



INIA
Instituto Nacional
de Investigaciones
Agrícolas

Zootecnia Tropical

ISSN: 0798 - 7269
AÑO 25 VOL. 25 No. 2 2007

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS - VENEZUELA

Carta al Editor

La autoría y su ética en publicaciones científicas

Ramón Silva-Acuña* y Berto Arias Rivas

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro de Investigaciones del estado Monagas. Maturín, estado Monagas, Venezuela. *Correo electrónico: rsilva@inia.gob.ve

En varias oportunidades hemos respondido de manera crítica la siguiente pregunta: ¿debemos incluir en una publicación científica a un colega como autor por haber ayudado en alguna tarea inherente al desarrollo del trabajo investigativo? Es fácil responder esta pregunta: autor es sin duda aquel que concibió y desarrolló el trabajo, planteó sus objetivos, ejecutó la metodología a seguir, es quien lidera el análisis estadístico de los datos y de manera crítica, revisa la versión final del artículo.

Nuestra respuesta ha tenido como base el concepto de autoría. Éste señala que una persona referida como autor debe estar cualificada para ello. Deben ser autores aquellos que participan, se involucran y trabajan sobre las hipótesis que serán probadas, en el análisis crítico de los resultados, en el diseño de la investigación, en la elaboración de una nueva metodología de análisis o de laboratorio o quien realice un importante modificación de métodos, técnicas de diagnóstico y quienes se involucraron en la redacción de la primera versión o revisión crítica importante del manuscrito y sobre todo, que tengan capacidad de justificar intelectualmente las conclusiones y discusión de los resultados.

Varias organizaciones internacionales (ICMJE, 1997; COPE, 2006; CSE, 2006)) han definido en forma muy clara el concepto de autoría: “El reconocimiento de autoría deberá basarse únicamente en contribuciones sustanciales en cuanto a los siguientes aspectos:

1. Concepción y diseño, o análisis e interpretación de datos.
2. Redacción o elaboración del borrador del artículo, o revisión crítica del contenido intelectual relevante.
3. Visto bueno definitivo de la versión a publicar”.

Justificar autorías basadas en razones diferentes a las condiciones indicadas, obviamente deben ser rechazadas.

Las investigaciones multicentros con proyectos, subproyectos y acciones propician el trabajo en equipo y suponen que la publicación final tendrá un autor colectivo. Pero sólo los miembros del equipo que clasifiquen como autores serán aquellos que han cumplido con la totalidad de los criterios antes mencionados; sin embargo, miembros del equipo con contribuciones aunque no sustanciales para la publicación, podrán figurar en la sección de “agradecimientos”.

Aquellas personas que faciliten datos de análisis de rutina, de diagramas, o tratamientos hechos de manera rutinaria, no deben ser considerados coautores porque sencillamente tales instrumentos no poseen valor científico agregado, sino que simplemente son informaciones de su trabajo. De manera similar, la misma consideración recibirán quienes den sugerencias en la manera como realizar la revisión bibliográfica, cual diseño experimental emplear, cual análisis conocido se debe aplicar o los que realicen críticas a la redacción que no interfieran en su contenido.

El orden de colocación de los autores obedece al grado de participación en el trabajo y podría ser decidida por consenso de los participantes o si es muy difícil definir el grado de participación, los nombres pueden ser colocados en orden alfabético.

Con todas estas explicaciones es posible aún que no se considere lo anteriormente señalado y se persista a ultranza en ser autor de la publicación. Esta autoría irresponsable no afecta la eficacia de la ciencia, pero sí corrompe la ética y la honestidad en el ambiente científico. Hoy, muchas revistas científicas respetuosas con sus articulistas exigen que se envíe un oficio al editor donde se expresa la manera en que cada autor participo en el artículo. ¿Porque esta exigencia? Primero, los que incluyen a colegas como coautores en demostración de amistad, agradeciéndoles favores, o esperando reciprocidad, cometen un error de gran importancia que fácilmente puede ser detectado si el editor solicita a uno de los autores una determinada información sobre el trabajo — que obviamente no conocerá — y segundo porque no hay fe de errata para los autores.

Hay que hacer una consideración particular sobre la ética. Esta tiene que ser un valor en el profesional de las ciencias y es violada tanto por quien paga un favor, como por aquel que acepta o reclama ser autor del trabajo por haber intervenido en un esquema de ayuda o sugerencia.

Otras aberraciones de la autoría irresponsable se observan cuando se incluye el nombre del jefe como autor en seminarios, conferencias y otros tipos de trabajos, bien sea por buscar agrados con el superior o porque se le exige al autor. Tal situación refleja la falta de ética y constituye un irrespeto hacia aquellos autores que si participaron activamente en el trabajo.

Por encima de todas las decisiones, debe prevalecer la honestidad y equidad, y solo así, la generación de conocimientos, innovaciones y aportes científicos de otras categorías le darán el valor intelectual a sus autores bajo la responsable participación en sus tareas del trabajo.

Con este ensayo sobre la autoría no se pretende agotar un tema tan importante del quehacer científico, sólo se desea clarificar el compromiso que significa trabajar en equipo para publicar los datos de nuestra investigación. Por otra parte, consideramos totalmente pertinente que los editores de las revistas científicas soliciten de los coautores su aporte en el manuscrito suministrado, para aumentar así la seriedad y calidad de la publicación final.

LITERATURA CITADA

ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors). 1997. Uniform requirement for manuscript submitted to biomedical journals. *J. Amer. Med. Assoc.*, 277: 927-934.

COPE (Committee on Publications Ethics). 2003. Guidelines on good publication practice. The COPE Report 2003, Londres, Inglaterra.

CSE (Council of Science Editors). 2006. CSE's White Paper on Promoting Integrity in Scientific Journal Publications. CSE Editorial Policy Committee. Reston, VA. USA.

SUMARIO Vol. 25 No. 2

Artículos científicos

- ALEMÁN D., ALFARO M. y HURTADO E. Efecto de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de cerdas 71
- ZEPPENFELD C. C., CASSOL P. C., MULLER L., ALVES DA CUNHA M., CARVALHO S. e HEDLUND B. A. Produção e composição do leite ovino durante as sete primeiras semanas de lactação..... 77
- MEDINA M. G., GARCÍA D. E., CLAVERO T. e IGLESIAS J. M. Estudio comparativo de *Moringa oleifera* y *Leucaena leucocephala* durante la germinación y la etapa inicial de crecimiento 83
- SALAMANCA G. G., CORREA C. I. L. y PRINCIPAL J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos 95
- SOARES C. M., HAYASHI C., FIGUEIREDO L. C. H. y GALDIOLI E. M. Níveis de proteína bruta e suplementação com levedura "Spray Dried" em rações associados a adubação orgânica no cultivo de alevinos de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) 103
- LUNA M., GRAZIANI C., VILLARROEL E., LEMUS M., LODEIROS C. y SALAZAR G. Evaluación de tres dietas con diferente contenido proteico en el cultivo de postlarvas del langostino de río *Macrobrachium rosenbergii* 111
- BRACAMONTE M., MORALES G. y PLAZA N. Efecto del levamisol sobre la generación de anticuerpos antirrábicos en ovejas vacunadas al tercer mes de gestación 123
- SAUME E., SOGBE E., CASTRO M. J. y ASCANIO M. Estudio comparativo de tres cepas vacunales del virus causante de la enfermedad de la bursa en pollos de engorde 129
- Notas Técnicas**
- CASTRO A. R.; COVA L. J., GARCÍA D. E. y MEDINA M. G Efecto de la cáscara de huevo en la producción de cápsulas de la lombriz roja (*Eisenia andrei*) 135
- NAVARRO R. D., DE OLIVEIRA A. A., RIBEIRO F. P.O., PORTILHO C.F., SILVA P. F. K., y SANTOS L. C. Reprodução induzida de curimatá (*Prochilodus affinis*) com uso de extrato bruto hipofisário de rã touro (*Rana catesbeiana*) 143

TABLE OF CONTENTS Vol. 25 No. 2

Scientific articles

ALEMÁN D., ALFARO M., and HURTADO E. Effect of semen temperature on the reproductive performance of sows.....	71
ZEPPENFELD C. C., CASSOL P. C., MULLER L., ALVES DA CUNHA M., CARVALHO S., and HEDLUND B. A. Production and composition of ovine milk during the first seven weeks of lactation.....	77
MEDINA M. G., GARCÍA D. E., CLAVERO T., and IGLESIAS J.M. Comparative study of <i>Moringa oleifera</i> and <i>Leucaena leucocephala</i> during the germination and initial stage of growth.....	83
SALAMANCA G. G., CORREA C. I. L., and PRINCIPAL J. Flavonoids profile and oxidation indexes for some Colombian propolis.....	95
SOARES C. M., HAYASHI C., FIGUEIREDO L. C. H., and GALDIOLI E. M. Crude protein level and dry yeast in diet combined with organic fertilizer in Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) fingerling rearing.....	103
LUNA M., GRAZIANI C., VILLARROEL E., LEMUS M., LODEIROS C., and SALAZAR G. Evaluation of three diets with different protein content in the culture of river prawn postlarvae, <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	111
BRACAMONTE M., MORALES G., and PLAZA N. Effect of levamisole on antibody generation in sheep vaccinated against rabies during the third month of pregnancy.....	123
SAUME E., SOGBE E., CASTRO M. J., and ASCANIO M. Comparative study of three vaccine strains of the virus that affect the bursa in broilers.....	129

Technical Notes

CASTRO A. R.; COVA L. J., GARCÍA D. E., and MEDINA M. G. Effect of egg shell in capsule production of the red worm (<i>Eisenia andrei</i>).....	135
NAVARRO R. D., DE OLIVEIRA A. A., RIBEIRO F. P.O., PORTILHO C.F., SILVA P. F. K., and SANTOS L. C. Induced spawning of curimatá (<i>Prochilodus affinis</i>) with use of hypophyseal raw extract of bull frog (<i>Rana catesbeiana</i>).....	143

Efecto de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de cerdas

Daniela Alemán¹, Mayra Alfaro¹ y Ernesto Hurtado^{2*}

¹ Universidad de Oriente. Escuela de Zootecnia. Departamento de Producción Animal. Maturín, Monagas, Venezuela.

² Universidad de Oriente. Escuela de Zootecnia Departamento de Biología y Sanidad Animal. Apartado Postal 6201 Maturín, Monagas, Venezuela. *Correo electrónico: ernestohurtado@cantv.net

RESUMEN

Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura del semen en cerdas nulíparas, primíparas y multíparas sobre su respuesta reproductiva, se utilizaron 91 cerdas mestizas de las razas Yorkshire y Landrace, en una granja comercial ubicada en Sabaneta, estado Monagas, Venezuela. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 3 x 2. Los factores identificados fueron: categoría de parto (nulíparas, primíparas y multíparas) y temperatura del semen (37 y 16-18°C). Las variables dependientes medidas fueron: Porcentaje de partos (PP), número de lechones nacidos vivos (NLNV) y número de lechones nacidos totales (NLNT). Los datos se analizaron mediante análisis de la varianza, por el método de los mínimos cuadrados, con un modelo lineal de efectos fijos, para desigual número de observaciones. Se observó efecto ($P < 0,05$) de la interacción categoría de parto x temperatura del semen sobre el porcentaje de partos. Los valores promedios encontrados para todas las cerdas fueron: 79,1% para 37°C y 55,4% para 16-18°C; mientras que el mayor promedio (85,6%) en la interacción ocurrió en las cerdas nulíparas inseminadas con semen a 37°C. El NLNV y NLNT no presentaron diferencias ($P > 0,05$) entre los factores bajo estudio. En conclusión la interacción categoría de parto x temperatura del semen afecta la respuesta reproductiva (porcentaje de partos).

Palabras clave: cerdas, temperatura del semen, respuesta reproductiva.

Effect of semen temperature on the reproductive performance of sows

ABSTRACT

With the purpose of evaluating the effect of semen temperatures on the reproductive performance of nuliparous, primiparous, and multiparous females, it was used 91 Yorkshire x Landrace half-breed sows, in a commercial farm located in Sabaneta, Monagas state, Venezuela. The treatments were distributed in a factorial arrangement (3x2) on a complete random design. The factors were categories of parturition (nuliparous, primiparous, and multiparous) and semen temperatures (37, and 16-18°C). The dependent variables were farrowing rate (FR), number of piglets born alive (NPBA), and number of total born piglets (NTBP). The data were analyzed through variance analysis by the method of the minimum squares, with a lineal model of fixed effects, for unequal number of observations was applied. It was observed an effect ($P < 0.05$) of the interaction categories of parturition x semen temperature on the farrowing rate. The mean values found for all sows were: 79.1% for 37°C and 55.4% for 16-18°C. While larger average (85.6%) in interactions occurred in nuliparous sows inseminations with semen at 37°C. The NPBA and NTBP did not present difference ($P > 0.05$) in factors of study. In conclusion, interaction categories of parturition x semen temperature affect reproductive answer (farrowing rate).

Keywords: sows, semen temperature, reproductive performance.

INTRODUCCIÓN

El éxito de un sistema de explotación porcina depende principalmente de un manejo reproductivo adecuado. En el ámbito mundial y nacional la inseminación artificial porcina es una técnica que ha innovado los sistemas de producción de carne de cerdo.

La evolución sostenida de esta técnica en la práctica se ha debido a los resultados obtenidos a nivel de granjas y la disminución de los costos de producción. Esta ha experimentado nuevos avances, que van desde sus inicios basados en el uso de semen a temperatura de 37°C hasta la utilización de sistemas de inseminación artificial intrauterina con bajas dosis seminales. Tales avances tecnológicos contribuyen a establecer una ganadería porcina rentable como consecuencia de una eficiente producción anual de carne, la cual se obtiene como resultado de un mayor número de lechones producidos por cerda al año. En Venezuela, desde los años 70 la inseminación artificial a nivel experimental ha tenido resultados satisfactorios, lo que dio base a la implementación de la técnica a nivel de granjas comerciales (Fuentes, 2000).

Actualmente en el mundo, el 99% de las inseminaciones realizadas emplean un método de conservación en donde el semen permanece de uno a cinco días a temperatura de 15 a 20°C, conservándose de forma ideal. Por debajo de 14°C se presentan alteraciones de la membrana del espermatozoide repercutiendo en el poder fecundante de este. Temperaturas por encima de los 20°C disminuyen enormemente la vida útil del semen (Hafez y Hafez, 2002). Variaciones de 1 a 2°C pueden afectar la calidad del semen ya que es particularmente sensible a los cambios térmicos, por lo que se hace necesario conservarlo a 17°C y evitar fluctuaciones en la temperatura (Gordon, 1999).

La conservación del semen refrigerado depende principalmente del diluyente, ya que contribuye a preservar las características funcionales de las células espermáticas manteniendo el nivel de fertilidad del eyaculado. El semen refrigerado se puede conservar a temperaturas entre 15 y 18°C. Estas temperaturas son las más utilizadas tanto en los Centros de inseminación artificial como en las explotaciones porcinas. Además el uso de BTS (diluyente ampliamente conocido en Europa y actualmente en Venezuela) permite mantener viable el material

espermático a 17°C durante unos 5 días, con un porcentaje de preñez en muchos casos superior al 80% (Fuentes, 2001).

La literatura reporta una serie de resultados que indican la importancia de la temperatura del semen en la respuesta reproductiva de la cerda. Tonieto *et al.* (2003) señalaron como práctica común el uso de semen conservado a una temperatura entre 15 - 18°C hasta el tercer día después de la colecta y la dilución, debido a las dificultades de mantenimiento y almacenamiento de semen por un lapso mayor a tres días. Jonson *et al.* (2000) señalan que la temperatura utilizada en la conservación de semen porcino es de 15°C, mientras que Fuentes (2000) recomienda inseminar las cerdas con semen fresco conservado durante (24 - 48 h), en nevera a una temperatura entre 17 - 18°C para alcanzar las más altas tasas de concepción y buen tamaño de la camada.

Todo indica que mediante el uso de la inseminación artificial, los productores y estudiosos del cerdo tienen la posibilidad de obtener grandes provechos, permitiendo adquirir de ésta forma destreza y práctica en el manejo de una técnica que día a día es utilizada a nivel mundial. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta reproductiva en cerdas de distintos partos utilizando semen a dos temperaturas al momento de la inseminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Unidad de producción y animales

En una granja comercial de ciclo completo, ubicada en Sabaneta, estado Monagas, Venezuela, localizada a 09° 45' N y 63° 27' O y a una altura de 145 msnm; se evaluaron 91 cerdas mestizas de las razas Yorkshire y Landrace, de diferente número de partos, las cuales recibieron dos servicios. Se utilizó semen proveniente de ocho verracos terminadores de las razas Duroc, Yorkshire, Landrace y Hampshire pertenecientes a la granja, que fueron alimentados con alimento balanceado elaborado por la agroindustria a razón de 2,5 kg/animal/d.

Colecta de semen y manejo reproductivo

El semen se recolectó durante dos períodos del día (6:30 am y 5:00 pm), de acuerdo a la técnica empleada en la granja. Se recolectó el semen del cerdo usando guantes de polivinilo, la primera parte del eyaculado fue desechada (pre-espermatozoide) y

posteriormente la fracción rica en espermatozoides en un recipiente precalentado fue recolectada. Siempre dejando que el cerdo complete su eyacuación (5-8 minutos). Luego se procedió a la evaluación seminal: macroscópica (pH, color y volumen) y microscópica (vitalidad, motilidad, atipias espermáticas y concentración).

Se realizó la dilución del semen en 46,45 g de diluyente comercial, Beltsville Thawing Solution (BTS), el cual fue previamente diluido en un litro de agua destilada y calentado en un matraz en baño de María. Una vez diluido el semen, se procedió a envasar con dosis de 70 mL. Las dosis utilizadas eran homoespéricas. Para efecto de la inseminación artificial tradicional se usó inmediatamente. En el caso del semen conservado, las dosis una vez envasadas, se dejaron reposar por 30 min y luego fueron llevadas a una nevera equipada con un termostato que permitió mantener la temperatura entre 16 a 18°C por un período inferior a 48 h. Para ambos tratamientos se utilizaron 5×10^9 espermatozoides por dosis.

Se realizaron dos detecciones de celo (a.m. y p.m.). La inseminación con semen a 37°C (tradicional) y 16 - 18°C fue efectuada por el mismo inseminador a las 12 y 24 h después de confirmado el celo.

Análisis estadístico

El diseño utilizado fue un completamente al azar con un arreglo de tratamientos factorial 3 x 2 siendo los factores o variables independientes: Categoría de parto (14 nulíparas, 23 primíparas y 54 multíparas) y temperatura del semen (37 y 16 - 18°C). Las variables dependientes a medir fueron: Porcentaje de partos, número de lechones nacidos vivos y número de lechones nacidos totales. Los datos obtenidos se analizaron a través de ANAVA por medio del procedimiento GLM (SAS, 1998), para desigual número de observaciones y se realizaron comparaciones múltiples (mínima diferencia significativa) a los factores significativos. Para evaluar el porcentaje de partos se le asignó el valor de uno (1) a la cerda que parió y cero (0) a la cerda que no parió y se reportó como porcentaje: (Número de cerdas que parieron / número de cerdas servidas) x100.

El modelo lineal aditivo con efectos fijos fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Observación k-ésima del i-ésimo nivel del factor temperatura del semen y j-ésimo nivel del factor categoría de parto.

μ = media teórica de la población.

α_i = Efecto de la temperatura del semen, donde "i" = (1, 2).

β_j = Efecto del categoría de parto, donde "j" = (1, 2, 3).

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto de interacción temperatura del semen "i" con la categoría de parto "j".

ε_{ijk} = Efecto del error experimental con media cero y varianza común.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medias ajustadas y los errores estándar de las variables: Porcentaje de partos, número de lechones nacidos vivos y número de lechones nacidos totales se muestran en la Cuadro 1. Estos resultados generales en el porcentaje de partos difieren con los reportados por Millán (1996), Alfaro (1996) y Zapata (1996) posiblemente debido a la aplicación de la técnica de la inseminación artificial.

Porcentaje de partos

El porcentaje promedio de partos calculado fue afectado significativamente ($P < 0,05$) por la interacción categoría de parto x temperatura del semen (Cuadro 2). Se observa que los mayores valores lo presentaron las cerdas nulíparas inseminadas con semen a 37°C y las cerdas multíparas inseminadas con semen entre 16 y 18°C. Sin embargo, resultados superiores fueron reportados por Alfaro (1996) en cerdas inseminadas con semen a 37°C en cerdas multíparas, mientras que experiencias recientes realizadas por Leyún (2004) han demostrado la efectividad del uso de semen a 17°C al compararlo con el semen aplicado a 37°C, en cerdas multíparas.

La leve superioridad observada en las cerdas nulíparas a 37°C pudiera atribuirse a la condición fisiológica y morfológica como consecuencia del estricto programa de selección que se realiza en la explotación. La mejor respuesta en las cerdas multíparas sobre las primíparas coincide con lo reportado por Leyún (2004).

Cuadro 1. Medias ajustadas y errores estándar para las variables estudiadas.

Variable	n	Media	EE
Partos (%)	91	67,03	4,49
Lechones nacidos vivos	61	8,68	2,62
Lechones nacidos totales	61	9,57	2,56

Cuadro 2. Medias mínimos cuadráticas y error estándar de las combinaciones temperatura del semen x categoría de parto para el porcentaje de partos.

Temperatura del semen (°C)	Categoría de parto	n	Promedio de partos† %	EE
37	Nulíparas	7	85,57a	1,64
	Primíparas	14	84,57a	1,16
	Múltiparas	26	69,07a	0,85
16-18	Nulíparas	7	28,57b	1,64
	Primíparas	9	44,57ab	1,45
	Múltiparas	28	78,14a	0,82

Es importante señalar que esta diversidad de resultados esta asociado a la viabilidad espermática como consecuencia posiblemente de los efectos ambientales y el componente hembra (salud, raza, dieta, condición de celo, etc.)

Número de lechones nacidos vivos y número de lechones nacidos totales

Los resultados obtenidos en estas condiciones permiten inferir que la variable porcentaje de partos puede ser afectada por la temperatura del semen y categoría de parto. No así para número de lechones nacidos vivos y nacidos totales. Se recomienda realizar nuevas investigaciones a fin aportar resultados que se puedan comparar con esta experiencia.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en estas condiciones permiten inferir que la variable porcentaje de partos puede ser afectada por la temperatura del semen y categoría de parto. No así para número de lechones nacidos vivos y nacidos totales. Se recomienda realizar nuevas investigaciones a fin aportar resultados que se puedan comparar con esta experiencia.

LITERATURA CITADA

Alfaro M. 1996. Parámetros productivos y tasa de parición de cerdas primíparas y múltiparas sometidas a monta natural e inseminación artificial. Trabajo de Ascenso. Universidad de Oriente. Escuela de Zootecnia. Maturín, Venezuela.

- Fuentes A. 2000. Inseminación artificial porcina en Venezuela. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Serie C. No. 47. Maracay, Venezuela.
- Fuentes A. 2001. Resultados experimentales en el manejo reproductivo del verraco. INIA, Serie E, No. 8. Maracay. Venezuela.
- Gordon I. 1999. Reproducción Controlada del Cerdo. Acribia. Zaragoza, España.
- Hafez E. y B. Hafez. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Domésticos. 7^{ma} ed. Editorial Interamericana. México.
- Jonson L., K. Weitze, P. Isiser y W. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci., 62: 143-172.
- Leyún M. 2004. Estudio comparado de diferentes sistemas de aplicación de semen porcino. Revista Navarra Agraria. ITG. Ganadero. 144: 41-48
- Millán J. 1996. Estudio de parámetros productivos y reproductivos en cerdas primíparas y multíparas sometidas a monta natural e inseminación artificial. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente. Escuela de Zootecnia. Maturín, Venezuela.
- SAS. 1998. User's Guide Statistics. Version 6.01. SAS. Inst. Inc. Cary, N.C.
- Tonieto S., C. Gonçalves, M. Nunes, T. Lucia e I. Bianchi. 2003. Composição e funções de diluentes para o acondicionamento de semen suino. Rev. Téc. Suinocultura, 5: 14-16
- Zapata M. 1996. Evaluación de parámetros productivos y reproductivos en cerdas primíparas y multíparas servidas con monta natural e inseminación artificial. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente. Escuela de Zootecnia. Maturín, Venezuela.

Produção e composição do leite ovino durante as sete primeiras semanas de lactação

Carla Cristina Zeppenfeld*, Cleber Cassol Pires, Liziany Muller,
Mauro Alves da Cunha, Sergio Carvalho e Andriéle Hedlund Bandeira

Universidade Federal de Santa Maria. Rua Casemiro de Abreu 43, Santa Maria RS. 97045-120, Brasil. *Correio electrónico: carlazoot@yahoo.com.br

RESUMO

Com objetivo de avaliar a produção e composição do leite ovino em relação a dois sistemas de alimentação e durante as primeiras sete semanas de lactação, realizou-se este trabalho no Departamento de Zootecnia na Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Foram utilizadas 10 ovelhas e suas filhas distribuídas aleatoriamente, 24 horas após o nascimento, em dois tratamentos: ALIM1: ovelhas alimentadas com silagem de sorgo e concentrado na proporção volumoso: concentrado 80:20 na matéria seca, e ALIM2: ovelhas alimentadas com silagem e concentrado na proporção volumoso: concentrado 60:40 na matéria seca. A produção de leite das ovelhas foi avaliada durante sete semanas, pelo método de dupla pesagem indireto, onde foram coletas as amostras de leite para determinação de gordura e lactose. As ovelhas da ALIM2 tiveram uma maior produção de leite do que as da ALIM1, apresentando produções de 1,50 e 1,36 kg/d, respectivamente. Para a percentagem de gordura a ALIM1 obteve valores de 3,11% e 2,56% para a ALIM2 e para lactose a ALIM1 obteve maiores valores sendo de 4,74 e 4,56%, respectivamente. O tratamento ALIM2 foi o que apresentou melhores resultados em produção de leite no período considerado.

Palavras chave: gordura, lactose, leite, ovelha.

Production and composition of ovine milk during the first seven weeks of lactation

ABSTRACT

Aiming to evaluate the production and composition of ovine milk in relation to two feeding systems, during the first seven weeks of lactation, this project took place in the Department of Zootechny at the Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Ten sheep were used and their respective daughters were randomly distributed, 24 hours after birth, in two treatments: ALIM1: sheep fed with sorghum silage and concentrate in the ratio voluminous: concentrate 80:20 as dry matter, and ALIM2: sheep fed with silage and concentrate in the ratio voluminous: concentrate 60:40 as dry matter. The production of milk from the sheep was evaluated during seven weeks, using the indirect double weighing method, in which samples of milk were collected to determine fat and lactose values. The ALIM2 sheep had a higher production of milk than ALIM1 sheep, showing productions of 1.50 and 1.36 kg/d, respectively. For fat percentage, the sheep fed with ALIM1 showed values of 3.11 and 2.56% for ALIM2, and for lactose the ALIM1 sheep showed higher values, which were 4.74 and 4.56%, respectively. The ALIM2 treatment demonstrated better results in milk production, in the considered period.

Keywords: fat, lactose, milk, sheep.

INTRODUÇÃO

A produção de leite das ovelhas constitui-se um fator primordial nas primeiras semanas de vida dos cordeiros, pois seu desenvolvimento depende em grande parte do aleitamento. Nos últimos anos, tem aumentado a necessidade em mudar o sistema extensivo de criação de ovinos para um sistema mais intensivo, devido aos baixos índices de produtividade do rebanho ovino brasileiro. Com esta mudança, aumentou o interesse em pesquisar a produção e a composição do leite de pequenos ruminantes (Fuente *et al.*, 1997).

Muitos fatores que contribuem para as variações na produção e na qualidade do leite de ovelhas têm sido descritos, tais como, o ambiente, a raça, idade da ovelha, estágio da lactação, número de cordeiros, técnicas de ordenha, estado sanitário, infecções de úbere, manejo do rebanho e nível nutricional durante a gestação e lactação (Peeters *et al.*, 1992; Bencini e Pulina, 1997).

Segundo Hassan (1995) o cruzamento de raças nativas com raças de elevada produção, seja ela de carne ou de leite, é o método mais rápido para melhorar a eficiência do rebanho. Entretanto, nem sempre isto é possível, devido aos problemas da importação de animais. Neste caso, é importante conhecer a produção de leite das raças locais e tentar selecionar para elevar a produção das mesmas. Elevar a produção de leite da mãe significa acelerar o ganho de peso na fase pré-desmame (Lewis *et al.*, 1990). Para cordeiros na fase pré-desmame, a suplementação com alimentos sólidos é importante para estimular o desenvolvimento do rúmen e, também, para suprir as exigências nutricionais, principalmente dos cordeiros com baixo consumo de leite (Santra e Karim, 1999). Esses autores relatam que um teor de 18% de PB na ração do *creep feeding*, oferecida à vontade para cordeiros em aleitamento, resultou em uma melhor eficiência alimentar, e um ganho médio diário de peso na fase pré-desmame de 140g. O experimento foi realizado em uma região de clima semi-árido, onde a exigência de proteína é superior, quando comparada com a de cordeiros em regiões de clima temperado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e composição do leite ovino em relação a dois sistemas de alimentação e durante as primeiras sete semanas de lactação.

MATERIALES E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Ovinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil, durante o período de julho de 2001 à fevereiro 2002. A Universidade está localizada na região fisiográfica denominada Depressão Central, a 53° 42' O, 29° 42' S e 95 metros de altitude com precipitação média anual de 1763 mm, com 19,2°C de temperatura média anual. O clima é do tipo Cfa, subtropical, variedade "sempre úmido" (Rambo, 1994).

De acordo com a Estação Meteorológica de Santa Maria, durante o período experimental a temperatura média mensal foi de 15,5°C, a precipitação média mensal de 254,6 mm e precipitação total de 1782 mm, com umidade relativa média mensal do ar de 83%.

Foram utilizadas 10 ovelhas Texel, confinadas com suas respectivas filhas em baias individuais, cobertas e com piso ripado com aproximadamente um metro acima do solo, as juaqueiras eram providas de comedouro e bebedouro. Os comedouros das ovelhas foram levantados a uma altura de modo que as cordeiras não conseguissem alimentar com as mães. As cordeiras em cada baia, tiveram acesso à alimentação privativa "*creep feeding*". Este procedimento permitiu avaliar o consumo de sólido da ovelha e cordeira separadamente. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos com cinco repetições cada, sendo ALIM 1: ovelhas com alimentação de silagem de sorgo e concentrado na proporção de volumoso: concentrado 80:20 na matéria seca, e ALIM 2: ovelhas com alimentação de silagem de sorgo e concentrado na proporção de volumoso: concentrado 60:40 na matéria seca.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 8:00 e 16:00 h, sendo que as quantidades de ração foram ajustadas pelas sobras do dia anterior que eram retiradas e pesadas antes do arraçoamento pelo turno da manhã, considerando uma sobra de 15%. A dieta em ambos os tratamentos foi calculada de maneira a atender as exigências de proteína bruta de ovelhas em lactação conforme NRC (1985), Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem dos ingredientes e a composição bromatológica da dieta.

Ingredientes	ALIM 1	ALIM 2
	----- % -----	
Silagem de sorgo	80	60
Milho moído	0,8	14,4
Farelo de soja	19,0	25,2
Fosfato bicálcico	0,2	0,4
Proteína bruta	13,96	13,22
Nutrientes digestíveis totais	61,56	65,28
Fibra detergente neutra	56,30	45,39
Fibra detergente ácida	32,09	25,75

A produção de leite das ovelhas foi avaliada durante sete semanas pelo método de dupla pesagem (indireto), proposto por Doney *et al.* (1979). As cordeiras foram pesadas antes e após a mamada, isto é, às 0:00; 8:00 e 16:00h, semanalmente, mantendo para isso as mesmas separadas oito horas antes de suas respectivas mães. As amostras de leite foram coletas antes das mamadas, manualmente, num volume de 10 ml. As análises de composição do leite foram realizadas na Usina de Laticínios (Coprol) onde a determinação da lactose foi realizada pelo método de Licor de Feeling e determinação da gordura pelos métodos de Gerber e Milko tester 3.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Para análise estatística dos dados foi realizada a análise de variância, sendo que para os dois sistemas de alimentação realizou-se o teste F ao nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS (SAS, 1993) no Núcleo de Processamento de Dados da Universidade Federal de Santa Maria

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios da produção de leite semanal, percentagem de gordura, percentagem de lactose em

função das duas dietas estão na Tabela 2. Para produção de leite, observou-se que as ovelhas alimentadas com uma menor proporção volumoso (ALIM 2), tiveram uma maior produção de leite ($P < 0,05$) do que as alimentadas com uma maior proporção volumoso (ALIM 1). Carvalho (2002), trabalhando com cabras, observou que estas quando alimentadas com maior porcentagem de FDN foram as que tiveram uma menor produção e que o efeito do nível de fibra da dieta sobre a produção de leite ocorre de forma direta, comprometendo a produção.

Sabe-se que o consumo é influenciado por vários fatores. Neste trabalho o principal aspecto foi a relação volumoso:concentrado que levou a diferentes teores de fibra (FDN) sendo este o principal fator de variação do consumo por ruminantes, a involução uterina pode ter influenciado em parte, porém não é o principal aspecto de limitação do consumo. Além disso, os animais estavam na mesma condição fisiológica e, mesmo que a involução uterina possa influenciar, são necessários estudos específicos para avaliar qual a melhor relação volumoso:concentrado para ser utilizada na fase inicial de lactação de ovelhas.

Tabela 2. Valores médios para produção de leite (PL), gordura e lactose, nos métodos de alimentação relação volumoso concentrado 80:20 (ALIM 1) e relação volumoso concentrado 60:40 (ALIM 2).

	PL	Gordura	Lactose
	kg	----- % -----	
ALIM 1	1,36	3,11	4,56
ALIM 2	1,50	2,56	4,74
CV (%)	7,91	34,20	8,70
F	2,45	6,45	14,96
P>F	0,0001	0,0053	0,0001

As ovelhas alimentadas com a ALIM 1 tiveram um maior teor de gordura no leite do que as da ALIM 2, com valores de 3,11 e 2,56%, respectivamente. Este resultado pode ser explicado por Carvalho (2002), o qual conclui que reduções nos teores de fibra da dieta levam a diminuição no tempo gasto de mastigação (comendo e ruminando) e, como conseqüência, a redução do pH ruminal, em função de menor fluxo de saliva para o rúmen, reduzindo, por conseguinte o fluxo de substância tamponantes. Isso proporciona um ambiente ruminal desfavorável para o crescimento de microrganismo celulolíticos, o que leva a redução da relação acetato: propionato e como, conseqüência a redução do teor de gordura do leite. No entanto, Motta (2000) não verificou diferença significativa ($P>0,05$) entre percentagem de gordura no leite de ovelhas e também entre os animais que receberam concentrado comparados aos que não receberam concentrado.

Para a percentagem de lactose na ALIM 2, constatou-se que esta possui maior valor que a ALIM 1, ($P<0,05$), com valores de 4,74 e 4,56%, respectivamente. Este valor é explicado pois a ALIM 2 possuía maior proporção de concentrado na dieta, sendo assim ocorre um maior tempo de permanência deste alimento no rumem o que proporciona maior formação de ácido propiônico, sendo este precursor da formação de glicose no fígado, lá coala na glândula mamaria transforma-se em lactose que é a precursora na produção de leite.

Há uma correlação negativa entre a produção e a gordura. Portanto, quando as ovelhas produzem mais leite, a concentração de gordura diminui. Esta relação é válida entre as raças de alta e baixa produção, bem

como entre animais de maior ou menor produção de leite em um rebanho e, dentro de um mesmo animal, durante os diferentes estágios da lactação (Bencini e Pulina, 1997).

Os valores médios encontrados para gordura foram de 3,11% para ALIM 1 e 2,56% par ALIM 2 sendo que estes valores discordam com o encontrado por Corbett (1968), que este relata a média de 7,39% na primeira semana de lactação, 6,60% para a segunda semana, 7,35% para a terceira e 7,82% na quarta semana de lactação. O autor trabalhou com ovelhas da raça Merino em pastagem cultivada.

Silva *et al.* (1999), trabalhando com diferentes grupos genéticos, obteve para ovelhas $\frac{1}{2}$ Bergamácia + $\frac{1}{2}$ Corriedale, com média de 1,08 kg/d, para $\frac{1}{2}$ Hampshire Down + $\frac{1}{2}$ Corriedale com média de 0,72 kg/d e para Corriedale média de 0,53 kg/d. O autor conclui que a produção de leite sofre efeitos do grupo genético, sugerindo o uso de reprodutores da raça Bergamácia para cobrir ovelhas Corriedale, com objetivo de produzir ovelhas mestiças com maior aptidão leiteira.

Motta (2000) e Roda *et al.* (1987) observaram que na terceira e quarta semanas de lactação as ovelhas produziram mais leite, e os animais com acesso ao concentrado produziram maior quantidade de leite. Para Bencini e Pullina (1997), depois do pico, o declínio da lactação pode ocorrer mais ou menos rapidamente em função do genótipo ou do potencial individual para produção de leite.

De acordo com Peeters et al (1992) nas ovelhas que permanecem com os cordeiros, o declínio na curva de lactação é explicado pela diminuição da intensidade

de sucção dos cordeiros, devido ao comportamento da mãe em restringir a amamentação. Ramsey et al. (1994) acrescentaram que o consumo de leite é um importante fator que influencia o crescimento durante as primeiras 3 a 4 semanas de vida. Entretanto, após o pico de lactação, o consumo de forragem pelos cordeiros aumenta para compensar o decréscimo no consumo de leite. Porém, a inter-relação entre o consumo de forragem e o consumo de leite não é bem conhecida.

CONCLUSÕES

A alimentação influi na produção e composição do leite ovino, sendo que com uma menor relação volumosa: concentrado obtém-se uma maior produção de leite.

LITERATURA CITADA

- Bencini R. e G. Puliuna. 1997. The quality of sheep milk: a review. *Wool Tech. Sheep Breeding*, 45: 182 – 220.
- Carvalho S. 2002. Decomposição e comportamento ingestivo de cabras em lactação alimentada com dietas contendo diferentes níveis de fibra. Tesis Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Zootecnia. Brasil.
- Corbett J.L. 1968. Variation in the yield and composition of milk of grazing Merino ewes. *J. Agric. Res.*, 19(2): 283-94.
- Doney J.M., J.N. Peart, N.F. Smith e F. Louda. 1979. A consideration of the techniques for estimation of milk yield by suckled sheep and a comparison of estimates obtained by two methods in relation to the effect of breed, level of production and stage of lactation. *J. Agric. Sci.*, 92(1): 123-132.
- Fuente L.F., P.F. San, J.A. Fuertes e C. Gonzalo. 1997. Daily and between-milking variations and repeatabilities in milk yields, somatic cell count, fat, and protein of dairy ewes. *Small Ruminant Res.*, 24: 133 – 139.
- Hassan H.A. 1995. Effects of crossing and environmental factors on production and some constituents of milk in Ossimi and saidi sheep, and their crosses with Chios. *Small Ruminant Res.*, 18: 165 – 172.
- Lewis J.M., T.J. Klopfenstein e R.A. Stock. 1990. Evaluation of intensive vs. extensive systems of beef production and the effect of level of beef cow milk production on postweaning performance. *J. Animal Sci.*, 68: 2517-2524.
- Motta O.S. 2000. Ganho de peso, características da carcaça de cordeiros(a) em diferentes métodos de alimentação, pesos de abate e produção de leite das ovelhas. Dissertação Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.
- NRC. 1985. Ruminant Nitrogen Usage, National Academies Press, Washington, D.C.
- Peeters R., N. Buys e L. Robijns. 1992. Milk yield and milk composition of Flemish milksheep, Suffolk and Texel ewes and their crossbreeds. *Small Ruminant Res.*, 7: 279-288.
- Roda D.S., W. Dupas e L.E. Santos. 1987. Produção de leite de ovelhas Ideal e Corriedale e desenvolvimento do cordeiro. *Boletim Industria Animal*, 44(2): 297-307.
- Ramsey W.S., P.G. Hatfield, J.D. Wallace e G.M. Southward. 1994. Relationships among ewe milk production and ewe and lamb forage intake in Targhee ewes nursing single or twin lambs. *J. Animal Sci.*, 72: 811-816.
- Rambo B.A. 1994. Fisionomia do Rio Grande do Sul. São Leopoldo. Unisinos.
- Santra A. e S.A. Karim. 1999. Effect of protein levels in creep mixture on nutrient utilization and growth performance of pre-weaned lambs. *Small Ruminant Res.*, 33: 131-136.
- SAS Institute. 1993. SAS User's Guide: Statistics. Ver. 6.8, Cary, NC, USA.
- Silva E.C., E.N. Martins e F.A.F. Macedo. 1999. Avaliação da produção de leite de ovelhas Corriedale puras e mestiças. Anais Reunião Anual da Sociedade brasileira de Zootecnia, Porto Alegre, SBZ. Brasil.

Estudio comparativo de *Moringa oleifera* y *Leucaena leucocephala* durante la germinación y la etapa inicial de crecimiento

María Gabriela Medina^{1*}, Danny Eugenio García², Tyrone Clavero³ y Jose Manuel Iglesias⁴

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Estación Experimental Trujillo, Pampanito, Trujillo. Venezuela. *Correo electrónico: mgmedina@inia.gob.ve

² Estación Experimental y de Producción Agrícola "Rafael Rangel", Universidad de Los Andes, Trujillo, Venezuela

³ Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Maracaibo, Zulia, Venezuela

⁴ Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar la germinación, la altura de la planta, el diámetro del tallo, número, longitud y diámetro de las ramas, la cantidad de hojas por rama y la tasa de crecimiento; la sobrevivencia e incidencia de plagas y enfermedades de *Moringa oleifera* y *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham, se llevó a cabo un experimento en la Estación Experimental y de Producción Agrícola "Rafael Rangel" en el estado Trujillo, Venezuela. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 20 réplicas por especie. Durante el periodo experimental, *M. oleifera* presentó una germinación y sobrevivencia de 100%; mientras que *L. leucocephala* mostró porcentajes levemente inferiores (95%, en ambos casos). Al final de la evaluación se observaron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) a favor de *M. oleifera* en el diámetro del tallo y ramas, la longitud de la rama y la cantidad de hojas por rama. No obstante, la altura de la planta, la cantidad de ramas y la tasa de crecimiento no mostraron diferencias significativas. *M. oleifera* fue inmune a plagas y enfermedades; sin embargo *L. leucocephala* se consideró resistente. Aun cuando *M. oleifera* exhibió mejor comportamiento que *L. leucocephala* en la mayoría de los indicadores medidos, ambas presentaron un satisfactorio crecimiento en la fase de vivero. Teniendo en cuenta los resultados, *M. oleifera* y *L. leucocephala* pueden ser transplantadas al campo a partir de la séptima y la décima semana, respectivamente.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, *Leucaena leucocephala*, propagación, fase de vivero, comportamiento inicial, crecimiento.

Comparative study of *Moringa oleifera* and *Leucaena leucocephala* during the germination and initial stage of growth

ABSTRACT

An experiment was carried out in "Rafael Rangel" Agricultural Production and Experimental Station, Trujillo state, Venezuela, in order to evaluate the germination, height, stem diameter, number, longitude and diameter of branch, quantity of leaves/branch, rate of growth; survival percentage, and plagues and diseases incidence of *Moringa oleifera* and *Leucaena leucocephala*. A totally randomized design with 20 replications/species was used. During the experimental period germination and survival of 100% in *M. oleifera* were showed; while inferior percentages (95 and 95%, respectively) in *L. leucocephala* were observed. At the end of evaluation, statistical differences were observed for *M. oleifera* in the stem and branch diameter, longitude of branch and quantity of leaves/branch. Nevertheless, the height, the quantity of branches, and the growth rate did not show substantial differences. *M. oleifera* was immune to plagues and diseases attack, and *L. leucocephala* was considered resistant. In general, *M. oleifera* exhibited better behavior than *L. leucocephala* in most of the

measured indicators, and both species showed a satisfactory growth in the nursery phase. *M. oleifera* and *L. leucocephala* could be transplanted from the seventh and tenth week, respectively.

Keywords: *Moringa oleifera*, *Leucaena leucocephala*, propagation, nursery condition, initial performance, growth.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, *Leucaena leucocephala* (Lam. de Wit) constituye la especie más utilizada y estudiada en las condiciones tropicales como fuente alternativa para la alimentación animal en sistemas silvopastoriles (Toral, 2005). Esta leguminosa, entre otras arbóreas, se destaca por presentar una amplia distribución geográfica, rápida adaptación a condiciones contrastantes de clima y suelo y elevada calidad de su biomasa. Sin embargo, existen otras especies con características similares que no han sido evaluadas en igualdad de condiciones experimentales, subestimándose así su potencial para los sistemas agroforestales en el trópico.

En este sentido, en la última década, *Moringa oleifera* (Lam.) se ha destacado dentro de un grupo de árboles no leguminosos, como una planta promisoriosa para los sistemas de corte y acarreo, de pastoreo/ramoneo, así como en la formación de barreras rompevientos y cercas vivas (Folk-Ard y Sutherland, 1996). Entre sus características agronómicas se encuentran su rápido crecimiento en el establecimiento (2 m a los 8 meses), elevada resistencia a la sequía, favorable respuesta en suelos ácidos y alcalinos, elevada producción de biomasa (300 g MS/planta/corte), excelente valor nutritivo (PB: 17%; DIVMS: 85%) y palatabilidad (Moroto *et al.*, 2000).

Considerando la importancia que presenta la caracterización de arbóreas y arbustivas en cuanto a sus potencialidades como especies multipropósitos para sistemas con bajos insumos, esta investigación tuvo como objetivo comparar, en términos de crecimiento y desarrollo, a *M. oleifera* y *L. leucocephala* cv. Cunningham en condiciones de vivero para así poder estimar el tiempo de trasplante a campo de ambas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área experimental

El ensayo se llevó a cabo en el vivero agroforestal de la Estación Experimental y de Producción Agrícola "Rafael Rangel" perteneciente a la Universidad de los Andes, ubicada entre los paralelos 09° 35' 00" y 09° 37' 19" N y entre los meridianos 70° 27' 00" y 70° 31' 39" O, a una altitud entre 270 y 300 msnm en el sector La Catalina, Vega Grande, municipio Pampán, estado Trujillo, Venezuela.

El área experimental presenta características edafoclimáticas de transición de Bosque Seco Tropical a Húmedo Tropical y las condiciones climatológicas que prevalecieron durante el periodo de evaluación se reflejan en el Cuadro 1.

Características del sustrato utilizado

Para el cultivo de las plántulas se utilizaron bolsas de nylon de polietileno negro horadadas de 1 kg, las cuales se llenaron con un sustrato compuesto por 60% de suelo franco-limoso alcalino, 10% de arena y 20% de estiércol bovino compostado. En este sentido, el Cuadro 2 muestra las características químicas de los componentes utilizados en el llenado de las bolsas.

Procedimiento experimental

En cada bolsa se colocaron 5 semillas recién cosechadas de cada especie y previamente seleccionadas en función de su buena apariencia externa y libre de hongos y mohos. A las semillas de *L. leucocephala* cv. Cunningham se les aplicó un tratamiento de escarificación, sumergiéndolas en agua caliente a 80°C durante dos minutos (Toral y González, 1999). Adicionalmente, las simientes escarificadas fueron inoculadas con una suspensión (1,0% m/v) de cepas específicas de *Rhizobium loti*.

Cuadro 1. Indicadores climatológicos más relevantes durante la etapa experimental.

Indicador	Abril	Mayo	Junio	Julio
Precipitación (mm)	134	84	100	129
Temperatura máxima (°C)	29,3	30,2	31,0	29,6
Temperatura mínima (°C)	24,4	23,5	23,2	24,7
Temperatura media (°C)	26,9	26,9	27,1	27,2
Humedad relativa (%)	64,3	63,4	65,6	63,5

Cuadro 2. Composición química de los componentes utilizados para la formulación del sustrato en la fase de vivero.

Componente	pH	CE	N	P	K	Ca	Mg	C.org.	MO
	1:2,5H ₂ O	dS/cm	%		ppm			%	
Suelo	7,9	0,30	0,28	16	72	1190	240	2,22	2,11
Estiércol	6,5	nd	2,10	0,99†	1,25†	1,02†	0,96†	nd	90,21

† Valores expresados en %.

nd: no determinado

Todo el material plantado en el vivero recibió un riego diario por 20 minutos en horas de la mañana (4 L/min/m²) para mantener la humedad necesaria para la germinación y el desarrollo de las nuevas plántulas. Cuando éstas alcanzaron una altura promedio de 7 cm se realizó una labor de raleo para dejar en cada bolsa la más vigorosa. No se aplicó enraizador ni fertilizante químico ya que las condiciones del sustrato se consideraron óptimas.

Mediciones

Las mediciones se realizaron con una frecuencia semanal. Los variables evaluadas fueron: Porcentaje de emergencia (conteo de plántulas emergidas hasta los 30 días después de la siembra), altura de la planta (en cm con regla graduada desde el nivel del suelo hasta el ápice de la rama apical), número de ramas (mediante conteo visual), longitud de la rama primaria (en cm con regla graduada), diámetro de la rama primaria (en la intercepción de la base de la

rama y el tallo con pie de rey), número de hojas por rama (mediante conteo visual), sobrevivencia (a partir de los 30 días de la siembra, realizando conteo a las plántulas germinadas dejadas en las bolsas) y tasa de crecimiento, en función de la altura, según las descripciones realizadas por Toral y Hernández (1996) y Toral (2000) para plantas forrajeras en la fase de vivero.

En la detección de plagas y enfermedades, se empleó la escala cualitativa propuesta por Machado *et al.* (1999) en la cual los porcentajes de afectación fueron calculados considerando la cantidad de hojas afectadas o con síntomas, dividida entre el total de hojas de cada planta. En el Cuadro 3 se muestran los rangos que se utilizaron para estimar el grado de lesiones producido por masticadores, raspadores, chupadores y trozadores, además de los síntomas causados por enfermedades y otros agentes parasíticos.

Cuadro 3. Escala utilizada en la detección de plagas y enfermedades.

Incidencia	Rango (%)	Clasificación
Plagas	0 a 1	inmune
	2 a 10	resistente
	11 a 20	tolerante
	> de 20	susceptible
Enfermedades	0 (grado 0)	inmunes
	1 (grado 1)	resistente
	5 (grado 2)	resistente
	10 (grado 3)	tolerante
	25 (grado 4)	tolerante
	50 (grado 5)	susceptible
	100 (grado 6)	susceptible

Fuente: Machado *et al.* (1999).

Diseño experimental, tratamientos y análisis estadístico

Se empleó un diseño totalmente aleatorizado con 20 réplicas por tratamiento. *M. oleifera* y *L. leucocephala* constituyeron los tratamientos. Se realizaron de forma independiente dos ANOVA simples; uno para comparar ambas especies en cada tiempo de medición (efecto principal) y otro análisis para describir individualmente el comportamiento de cada variable en cada especie durante el periodo experimental. En ambos procesamientos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 10.0 para Windows® (Visauta, 1998) empleando la dócima de comparación de Duncan para $P < 0,05$.

Los datos expresados en porcentajes (germinación, sobrevivencia y presencia de plagas y enfermedades) fueron transformados por arcoseno de la raíz cuadrada de los valores para la realización del análisis estadístico.

RESULTADOS

La emergencia de las plántulas ocurrió a los 3 y 6 días para *M. oleifera* y *L. leucocephala*, respectivamente. Hasta los 30 días posteriores a la siembra se obtuvo

un porcentaje de germinación de 95 y 100% para *L. leucocephala* y *M. oleifera*, respectivamente, y se encontró al final de la evaluación una sobrevivencia de 100% para *M. oleifera* y de 95% en *L. leucocephala*.

Respecto a la altura de *M. oleifera* y *L. leucocephala*, la Figura 1 muestra que ambas especies crecieron de forma progresiva durante todo el lapso del experimento. En *M. oleifera* a partir de la séptima semana no se observó mayor crecimiento. En el caso de *L. leucocephala*, los aumentos de la altura fueron continuos en cada momento de medición y los valores alcanzados mostraron diferencias altamente significativas entre sí. A partir de la décimo tercera semana de medición no se encontraron diferencias significativas entre las alturas de ambas especies; las cuales fueron de 45,00 y 53,20 cm para *L. leucocephala* y *M. oleifera* en dicha medición, respectivamente.

Con relación al diámetro del tallo, en *M. oleifera* se observaron incrementos significativos ($P < 0,01$) hasta la séptima semana; pero a partir de ese momento los aumentos fueron discretos hasta el final de la evaluación (Figura 2). En *L. leucocephala*, los

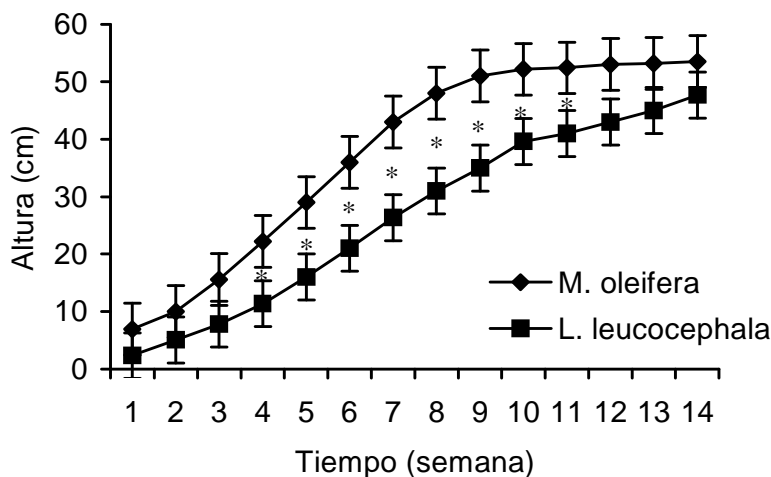


Figura 1. Altura de las especies evaluadas en el vivero. Barras indican error estándar y asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre especies.

máximos valores se observaron también a partir de la duodécima semana. Entre ambas especies, hasta la sexta semana no se encontraron diferencias significativas, con respecto a este indicador ($P < 0,05$). A partir de la séptima medición, el diámetro del tallo de *M. oleifera* mostró diferencias estadísticas con el de *L. leucocephala* hasta el final del experimento, donde los valores fueron de 0,92 y 0,62 cm, respectivamente.

El patrón de aumento del número de ramas en *M. oleifera* fue similar al observado para la altura (Figura 3). Con respecto a *L. leucocephala*, sólo a partir de la décima semana se observó la mayor cantidad de ramas. Únicamente en el periodo comprendido entre la sexta y la novena semana el número de ramas entre las especies presentó diferencias estadísticas ($P < 0,05$). Al final de la evaluación ambas plantas exhibieron un número similar de ramas.

En cuanto a la cantidad de hojas por rama, la Figura 4 muestra que en *M. oleifera* no se encontraron aumentos significativos a partir de la semana seis. Sin embargo, en *L. leucocephala*, hasta la novena semana,

se observaron incrementos sustanciales ($P < 0,05$). En todas las semanas las especies mostraron diferencias estadísticas entre sí ($P < 0,05$). En la semana catorce *M. oleifera* presentó más de 16 hojas por rama y *L. leucocephala* solamente 11.

Hasta la semana siete *M. oleifera* mostró una elongación de las ramas altamente significativa (Figura 5). Por su parte, a partir de la oncenava semana, las ramas de *L. leucocephala*, no mostraron incrementos sustanciales en su longitud. Después de la segunda medición, la longitud de las ramas entre las especies presentó diferencias a favor de *M. oleifera*. Al final de la evaluación, las ramas de *M. oleifera* medían 13,9 cm, mientras que las de *L. leucocephala* tenían una longitud de 9,4 cm.

La Figura 6 muestra la evolución del diámetro de las ramas primarias. En ambas especies a partir de la séptima medición se observaron los mayores valores, los cuales difirieron de manera altamente significativa con las semanas anteriores.

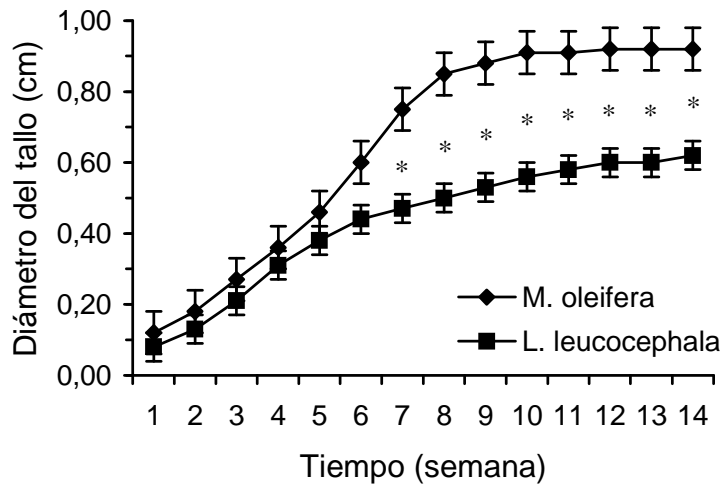


Figura 2. Diámetro del tallo de las especies evaluadas en el vivero. Barras indican error estándar y asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre especies.

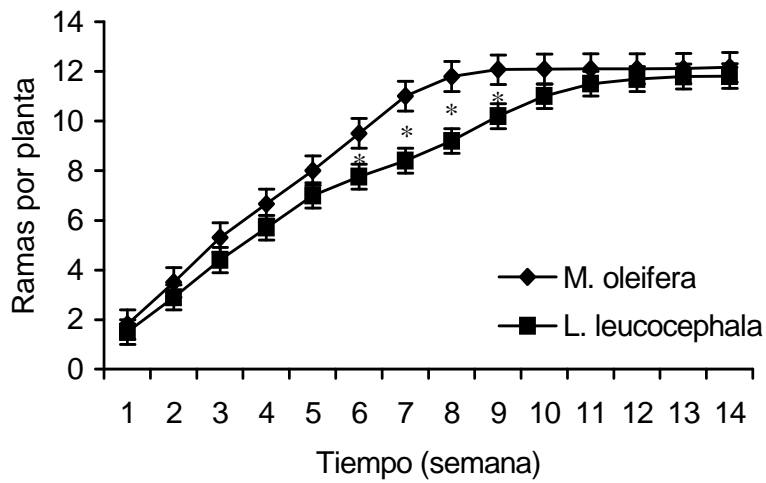


Figura 3. Número de ramas de las especies evaluadas en el vivero. Barras indican error estándar y asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre especies.

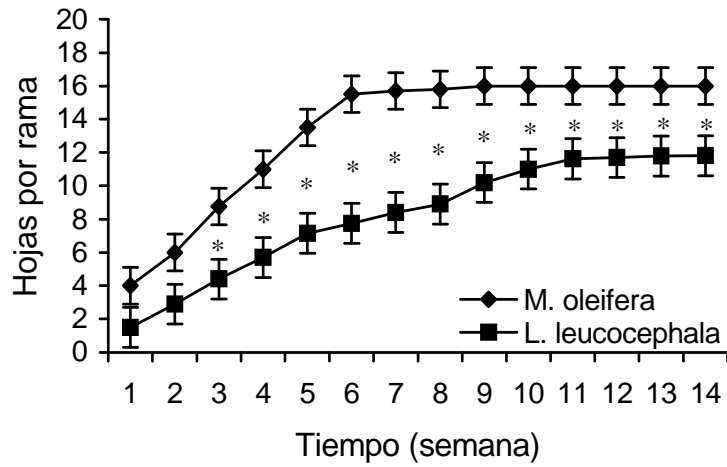


Figura 4. Cantidad de hojas por rama de las especies evaluadas en la fase de vivero. Barras indican error estándar y asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre especies.

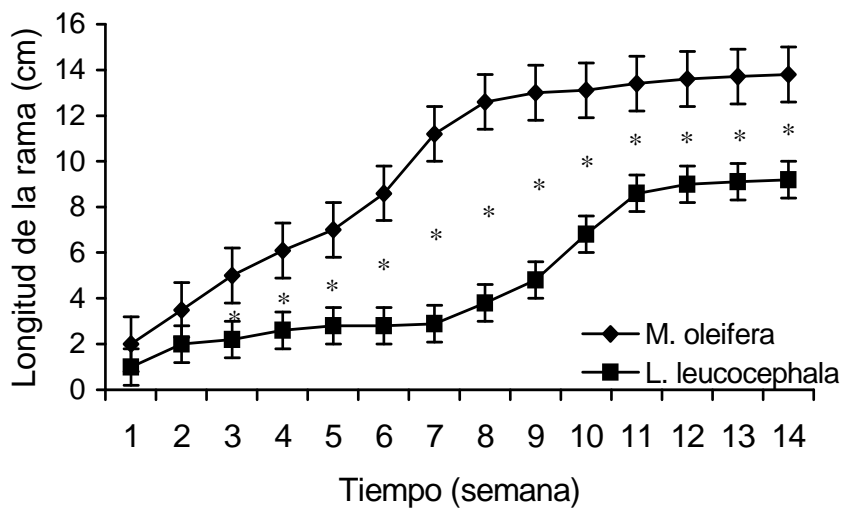


Figura 5. Longitud de rama de las especies evaluadas en el vivero. Barras indican error estándar y asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre especies.

Asimismo, durante toda la evaluación, el diámetro de las ramas en *M. oleifera* fue superior al de *L. leucocephala* ($P < 0,05$), obteniéndose al final del experimento grosores de 0,38 y de 0,26 cm, respectivamente.

Con relación a la tasa de crecimiento en función de la altura (Figura 7), se observó que en la semana siete para *M. oleifera* y nueve y diez para *L. leucocephala* se obtuvieron los mayores valores numéricos. Durante las primeras siete semanas *M. oleifera* exhibió un crecimiento significativamente más rápido que *L. leucocephala*. Sin embargo, en las semanas 8, 9, 11 y 15 no se observaron diferencias apreciables entre las especies.

Según la escala utilizada para determinar el grado de lesiones por plagas y síntomas causados por enfermedades, en el caso de *M. oleifera* se obtuvo una afectación del 0,50% y no se observaron síntomas de enfermedades en la región aérea de esta especie, por lo cual, en las condiciones experimentales descritas, se consideró inmune a plagas y enfermedades. En el caso de *L. leucocephala* con respecto a las lesiones por plagas presentó 2,3% de afectaciones atribuyéndosele el grado de resistente y en cuanto a aparición de enfermedades mostró un 0,25% de daños, describiéndose como inmune.

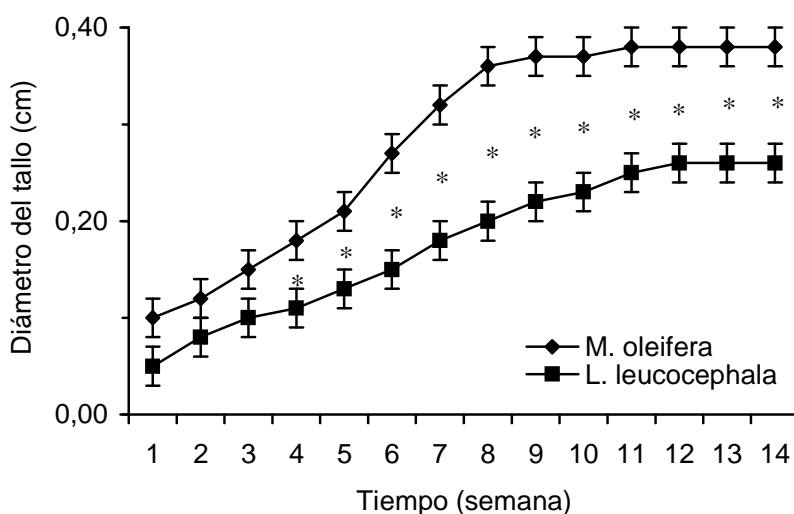


Figura 6. Diámetro de la rama de las especies evaluadas en el vivero. Barras indican error estándar y asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre especies.

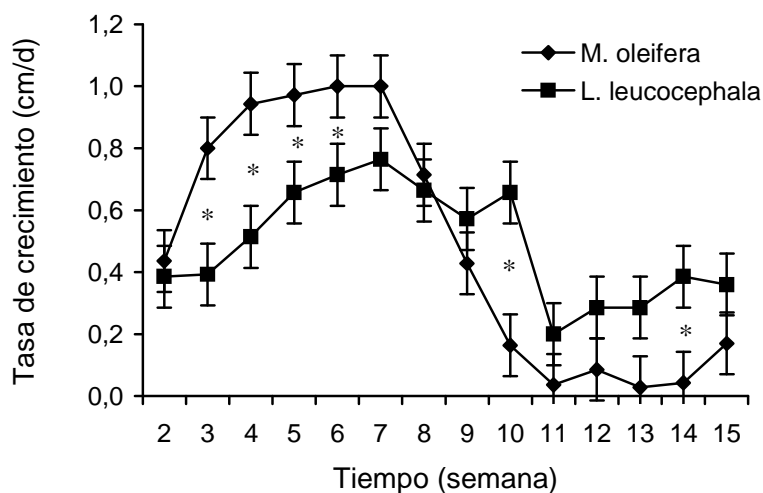


Figura 7. Tasa de crecimiento de las especies evaluadas en el vivero. Barras indican error estándar y asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre especies.

DISCUSIÓN

El comportamiento obtenido en todas las variables medidas denota la factibilidad de cultivar ambas especies en condiciones de vivero, lo que pudo estar relacionado con la calidad de la semilla, las condiciones ambientales favorables durante el ensayo, el adecuado sustrato y las labores de mantenimiento llevadas a cabo.

Aunque la literatura disponible no ofrece mucha información acerca de estudios realizados en vivero con plantas arbóreas con potencial agroforestal, Clavero (1998) y Toral (2000) señalan que *L. leucocephala*, en condiciones favorables, crece rápidamente. Los valores de altura obtenidos en este estudio son superiores a los informados por Wencomo *et al.* (2003) y Wencomo (2004) al evaluar 170, 140 y 50 accesiones del género *Leucaena*, respectivamente, incluyendo la variedad Cunningham empleada en este ensayo. Los valores promedios de la altura de dichas accesiones fueron de 28,7; 30,5 y 33,1 cm, respectivamente, en periodos de evaluación similares al de este experimento. No obstante *M. oleifera*, en

comparación con *L. leucocephala*, alcanzó una mayor altura en menor tiempo, aún cuando entre ambas especies no se encontraron diferencias estadísticas al final de la evaluación. Este comportamiento quizás se debe a que *M. oleifera* desde el inicio de su establecimiento, experimenta un crecimiento acelerado, en el cual puede alcanzar hasta 5 metros de altura en condiciones ideales de cultivo, debido a que presenta un sistema radical muy profundo, el cual hace un mayor aprovechamiento de los nutrientes del suelo y el agua disponible.

En ambas especies el diámetro de la base del tallo se incrementó con el transcurrir de las semanas, lo que evidencia que a medida que la planta madura expresa su mayor desarrollo y crecimiento. El hecho de que hasta la sexta semana en ambas especies no existieron variaciones en esta variable, demuestra que desde la emergencia las especies presentan un comportamiento similar. A partir del momento en que comienzan a diferenciarse, *M. oleifera* muestra resultados superiores comparado con *L. Leucocephala*, donde el engrosamiento del tallo fue lento, pero progresivo, tendencia similar observada por Angulo *et al.* (1997).

Que ambas especies manifestaran similitud en cuanto al aumento del número de ramas pudo estar dado a que, independientemente a su distante ubicación taxonómica, estas presentan una arquitectura similar en cuanto al patrón de formación y disposición de las ramas en su etapa inicial de desarrollo. En el caso de *M. oleifera*, la mayor cantidad de ramas encontradas entre la sexta y la novena semana, y su poca variación en el resto del tiempo, puede constituir un indicador de que haya alcanzado su total madurez en dicha etapa. Caso contrario se observó en *L. leucocephala* en la cual, la dinámica de este indicador fue lenta en las primeras semanas, en comparación con la primera.

Con respecto a la longitud, el diámetro y el número de hojas por rama, *M. oleifera* sobresalió respecto a *L. leucocephala* durante la etapa experimental. Sin embargo, la estabilización numérica de estas variables en la séptima semana pone de manifiesto la precocidad y el mayor desarrollo que alcanzó *M. oleifera* en relación con *L. leucocephala*. Este resultado pudo estar relacionado con las características que presentan las ramas de *M. oleifera*, las cuales son esparcidas, de mayor constitución y con numerosas hojas. (Moroto *et al.*, 2000).

Al parecer, el rápido desarrollo de *M. oleifera* es una particularidad de la especie. Al respecto, Toral (2005) observó el mismo comportamiento al evaluar el establecimiento en campo de 67 especies de arbóreas forrajeras, donde *M. oleifera* superó en cuanto a rapidez de establecimiento al resto, incluyendo *L. leucocephala*, al alcanzar a los siete meses la altura de explotación (2 m).

Durante el periodo experimental las especies evaluadas manifestaron un excelente comportamiento en cuanto a la germinación, sobrevivencia e incidencia de plagas y enfermedades. Los resultados obtenidos en *M. oleifera* coinciden con lo planteado por Reyes (2005), al señalar que las semillas presentan una germinación del 99,5%, vigor superior al 95% y porcentaje de sobrevivencia en la etapa inicial del 100%, cuando se cultiva en condiciones ideales como las prevalecientes en este estudio. Asimismo este aspecto es indicativo de la poca latencia de la semilla de *M. oleifera*; ventaja adicional con respecto a *L. leucocephala*.

No obstante, la incidencia de plagas y enfermedades difiere de lo expresado por Reyes (2005), quienes observaron que las plantas de *M. oleifera* en

condiciones de vivero son afectadas por *Atta* sp., *Mocis latipes*, *Coccus* sp., y en menor grado por *Aceria sbeldoni*.

En el caso de *L. leucocephala*, los elevados porcentajes de germinación y sobrevivencia encontrados en este experimento son superiores a los obtenidos por Cepero *et al.* (2001), Wencomo *et al.* (2003), Wencomo (2004) y González *et al.* (2005) en condiciones similares de experimentación. Dichos resultados fueron atribuidos al efecto de latencia, debido a la dureza de su semilla por la presencia de cubiertas impermeables al agua y los gases que restringen su germinación, condición biológica que es común en muchas leguminosas.

En relación al método de escarificación utilizado las semillas del cultivar Cunningham parecen responder muy bien, si valoramos lo obtenido por Toral y González (1999) al evaluar diferentes variedades de *L. leucocephala* y otras leguminosas arbóreas, encontrando un porcentaje de germinación de 94,6% para dicha variedad. También existe la posibilidad de una influencia favorable de la inoculación en el crecimiento de la especie. Al respecto, Ojeda *et al.* (1998) al evaluar el comportamiento de *L. leucocephala* cv. Perú inoculada en la fase de vivero, encontraron diferencias significativas en los tratamientos con respecto al testigo, donde los porcentajes de germinación oscilaron entre 84 y 89%, además de obtener un adelanto en el trasplante de las posturas inoculadas a los 7 y 13 días.

CONCLUSIONES

1. *M. oleifera* y *L. leucocephala* mostraron un excelente comportamiento durante la etapa evaluada, lo que denota la factibilidad de cultivarlas en condiciones de vivero.
2. Los resultados obtenidos demuestran una superioridad de *M. oleifera* respecto a *L. leucocephala* en la etapa inicial de crecimiento.
3. Las plantas de *M. oleifera* se encuentran óptimas para el trasplante a partir de la séptima semana, donde se logra la estabilización de todas las variables evaluadas.
4. En *L. leucocephala* el trasplante a campo se debe realizar a partir de la décima semana, momento en el cual la mayoría de las variables no presentan variaciones significativas.

5. Para ambas especies se sugiere no tomar la altura de la planta como único indicador para definir el momento óptimo del transplante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar un reconocimiento especial al personal que labora en la Estación Experimental y de Producción Agrícola "Rafael Rangel" (Universidad de Los Andes) del estado Trujillo por el apoyo recibido para llevar a cabo esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Angulo R., Y. Montilla, M. Rivas, T. Clavero, R. Razz y C. Castro. 1997. Efecto de diferentes aguas residuales sobre el crecimiento de la *Leucaena leucocephala* en condiciones de vivero. *Interciencia*, 22(1): 28-30.
- Cepero L., A.R. Mesa, G. Lonjonchere y M. Prieto. 2001. Estimulación del crecimiento de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham con rayos gamma de cobalto 60. *Pastos y Forrajes*, 24(3): 235-240.
- Clavero T. 1998. *Leucaena leucocephala*. Alternativa para la alimentación animal. Centro de Transferencia de Tecnología en Pastos y Forrajes. La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- Folk-Ard G. y J. Sutherland. 1996. *Moringa oleifera*, un árbol con enormes potencialidades. *Agroforestry Today*, 8(3): 5-8.
- González Y., J. Reino, J.A. Sánchez, C. Fung y R. Machado. 2005. Técnica de hidratación – deshidratación en semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham. *Pastos y Forrajes*, 28(2): 117-120.
- Machado R., R. Roche., O. Toral y E. González. 1999. Metodología para la Colecta, conservación y caracterización de especies herbáceas, arbóreas y arbustivas útiles para la ganadería. *Pastos y Forrajes*, 22(3): 181-203.
- Moroto L.O., E. Cruz, E. Francaise, V. Driesche, S. Beckmans, M.J. Manso, L. Lazo, C. Ríos y J.M. Machado. 2000. *Moringa oleifera* Lam. (Pterigosperma): Consideraciones sobre la presencia de lectinas. Memorias IV Taller Internacional Silvopastoril "Los árboles y Arbustos en la ganadería Tropical". Tomo I. Est. Exp. Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. pp. 215-217.
- Ojeda L., R. Herrera, E. Furrázola, C. Hernández y A. Castellón. 1998. Inoculación de *Leucaena leucocephala* cv Perú con micorrizas versículo-arbusculares en la fase de vivero. *Pastos y Forrajes*, 21(2): 159-164.
- Reyes N. 2005. Marango: Cultivo y utilización en la alimentación animal. Guía técnica No. 5. Universidad Nacional Agraria. La Molina, Lima, Perú.
- Toral O. e Y. González. 1999. Efecto del agua caliente en la germinación de diez especies arbóreas. *Pastos y Forrajes*, 22(1): 47-53.
- Toral O. 2000. Estudio de la Fase de vivero. En Simón L. (Ed.) Los árboles y arbustos en la ganadería. Tomo II. Nuevos aportes del silvopastoreo. Est. Exp. Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. pp. 14-20.
- Toral O. 2005. La utilización del germoplasma arbóreo forrajero. En Simón L. (Ed) El Silvopastoreo: Un Nuevo Concepto de Pastizales. Est. Exp. Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. pp. 34-47.
- Visauta B. 1998. Análisis Estadístico con SPSS para Windows. Estadística Multivariante. Mc-Graw-Hill-Interamericana. Madrid, España.
- Wencomo H. 2004. Evaluación de 50 accesiones de *Leucaena* spp. en la fase de vivero. *Pastos y Forrajes*, 27(4): 321-329.
- Wencomo H., B. Cepero y J.M. Iglesias. 2003. Comportamiento de 145 accesiones de *Leucaena* spp. aviveradas en un sustrato con suelo ácido. *Pastos y Forrajes*, 26(1): 21-26.

Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos

Guillermo Salamanca Grosso^{1*}, Ivonne L. Correa Carvajal¹ y Judith Principal²

¹ Grupo de Investigaciones Mellitopalínológicas y Propiedades Físicoquímicas de Alimentos, Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima, Colombia. *Correo electrónico: gsalaman@ut.edu.co

² Estación de Apicultura "Héctor Ochoa Zuleta" Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Tarabana, estado Lara. Venezuela

RESUMEN

Los flavonoides son compuestos químicos de origen botánico con marcada actividad biológica y han sido usados como marcadores de la calidad del propóleo. En este trabajo se presenta la metodología necesaria en la determinación cuantitativa de flavonoides totales usando dos métodos espectrofotométricos complementarios, basados en la reactividad diferencial del tricloruro de aluminio y 2-4 dinitrofenilhidrazina. Frente a flavonas, flavonoles y flavanonas las determinaciones se hicieron mediante espectrofotometría ultravioleta visible. Adicionalmente se evaluaron los índices de oxidación en un grupo de muestras de propóleos colombiano. Las determinaciones se realizaron sobre extractos alcohólicos usando etanol del 96% v/v (EEP). Las muestras fueron colectadas en los Departamentos de Arauca y Boyacá, en las zonas de vida de bosque húmedo tropical y seco montano bajo. Los índices de oxidación se determinaron siguiendo el test del permanganato de potasio en medio ácido. Las determinaciones para el contenido total de flavonoides variaron entre $7,50 \pm 0,01$ y $22,3 \pm 0,17\%$; los valores observados en el test de tricloruro de aluminio (flavonas y flavonoles) estuvieron entre $0,52 \pm 0,03$ y $3,25 \pm 0,04\%$ y para 2,4D (Flavanonas) entre $9,90 \pm 0,21$ y $11,78 \pm 0,26\%$ respectivamente. Los índices de oxidación observados en muestras con altos contenidos de flavonoides totales estuvieron por el orden de 2 a 10 segundos, demostrándose así la actividad antioxidante de las muestras analizadas y la calidad de los EEP de las zonas estudiada.

Palabras clave: propóleo, flavonoides, flavonas, flavonoles, flavanonas, determinación cuantitativa, métodos espectrofotométricos.

Flavonoid profile and oxidation indexes for some Colombian propolis

ABSTRACT

Flavonoids are chemical compounds of botanical origin with noticeable biological activity and have been used like markers of their quality properties. In this work we show the methodology for quantitative determination of total flavonoids, using two complementary spectrophotometric methods, based on the reactivity differential of aluminum trichloride and 2-4 dinitrophenylhydrazine. For flavonas, flavonoles and flavanonas the determinations were performed by ultraviolet visible methods. Additionally, oxidation indexes for Colombian samples were evaluated. The determinations were made on alcoholic extracts using ethanol of 96% v/v (EEP). The samples were collected at the Arauca and Boyacá Departments, in the tropical humid forest and dry mountain forest, respectively. The oxidation indexes were determined following the test of the permanganate of in acid media. Total content for flavonoids were 7.50 ± 0.01 to $22.3 \pm 0.17\%$ and using the trichloride test for flavones and flavanols, between 0.52 ± 0.03 and $3.25 \pm 0.04\%$. For 2,4D (Flavanones) results were 9.90 ± 0.21 and $11.78 \pm 0.26\%$ respectively. The oxidation index observed were 2 a 10 seconds, demonstrating their activity and quality.

Keywords: propolis, flavonoids, flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, quantitative determination, spectrophotometric method.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto de naturaleza compleja elaborado por las abejas a partir de resinas, aceites esenciales y polen que colectan en las zonas de vida donde realizan su actividad de pecoreo. En el proceso de recolección, transporte y almacenamiento a la colmena, adicionan sustancias enzimáticas y cera, de secreciones glandulares de la hipofaringe y glándulas cereras presentes en los esternitos del abdomen. Adicionalmente, puede añadir microelementos del entorno, donde el producto final es de consistencia viscosa, con tonalidades de color castaño, marrón, pardo, rojizo y verde, en algunos casos negro, según sea el origen botánico y geográfico (El Hady y Hegazi, 2002; Mohammadzadeh *et al.*, 2007).

El producto presenta propiedades anti inflamatorias, inmunoestimulantes, hepatoprotectoras, carcinostáticas, antimicrobianas, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular. Diversos trabajos han demostrado que el propóleo es una fuente natural de antioxidantes, que protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación. Sus propiedades antioxidantes se deben a su actividad anti radicalaria particularmente, frente a radicales alcoxi y en menor grado, a superóxido y al efecto inhibitor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Farré *et al.*, 2004; Principal, 2005).

Los propóleos están constituidos fundamentalmente por flavonoides, derivados de esteroides y ácidos fenólicos. Walker y Crane (1987) reportaron la presencia de 38 flavonas, 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos. Los métodos instrumentales de análisis actualmente han permitido identificar entre 150 y 180 compuestos distintos en un mismo producto, demostrándose la variabilidad y complejidad del producto, que han dado validez y versatilidad de uso terapéutico (Hegazi y El Hady, 2001; Park *et al.*, 2002; Salamanca, 2002; Murat *et al.*, 2002).

Por su consistencia y estructura, los propóleos pueden clasificarse en dos grupos, los de naturaleza fluida y los balsámicos-oleorresinosos. Los primeros presentan una fracción importante de agentes volátiles, mientras que en los balsámicos predomina la consistencia densa, con bajo contenido de volátiles, susceptibles de polimerización y con frecuencia se percibe el aroma de las plantas en forma concentrada; en general son sustancias viscosas, semisólidas y cauchosas. En general, el propóleo presenta una consistencia variable, dependiendo de su origen y condiciones térmicas; se presenta como un material duro a los 15°C y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión varía entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C (Salamanca *et al.*, 2004).

En principio se podría establecer una clasificación para los propóleos en función de su origen biogeográfico, tomando como referencia los contenidos de flavonoides y ésteres fenólicos observados en las muestras europeas y americanas, pero aun la información es incompleta. Las muestras asociadas al género *Populus spp.* contienen mezclas de agliconas flavónicas, ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres. En muestras rusas se han detectado agliconas de flavonas y en muestras brasileras se han encontrado principalmente derivados del ácido p-cumárico (Souza *et al.*, 2002; Murat *et al.*, 2002). El aroma en algunos casos es parecido al de su origen botánico, siendo amargo, picante y hasta astringente (Burdock, 1998; Salamanca, 2005).

La cuantificación de flavonoides en productos naturales y en particular en muestras de propóleo, usualmente se hace mediante cromatografía de capa fina (Didry *et al.*, 1990), análisis calorimétrico (Nagy y Grancai, 1996), cromatografía de gases (Christov y Bankova, 1992), cromatografía de gases acoplada a masas GC/MS (Bankova *et al.*, 1987) y cromatografía líquida de alta eficiencia (Vennat *et al.*, 1995). Los métodos por cromatografía de gases y de alta eficiencia aportan información definitiva en la caracterización de las muestras, pero presentan limitaciones importantes debido a los costos del equipamiento y la participación de personal con formación específica en el área instrumental. En

cambio, los métodos espectrofotométricos permiten cuantificar flavonoides con estructuras similares y son convenientes y apropiados en las determinaciones de rutina, aunque presenten limitaciones en la sensibilidad y especificidad. Las flavonas y flavonoles, desde el punto de vista reactivo, forman complejos estables con el tricloruro de aluminio y son susceptibles de analizar mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (Mabry *et al.*, 1970); entre tanto, las flavanonas y flavanonoles reaccionan mejor con el 2,4-Dinitrofenilhidrazina (Nagy y Grancai, 1996), situación que ha sido evaluada por Chang *et al.* (2002) y Kosalec *et al.* (2004), en la estimación de flavonoides totales en propóleos de Taiwán y Croacia.

Los flavonoides, desde el punto de vista estructural, corresponden a un sistema de 3 anillos fusionados en una secuencia de carbonos que presenta un heterociclo central en una estructura $C_6C_3C_6$, que ha sido discutida ampliamente por su estabilidad y reactividad (Amić *et al.*, 2003; Asres *et al.*, 2006). Estos compuestos suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos, condición que facilita su clasificación y reactividad frente respecto del tricloruro de aluminio y 2,4D. El uso de estos compuestos en la determinación de flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas se encuentra bien documentado. En el primer caso se genera un complejo estable con un máximo de absorción a 415 nm (Jurd, 1962), que es sensible frente a apigenina, crisina y luteonina, así como en los flavonoles rutina, morina, quercetina, miricetina, kaempferol, quercitina y galangina. Las flavonas naringenina, naringina y hesperidina no presentan absorción importante con el tricloruro de aluminio, pero son activas con 2,4D con máximos de absorción a 495 nm. Las isoflavonas no presentan absorción a 415 y 495 nm (Chang *et al.*, 2002). La necesidad de cuantificar estos compuestos en propóleos comerciales es cada vez más frecuente, debido al incremento y desarrollo de preparados comerciales a base de propóleos. En consecuencia ha sido necesario acudir a las directrices establecidas en los manuales de buenas prácticas de manufactura, que permitan el aseguramiento inicial en la compra de materias primas para la elaboración de nuevos productos. Considerando las necesidades de los comercializadores de propóleos, se ha planteado el uso de dos técnicas complementarias: una de ellas con tricloruro de aluminio y 2,4 Dinitrofenilhidrazina (2,4D), como método de rutina para la cuantificación de flavonoides totales, flavonas flavonoides y flavanonas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y solventes

Todos los reactivos usados en este trabajo fueron de grado analítico. Etanol, metanol, acetato e hidróxido de potasio, ácido sulfúrico, cloruro de aluminio y 2,4 dinitrofenilhidrazina se compraron en la compañía Merck (Alemania), estándares de Naringenina y Quercetina se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Equipos

Se uso una centrifuga universal 0-4000 rpm, para la remoción de material insoluble luego de las operaciones de extracción en la obtención de EEP. Agitador mecánico y unidad Spectronic Génesis 5 Milton Roy, en celdas de 10 mm de cuarzo y programas SoftCard de control.

Muestras de propóleo

Se colectaron 8 muestras de propóleo crudo en el Departamento de Boyacá con una zona de vida de bosque seco montano bajo, con predominio de clima frío (13 a 14°C) a una altitud entre 2.400 y 2.800 msnm, en las siguientes localidades: Belén: 05°59'31" N y 72°55'00" E., 1.310 mm/año, Santa Rosa de Viterbo 05°57'20" N y 72°57'01" E. 764 mm/año, Cerinza: 05°57'28" N y 72°57'00" E. 1.055 mm/año, Cucaita: 05°32'45" N y 73°27'26" E. 760 mm/año, Nobsa: 05°46'24" N y 72°56'54" E y 760 mm/año; Paipa: 05°47'04" N y 73°06'47" E. 944 mm/año; Combita: 05°37'48" N y 73°19'48" E. 920 mm/año. Se incorporó además una muestra colectada en el Departamento de Arauca (Tame: 06°27'44" N y 71°44'20" E. 2.100 mm/año), en una zona de vida de bosque húmedo tropical con 28°C. Finalmente se usaron dos muestras de referencia remitidas a la Universidad del Tolima, desde la región de Mendoza (Argentina), para un total de 10 que se analizaron por triplicado. Éstas se acondicionaron convenientemente en recipientes estériles y herméticos de vidrio ámbar, que se mantuvieron de manera individual en refrigerador a 5°C, hasta el momento de la extracción.

Extractos etanólicos (EEP)

Los extractos de propóleos, fueron preparados como se indica a continuación: 20 g de muestra cruda, se

extrajeran con 30 mL de etanol del 96% (v/v), por 48 h a 25°C empleando un sistema mecánico de agitación continua; se realizó centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos para remover el material suspendido no soluble. Los extractos finales, se conservaron en frascos ámbar a 5°C.

Determinaciones con 2,4D

Un patrón de (\pm)-Naringenina fue usado como estándar de referencia. 20 mg del patrón, fue disuelto en metanol, las concentraciones finales fueron 500, 1.000 y 2.000 μ /mL. Un mililitro de cada disolución estándar se hizo reaccionar con 2 mL de 2,4D al 1% y 2 mL de metanol a 50°C por 50 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla fue disuelta con 5 mL de hidróxido de potasio al 1% en metanol del 70%, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, 1 mL de la mezcla fue tomado, mezclado con 5 mL de metanol y centrifugado a 1.000 rpm., durante 10 minutos para remover el precipitado. El sobrenadante fue colectado y ajustado a 25 mL. Las determinaciones analíticas se realizaron a 495 nm. Un mililitro del EEP se hizo reaccionar con 2,4D, con el propósito de estimar el contenido de flavanonas.

Determinaciones con $AlCl_3$

Un patrón de Quercetina fue usado para realizar la curva de calibración. 10 mg del reactivo, fueron disueltos en etanol al 80% y posteriormente, diluidos a 25, 50, 100 μ /mL. Las disoluciones de los estándares 0,5 mL, fueron mezclados con 1,5 mL de etanol del 95%, 0,1 mL de cloruro de aluminio del 10%, 0,1 mL de acetato de potasio 1 M y 2,8 mL de agua destilada. Después fueron incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, la absorbancia de la mezcla de reacción fue medida a 415 nm. Para el blanco la cantidad de cloruro de aluminio del 10% fue sustituido por agua destilada. Análogamente, 0,5 mL de EEP en 100 ppm, se hicieron reaccionar con cloruro de aluminio para la determinación del contenido de flavonas y flavonoles.

Oxidación

En la determinación de las propiedades antioxidantes, se tomaron 2 mL de EEP, los cuales se mezclaron con 48 mL de agua destilada. En un tubo de ensayo limpio y seco previamente enjuagado con mezcla sulfocrómica, se midió 0,5 mL del diluido de EEP,

0,5 mL de agua destilada y 1 mL de ácido sulfúrico al 20%. Todos los tubos se sometieron a refrigeración en baño de hielo a 18 a 20°C. Haciendo uso de una micropipeta de 50-200 μ L, se adicionaron 50 μ L de solución de permanganato de potasio (0,1 N), estandarizada frente a oxalato de sodio, a continuación, se puso en marcha un cronómetro, que permitió estimar el tiempo en cual la solución ácida de permanganato es reducida, condición que se fija con la evolución a iones manganeso (Mn^{2+}), con el registro del tiempo de la desaparición del color. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Las determinaciones de flavanonas y flavonas-flavonoles, así como los índices de oxidación, se midieron por triplicado siguiendo la metodología descrita en cada caso como se indicó; las comparaciones entre los valores medios observados se hicieron empleando la prueba t de Student, con un nivel de confianza del 95%. Las curvas de calibración para los patrones de (\pm)-Naringenina y Quercetina se ajustaron siguiendo la metodología de mínimos cuadrados previa optimización y verificación de los coeficientes de correlación. Se realizaron análisis de varianza y se aplicó el test de Kruskal-Wallis, como prueba de hipótesis nula de igualdad entre los promedios de las determinaciones analíticas. Finalmente se realizó un análisis de conglomerados para las observaciones a través de estructura Euclídea, usando el método de Pérez (2002), para establecer las características de las muestras por similitud. Se usó el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los contenidos de flavonas, flavonoles, flavanonas y flavonoides totales presentes en las muestras de propóleo crudo colectado en las zonas mencionadas, así como las muestras de referencia argentinas, se muestran en el Cuadro 1, donde igualmente se han incluido los índices de oxidación típicos observados. En la estimación de la curva de calibración para flavanonas, se observó un coeficiente de correlación apropiado ($r^2 = 0,998$, (\pm)-Naringenina) y para flavonas y flavonoles ($r^2 = 0,999$ sobre Quercetina).

El análisis de varianza para el contenido de flavonas y flavonoles entre grupos y para el total de muestras

Cuadro 1. Equivalentes de Quercetina (flavonas y flavonoles), Naringenina (flavanonas) y flavonoides totales en muestras de propóleo colombiano.

Origen	Localidad	Flavonas y Flavonoles	%		Índice de oxidación S
			Flavanonas	Flavonoides Totales	
Boyacá	Combita	0,63 ± 0,02ab	11,8 ± 0,26fg	12,4 ± 0,08jk	4,98
	Cerinza	0,79 ± 0,01cd	6,70 ± 0,05	7,50 ± 0,01	117
	Santa Rosa	0,52 ± 0,03ba	4,90 ± 0,06	5,30 ± 0,01	19,2
	Paipa	2,82 ± 0,06	9,90 ± 0,21	12,7 ± 0,03kj	3,28
	Cucaita	3,25 ± 0,04	19,1 ± 0,40	22,3 ± 0,17	2,12
	Belén	0,90 ± 0,03dc	5,40 ± 0,17	6,30 ± 0,03	27,2
	Nobsa	1,97 ± 0,20	8,80 ± 0,08	10,8 ± 0,03	3,98
Arauca	Tame	1,42 ± 0,03e	18,8 ± 0,40hi	20,2 ± 0,17lm	112
Argentina	Argentina1	3,94 ± 0,08	11,5 ± 0,17gf	15,4 ± 0,06	1,60
	Argentina2	2,60 ± 0,01	17,5 ± 0,25ih	20,1 ± 0,06ml	1,60

analizadas indica diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores medios observados. El test de rangos múltiples indica que existe similitud entre las muestras de propóleos colectadas en las localidades de Combita y Santa Rosa, Belén y Cerinza. El contenido más alto para estos compuestos determinados a través del complejo con tricloruro dealuminio correspondió a las muestras de Paipa (2,82%) y Cucaita con (3,25%) y los más bajos en las muestras de Santa Rosa (0,52%) y Combita (0,63%). Los propóleos de mayor similitud a los argentinos han sido los de Paipa y Cucaita. Los valores individuales para estos flavonoides en todos los casos son inferiores a los reportados por Kosalec *et al.* (2004), pero comparables a los brasileros y taiwaneses, y menores que los chinos.

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de medias entre las muestras analizadas ($P < 0,0007$). En el caso de las flavanonas determinadas con el reactivo 2,4D, se ha encontrado similitud entre los propóleos de Combita y una de las muestras argentinas, con 11,8 y 11,5%, respectivamente, Tame y el segundo argentino con prevalencia ligeramente mayor para el total de flavanonas en el propóleo colombiano. No se presentaron diferencias significativas entre los valores medios de las determinaciones ($P < 0,05$), respecto de éste parámetro la muestra de Cucaita reveló ser la mayor del grupo. El test de Kruskal-Wallis indica que no hay igualdad de medias observadas para el

contenido de flavanonas. Las muestras taiwanesas contienen entre 17,6 a 21,8% de flavanonas y en los brasileros solo 7,12%, mientras que las de Dakova (Croacia) muestran promedios desiguales según sea la zona de origen, con 16,2 y 12,1% para las muestras del oeste y este, respectivamente, aunque se observan rangos relativamente amplios.

El contenido de flavones de los propóleos colombianos en algunos casos es comparable con los reportados por Chang *et al.* (2002) y Kosalec *et al.* (2004). Respecto de flavonoides totales, por los dos métodos empleados de manera complementaria, se observó un rango entre 5,30% (Santa Rosa) y 22,3% (Cucaita). Los resultados indican que hay un mayor contenido de flavonas, flavonoles y flavanonas en los EEP de Cucaita y Tame. Las muestras de EEP Argentinas (Mendoza) resultaron comparables con las colombianas. Como en las determinaciones globales para flavonas y flavonoles con $AlCl_3$ y flavanonas con 2,4D hay diferencias significativas ($P < 0,05$).

En cuanto a los índices de oxidación de los EEP, se observó que algunas muestras presentan tiempos reducidos frente al permanganato de potasio en medio ácido, cuyos valores se recogen en el Cuadro 1. Estas variaciones pueden asociarse con el tipo de compuestos presentes en los extractos analizados, que no necesariamente contienen flavonoides. En este sentido, Souza *et al.* (2002) han encontrado ácido canféico y ésteres que le confieren propiedades

diferentes a los propóleos. Igualmente, Graças *et al.* (2002) y Evandro *et al.* (2002) identificaron sesquiterpenoides, nerodiol y cinamato de metilo en muestras brasileras, los cuales modificarían la respuesta esperada del índice de oxidación y que bien valdría estudiar en las muestras con tiempos de oxidación atípicos observadas. Como referencia se suelen considerar valores hasta de 22 segundos como criterio comercial de calidad (Salamanca, 2002).

Los valores observados en la caracterización de propóleos colombianos muestran algunos índices de similitud entre los EPP, permitiendo encontrar características análogas entre sí. El análisis de conglomerados revela grupos de EEP similares para las muestras de Combita, Santa Rosa y Belén, un segundo grupo conformado por muestras de Paipa, Nobsa y Argentina1, y adicionalmente otro grupo compuesto por los extractos de Cucaita, Tame y Argentina2, como se ilustra en la Figura 1.



Figura 1. Estructura del análisis de conglomerados para los extractos etanólicos de propóleos colombianos en virtud al contenido de flavonas, flavonoles, flavanonas y tiempos de oxidación.

Los resultados globales observados en las muestras analizadas, deriva de las diferencias en la y diversidad de la flora predominante en cada una de las zonas biogeográficas donde se ha colectado las muestras. En el sector de Santa Rosa, la flora predominante es

Eucalipto (*Eucalyptus* spp), Tunacón (*Miconia squamulosa* Smith Triana), Encenillo (*Weinmania tomentosa* D.) y Acacia (*Acacia decurrens* Willd), mientras que en Belén y Cerinza predomina el bosque nativo donde se destacan el Encenillo y el Tunacon. En Paipa, la Feijoa (*Feijoa sellowiana* D) y Eucalipto son las principales especies establecidas en la proximidad de los apiarios, a diferencia de Nobsa donde solo predominan Eucaliptos. El Retamo (*Cytissus monspessulanus*), Ayuelo, Raque y Eucalipto es la oferta de exudados y resinas para las abejas de Combita, que es análoga a la existente en Cucaita donde adicionalmente se observan árboles de pino (*Pinus* spp), Retamo, Raque y Hayuelo (*Dodonaea viscosa* L. Jacq) que es propia de la consociación de bosque seco montano bajo.

Es importante señalar que las muestras colectadas en Argentina corresponden al centro oeste de la república, cerca de la cordillera de los Andes, a 600 msnm, donde predominio son suelos áridos y clima continental, pero abundante riego artificial o deshielo de cordillera, inviernos rigurosos y verano cálido, donde hay presencia de álamos (*Populus* sp.) y sauces (*Salix* sp.) considerados como fuentes de resinas para la elaboración de propóleos por parte de *Apis mellifera*. La oferta floral de sector de Tame es más amplia y diversa, pues los apiarios se han establecido en la consociación de bosque húmedo tropical, se distingue el Bototo (*Cochlospermum vitifolium*), Chaparro (*Curatella americana* L.), Ceiba (*Ceiba pentadra* L.), Caucho (*Ficus elastica* Roxburg), Guayabo (*Psidium* sp), Mango (*Mangifera indica* L.), Ocobo (*Tabebuia rosea*) y Totumo (*Crescentia cujete* L.), entre otros.

CONCLUSIONES

El potencial y actividad biológica de los flavonoides presentes en muestras de propóleos usados en la preparación de productos de interés farmacéutico, los deja en posibilidad para ser determinados cuantitativamente. El trabajo permitió la evaluación e implementación de un método espectrofotométrico para la determinación de flavonas, flavanonas y flavonoles, presentes en propóleos colombianos y estimar sus índices de oxidación. Los resultados observados, muestran diferencias significativas entre las muestras, variaciones que están en función del origen biogeográfico y que se expresan a través del contenido de flavonoides totales con diferentes tiempos de oxidación. La técnica evaluada es simple y

el tiempo necesario no supera los 40 minutos, siempre y cuando se hayan realizado los EPP con suficiente anterioridad. Los métodos espectrofotométricos complementarios con Tricloruro de aluminio y 2,4-Dinitrofenilhidrazina exhiben sensibilidad, especificidad y selectividad en este tipo de cuantificaciones. En el primer caso se forman complejos de color amarillo formados específicos para flavonas y flavanoles (3,5-hidroxiflavonas y 3,5-hidroxiflavanoles) y en el segundo complejos de flavanonas con grupos hidroxilo en la posición C₅ como es el caso de genisteína, hesperetina y (±)-naringenina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a los evaluadores del artículo por sus aportes y sugerencias. De igual manera agradecemos al Comité Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima.

LITERATURA CITADA

- Amić D., D. Davidović-Amić, D. Bešlo y N. Trinajstić. 2003. Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat. Chem. Acta*, 76: 55–61.
- Asres K., A. Seyoum y K. F. Fathy Kandeel El-Fiky. 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochem.*, 67: 2058-2070.
- Bankova V., A. Dyulgerov, S. Popov y N. Marekov. 1987. A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z. Naturforsch. C. Biosci.*, 42: 147-151.
- Burdock G. 1998. A Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.*, 36: 347–363.
- Chang C. C., M. H. Yang, H. M. Wen y J. C. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.*, 10: 178-182.
- Christov R. y V.S. Bankova. 1992. Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents from propolis using an electron-capture detector. *J. Chromatogr.*, 623: 182-185.
- Didry N., L. Dubreuil y M. Pinkas. 1990. New procedure for direct bioautographic TLC assay as applied to a tincture of *Ranunculus bulbosus*. *J. Ethnopharmacol.*, 29, 283-290.
- Evandro A., E. A. Nascimento, S. A. Morais, R. Chang, D.C. Reis y R. K. Lima. 2002. Análise Preliminar da Própolis de Santa Bárbara, MG. Memórias 25 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, Minas Gerais. Brasil.
- Farré R., I. Frassetto y A. Sánchez. 2004. Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45: 21-43.
- Graças A., L. Cito, M.H. Chaves, J.A. Dantas Lopes, C.R. Oliveira Farias y M.S. Sousa da Silva. 2002. Triterpenóides de Própolis de Castelo do Piauí. Memórias 25a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, Minas Gerais. Brasil.
- El Hady F. y A. Hegazi. 2002. Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile delta propolis. *Z. Naturforsch.*, 57: 386-394.
- Hegazi A. y F. El Hady. 2001. Egyptian propolis: 1 Antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt propolis. *Z. Naturforsch.*, 56: 82-88.
- Jurd L. 1962. Spectral properties of flavonoids compounds. *En Geissman T.A. (Ed.) The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Pergamon Press. pp. 107-155.
- Kosalec M., M. Bakmaz, S. Pepeljnjak y S.V. Kne. 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.*, 54: 65-72.
- Mabry T. J., K.R. Markham y M.B. Thomas. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer- Verlag. New York.
- Marucci M.C., F. Ferreres, C. García-Viguera, V.S. Bankova, S.L. Castro, A.P. Dantas, P.H. Valente

- y N. Paulino. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.*, 74: 105–112.
- Mohammadzadeh S., S. Mohammad, M. Manoochehr Hamedi, Y. Amanzadeh, S. Sadat- Ebrahimi y N.S. Seyed Nasser Ostad. 2007. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem.*, 103: 729–733.
- McMurry J. 1992. *Organic Chemistry*. Third ed. Cole Publishing Company. New York.
- Mirzoeva O. K., R.N. Grishanin y P.C. Calder. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.*, 152: 239-246.
- Muñoz O., R. Peña, E. Ureta, G. Montenegro, C. Caldwell y B. Timmermann. 2001. Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Z. Naturforsch.*, 56: 273-277.
- Murat K., K. Serdar y K. Semra. 2002. GC/MS Analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z. Naturforsch.*, 57: 905-909.
- Nagy M. y D. Grancai. 1996. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie*, 51: 100-101.
- Nieva M.I., M.I. Isla, N.G. Cudmani, M.A. Vattuone y A.R. Sampietro. 1999. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.*, 68: 97–102.
- Park Y., S. Alentar y C. Aguiar. 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2502-2506.
- Pérez C. 2002. *Estadística Práctica con Statgraphics*. Prentice Hall. Pearson education. Madrid.
- Principal J. 2005. El propóleo: Perspectivas terapéuticas en la medicina humana y veterinaria. *Memorias I Congreso Internacional de Apicultura de los Andes. III Convención de Apicultores*. Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Venezuela. pp. 57-60.
- Salamanca G.G. 2002. Origen naturaleza y características de los propóleos. *Memorias XVI Seminario Americano de Apicultura*. Secretaria de Agricultura Pesca y Alimentación. México. pp. 101-110.
- Salamanca G.G., C. Ramírez y L. Rubiano. 2004. Contenido mineral de los propóleos colectados en algunas zonas biogeográficas colombianas. *Rev. Inst. Univer. Chocó*, 20: 79-85.
- Salamanca G. 2005. Propiedades nutricionales y apiterapéuticas de los productos de la colmena. *Memorias I Congreso Internacional de Apicultura de los Andes. III Convención de Apicultores*. Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Venezuela. pp. 5-14.
- Souza R., M. Souza y J. Mendes. 2002. Análise de extratos aquosos e etanólicos de própolis por cromatografia líquida de alta eficiência. *Memórias 25 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*.
- Vennat B., A. Argouet-Grand, D. Gross y A. Pourrat. 1995. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from a propolis extract. *J. Pharmacie Belgique*, 50: 438-444.
- Walker P. y E. Crane. 1987. Constituents of propolis. *Apidologie*, 18: 327-334.
- Wu P. y L. Ye. 2000. Determination of effective components in propolis. *Wei Sheng Yan Jiu.*, 29: 123-124.

Níveis de proteína bruta e suplementação com levedura "Spray Dried" em rações associados a adubação orgânica no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Claudemir Martins Soares^{1*}, Carmino Hayashi², Carlos Henrique Figueiredo Lacerda³ e Eliana Maria Galdioli⁴

¹ Dep. Biologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM). Maringá, Paraná, Brasil. *Correio electrónico: cmsoares@uem.br

² Instituto de Pesca / APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, UEM. Maringá, Paraná, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia, UEM; Maringá, Paraná, Brasil

RESUMO

Objetivou-se avaliar o uso de rações com diferentes teores de proteína bruta (PB) associado a inclusão de levedura desidratada (LD) e adubação no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo. Foram utilizados 480 peixes (2,19±0,29g), em um delineamento em blocos casualizados com doze tratamentos e quatro repetições. As rações tinham 27, 30 e 33 % de PB com ou sem LD (6%), sendo estas empregadas em tanques com ou sem adubação. Os peixes submetidos a rações com 30 e 33% de PB sem LD e os com 33% de PB com LD em tanques adubados apresentaram valores de peso final superiores aos dos alimentados com 27 e 30% de PB com ou sem LD em tanques sem adubação. Os peixes que receberam rações com 30 e 33% de PB sem LD apresentaram melhores índices de conversão alimentar que os que receberam rações com 27% de PB em tanques sem adubação. Os tratamentos com rações com 27 ou 30% de PB em tanques com adubação levaram os valores de peso final médio e conversão alimentar similares aos tratamentos com 33% de PB em tanques não adubados. Houve aumento linear dos valores de peso final e taxa de eficiência protéica em função dos níveis de PB na ração em tanques adubados e sem adubação. O uso de adubação com o emprego de rações com os mesmos teores de PB possibilitaram melhores valores de peso final, conversão alimentar e taxa de eficiência protéica dos peixes. Os peixes criados em tanques adubados tiveram melhores valores de peso final, conversão alimentar e taxa de eficiência protéica, enquanto a presença de LD não afetou estes parâmetros. Conclui-se que o uso de adubação possibilita a redução da proteína dietária para alevinos de tilápia do Nilo.

Palavras chave: adubação, levedura desidratada, fontes protéicas, *Oreochromis niloticus*, tilápia do Nilo.

Crude protein level and dry yeast in diet combined with organic fertilizer in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerling rearing

ABSTRACT

Aiming to evaluate the use of crude protein (CP) levels and dry yeast (DY) combined with organic fertilizer in Nile tilapia fingerling culture, 480 fishes (2.19±0.29g) were distributed in an entirely randomized block design with twelve treatments with four replications. The diets had 27, 30, and 33% of CP with or without DY (6%) and applied in tanks with or without manure. Fishes that received diets with 30 and 33% of CP without DY and the diet with 33% of CP with DY in tanks fertilized showed better final weight values than those feed with 27 and 30% of CP with or no DY in no fertilized tanks. Fishes that received diets with 30 and 33% of CP without DY had better feed conversion index than those that received diets with 27% of CP in no fertilized tanks. The

treatments that have diets with 27 or 30% of CP in fertilized tanks promoted similar values of final weight and feed/gain ratio conversion than treatments with 33% of CP at no fertilized tanks. There was a linear increase of final weight and efficiency protein rate values by the levels of PB in diets in fertilized tanks and without manure. The use of manure with diets with the same PB levels showed better values of final weight, feed/gain and efficiency protein rate. The final weight, feed: gain ratio and efficiency protein rate of fishes were better at the fertilized tanks. Therefore these parameters were no affect by the DY in diets. It may be concluded that the use of manure make possible a reduction in the dietary protein level in Nile tilapia fingerlings.

Keywords: dry yeast, fertilization, Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, protein source.

INTRODUÇÃO

A aqüicultura é o setor de produção animal que mais tem crescido no mundo, apresentando uma taxa média de aumento anual de 10% (FAO, 1997). Esta atividade deve expandir-se rapidamente para compensar a estabilização dos produtos oriundos da pesca em ambientes naturais em virtude da sobre exploração nos oceanos e outros corpos de água (Hossain *et al.*, 2001). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é empregada em diversos sistemas de criação em um grande número de países tropicais e subtropicais, sendo uma das mais importantes na aqüicultura mundial (Lovshin, 1997). Sua produção anual vem crescendo a uma taxa e 12,00% (El-Sayed, 1999).

Os custos com a alimentação na aqüicultura correspondem à maior parcela dos custos totais de produção nas criações semi-intensivas (Meer *et al.*, 1995; El-Sayed, 1999) em função das rações para peixes possuem elevado teor de proteína, em comparação às rações para outros animais cultivados (Furuya *et al.*, 1997). Principalmente em virtude do alto preço da farinha de peixe (FP), a qual é a principal fonte de proteína utilizada para rações para peixes devido ao seu valor biológico e perfil em aminoácidos favoráveis. Apesar de que em rações para peixes onívoros a proteína da FP pode ser substituída em grande parte por proteína de origem vegetal como a do farelo de soja, este ainda apresenta alto valor, desta foram a determinação de níveis adequados de proteína bruta nas rações assim como de manejos como a adubação que possam possibilitar a redução dos teores de proteína nas rações permitira redução nos custos de produção.

A levedura desidratada (LD) apesar de apresentar elevado nível protéico e alto valor biológico, tem sua inclusão em rações limitada devido a parede celular

rígida Rumsey *et al.* (1990) e por possuir elevado nível de nitrogênio não protéico (Berto, 1997), entretanto proporciona melhora no desempenho dos animais quando adicionada às rações desde que em baixas percentagens Meurer *et al.* (2000) atuando como suplemento vitamínico, uma vez que esta é rica em vitaminas do complexo B.

A adubação de tanques tem como propósito aumentar a produtividade planctônica aumentando a disponibilidade de alimento natural para os peixes (Faria *et al.*, 2000; Knud-Hansen *et al.*, 2003), principalmente nos estágios inicial sendo fonte de proteína de alta qualidade e de minerais podendo reduzir os custos de produção em virtude de possibilitar o uso de rações com menores níveis protéicos. Na tilapicultura principalmente na criação de indivíduos nas fases iniciais de desenvolvimento pode-se utilizar o cultivo em “águas verdes” mediante a adubação dos tanques com intuito de aumentar a disponibilidade de organismos planctônicos os quais podem ser filtrados e consumidos pelas tilápias devidos o seu habito alimentar, o que desta forma pode possibilitar a redução no teor de proteína na ração utilizada para a criação. Desta forma estudos com fertilização de tanques para aumentar rendimentos da tilápia de Nilo, recebeu atenção considerável durante recentes décadas (Schroeder *et al.*, 1990; Knud-Hansen *et al.*, 2003)

Este experimento teve por objetivo avaliar a utilização de rações com diferentes teores de proteína bruta com suplementação com 6,00% de levedura seca associados a adubação orgânica no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo.

MATERIALES E MÉTODOS

O presente experimento com duração de 60 dias foi realizado no Laboratório de Aqüicultura do

Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá no período de julho a agosto de 2000. Foram utilizados 480 peixes com peso de médio de 0,52 g, distribuídos em 48 tanques-rede de "nylon", com abertura de malha de 1,00 x 1,00 mm e 48,00 x 38,00 x 47,00 cm de altura, comprimento e largura, respectivamente e, volume útil de 120 L, instalados em oito caixas de fibrocimento com volume útil de 800 L, em um delineamento em blocos casualizados. Durante o período experimental foi mantida aeração constante por meio de compressor com uma pedra porosa por tanque rede e circulação de 10% do volume total de água de cada caixa por dia.

Realizou-se inoculação com plâncton natural, colocando-se em cada tanque, 500 mL de água proveniente de tanques de piscicultura, juntamente com a primeira adubação, dez dias antes da estocagem dos peixes. A cada sete dias as 8:00 horas, foram realizadas coletas de plâncton, retirando-se seis amostras de 250 mL, uma em cada tanque-rede, a 20cm da superfície em cada tanque, sendo estas misturadas e desta retirados 250 mL. As amostras foram filtradas em rede de 20 µm de abertura de malha e fixadas em formalina 2% neutra, para posteriores análises. Os parâmetros físico-químicos pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido foram monitorados semanalmente. O oxigênio dissolvido foi mantido acima de 4,00 mg/L, enquanto que a temperatura foi medida duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h).

O fitoplâncton dos diferentes tanques foi analisado em microscópio óptico "Olympus", utilizando-se para tal, lâmina comum de vidro quadriculada com área de 1cm². As diluições para as análises das amostras foram realizadas de forma que fossem contados pelo menos 200 indivíduos do item mais freqüente. Para a análise do zooplâncton total foram contados todos os organismos presentes em 1 mL das amostras. A identificação dos organismos planctônicos foi baseada em Hino e Tundisi (1977), Lewis (1979), Komarék (1983) e Picelli-Vicentim (1987).

As rações foram formuladas de modo a serem isocálcicas, isofosfóricas, isocalóricas e com 27, 30 e 33% de PB (Tabela 1), diferindo ainda quanto a inclusão de levedura desidratada por "spray dry" (LD) em nível de 6% da ração. As diferentes rações foram

fornecidas para os peixes estocados em tanques com e sem adubação, sendo que os tanques sem adubação foram mantidos cobertos com plástico escuro para inibir a proliferação do fitoplâncton em quanto os tanques adubados foram cobertos com plástico transparente. Foram realizadas adubações semanais da metade dos tanques (caixas de 1000 L) com 20 g de esterco de aves.

As rações foram formuladas de modo a serem isocálcicas, isofosfóricas, isocalóricas. Para a confecção das rações os alimentos foram moídos individualmente, em um moinho tipo faca com peneira 0,5 mm, que, posteriormente foram umedecidas em água à 50°C, peletizadas em moinho de carne e secas em estufa de ventilação forçada a 55°C e desintegradas e passadas em peneiras de diferentes malhas, para que fossem fornecidas grânulos com tamanhos adequados à boca dos peixes. O arraçamento foi realizado a vontade seis vezes ao dia, sendo fornecidas as rações a cada dez minutos até o saciamento dos animais.

Os fundos dos tanques-rede foram sifonados a cada dois dias, para a retirada das fezes depositadas, enquanto que o fundo das caixas de fibro-cimento foram sifonados nos dias de pesagem dos peixes.

As características de desempenho dos peixes analisadas foram o peso final, conversão alimentar e a taxa de eficiência protéica. Sendo a taxa de eficiência protéica calculada segundo a expressão descrita por Jauncey e Ross (1982).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com dose tratamentos e quatro repetições, sendo que os tratamentos consistiram da combinação dos níveis de PB, presença ou não da LD em tanques ou sem adubação. As análises estatísticas das variáveis de desempenho foram realizadas por análises de MANOVA Fatorial, de variância e de regressão linear, através do programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas) descrito por Euclides (1983). Os dados de fitoplâncton e zooplâncton total foram submetidos à análise de variância e em caso de diferenças estatísticas, aplicou-se o teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Composição percentual e química das rações experimentais com diferentes teores de proteína bruta e de levedura desidratada (matéria natural). SL e CL = sem levedura e com levedura, respectivamente

Ingrediente (%)	Proteína bruta na ração (%)					
	27		30		33	
	SL	CL	SL	CL	SL	CL
Milho	35,89	32,98	29,61	26,70	23,34	16,50
Farinha de peixe	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Farelo de soja	46,10	41,55	53,58	49,03	61,06	57,21
Levedura seca	-	6,00	-	6,00	-	6,00
Bagaço de cana	5,43	6,89	4,85	6,31	4,27	7,80
Calcário calcítico	1,64	1,64	1,60	1,59	1,55	1,55
Fosfato bicálcico	1,85	1,78	1,73	1,66	1,62	1,59
Óleo de soja	4,07	4,15	3,60	3,69	3,14	4,33
Suplemento†	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT (butil-hidroxi-toluent)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100	100	100	100	100	100
	Valores calculados					
Energia digestível (kcal/kg)‡	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000
Proteína bruta (%)	27,0	27,0	30,0	30,0	33,0	33,0
Lisina (%)	1,63	1,66	1,83	1,86	2,03	2,08
Metionina+cistina (%)	0,95	0,94	1,03	1,02	1,11	1,09
Cálcio (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fósforo total (%)	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Fibra bruta (%)	5,19	5,62	5,20	5,63	5,21	6,45
Extrato etéreo (%)	7,00	7,00	6,50	6,50	6,00	7,00
Linoléico (%)	3,01	2,98	2,68	2,65	2,34	2,83

† Níveis de garantia por kg do produto: Vit. A 1.200.000 UI. Vit. D3 200.000 UI. Vit.E 12.000 mg. Vit. K3 2.400 mg. Vit. B1 4.800 mg. Vit. B2 4.800 mg. Vit. B6 4.000 mg. Vit. B12 4.800 mg. Ác. Fólico 1.200 mg. Pantotenato Ca 12.000 mg. Vit. C 48.000 mg. Biotina 48 mg. Colina 65.000 mg. Niacina 24.000 mg. Ferro 10.000 mg. Cobre 6.000 mg. Manganês 4.000 mg. Zinco 6.000 mg. Iodo 20 mg. Cobalto 2 mg. Selênio 20 mg.

‡ Com base nos valores de energia digestível propostos para a tilapia para o milho e farinha de peixe pelo NRC (1993) e para o óleo de soja por Sintayehu *et al.* (1996)

A produção de leite das ovelhas foi avaliada durante 7 semanas pelo método de dupla pesagem (indireto). As cordeiras foram pesadas antes e após a mamada, isto é, às 0:00; 8:00 e 16:00h, semanalmente, mantendo para isso as mesmas separadas oito horas antes de suas respectivas mães. As amostras de leite foram coletas antes das mamadas, manualmente, num volume de 10 ml. As análises de composição do leite foram realizadas na Usina de Laticínios (Copro) onde a determinação da lactose foi realizada pelo método

de Licor de Feeling e determinação da gordura pelos métodos de Gerber e Milko tester 3.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Para análise estatística dos dados foi realizada a análise de variância, sendo que para os dois sistemas de alimentação realizou-se o teste F ao nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS no Núcleo de Processamento de Dados da Universidade Federal de Santa Maria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas interações entre os fatores teor proteína levedura e adubação (MANOVA Fatorial, $P > 0,05$) sobre os parâmetros de desempenho produtivos dos peixes. Na Tabela 2 encontram-se os

valores médios das densidades dos organismos planctônicos nos tanques com e sem adubação ao longo do período experimental. Houve maiores disponibilidades de organismos planctônicos ($P < 0,01$) em tanques adubados ocorrendo nestes maiores densidades de organismos fitoplanctônicos assim como zooplanctônicos em comparação aos valores obtidos nos tanques sem adubação.

Tabela 2. Valores médios das densidades dos organismos planctônicos nos tanques com e sem adubação ao longo do período experimental

	Sem adubação						Com adubação					
	Tempo (dias)											
	1	7	14	21	28	35	1	7	14	21	28	35
Zooplâncton (ind/cm ²)												
<i>Arcella</i> sp	0	0	0	0	0	0	320	240	0	0	240	0
<i>Difflugia</i> sp	0	0	0	0	0	80	0	0	400	80	80	1.440
Outras tecamebas	0	0	240	0	160	80	80	80	0	0	320	0
<i>Lecane</i> SP	160	0	0	80	80	800	240	400	80	80	160	0
<i>Tricocerca</i> SP	240	0	0	0	0	80	400	320	400	80	240	320
Outros rotíferos	240	0	80	0	320	640	240	0	320	0	320	480
<i>Vorticella</i> sp	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0	0	80
Outros protozoários	160	0	0	80	0	80	160	0	0	0	80	0
Total	800	0	320	160	560	1.760	1.520	1.040	1.200	240	1.440	2.320
Fitoplâncton (1×10^3) (ind/mL)												
<i>Botryococcus</i> sp	0	0	0	0	0	0	3,2	0	0	1,6	0	0
<i>Chlorella</i> sp	6	0	0	0	3,2	0	32,0	12,8	0	0	0	0
<i>Coelastrum</i> sp	1,6	0	0	0	1,6	0	36,8	9,6	16,0	16,0	12,8	14,4
<i>Cyclotella</i> sp	1,6	0	0	0	0	0	0	3,2	0	0	0	0
<i>Desmidium</i> sp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6
Diatomaceae	1,6	0	0	0	0	0	121,6	17,6	0	3,2	0	1,6
<i>Eudorina</i> sp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,8
<i>Eutetramorus</i> SP	0	0	1,6	0	0	0	0	0	1,6	0	1,6	0
<i>Kirchineriela</i> SP	0	0	0	0	1,6	0	0	17,6	0	0	0	0
<i>Pandorina</i> SP	1,6	0	3,2	0	0	0	0	0	0	0	3,2	0
<i>Pediastrum</i> SP	4,8	0	1,6	0	0	0	1,6	0	0	0	0	0
<i>Scenedesmus</i> SP	19,2	4,8	19,2	4,8	0	3,2	524,8	318,4	33,6	96,0	57,6	132,8
Cyanophyta	0	12,8	0	0	0	0	0	0	0	3,2	0	0
Total	36,8	17,6	25,6	4,8	6,4	3,2	720,0	379,2	51,2	120,0	75,2	155,2

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de desempenho dos alevinos de tilápia do Nilo submetidos a rações com ou sem levedura desidratada.

Parâmetro†	Uso de levedura		CV(%)
	Sem levedura	Com levedura	
PIM	0,52a‡	0,52a	3,08
PFM	7,88 ^a	7,75a	14,02
CA	0,66 ^a	0,67a	17,93
TEP	1,97 ^a	2,00a	18,59
SOB	94,17 ^a	92,08a	9,73

† PIM = peso inicial médio (g), PFM = peso final médio (g), CA= conversão alimentar aparente, TEP = taxa de eficiência protéica, SOB = taxa de sobrevivência (%).

‡ Valores em mesma linha seguidos de mesma letra não diferem pelo teste F

Os valores médios das características de desempenho de alevinos de tilápia do Nilo submetidos a rações com diferentes teores de proteína, com ou sem levedura e em tanque adubados ou não estão na Tabela 2. Os peixes submetidos a rações com 30 e 33% de proteína bruta sem levedura e os com 33% de proteína bruta com levedura em tanques adubados apresentaram valores superiores de peso final (Tukey, $P < 0,05$) do que os alimentados com 27 e 30% de proteína bruta com ou sem levedura em tanques sem adubação.

Em relação aos valores de conversão alimentar os peixes que receberam as rações com 30 e 33% de PB sem levedura apresentaram melhores índices (Tukey, $P < 0,05$) que os peixes que receberam rações com 27% de proteína bruta em tanques sem adubação. Os tratamentos com rações com 27 ou 30% de proteína bruta em tanques com adubação apresentaram valores de peso final médio e conversão alimentar similares (Tukey, $P > 0,02$) aos tratamentos com 33% de proteína bruta em tanques não adubados.

A presença de 6% de levedura não afetou (Teste *F*, $P < 0,05$) os parâmetros de desempenho dos peixes (Tabela 3); fato este que discorda do obtido por Meurer *et al.* (2000) que observaram melhora no desempenho de alevinos de tilápia do Nilo com rações tendo 6% de levedura desidratada.

Observou-se aumento linear ($P < 0,05$) dos valores de peso final e taxa de eficiência protéica em função dos

níveis de proteína na ração em tanques adubados e sem adubação (Tabela 4), o que sugere que a exigência de proteína bruta para esta fase de desenvolvimento da tilápia do Nilo deve estar acima dos teores protéicos aqui estudados.

O uso de adubação com o emprego de rações com os mesmos teores de proteína bruta possibilitou melhores valores (Teste *F*, $P < 0,05$) de peso final, conversão alimentar e taxa de eficiência protéica dos peixes quando comparados com os peixes mantidos nos tanques sem adubação (Tabela 4). Desta forma a adubação possibilita o uso de rações com menores teores de PB, podendo de esta forma promover redução nos custos de produção. Estes resultados estão de acordo com os relatos de Schroeder *et al.* (1990) que observaram melhora nos parâmetros de desempenho de tilápia do Nilo com o uso de adubação e com Little e Edwards (2004) que observaram melhores valores de peso final e de taxa de sobrevivência de tilápia do Nilo em cultivos monossexo ou misto em tanques adubados.

Melhoras nas características de desempenho produtivo de peixes com o emprego de plâncton associado a rações também foram relatados por Furuya *et al.* (1999) e Soares *et al.* (2000) para alevinos de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e quinguio (*Carassius auratus*), respectivamente, quando comparados com aqueles alimentados com apenas ração.

Tabela 4. Valores médios de desempenho dos alevinos de tilápia do Nilo submetidos a rações com diferentes teores de proteína bruta e em tanques com e sem adubação.

Parametro†	Tratamentos							
	Proteína bruta na ração				Uso de adubo			
	27	30	33	CV	Sem adubo	Com adubo	CV	
	----- % -----				----- % -----			
PIM	0,52	0,52	0,52	2,90	PIM	0,52	0,52	2,93
PFM‡	7,25	7,84	8,34	8,75	PFM	7,20b#	8,43a	8,75
CA	0,68	0,65	0,65	8,47	CA	0,75 ^a	0,58b	12,14
TEP§	1,85	1,96	2,15	11,76	TEP	2,24 ^a	1,72b	11,76
SOB¶	95,6	94,6	89,4	9,20	SOB	90,8 ^a	95,4a	9,19

† PIM = peso inicial médio (g), PFM = peso final médio (g), CA = conversão alimentar aparente, TEP = taxa de eficiência protéica, SOB = taxa de sobrevivência (%).

‡ efeito linear $Y = 2,28122 + 0,18446X$, $r^2 = 1,00$ ($P < 0,001$)

§ efeito linear $Y = 0,48846 + 0,04991X$, $r^2 = 0,98$ ($P < 0,02$)

¶ efeito linear $Y = 124,37500 - 1,04167X$, $r^2 = 0,89$ ($P < 0,04$)

Valores em mesma linha seguidos de mesma letra não diferem pelo teste F.

A melhora na conversão alimentar com e taxa de eficiência protéica dos alevinos indicam que o plâncton age como suplemento alimentar possibilitando o emprego de rações com menores teores de proteína bruta durante o cultivo de alevinos de tilápia do Nilo.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o uso de adubação possibilita a utilização de rações com menores teores de proteína para alevinos de tilápia do Nilo e que se pode incorporar 6% de levedura desidratada em rações para este peixe nesta fase de desenvolvimento.

LITERATURA CITADA

- Berto D.A. 1997. Uso de levedura desidratada na alimentação de suínos. Anais Simpósio sobre Tecnologia da Produção e Utilização de Levedura Desidratada na Alimentação Animal, CBNA, Campinas. pp. 85-106.
- El-Sayed A.F.M. 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. Aquaculture Res., 179: 149-168,
- Euclides R.F. 1983. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genética). Univ. Fed. Viçosa. Viçosa, Brasil.
- FAO. 1997. Review of the state of the world Aquaculture. FAO Fisheries Circular No. 886. Rev. 1. FAO. Rome.
- Faria A.C.E.A., C. Hayashi, C.M. Soares, G.S. Gonçalves. 2000. Avaliação dos grupos zooplânctônicos em tanques experimentais submetidos a adubação com diferentes substratos orgânicos. Acta Scientiarum, 22(3): 375-381.
- Furuya V.R.B., C. Hayashi e W.M. Furuya. 1997. Farelo de canola na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), durante o período de reversão de sexo. Rev.Bras. Zootec., 26(6): 1067-1073.
- Furuya V.R.B., C. Hayashi, W.M. Furuya, C.M. Soares e E.M. Galdioli. 1999. Influência do plâncton, dieta artificial e sua combinação sobre o crescimento sobrevivência de larvas de curimbatá (*Prochilodus lineatus*). Acta Scientiarum, 21(3): 699-703.

- Hino K. e J.G. Tundisi. 1977. Atlas das algas da Represa do Broa. Univ. Fed. São Carlos, São Carlos, Brasil.
- Hossain M.A., U. Focken e K. Becker. 2001. Evaluation of an unconventional legume seed, *Sesbania aculeata*, as a dietary protein source for common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture*, 198(1): 129-140.
- Jauncey K. e B. Ross. 1982. A Guide to Tilapia Feeds and Feeding. University of Stirling, Scotland.
- Knud-Hansen C.F., K.D. Hopkins e H. Guttman. 2003. A comparative analysis of the fixed-input, computer modeling, and algal bioassay approaches for identifying pond fertilization requirements for semi-intensive aquaculture. *Aquaculture*, 228(1): 189-214.
- Komarék J. 1983. Contribution on the chlorococcal algae of Cuba. *Nova Hedwigia*, 6(1): 65-180.
- Lewis Jr. W.M. 1979. Zooplankton Community Analysis: Studies on a Tropical System. Springer Verlag, New York, USA.
- Little D.C. e P. Edwards. 2004. Impact of nutrition and season on pond culture performance of mono-sex and mixed-sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 232: 279-292.
- Lovshin L.L. 1997. Tilapia farming: A Growing Worldwide Aquaculture Industry. Anais Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Peixes. CBNA, Piracicaba. Brasil. pp. 137-164.
- Meer M.B., M.A.M. Machiels e M.C.J. Verdegem. 1995. The effect of dietary protein level on growth, protein utilization and body composition of *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Res.*, 26(12): 901-909.
- Meurer F., C. Hayashi, C.M. Soares e W.R. Boscolo. 2000. Utilização de levedura "spray dry" na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. *Acta Scientiarum*, 22(2): 479-484.
- NRC. 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Research Council. Washington, USA.
- Picelli-Vicentim M.M. 1987. Chlorococcales Planctônicas do Parque Regional do Iguaçu, Curitiba, estado do Paraná. *Rev. Brás. Biol.*, 7(1/2): 57-85.
- Rumsey G.L., S.G. Hughes e J.L. Kisella. 1990. Use of dietary yeast *Saccharomyces cerevisiae* nitrogen by lake trout. *J. World Aquaculture Soc.*, 21(3): 205-209.
- Schroeder G.L., G. Wohlfarth, A. Alkon, A. Halevy e H. Krueger. 1990. The dominance of algal-based food webs in fish ponds receiving chemical fertilizers plus organic manures. *Aquaculture*, 86(2/3): 219-230.
- Sintayehu A., E. Mathies e K.H. Meyer-Burfdorff. 1996. Apparent digestibilities and growth experiment with tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed soybean meal, cottonseed meal and sunflower seed meal. *J. Appl. Ichthyol. Z. Angew. Ichthyol.*, 12(2): 125-130.
- Soares C.M., C. Hayashi, G.S. Gonçalves, E.M. Galdioli e W.R. Boscolo. 2000. Plâncton, *Artemia* sp, dieta artificial e suas combinações no desenvolvimento e sobrevivência do quinguio (*Carassius auratus*) durante a larvicultura. *Acta Scientiarum*, 22(2): 383-388.

Evaluación de tres dietas con diferente contenido proteico en el cultivo de postlarvas del langostino de río *Macrobrachium rosenbergii*

Merirros Luna¹, César Graziani^{1,4*}, Elvis Villarroel^{1,4}, Mairin Lemus²,
César Lodeiros^{3,4} y Greys Salazar¹

¹ Lab. Camarones Dulceacuícolas, Dpto. Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, Sucre. Venezuela.

² Centro de Investigaciones Ecológicas Guayacán, Vicerrectorado Académico, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, Sucre. Venezuela.

³ Lab. Acuicultura, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, Sucre. Venezuela.

⁴ Fundación para la Investigación y el Desarrollo de la Acuicultura del estado Sucre. Gobernación del estado Sucre, Cumaná 6101, Sucre. Venezuela. *Correo electrónico: fidaesucree@yahoo.es

RESUMEN

Se evaluó el crecimiento y la supervivencia de postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii* alimentadas con dos dietas comerciales empleadas actualmente en cultivo de peces dulceacuícolas (P-28 y P-25) y una dieta formulada para camarones marinos (P-35) con distintos niveles de proteínas. El ensayo tuvo una duración de 30 días, durante los cuales se realizaron dos muestreos quincenales. Las postlarvas fueron distribuidas a una densidad de 50 organismos por acuario de 3,2 L, empleándose un total de cuatro réplicas experimentales y una de sustitución para cada dieta, con un suministro de alimento dos veces al día, equivalente al 10% de la biomasa húmeda de los camarones. La relación talla-peso de los organismos de las diferentes dietas mostraron relaciones lineales y significativas con un elevado índice de correlación ($r > 0,90$) y un crecimiento alométrico, sin obtener diferencias significativas entre sus pendientes, mostrando que las dietas utilizadas fueron adecuadas para el desarrollo de los organismos. No obstante, en los demás parámetros de crecimiento se encontraron diferencias significativas entre las dietas utilizadas, particularmente a los 15 días del experimento, donde la dieta P-25 mostró el valor mayor en cuanto a longitud total y ganancia relativa en peso. El índice de ARN/ADN al día 30 mostró ser más elevado para la dieta P-25 y P-35 y ésta igual a la P-28. Al final del estudio, la tasa de conversión alimentaria de la dieta P-25 (1,57) fue menor, en un orden de más del 27% que las demás dietas. Estos resultados, y los análisis bioquímicos de las dietas evaluadas sugieren la utilización de dietas con un 25% de proteínas y elevado contenido de carbohidratos, para la alimentación de postlarvas de *M. rosenbergii*, recomendándose ensayar dietas con niveles proteicos inferiores a 25%, con la finalidad de verificar si son convenientes en función de disminuir aún más los costos del alimento.

Palabras clave: *Macrobrachium rosenbergii*, dietas, contenido proteico, postlarvas, langostino.

Evaluation of three diets with different protein content in the culture of river prawn postlarvae, *Macrobrachium rosenbergii*

ABSTRACT

We evaluated the growth and survival of *M. rosenbergii* postlarvae fed with two commercial diets currently used for culturing freshwater fishes (P-28 and P-25) and a diet formulated for marine shrimp culture (P35), having different protein levels. The experiment lasted 30 days carrying out sampling of the animals after 15 and 30 days

of culture. The postlarvae were cultured in 3.2 L aquaria at a density of 50 organisms per aquaria, using four replicates and one aquarium for replacements, for each diet. The diets were administered twice a day at a rate of about 10% of wet body mass of the animals. The relationship length/weight of the animals with the different diets were significant with a high correlation coefficient ($r > 0.90$) and followed a linear model. They showed an allometric growth, and non significant differences among their slopes. Other growth parameters did show statistically significant differences among the diets, especially at 15 days of culture. At this time, P-25 showed highest total length and relative weight gain. The RNA/DNA index at day 30 was highest for P-25, and P-35 was intermediate. At this time, food conversion ratio for P-25 (1.57) was about 27% lower than the other two diets. These results, along with the biochemical analysis of the evaluated diets, suggest the use of diets with 25% protein content and high carbohydrate content for culture of *M. rosenbergii* postlarvae. It is proposed to study the use of diets with protein content lower than 25% to determine the possibility to lower the costs.

Keywords: *Macrobrachium rosenbergii*, diet, protein content, postlarvae, prawn.

INTRODUCCIÓN

Los camarones dulceacuícolas del género *Macrobrachium*, familia Palaemonidae, son los comercialmente más importantes en esta familia. Las más de 100 especies pertenecientes a la familia se encuentran distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, siendo *Macrobrachium rosenbergii* la que ha sido cultivada con mayor éxito en diversos países del mundo, incluyendo las regiones tropicales del Caribe (New y Singholka, 1984; Valenti, 2006).

La producción de postlarvas de *M. rosenbergii* de buena calidad es importante para el éxito del cultivo, por lo que estudios de dietas que cubran eficientemente sus requerimientos energéticos son de carácter fundamental. Existen algunos estudios nutricionales en estas fases, en los cuales se han evaluado aspectos como niveles y fuentes de las proteínas, lípidos y carbohidratos utilizados en las dietas y su efecto en el crecimiento, supervivencia, tasa de conversión, asimilación, producción y costos operacionales (Molina-Vozzo *et al.*, 1995; Lobão *et al.*, 1995a,b; Correia *et al.*, 1997), resaltando a las proteínas como el principal componente de las dietas comerciales, debido a la gran influencia en el crecimiento y su relación directa con los costos de producción (Cortés-Jacinto *et al.*, 2003, Teshima *et al.*, 2006).

En Venezuela, actualmente se ofertan en el mercado algunos alimentos para especies en cultivo, de variadas formas y composiciones, que no se conoce si satisfacen los requerimientos nutricionales de los camarones de agua dulce, ya que han sido formuladas

principalmente para camarones marinos y peces de agua dulce. Debido a ello, el presente trabajo evalúa el efecto de tres dietas comerciales con diferentes concentraciones proteicas en el desarrollo de postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las postlarvas (PL) de *Macrobrachium rosenbergii* fueron producidas en el Laboratorio de Camarones Dulceacuícolas de la Universidad de Oriente, siguiendo los protocolos estándares desarrollados por New y Singholka (1984).

Para la experimentación, las postlarvas producidas se mantuvieron en acuarios, con un volumen de 3,2 L y un área de fondo de 0,13 m², a una densidad de cultivo de 600 PL/m², menor a la establecida por New y Singholka (1984) en protocolos estándares para su acopio (1.000 PL/m²), en función de minimizar el efecto de la densidad como factor perturbador. De acuerdo a ello, se colocaron 50 PL/acuario, empleándose cuatro réplicas experimentales por dieta y una de reposición. Tanto las PL de las réplicas de experimentación como las de sustitución, en todas las dietas, fueron del mismo tamaño y peso (ANOVA, $P > 0,1$) con promedios generales de 11,6±1,37 mg y 12,02±0,45 mm, respectivamente. Durante el bioensayo la temperatura se mantuvo constante a 28±1°C; para ello todos los acuarios réplicas estuvieron semisumergidos en un recipiente con agua provisto de calentadores automáticos y un agitador para la homeogeneización del agua. Todos los acuarios estuvieron provistos de aireación constante y se realizaron recambios diarios del 50% del agua para garantizar la calidad de la misma.

Se ensayaron tres piensos comerciales, los cuales por acuerdo con la empresa transnacional que los suministró, se decidió identificar como P-35, P-28 y P-25 (el número corresponde al nivel proteico, en porcentaje, de la dieta) utilizados para la alimentación de camarones marinos y peces de agua dulce conocidos como tilapias (*Oreochromis* spp.), cachamas (*Colossoma macropomum*) y morocotos (*Piaractus brachipomus*), respectivamente.

A cada alimento ensayado, se le determinó el porcentaje de cenizas (Covenin, 1979), carbohidratos (Chávez y González, 1995) y el contenido calórico (García, 1987). El alimento se suministró, en un equivalente al 10% de la biomasa húmeda en dos raciones diarias (mañana y tarde), durante 30 días. El tamaño del "pellet" de los tres alimentos se ajustó, mediante macerado y tamizado a 1 mm de longitud.

En todos los acuarios, diariamente se contabilizó el número de postlarvas vivas en función de determinar la sobrevivencia. Quincenalmente se tomaron cuatro PL por réplica de tratamiento, las cuales fueron inmediatamente sustituidas por postlarvas de los acuarios de reposición, las cuales mantenían las mismas condiciones, con la finalidad de no afectar la densidad. Las cuatro postlarvas fueron utilizadas para formar un "pool" por réplica. A cada "pool" se le determinó el peso en húmedo y se llevó a una estufa por 48 horas a una temperatura de 60°C, para obtener el peso en seco. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en una mufla a 500°C durante tres horas. Por diferencia entre el peso en seco y el de las cenizas, se obtuvo la materia orgánica libre de cenizas, masa que fue utilizada para realizar los diversos índices gravimétricos.

Para evaluar las dietas se establecieron varios índices, determinando la longitud total de las postlarvas con un vernier (0,01 mm de precisión) y sus pesos con una balanza analítica (0,0001 g de precisión), de esta manera se estableció la ganancia relativa en peso (GRP) definida como la relación en porcentaje del incremento del peso con respecto al peso al inicio del experimento, la tasa de conversión alimentaria (TCA) en relación del peso en seco del alimento sobre el incremento del peso en seco de las postlarvas. De igual manera, se determinó el crecimiento instantáneo mediante la relación de los ácidos nucleicos ARN/ADN, determinados por la técnica de fluorescencia de Canino y Calderone (1995). Para ello, se utilizaron en cada muestreo otras cuatro

postlarvas, de igual manera que para obtener los diferentes pesos descritos anteriormente.

Para determinar el efecto de las dietas en las variables analizadas en las postlarvas de *M. rosenbergii*, en cada período experimental y previa comprobación de la normalidad de los datos y la homeogeneidad de las varianzas, se realizó un análisis de varianza simple. Las diferencias entre las dietas se establecieron con la prueba *a posteriori* de Duncan (Steel y Torrie, 1985). Además, se realizó un análisis de regresión para establecer el grado de relación entre el peso y la talla, previa transformación logarítmica de los datos para cada dieta y se realizaron análisis de comparación de las pendientes mediante el contraste en pares, siguiendo las recomendaciones de Zar (1984).

RESULTADOS

El Cuadro 1 muestra la composición nutricional y energética de las distintas dietas empleadas. Además de la proporción del contenido de proteínas, las diferencias notables de las macromoléculas entre las dietas fue fundamentalmente de carbohidratos, donde la dieta P-25 posee una elevada proporción de casi 50%, en comparación con 38% para P-35 y 31% para P-28. La cantidad de grasas, en todas las dietas, fue la de menor proporción entre las macromoléculas (<5%), siendo la dieta P-25 la que mostró menor concentración (2,2%). De esta manera, la energía en kcal/g de las dietas fue mayor en la P-35 (357), seguido de la P-25 (335) y la P-28 (288). Una diferencia notable también se estableció en el contenido de fibras, donde la dieta P-28 superó en más del doble a las demás dietas.

El incremento en longitud total mostró diferencias significativas entre las dietas en el período inicial (0-15 días, $P < 0,05$); sin embargo, no para el período final (15 a 30 días, $P > 0,05$). En ambos períodos, los organismos alimentados con la dieta P-25 fueron los que más incrementaron en longitud, siendo estos incrementos significativos ($P < 0,05$) sólo en el período inicial, donde las dietas P-28 y P-35 no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) (Figura 1 A). Esta misma tendencia, en cuanto a la diferenciación de los efectos de las dietas se desarrolló para la ganancia relativa en peso (Figura 1 B).

Las relaciones talla-peso de las diferentes dietas (Figura 2) resultaron ser lineales significativamente ($P < 0,001$), con coeficientes de correlación elevados

Cuadro 1. Composición bromatológica de las dietas comerciales ensayadas

Componentes	P-35	P-28	P-25
Proteínas (%)	35,0	28,0	25,0
Grasas (%)	4,0	3,0	2,2
Humedad (%)	12,0	12,0	12,0
Fibra (%)	3,0	10,0	5,0
Carbohidratos (%)	38,0	31,0	48,0
Cenizas (%)	8,0	16,0	8,0
Energía (kcal/g)	357,0	288,0	335,0

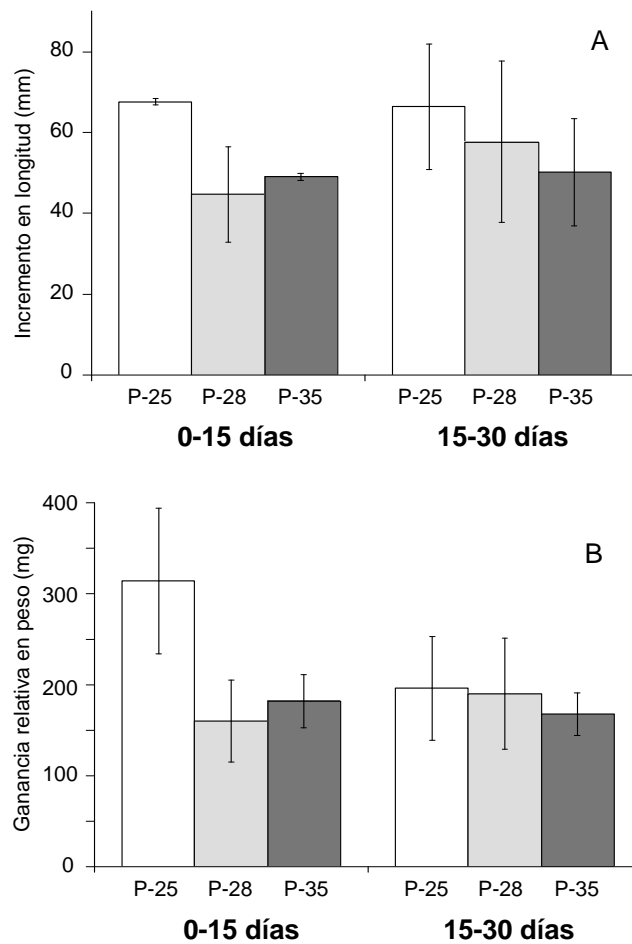


Figura 1. Incremento en longitud total (A) y ganancia relativa en peso (B) de postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii* en los dos períodos experimentales (de 0 a 15 días y de 15 a 30 días) alimentadas con las dietas P-25, P-28 y P-35. Las líneas verticales indican la desviación estándar con respecto a la media.

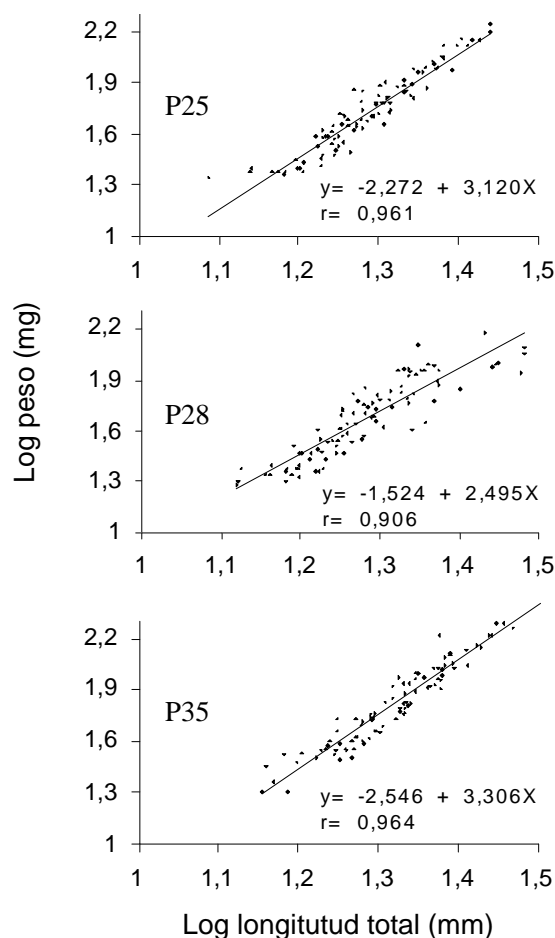


Figura 2. Relación talla-peso de las postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii*, alimentadas con las dietas P-35, P-28 y P-25, durante el experimento.

($r > 0,90$) y pendientes que muestran un crecimiento alométrico, siendo la de la dieta P-25 la más elevada, aunque no significativamente diferente de las demás (comparación múltiple entre pendientes ($P < 0,05$)).

El índice de crecimiento instantáneo, relación ARN/ADN (Figura 3), mostró valores significativamente iguales ($P > 0,05$) al inicio y a los 15 días del experimento; no obstante, al final del estudio la dieta P-25 fue la que obtuvo el mayor valor $2,14 \pm 0,055$ ($P < 0,05$), aunque significativamente igual a la dieta P-35 ($1,56 \pm 0,119$) y ésta a la dieta P-28 con un índice de $1,18 \pm 0,283$ ($P > 0,05$).

Durante los primeros 12 días del ensayo, la mayor supervivencia se obtuvo con las dietas P-28 y P-35

(>95%), encontrándose para P-25 valores entre 85-95% (Figura 4). A partir de ese momento, y en 5 días, para estas dietas, la supervivencia decayó significativamente a 60-70% ($P < 0,05$) para luego estabilizarse, sin cambios buscados, obteniéndose al final del experimento supervivencias entre el 50-65%. En contraste, la dieta P-25, aunque durante la primera semana presentó disminución de la supervivencia, mostró menores tasas de mortalidad a través del período experimental, alcanzando una supervivencia, al final del experimento, por encima del 70%. Estos valores permitieron establecer que la dieta P-25 fue la que obtuvo significativamente ($P < 0,05$) mayor supervivencia.

Al final del experimento la dieta P-25 generó una tasa de conversión alimenticia (TCA, Figura. 5) de $1,57 \pm 0,299$, significativamente menor ($P < 0,05$) que

las obtenidas con las dietas P-35 ($2,17 \pm 0,174$) y P-28 ($2,46 \pm 0,170$).

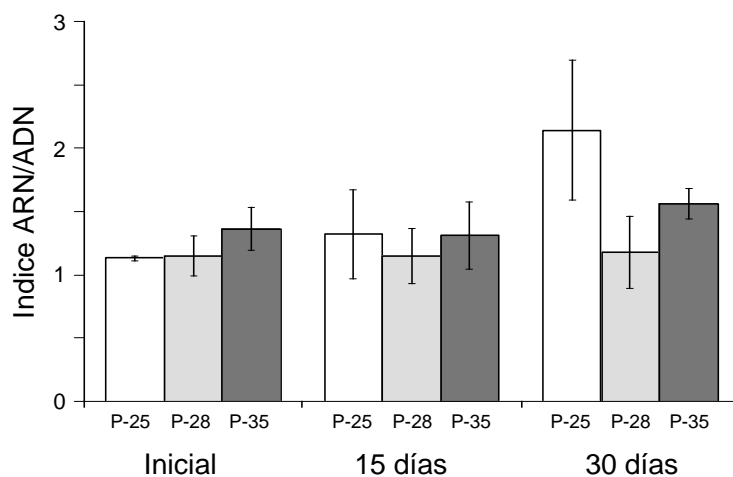


Figura 3. Relación ARN/AND de las postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii* al inicio, 15 y 30 días de la experimentación, alimentadas con las dietas P-25, P-28 y P-35. Las líneas verticales indican la desviación estándar con respecto a la media.

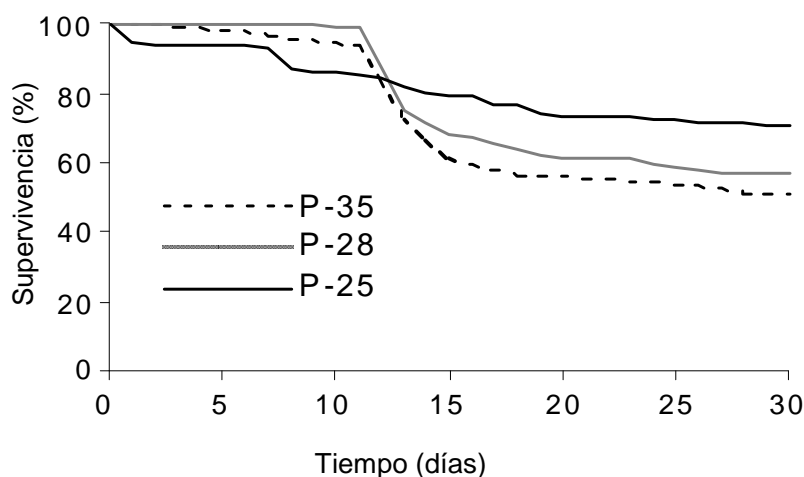


Figura 4. Supervivencia de las postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii*, alimentadas con las dietas P-25, P-28 y P-35.

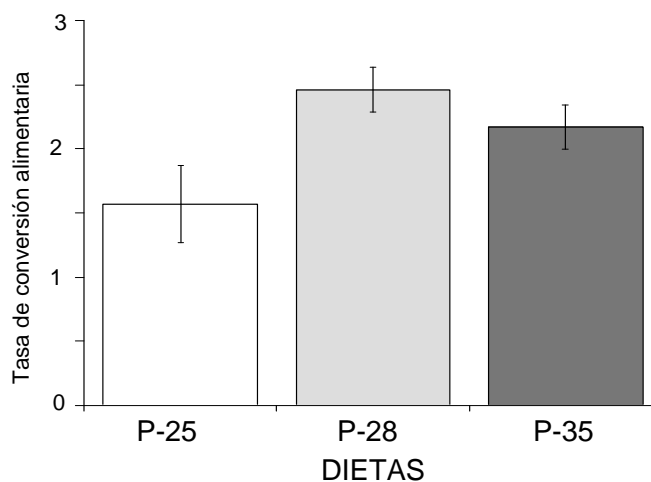


Figura 5. Tasa de conversión alimentaria de las postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii*, alimentadas con las dietas P-25, P-28 y P-35.

DISCUSIÓN

Con todas las dietas se observó un crecimiento alométrico, sin diferencias significativas en la relación talla-peso, sugiriendo que todas las dietas utilizadas fueron adecuadas para el desarrollo de los organismos. Sin embargo, los organismos alimentados con las dietas mostraron diferencias en los parámetros de crecimiento evaluados y la supervivencia, indicando diferencias en cuanto a la asimilación del alimento. Estas diferencias mostraron a la dieta P-25 con los valores más adecuados para el desarrollo y crecimiento de las postlarvas de *M. rosenbergii*, lo cual fue corroborado con la TCA, cuyo valor medio alcanzado (1,57) fue menor en más del 27% de las demás dietas. Estas diferencias podrían estar asociadas al contenido proteico de la dieta (25%) sosteniendo resultados obtenidos en otros trabajos (Sandifer y Joseph, 1976; Stanley y Moore, 1983), los cuales han señalado niveles de 25% de proteínas como óptimo para el crecimiento de *M. rosenbergii*. No obstante, algunos estudios no muestran diferencias en el crecimiento y supervivencia de juveniles de *M. rosenbergii* en

rangos de 15-35% de proteínas (Balazs y Ross, 1976; Boonyaratpalin y New, 1980) y otros han señalado buenos resultados con niveles entre 40-50% (Molina-Vozzo *et al.*, 1995) y 35% (El-Sayed, 1997). Algo similar, en cuanto a la variabilidad de resultados, ocurre con dietas probadas en camarones marinos, llegándose inclusive a recomendar para postlarvas dietas con proporciones de proteínas menores, como por ejemplo, Velasco *et al.* (2000) quienes proponen dietas entre 18 y 20% para *Litopenaeus vannamei*. Estas diferencias en resultados son probablemente producto del origen de los componentes proteicos y de los otros constituyentes de las dietas, así como del procesado de las dietas y de las condiciones de cultivo, lo cual pone de manifiesto la necesidad de profundizar en aspectos nutricionales y homogeneizar en lo posible los diseños experimentales, en función de establecer comparaciones entre los resultados con un grado de confiabilidad adecuado.

Teniendo en cuenta los diferentes resultados anteriores y el del presente trabajo, aún cuando no se ensayaron dietas con niveles proteicos menores a 25%, no se justificaría dar un nivel más elevado de

proteína si se puede abaratar los costos y obtener buenos resultados con niveles proteicos menores. De hecho, una proyección de costos de las dietas utilizadas en este estudio muestran que considerando la TCA final y los costos del alimento, la dieta P-25 representó un ahorro de aproximadamente 55% sobre el empleo del alimento P-35 formulado para camarones marinos y que actualmente se emplea en camarones dulceacuícolas. En el caso de la dieta P-28, a pesar de que fue 38% más costosa que la dieta P-25, su elevada TCA no la hizo igual de atractiva.

Al considerar el período de experimentación en dos intervalos de cultivo, se encontró que durante el período final (15-30 días) se observaron los mayores incrementos en biomasa. Esto pudiera deberse a que durante el período inicial (0-15 días) del experimento, se observó una mayor frecuencia en las mudas, lo cual pudo conducir a canalizar la producción energética para el proceso de muda, restando ganancia en peso por crecimiento. A este respecto, Graziani *et al.* (1998) indicaron que durante las primeras fases de vida, las mudas en *Macrobrachium* spp. son frecuentes y por ello tienen que destinar gran parte de la energía a la formación del nuevo exoesqueleto. De esta manera, algunos estudios (Vega-Villasante *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2000) evidencian una ausencia en el consumo de alimentos, durante el cual, el camarón utiliza las reservas acumuladas en el hepatopáncreas para la construcción del nuevo exoesqueleto y en la síntesis de nuevo tejido relacionado con la muda. Una hipótesis adicional, a la poca ganancia en peso relacionado con la muda, es que en dichos procesos fisiológicos la alimentación podría verse afectada debido a que las estructuras quitinosas como mandíbulas, maxilas y dientes del molinillo gástrico de los camarones por estar recién generadas y blandas dejan de ser funcionales, ocasionando una limitante en la articulación mecánica para el proceso de alimentación. De esta manera, en la medida que las postlarvas son mayores y las mudas durante su desarrollo se distancian en el tiempo, la energía es más canalizada hacia el crecimiento.

En nuestro estudio, la implicación de la muda como un proceso crítico en el crecimiento de las postlarvas pudo haberse reflejado en el período inicial, teniendo repercusión en la supervivencia. En las postlarvas alimentadas tanto con P-28 y P-35 se observó un aumento brusco de la mortalidad entre los días 12 y 14 de la experiencia, mientras que la mortalidad en

las postlarvas alimentadas con P-25 fue baja sin diferencias notables. Aunque en este trabajo no se contabilizó el número de mudas, fue evidente el aumento en el número de mudas ocurridas entre los días 11 y 14 del cultivo en las postlarvas alimentadas con P-28 y P-35 (observación personal), lo que pudo ocasionar el aumento de la mortalidad. Además de las implicaciones antes señaladas para el crecimiento, los camarones al mudar quedan con el exoesqueleto blando, haciéndose más susceptibles al canibalismo propio del género *Macrobrachium* (Graziani *et al.*, 1993, 1998).

A pesar que la concentración de proteínas en las dietas para organismos acuáticos son la principal atención de los investigadores debido a su influencia en el costo (New, 1976) y la síntesis y reparación de tejidos (Lim y Akiyama, 1992), la eficiencia de una dieta no depende únicamente de las proteínas. Bautista y Subosa (1997) señalan que los niveles de proteínas mejoran el crecimiento cuando se combinan con carbohidratos, lo cual supone una forma más económica de cubrir los requerimientos energéticos. En tal sentido, los carbohidratos, en las dietas para crustáceos derivados básicamente de harinas vegetales (maíz, trigo, arroz y sorgo) son fundamentales, ya que sus componentes son utilizados como fuente de energía, en la síntesis de quitina (principal constituyente del exoesqueleto) y en la formación de componentes fundamentales como ácidos grasos y esteroides (Clifford y Brick, 1978; Kucharski y Da Silva, 1991; Cruz-Suárez, 1996). De hecho, los carbohidratos son reportados por Díaz-Herrera *et al.* (1992) como el principal sustrato energético para cubrir los requerimientos metabólicos en postlarvas y juveniles de *M. rosenbergii*. Nuestros resultados soportan los estudios anteriores, ya que la dieta P-25% que proporcionó mayor crecimiento y supervivencia, así como menor TCA, fue la dieta con mayor proporción de carbohidratos con casi un 50% de su constitución macromolecular, a diferencia de las otras dietas (31% para P-35 y 38% para P-28). De esta manera, es muy probable que el papel y la eficiente utilización de la proteína estén siendo influenciados por el complemento de carbohidratos. En este sentido, Rosas *et al.* (2000) señalaron la posibilidad de reducir las proteínas de la dieta sustituyéndolas por carbohidratos, los cuales son mejor asimilados si se incluyen en forma de almidón.

En esta investigación se empleó la relación ARN/ADN como índice de condición fisiológica.

Este índice está siendo utilizado para indicar crecimiento instantáneo, o condición fisiológica en relación con la influencia ambiental o deficiencias en la alimentación en invertebrados (Lodeiros *et al.*, 1996; Núñez *et al.*, 2002). En nuestro estudio, el índice mostró valores iguales al inicio del experimento, corroborando la equidad en la condición inicial de los organismos, y tan solo mostró valores significativamente mayores al final del experimento, mostrando el valor mayor para la dieta P-25 (2,14), el cual supuso más del 80% del índice de las otras dietas, aunque las diferentes dietas mostraron índices elevados de dispersión, que la hizo significativamente igual al de la dieta P-35 (1,56) y ésta a la de la P-28 (1,18). La relación ARN/ADN, a pesar de ser tomada como un índice de condición que demuestra actividad celular de forma catabólica e instantánea debido a la actividad enzimática relativa al ARN en base al contenido celular estático de ADN y relacionado con el crecimiento instantáneo, debe ser tomado con mucha precaución, debido a que este parámetro no solo puede ser variable para el proceso de crecimiento, sino para otros procesos metabólicos celulares, sean de índole catabólico o anabólico, pudiendo enmascarar su relación con el crecimiento, como los procesos de demanda metabólica de la reproducción o elevada actividad por defensa ante estresores contaminantes (Lodeiros *et al.*, 1996; Acosta y Lodeiros, 2001). En lo particular, y aunque los resultados del índice mostraron cierta correlatividad con los obtenidos con otros parámetros de crecimientos evaluados en el presente estudio, debido a los procesos de muda y las implicaciones metabólicas que éstos poseen en crustáceos, pensamos que el índice no debe ser aconsejable para evaluar condición fisiológica para estos organismos.

Los resultados de este estudio, y las discrepancias encontradas con otros trabajos, ponen de manifiesto la variabilidad de los resultados y la necesidad de seguir evaluando alimentos comerciales disponibles en el mercado. Si bien falta mucho por investigar en cuanto a la nutrición de *Macrobrachium*, nuestro estudio propone la utilización de dietas con un 25% de proteínas y elevado contenido de carbohidratos. En este sentido, la utilización de los ensilados de maíz, son una materia prima utilizable, la cual inclusive puede sustituir el maíz, cumpliendo de esta manera con elevado contenido de carbohidratos y a la vez disminuyendo costos (Coelho-Emerenciano y Massamitu-Furuya, 2006). Independientemente de ello, es conveniente ensayar dietas con niveles

proteicos inferiores a los empleados en este estudio, con la finalidad de verificar si son convenientes en *M. rosenbergii*, y para disminuir aún más los costos del alimento.

En vista que la dieta P-25 arrojó los mejores resultados y es empleada actualmente en el cultivo de peces continentales, la hace ideal para ser utilizada en el policultivo de *M. rosenbergii* con otros peces, como una manera de aumentar la productividad y simplificar el manejo en el cultivo, al utilizar el mismo alimento para peces y camarones. No obstante, es recomendable realizar estudios de policultivo analizando factores como el tamaño de las postlarvas y/o alevines a sembrar y densidades, como una manera de minimizar impactos negativos en el crecimiento y sobrevivencia de ambas especies al competir por espacio y alimento.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación ha sido financiada parcialmente por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Fundacite Anzoátegui y la Fundación para la Investigación y Desarrollo de la Acuicultura del estado Sucre (Fidaes) de la Gobernación del estado Sucre, Venezuela, siendo ésta su Contribución No. 1.

LITERATURA CITADA

- Acosta V. y C. Lodeiros. 2001. Evaluación del efecto del cobre sobre juveniles del mejillón verde *Perna viridis* mediante la concentración de ADN y la relación ARN/ADN en el músculo aductor Rev. Cien. Fac. Cien. Vet. LUZ, 11(6): 485-490.
- Balazs G. y E. Ross. 1976. Effect of protein source and level on growth and performance of the captive freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquacult., 7: 299-313.
- Bautista M. y P. Subosa. 1997. Changes in shrimp feed quality and effects on growth and survival of *Penaeus monodon* juveniles. Aquacult., 151: 121-129.
- Boonyaratpalin M. y M.B. New. 1980. Evaluation of diets for *Macrobrachium rosenbergii* reared in concrete ponds. En New M.B. (Ed.). Giant Prawn Farming. Elsevier. pp. 249-256.

- Canino M. y E. Calderone. 1995. Modification and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acid content of fish larvae. *Fish Bull.*, 93: 158-165.
- Chávez J. y E. González. 1995. *Problemario: Bromatología y Nutrición*. Editorial Texto. Caracas.
- Clifford H. y R. Brick. 1978. Protein utilization in the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Proc. World Maricult. Soc.*, 9: 195-208.
- Cortés-Jacinto H., R. Villarreal-Colmenares, R. Civera-Cerecedo y R. Martínez-Córdova. 2003. Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Aquacult. Nut.*, 9: 207-210.
- Coelho-Emerenciano M. y W. Massamitu-Furuya. 2006. Ensilado de maíz en dietas para postlarva de camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*. *Invest. Mar.*, Valparaíso, 34: 57-61.
- Cruz-Suárez L. 1996. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. *En Cruz-Suárez L., D. Ricque-Marie y R. Mendoza-Alfaro (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Monterrey, Nuevo León, pp. 207-232.*
- Correia E., P. Castro y A. Ferreira. 1997. Alaliação de rações para o cultivo do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* em berçários. *Bol. Inst. Pesca Sao Paulo*, 24: 49-55
- Covenin. 1979. *Alimentos para animales. Determinación de cenizas*. Covenin, Caracas.
- Díaz-Herrera F., E. Pérez, C. Juárez, y L. Bückle. 1992. Balance energético de postlarvas y juveniles del langostino malayo *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Crustacea: Palaemonidae). *Cienc. Mar.*, 18 (2): 19-32.
- El-Sayed A. 1997. Growth rates and feed efficiency of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* fed varying protein and energy levels. *Bull. Nat. Inst. Oceanogr. Fish. Egy.*, 23: 439-448.
- García M. 1987. Formulación de dietas experimentales y piensos comerciales. *En J. Espinosa y U. Labarta (Eds). Alimentación en Acuicultura. CAICYT, Madrid. pp. 23-58.*
- Graziani C., K. Chung y M. De Donato. 1993. Comportamiento reproductivo y fertilidad de *Macrobrachium carcinus* (Decapoda: Palaemonidae) en Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 41 (3): 657-665
- Graziani C., C. Moreno y T. Orta. 1998. Efecto de la inseminación natural y artificial en la reproducción de *Macrobrachium jelskii* (Miers) (Decapoda: Palaemonidae). *Bol. Inst. Oceanogr. Ven.*, 37(1-2): 35-42
- Kucharski L. y R. Da Silva. 1991. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1:215-218.
- Lim C. y D. Akiyama. 1992. Nutrient requirements of penaeid shrimp. *J. Biol.*, 8: 60-73.
- Lobão V., H. Marques, E. Roverso, A. Pazinato, J. Lombardi, E. Hortensio y S. Melo. 1995a. Desenvolvimento ponderal de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapoda, Palaemonidae) em laboratório, frente ao uso de diferentes tipos de ração. *Bol. Inst. Pesca Sao Paulo*, 22(2): 63-69
- Lobão V., J. Lombardi, E. Roverso, H. Marques, E. Hortensio y S. Melo. 1995b. Efeitos de rações de origem protéica vegetal e animal na engorda de *Macrobrachium rosenbergii* (De man). *Bol. Inst. Pesca Sao Paulo*, 22(1): 159-164.
- Lodeiros C., R.I. Fernández, A. Bonmatí, J.H. Himmelman y K.S. Chung. 1996. Relation of RNA/DNA ratios to growth for the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* in suspended culture. *Mar. Biol.*, 126: 245-251.
- Molina-Vozzo R., J. Heinen y L. D'Abramo. 1995. Supplementation of commercial feeds with beef liver for indoor nursery culture of freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii*. *J. World Aquacult. Soc.*, 26(1): 103-106

- Molina C., E. Cadena y F. Orellana. 2000. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. *En* Cruz L.E, D. Rique, M. Tapia, M. Olivera y R. Civera (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola. Memorias V Simposio internacional de Nutrición Acuícola, Mérida, Yucatán, México. pp. 358-380.
- New M. 1976. A review of shrimp and prawn nutrition. *Proc. World Maricult. Soc.*, 7: 277-287.
- New M. y S. Singholka. 1984. Cultivo del camarón de agua dulce. FAO. Doc. Téc. Pesca. No. 225. Roma.
- Núñez M., C. Lodeiros, M. De Donato y C. Graziani. 2002. Evaluation of microalgae diets for *Litopenaeus vannamei* larvae using a simple protocol. *Aquacult. Inter.*, 10(3): 177-187.
- Rosas C., G. Cuzón, G. Gaxiola, C. Pascual, R. Brito, M. Chimal y A. Van Worhoutht. 2000. El metabolismo de los carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. *En* Cruz-Suárez L., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, México. pp. 340-358
- Sandifer P.A. y A.D. Joseph. 1976. Growth responses and fatty acid composition of juvenile prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) fed a prepared ration augmented with shrimp head pil. *Aquacult.*, 8: 129-138.
- Teshima Sh., S. Koshio, M. Ishikawa, Md. Shah y L. Hernandez. 2006. Protein requirements of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* evaluated by the factorial method. *J. World Aquacult. Soc.*, 37: 145-153
- Stanley R.W. y L.B. Moore. 1983. The growth of *Macrobrachium rosenbergii* feeds in pond cages. *J. World Maricult. Soc.*, 14: 174-184.
- Steel R. y J. Torrie. 1985. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2^{da} ed. McGraw-Hill, México.
- Valenti, W. C. 2006. Current status of freshwater prawn culture in Brazil. *En* Nair C.M., D.D. Nambudiri y S. Jose (Eds.) International Symposium on Freshwater Prawns, Kochi. Freshwater Prawns: Advances in Biology, Aquaculture & Marketing. Allied Publishers, New Delhi, India. pp. 106-111.
- Vega-Villasante F., H. Nolasco-Soria, R. Civera-Cerecedo, R. González-Valdés y M. Oliva-Suárez. 2000. Alternativa para la alimentación del camarón en cultivo: el manejo de la muda. *En* Cruz-Suárez L., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M., M. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, México. pp. 313-320.
- Velasco, M., A. Lawrence, F. Castille y L. Obaldo. 2000. Dietary protein requirement for *Litopenaeus vannamei*. *En* Cruz-Suárez L., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M., M. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, México. pp. 181-192
- Zar J. 1984. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey.

Efecto del levamisol sobre la generación de anticuerpos antirrábicos en ovejas vacunadas al tercer mes de gestación

Magaly Bracamonte*, Gustavo Morales y Noris Plaza

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Sanidad Animal. Av. Las Delicias. Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela. *Correo electrónico: mbracamonte@inia.gob.ve

RESUMEN

Se realizó un estudio experimental para determinar la generación de anticuerpos antirrábicos y su persistencia en el tiempo, en 30 ovejas preñadas de tres meses, mestizas razas West African y Barbado Barriga Negra. Se conformaron al azar tres grupos de estudio: grupo vacunado (10); grupo vacunado y desparasitado simultáneamente con levamisol, utilizado como desparasitante (10) y grupo control (10). Se evaluaron los sueros correspondientes a las ovejas de los tres grupos, desde los 0 días post vacunación hasta los 135 días, mediante la técnica de seroneutralización en ratones lactantes, y los títulos de anticuerpos se calcularon por la fórmula de Reed y Muench, considerando niveles $\geq 1:5$ protectivos contra la rabia. Para el estudio estadístico se empleó el análisis de varianza factorial 3 x 2 y para la separación de medias la prueba de Duncan. La respuesta serológica de los grupos G1 y G2 comienza a evidenciarse a partir de los 15 días post vacunación, alcanzando títulos más elevados en la fecha cercana al parto, entre 90 y 105 días post vacunación. Estadísticamente se comprobó en el grupo vacunado y desparasitado simultáneamente, una respuesta serológica significativamente mayor ($P < 0,05$) en comparación con el grupo que solo recibió vacuna, lo cual demuestra el efecto inmunopotenciador del levamisol en esta especie. Esta respuesta se ve reforzada con la condición del efecto hormonal después del parto ya que en las ovejas recién paridas los niveles de anticuerpos resultaron superiores y estadísticamente diferentes a los niveles correspondientes a las ovejas gestantes ($P < 0,05$).

Palabras clave: rabia, anticuerpos antirrábicos, inmunidad, ovinos.

Effect of levamisole on antibody generation in sheep vaccinated against rabies during the third month of pregnancy

ABSTRACT

An experimental study was carried out to evaluate the generation of antibodies for rabies virus and its persistence in time, using 30 pregnant West African and Barbados black belly sheep. Three groups of 10 sheep were randomly organized: (G1) vaccinated, (G2) vaccinated plus levamisol, and (G3) control. Serologic evaluation through seroneutralization test in lactating mice was done for all groups from 0 to 135 days, and antibodies titles were established using the Reed & Munch formula, considering levels greater than 1.5 as protectives against rabies. A factorial 3x2 analysis of variance and Duncan tests were used for statistical analysis. Serologic response was detected for G1 and G2 15 days after vaccination, reaching the highest titles between 90 and 105 days, just before parturition. Statistical significance ($P < 0,05$) between G1 and G2 showed the levamisol effect as potentiator of immune system in sheep, The ewe after partum had higher level of antibodies and significant different to pregnant ewe.

Keywords: rabies, antibodies for rabies, immunity, sheep.

INTRODUCCIÓN

Venezuela cuenta en su territorio con más de 4 millones de hectáreas de zonas áridas y semiáridas, las cuales constituyen un potencial para la ganadería ovina y caprina, como fuente de ingreso fundamental para los campesinos asentados en esas áreas, mediante la producción de carne, leche y pieles. Sin embargo, sería necesaria la introducción de nuevas tecnologías con el fin de mejorar su productividad (Reverón, 1990).

El último censo agrícola nacional oficial, registra una población ovina de 762.670 cabezas, lo cual muestra un incremento del 71% con respecto al anterior censo de 1985. Esta población está distribuida por todo el país, sobrepasando el millón de ejemplares, y en los estados Zulia y Falcón se concentra el 45% de la población total, ambos estados ubicados en la franja árida y semiárida, demostrando el determinismo climático de ubicación de la especie. La distribución de los rebaños dentro de las 29.254 explotaciones censadas está por el orden de 6,8% de sementales, 49,3% de machos, 21,6% de crías menores de seis meses y 22,3% de animales de reemplazo y para la venta. Sin embargo, muchas explotaciones con adelantos técnicos de manejo y producción, se utilizan para producción de corderos lechales y estos datos de distribución no estarían reflejados en el censo (MARNR, 2004).

El ganadero prefiere en la actualidad tener un rebaño ovino como fuente de abastecimiento de carne, a un menor precio que el sacrificio de un vacuno, por lo que se observa como se ha cuadruplicado en la última década su producción en estados como Barinas y Anzoátegui (MARNR, 2004). Igualmente, se evidencian condiciones futuras favorables de la explotación ovina durante las próximas dos décadas, debido al mejoramiento de las condiciones sanitarias, fertilidad, nutrición y potencial genético, sin necesidad de aumentar los recursos para su alimentación. Actualmente se podría hablar de una etapa de excelente recuperación de la cría ovina en el país, con el establecimiento de nuevas explotaciones, centros de cría altamente tecnificados en los estados Guárico, Anzoátegui, Monagas, Mérida, Táchira, Lara y Trujillo existiendo en Carabobo, Aragua y Miranda, explotaciones ovinas con sistemas tecnificados de importante producción, que generan

requerimientos crediticios y mayor demanda en el mercado interno para la cría y consumo.

El manejo sanitario de estos animales es similar a los de la ganadería bovina, existiendo explotaciones que diversifican su producción y toman en cuenta la vacunación antirrábica dentro de los planes de protección a los animales de la explotación. La prevención de la rabia en estos rebaños se orienta al control de la población de vampiros como principal agente transmisor, y a la vacunación de los susceptibles con la finalidad de lograr destruir las células infectadas por el virus rábico (Tizard, 2000). En vista de que los animales jóvenes son considerados inmunológicamente inmaduros, se recomienda vacunar a los corderos a partir de los 3 o 4 meses de edad, por lo que resulta muy importante garantizar altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra la rabia en el suero de las ovejas al momento del parto, que permitan una buena transmisión de anticuerpos a través del calostro. En estudios similares en otros rumiantes, se determinó que vacas vacunadas contra la rabia durante la gestación, garantizaron protección hasta los 4 meses de vida en los becerros, por transmisión de anticuerpos calostrales (Mora, 1991).

Por otra parte, se ha comprobado que el levamisol aumenta la resistencia a las infecciones experimentales de virus y protozoarios, y suprime células tumorales, y esta propiedad en particular le confiere una gran importancia, por ser el primero de una familia novel de agentes farmacéuticos de síntesis que actúa en la dinámica de la respuesta inmunitaria. Se debe diferenciar lo que es un estimulante que refuerza las defensas de forma no específica, de aquel que requiere la presencia de un antígeno inyectado simultáneamente para que aumente el efecto específico, bien sea humoral o celular (Diasio y Lo Buglio, 1996).

Todos los estudios indican que se deben ajustar los planes de vacunación, diseñando estrategias adecuadas derivadas de investigaciones desarrolladas en cada especie y adaptadas a nuestras condiciones (Mosquera, 1993), y como el levamisol es un desparasitante ampliamente utilizado en la especie ovina, del cual se ha demostrado su efecto inmunopotenciador en otras especies (Adrianova *et al.*, 1980; Bineva *et al.*, 1986; Ivanov *et al.*, 1987; Hogart-Scott *et al.*, 1980; Haasova *et al.*, 1990). El

objetivo de este trabajo fue evaluar la formación de anticuerpos antirrábicos en ovejas utilizando simultáneamente levamisol para comprobar sus bondades en esta especie, a fin de constituir un referencial tecnológico acorde con la realidad local.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó sobre un grupo de 30 ovejas preñadas de tres meses, primíparas, mestizas de las razas West African (WA) y Barbado Barriga Negra (BBN), ubicadas en las instalaciones del INIA-Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay, estado Aragua, Venezuela, en condiciones ambientales de 450 msnm, con 26-29°C de temperatura promedio anual y 76% de humedad relativa. Todos los animales fueron sometidos a un mismo régimen de alimento balanceado con pasto fresco picado (*Panicum maximum*), alimento concentrado (300 g/anim/d) y suplemento vitamínico.

Para la selección de las ovejas, se les realizó un screening serológico a fin de demostrar la ausencia de anticuerpos antirrábicos al inicio de la prueba; además se comprobó su tiempo de gestación mediante estudios ecográficos.

En el ensayo se utilizó una vacuna antirrábica comercial, elaborada en cultivo celular, cuya potencia resultó con 1,9 UI/dosis de efectividad mediante la prueba NIH. Este método está basado en la neutralización de una serie de diluciones de sueros con una dosis constante de un virus de desafío, previamente titulado, y se usa para estudiar el valor inmunizante de vacunas antirrábicas comerciales (Kaplan y Koprowsky, 1976; Larghi y Nebel, 1980). Igualmente se aplicó un producto comercial como desparasitante, cuyo principio activo es levamisol al 7,5%.

Para medir los títulos de anticuerpos antirrábicos generados en las ovejas, se empleó la técnica de Seroneutralización en ratones adultos, desarrollada por Webster y Dawson (1935), y es también utilizada para identificación de virus rábico, siendo recomendada por el Comité de Expertos de la OMS sobre rabia (OMS, 1992). Con esta técnica cada muestra de suero se trabajó en diluciones base 5 y se enfrentaron a un virus de desafío fijo (CVS) con un título de $10^{5.8}$ DL₅₀/0,03 mL, cuya dilución de trabajo contenía 64 DL₅₀ de CVS. Los títulos de anticuerpos se calcularon por la fórmula de Reed y Muench

(1938) y se consideraron como niveles protectivos contra la rabia, menor o igual a 1:5, según las normas establecidas por el Comité de Expertos de la OMS (OMS, 1992).

Se estableció un experimento completamente aleatorizado, conformado por tres grupos:

Grupo 1 (G1): conformado por 10 ovejas (5 WA y 5 BBN), las cuales fueron inmunizadas con vacuna antirrábica inactivada, al tercer mes de gestación.

Grupo 2 (G2): conformado por 10 ovejas (5 WA y 5 BBN), las cuales fueron inmunizadas con vacuna antirrábica inactivada al tercer mes de gestación, y simultáneamente les fue aplicado un desparasitante comercial (levamisol al 7,5%), en dosis de 3 mg/kg de peso vivo.

Grupo 3 (G3) o control: conformado por 10 ovejas preñadas (5WA y 5 BBN), sometidas a las mismas condiciones de manejo y alimentación que el resto de las ovejas del ensayo, pero sin recibir ni vacuna antirrábica ni desparasitante.

Al cumplir los tres meses de gestación, a los tres grupos de ovejas les fue tomada una muestra de suero y ese mismo día, los grupos G1 y G2 recibieron los tratamientos antes mencionados, con el fin de determinar los niveles de anticuerpos antirrábicos a los 0 días post vacunación (PV), y luego se continuó la medición de anticuerpos cada 15 días, hasta los 135 días PV.

Para el estudio estadístico de los datos se tomó en cuenta los tres grupos conformados, el período de gestación (C1) y de parto (C2), y se empleó el análisis de varianza factorial de 3 x 2, utilizándose el denominador de la dilución (por ejemplo, 1:5 = 5), como variable respuesta, y como variables de clasificación el tratamiento de los grupos G1 y G2 y la condición C1 ó C2. Como prueba para la separación de medias se recurrió a la prueba de Duncan y se estableció como nivel de significación un valor de $P < 0,05$. El paquete estadístico empleado fue InfoStat (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se puede observar la respuesta serológica de los animales de los grupos G1 y G2 a partir de los 15 días PV, presentando valores superiores a los mínimos considerados como

protectivos contra la rabia ($\geq 1:5$), y alcanzando títulos más elevados en la fecha cercana al parto, entre 90 y 105 días PV, sugiriendo que el componente hormonal que se activa en este período pudiese estar relacionado con esa respuesta. Esta situación sigue un patrón ya comprobado con anterioridad por otros investigadores quienes han realizado ensayos en animales gestantes con seis tipos de vacunas diferentes, encontrando títulos considerados protectivos contra la rabia a partir de los 30 días PV (Arnold y Penty, 1979). Otros han obtenido en la misma especie, a los 29 días PV una media de títulos de anticuerpos de 1:60 (Fábrega, 1970). Igualmente, en el caso de aplicar dos vacunaciones se encontraron títulos mayores en los revacunados al momento del parto, hasta de tres veces superior a los vacunados con una sola dosis (Mora, 1991; Mosquera, 1993).

Sin embargo, se observó una mayor respuesta serológica en las ovejas paridas del grupo G2, siendo estos resultados comparables con los obtenidos en otros ensayos realizados en ovejas empleando vacuna clostridial más levamisol, donde se demostró un efectivo incremento de los niveles de anticuerpos a los componentes vacunales cuando fue administrada en combinación con el desparasitante (Hogart-Scott *et al.*, 1980).

Igualmente, en ensayos con ovejas empleando polivacuna contra enterotoxemia C y D más levamisol, se evidenció estimulación de la inmunogénesis contra el antígeno tipo D (Bineva *et al.*, 1986) y ensayos en vacas utilizando tuberculina más levamisol se encontró una respuesta humoral de forma abrupta, cuando éste se aplicó al 7^{mo} día PV a diferencia de animales no estimulados (Ivanov *et al.*, 1987).

Al comparar los niveles de anticuerpos antirrábicos de los tres grupos de estudio (Cuadro 1), se observan diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0,05$). El mismo resultado se observa en la comparación entre la condición de gestante o parida (Cuadro 2), y entre los grupos y la condición ($P < 0,05$) (Cuadro 3).

Los valores más elevados de anticuerpos correspondieron a la combinación de tratamiento (G2) de vacunación antirrábica más levamisol. Así mismo, constatamos simultáneamente que el grupo de las ovejas paridas, presentó los mayores títulos de anticuerpos antirrábicos ($P < 0,05$).

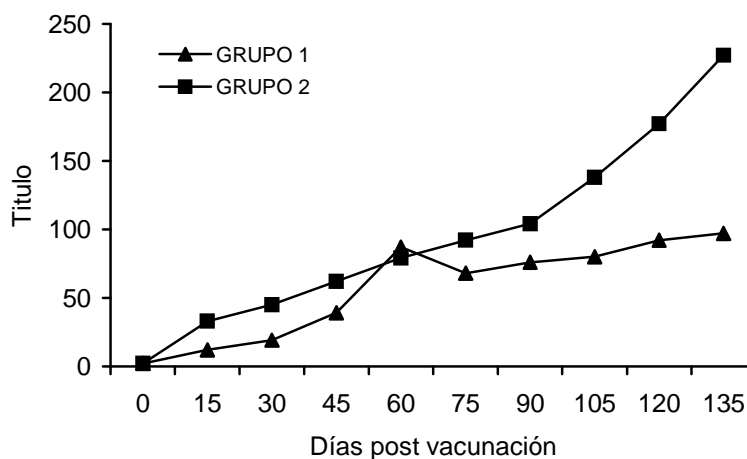


Figura 1 Títulos de anticuerpos antirrábicos en ovejas del Grupo 1 y Grupo 2

Cuadro 1. Comparación de los niveles de anticuerpos antirrábicos entre los grupos de estudio

Grupos	Anticuerpos†	n
G1	55,11b	100
G2	95,81c	100
G3	2,00a	100

† Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

n: Número de muestras de suero examinadas por grupo de estudio

Cuadro 2. Comparación de los niveles de anticuerpos antirrábicos entre la condición de gestante o parida.

Condición	Anticuerpos†	n
C1	23,97a	150
C2	77,98b	150

† Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

n: Número de muestras de suero examinadas por grupo de estudio

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En relación a la cinética de anticuerpos se observó en los días cercanos al parto, el efecto hormonal incide positivamente sobre la generación de anticuerpos antirrábicos en ovejas vacunadas al tercer mes de gestación, observándose a partir de ese momento niveles de anticuerpos significativamente altos.

La estrategia de vacunar ovejas gestantes, con vacuna antirrábica más levamisol induce una mayor respuesta en cantidad y tiempo de permanencia de anticuerpos, demostrando el efecto inmunopotenciador del desparasitante en esta especie.

Se amerita evaluar el desarrollo de la inmunidad pasiva contra la rabia en los corderos provenientes de madres vacunadas durante la gestación.

LITERATURA CITADA

- Arnold R. y L. Penty. 1979. Vacunación en bovinos contra la rabia. Centro Panamericano de Zoonosis, 15(3): 45-67.
- Bineva L., B. Peichev y M. Marinov. 1986. Trails of immunoestimulation of an antitoxic response with Levamisol in the immunization of sheep with a combined clostridial vaccine. *Vet. Medical Nauki.*, 23(4): 35-38.
- Diasio R. y A. Lo Buglio. 1996. Inmunomoduladores: Fármacos inmunosupresores e inmunoestimulantes. *En* Hardman J., L. Limbird, P. Molinoff, R. Ruddon y A. Goodman. (Eds) Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9^{na} ed, Mac Graw Hill. pp 36-58.
- Fábrega F. 1970. Respuesta inmune en bovinos vacunados con vacuna de cerebro de ratón lactante. II Congreso de Medicina Veterinaria y Zootécnica. *Boletín Centro Panamericano de Zoonosis*, 12(4): 36-87.
- Haasova I., O. Matouche, D. Jilek, V. Oral, J. Svejda y J. Richter. 1990. Intradermal method of vaccination with a human diploid cell tissue
- Adrianova L., E. Berger, G. Butenko y T. Echeneva. 1980. Experimental investigation on possibilities of regeneration of the immunity in old animals. *Zeitschrift fue Allgimine Mikrobiologie*, 35(2): 165-170.

- culture vaccine for preexposure antirrabies immunizations. *Cas Lek.*, 129(7): 216-218.
- Hogart-Scott R., D. Liardet y P. Morris. 1980. Levamisole vaccine combinations and heightened antibody response. *Australian Vet. J.*, 56(6): 285-291.
- Infostat. 2004. Manual Infostat Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ivanov L., R. Arzov, I. Simov, I. Dimov y I. Sizov. 1987. Effect of tuberculin and levamisole on the immune response after vaccinating calves against parainfluenza and salmonella infections. *Veterinary Medical Nauki.*, 24(4): 43-49.
- Kaplan M. y H. Koprowsky. 1976. La Rabia: Técnicas de Laboratorio, 3^{ra} ed. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.
- Larghi O. y A. Nebel. 1980. Duration of immunity afforded to cattle by binary-ethylamine inactivated rabies vaccine. *Zbl. Vet. Med. B.*, 32: 609-615.
- MARNR. 2004. Primer informe sobre la situación de los recursos zoogenéticos en la República Bolivariana de Venezuela. FAO/CDB. Caracas, Venezuela.
- Mora S. 1991. Respuesta inmune a vacunación antirrábica y transferencia de anticuerpos en bovinos Holstein-Friesian. Tesis de grado. Univ. Central Ven., Fac. Cien. Vet. Maracay, Venezuela.
- Mosquera O. 1993. Respuesta inmunitaria en becerros inoculados con diferentes tipos de vacunas antirrábicas. Tesis de grado, Univ. Zulia, Fac. Cienc. Vet. Maracaibo, Venezuela.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1992. Comité de Expertos sobre Rabia. 8^{vo} Informe. Serie de Informes Técnicos, N° 824, Ginebra.
- Reed L.J. y Muench M.A. 1938. Simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-497.
- Reverón A. 1990. Consideraciones sobre la producción y productividad de los corderos. Memorias Ciclo de Conferencias sobre Producción de Ovinos y Caprinos. Fonaiap, Fac. Agronomía, UCV. Maracay. pp.1-6.
- Tizard I. R. 2000. Inmunología Veterinaria. 6^{ta} ed. McGraw Hill.
- Webster L. y Dawson J. 1935. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 32: 570-573.

Estudio comparativo de tres cepas vacunales del virus causante de la enfermedad de la bursa en pollos de engorde

Elsy Saume^{1*}, Elio Sogbe², María J. Castro¹ y Marisela Ascanio³

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Sanidad Animal. Maracay 2101, Aragua. Venezuela. *Correo electrónico: esaume@inia.gob.ve

² Laboratorio Diasog. Maracay, Aragua. Venezuela.

³ Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Maracay, Aragua. Venezuela.

RESUMEN

El virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (EIB) produce una de las más importantes enfermedades inmunodepresivas del sector avícola comercial. El presente estudio fue diseñado con el propósito de comparar el efecto producido sobre la bursa en pollos vacunados con las cepas suave, intermedia e intermedia plus de la EIB a través de la relación peso bursa/peso corporal y de diferentes cambios histopatológicos. Se realizó un ensayo con 200 pollos broiler del híbrido cobb x cobb, divididos en 4 grupos de 50 pollos, cada grupo se formó con 5 réplicas de 10 pollos. Los tratamientos consistieron en cuatro grupos: control (A), vacunados con la cepa suave (B), con cepa intermedia (C) y con cepa intermedia plus (D). Los pollitos fueron vacunados a los 10 días de edad y sacrificados a los 8, 16, 22 y 32 días post vacunación (PV) registrándose el peso corporal, y de la bursa, así como los cambios histopatológicos en la bursa. A los 32 días PV sólo el grupo vacunado con la cepa intermedia plus presentó atrofia bursal y diferencias ($P < 0,05$) histopatológicas con los otros grupos. En el grupo, se observaron lesiones microscópicas mayores, y una menor reactividad a los 8 y 32 días PV. Estos resultados sugieren que la cepa intermedia plus de la EIB es más invasiva, evidenciándose a través de bursas más pequeñas con mayores lesiones microscópicas.

Palabras clave: enfermedad infecciosa de la bursa, cepas vacunales, bursa.

Comparative study of three vaccine strains of the virus that affect the bursa in broilers

ABSTRACT

The virus that infects the bursa in broilers (IBDV) causes one of the most important immunosuppressive diseases in commercial poultry. The present study was designed to compare the effect on the broiler's bursas of three vaccines made with three different viral strains, mild, intermediate and intermediate plus, of IBDV. It was evaluated by means of comparing the bursa/body weight ratios and bursa histopathological changes. The experiment was conducted with 200 cobb x cobb broiler chickens, divided in 4 groups of 50 chickens each. Each group consisted of 5 replicates of 10 chickens each. The groups were: (A) no vaccinated (control); (B) vaccinated with the mild strain, (C) vaccinated with the intermediate strain, and (D) the vaccinated with the intermediate plus strain. The chicks received a first vaccination at ten days old. Chicks were slaughtered at 8, 16, 22, and 32 days post vaccination (PV), and body and bursal weights were recorded and bursa tissues were examined for histopathological changes. At 32 days PV only the intermediate plus vaccine produced atrophy of the bursa and significant histopathological differences ($P < 0.05$) with the other groups. For the D, there were observed larger microscopic lesions and low reactivity at 8 and 32 d PV. These results suggest that the intermediate plus IBDV vaccine is more invasive as evidenced by smaller bursas and larger microscopic lesions.

Keywords: bursa infection, vaccinal strains, bursa.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad infecciosa de la bursa (EIB) o enfermedad de Gumboro continúa siendo motivo de preocupación en la industria avícola, debido al impacto económico que representa debido a la disminución de la productividad en el sector, como consecuencia del efecto inmunosupresor que produce en las aves.

La enfermedad está ampliamente distribuida en el mundo (Morales, 1995). Esta enfermedad es producida por un birnavirus que genera inmunosupresión en el sistema inmune humoral de las aves y es bastante resistente a las condiciones ambientales y a los desinfectantes (Rosales, 1989). La protección del pollo contra la EIB a través del uso de vacunas se complica por la presencia de dos serotipos y de varios subtipos antigénicos del virus o variantes. Virus de los serotipos 1 y 2 han sido observados en pollos, pero solo el serotipo 1 causa inmunosupresión. La vacunación con un antígeno específico del serotipo 1 no siempre va a proteger a los pollos contra la enfermedad cuando el antígeno del reto sea de un subtipo diferente (Jackwood, 1999).

El diseño de un programa de vacunación exitoso está basado en algunos factores como: 1) Cantidad de virus en el medio ambiente. 2) Diversidad antigénica del virus. 3) Nivel de inmunidad materna y la uniformidad de estos anticuerpos. 4) Cepa vacunal utilizada, ya que algunas cepas tienden a ser más virulentas que otras (Lukert, 1991a). Se han desarrollado vacunas atenuadas o suaves que no causan daño en la bursa, así como vacunas intermedias más patógenas que las suaves y que fueron desarrolladas a causa de la interferencia de los anticuerpos maternos con la vacunación con cepas atenuadas. También existen las cepas vivas virulentas o cepas calientes que se administraron en parvadas donde existían desafíos altamente virulentos (Avellaneda y Villegas, 1995) y las cepas llamadas intermedias plus que sustituyen a las cepas calientes por ser menos patógenas, pero que también pueden causar atrofia de la bursa de Fabricio y son utilizadas donde existen variantes del virus (Dormitorio *et al.*, 1996). Banda y Villegas (2004) caracterizaron genéticamente virus altamente virulentos detectados en Venezuela, encontrando que son semejantes a los virus encontrados en Europa y Asia, los cuales están asociados a hemorragias generalizadas en músculos y

en la bursa, motivo por el cual se ha generalizado el uso de vacunas intermedia plus en el país.

El objetivo de esta investigación fue comparar el efecto producido sobre la bursa por el uso de las cepas vacunales de EIB, suave, intermedia e intermedia plus, a través de la relación peso bursa/peso corporal y de los diferentes cambios histopatológicos durante un ciclo de producción en pollos de engorde.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 200 pollos del híbrido cobb x cobb de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial y de un mismo lote de reproductoras, a los cuales se les suministro alimento comercial y agua *ad libitum*.

Se realizaron 4 tratamientos, cada uno con 5 replicas de 10 pollos, para un total de 50 pollos por tratamiento. Los grupos de tratamientos fueron: A) Control no vacunado, B) vacunado con cepa suave, C) vacunado con cepa intermedia y D) vacunado con cepa intermedia plus. A los diez días de edad fueron vacunados en el agua de bebida a la dosis recomendada por el laboratorio productor de los biológicos utilizados.

Previo a la vacunación se les realizó titulación de los anticuerpos maternos mediante la técnica de ensayo inmunoenzimático ELISA, los cuales tuvieron un título promedio de 2.579, lo que nos indicó la caída natural de los anticuerpos maternos, siendo el momento óptimo de realizar la vacunación ya que altos niveles de estos inhiben la respuesta inmune producida por la vacunación. (Naqi *et al.*, 1983).

Se realizó el pesaje de las aves semanalmente a partir de la vacunación y la necropsia a 5 aves por grupo semanalmente hasta el final del ensayo para extracción de la bursa, pesaje, observación macroscópica y realización de histopatología. Para esto último, las muestras fueron fijadas en formalina neutra al 10% buffer y teñidas con hematoxilina y eosina (Allen, 1995). Una vez coloreadas se procedió a la observación de las lesiones mas representativas y la reactividad. (Kim *et al.*, 1999).

En el análisis estadístico de los datos de peso ave, peso bursa y relación peso bursa/peso corporal, se

realizó análisis de varianza y la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $P < 0,05$. Para el análisis de los resultados de la reactividad de las bolsas, se utilizó el método no paramétrico de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de $P < 0,05$ y se convirtieron en escala numeral según los resultados de reactividad: + = 1, +/+ = 2, ++ = 3, +/+ = 4, +++ = 5. La relación peso bursa/peso corporal (PB/PC) se calculó dividiendo el peso de la bursa entre el peso del ave multiplicado por 1000 (Giambrone y Closse, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al observar las bolsas, macroscópicamente, no se observaron lesiones evidentes como edema y hemorragia, resultado similar al señalado por Rautenschlein *et al.* (2005).

En la relación peso bursa/peso cuerpo (PB/PC), promedio por grupo de tratamiento (Cuadro 1), se observó que a los 10 días de edad prevacunación los pollos de los grupos C (vacunados con cepa intermedia) y D (vacunados con cepa intermedia plus) presentaron bolsas más pequeñas que el resto de los grupos; sin embargo, a los 8 días post vacunación no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos. Kuliková *et al.* (2004) evaluaron la relación PB/PC a los 10 días PV de aves vacunadas con cepas suaves, intermedias y fuertes, observando diferencias significativas entre los grupos vacunados con cepas fuertes y en un grupo vacunado con una cepa suave con los grupos de cepas intermedias. A los 16 días post vacunación los pollos vacunados con la cepa intermedia presentaron atrofia de la bursa, al igual que los vacunados con las cepas intermedia plus.

Cuadro 1. Relación Peso Bursa/Peso Cuerpo promedio por grupo de tratamiento.

Tratamiento	Pre-vacunación	Días Post-vacunación			
		8	16	22	32
No vacunado	3,31a	2,34ab†	2,38a	2,59a	2,88a
Vacunado cepa suave	3,31a	1,87a	2,97a	2,65a	2,36a
Vacunado cepa intermedia	2,29ab	1,72a	1,55b	1,86a	2,33a
Vacunado cepa intermedia plus	1,82b	2,03a	2,00ab	2,48a	1,20b

† Valores con distintas letras en la misma columna son diferentes estadísticamente ($P < 0,05$).

Cuadro 2. Reactividad de las bolsas por histopatología.

Tratamiento	Pre-vacunación	Días Post-vacunación			
		8	16	22	32
No vacunado	+/+a	++a	+/+/+a	+/+/+a	+/+/+a
Vacunado cepa suave	+a	++a	++b	+/+/+a	+/+/+a
Vacunado cepa intermedia	+a	+/+/+ab	++b	+/+/+a	+/+/+a
Vacunado cepa intermedia plus	+a	+b	++b	+/+/+a	++b

† Valores con distintas letras en la misma columna son diferentes estadísticamente ($P < 0,05$).

Kuliková *et al.* (2004) reportan también atrofia en pollos vacunados con las cepas intermedias. A los 32 días post vacunación al final del ensayo sólo el grupo D (vacunado con la cepa intermedia plus) presentó atrofia de la bursa con el menor índice de relación PB/PC. Lukert (1991b) señala que las cepas suaves no tienen efecto significativo en la bursa. A su vez, Rautenschlein *et al.* (2005) reseñan que al vacunar pollos con cepas intermedia e intermedia plus, al final del ensayo sólo el grupo vacunado con la cepa intermedia plus presentó disminución significativa de la relación PB/PC. Según Ceruti *et al.* (2004) esto se debería a que la relación PB/PC es favorecida con las vacunas de menor patogenicidad. Hassanzadeh *et al.*

(2006) observaron que la relación PB/PC de aves vacunadas con diferentes planes de vacunación, incluyendo la vacuna complejo virus-anticuerpo en Ovo al día 18, no tuvieron diferencias significativas entre sí, pero hubo diferencias significativas con el grupo no vacunado, no desafiado, el cual obtuvo la mejor relación PB/PC. No obstante, Mazariegos *et al.* (1990) indican que la relación PB/PC no siempre resulta un buen indicador, ya que algunos pollos que no mostraron mayores cambios en la relación PB/PC, no respondieron adecuadamente a la vacunación contra Newcastle, teniendo además severas lesiones microscópicas en la bursa.

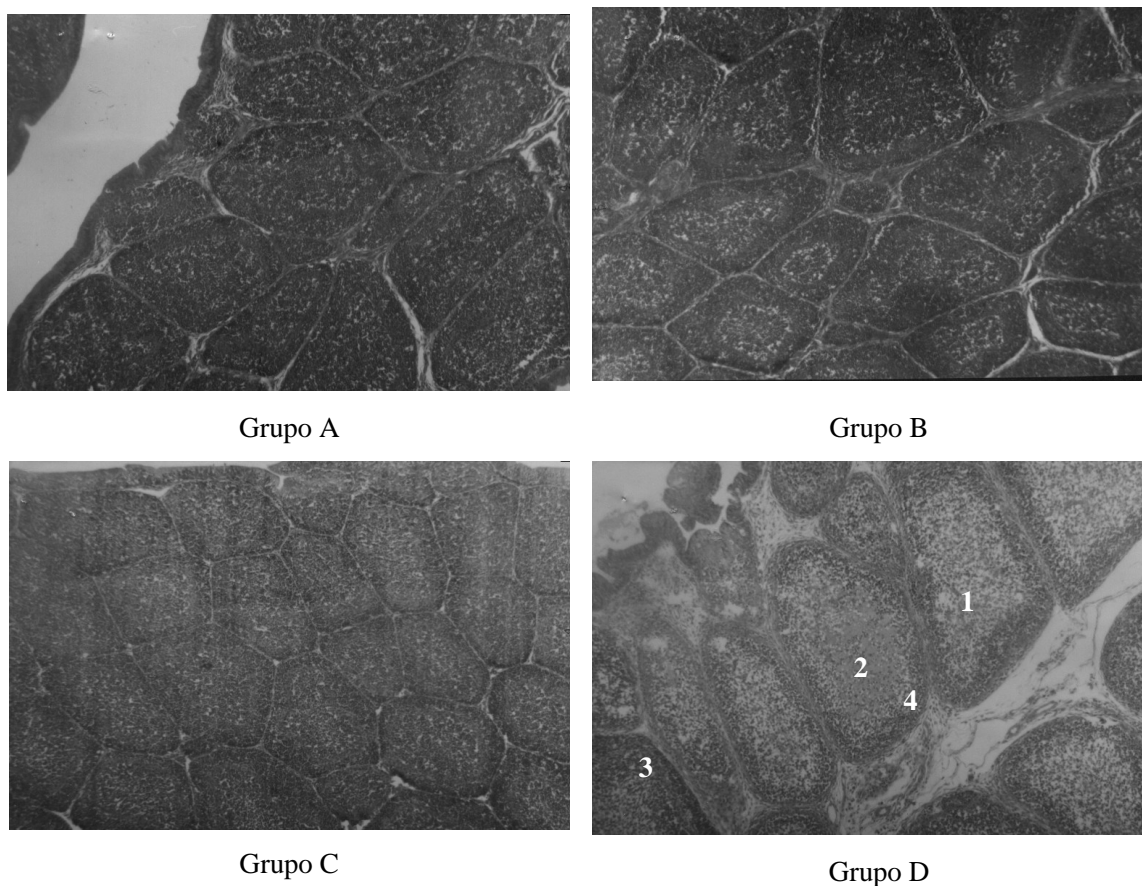


Figura 1: Micrografías de Bursas de Fabricio. 40x. Pollos de 42 días de edad. Grupo A (control) bursa normal, folículos linfoides homogéneos con distribución uniforme de la población linfocitaria. Grupo B (cepa suave), bursa similar a lo observado en el grupo control. Grupo C (cepa intermedia) bursa con aspecto completamente normal, similar a lo observado en los grupos A y B. Grupo D (cepa intermedia plus), se observan folículos linfoides con 1: depleción linfocitaria centro folicular, 2: persisten aún focos de necrosis, 3: intento de repoblación linfoide, 4: edema interfolicular.

En el estudio de reactividad de las bursa por histopatología (Cuadro 2) se observó que hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) a los 8 días post vacunación entre el grupo D (vacunado con la cepa intermedia plus) y el resto de los grupos. A los 16 días post vacunación, la mejor reactividad la presentó el grupo A (control) con diferencias significativas con los demás grupos de tratamiento, mientras que a los 22 días la reactividad fue igual para todos. A los 32 días post vacunación hubo diferencias significativas en el grupo D, presentando menor reactividad (Figura 1) con respecto a los demás grupos.

Giambrone y Clay (1986) indican que las cepas más invasivas y patógenas inducen bursas más pequeñas y mayores lesiones microscópicas en la bursa, por ello el grupo D (cepa intermedia plus) a los 32 días post vacunación presentó atrofia de la bursa y microscópicamente menor reactividad. Estos resultados también pueden ser debido a que la velocidad de recuperación de la bursa varía con la virulencia del virus utilizado (Kim *et al.*, 1999).

Rautenschlein *et al.* (2003) al evaluar bolsas de Fabricio de aves vacunadas con cepas intermedias observaron recuperación folicular con aumento de la repoblación linfocitaria a los 8 días PV. Rautenschlein *et al.* (2005) reportan que la cepa intermedia plus, induce lesiones similares con la bursectomía, ya que disminuyen las células de replicación del virus, produciendo incremento de lesiones microscópicas, concordando con los resultados obtenidos.

Los resultados de esta investigación nos indican que en el grupo A (control) y el grupo B (cepa suave) los cambios de maduración folicular son similares y obedecen al progreso orgánico e inmunológico del ave, evolucionando de acuerdo a la edad para la época de beneficio, concordando esto con la relación PB/PC. En el grupo C (cepa intermedia) la recuperación de la población linfocitaria en los folículos linfoides después del proceso de necrosis inicial es adecuada y acorde con la relación PB/PC.

En el grupo D (cepa intermedia plus) la capacidad de los folículos linfoides para reestablecer la población de linfocitos después de los fenómenos de necrosis inducidos por el virus vacunal, fueron insuficientes para la repoblación linfoide adecuada y sólo

presentaron reactividad moderada que concuerda con los resultados de la relación PB/PC, recomendándose el uso de este tipo de vacunas en zonas de alto desafío y como segunda dosis

CONCLUSIONES

Se concluye que las cepas vacunales suave e intermedia pueden ser utilizadas como prevención de la enfermedad en la primo vacunación y en aves ubicadas en zonas de bajos o medianos desafíos. Se recomienda la aplicación de las cepas vacunales intermedia plus de la enfermedad infecciosa de la bursa, por ser más invasiva, como segunda dosis y en zonas de alto desafío.

LITERATURA CITADA

- Allen T.C. 1995. Hematoxilina y eosina. *En* Registro de Patología de los Estados Unidos de América (Ed) Métodos Histológicos. 3^{ra} ed. American Registry of Pathology. Washington, D.C. pp. 55-60
- Avellaneda G y Villegas P. 1995. Enfermedad infecciosa de la bolsa (Gumboro): Programas de control. *Avicultura Profesional*, 13(1): 27-32.
- Banda A. y Villegas P. 2004. Bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis.*, 48: 540-549.
- Ceruti R., L. Gavazzi, G. Grillo y A. Zanella. 2004. Infectious bursal disease: Field evaluation on effects of two vaccines with different level of residual pathogenicity in broilers. *Proc. 53th Western Poultry Disease Conference*. Sacramento, California, USA. pp. 34-36
- Dormitorio T.V., J.J. Giambrone y L.W. Duck. 1996. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolate. *Avian Dis.*, 40: 496-497.
- Giambrone J.J. y R.P. Clay. 1986. Evaluation of the immunogenicity, stability, pathogenicity, and immunodepressive potencial of four commercial live infectious bursal disease vaccines. *Poultry Sci.*, 65(7): 1287-1290.

- Giambrone J.J. y J. Closser. 1990. Efficacy of live vaccines against serologic subtype of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 34: 7-11.
- Hassanzadeh M., M. Hassan, B. Fard y A. Tooluo. 2006. Evaluation of the immunogenicity of immune complex infectious bursal disease vaccine delivered in ovo to embryonated eggs or subcutaneously to day-old chickens. *Inter. J. Poultry Sci.*, 5(1): 70-74.
- Jackwood D. 1999. Biotecnología de la infección bursal. *Memorias XIII Congreso Latinoamericano de Avicultura. Amevea, Univ. Georgia. Athens, Georgia.* pp.30-36.
- Kim I., M. Gajic y M. Sharma. 1999. Recovery of antibody producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 43: 401-413.
- Kuliková L., V. Jurajda y R. Juranová. 2004. Effects of infectious bursal disease vaccination strains on the immune system of Leghorn chickens. *Acta Vet. Brno.*, 73: 205-209.
- Lukert P. 1991a. Uso de vacunas vivas contra la enfermedad de gumboro en presencia de anticuerpos maternos. *Boletín No. 36, Laboratorios Vineland. Vineland, New Jersey. USA.*
- Lukert P. 1991b. Vacunación exitosa. Guías para la prevención de pérdidas por enfermedad y mayores ganancias. *Boletín No. 39, Laboratorios Vineland. Vineland, New Jersey. USA.*
- Mazariegos L.A., P.D. Lukert y J. Brown. 1990. Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease intermediate strains. *Avian Dis.*, 34: 203-208.
- Morales O. 1995. Actualidades en el control de la enfermedad infecciosa de la bursa. *Memorias VI Congreso Nacional de Avicultura. Fenavi, Maracaibo, Zulia. Venezuela.* pp. 360-364.
- Naqi S., B. Marquez y N. Sahin. 1983. Maternal antibody and its effect on infectious disease immunization. *Avian Dis.*, 27: 623-631.
- Rautenschlein S., H. Yeh y J. Sharma. 2003. Comparative immunopathogenesis of mild, intermediate, and virulent strains of classic infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 47: 66-78.
- Rautenschlein S., Ch. Kraemer, J. Vanmarcke y E. Montiel. 2005. Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. *Avian Dis.*, 49: 231-237.
- Rosales G. 1989. Control de la enfermedad de gumboro. *Avicultura Profesional*, 7(2): 70-72.

Nota Técnica

Efecto de la cáscara de huevo en la producción de cápsulas de la lombriz roja (*Eisenia andrei*)

Alexander Rafael Castro¹; Luis José Cova², Danny Eugenio García^{3*} y María Gabriela Medina⁴

¹ Instituto Nacional de Tierras, Trujillo, Venezuela

² Instituto de Investigaciones Experimentales "José Witremundo Torrealba", Universidad de Los Andes, Trujillo, Venezuela

³ Estación Experimental y de Producción Agrícola "Rafael Rangel", Universidad de Los Andes, Trujillo, Venezuela.

*Correo E: dagamar8@hotmail.com

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Estación Experimental Pampanito, Trujillo, Venezuela

RESUMEN

Con el objetivo de conocer la influencia de la adición de cáscara de huevo de gallina en la reproducción de la lombriz roja (*Eisenia andrei* Bouché) en un sustrato compuesto por estiércol bovino, se realizó un experimento en el estado Trujillo, Venezuela, mediante un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo y veinte réplicas. Los sustratos con las diferentes proporciones de cáscara constituyeron los tratamientos ($C_0=0$, $C_1=1$, $C_2=2$ y $C_3=3\%$). En la etapa inicial se formaron cuatro grupos de ochenta lombrices nacidas al mismo tiempo, las cuales fueron alimentadas durante el crecimiento bajo las proporciones determinadas de cáscara en su dieta. A los tres meses de edad, los individuos de cada tratamiento se dividieron en 20 frascos. Cada 10 días y durante un mes se cambiaron a frascos nuevos manteniendo la composición del sustrato inicial respectivo. En cada periodo se contaron las cápsulas depositadas. Se observó un efecto significativo de la inclusión de 2 y 3 % de cáscara en la producción de cápsulas a los 20 y 30 días de medición (110 y 120 días de vida). Las ecuaciones que presentaron los mayores ajustes en cuanto a la producción de cápsulas en el tiempo fueron las cuadráticas. Se concluye que la inclusión de 2 y 3% de cáscara de huevo de gallina en un sustrato de estiércol bovino favorece la deposición de cápsulas de *E. andrei* a los 20 y 30 días.

Palabras clave: lombriz, *Eisenia andrei*, calcio, cáscaras de huevo, cápsulas.

Effect of egg shell in capsule production of the red worm (*Eisenia andrei*)

ABSTRACT

An experiment was carried out in order to determine the influence of addition of egg shell in the reproduction of the red worm (*Eisenia andrei* Bouché) in bovine manure substrate in Trujillo state, Venezuela, using a totally randomized design with measurement repeated in time and 20 replicates. Different egg shell proportion constituted the treatments ($C_0=0$, $C_1=1$, $C_2=2$, and $C_3=3\%$). In the initial stage four groups of eighty worms at the same time were formed. During growth, worms were fed with the above proportions of shell in the diet. At three months of age, the individuals in each treatment were divided in 20 flasks. Every 10 days and during one month they were changed to new flasks maintaining the composition of the respective initial substrate. The deposited capsules in the flasks were counted. A significant effect in the capsules production was observed ($P<0.05$) at 20 and 30 days of measuring (110 and 120 days of age). The equations with the biggest adjustments according to the capsules production in time were quadratic functions. The inclusion of egg shell in 2 and 3% rate in bovine manure, favored the capsules deposition of *E. andrei* at 20 and 30 days.

Keywords: worm, *Eisenia andrei*, calcium, egg shell, capsules.

INTRODUCCIÓN

La lombriz roja (*Eisenia andrei* Bouché) constituye uno de los organismos más interesantes de la fauna edáfica tropical y entre todas las especies de lombrices existentes en el mundo, es la que reúne las mejores características para la cría industrial por su rápida tasa de descomposición de la materia orgánica (García *et al.*, 1995), calidad proteica (Vielma-Rondón *et al.*, 2003) y naturaleza multipropósito (Compagnoni *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1999).

El comportamiento reproductivo de esta lombriz se encuentra muy relacionado con su alimentación y específicamente con la presencia de calcio en su dieta (Satchell, 1983). El aparato digestivo del anélido posee unas glándulas calcíferas encargadas de elevar el pH de las sustancias que pasan por el esófago hasta niveles adecuados para su digestión. Esta alcalinización se realiza por medio de la descarga de carbonato cálcico al bolo alimenticio. (Duque, 1997).

Al respecto, en algunas investigaciones sobre las características reproductivas de esta lombriz en condiciones subtropicales y templadas se ha informado que produce más de una cápsula por semana (Meinicke, 1988; Santacana, 1996).

Por otra parte, la cáscara de huevo de gallina es un material de desecho producido en grandes cantidades en Venezuela. Esta fuente contiene elevadas proporciones de calcio (Butcher *et al.*, 1991), por lo cual se convierte en la forma más idónea y natural de suministro del macroelemento para las lombrices. A la par que mediante esta práctica se garantiza un adecuado y útil destino de este desecho (Ferruzzi, 1987).

Teniendo en cuenta la importancia que reviste determinar la influencia de fuentes de calcio en las características reproductivas de este anélido en condiciones tropicales, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de cuatro proporciones de cáscara de huevo de gallina en la producción de cápsulas de la lombriz roja (*E. andrei*) en un sustrato de estiércol bovino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Investigación en Recursos Subutilizados,

ubicada en el Núcleo Universitario "Rafael Rangel", perteneciente a la Universidad de Los Andes (ULA), en el estado Trujillo, Venezuela.

Durante el periodo experimental se llevó un registro de la temperatura y la humedad en el área. En este sentido, la temperatura máxima fue de 29,0°C, la mínima de 21,0°C y la humedad relativa osciló entre 68-72%.

Material biológico y suministros

Para la realización del ensayo, las lombrices adultas fueron adquiridas de una finca ovejera (Finca Barroso) ubicada a 5 km de la población de Betijoque, municipio Rafael Rangel, estado Trujillo (654 msnm) con temperatura mínima de 21°C, máxima de 28°C y precipitación media anual de 1.200 mm.

Sustrato y componentes

El sustrato base (estiércol vacuno) utilizado en el ensayo se colectó de la finca La Guía, ubicada en Valerita, Sabana Grande a 4 km de Monay, municipio Pampán, estado Trujillo, donde las vacas donadoras del material realizaban pastoreo diario en áreas de gramíneas mejoradas (*Panicum maximum* y *Cynodon nlemfluensis*) en condiciones de transición de bosque húmedo a seco tropical.

Posteriormente a la colecta del estiércol (50 kg), el material fue sometido a un proceso de compostaje en piso de cemento al aire libre con abundante agua durante tres meses. Semanalmente se removió con una pala para acelerar el proceso de fermentación que dio como resultado una estabilización del material en cuanto a temperatura (27,2°C) y pH (6,9).

La cáscara de huevo de gallina (3 kg) se colectó a partir de desecho industrial de repostería en el municipio Pampán del estado Trujillo. El material fue previamente lavado con suficiente agua y presecado en una estufa con ventilación forzada a 65 °C durante una semana. Posteriormente fue triturado con un molino de mano (tipo Corona) hasta su reducción a polvo. Este proceso se realizó tres veces para obtener un completo triturado (0,5 mm).

Determinación de calidad

Tanto el estiércol bovino (500 g) como la cáscara de huevo de gallina en polvo (345 g) fueron analizados en el Laboratorio de Química Ambiental de la ULA, Trujillo, mediante las metodologías propuestas por la AOAC (1990). Se determinaron los contenidos de materia seca (MS) por secado en estufa a 105 °C, la concentración de nitrógeno (N) mediante el método Kjeldahl y los niveles de fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y sodio (Na) utilizando absorción atómica mediante extracción previa de los metales con ácido nítrico concentrado después de la incineración de la muestra. La ceniza (Cz) se determinó mediante calcinación del material en la mufla a 540°C por 24 horas.

En este sentido, el Cuadro 1 muestra la composición química de los sustratos utilizados en cada tratamiento.

Procedimiento experimental

En el Laboratorio de la UNIRS, se colocaron 440 lombrices adultas en cuatro recipientes cúbicos de 12 L (110/unidad) con 8 kg del sustrato base. Después de nueve días se retiraron las lombrices, dejando allí las cápsulas depositadas por ellas durante ése tiempo. A los tres meses después de iniciada la experiencia, se tomaron 80 lombrices ($0,11 \pm 0,02$ g/lombriz) de cada grupo y se llevaron a los frascos experimentales, en ese momento fue considerado el tiempo cero (T_0) o inicio del ensayo.

Se formaron cuatro grupos de 20 frascos de vidrio de 10 x 10 cm con 100 g de sustrato alimenticio cada uno, ya mezclado con sus diferentes dosis de cáscara molida, para sostener cuatro lombrices en cada frasco durante 10 días. Cada recipiente recibió una cantidad de cáscaras tal, que permitiera establecer las siguientes proporciones en cada tratamiento: C_0 = tratamiento control (sin cáscara), $C_1 = 1\%$, $C_2 = 2\%$ y $C_3 = 3\%$. Las lombrices destinadas al ensayo, y distribuidas inicialmente en cada tratamiento, siempre fueron alimentadas con las mismas proporciones respectivas.

Todos los frascos fueron tapados con tela de liencillo y ligas de goma para evitar la fuga de lombrices o la entrada de cualquier agente externo que pudiera afectar el experimento. Diariamente se adicionó a cada frasco 1 mL de agua para mantener la humedad constante en el nicho formulado.

A partir de T_0 se transfirieron las lombrices cada 10 días a frascos nuevos en tres ocasiones, conformado cada tratamiento por 80 lombrices, las cápsulas fueron contadas a medida que procedía el ensayo de manera que el conteo se realizó antes que las mismas eclosionaran. Siempre fueron utilizadas las mismas lombrices para cada tratamiento

Cuadro 1. Composición química de los sustratos usados en cada tratamiento.

Sustrato	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cz	MO
	----- % -----							
C0	2,43	0,85	1,53	1,02	0,49	0,92	12,32	87,68
C1	2,41	0,85	1,53	1,89	0,50	0,91	13,12	86,88
C2	2,38	0,85	1,53	2,76	0,50	0,91	13,92	86,08
C3	2,37	0,85	1,52	3,63	0,51	0,90	14,72	85,28

Diseño experimental, factores y análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo con veinte réplicas, donde los tratamientos fueron los sustratos formulados a partir de la proporción de cáscara. Para la interpretación de los datos correspondientes a la producción de cápsulas se empleó el análisis de comparación de medias del paquete estadístico SPSS 10.0 para Windows® (Visauta, 1998) utilizando la prueba de Tukey a $P < 0,05$. Para la obtención de las ecuaciones de mejores ajustes, así como los coeficientes estadísticos, se empleó la opción Regression correspondiente al mismo paquete.

RESULTADOS

Los análisis de laboratorio sobre la composición química de la cáscara de huevo de gallina dieron como resultado una elevada proporción de Ca, considerables niveles de MS y macroelementos y muy baja cantidad de MO. Asimismo, el estiércol vacuno presentó una concentración muy inferior del mineral, pero un valor de MO y N superior al de la cáscara.

Por otra parte, en el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos en el conteo de cápsulas con las

cuatro proporciones ensayadas y en los 30 días de medición. En la primera medición se observaron diferencias significativas en la producción de cápsulas a favor del tratamiento control ($P < 0,05$). Sin embargo, la mayor colocación de cápsulas se obtuvo con C₂ y C₃ a los 20 y 30 días. En ese mismo periodo las lombrices alimentadas con C₀ y C₁ depositaron cantidades de cápsulas inferiores. Aunque se observaron diferencias apreciables entre la productividad de las lombrices alimentadas con los diferentes sustratos a los 10 días, con C₂ y C₃ se obtuvieron las menores producciones iniciales.

Por otra parte, la Figura 1 muestra el comportamiento reproductivo de *E. andrei* en el tiempo y las ecuaciones matemáticas de mejores ajustes en cada sustrato. Para todos los sustratos, las mejores funciones que se ajustaron a los datos experimentales fueron las cuadráticas ($y = a + bx + cx^2$). Dichas ecuaciones exhibieron r^2 significativos iguales o superiores a 0,70. Las funciones describieron, respecto al tiempo, un incremento sustancial en la producción de cápsulas hasta aproximadamente los 20 días. A partir de ese momento las ecuaciones numéricamente expresaron una estabilización en la eficiencia reproductiva del anélido en todos los sustratos ensayados.

Cuadro 2. Efecto de la proporción de cáscara de huevo de gallina en la producción de cápsulas de *E. andrei* en cada unidad experimental. Valores entre paréntesis constituyen el tiempo de vida de la lombriz

Sustrato	Tiempo		
	10 (100)	20 (110)	30 (120)
	----- d -----		
C0	7,90±0,77a†	11,35±0,58b	10,45±0,76b
C1	6,00±0,91b	11,35±0,69b	11,25±0,82b
C2	4,95±0,54c	13,10±1,02a	13,20±0,79a
C3	4,59±0,67c	13,20±0,98a	12,25±1,12a

† Promedios con letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

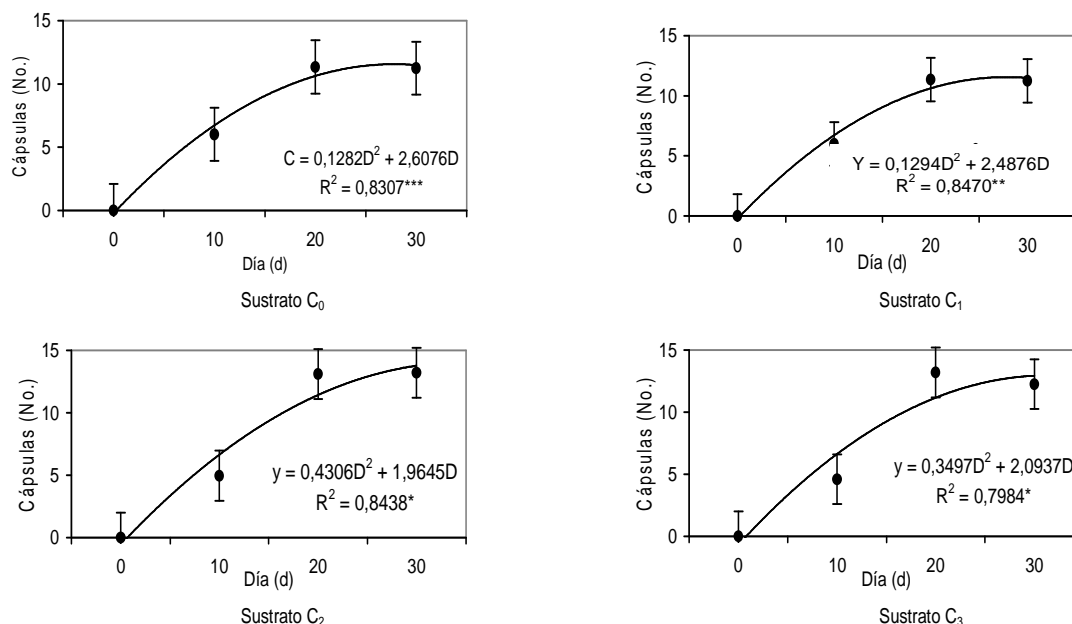


Figura 1. Ecuaciones de regresión que relacionan la producción de cápsulas en el tiempo para cada sustrato experimental. Los asteriscos *, ** y *** indican significancias de $P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$, respectivamente.

DISCUSIÓN

Analizando los valores de temperaturas en la fase experimental, estos se encuentran entre el rango permisible por parte de las lombrices y que ha sido reportado como óptimo por numerosos autores para el buen desempeño reproductivo del anélido (Hernández *et al.*, 1996; Toccalino *et al.*, 2001).

En sentido general, la composición química de los componentes de cada sustrato son similares a los informados por Butcher *et al.* (1991) para la cáscara de huevo y por García (2007) para el estiércol bovino. Considerando la elevada proporción de Ca en la cáscara y demás minerales, ésta rica fuente puede ser empleada de manera intensiva como aditivo a sustratos a base de desechos agrícolas en los cuales se pretenda aumentar la concentración de este importante elemento en la dieta de la lombriz.

La considerable proporción de MO, en el caso del estiércol bovino, su contenido de humedad y su balanceada cantidad de macronutrientes lo convierte en un material óptimo para su utilización como sustrato basal en condiciones extensivas. En este sentido, varias investigaciones realizadas en el campo de la lombricultura señalan al material como una fuente idónea de nutrimentos para el sistema digestivo de estos anélidos por encontrarse libre de algunos metabolitos de desechos capaces de afectar el crecimiento y desarrollo de este invertebrado (García *et al.*, 1995; Fogar *et al.*, 2007).

Con respecto a la mayor estimulación en la producción de cápsulas, esta se obtuvo con la inclusión de 2 y 3% de cáscara, lo cual se debe quizás a que con dichas concentraciones se alcanzaron los niveles adecuados de Ca para que la lombriz produjera una mayor cantidad de cápsulas. Sin embargo, todavía no se conoce con exactitud los

requerimientos nutricionales de *E. andrei*, así como la concentración mínima que necesita para la producción de cápsulas viables.

No obstante, es conocido que *E. andrei* se reproduce eficientemente en buenas condiciones de alimentación (Hernández *et al.*, 2002) y que la única manera de conseguir los niveles adecuados de Ca en su ración dependerá de la cantidad que se encuentre disponible en su dieta (Fogar *et al.*, 2007). Asimismo, existe una importante relación entre la cantidad de Ca que posee *E. andrei* en sus glándulas y la proporción que emplea para crear sus cápsulas, la cantidad y su eficiencia reproductiva (Satchell, 1983).

Teniendo en cuenta que en la primera medición (100 días de vida de la lombriz) se obtuvo la menor producción de cápsulas, quizás denota un efecto de madurez retardada del anélido en el tiempo, independientemente del tipo de sustrato; suponiendo que antes de esa fecha la lombriz no deposita cápsulas porque no se encuentra madura sexualmente, lo cual depende en gran parte de la temperatura (Satchell, 1983).

Aún cuando empíricamente se informa que el tiempo de madurez de *Eisenia spp.* puede fluctuar entre los 30 y los 45 días (momento en el cual puede producir cápsulas), este comportamiento no fue observado en la investigación llevada a cabo, lo cual pudo estar dado a que una parte del Ca incorporado al alimento, no haya sido metabolizado por la lombriz al no encontrarse en forma asimilable. Al respecto, en numerosos ensayos se han informado los 90 días como el tiempo óptimo en que *Eisenia spp.* alcanza su madurez sexual (Satchell, 1983; Ferruzzi, 1987). En las condiciones de este experimento a los 100 días después de su oclusión, la lombriz no produjo su máxima cantidad de cápsulas y solamente posterior a los 110 días de vida, el anélido produjo una cantidad similar de postura. Dichos resultados pudieran deberse a factores fisiológicos en el animal, los cuales no fueron dilucidados en esta investigación y/o por las características del sustrato de alimentación, el cual al inicio del experimento quizás no se encontraba listo para ser utilizado por la lombriz.

Considerando que los sustratos en los cuales se obtuvieron las mayores producciones a los 20 y 30 días (C₂ y C₃), hallan sido los que produjeron menor cantidad de cápsulas a los 10 días pudiera deberse a que, aunque estas proporciones estimularon el

comportamiento reproductivo del anélido, existe un tiempo de latencia para que las lombrices metabólicamente sean capaz de asimilar este elemento, y el Ca sea movilizado para la producción de cápsulas de forma intensiva.

Si bien se ha informado en algunas investigaciones que a medida que aumenta la temperatura ambiental, la lombriz roja incrementa sustancialmente la producción semanal de cápsulas a expensa de una menor cantidad de lombricillas por postura (Reinecke *et al.*, 1992), bajo las condiciones descritas en este experimento (T. media: 24,38°C), la lombriz duplicó su producción respecto a otros ensayos realizados en países en los cuales las temperaturas son menores (Ferruzzi, 1987; Galvis, 1991). Sin embargo, los resultados obtenidos son muy inferiores a los informados por Hernández *et al.* (1997) quien describió una producción entre 4 y 6 cápsulas por semana a 29,0°C.

La tendencia a producir 2 cápsulas por semana a partir de los 20 días de medición, sobre todo en los mejores tratamientos, denota la adaptación de estos anélidos a las condiciones nutricionales que prevalecieron en cada caso y su buen desempeño en el nicho ecológico de experimentación. Estos resultados coinciden con los informados por García (2007) con relación a que el estiércol, tanto de monogástricos como de rumiantes, puede ser utilizado exitosamente como sustrato basal para el adecuado desarrollo de *E. andrei* en condiciones tropicales.

Considerando el ajuste de los datos a las ecuaciones cuadráticas, las dinámicas reproductivas obtenidas para cada sustrato fueron crecientes en todos los casos. Los elevados niveles de los r²; así como su elevada significación, denotan el buen ajuste de las funciones matemáticas descritas a los datos experimentales con cada sustrato.

Aún cuando existen pocas investigaciones publicadas en las cuales se hallan modelado matemáticamente la dinámica reproductiva de este organismo en el trópico, Hernández *et al.* (1999) informó un ajuste significativo a ecuaciones exponenciales en la producción de biomasa y parámetros morfológicos de las lombrices tales como largo y ancho; aunque estos autores no evaluaron la dinámica de la producción de cápsulas. No obstante, la frecuencia de medición, el número de réplicas, los periodos de muestreo y las condiciones experimentales, fundamentalmente la

temperatura y el estatus nutricional, pudieran influir en la obtención de una u otra función para describir la dinámica reproductiva de *E. andrei*.

CONCLUSIONES

Es posible utilizar la cáscara de huevo de gallina como aditivo (1-3%) del estiércol vacuno para enriquecer el sustrato, en la crianza de la lombriz roja (*E. andrei*) sin causar efectos negativos en su reproducción y transformar las cáscaras en un producto útil a la agricultura.

Las proporciones de cáscara de huevo estudiadas en esta investigación provocan un efecto significativo en la reproducción de *E. andrei*. Este anélido alimentado con estiércol bovino y proporciones de cáscara en la dieta de 2 y 3% se ve estimulado a producir considerables deposiciones de posturas (dos cápsulas por semana) a los veinte y treinta días de medición (110 y 120 días de vida).

AGRADECIMIENTOS

Al CDCHT de La Universidad de Los Andes por el apoyo brindado para llevar a cabo esta investigación.

LITERATURA CITADA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis 15^{ta} ed. Association of Official Analytical Chemist. Washington D.C. USA
- Butcher G., R. Miles y A. Nilipour. 1991. La calidad del cascarón del huevo. *Industria Avícola*, 38(11): 9-10.
- Compagnoni L. y G. Putzolu. 1995. *Cría Moderna de las Lombrices y Utilización Rentable del Humus*. Editorial de Vecchi. Barcelona, España.
- Duque R. 1997. *Cultivo y Utilización de la Lombriz de Tierra*. Ediciones Z. Colombia.
- Ferruzzi C. 1987. *Manual de Lombricultura*. Editorial Mundi Prensa. Madrid, España.
- Fogar M.N., M.F. Cracogua y M.C. Iglesias. 2007. Respuesta de la lombriz roja (*E. foetida*) frente a

diferentes alimentos. Disponible en: <http://www1.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-058.pdf> (Consulta: Enero, 2007)

- Galvis A. 1991. *Un auténtico reciclaje natural. La lombricultura*. Caja Agraria. Dpto. Risaralda. Pereira, Colombia, 4p.
- García M.D., M. Reinés, P.L. Domínguez, C.M. Mederos y A. Gutiérrez. 1995. Utilización de excretas porcinas en la cría de lombrices de tierra. Inclusión de lombrices frescas en dietas para cerdos. *Rev. Comput. Prod. Porcina*, 2(1): 45-52.
- García S. 2007. Estudio biológico y evaluación de sustrato (estiércol vacuno x rastrojo de maíz) en la reproducción de la lombriz roja (*Eisenia foetida* Sav.) en Tingo María. FAO. Roma. Disponible en: www.fao.org/ag/AGL/agll/rla128/unas/uncis10/unas10-30.htm. (Consulta: Enero, 2007) Nota: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/rla128/unas/unas10/unas10-30.htm>
- Hernández J.D., P. Montes de Oca y C. Villalobos. 1996. Estudio reproductivo de la lombriz de tierra *E. foetida* en cuatro sustratos en la finca experimental Santa Lucía. *Memorias X Congreso Nacional Agronómico*. San José, Costa Rica.
- Hernández J.A., M.L. Rincón y R. Jiménez. 1997. Comportamiento de la lombriz roja (*E. foetida*) bajo condiciones de clima cálido. *Rev. Fac. Agro. LUZ*, 14: 387-392.
- Hernández J.A., N. Ramírez, B. Bracho y A. Faría. 1999. Caracterización del crecimiento de la lombriz roja (*Eisenia* spp.) bajo condiciones de clima cálido. *Rev. Fac. Agro. UCV*, 25(2): 1-7.
- Hernández J.A., C. Contreras, R. Palma, J. Saría y S. Pietrosevoli. 2002. Efecto de los restos de la palma aceitera sobre el desarrollo y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia* spp.). *Rev. Fac. Agro. LUZ*, 19(4): 304-311.
- Meinicke A. 1988. *Las Lombrices*. Ediciones Agropecuarias Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay.
- Reinecke A., S. Viljoen y R. Saayman. 1992. The suitability of *Eudrilus eugeniae*, *Perionyx excavatus* and *Eisenia fetida* (Oligochaeta) for vermicomposting in southern Africa in terms of

- their temperature requirements. *Soil Biol. Biochem.*, 24(12): 1295-1307.
- Santacana J. 1996. Lombricultura en Venezuela, estado actual y perspectivas. Memorias 3^{er} Congreso de Ciencias Veterinarias "Eduardo Mendoza Goiticoa". Maracay, Venezuela.
- Satchell J.E. 1983. *Earthworm Ecology from Darwin to Vermiculture*. Chapman y Hall, Londres.
- Toccalino P.A., J.P. Roux y C.M. Agüero. 2001. Comportamiento reproductivo de *Eisenia foetida* (lombriz roja de California) durante las cuatro estaciones del año y alimentadas con distintos compostajes. *Univ. Nac. Nordeste, Fac. Cien. Vet.* Corrientes, Argentina. Disponible en línea en: <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/4-Veterinarias/V-040.pdf> (Consulta: Enero, 2007)
- Vielma-Rondón R., J.F. Ovalles-Durán, A. León-Leal y A. Medina. 2003. Valor nutritivo de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) como fuente de aminoácidos y su estimación cuantitativa mediante cromatografía en fase reversa (HPLC) y derivatización pre-columna con o-ftalaldehído (OPA). *Ars. Pharmaceutica*, 44 (1): 43-58.
- Visauta B. 1998. *Análisis Estadístico con SPSS para Windows. Estadística Multivariante*. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España.

Nota Técnica

Reprodução induzida de curimatá (*Prochilodus affinis*) com uso de extrato bruto hipofisário de rã touro (*Rana catesbeiana*)

Rodrigo Diana Navarro, Alessandro Arruda de Oliveira, Oswaldo Pinto Ribeiro Filho*, Flávio Portilho Carrara, Fernanda Keley Silva Pereira e Luiz Carlos Santos

* Universidade Federal de Viçosa, Ranário Experimental. Av. P.H. Rolfs, s/n CEP: 36571-000. Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Correio electrónico: oribeiro@ufv.br

RESUMO

La objetivou-se com este trabalho determinar o efeito do uso do extracto bruto de hipófise (EBH) na indução da desova em curimatá. Foi realizado uma seleção de fêmeas de rã touro (*Rana castesbeiana*) para extração da hipófise, onde as fêmeas doadoras foram aquelas que apresentavam aumento da cavidade visceral, provocado pelo ovários em estágio maduro ou de maturação avançada. Para desova foram utilizados 20 reprodutores de curimatá (*Prochilodus affinis*). Os machos com peso médio inicial de 170,0 g e comprimento médio de 21,72 cm e as fêmeas com peso médios iniciais de 181,0 g e comprimento médio de 6,28 cm. O experimento foi realizado com dois tratamentos: Tratamento 1: 0,5 mg/kg e Tratamento 2: 0,7 mg/kg. Os animais foram alojados em aquário com 1000 L de água, aeração constante. Vinte fêmeas receberam duas injeções intramusculares de extrato bruto de rã touro, sendo a primeira dose de 0,5 mg/kg e a segunda dose de 0,7 mg/kg, com intervalo de 12 horas. Os curimatás submetidos a dosagens de 0,5 mg/kg obtiveram números de larvas superior e estatisticamente significativas ($P>0,06$) ao tratamento 2 utilizando 0,7 mg /kg, provavelmente esse resultado pode ser em função de umas fêmeas estarem em diferentes estádios de maturação gonadal. Em curimatá duas de doses de extrato bruto de hipófise de rã touro nas concentrações de 5 e 7 mg/kg, permitiram a indução reprodutiva das fêmeas, mostrando uma alternativa no manejo reprodutivo.

Palavras chave: extrato bruto hipofisário, desova induzida, *Prochilodus affinis*.

Induced spawning of curimatá (*Prochilodus affinis*) with use of hypophyseal raw extract of bull frog (*Rana catesbeiana*)

ABSTRACT

The main objective of this work was to determine the effect of the use of hypophyseal raw extract to induce fish spawning in curimatá specie. An election of females of frog bull (*Rana castesbeiana*) was carried through for extraction of hypophysys, where the female donors had been those that presented an increment of their visceral socket, which was provoked by ovaries in mature phase or advanced maturation. Twenty curimatá breeders (*Prochilodus affinis*) had been used for spawning. The males had an initial average weight of 170.0 g and an average length of 21.72 cm and the females with an initial weight average of 181.0 g and an average length of 6.28 cm. The experiment was carried through with 2 treatments: Treatment 1: 0.5 mg/kg and Treatment 2: 0.7mg/kg. The animals were stocked in aquarium with 1000 L capacity with constant aeration. The females received two intramuscular injections of frog bull raw extract, being the first dose of 0.5 mg/kg and the second 0.7 dose of mg/kg, with interval of 12 hours. The females with dosages of 0.5 mg/kg had obtained a superior number of larvae than those with 0,7 mg/kg. The difference was statistical significant ($P>0,06$). This result was

probably due to different stadiums of gonadal maturation. Both dosages (0.5 and 0.7 mg/kg) of frog bull hypophyseal raw extract had allowed to induce reproduction of curimatá females, showing an alternative in the reproductive handling.

Keywords: raw hypophyseal extract, induced spawning, reproduction, *Prochilodus affinis*.

INTRODUÇÃO

No cultivo comercial de peixes, controlar o ciclo reprodutivo da espécie a ser cultivada é de extrema importância. O desenvolvimento de larvas e alevinos é um dos principais entraves para o desenvolvimento da piscicultura (Narahara *et al.*, 2002).

O emprego de técnicas de controle de parâmetros abióticos como fotoperíodo e temperatura, juntamente com a utilização do processo de reprodução induzida por meio de uso de hormônios hipofisários de rã, é um recurso que pode estimular a reprodução tanto de peixes e rã (Ribeiro Filho, 1994).

A indução de desovas pelo uso de hipófises de outras espécies tem sido empregada por alguns pesquisadores como Ribeiro Filho (1998), umas das vantagens da utilização de hipófise de rã-touro é que as fêmeas adultas de rã-touro permanecem maduras durante o ano todo (Ribeiro Filho, 1994), portanto como no abate de rã não se utiliza cabeça; possibilitando assim a extração de hipófise.

À semelhança de grande número de espécies reofílicas, que não se reproduzem naturalmente em condições de cativeiro, como por exemplo, *Curimatá* que necessitam ser induzidos à reprodução através de aplicação de hormônios (Castagnolli e Cyrino, 1980; Sato *et al.*, 1996a).

Vários pesquisadores brasileiros têm-se interessado pela reprodução induzida de espécies reofílicas. Assim, foram desenvolvidos trabalhos com mandi, *Pimelodus maculatus* (Fenerich *et al.*, 1974), dourado, *Salminus maxillosus* (Dumont-Neto *et al.*, 1997), curimatá, *Prochilodus scrofa* (Castagnolli e Cyrino, 1980; Godinho *et al.*, 1984), curimatã-pacu, *Prochilodus margravii* (Sato *et al.*, 1996b), curimatã-pioia, *Prochilodus affinis*, pacu, *Piaractus mesopotamicus* (*Colossoma mitrei*) (Godinho *et al.*, 1977; Castagnolli e Donaldson, 1981, Romagosa *et al.*, 1985), Pirapitinga-do-Sul, *Brycon opalinus*,

(Narahara *et al.*, 2002) que são espécies de alto valor comercial e indicadas para piscicultura.

Portanto, conhecer o uso de técnicas alternativas para reprodução induzida dessas espécies, em condições de cativeiro, é de fundamental importância (Menin, 1992). A utilização de hipófise de diferentes espécies é uma das alternativas para minimizar custos da técnica de indução de reprodução. No abate de rã, a cabeça é um material descartável, no entanto podendo ser utilizada na técnica de extração e aplicação do extrato bruto de hipófise em outras espécies.

Além disso, nenhuma informação tem sido encontrada em relação ao uso de extrato de hipófise de rã touro na reprodução de curimatá (*Prochilodus affinis*). Objetivou-se com este trabalho determinar o efeito do uso do extrato bruto de hipófise rã touro (*Rana castesbeiana* Shaw 1802) na indução da desova em curimatá.

MATERIALES E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de reprodução da Estação de Piscicultura e Hidrobiologia do Departamento de Biologia Animal da UFV. Foi realizada uma seleção de fêmeas de rã touro para extração da hipófise, onde as fêmeas doadoras foram aquelas que apresentavam aumento da cavidade visceral, provocado pelos ovários em estágio maduro ou de maturação avançada (Costa, 1992). O tamanho das hipófises dos exemplares utilizados foi de 0,3 cm e o peso variou de 0,6 a 1,0 mg. A extração das hipófises foi feita com uma incisão na mucosa bucal, na linha mediana entre o orifício das trompas auditivas, visando atingir o osso esfenetimóide, localizado sob o encéfalo (Menin, 1992).

Após a extração das hipófises, as mesmas foram colocadas em frasco contendo acetona, usada com meio desidratante. No término da coleta, efetuou-se a lavagem das hipófises para retiradas de tecido estranho. Em seguida, a acetona foi repostada de 20

vezes o volume das hipófises. Ao final da desidratação, as hipófises foram colocadas em papel filtro e deixadas ao ar secar à temperatura ambiente e em local seco, por um período de uma hora. A seguir, cada hipófise foi pesada individualmente em balança analítica com sensibilidade de 0,0001 g.

Para obter a dosagem pré-determinada, tornou-se como base o peso total dos animais de cada tratamento. As fêmeas selecionadas receberam injeções intramusculares extrato bruto hipofisário de rã touro na primeira dose foi de 0,5 mg/kg e na segunda dose foi de 5 mg/kg num intervalo de 12 horas num total de 177 horas graus. Os machos receberam aplicação também de extrato bruto hipofisário de rã touro de 5 mg/kg, por ocasião da aplicação da segunda dose nas fêmeas.

Foram utilizados 20 reprodutores de curimatá (*Prochilodus affinis*) sendo 10 do tratamento 1 e 10 do tratamento 2. Os machos com peso médio inicial $170,0 \pm 69,92$ g e comprimento médio de $21,72 \pm 2,32$ cm e comprimento padrão de $16,54 \pm 2,5$ cm e as fêmeas com peso médios inicial $181,0 \pm 69,92$ g e comprimento médio de $23,75 \pm 1,28$ cm e comprimento padrão $16,25 \pm 2,19$ cm. O experimento foi realizado com 2 tratamentos: Tratamento 1: 0,5 mg/kg e Tratamento 2: 0,7 mg/kg. Os animais foram alojados em aquário com 1000 litros de água, aeração constante.

A desova ocorreu naturalmente nos aquários, logo após os ovos produzidos, pôr fêmea, foram colocados em incubadoras cilíndricas individuais contendo 20 L de água, corrente e à temperatura de $29,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Foram calculadas a porcentagem de larvas e a porcentagem de fêmeas que desovaram. As análises estatísticas foram feitas pelo programa SAS.

RESULTADOS

Os parâmetros de qualidade da água avaliados permaneceram normais e dentro das condições ótimas para o crescimento da espécie em todos os tratamentos de acordo Castagnolli (2002). Os valores médios observados para os parâmetros monitorados foram: a temperatura ficou de $27,9 \pm 0,14^\circ\text{C}$, $7,25 \pm 0,58$ para pH.

Os curimatás submetidos a dosagens de 0,5 mg/kg obtiveram números de larvas superior e estatisticamente significativo ($P > 0,05$) ao tratamento 2 utilizando 0,7 mg/kg, Fêmeas que receberam hormônio hipofisário com dosagem de 0,5 mg/kg obtiveram uma maior porcentagem de desova em relação a fêmeas que receberam hormônio hipofisário com dosagem de 0,7 mg/kg (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Provavelmente esse resultado pode ser em função de umas fêmeas estarem em diferentes estádios de maturação gonadal. (Narahara *et al.*, 2002) Trabalhando com extrato de pituitária de salmão em pirapitinga do sul (*Brycon opalinus*) observou que nas duas concentrações 5 e 10 mg/kg permitiram a indução reprodutiva. (Streit *et al.*, 2002), utilizaram hipófise de frango e coelho como indutores gonadais e observaram a indução reprodutiva de machos de *Leporinus macrocephalus*. (Reidel *et al.*, 2002), trabalhando com *Leporinus macrocephalus* utilizando hipófise de carpa observaram que o animal após 170 horas graus realizou-se extrusão dos óvulos das fêmeas, no presente experimento a desova ocorreu em 177 horas graus. (Godinho *et al.*, 1984), utilizaram HCG (gonadotropina coriônica humana) e EPS (extrato bruto de pituitária de salmão) para induzir a desova em *Prochilodus scrofa* e concluíram que podem ser usados como agentes indutores à reprodução

Tabela 1. Valores médios em percentual de resposta de curimatá (*Prochilodus affinis*) ao estímulo hormonal de diferentes dosagens de extrato bruto de rã touro.

Dosagem	Intervalos entre doses	Fêmeas que desovaram	Larvas
mg/kg	H	%	N
0,5	12	75	25.373
0,7	12	25	19.066

As diferenças das repostas obtidas com os animais do tratamento 1 e 2 podem ter acontecido em virtude das variações dos graus de maturação gonadal, temperatura e alimentação. (Frenkel e Goren, 1997) observaram que alguns fatores como salinidade, taxa de alimentação, temperatura e fotoperíodo afetam diretamente a reprodução em *Aphanius dispar*.

O sucesso da indução de desova também foi discutido por Martins (1936) que afirmou serem os resultados negativos, obtidos em muitas tentativas de indução da reprodução, não relacionados com especificidades zoológicas, mas sim outros fatores, como menor concentração de hormônios gonadotróficos presentes nas hipófises; variação quantitativa dos diferentes componentes do complexo hormonal da hipófise anterior, cuja influência é exercida reciprocamente sobre as gônadas e em outros locais de atuação. Em curimatá *Prochilodus affinis* duas doses de extrato bruto de hipófise de rã touro nas concentrações de 0,5 e 0,7 mg/kg aplicadas com intervalos de 12 horas, permitiram a indução reprodutiva das fêmeas, mostrando uma alternativa no manejo reprodutivo.

LITERATURA CITADA

- Castagnolli N. 1992. Piscicultura de Água Doce. Funep, Jaboticabal. Brasil.
- Castagnolli N. e J.E.P. Cyrino. 1980. Desova induzida do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). Ciência e Cultura, 32(9): 1245- 1253.
- Castagnolli N. e E.M. Donaldson. 1981. Induced ovulation and rearing of the pacu, *Colossoma mitrei*. Aquaculture, 25: 275-279.
- Costa C.L.S. 1992. Desenvolvimento do aparelho reprodutor e fatores associados ao ciclo reprodutivo da rã-touro no sistema anfigranja. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. Brasil. 90p.
- Dumont-Neto R., A. Pelli e R.O. Freitas. 1997. Reprodução induzida do dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849) na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta-Grande. Revista Unimar, 19(2): 439-445.
- Fenerich N.A., H.M. Godinho e J.M.B. Barker. 1974. Sobre a ocorrência de ovulação de *Rhamdia hilarii*, *Pimelodus maculatus* e *Salminus maxillosus* em laboratório. Ciência e Cultura, 26(7): 344- 352.
- Frenkel V. e M. Goren. 1997. Some environmental factors affecting the reproduction of *Aphanius dispar* (Ruppell 1828). Hidrobiologia, 7: 197-207.
- Godinho H.P. e A.L. Godinho. 1986. Induced spawning of pacu, *Colossoma mitrei* (Berg., 1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. Aquaculture, 55: 69-73.
- Godinho H.M., N.A. Fenerich e M.Y. Narahara. 1977. Sobre reprodução induzida do pacu *Colossoma mitrei* (Berg, 1895). Ciência e Cultura, 29: 796- 797.
- Godinho H.M., E. Romagosa e M.A. Cestarolli. 1984. Reprodução induzida de curimatá, *Prochilodus scrofa* Steind., 1881, sob condições de cultivo experimental. Rev. Bras. Reprodução Animal, 8(2): 113-119.
- Godinho H.P. e D.M. Ribeiro. 1985. Maturidade sexual de curimatás, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Teleostei) em viveiros. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot, 34(7): 349-357,.
- Menin E. 1992. Fisiologia Animal Comparada. Manual de Aula Prática. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária. Viçosa. Brasil.
- Narahara M.Y., E.F. Andrade-Talmelli, E.T. Kavamoto e H.N. Godinho. 2002. Reprodução induzida da Pirapitinga-do-Sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. Revista Bras. Zootecnia, 31(3): 1070-1075.
- Martins T. 1936. Tratado de Endocrinologia. Companhia Editorial Nacional, São Paulo. Brasil.
- Reidel A., A. Feiden, A. Klahold e W.R. Boscolo. 2002. Reprodução de piauçu (*Leprorinus macrocephalus*) Aspecto da desova e fecundação. Anais XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, Goiânia. p. 359.

- Ribeiro Filho O.P. 1994. Uso de extrato bruto de hipófise na indução da desova de rã touro, *Rana catesbiana* Shaw, 1802, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Brasil.
- Ribeiro Filho O.P., S.L. Lima, D.R. Andrade e J.T. Seixas Filho. 1998. Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) com o uso de extrato bruto hipofisário. Rev. Bras. Zootec., 27(2): 216-223.
- Romagosa E., P. Paiva e M.A.Cestarolli. 1985. Reprodução induzida de pacu *Colossoma mitrei*, Berg., 1895, mantido em condições de cultivo intensivo. Ciência e Cultura, 37(7): 849-875.
- Sakaguti E.S., W.C. Caçador, E.L. Márquez e E. Lupchinssk Jr. 2002. Extrato de hipófise de frango e coelho como indutores gonadais de amchos de piauçu (*Leporinus macrocephalus*). Anais XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, Goiânia. Brasil. p. 344
- Sato Y., E.L. Cardoso e A.L. Godinho. 1996a. Hypophysation parameter of the neotropical fish *Prochilodus margravii* obtained in hatchery conditions. Rev. Brás. Biologia, 56(1): 59-64.
- Sato Y., E.L. Cardoso e A.L. Godinho. 1996b. Hypophysation of the fish *Prochilodus affinis* from the rio São Francisco basin, Brazil. Arq. Brás. Méd. Vet. Zoot., 48(1): 55-62.
- Streit Jr. D.P., G.V. Moraes, J.A. Povh, E.D. Souza, R.F. Ribeiro e A.D. Woodhead. 2002. Nutrition and reproductive capacity in fish. Proc. Nutrition Soc., 19: 23-27.

