

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE *LIMNOBIUM LAEVIGATUM* Y SU POTENCIAL PARA SU USO COMO FORRAJE

PROXIMAL ANALYSIS OF *LIMNOBIUM LAEVIGATUM* AND ITS POTENTIAL AS FORAGE

Héctor Aponte^{1,2}, Carla Segura³ y Juan Carlos Francia⁴

RESUMEN

El empleo de plantas acuáticas como insumo para la alimentación de animales acuáticos y de granja se ha venido incrementando debido a su elevada tasa de crecimiento, su buena palatabilidad, alto contenido en proteínas, bajo nivel en fibras y presencia de cenizas en concentraciones considerables. El presente trabajo tiene como objetivo realizar un análisis químico proximal de *Limnobium laevigatum* propagado bajo dos concentraciones de soluciones nutritivas para hidroponía (1X y 2X), donde se ha demostrado previamente que la especie maximiza su crecimiento. Se analizó el porcentaje de proteínas, lípidos, carbohidratos y ceniza en las plantas propagadas según la concentración de solución nutritiva. Los valores de proteínas y grasas fueron más elevados en el tratamiento 2X ($p < 0.05$). El contenido de cenizas, carbohidratos, fibra y porcentaje de humedad fueron similares en los dos tratamientos. Por su alto valor proteico (26%-30%) y bajo contenido en fibras (7%) en la materia seca, esta especie muestra ser un recurso potencial para su uso como forraje. El presente trabajo sienta las bases para posteriores investigaciones que analicen con mayor detalle el contenido de sustancias tóxicas, vitaminas y aminoácidos en *L. laevigatum*.

Palabras clave: análisis proximal, nutrición animal, forraje, plantas acuáticas, *Limnobium laevigatum*.

ABSTRACT

For its high growth rate, palatability, high protein content, low fiber and ash content in considerable concentrations, many aquatic plants have the potential to be used as a food resource for aquatic and farm animals. The present work aims to make a chemical proximal analysis of *Limnobium laevigatum* propagated under two nutrient concentrations (1X and 2X) at which the species is known to maximizes its growth. The percentage of proteins, lipids, carbohydrates and ash of the propagated plants were analyzed. Protein and fat content were higher in the treatment 2X ($p < 0.05$). Ash content, fiber, carbohydrate and moisture content were similar in the two treatments. Because of its high protein content (26-30%) and low in fiber (7%) in the dry matter, this species shows its potential as forage. Further work is necessary to analyze in more detail the content of toxic substances, vitamins and amino acids in *Limnobium laevigatum*.

Keywords: Proximate analysis, animal nutrition, forrage, aquatic plants, *Limnobium laevigatum*.

¹ MUSEO DE HISTORIA NATURAL, UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. LIMA, PERÚ.

² ÁREA DE ECOLOGÍA, COORDINACIÓN CURSOS BÁSICOS, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

³ FACULTAD DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

⁴ FACULTAD DE BIOLOGÍA MARINA Y ECONEGOCIOS, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son utilizadas por el ser humano con múltiples fines, siendo uno de ellos su uso como forraje. A nivel mundial, tenemos alrededor de 887 plantas que se utilizan con este fin (1). Las plantas que sirven para forraje deben caracterizarse por tener gran capacidad de adaptación y persistencia, eficiente crecimiento y perdurabilidad, altas producciones de biomasa de buena calidad y un alto grado de aceptación por los animales (2). Muchas plantas acuáticas cumplen con estas características por su alta tasa de crecimiento, palatabilidad, alto nivel de proteínas, bajo contenido en fibras y presencia de cenizas en concentraciones considerables (3, 4), lo que las ha convertido en excelentes suplementos nutricionales para animales e inclusive hasta para el ser humano (5, 6).

Debido a la escasez e incremento en los precios de la harina de pescado y la soya, se vienen desarrollando investigaciones para optimizar los métodos de alimentación y encontrar fuentes nutricionales alternativas para las especies acuáticas comerciales, las cuales a sus vez tiendan a ser amigables con el medio ambiente (7, 8). Las plantas acuáticas pueden ser utilizadas como alimentos para animales de granja y peces debido a que constituyen fuentes proteicas de alto valor nutricional (18% a 32% en base seca), aunque algunas tienen como deficiencia que son alimentos muy voluminosos por su baja producción de materia seca, que oscila entre 5% y 6% (9, 10). Especies como *Eichhornia crassipes* han sido ampliamente estudiadas con estos fines a partir de análisis químicos proximales, los cuales permiten estudiar las características del tejido vegetal para su posterior aplicación como suplemento dietario en animales (11-13). Trabajos realizados con las especies de *Lemna sp.* y *Azolla sp.* para la alimentación de tilapia han mostrado buenos resultados con

respecto al crecimiento y supervivencia durante el ciclo productivo (14-18).

Las características nutricionales de los tejidos de las plantas para forraje pueden variar, dado que las condiciones nutricionales en los ecosistemas donde habitan son diferentes. Para el caso de las plantas acuáticas, la concentración de nutrientes en el agua influyen en el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y otros minerales en los tejidos de las plantas, fenómeno que ha sido demostrado en plantas acuáticas como *Schoenoplectus americanus* y *Lemna gibba* (19, 20). En consecuencia, el contenido de proteínas, grasas y fibras en los tejidos de las plantas estará supeditado también a la ración de nutrientes que reciban. En este contexto, es importante trabajar con especies de las que se conozca sus requerimientos para obtener un crecimiento óptimo y que produzcan tejidos de buena calidad que garanticen la rentabilidad del proceso de propagación.

Una planta acuática frecuente en algunos humedales de Centro y Sudamérica es *Limnobium laevigatum* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Heine. (familia Hydrocharitaceae) (figura 1). En el Perú esta especie se distribuye entre los 0 y 500 metros sobre el nivel del mar, habiéndose reportado para ambientes lacustres y ribereños de los departamentos de Lima, Ucayali y Loreto (21, 22). Esta especie se caracteriza por tener un rápido crecimiento, invadiendo hábitats y transformándose en una plaga en países de Norte y Sudamérica (1, 23). Su tasa de crecimiento relativo es de 0.124, la cual es más alta que su similar reportada para otras macrófitas acuáticas como *Egeria densa* y *Eichhornia crassipes* (4, 24-26).

A pesar de ser altamente invasiva, el rol de *L. laevigatum* en los humedales es muy importante. Esta especie forma parte de la dieta de algunas aves sudamericanas

como *Cygnus melancoryphus* y *Gallinula chloropus galeata* (27, 28), así como de algunos invertebrados como *Paulinia acuminata* (29). Corti & Schatteler (2002) hacen un estudio químico proximal de *L. laevigatum* el cual muestra que la especie, en condiciones naturales, puede llegar a tener hasta un 16% de proteínas

(porcentaje en base seca), lo que la hace interesante como planta forrajera. Sin embargo, esta concentración de proteínas podría cambiar en procesos de propagación bajo condiciones controladas, donde la luz y el espacio son los más apropiados, y los nutrientes no son limitantes.

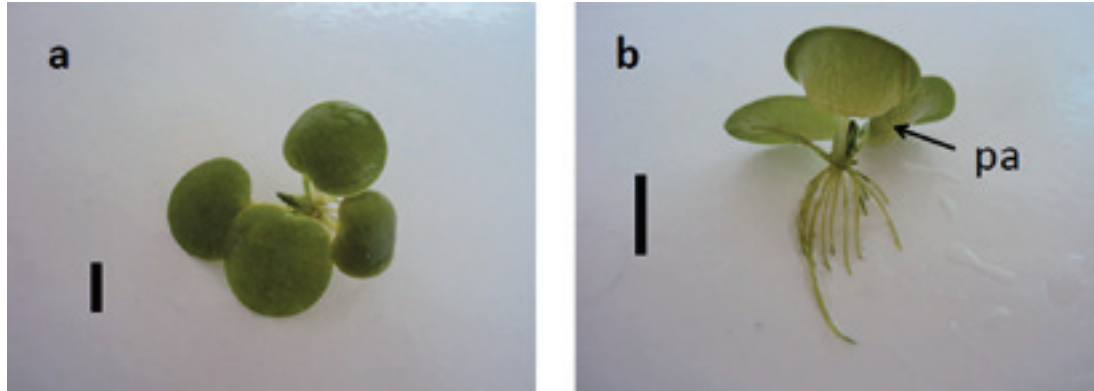


FIGURA 1. VISTA SUPERIOR (A) Y LATERAL (B) DE *LIMNOBIUM LAEVIGATUM*. EN (B) SE APRECIA EL PARÉNQUIMA AERÍFERO (PA) QUE PERMITE SU FLOTACIÓN. ESCALA: 1 CM.

El objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis químico proximal de *L. laevigatum*, propagado bajo dos concentraciones distintas de nutrientes conocidos que maximizan el crecimiento de la especie. Asimismo, se discute el potencial de esta especie como planta promisoría para la alimentación de animales, comparando los resultados obtenidos con valores de la misma especie en zonas naturales y con los datos de otras especies acuáticas de uso forrajero.

MÉTODOS

PROPAGACIÓN DE *Limnobium laevigatum*

La propagación de *L. laevigatum* se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Marina de la Universidad Científica

del Sur, en un sistema de cultivo estático. Las plantas utilizadas fueron colectadas en el mes de enero del 2013 en los alrededores del humedal de Pantanos de Villa (Lima, Perú) y luego propagadas en laboratorio. Mediante estudios preliminares se determinaron las concentraciones de nutrientes en las soluciones hidropónicas que permitían obtener la mejor productividad bajo condiciones controladas (24, 30); estas concentraciones de nutrientes (1X y 2X de la tabla 1) fueron utilizadas durante treinta días (marzo-abril del 2013) para su propagación hasta llegar a la densidad de 521 g/m². Durante el período de estudio, la temperatura del ambiente fue de 23,55 ± 1,81 (20,3-29,1) °C, la del agua fue de 23,6 ± 2,22 (20,4-29,9)°C, la humedad relativa fue 73 ± 4,21 (60-85) %, y la iluminación fue de 39,44 ± 46,29 (1,62-204) W/m² bajo un régimen de 12 horas de luz.

TABLA 1. Característica de las soluciones nutritivas utilizadas en cada tratamiento (1X y 2X). Todos los valores de los elementos están en partes por millón (ppm) a excepción del pH y la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

	1X	2X
N	43,08	68,08
P	31,65	62,90
K	12,02	17,02
Mg	23,09	27,47
S	48,47	54,22
Ca	101,70	116,20
Fe	0,21	0,39
Mn	0,06	0,13
Zn	0,12	0,14
Cu	0,02	0,04
B	0,72	0,77
Mo	0,02	0,02
pH	7,9	7,8
CE	952,3	1117,6

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

En laboratorio se halló el porcentaje de materia seca mediante el método gravimétrico. La ceniza fue determinada mediante la carbonización de la muestra en un horno de incineración a 600 °C. Para la determinación de grasa total se realizó una extracción de grasa por arrastre con hexano en equipo Soxhlet. La fibra fue determinada mediante la ebullición de la muestra en hidróxido de sodio diluido, ácido clorhídrico diluido, alcohol y éter. La proteína total fue determinada por el método de Micro Kjendahl utilizando 6,25 como factor de conversión (31). Para todos los métodos se utilizaron los procesos estandarizados por la Association of Official Analytical Chemist (32). El porcentaje restante (sin considerar la fibra) fue considerado como carbohidratos y se obtuvo a partir de los valores promedios. Las muestras de las plantas de cada tratamiento (1X y 2X) fueron procesadas por separado y cada proceso se hizo por triplicado. Se calculó

la cantidad de kilocalorías representadas por las proteínas, grasas, carbohidratos y kilocalorías totales, utilizando los factores específicos de para proteínas (2,11), grasas (8,37) y carbohidratos (3,57) (33).

Para comparar los resultados del análisis químico proximal entre los tratamientos 1X y 2X, se verificó la normalidad de los datos (Shapiro-Wilk, $p > 0.05$), y luego se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y las variables obtenidas. Todos estos análisis fueron realizados en el *software* PAST 2.17c (34). Las kilocalorías obtenidas fueron calculadas a partir de los promedios, por lo que no se aplicaron análisis estadísticos a estos datos.

RESULTADOS

La tabla 2 muestra los valores obtenidos en el análisis químico proximal en los tratamientos. Se observa que los valores de proteínas y grasas fueron significativamente superiores en el tratamiento 2X ($p < 0.05$) en base húmeda (BH) y en base seca (BS). Por otro lado, el contenido en carbohidratos fue mayor en el tratamiento 1X. El contenido de cenizas, fibra y el porcentaje de humedad fueron similares en los dos tratamientos ($p > 0.05$). Las kilocalorías totales se encuentran alrededor de los 250 Kcal en 100 g de muestra seca.

DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra el alto contenido de proteínas que presenta *L. laevigatum* propagada bajo condiciones controladas. Estas concentraciones son significativamente mayores a las obtenidas para la misma especie en condiciones naturales, donde la concentración de proteínas fue del 16.22%

TABLA 2. Análisis químico proximal y cálculo de kilocalorías contenidas en el tejido de *Limnobium laevigatum* en base húmeda (BH) y base seca (BS) en los tratamientos (1X y 2X) Se muestran los promedios + DE de cada valor. *= $p < 0.5$, **= $p < 0.01$ para ANOVA.

	BH		BS	
	1X	2X	1X	2X
Agua (%)	95.10±0.06	95.18±0.04	-	-
Proteína (%)*	1.29±0.10	1.48±0.05	26.28±2.54	30.76±0.95
Grasa (%)**	0.06±0.01	0.12±0.01	1.18±0.13	2.55±0.18
Fibra (%)	0.39±0.04	0.37±0.02	8.00±0.82	7.63±0.39
Cenizas (%)	1.13±0.04	1.14±0.02	23.06±0.80	23.65±0.45
Carbohidratos (%)	2.42	2.08	49.48	43.04
Kcal proteína (Kcal/100 g)	3.15	3.61	64.12	75.05
Kcal grasa (Kcal/100 g)	0.50	1.00	9.88	21.34
Kcal carbohidrato (Kcal/100 g)	8.64	7.43	176.64	153.65
Kcal Total (Kcal/100 g)	12.29	12.04	250.64	250.04

BS (28). Entre los dos tratamientos del presente estudio, la concentración de proteínas fue mayor en el tratamiento de mayor concentración de nutrientes (tabla 2), lo que revela la importancia de la optimización de las condiciones de propagación, a fin de lograr un tejido con alto contenido proteico, pero que al mismo tiempo no presente efectos nocivos para la planta. Concentraciones mayores de nutrientes al tratamiento 2X han mostrado tener toxicidad en *L. laevigatum* en condiciones de laboratorio (24), lo que nos indica que el tratamiento apropiado para su propagación y para lograr al mismo tiempo tejidos de buena calidad para forraje es el tratamiento 2X.

Dado que el contenido de proteína representa aproximadamente el 70% del peso seco de la materia orgánica que se encuentra en el tejido del pez (35), se comprende la necesidad de una dieta con alto contenido proteico para peces (28% a 50% BS). *Limnobium laevigatum* ha mostrado valores de proteína bruta óptimos (entre 26% y 30% BS). Resultados similares han sido encontrados en otras especies de plantas acuáticas utilizadas en la alimentación de

organismos acuáticos, como *Lemna gibba* (proteína bruta entre 20% y 30% BS (17, 36, 37) y *Lemna persupilla* (entre 24% y 26%, (38). Por otro lado, *Limnobium laevigatum* tiene inferior contenido proteico que *Lemna minor* (cuyos valores llegan al 40% BS de proteínas), (39), *Lemna disperma* (35-43%) (40) y *Lemna aequinoctialis* (33%) (41). En alimentos para peces complementadas con plantas como *Zea mays* (maíz), *Glycine max* (soya) y *Vicia faba* (habas), y algas como *Porphyra*, *Gracillaria* y *Sargassum*, el porcentaje de proteínas varía entre 7% y 47% (42-44), por lo que la especie en estudio se encuentra en el rango para ser considerado como complemento proteico.

El contenido de fibra bruta es también importante a evaluar en los complementos alimenticios, este no debe superar el 10% BS, pues reduce la asimilación de nutrientes y afectan la digestibilidad (45). En el caso de la fibra, los resultados para *L. laevigatum* se presentaron en un rango del 7% al 8 % BS, encontrándose dentro del rango recomendado para alimentación de peces tomando en cuenta los hábitos alimenticios: carnívoro, omnívoro o herbívoro para cada dieta (46).

Los lípidos son el mayor recurso energético (2,25 veces mayor que la proteína), por lo cual un alto nivel lipídico permite ahorrar al máximo la proteína, reduciendo los costos de alimentación (47). En el presente estudio, los valores de grasa para *L. laevigatum* se encontraban alrededor de 2% BS, esto indica que podría ser deficiente para su empleo en alimentación de algunos organismos acuáticos, donde se recomienda que el contenido de lípidos debe estar entre el 16 a 35% BS (según especie y condiciones de cultivo)(38). Sin embargo, alimentos ricos en proteínas y con cantidades bajas en lípidos (<3% BS) han mostrado tener resultados óptimos en la reproducción de peces como *Oreochromis niloticus* (42).

Además, se debe tener presente que algunas especies de uso forrajero deben ser previamente sometidas a ciertos tratamientos durante su procesamiento, debido a la presencia de sustancias tóxicas, y en otros casos ser complementados por sus bajos niveles de aminoácidos y otras sustancias esenciales (38,46,48-54). El presente estudio sienta las bases para posteriores trabajos que analicen con

mayor detalle el contenido de sustancias tóxicas, vitaminas y aminoácidos en *Limnobium laevigatum*.

CONCLUSIÓN

De acuerdo con la composición bromatológica expuesta, *Limnobium laevigatum*, se presenta como una planta potencialmente utilizable como complemento para la elaboración de alimentos en la nutrición de organismos acuáticos de interés comercial y animales de granja.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Leya Poma, Vania Pachas, Mariela Leveau, Edgar López y Yolanda Vásquez por su apoyo durante el desarrollo del experimento. Asimismo, agradecemos a Joyce Del Pino y a Aldo Indacochea por su apoyo en la logística durante la propagación de *L. laevigatum*. Finalmente agradecemos a Cesar Pacherras por sus valiosas sugerencias al texto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [On Line Data Base] [Internet]. 2013 [citado 3 de octubre de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxecon.pl>.
2. Olivera Y, Machado R, del Pozo PP. Características botánicas y agronómicas de especies forrajeras importantes del género *Brachiaria*. *Pastos Forrajes Cuba*. 20 de diciembre de 2012;19 (1):1-23.
3. Linn JG, Goodrich RD, Meiske JC, Staba EJ. Aquatic Plants From Minnesota. Part 4-Nutrient Composition. Minnesota - Estados Unidos.: Water Resources Research Center. University of Minnesota.; 1973. Report No.: 56.

4. Pistori RET, Camargo AFM, Henry-Silva GG. Relative growth rate and doubling time of the submerged aquatic macrophyte *Egeria densa* Planch. *Acta Limnol. Bras.* 2004;16(1):77-84.
5. Vásquez L, Newman C, Urdaneta M, Zavaleta F, Valbuena A. Plantas acuáticas vasculares como fuente de proteínas para el consumo humano. *Memorias.* Lima - Perú; 1998. p. 1-28.
6. Reid J, Stanley W. Exploring duckweed (*Lemna gibba*) as a protein supplement for ruminants using the boer goat (*Capra hircus*) as a model. North Carolina State University, Raleigh; 2003.
7. Cruz S, Rique M, Tapia S, Nieto M. Ingredientes para la elaboración de alimentos balanceados para camarón; criterios de selección. *Curso Rapco En Agric.* Monterrey México; 2004.
8. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. FAO Inter-Departmental Working Group; 2012.
9. Thanh DH, Van LN, Rodríguez L, Ly L. Nitrogen digestion and metabolism in Mong Cai pigs fed sugar cane juice and different foliages as sources of protein. *Livest. Res. Rural Dev.* 9(2):17.
10. Escamilla L. Composición química y obtención de concentrados de proteína foliar de plantas acuáticas presentes en los canales de Xochimilco [Tesis de Licenciatura]. [México DF]: Universidad Nacional Autónoma de México; 1998.
11. Sunday AD. The Utilization of Water Hyacinth *Eichhornia crassipes* by wets african dwarf (wad) growing goats. *Afr J Biomed Res.* 2002;(4):147-9.
12. Okoye FC, Daddy F, Ilesanmi BD. The nutritive value of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and its utilisation in fish feed. *Proc. Int. Conf. Water Hyacinth.* New Bussa, Nigeria; 2002. p. 65-70.
13. Sotolu AO. Digestibility value and nutrient utilization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) meal as plant protein supplement in the diet of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) juveniles. *Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 2010;9(5):539-44.
14. Gagher IG, Porath D, Granoth G. Evaluation of duckweed (*Lemna gibba*) as feed for tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in a recirculating unit. *Aquaculture.* 1984;41(3):235-44.
15. Hassan MS, Edwards P. Evaluation of duckweed (*Lemna perpusilla* and *Spirodela polyrrhiza*) as feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 1992;104(3):315-26.
16. Glas C. Evaluación de factores fisicoquímicos y biológicos en el desempeño de reactores duckweed, con y sin pretratamiento anaeróbico en el tratamiento de aguas residuales domésticas [Tesis de Maestría]. [Cali, Colombia]: Universidad del Valle; 2000.

17. Ponce JT, Fitz M. *Azolla mexicana* y *Lemna sp.* como alimentos suplementarios en el policultivo de juveniles de tilapia (*Oreochromis hornorum*) y carpa barrogona (*C. rubrofuscus*) bajo condiciones semicontroladas. Pachuca, Hidalgo, México; 2004. p. 6.
18. Mohedano RA, Rodríguez JB, Fracalossi DM. *Lemna valdiviana*, una planta que además de tratar efluentes alimenta os peixes cultivados. Panor. Aquicultura. 2005;15:33 - 40.
19. Clostre G, Suni M. Efecto del nitrógeno, fósforo y potasio del medio de cultivo en el rendimiento y valor nutritivo de *Lemna gibba* L. (Lemnaceae). Rev. Peru. Biol. 2006;13(3):231-5.
20. Aponte H. El junco. Clasificación, Biología y gestión. Científica. 2009;6 (1):38-45.
21. Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Perú. Saint Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden; 1993.
22. Ramírez DW, Cano A. Estado de la diversidad de la flora vascular de los Pantanos de Villa (Lima - Perú). Rev. Peru. Biol. 6 de mayo de 2011;17(1):111- 114.
23. San Martín C, Boetscher C. Importancia ecológica de la heterofilia en *Limnobium laevigatum*. Boletín Soc. Argentina Botánica. 2003;(Supl.):131-2.
24. Aponte H, Pacherras CO. Crecimiento y propagación de *Limnobium laevigatum* (Hydrocharitaceae) bajo diferentes concentraciones de nutrientes. Biol. Lima. 2013;11(1):69-78.
25. Reddy KR, DeBusk WF. Growth characteristics of aquatic macrophytes cultured in nutrient-enriched water: I. Water hyacinth, water lettuce, and pennywort. Econ. Bot. 1984;38(2):229-39.
26. Henry-Silva G, Camargo AFM, Pezzato M. Effect of nutrient concentration on the growth of aquatic macrophytes *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* and *Salvinia molesta*. Proc. 11 Th Ewrs Int. Symp. Aquat. Weeds. Moliets et Maâ - Francia; 2002. p. 147-50.
27. Beltzer A, Sabatti R, Marta M. Ecología alimentaria de la polla de agua negra *Gallinula chloropus galeata* (Aves: Rallidae) en un ambiente lenticó del Río Parana Medio, Argentina. Ornitol. Neotropical. 1991;2:29-36.
28. Corti P, Schlatter RP. Feeding Ecology of the Black-necked Swan *Cygnus melancoryphus* in Two Wetlands of Southern Chile. Stud. Neotropical Fauna Environ. 2002;37(1):9-14.
29. Carbonell CS, Cigliano MM, Lange CE. Especies de Acridomorfos (Orthoptera) de Argentina y Uruguay. La Plata (AR): The Orthopterists' Society at the Museo de La Plata; 2006.

30. Flores J, Cabanillas G, Aponte H. Estudio Preliminar de la productividad foliar y de Biomasa de *Limnobiium laevigatum* (Hydrocharitaceae) bajo condiciones de laboratorio. Libro Resúmenes. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
31. USDA. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. Washington D.C.; 1931 p. 22. Report No.: 183.
32. Cunniff P, AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 16.a ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International; 1997.
33. FAO. Food energy - methods of analysis and conversion factors. Roma, Italia; 2003 p. 87. Report No.: 77.
34. Hammer Ø, Harper DAT, Rayan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001;4(1):9.
35. Dias J, Conceição LE, Ribeiro AR, Borges P, Valente LM, Dinis MT. Practical diet with low fish-derived protein is able to sustain growth performance in gilthead seabream *Sparus aurata* during the grow-out phase. *Aquaculture.* 2009;293(3):255-62.
36. Dewanji A. Amino acid composition of leaf proteins extracted from some aquatic weeds. *J. Agric. Food Chem.* 1993;41(8):1232-6.
37. Gutiérrez K, Sanginés L, Pérez F, Martínez L. Estudios del potencial de la planta acuática *Lemna gibba* en la alimentación de cerdos. *Rev. Cuba. Cienc. Agrícola.* 2001;35(4):367-72.
38. González R. Cultivo de *Lemna perpusilla* en el valle del Cauto y su empleo en la alimentación de alevines y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) [Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias]. [Bayamo, Cuba]: Universidad de Granma; 2010.
39. Culley Jr DD, Epps EA. Use of duckweed for waste treatment and animal feed. *Water Pollut. Control Fed.* 1973;337-47.
40. Leng RA, Stambolie JH, Bell R. Duckweed-a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish. *Livest. Res. Rural Dev.* 1995;7(1):36.
41. Ty C, Preston TR. Effect of water spinach and fresh cassava leaves on intake, digestibility and N retention in growing pigs. *Livest. Res. Rural Dev.* 2005;17(2):77-83.
42. Azaza MS, Wassim K, Mensi F, Abdelmouleh A, Brini B, Kraïem MM. Evaluation of faba beans (*Vicia faba* L. var. *minuta*) as a replacement for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture.* 1 de febrero de 2009;287(1-2):174-9.

43. Pereira R, Valente LMP, Sousa-Pinto I, Rema P. Apparent nutrient digestibility of seaweeds by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Algal Res.* mayo de 2012;1(1):77-82.
44. Davidson J, Good C, Barrows FT, Welsh C, Kenney PB, Summerfelt ST. Comparing the effects of feeding a grain- or a fish meal-based diet on water quality, waste production, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance within low exchange water recirculating aquaculture systems. *Aquac. Eng.* enero de 2013;52:45-57.
45. Köprücü K, Özdemir Y. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 14 de noviembre de 2005;250(1-2):308-16.
46. Furuya VRB, Furuya WM, Hayashi C, Soares CM. Niveles de inclusión de harina de girasol en la alimentación de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), en etapa juvenil. *Zootec. Trop.* 2000;18(1):91 - 106.
47. Watanabe W, Olla B, Wicklund L, Head W. Tilapia Aquaculture in the Americas. Vol. I. Saltwater Cult. Fla. Red Tilapia Saline Toler. Tilapias Rev. World Aquaculture Society Baton Rouge, Louisiana, United States; 1997. p. 54-141.
48. El-Sayed A-FM. Long-term evaluation of cotton seed meal as a protein source for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn.). *Aquaculture.* 1990;84(3):315-20.
49. El-Sayed A-FM. Effects of substituting fish meal with *Azolla pinnata* in practical diets for fingerling and adult Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquac. Res.* 1992;23(2):167-73.
50. Espejo C. La piscicultura en Colombia. Tecnología de punta en el departamento de Valle del Cauca. Tegucigalpa, Honduras; 1997. p. 78.
51. Wee KL, Wang S-S. Nutritive value of *Leucaena leaf* meal in pelleted feed for Nile tilapia. *Aquaculture.* 1987;62(2):97-108.
52. Castillo E, Acosta Y, Betancourt N, Castellanos E, Matos A, Cobos V, et al. Utilización de la pulpa de café en la alimentación de alevines de tilapia roja [Internet]. *Rev. Aquat.* Vol 16 1. 2002 [citado 25 de junio de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.erevistas.csic.es/ficha_articulo.php?url=oai:www.revistaaquatic.com:751&oai_iden=oai_revista84.
53. Villareal C. Avances en la nutrición de *Cherax quadricarinatus*. Av. En Nutr. Acuícola Vi. Cancún, Quintana Roo, México.; 2002.
54. Cyrino J, Bicudo A, Sado R, Borghesi R. Producto de peixes e meio ambiente – a busca pela definicao, formulacao e uso de alimentos ambientalmente corretos en piscicultura. Sao Paulo, Brazil; 2006. p. 28.