



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto del tipo de alimento en el crecimiento y la  
actividad de las enzimas digestivas de juveniles  
cultivados de *Octopus maya* (Voss y Solis).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ANA MAYELA VALERO JIMENEZ**



Tutor: Dr. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Valero  
Jiménez  
Ana Mayela  
55 41 28 61  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
30002457-7
2. Datos del tutor  
Dr.  
Carlos  
Rosas  
Vázquez
3. Datos del sinodal 1  
Dra.  
Ruth Cecilia  
Vanegas  
Pérez
4. Datos del sinodal 2  
Dr.  
Pedro Pablo  
Gallardo  
Espinosa
5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
Martha Gabriela  
Gaxiola  
Cortéz
6. Datos del sinodal 4  
M. en C.  
María del Pilar  
Torres  
García
7. Datos del trabajo escrito  
Efecto del tipo de alimento en el crecimiento  
y la actividad de las enzimas digestivas de juveniles  
cultivados de *O. maya* (Voss y Solis).  
84 p.  
2009

## Agradecimientos

Quiero expresar mi cariño, gratitud y admiración a mi Asesor de Tesis, **Dr. Carlos Rosas Vázquez**, por su gran voluntad, paciencia y dedicación, por su siempre amable y cálida disposición para compartir su conocimiento, y por ese gran amor hacia la investigación que bien sabe contagiar.

Todo mi cariño y mi más sincero agradecimiento y reconocimiento para **Alejandra Pacheco Preciado** y **Arturo George Zamora** con quienes recorrí hombro a hombro este camino, sin su paciencia, dedicación y trabajo esto no hubiese sido posible. Gracias por todo su apoyo y por su amistad.

Agradezco de manera muy especial al **Arq. Victor Raúl Almanza Vincent** por su enorme apoyo y por su franco interés por mi familia. ¡Mil gracias por todas sus consideraciones para que pudiera concretar este proyecto!

Mi agradecimiento a todos los Técnicos Académicos del Iglú de Pulpo de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) de la UNAM, en especial a **Claudia Caamal Monsreal** y **Richard Mena Loría** quienes fueron imprescindibles para el abasto y mantenimiento de los organismos y para la infraestructura que esta investigación requirió.

Gracias a **Vianey Eunice Sosa Koh** y **Ariadna Berenice Sánchez Arteaga**, Técnicos Académicos del Laboratorio Central de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) de la UNAM, por su disposición y paciencia para transmitirnos las técnicas de laboratorio necesarias y por su valioso su apoyo.

Quiero agradecer a los integrantes de la Cooperativa "**Moluscos del Mayab**" por permitirme recorrer parte del camino con ustedes, por toda la confianza y el cariño que depositaron en mi. Gracias por no rendirse porque esta investigación tiene más sentido por ustedes.

Agradezco a toda mi familia, en especial a mis padres y mis dos hermanos, **Daniela** y **Ricardo Valero**, por ser mi fuerza y mi más grande apoyo.

Hago una mención especial para mis grandes amigos **Maya Rubio, Karla Bilbatúa y Francisco Gasteazoro** cuya amistad y enorme apoyo a lo largo de la licenciatura fueron invaluable. ¡Gracias por todo!

A mis queridísimas amigas **Erandi Pérez, Alma y Edna Bernal**, compañeras y cómplices en la vida jaja, mil gracias por toda su confianza y fé en mi, por su preocupación, apoyo y amor incondicionales. ¡Gracias por siempre estar ahí!

Y a todas esas personas maravillosas que estuvieron apoyándome y que hicieron bella mi estancia en Sisal, en especial a **Gabriela Chávez, Lizza Lozano y Janet Piñero**, mil gracias por su valiosísima amistad.

Y finalmente mi mayor gratitud a esta incomparable institución que es la **UNAM**, máxima casa de estudios en México, por las magníficas enseñanzas y todas las oportunidades a las que uno tiene acceso al formar parte de su comunidad.

**Este trabajo se llevó a cabo gracias al financiamiento otorgado por el Fondo CONACYT-Básico (proyecto No. 50118) y la DGAPA-UNAM (Proyecto IN216006) a C.R.**

A mi padre, Eduardo Valero Rincón  
y mi madre, Susana E. Jiménez Salas.

## ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>11</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>13</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>13</b>
<b>Material y Método</b> .....	<b>14</b>
<u>Origen de los organismos</u> .....	14
<u>Condiciones Experimentales</u> .....	15
<u>Diseño Experimental</u> .....	18
EXPERIMENTO 1. ALIMENTOS BALANCEADOS.....	19
EXPERIMENTO 2. FUENTES DE PROTEÍNA.....	21
EXPERIMENTO 3. MEZCLAS.....	23
EXPERIMENTO 4. ÁCIDOS GRASOS.....	24
<u>Actividad de las Enzimas Digestivas</u> .....	27
ENZIMAS EXTRACELULARES ALCALINAS: PROTEASAS TOTALES, TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA.....	27
ENZIMAS ÁCIDAS: FOSFATASAS ÁCIDAS.....	30
PROTEÍNAS TOTALES.....	32
<u>Glucógeno (en músculo)</u> .....	33
<b>Análisis Estadístico de Respuestas Evaluadas</b> .....	<b>33</b>
<u>Crecimiento y Supervivencia</u> .....	33
<u>Actividad Enzimática</u> .....	34
<u>Glucógeno en músculo</u> .....	34
<b>Resultados</b> .....	<b>35</b>
EXPERIMENTO 1. ALIMENTOS BALANCEADOS.....	35
EXPERIMENTO 2. FUENTES DE PROTEINA.....	38
EXPERIMENTO 3. MEZCLAS.....	46
EXPERIMENTO 4. ÁCIDOS GRASOS.....	54
<b>Discusión</b> .....	<b>62</b>
<u>Crecimiento y supervivencia</u> .....	62
<u>Ácidos grasos</u> .....	64
<u>Actividad de las enzimas digestivas</u> .....	66
<b>Conclusiones</b> .....	<b>70</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>72</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>77</b>
<b>ANEXO II</b> .....	<b>79</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>80</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS</b> .....	<b>82</b>



## Resumen

En el presente trabajo se evaluó el efecto que tienen 7 diferentes fuentes de proteína sobre el crecimiento y la actividad de las enzimas digestivas de *Octopus maya*, con el fin de conocer si pueden o no ser aprovechadas en la elaboración de un alimento balanceado para el cultivo del pulpo. Dichas fuentes fueron: jaiba fresca (como control), harina de pescado, harina de almeja, Concentrado Protéico de Solubles de Pescado (CPSP 70%), tentáculos de calamar liofilizados, almeja liofilizada y jaiba liofilizada. Para la evaluación se emplearon juveniles de *O. maya* cultivados de entre 1 y 30 días de vida. Los insumos probados fueron seleccionados siguiendo la secuencia de experimentos realizados, de tal forma que la elección de un insumo siempre se realizó tomando en cuenta los resultados del experimento previo. Únicamente el primer experimento se llevó a cabo utilizando un alimento completo a partir del cual se diseñaron los experimentos posteriores. En todos los casos se utilizaron fuentes de proteína nativa a excepción del último ensayo en el que algunas de las fuentes proteicas fueron desengrasadas y re-engrasadas con el fin de conocer el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en el crecimiento de los juveniles de *O. maya*.

La jaiba fresca fue utilizada como control positivo debido a que con ella se presentan las mejores tasas de crecimiento. Con ningún insumo diferente de la jaiba, fresca o liofilizada, se registraron valores positivos de crecimiento, aún cuando éstos fueron sometidos a un proceso de extracción, y en su caso también de readición, de grasas. Así, no fue posible asegurar que el tipo de ácidos grasos contenidos en cada una de las fuentes de proteína probadas fueran los causantes de las bajas tasas de crecimiento obtenidas como producto de una baja digestibilidad. En el caso de las enzimas digestivas, aunque no se encontró un patrón definido de actividad, sí se pudo observar que aún así la actividad de las mismas sí se ve regulada por el tipo de alimento proporcionado al animal.

## Introducción

Los pulpos son moluscos cefalópodos presentes en prácticamente todos los mares del planeta. Se reproducen una sola vez en su vida (Mangold, 1983; Giménez and García, 2002) y se caracterizan por tener ciclos de vida cortos, que pueden apenas llegar a 6 o 9 meses de edad (Okutani, 1990; Forsythe, 1981; Domingues et al., 2001a, 2001b, 2002). Sin embargo, la mayoría de las especies vive entre uno y dos años (Mangold, 1983).

En los últimos años la demanda de estos animales en el mercado se ha visto incrementada por ser un producto de alto valor culinario, cuya valía como recurso pesquero es reconocida en todo el mundo, más por su valor comercial que por el tamaño de sus capturas, inferiores a las de muchas otras especies marinas. Con dicho aumento en su demanda se ha producido una sobreexplotación de las poblaciones silvestres.

De acuerdo con la Carta Nacional Pesquera, en el Golfo de México se capturan principalmente dos especies de pulpo, el Pulpo Patudo (*Octopus vulgaris*) y el Pulpo Rojo (*Octopus maya*). Aunque para el caso de *O. vulgaris* se considera que sus poblaciones se encuentran con potencial de desarrollo, para el caso de *O. maya* éstas se hallan ya al máximo sustentable. Así, se recomienda no incrementar el esfuerzo pesquero actual hacia *O. maya*, revisar su periodo de veda y brindar protección al reclutamiento de la especie. Las generalidades de esta especie se incluyen en el Anexo I.

Una opción valiosa y viable para contribuir a la conservación de las poblaciones silvestres de pulpo, sin dejar de abastecer por supuesto la demanda del mismo en el mercado, es precisamente la acuicultura. Estos cefalópodos, en estado adulto, poseen características relevantes para su cultivo en condiciones controladas:

- se adaptan fácilmente al cautiverio
- presentan tasas de crecimiento y reproducción muy elevadas
- aceptan alimentos frescos y congelados
- elevado precio y amplitud de mercado

Sin embargo, los esfuerzos por cultivar pulpo, ya sea en jaulas flotantes o en estanques con condiciones controladas, han encontrado su mayor dificultad en el mantenimiento de las crías, especialmente en lo que al ámbito de la alimentación y la nutrición se refiere.

El metabolismo de los cefalópodos es esencialmente proteico y muy distinto del de los peces o crustáceos (Lee, 1994). El requerimiento en amino ácidos para la producción de proteínas es elevado (Houlihan et al., 1990) y su metabolismo es totalmente dependiente de ellas (Lee, 1994), siendo únicos entre los poiquilotérmicos (Forsythe and Van Hewkelem, 1987; Lee et al., 1998). Así, Lee (1994) defiende que la relación Proteína/Energía (P/E), normalmente usada en otros animales para definir la calidad de una dieta, no es fiable ni buena indicadora de una dieta apropiada para cefalópodos y propone que el balance de amino ácidos en el alimento es el mejor indicador de una buena dieta.

En los cefalópodos las altas tasas de crecimiento resultan de una elevada tasa de síntesis de proteínas siendo que, por ejemplo, en el pulpo *Octopus vulgaris* más del 90% de las proteínas sintetizadas son retenidas y utilizadas para el crecimiento (Houlihan et al., 1990).

Estos organismos se componen mayoritariamente de agua (80%). Las proteínas representan cerca del 16.6% de su peso húmedo (Iwasaki and Harada, 1985). Los carbohidratos representan cerca del 1% (Vlieg, 1984) y los lípidos menos del 2%. Ninguno de estos dos últimos componentes es utilizado para la producción de energía (Hochachka, et al., 1975). En términos de peso seco, su composición es mayoritariamente proteica (75 a 85%). En comparación con los peces, poseen 20% más de proteína, 80% menos de cenizas, entre 50 a 100% menos de lípidos y entre 50 a 100% menos de carbohidratos (Lee, 1994), los lípidos neutros son muy poco utilizados (Lee et al., 1998). Una vez que las proteínas son utilizadas para todas las funciones vitales y el crecimiento, su asimilación es muy eficiente con valores superiores al 90% (Lee, 1994). Así, las proteínas son la mayor fuente de energía para estos organismos (Lee, 1994).

El cultivo del pulpo se encuentra aún en fase de desarrollo. Uno de los principales problemas que enfrenta esta actividad es precisamente la falta de un alimento balanceado que cubra con los requerimientos de nutrientes esenciales del pulpo, que sea disponible y de bajo costo y que promueva el crecimiento y la reproducción de los organismos cultivados.

## Antecedentes

Estudios previos han demostrado que a la fecha no existen alimentos balanceados para alimentar cefalópodos. Numerosas investigaciones desarrolladas en diversas especies de pulpos han sido dedicadas a la exploración de diversas fuentes proteicas incluyendo surimi de pescado, pollo congelado, croquetas para perro, camarones congelados, fragmentos de calamar, camarones vivos y cangrejos, entre otros (Van Heukelem, 1976; Van Heukelem, 1977; Forsythe and Hanlon, 1980; Hanlon and Forsythe, 1985a; Hanlon and Forsythe, 1985b; García-García and Aguado-Giménez, 2002; Giménez and Garcia, 2002; Aguado-Giménez and García-García, 2003; Vaz-Pires et al., 2004; Miliou et al., 2005; Petza et al., 2006; Pérez et al., 2006; Rosas et al., 2007; Domingues et al., 2007). De entre estos estudios se destaca el realizado por Lee et al. (1991) quienes demostraron que entre 12 diferentes fuentes proteicas, únicamente los pulpos que fueron alimentados con camarón vivo o con carne de pollo crudo produjeron un crecimiento positivo. Una especie muy estudiada en estos aspectos ha sido *Sepia officinalis*, especie de desarrollo directo muy abundante en los mares europeos y asiáticos (Gomi et al., 1986). Estos estudios se han dedicado a probar diferentes formas de alimentar a los cefalópodos con fuentes de proteína de alta calidad como la proveniente de camarones, misidaceos y calamares (Castro, 1991; Castro et al., 1993; Castro and Lee, 1994; Domingues, 1999; Domingues et al., 2002; Koueta et al., 2002; Domingues et al., 2004; Domingues et al., 2005; Le Bihan et al., 2006; Koueta et al., 2006). De estas experiencias lo que se ha podido notar es que, en general, los animales presentan crecimientos mayores de 6% por día cuando la proteína proviene principalmente de crustáceos vivos o en su defecto congelado. No obstante, cuando esta misma proteína ha sido modificada ya sea por cocción o por secado con calor, los crecimientos observados raramente pasan del 0.5% por día indicando que las sepias y los pulpos son en general sensibles a los cambios en algún aspecto relativo a la disponibilidad de las proteínas en el alimento.

Entre los aspectos que han sido estudiados para explicar las razones por las cuales los cefalópodos no crecen cuando son alimentados con algunas de estas fuentes proteicas se encuentran los niveles de lípidos en la dieta. Koueta et al. (2006) observaron que cuando los palemónidos congelados son sumergidos en aceite rico en ácidos grasos poliinsaturados, los juveniles de *S. officinalis* muestran un incremento en el peso del manto mayor que el observado en los animales alimentados con la dieta control. Por su

parte diversos autores (García-García and Aguado-Giménez, 2002; Giménez and Garcia, 2002; Petza et al., 2006; Pérez et al., 2006; Rosas et al., 2007; Domingues et al., 2007) observaron que en *O. vulgaris*, *O. maya* y *Enteroctopus megalocyatus*, dietas ricas en lípidos suelen afectar negativamente el crecimiento debido a la posible saturación que éstos provocan de los sitios de absorción de la proteína en la glándula digestiva. Así, aunque los ácidos grasos poliinsaturados parecieran ser benéficos para el crecimiento de los juveniles de sepia, su uso en dietas para engorda deberá considerar la capacidad digestiva de los organismos en particular, la cual depende de las dietas naturales para las que los organismos se han adaptado. En el caso particular de los pulpos, los resultados hasta ahora obtenidos demuestran que los lípidos podrían limitar la digestión de las proteínas ya que estos son poco frecuentes en sus dietas naturales.

Una de las formas de estudiar la capacidad digestiva de los pulpos, al igual que de otras especies de interés para la acuicultura, es a través de la evaluación de los efectos que los alimentos tienen sobre la actividad de las enzimas digestivas. Estudios recientes llevados a cabo en pre-adultos de *O. maya* demostraron que la actividad de las proteasas generales, tripsina y quimotripsina es modulada por las características del alimento ofrecido. Aguila et al. (2007b) trabajando con dietas balanceadas diseñadas específicamente para *O. maya* y con diferentes niveles de hidrolizado de pescado, observaron que las dietas que produjeron crecimientos negativos indujeron la producción de quimotripsina mientras que las dietas que produjeron altas tasas de crecimiento indujeron la actividad de la tripsina. También Rosas et al. (2007) al utilizar un alimento balanceado originalmente diseñado para alimentar camarones y enriquecido con pasta de calamar (*Loligo spp*) observaron una respuesta similar, lo que hizo pensar que esta especie de pulpo tienen la capacidad de aumentar la capacidad digestiva en un intento por extraer una mayor cantidad de nutrientes en presencia de dietas deficientes. Considerando que la capacidad digestiva puede cambiar con la edad se realizó un estudio en el que se evaluaron los efectos de un alimento balanceado sobre el crecimiento y la actividad de las enzimas digestivas de *O. maya* (Moguel 2008). Ahí se observó que, al igual que en los pre-adultos, la quimotripsina de organismos menores de 1g de peso húmedo es inducida en presencia de dietas deficientes mientras que la tripsina se relaciona directamente con el crecimiento.

## **Justificación**

*Octopus maya* es una especie de importancia económica y con un gran potencial para ser utilizada como especie de cultivo. Aunque las dietas hasta ahora utilizadas para alimentar a esta especie en cautiverio han sido elaboradas tomando en consideración los perfiles de amino ácidos, carbohidratos y lípidos de las jaibas, con las que se obtiene el mayor crecimiento, los resultados obtenidos indican que en el diseño de estos alimentos deben de considerarse otros aspectos además de los estrictamente relacionados con su composición bioquímica. El uso de indicadores de la capacidad digestiva, como la actividad de las enzimas digestivas acopladas al crecimiento y la sobrevivencia, proporcionan una base sólida para comprender la forma en que los elementos de la dieta son utilizados. Esta información permitirá establecer una base para el diseño de dietas que promuevan la capacidad digestiva y al mismo tiempo satisfagan los requerimientos nutricionales para el crecimiento de los pulpos en particular y de los cefalópodos en general, contribuyendo así al desarrollo de la tecnología para su cultivo.

Por estas razones el presente estudio ha sido diseñado con el fin de establecer la manera en que diferentes fuentes proteicas derivadas de un alimento balanceado modulan la actividad de las enzimas digestivas, el crecimiento y la sobrevivencia de los juveniles tempranos de *Octopus maya*.

## **Objetivos particulares**

1. Conocer el efecto de diferentes fuentes proteicas en el crecimiento y sobrevivencia de los juveniles tempranos de *Octopus maya* obtenidos en condiciones controladas.
2. Establecer si existe una relación entre la actividad de las enzimas digestivas (fosfatasas ácidas, proteasas generales, tripsina y quimotripsina) y el crecimiento que pueda explicar la forma en que el tipo de alimento modula la capacidad digestiva de estos organismos.

## Material y Método

### Origen de los organismos

Se obtuvieron juveniles de *Octopus maya* provenientes de desoves realizados bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Las hembras fecundadas fueron extraídas del medio natural y trasladadas al área de maduración e incubación, en donde se mantuvieron alrededor de 45 días (tiempo después del cual la hembra realiza la puesta). Los huevos se trasladaron a incubadoras en donde se tuvo especial cuidado con el sistema de aeración y la calidad del agua, factores críticos para la sobrevivencia de los embriones (Fig. 1). Una vez ahí se esperaron de 40 a 50 días hasta completar el desarrollo de los embriones seguido del avivamiento.

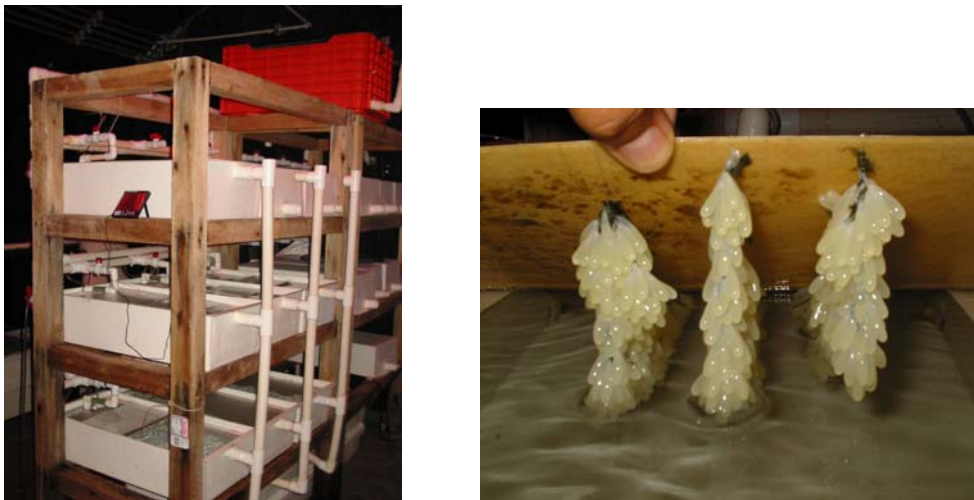


Figura 1. a) Sistema de incubación; b) Masa de huevos de *O. maya*.

Los organismos utilizados variaron desde recién eclosionados hasta el mes de edad en los diferentes experimentos y, dependiendo de la disponibilidad de ejemplares, en algunos casos además de la edad también se tomó en cuenta su peso para llevar a cabo la selección.

## **Condiciones Experimentales**

Los juveniles de *O. maya* fueron colocados en tanques rectangulares de 70 L de capacidad con agua de mar en condiciones controladas. La calidad del agua se mantuvo constante mediante filtros y espumadores (Fig. 2). Además se realizó la medición de parámetros físico-químicos, los cuales se regularon dentro de los siguientes intervalos considerados como adecuados: 32 a 36 ups, 24 a 28°C, 4 a 6 mg/L de O<sub>2</sub> disuelto, niveles menores de 1 mg/L de amonio total y de entre 0.8 y 1.1 mg de nitritio. La intensidad luminosa se mantuvo en niveles no mayores de 70 lux/cm<sup>2</sup>.



Fig. 2. Sistema de filtros y espumadores.

Los animales fueron colocados en dispositivos llamados "T", manufacturados con tubos de PVC de 2" de diámetro. El sistema de T contó con 2 tapas removibles, una lateral y otra en la parte superior, para facilitar la alimentación. Además estuvo sellada, por ambos lados, con malla plástica para permitir el flujo de agua. Se colocó un pulpo por T, 37 T's por cada tina y el número de tinas necesarias según la N establecida previamente para cada experimento, que en general varió entre 3 y 4 tinas (Fig. 3).





Fig. 3. Distribución de animales experimentales en tinas y T's.

En el experimento 4 el sistema de T's se sustituyó por contenedores rectangulares de plástico, mismos que contaban con una entrada por la tapa para suministro de agua a través de una manguera, y en la parte frontal con una malla que permitió la salida del agua. El flujo fue controlado con válvulas individuales. Se colocó igualmente un pulpo por contenedor y 24 contenedores por tina (Fig. 4).



Fig. 4. Sistema de contenedores rectangulares.

Cada individuo se identificó con un número el cual sirvió para asignar al azar cada tipo de alimento. De esta manera, y dado que la numeración de los lugares en las tinas fue consecutiva, también su lugar dentro de la tara quedó distribuido al azar, eliminando así efectos tales como el de la diferencia en la incidencia de la luz, la intensidad del flujo de agua, el movimiento (estrés), etc. que pueden ser distintos en cada sitio específico dentro de la tina e influir en el registro del efecto de la dieta.

En el caso del sistema de contenedores, como eran de varios colores, se buscó que la cantidad de contenedores de cada color dentro de las diferentes dietas fuera equitativa, y su distribución con los animales dentro de la misma dieta también fue al azar.

Todos los animales, en todos los experimentos, fueron alimentados dos veces al día (a las 9:00 a.m. y a las 6:00 p.m.) dándoles diariamente una porción de alimento equivalente al 30 % de su peso (Fig. 5). Como se ofrecieron dos tomas, entonces la ración por toma fue del 15%. De igual manera en todos los experimentos el alimento fue suministrado en conchas de bivalvos (con el fin de brindar superficie de fijación tanto al pulpo para comer, como al alimento para que no flotara) y las materias primas fueron liofilizadas (según el caso), molidas y tamizadas a un tamaño de 250  $\mu\text{m}$ .



Fig. 5. Alimentación de juveniles de *O. maya* individualizados en T's.

En cuanto al mantenimiento de los organismos previo a los experimentos, en el experimento 1 no existió tal debido a que la prueba se inició el mismo día de la eclosión de los embriones. En el caso de los experimentos 2 y 3 los pulpos fueron mantenidos con jaiba fresca, misma pasta que fue empleada como dieta control en todos los casos. Para el experimento 4 también fue usada jaiba fresca, pero en este caso se adicionó con CPSP (5 %) y vitaminas (2 %).

### **Diseño Experimental**

El diseño experimental de los ensayos que se llevaron a cabo se basó en los resultados de otros experimentos realizados previamente, en los cuales quedó demostrado que la gnetina es mejor aglutinante que el alginato de sodio en la elaboración de alimentos destinados a pulpo (Rosas et al., 2008). Así mismo se observó que la jaiba fresca es óptima en cuanto a valores de crecimiento y sobrevivencia, razón por la cual se tomó como dieta control en todos los casos (Domínguez et al., 2007). Todos los experimentos tuvieron una duración aproximada de 20 días, tiempo que se ajustó de acuerdo con la sobrevivencia observada.

En general el diseño experimental fue el siguiente:

Tabla 1. Diseño experimental de cada uno de los experimentos realizados con juveniles de *O. maya* cultivados para probar diversas fuentes de alimento.

	<b>Experimento 1</b>	<b>Experimento 2</b>	<b>Experimento 3</b>	<b>Experimento 4</b>
<b># dietas por probar</b>	4	6	5	6
<b># animales por dieta</b>	20	20	20	20
<b>Edad animales</b>	Recién eclosionados	1 mes	+ - 1 mes (0.4 – 1 g)	+ - 1 mes (0.4 – 1g)
<b>Duración del experimento</b>	12 días	9 días	23 días	26 días

## EXPERIMENTO 1. Alimentos Balanceados.

Se utilizaron 20 pulpos recién eclosionados provenientes del mismo desove para cada una de las dietas (Fig. 6). Para este experimento se formularon 4 diferentes alimentos balanceados, tomando como dieta basal un alimento utilizado para el cultivo de trucha, el cual parecía cumplir con los requerimientos nutricionales y el perfil aminoacídico adecuado para el pulpo (Fig. 7).



Fig. 6. Pulpos recién eclosionados provenientes de desoves en condiciones controladas de luz y temperatura.



Fig. 7. Preparación de alimentos balanceados en el área de nutrición de la UMDI.

Las dietas fueron las siguientes:

Tabla 2. Composición de los alimentos balanceados empleados en el experimento 1, expresada en % total del insumo por cada 100 gramos de mezcla.

<b>Insumo</b>	<b>Basal</b>	<b>CPSP</b>	<b>Autolizado</b>	<b>Jaiba Fresca</b>
Harina Prime Chile	30	30	30	-
Saborizante de Pescado (Autolizado)	-	-	En lugar de H <sub>2</sub> O 47 mL	-
CPSP 70	5	15	5	-
Harina de Almejas	10	10	10	-
Tentáculos de Calamar Liofilizados	41	31	41	-
Grenetina	7	7	7	5
Aceite de pescado	3	3	3	-
Lecitina de soya	1	1	1	-
Vitaminas Mix + stay-C	2	2	2	-
Minerales mix	1	1	1	-
Jaiba fresca	-	-	-	100
H <sub>2</sub> O	35 mL + 15 = 50 mL	35 mL + 12 = 47 mL	-	-
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

De las cuales:

- Dieta A = Basal
- Dieta B = CPSP (Concentrado Proteico de Solubles de Pescado)
- Dieta C = Autolizado
- Dieta D = Jaiba (DIETA CONTROL)

Como se puede ver en la tabla anterior los alimentos fueron formulados a partir de la dieta basal, misma a la que le fueron modificadas las proporciones de ciertos ingredientes y agregados otros que se pusieron a prueba. En el caso de la Dieta B las proporciones se ajustaron a manera de incluir una mayor cantidad de CPSP que, gracias a su fuerte poder atrayente se adicionó como saborizante al alimento, buscando volverlo más atractivo para los organismos. En la Dieta C el elemento añadido fue un Autolizado de pescado utilizado en la cocina oriental también por su papel como atrayente. La jaiba fue la dieta control. Las variables a medir en este experimento fueron el crecimiento y la sobrevivencia así como el grado de lixiviación de las diferentes dietas. No se evaluó la actividad de las enzimas digestivas ni el glucógeno en músculo debido al tamaño final tan pequeño de los organismos.

## EXPERIMENTO 2. Fuentes de Proteína.

Dados los resultados del primer experimento, se realizó un segundo ensayo. En él, se decidió probar por separado cada una de las fuentes proteicas brindadas en la dieta base anterior, buscando conocer el efecto de cada una de ellas en el crecimiento y sobrevivencia de los organismos. Esto permitió identificar el elemento que pudiese estar interfiriendo en la buena digestibilidad del alimento balanceado, y conocer cuáles de ellas son las mejores opciones a utilizar.

Se utilizaron 20 pulpos por dieta, provenientes de diferentes desoves y fechas de nacimiento pero todos ya de 30 días de edad. Los organismos fueron pesados y distribuidos al azar en cada una de las dietas. El intervalo de peso usado fue de entre 0.4 g. a 1 g. en peso húmedo.

En este experimento se probaron 7 fuentes de proteína:

Dieta A = Harina de Pescado

Dieta B = CPSP

Dieta C = Harina de Almeja

Dieta D = Tentáculo de calamar liofilizado

Dieta E = Almeja Liofilizada

Dieta F = Jaiba fresca (CONTROL)

Dieta G = Jaiba Liofilizada

Todos los alimentos se prepararon únicamente con la fuente de proteína correspondiente más el 5% de gretetina previamente disuelta en agua caliente, ajustando finalmente la cantidad de agua de acuerdo a la consistencia de la mezcla que debió ser pastosa (Fig. 8).



Fig. 8. Consistencia pastosa de los alimentos elaborados.

Al término del periodo experimental se midió el crecimiento y la sobrevivencia, la actividad enzimática en la glándula digestiva (tripsina, quimotripsina, proteasas totales y fosfatasa ácida) y el glucógeno en músculo.

Diariamente se midió el pH, el oxígeno disuelto, la salinidad y la temperatura en el agua de las tinajas con un potenciómetro.

### EXPERIMENTO 3. Mezclas.

Este experimento fue diseñado con el fin de determinar el efecto de las fuentes proteicas que tuvieron los mejores resultados en el experimento anterior, pero ahora considerando la mezcla entre ellas como una forma de mejorar su desempeño. Estas dos fuentes fueron el CPSP y el tentáculo de calamar liofilizado, manteniendo la jaiba fresca como control. En este experimento se probó además la jaiba liofilizada (Fig. 9).



Fig. 9. a) Preparación de jaiba para liofilizar; b) Liofilizadora.

Se utilizaron 20 animales por dieta, nuevamente provenientes de diferentes desoves y alrededor de 1 mes de edad. El intervalo de peso usado se amplió de 0.4 g a 1.2 g en peso húmedo para poder completar el número de pulpos requeridos.

Las mezclas ensayadas fueron:

- Dieta A = CPSP + Tentáculo de Calamar Liofilizado
- Dieta B = Tentáculo de calamar Liofilizado + Jaiba Liofilizada
- Dieta C = CPSP + Jaiba Liofilizada
- Dieta D = Jaiba Liofilizada
- Dieta E = Jaiba Fresca (CONTROL)



Las dietas se prepararon con los ingredientes tamizados a 250  $\mu\text{m}$ . Únicamente se mezclaron las fuentes proteicas correspondientes con el 5% de grenetina. El agua nuevamente se ajustó según la consistencia de la masa.

Se midieron parámetros físico – químicos (T  $^{\circ}\text{C}$ , S ‰, O.D. y pH) , amonio, nitratos y nitritos semanalmente y se evaluó crecimiento, sobrevivencia, actividad enzimática y glucógeno en músculo.

#### EXPERIMENTO 4. Ácidos grasos.

Este experimento consistió en probar de manera aislada el CPSP, la jaiba liofilizada y el tentáculo de calamar liofilizado, mismos que fueron sometidos a un procedimiento de extracción de grasas. Para esto la jaiba y el tentáculo de calamar fueron liofilizados y molidos, posteriormente los tres insumos fueron tamizados a 250  $\mu\text{m}$  y procesados de acuerdo con el método “Soxhlet” (Fig. 10). El procedimiento seguido se señala en el Anexo II.



Fig. 10. a) Dispositivo de extracción de grasas “Soxhlet”; b) Recuperación del éter usado durante el proceso de desengrasado.

Una vez extraídos los ácidos grasos, los insumos fueron adicionados con colesterol y vitaminas en todos los casos y readicionados con ácidos grasos (HUFAS\*\*) cuando así correspondía. De esta manera la formulación de las dietas fue la siguiente:

Tabla 3. Composición de las dietas empleadas en el experimento 4, expresada como porcentaje por cada 100 g de mezcla.

	<b>Sin HUFAS</b>	<b>Con HUFAS</b>
Fuente de Proteína (*)	86.5%	86.5%
Grenetina	8 %	5 %
Colesterol	0.5%	0.5%
Vitaminas y Minerales	2 %	2 %
Stay-C (vitamina C)	3%	%
Hufas	0	4 %

\* Fuentes de proteína: tentáculo de calamar liofilizado, jaiba liofilizada o CPSP.

\*\* HUFAS (Highly Unsaturated Fatty Acids)

El agua se ajustó hasta obtener la consistencia deseada (pastosa).

Así, las dietas experimentales evaluadas fueron (Fig. 11):

Dieta A = Tentáculo de Calamar Liofilizado Sin Hufas

Dieta B = Jaiba Liofilizada Sin Hufas

Dieta C = CPSP Sin Hufas

Dieta D = Tentáculo de Calamar Liofilizado Con Hufas

Dieta E = Jaiba Liofilizada Con Hufas

Dieta F = CPSP Con Hufas

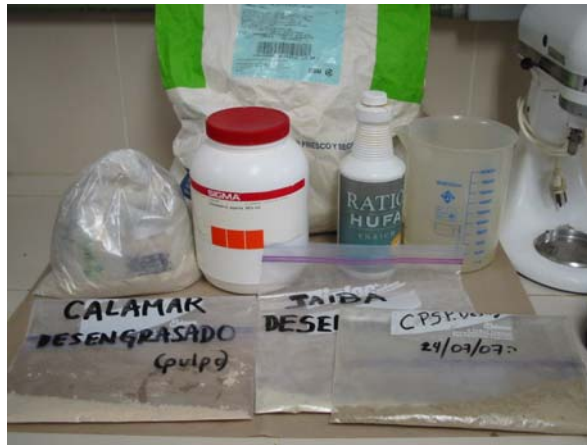


Fig. 11. Ingredientes empleados en la elaboración de alimentos con HUFAS y sin HUFAS.

En esta ocasión el experimento fue realizado en dos partes debido a que no se completó el número de organismos requerido para hacerlo en una sola vez. En la primera parte se probaron las dietas de jaiba y tentáculo de calamar y en la segunda las correspondientes al CPSP.

Como se mencionó anteriormente, el mantenimiento de los animales previo a este experimento se realizó no sólo con jaiba fresca como en las demás ocasiones, sino con una dieta de jaiba adicionada con vitaminas (porque se pensó que la elevada mortalidad en los otros ensayos podía deberse a una falta de vitaminas), hasta que alcanzaron el peso deseado de 0.4 g a 1 g. Aunque provenientes de diferentes desoves todos los juveniles tenían menos de 15 días de edad y presentaban pesos aproximados de 0.3 g al momento de comenzar a alimentarlos con la dieta adicionada.

Preparación del alimento para engorda previa:

Tabla 4. Composición de la dieta empleada para engorda de los pulpos del experimento 4 antes del experimento. Porcentaje de ingredientes por cada 100 g de mezcla.

<b>Por cada 100 g:</b>	<b>%</b>	<b>gramos</b>
Jaiba Fresca	88 %	88 g
CPSP	5 %	5 g
Vitaminas (Stay C)	2 %	2 g
Grenetina	5 %	5 g
<b>TOTAL:</b>	<b>100 %</b>	<b>100 g</b>

\* No se utiliza agua para diluir previamente la grenetina debido al alto contenido de la misma en la pulpa de jaiba, el cual es suficiente para realizar la mezcla.

En ambas partes del experimento la N fue de 18 pulpos por dieta y, al momento de montar el experimento, éstos ya oscilan entre 3 semanas y 1 mes de edad.

Se midió el crecimiento, la sobrevivencia, la actividad de las enzimas digestivas y el glucógeno en músculo.

### **Actividad de las Enzimas Digestivas**

Una Unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1µmol de sustrato/minuto ( E=18000 L/mol/cm).

- Enzimas extracelulares alcalinas: Proteasas Totales, Tripsina y Quimotripsina.

Se siguió el método sugerido por Charney, J. y Tomarelli, R. (1947) para Proteasas totales y Tripsina, y el establecido por Delmar, E.G., Largman, C., Brodick, J.W. y Geokas, MC. (1979) para la Quimotripsina. Se detalla sobre ambos métodos a continuación.

### Obtención de la muestra

Se extrajo una muestra de tejido (glándula digestiva de *O.maya*) de 60 mg (mínimo) que se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml y se guardó a -40°C hasta su procesamiento (Fig. 12).

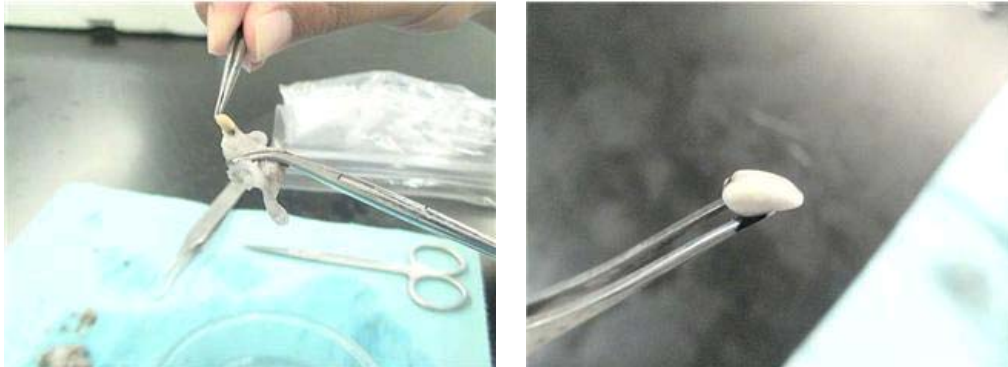


Fig. 12. Extracción de la glándula digestiva de los pulpos experimentales.

### Preparación del homogenado

Cada muestra fue homogenizada con 1000  $\mu$ l de buffer de extracción aproximadamente por 30 segundos. Fue importante realizar este proceso a 4°C, para lo cual el tubo fue colocado en un vaso de precipitado con hielo frappé. Luego se centrifugó a 10 000 g por 30 min a 4°C para después vaciar el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo (extracto crudo).

Buffer de extracción (pH = 8.3):

- Tris – base 0.09 M
- Ácido Bórico 0.08 M
- EDTA 3 mM
- Mercaptoethanol 0.5 M
- Glicerol 10 %

### Procesamiento de la muestra

Una vez obtenido el extracto crudo, las muestras fueron procesadas utilizando el sustrato específico respectivo para cada enzima (Tabla 4).

Tabla 5. Sustratos empleados en la medición de la actividad enzimática con cada una de las enzimas extracelulares.

<b>Enzima</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Preparación</b>
Proteasas Totales	Azocoll 2.4 % disuelto en buffer fosfato pH. 3.	<i>Reactivos:</i> Buffer Fosfato , pH 3. Mantener en 2-8 °C. <i>Preparación:</i> – KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.096 M – NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.004 M
Tripsina	N α-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide 1 mM (BAPPNA) disuelto en Buffer Tris 0.1 M, pH. 8.	<i>Reactivos:</i> Buffer Tris 0.1 M, pH 8. Mantener en 2-8 °C.
Quimotripsina	Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (SAAPNA) 1.142 mM disuelto en Buffer Base Tris 0.1 M, con CaCl <sub>2</sub> 0.01 M , pH 8.	<i>Reactivos:</i> Buffer Base Tris 0.1 M, con CaCl <sub>2</sub> 0.01 M , pH 8. Mantener en 2-8 °C.

Nota: Fue importante evaluar el pH del sustrato respectivo previa su utilización. En caso de requerirse algún ajuste se utilizó el buffer atemperizado a 25°C.

En todos los casos se tomaron 833  $\mu$ l del sustrato respectivo y se adicionaron 167  $\mu$ l de muestra. Para tripsina y quimotripsina se usaron muestras de extracto diluido 1:100 (10  $\mu$ l del extracto crudo en 990  $\mu$ l de buffer de extracción pH. 8.3), mientras que para proteasas la muestra correspondió al extracto crudo. El blanco en todos los casos fue 167  $\mu$ l de agua libre de pirógenos + 833  $\mu$ l del sustrato respectivo y NO se incubó. Tanto las muestras como el blanco se agitaron en el vórtex.

A continuación, las Proteasas se incubaron a 37°C por 1 hora, la tripsina a 25°C también por 1 hora y la quimotripsina a 37°C pero por 30 minutos. Después se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro en la longitud de onda correspondiente: proteasas a 442 nm, tripsina a 410 nm y quimotripsina a 410 nm.

En proteasas totales, la actividad específica es obtenida en  $\mu$ U/mg proteína. Una unidad equivale a la variación de una unidad de densidad óptica por minuto. En tripsina y quimotripsina la actividad es medida por la aparición de pNa a 410 nm. La actividad específica se expresa:  $\mu$ U/mg proteína. 1 unidad =1  $\mu$ mol/L pNa / minuto

➤ Enzimas ácidas: Fosfatasas ácidas

En el caso de las Fosfatasas ácidas se siguió el procedimiento señalado por Moyano F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J. y Sarasquete, C. (1996), mismo que se señala a continuación.

Obtención de la muestra

Se debe obtener 1 g de muestra mínimo y colocarlo en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml. En nuestro caso no siempre se logró juntar un gramo, por tanto para homogenizar se ajustó el buffer de extracción a la cantidad de muestra lograda.

La muestra se mantuvo en congelación a -40°C hasta su procesamiento.

### Preparación del homogenado

Antes de iniciar el homogenado el tejido fue pesado. Se adicionaron 2.5 ml de buffer de extracción por 1g de tejido. Se homogenizó en el mismo tubo Eppendorf hasta que se desintegró completamente. Fue importante hacerlo a 4°C, para ello se puso el tubo en un vaso de precipitado con hielo. Posteriormente se centrifugó a 10 000g por 1 hora a 4°C. Luego se vació el sobrenadante en tubos Eppendorf nuevos (extracto crudo).

Buffer de extracción:

- KCl 1%
- EDTA 1mM

### Procesamiento de la muestra

En las fosfatasas la actividad es medida por la aparición de p-nitrophenol a 405 nm. La actividad específica se expresa: UI/mg proteína. 1 unidad =1  $\mu\text{mol/L}$  pnitrophenol / minuto. Para medir la actividad de las fosfatasas ácidas se usó como sustrato p-nitrophenil-fosfato 2 % en buffer Base Tris-HCl 0.1 M, pH 4. Se colocaron 500  $\mu\text{l}$  de pNPP 2% en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de extracto diluido (1:100). Posteriormente se agitó en vortex y se incubó a 25°C por 30 minutos. Luego de ello se agregó 1 ml de NaOH 1M (para detener la reacción) y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 405 nm. El blanco correspondió a 500  $\mu\text{l}$  de agua libre de pirógenos + 500  $\mu\text{l}$  de pNPP + 1 ml NaOH. No se incubó. La actividad es medida por la aparición de p-nitrophenol a 405 nm (Fig. 13). La actividad específica se expresa: UI/mg proteína. 1 unidad =1  $\mu\text{mol/L}$  pnitrophenol / minuto.





Fig. 13. Espectrofotómetro

➤ Proteínas Totales

Cada una de las técnicas que integra la serie de evaluaciones enzimáticas combina la colorimetría con la incubación de la enzima y el sustrato. La actividad se expresa como actividad de la enzima por mg de proteína, por lo tanto, al evaluar cualquier enzima es necesario también evaluar las proteínas totales.

Esta determinación se llevó a cabo mediante el análisis de la proteína de Bradford, el cual se basa en la adhesión del tinte azul de Coomassie a la proteína.

Se realizó una dilución 1:50 ( 5  $\mu$ l de extracto crudo en 254  $\mu$ l de buffer de extracción de enzimas ácidas) en un tubo eppendorf de 0.5 ml y se homogenizó en vórtex.

El buffer se manejó atemperizado mientras que tanto la dilución como el extracto crudo fueron en frío. En una placa para lector de ELISA se colocaron 10  $\mu$ l de Curva Estandar, 10  $\mu$ l de blanco y 10  $\mu$ l de la dilución de las muestras en los pozos respectivos, realizando 3 réplicas en cada caso. Inmediatamente después de agregaron 200  $\mu$ l de Proteína de Bradford y se dejaron pasar 5 minutos para estabilizar. De inmediato se leyó la absorbancia en el lector de ELISA a 595 nm.

### **Glucógeno (en músculo)**

Se extrajo una muestra de músculo, proveniente del tentáculo de los pulpos experimentales muestreados. Esta debió corresponder a un corte entre 0.0200 - 0.0600 g de peso, mismo que fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se añadieron previamente 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. El tejido fue homogenizado en el TCA durante 2 minutos y posteriormente centrifugado a 7000 rpm (4550g) durante 6 min. El sobrenadante fue separado y colocado en otro tubo eppendorf de 1.5 ml con 500 µl de etanol al 95% homogenizando con ayuda de la micropipeta. Luego se incubó a 37 °C por 3 horas y después de ello se volvió a centrifugar a 7000 rpm por 15 minutos. En esta ocasión el sobrenadante fue desechado y los tubos se pusieron a secar invertidos sobre un papel absorbente.

Mientras los tubos se secaban se preparó el blanco y el estándar:

Blanco: 200 µl de fenol al 5% + 1 ml de ácido sulfúrico

Estándar: 10 µl de estandar de glucosa (2 mg/ml) + 200 µl de fenol 5% + 1 ml de ácido sulfúrico.

Luego se adicionó a las muestras (tubos que se pusieron a secar) 200 µl de fenol al 5% + 1 ml de ácido sulfúrico. Se agitó en vórtex. De estas muestras se tomaron 200 µl y se colocaron en una microplaca de lector de ELISA, incluyendo el blanco y el estándar, cada uno por triplicado. Se leyó la absorbancia a 490 nm en el lector de ELISA.

### **Análisis Estadístico de Respuestas Evaluadas.**

#### **Crecimiento y Supervivencia.**

Para crecimiento y supervivencia se calculó el porcentaje de cada uno, tomando en cuenta parámetros estadísticos como la media y el error estándar, mismos que fueron empleados para calcular el máximo y el mínimo de los datos con los cuales se graficó.

El crecimiento fue expresado como tasa de crecimiento % peso por día, mismo que se obtuvo con la fórmula:

$$\text{Tasa crecimiento \% día} = \frac{(\ln Pf - \ln Pi)}{T} * 100$$

donde:

- ln: logaritmo natural
- Pf: peso final
- Pi: peso inicial
- T: tiempo

#### Actividad Enzimática.

La actividad enzimática se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Vel. Reacción: } \frac{(\text{pendiente} * \text{vol. reacción} * \text{factor de conversión})}{(\text{Coeficiente de extinción} * \text{Vol. Enzima})}$$

La velocidad de reacción obtenida se multiplicó posteriormente por el factor de dilución y el dato de proteínas totales obtenido previamente para tener la actividad enzimática en UI mg de proteína.

#### Glucógeno en músculo.

El glucógeno se calculó con la fórmula:

$$\text{Glucógeno mg/g} = \frac{(\text{DO promedio} - \text{DO promedio blanco})}{\text{DO promedio std}} * \text{std} \\ (\text{Concentración glucosa (1 mg/ml)} * (\text{vol extracto/peso tejido}) * 0.9)$$

Con todas las variables medidas, salvo para sobrevivencia que sólo se calculó el porcentaje, se realizó un ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey con un alfa de 0.05.

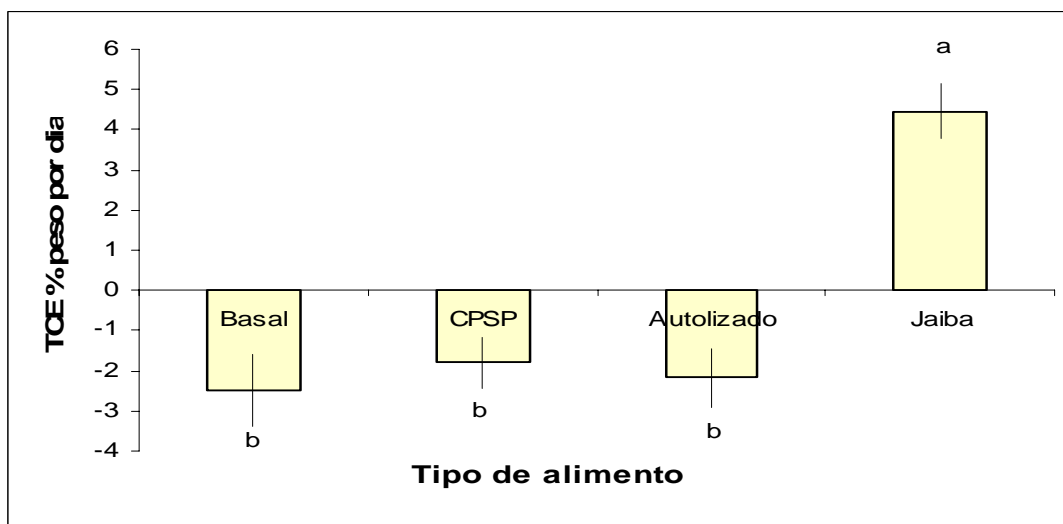
## Resultados

### EXPERIMENTO 1. Alimentos Balanceados

a. Crecimiento. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que tanto la dieta basal como la de CPSP y el Autolizado produjeron pérdida de peso en los organismos experimentales, misma que fue similar para los tres casos ( $P > 0.05$ , Gráfica 1). El crecimiento de los animales alimentados con carne de jaiba resultó ser 6.95, 6.26 y 6.63 veces mayor que el observado en el resto de los tratamientos ( $P < 0.05$ , Tabla 6).

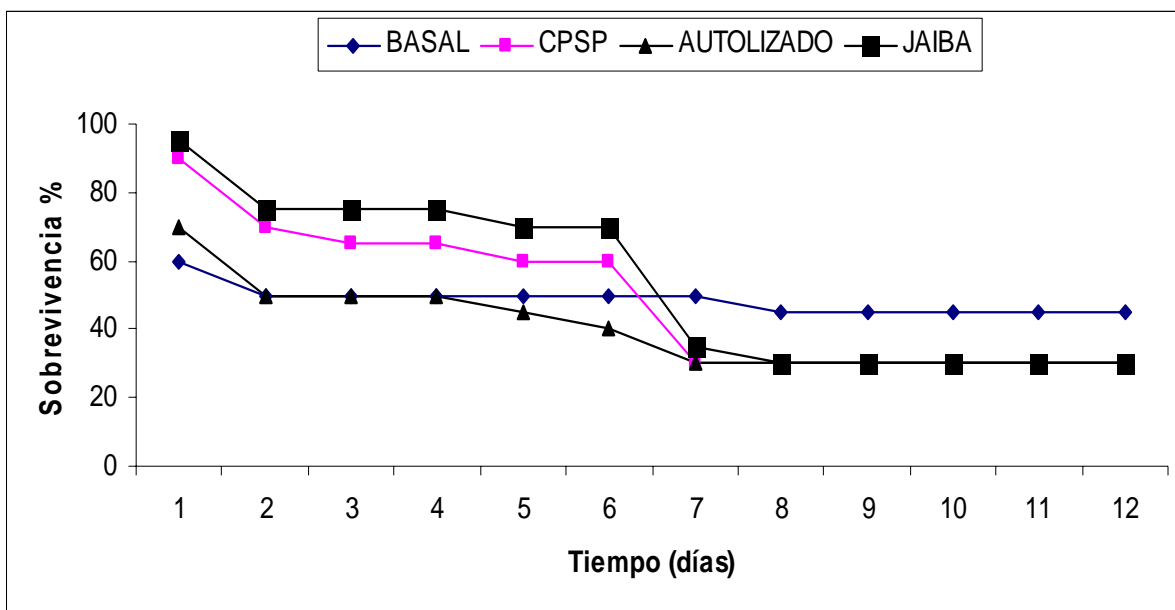
Tabla 6. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al efecto del tipo de alimento en el crecimiento de juveniles tempranos de *O. maya*. Experimento 1.

	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	305.40	3.00	101.80	21.42	<b>.000*</b>
<b>Tukey</b>					
	Basal	CPSP	Autilizado	Jaiba	
Basal		0.9984	0.9981	<b>0.0002</b>	
CPSP	0.9984		0.9810	<b>0.0002</b>	
Autolizado	0.9981	0.9810		<b>0.0002</b>	
Jaiba	<b>0.0002</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0002</b>		



Gráfica 1. Efecto del tipo de alimento sobre la tasa de crecimiento específico (TCE % por día) de juveniles tempranos de *O. maya*. Valores como promedio  $\pm$  E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos.

b. Supervivencia. Es interesante hacer notar que la supervivencia fue similar en todos los tratamientos con valores que oscilaron entre 30 y 45 % para todos los tratamientos (Gráfica 2).

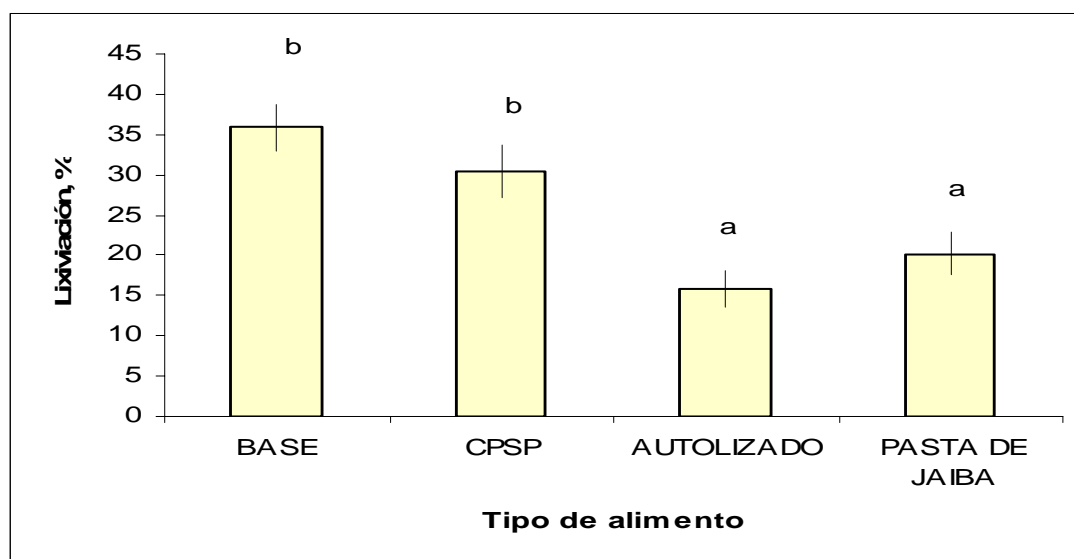


Gráfica 2. Supervivencia de juveniles tempranos de *O. maya* a lo largo de 12 días proporcionándoles diferentes tipos de alimento. Experimento 1.

c. Lixiviación. La lixiviación de la dieta con autolizado de pescado y la pasta de jaiba fue de 16 y 20%, respectivamente (Gráfica 3). Estos valores resultaron ser significativamente menores que los obtenidos de la dieta base sola y la dieta base con CPSP (35 y 30% respectivamente) ( $P < 0.05$ ; Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al grado de lixiviación de cada una de las dietas experimentales empleadas en la alimentación de juveniles de *O. maya*. Experimento 1.

	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	2246	3	748.6	10.64	<b>.000*</b>
<b>Tukey</b>					
	Base	CPSP	Autolizado	Jaiba	
Base		0.5196	<b>0.0003</b>	<b>0.0031</b>	
CPSP	0.5196		<b>0.0048</b>	<b>0.0792</b>	
Autolizado	<b>0.0003</b>	<b>0.0048</b>		0.7118	
Jaiba	<b>0.0031</b>	<b>0.0792</b>	0.7118		



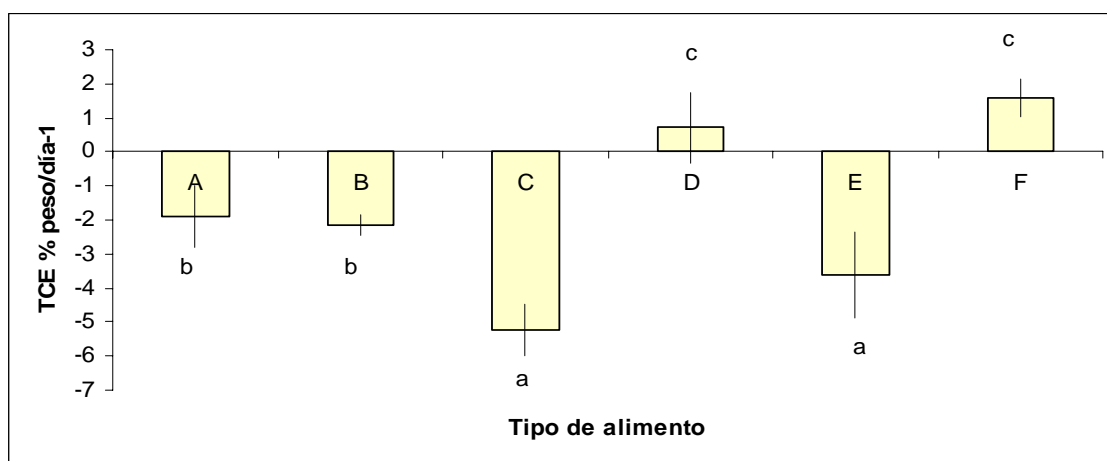
Gráfica 3. Porcentaje de lixiviación de los diferentes tipos de alimentos proporcionados a juveniles tempranos de *O.maya*. Experimento 1.

EXPERIMENTO 2. Fuentes de Proteína.

a. Crecimiento. La tasa de crecimiento específica mostró que los animales alimentados con pasta de tentáculo de calamar liofilizado y pasta de jaiba fresca promovieron crecimientos positivos (0.7 y 1.5 % por día, respectivamente) ( $P < 0.05$ ; Tabla 8). El resto de los tratamientos produjo pérdida de peso en los animales experimentales. Es interesante hacer notar que los pulpos alimentados con almeja liofilizada y harina de almeja mostraron las mayores pérdidas de peso con valores de -3.6 y -5.2% por día, respectivamente (Gráfica 4).

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al efecto de diferentes fuentes de proteína en el crecimiento de juveniles de *O. maya*. Experimento 2.

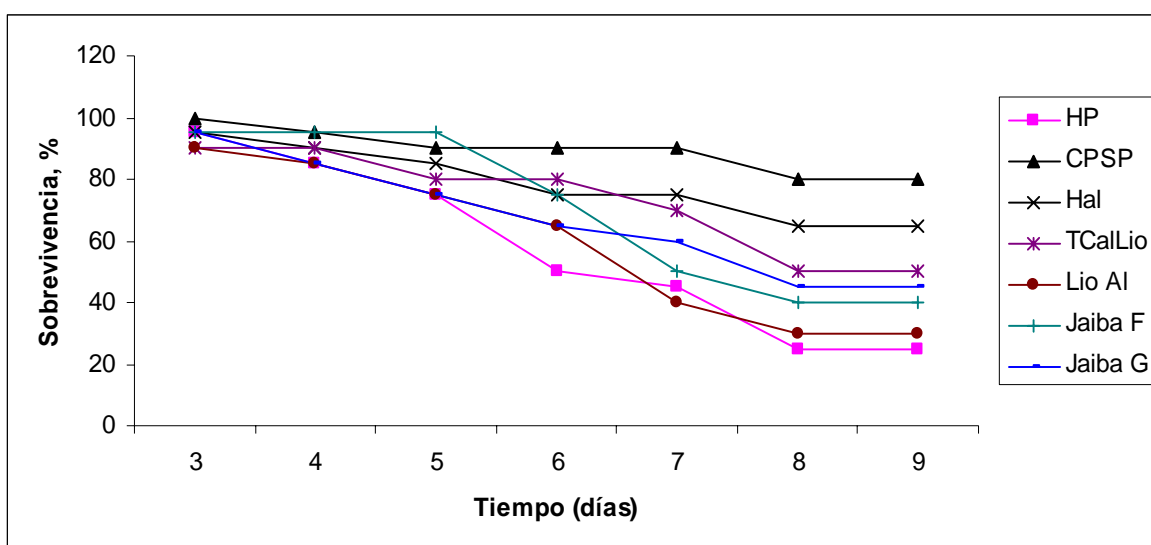
	SC	GL	MC	F	P	
<b>ANOVA</b>						
dieta	531.8	5	106.4	13.31	<b>.000*</b>	
<b>Tukey</b>						
	H. pescado	CPSCP	H. almeja	Tentáculo meja Liofilizada	Jaiba Fresca	
H. pescado		0.9999	<b>0.0651</b>	0.2758	0.7982	<b>0.0309</b>
CPSCP	0.9999		<b>0.0296</b>	<b>0.0604</b>	0.8230	<b>0.0012</b>
H. almeja	0.0651	<b>0.0296</b>		<b>0.0001</b>	0.7848	<b>0.0001</b>
Tentáculo	0.2758	0.0604	<b>0.0001</b>		<b>0.0108</b>	0.9433
meja Liofilizada	0.7982	0.8230	0.7848	<b>0.0108</b>		<b>0.0005</b>
Jaiba Fresca	<b>0.0309</b>	<b>0.0012</b>	<b>0.0001</b>	0.9433	<b>0.0005</b>	



Gráfica 4. Efecto de diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca) sobre la tasa de crecimiento específico (TCE % por día) de juveniles de *O. maya*. Valores como promedio  $\pm$  E.S.

Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 2.

b. Supervivencia. En este experimento el mayor porcentaje de supervivencia se observó en el CPSP con un 80%, mientras que el menor correspondió a la harina de pescado con tan solo el 25% de supervivencia seguida de la almeja liofilizada que obtuvo el 30%. El resto de las fuentes de proteína probadas quedaron entre 40 y 65% de supervivencia. Cabe resaltar que para el caso de la jaiba la supervivencia fue del 40% (Gráfica 5).



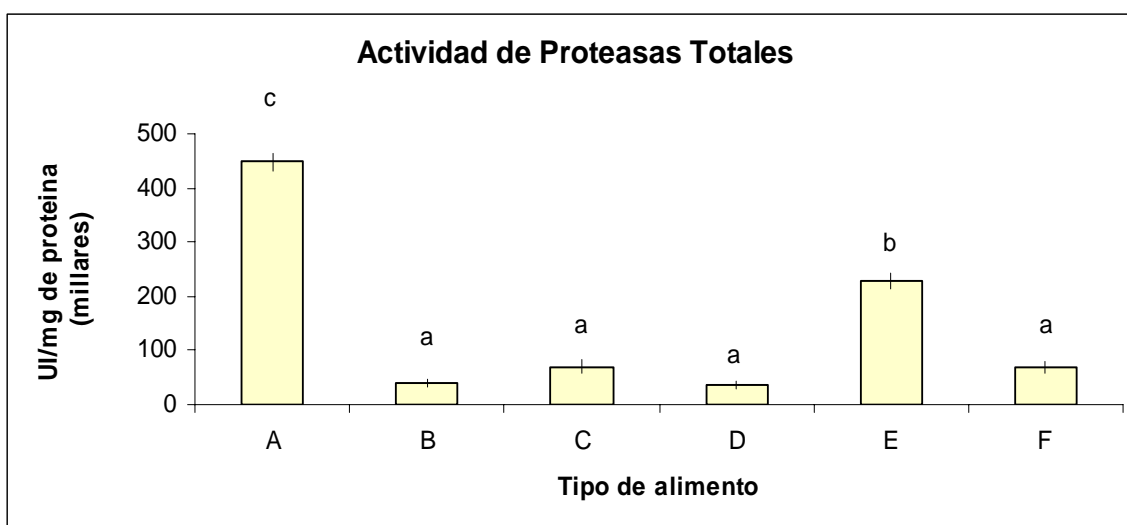
Gráfica 5. Porcentaje de supervivencia de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2.

c. Actividad enzimática. La actividad de las proteasas fue significativamente mayor para los pulpos tratados con harina de pescado ( $P < 0.05$ ; tabla 9), seguida de los correspondientes a la almeja liofilizada que también se observó significativamente menor que la primera pero mayor en comparación con las demás. El resto de las fuentes de proteína presentó valores bajos en la actividad de estas enzimas y no tuvieron diferencias significativas entre ellos ( $P < 0.05$ , Tabla 9) (Gráfica 6).



Tabla 9. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las proteasas, registrada al emplear diferentes fuentes de proteína para alimentar juveniles de *O. maya*. Experimento 2.

	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	4.30E+11	5	8.56E+10	112.1	<b>,000*</b>
<b>Tukey</b>					
	H. pescado	CPSCP	H. almeja	Tentáculo meja Liofilizada	Jaiba Fresca
H. pescado		<b>0.0002</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0002</b>
CPSCP	<b>0.0002</b>		0.7671	1.0000	<b>0.0002</b>
H. almeja	<b>0.0002</b>	0.7671		0.6872	<b>0.0002</b>
Tentáculo	<b>0.0002</b>	1.0000	0.6872		<b>0.0002</b>
meja Liofilizada	<b>0.0002</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0002</b>		<b>0.0002</b>
Jaiba Fresca	<b>0.0002</b>	0.5869	1	0.4842	<b>0.0002</b>

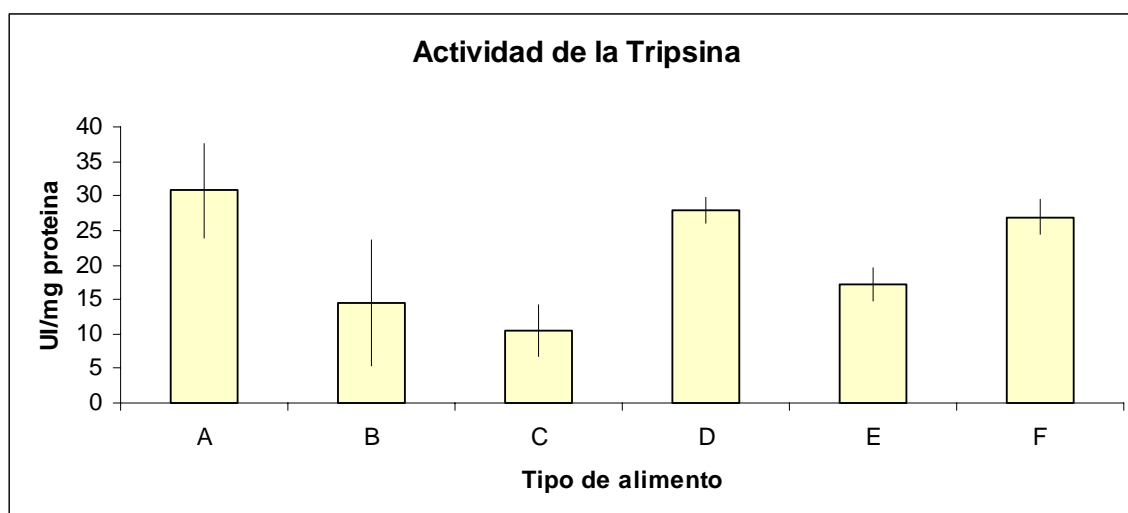


Gráfica 6. Actividad enzimática de las proteasas totales (UI/mg de proteína) de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca). Valores como promedio  $\pm$  E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 2.

En la tripsina se observó una actividad que varió de 10.55 a 30.81 UI/mg proteína, correspondiendo la mayor nuevamente a la harina de pescado y la menor a la harina de almeja (Gráfica 7). El CPSP y la almeja liofilizada tuvieron valores de 14.55 y 17 UI/mg de proteína respectivamente, mientras que para la jaiba el valor fue de 26.95 UI/mg proteína (Gráfica 7). Estos valores no resultaron ser estadísticamente distintos ( $P < 0.05$ ; Tabla 10).

Tabla 10. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la tripsina, registrada al emplear diferentes fuentes de proteína para alimentar juveniles de *O. maya*. Experimento 2.

	SC	GL	MC	F	P	
<b>ANOVA</b>						
dieta	1178	5	235.7	3.069	<b>.036*</b>	
<b>Tukey</b>						
	H. pescado	CPSCP	H. almeja	Tentáculo meja Liofilizada	Jaiba Fresca	
H. pescado		0.2555	0.0974	0.9984	0.4239	0.9842
CPSCP	0.2555		0.9925	0.4503	0.9992	0.3201
H. almeja	0.0974	0.9925		0.1979	0.9378	0.1018
Tentáculo	0.9984	0.4503	0.1979		0.6595	1
meja Liofilizada	0.4239	0.9992	0.9378	0.6595		0.5560
Jaiba Fresca	0.9842	0.3201	0.1018	1	0.5560	

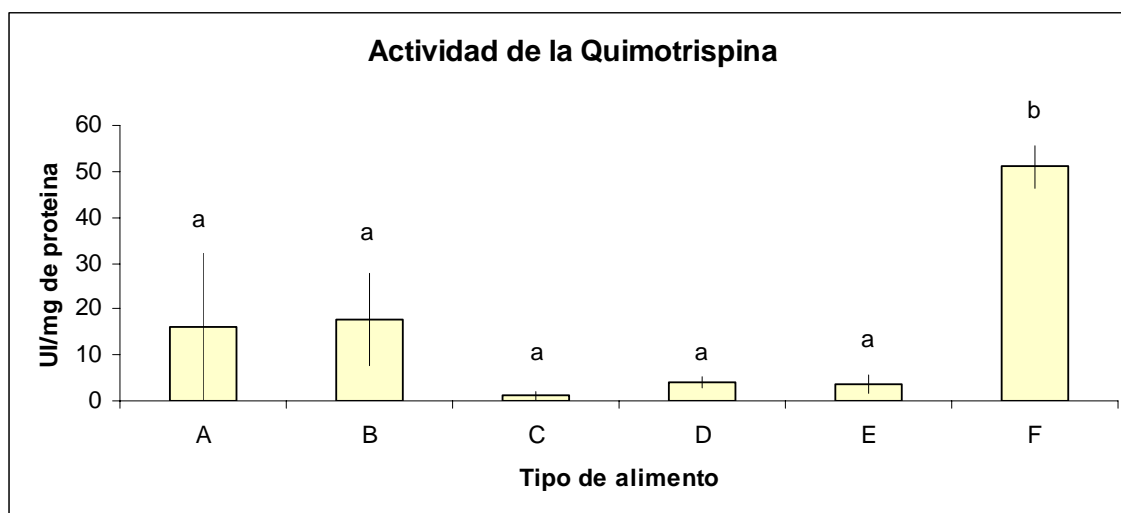


Gráfica 7. Actividad enzimática de la tripsina (UI/mg de proteína) en juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca). Valores como promedio  $\pm$  E.S. Experimento 2.

Para la quimotripsina se observó una gran actividad en los organismos alimentados con jaiba fresca, obteniendo un valor de 51.12 UI/mg de proteína que resultó ser significativamente mayor que en los demás grupos experimentales ( $P < 0.05$ ; Tabla 11). La actividad enzimática en las demás dietas se mantuvo baja, con valores de entre 3.66 y 16 que no resultaron ser significativamente diferentes entre ellos ( $P < 0.05$ ; Tabla 11) (Gráfica 8).

Tabla 11. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la quimotripsina, registrada al emplear diferentes fuentes de proteína para alimentar juveniles de *O. maya*. Experimento 2.

	SC	GL	MC	F	P	
<b>ANOVA</b>						
dieta	1.05E+04	5	2101	9.612	<b>.000*</b>	
<b>Tukey</b>						
	H. pescado	CPSCP	H. almeja	Tentáculo meja Liofilizada	Jaiba Fresca	
H. pescado		0.99999	0.8118	0.9447	0.9035	<b>0.0245</b>
CPSCP	0.99999		0.7394	0.9085	0.8488	<b>0.0343</b>
H. almeja	0.8118	0.7394		0.9999	0.9999	<b>0.0012</b>
Tentáculo	0.9447	0.9085	0.9999		1	<b>0.0087</b>
meja Liofilizada	0.9035	0.8488	0.9999	1		<b>0.0020</b>
Jaiba Fresca	<b>0.0245</b>	<b>0.0343</b>	<b>0.0012</b>	<b>0.0087</b>	<b>0.0020</b>	

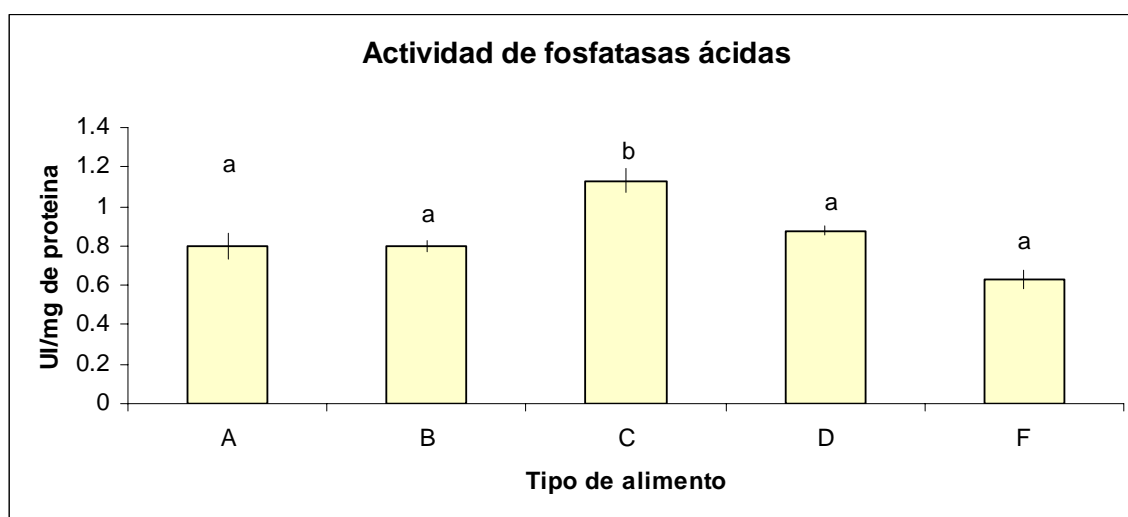


Gráfica 8. Actividad enzimática de la quimotripsina (UI/mg de proteína) en juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca). Valores como promedio  $\pm$  E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 2.

En las fosfatasas ácidas se observó una actividad con valores que no difieren tanto de una dieta a otra como en el caso de las otras enzimas digestivas, pero que presentó diferencias significativas entre la harina de almeja y el resto de los tratamientos ( $P < 0.05$ ; Tabla 12) (Gráfica 9).

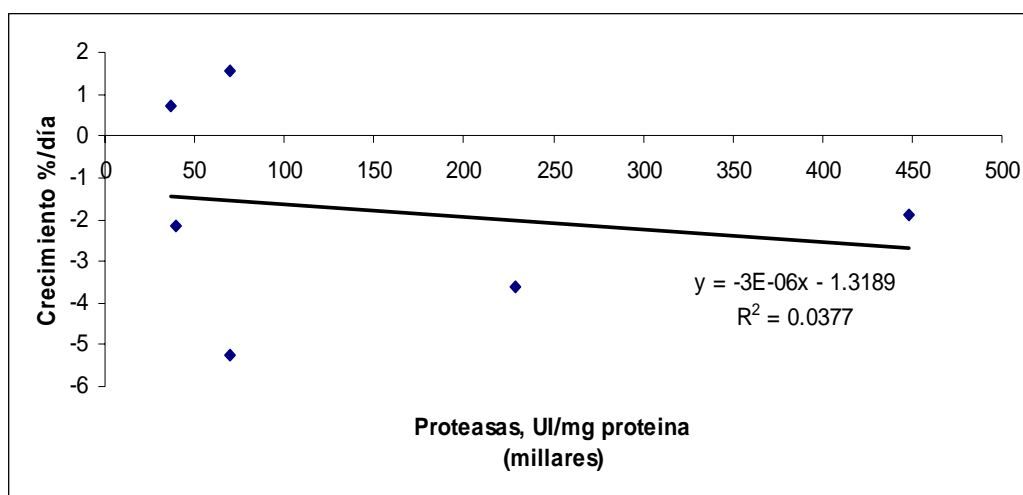
Tabla 12. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las fosfatasas ácidas, registrada al emplear diferentes fuentes de proteína para alimentar juveniles de *O. maya*. Experimento 2.

	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	0.402	4	0.101	11.64	<b>.001*</b>
<b>Tukey</b>					
	H. pescado	CPSCP	H. almeja	Tentáculo	Jaiba Fresca
H. pescado		1	<b>0.0371</b>	0.9046	0.2509
CPSCP	1		<b>0.0382</b>	0.9111	0.2432
H. almeja	<b>0.0371</b>	<b>0.0382</b>		0.1296	<b>0.0008</b>
Tentáculo	0.9046	0.9111	0.1296		0.0561
Jaiba Fresca	0.2509	0.2432	<b>0.0008</b>	0.0561	

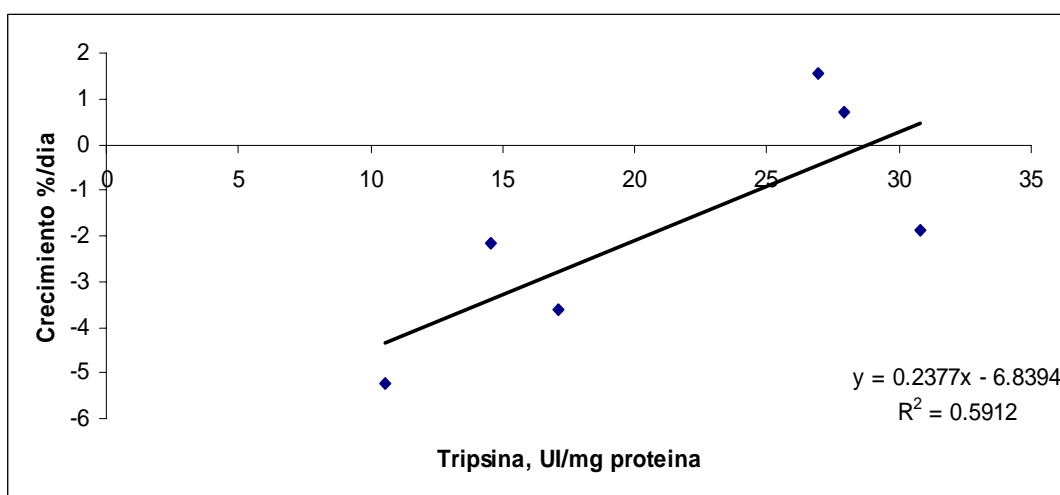


Gráfica 9. Actividad enzimática de las fosfatasas ácidas (UI/mg de proteína) de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca). Valores como promedio  $\pm$  E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 2.

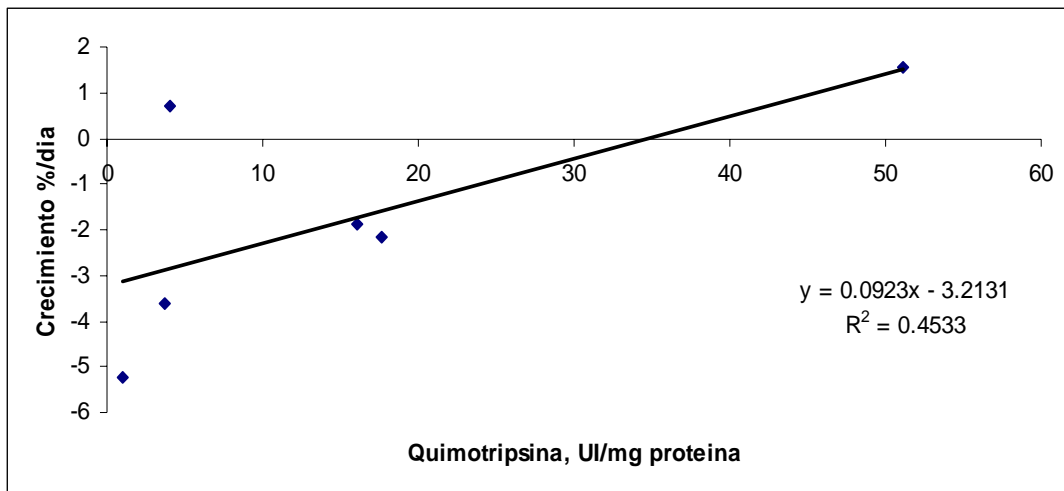
Es interesante notar que para la tripsina, la quimotripsina y las fosfatasa s ácidas, los resultados obtenidos en este experimento permiten ver una relación lineal entre la actividad enzimática y el porcentaje de crecimiento por día de los animales experimentales (Gráficas 11, 12, 13), no así en el caso de las proteasas (Gráfica 10). Para tripsina y quimotripsina se observó que a mayor actividad enzimática mayor fue el crecimiento (Gráficas 11 y 12). Para las fosfatasa s ácidas esta relación fue inversa, a mayor actividad menor crecimiento (Gráfica 13).



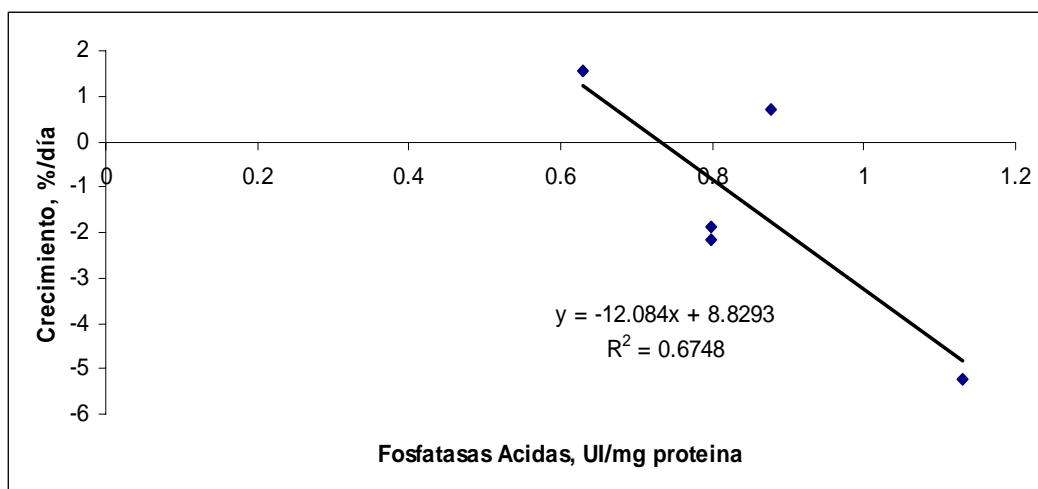
Gráfica 10. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las proteasas de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2.



Gráfica 11. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de la tripsina en juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2.



Gráfica 12. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de la quimotripsina en juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2.



Gráfica 13. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las fosfatasas ácidas de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2.

d. Glucógeno. No se encontraron diferencias debidas a la dieta. Así un valor promedio de  $1.59 \pm 0.12$  pudo ser calculado (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la concentración de glucógeno en músculo de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2.

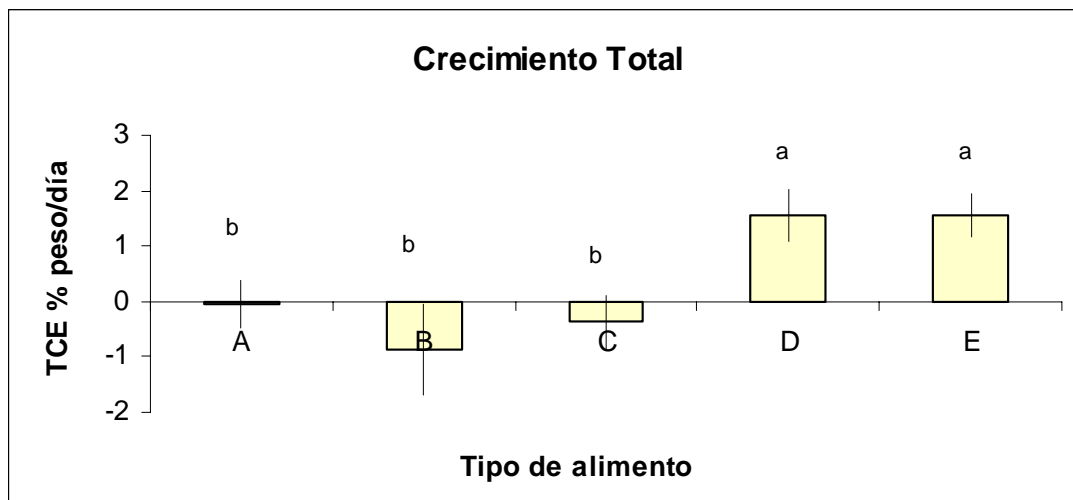
	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	2.19	5	0.438	0.736	0.602
<b>Parámetros Estadísticos</b>					
Promedio	1.5979				
Desv. Est.	0.7582				
n	39				
ES	0.1214				
CV	7.5977				

### EXPERIMENTO 3. Mezclas.

a. Crecimiento. En este experimento se observó el mayor crecimiento en los organismos alimentados con jaiba, ya fuese fresca o liofilizada, y el menor para los correspondientes a la combinación de tentáculos de calamar con Jaiba liofilizada (Gráfica 14). El primero resultó ser 1.54 veces mayor que el segundo. Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ; Tabla 14) entre el crecimiento obtenido con jaiba (liofilizada o fresca) y el resto de los tratamientos, en los que además se observó pérdida de peso (Gráfica 14).

Tabla 14. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al efecto de la mezcla de diferentes fuentes de proteína en el crecimiento de juveniles de *O. maya* alimentados con las mismas. Experimento 3.

	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	52.46	4	13.11	4.18	<b>,005*</b>
<b>Tukey</b>					
	CPSP-Tent	Tent-Jaiba	CPSP-Jaiba	Jaiba Liof	Jaiba Fresca
CPSP-Tent		0.8183	0.9899	0.2354	0.2271
Tent-Jaiba	0.8183		0.9662	<b>0.0294</b>	<b>0.0280</b>
CPSP-Jaiba	0.9899	0.9662		0.0885	0.0846
Jaiba Liof	0.2354	<b>0.0294</b>	0.0885		1
Jaiba Fresca	0.2271	<b>0.0280</b>	0.0846	1	

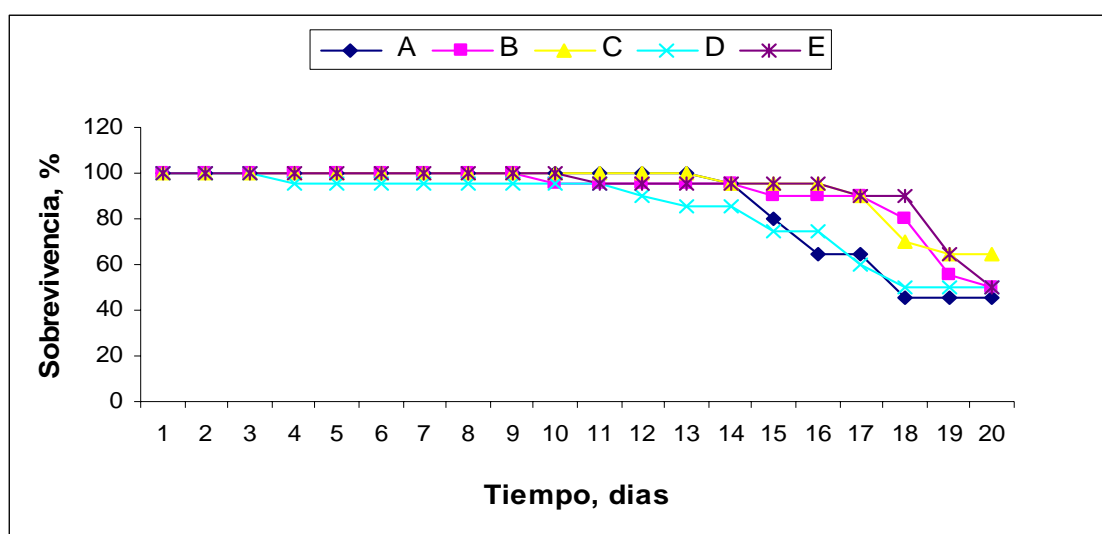


Gráfica 14. Efecto de la mezcla de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca) sobre la tasa de crecimiento específico (TCE % por día) de juveniles de *O. maya*. Valores como promedio  $\pm$  E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos.

Experimento 3.



b. Supervivencia. La supervivencia varió entre 45 y 65%, siendo el mayor porcentaje para la mezcla de CPSP con Jaiba liofilizada y el menor para la correspondiente a CPSP con tentáculos de calamar liofilizados. Todas las demás dietas quedaron con el 50% de los animales experimentales iniciales (Gráfica 15).

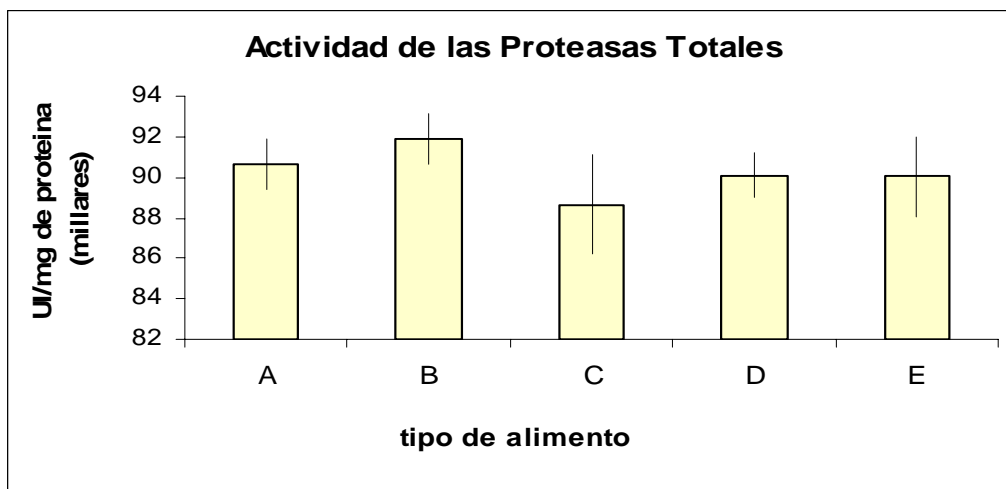


Gráfica 15. Porcentaje de supervivencia de juveniles de *O. maya* alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca). Experimento 3.

c. Actividad enzimática. Las proteasas totales presentaron una actividad elevada que no difirió mucho de una dieta a otra, siendo la más alta para la dieta B (tentáculos de calamar liofilizados + jaiba liofilizada) y la menor para la dieta C (CPSP + jaiba liofilizada). Sin embargo las diferencias no fueron significativas ( $P > 0.05$ ; Tabla 15) (Gráfica 16).

Tabla 15. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las proteasas al emplear mezclas de diferentes fuentes de proteína en la alimentación de juveniles de *O. maya*. Experimento 3.

	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	2.43E+07	4	6.07E+06	0.188	0.943
<b>Tukey</b>					
	CPSP-Tent	Tent-Jaiba	CPSP-Jaiba	Jaiba Liof	Jaiba Fresca
CPSP-Tent		0.9970	0.9665	0.9998	0.9993
Tent-Jaiba	0.9970		0.9285	0.9896	0.9853
CPSP-Jaiba	0.9665	0.9285		0.9888	0.9872
Jaiba Liof	0.9998	0.9896	0.9888		1
Jaiba Fresca	0.9993	0.9853	0.9872	1	

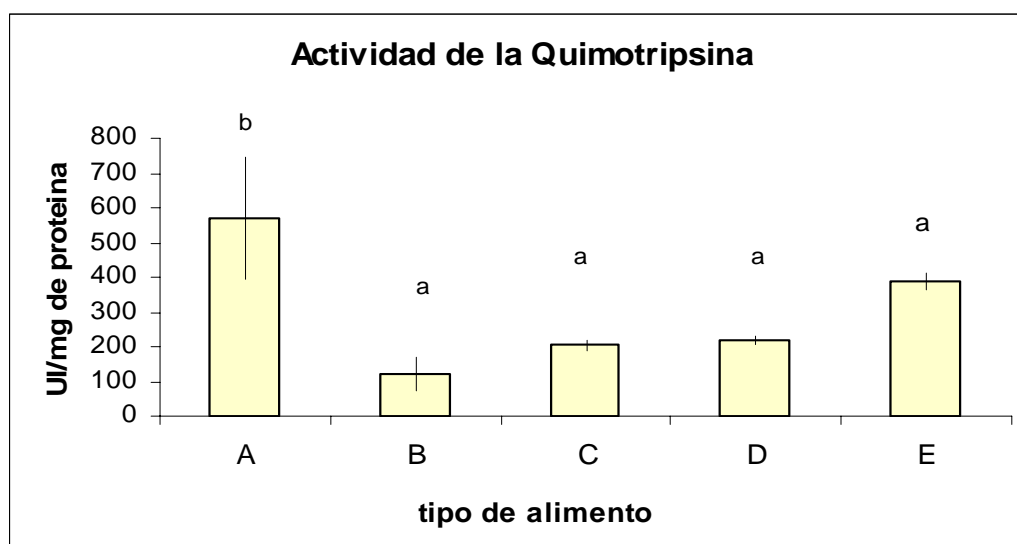


Gráfica 16. Actividad enzimática de las proteasas totales (UI/mg de proteína) de juveniles de *O. maya* alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca). Valores como promedio  $\pm$  E.S. Experimento 3.

Una mayor actividad de la quimotripsina se observó en la combinación de CPSP + tentáculos de calamar liofilizados (dieta A). Esta actividad fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ; Tabla 16) que el resto con un valor de 571.1 UI/mg de proteína (447.82, 367.21, 354.04 y 181.03 veces mayor que el obtenido para las dietas B, C, D y E respectivamente; Gráfica 17).

Tabla 16. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la quimotripsina al emplear mezclas de diferentes fuentes de proteína en la alimentación de juveniles de *O. maya*. Experimento 3.

	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	9.05E+05	4	2.26E+05	3.537	<b>.015*</b>
<b>Tukey</b>					
	CPSP-Tent	Tent-Jaiba	CPSP-Jaiba	Jaiba Liof	Jaiba Fresca
CPSP-Tent		0.0807	0.0648	<b>0.0393</b>	0.4478
Tent-Jaiba	0.0807		0.9912	0.9805	0.4655
CPSP-Jaiba	0.0648	0.9912		0.99998	0.5539
Jaiba Liof	<b>0.0393</b>	0.9805	0.99998		0.4930
Jaiba Fresca	0.4478	0.4655	0.5539	0.4930	

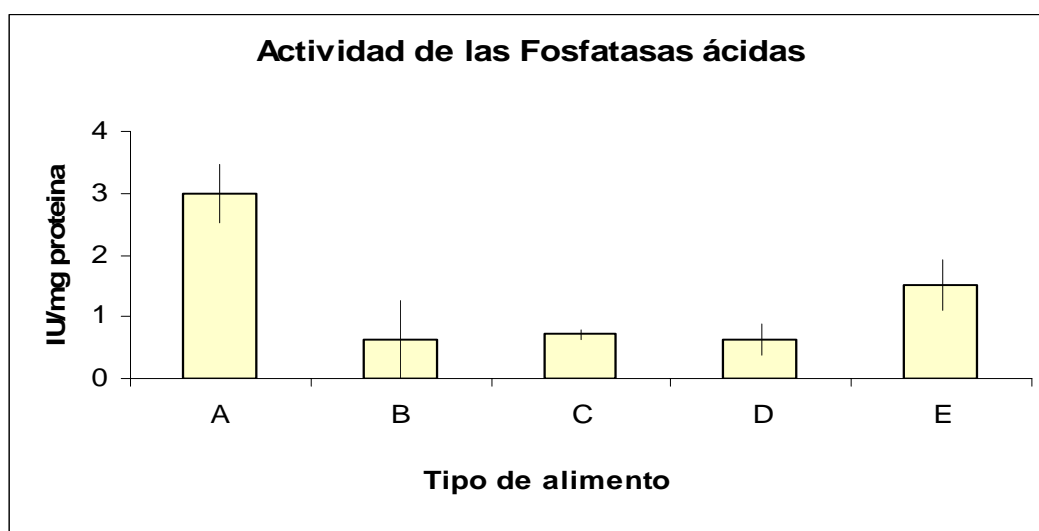


Gráfica 17. Actividad enzimática de la quimotripsina (UI/mg de proteína) en juveniles de *O. maya* alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca). Valores como promedio  $\pm$  E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 3.

En las fosfatasas ácidas se observó un comportamiento similar al obtenido con la quimotripsina. La mayor actividad se registró para la mezcla de CPSP y tentáculos de calamar liofilizados con 3 UI/mg de proteína, seguida de la jaiba fresca con 1.52 UI/mg de proteína. Las tres dietas restantes presentaron el mismo valor de actividad enzimática que fue de 0.63 UI/mg de proteína (Gráfica 18). Sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ; Tabla 17).

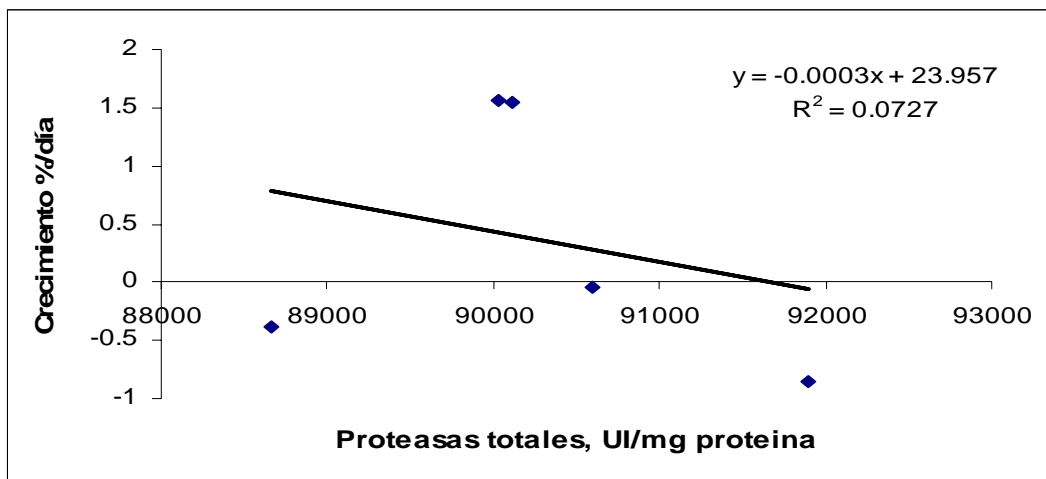
Tabla 17. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las fosfatasas ácidas al emplear mezclas de diferentes fuentes de proteína en la alimentación de juveniles de *O. maya*. Experimento 3.

	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	9.10E+00	4	2.28E+00	2.445	0.103
<b>Tukey</b>					
	CPSP-Tent	Tent-Jaiba	CPSP-Jaiba	Jaiba Liof	Jaiba Fresca
CPSP-Tent		0.1651	0.1872	0.1137	0.3470
Tent-Jaiba	0.1651		1	1	0.7694
CPSP-Jaiba	0.1872	1		0.99998	0.8216
Jaiba Liof	0.1137	1	0.99998		0.6608
Jaiba Fresca	0.3470	0.7694	0.8216	0.6608	

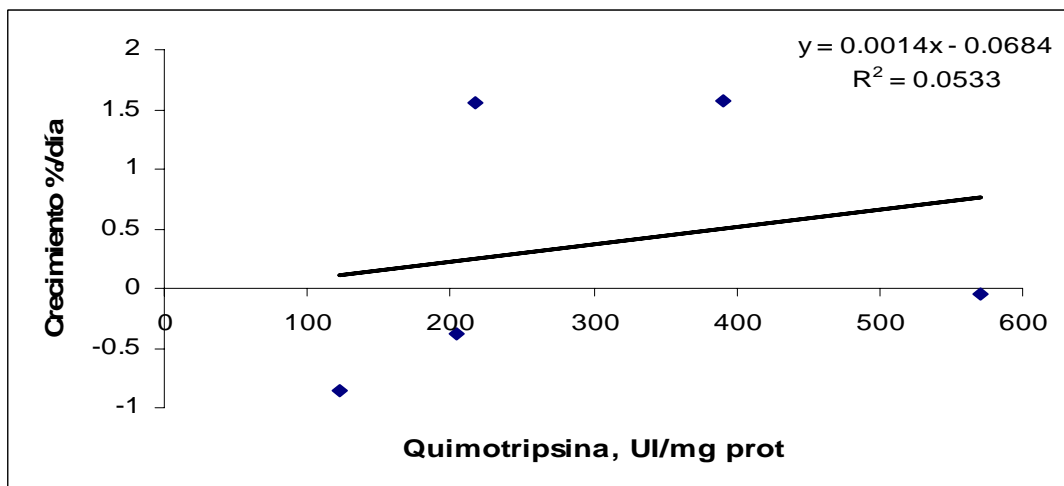


Gráfica 18. Actividad enzimática de las fosfatasas ácidas (UI/mg de proteína) de juveniles de *O. maya* alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca). Valores como promedio  $\pm$  E.S. Experimento 3.

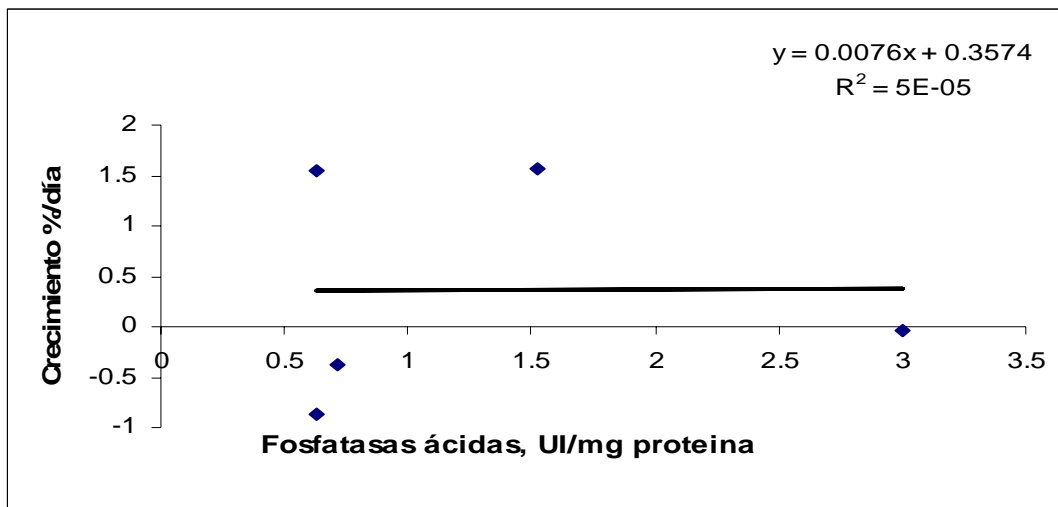
Es interesante notar que en este experimento, no se encontró una relación entre la Tasa de Crecimiento Específico % por día y la actividad enzimática. No obstante, para las proteasas totales y la quimotripsina, sí se observan dos puntos máximos de crecimiento en determinado intervalo de actividad enzimática, fuera del cual no se registra crecimiento o se observa pérdida de peso (Gráficas 19, 20 y 21).



Gráfica 19. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las proteasas totales de juveniles de *O. maya* alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína. Experimento 3.



Gráfica 20. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de la quimotripsina en juveniles de *O. maya* alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína. Experimento 3.



Gráfica 21. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las fosfatasa ácidas de juveniles de *O. maya* alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína. Experimento 3.

d. Glucógeno. No se encontraron diferencias asociadas a la dieta. Así un valor promedio de  $4.29 \pm 0.23$  pueden ser calculado (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la concentración de glucógeno en músculo de juveniles de *O. maya* alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína. Experimento 3.

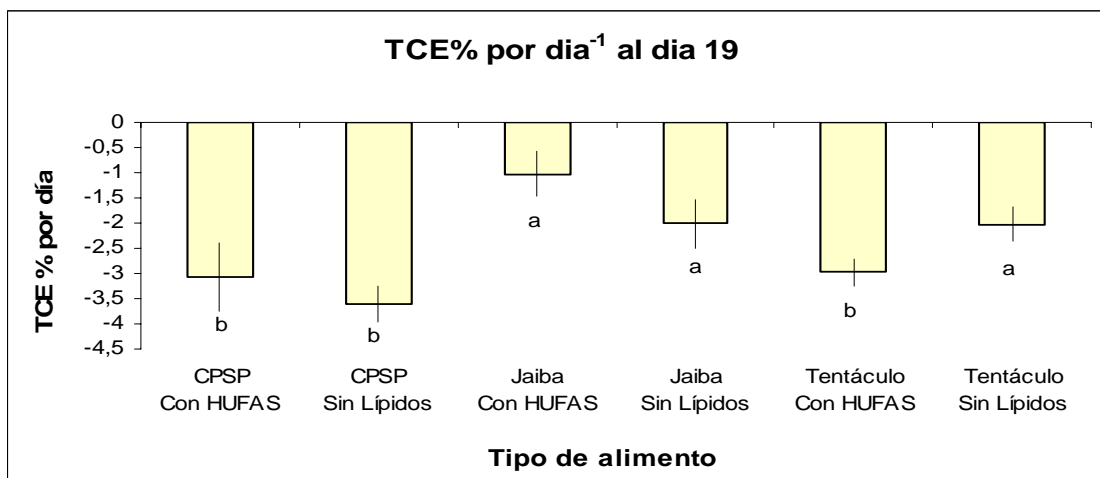
	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	8.58	4	2.145	1.007	0.417
<b>Parámetros Estadísticos</b>					
Promedio	4.2987				
Desv. Est.	1.4603				
n	40				
ES	0.2309				
CV	5.3714				

EXPERIMENTO 4. Ácidos grasos.

a. Crecimiento. En este experimento se observó pérdida de peso en todas las fuentes de proteína probadas, ya fuese con HUFAS o desengrasadas. Las mayores pérdidas se registraron para el CPSP con y sin lípidos, que resultaron ser significativamente diferentes de los demás pero no entre ellas ( $P < 0.05$ ; Tabla 19). El resto de los tratamientos, aunque también mostraron valores negativos, no presentaron diferencias significativas entre sí (Gráfica 22).

Tabla 19. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al efecto de diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas en el crecimiento de juveniles de *O. maya* alimentados con las mismas. Experimento 4.

	SC	GL	MC	F	P		
<b>ANOVA</b>							
dieta	35.58	5	7.115	4.323	<b>.003*</b>		
<b>Tukey</b>							
	S/L Tentáculo	S/L Jaiba	C/H Tentaculo	C/H Jaiba	S/L CPSP	C/H CPSP	
S/L Tentáculo		1	0.7506	0.6756	0.2523	0.6620	
S/L Jaiba	1		0.6668	0.6172	0.1756	0.5658	
C/H Tentáculo	0.7506	0.6668		<b>0.0366</b>	0.9258	1	
C/H Jaiba	0.6756	0.6172	<b>0.0366</b>		<b>0.0035</b>	<b>0.0242</b>	
S/L CPSP	0.2523	<b>0.1756</b>	0.9258	<b>0.0035</b>		0.9637	
C/H CPSP	0.6620	0.5658	1	<b>0.0242</b>	0.9637		

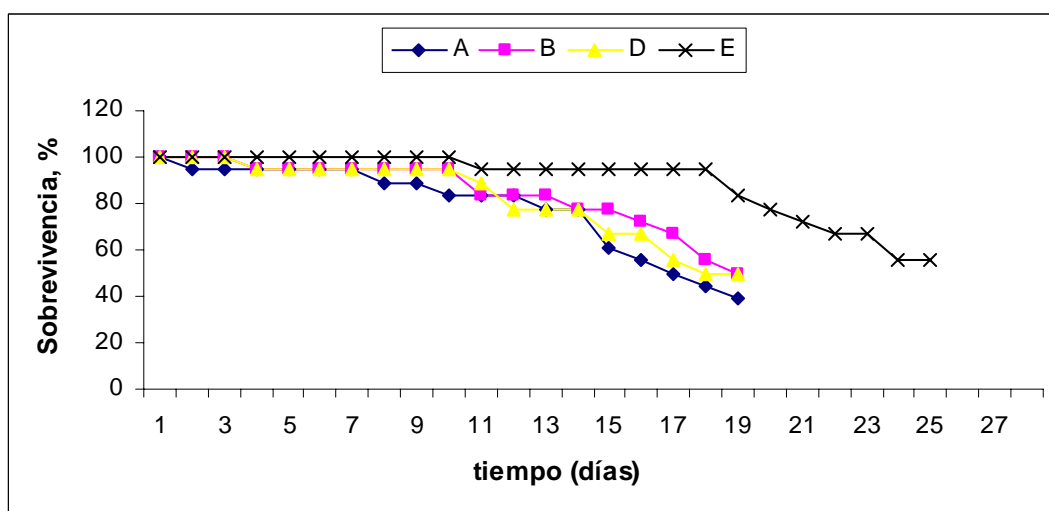


Gráfica 22. Efecto diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas sobre la tasa de crecimiento específico (TCE % por día) de juveniles de *O. maya* alimentados con las mismas.

Valores como promedio  $\pm$  E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos.

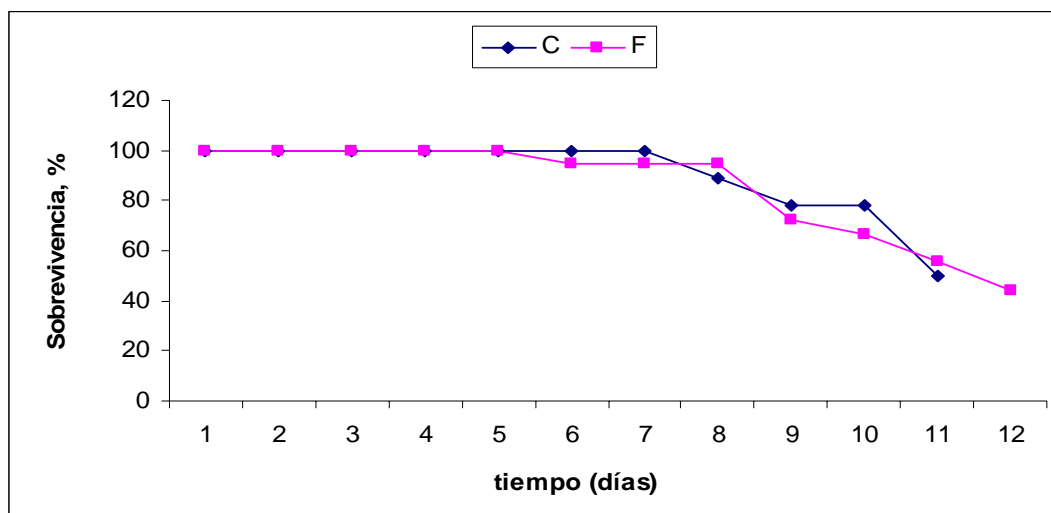
Experimento 4.

b. Supervivencia. Los valores de supervivencia fueron de 39 a 55%. La más alta mortalidad se registró en los animales tratados con Tentáculos de calamar desengrasados seguidos del CPSP con grasa. La más alta supervivencia correspondió a la jaiba liofilizada sin desengrasar (Gráfica 23, a y b).



a)





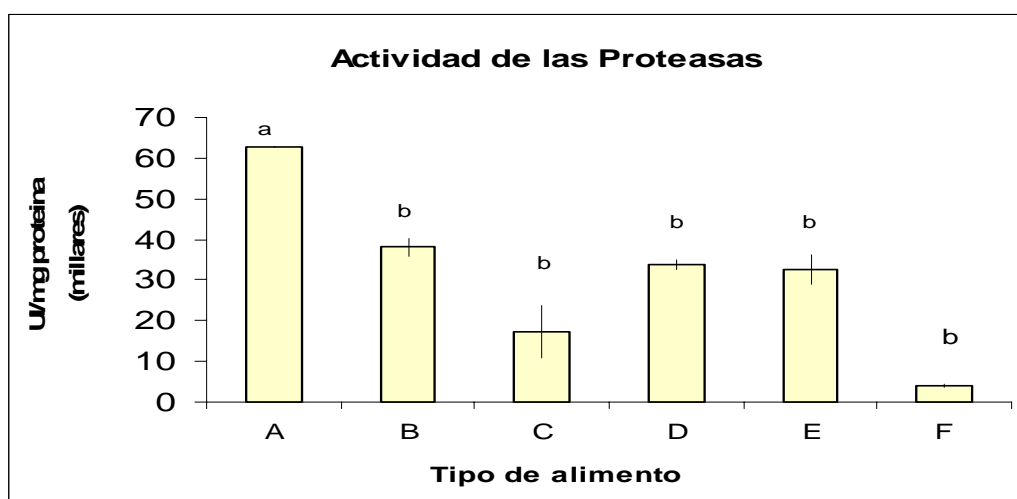
b)

Gráfica 23. Porcentaje de supervivencia de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína a las que se les extrajeron las grasas y en algunos casos se les readicionaron HUFAS (A=Tentáculo sin grasas, B=Jaiba sin grasas, C=CPSP sin grasas, D=Tentáculo de calamar con HUFAS, E=Jaiba con HUFAS, F=CPSP con HUFAS). Experimento 4.

c. Actividad enzimática. La mayor actividad de las Proteasas se registró para el tentáculo de calamar desengrasado y la menor para el CPSP con HUFAS. Solamente se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ; Tabla 20) entre el tentáculo de calamar liofilizado y el resto de los tratamientos (Gráfica 24).

Tabla 20. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las proteasas al usar diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas en la alimentación de juveniles de *O. maya*. Experimento 4.

	SC	GL	MC	F	P	
<b>ANOVA</b>						
dieta	5.15E+09	5	1.03E+09	28.64	<b>.000*</b>	
<b>Tukey</b>						
	S/L Tentáculo	S/L Jaiba	C/H Tentaculo	C/H Jaiba	S/L CPSP	C/H CPSP
S/L Tentáculo		<b>0.0050</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0036</b>	<b>0.0012</b>	<b>0.0002</b>
S/L Jaiba	<b>0.0050</b>		<b>0.0164</b>	0.9671	0.8646	<b>0.0011</b>
C/H Tentáculo	<b>0.0002</b>	<b>0.0164</b>		0.1021	0.0882	0.2245
C/H Jaiba	<b>0.0036</b>	0.9671	0.1021		0.9999	<b>0.0054</b>
S/L CPSP	<b>0.0012</b>	0.8646	0.0882	0.9999		<b>0.0039</b>
C/H CPSP	<b>0.0002</b>	<b>0.0011</b>	0.2245	0.0054	<b>0.0039</b>	

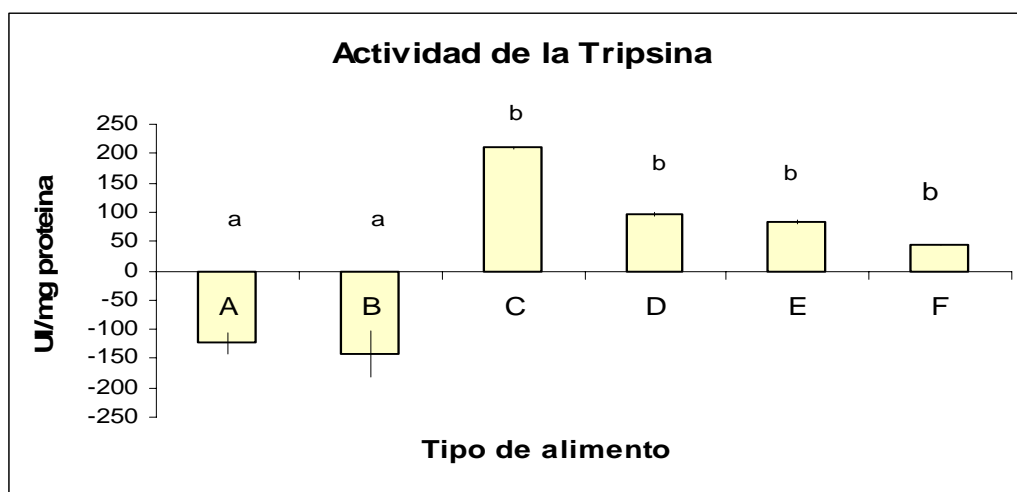


Gráfica 24. Actividad enzimática de las proteasas totales (UI/mg de proteína) de juveniles culticados de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína a las que se les extrajeron las grasas y en algunos casos se les readicionaron HUFAS (A=Tentáculo sin grasas, B=Jaiba sin grasas, C=CPSP sin grasas, D=Tentáculo de calamar con HUFAS, E=Jaiba con HUFAS, F=CPSP con HUFAS). Valores como promedio  $\pm$  E.S. Distintas letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 4.

En la tripsina no hubo actividad para dos de los tratamientos que fueron el tentáculo de calamar y la jaiba sin lípidos. De los restantes, fue el CPSP tanto sin lípidos como con HUFAS el que mostró la mayor y la menor actividad respectivamente, sin mostrar diferencias significativas ( $P>0.05$ ; tabla 20) con el resto de los tratamientos (Gráfica 25).

Tabla 21. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la tripsina al usar diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas en la alimentación de juveniles de *O. maya*. Experimento 4.

	SC	GL	MC	F	P	
<b>ANOVA</b>						
dieta	2.07E+05	5	4.14E+04	38.09	<b>.000*</b>	
<b>Tukey</b>						
	S/L Tentáculo	S/L Jaiba	C/H Tentaculo	C/H Jaiba	S/L CPSP	C/H CPSP
S/L Tentáculo		0.98	<b>0.0004</b>	<b>0.0028</b>	<b>0.0037</b>	<b>0.0321</b>
S/L Jaiba	0.98		<b>0.0005</b>	<b>0.0028</b>	<b>0.0037</b>	<b>0.0252</b>
C/H Tentáculo	<b>0.0004</b>	<b>0.0005</b>		0.0880	0.0584	<b>0.0442</b>
C/H Jaiba	<b>0.0028</b>	<b>0.0028</b>	0.0880		0.9985	0.7890
S/L CPSP	<b>0.0037</b>	<b>0.0037</b>	0.0584	0.9985		0.9129
C/H CPSP	<b>0.0321</b>	<b>0.0252</b>	<b>0.0442</b>	0.7890	0.9129	

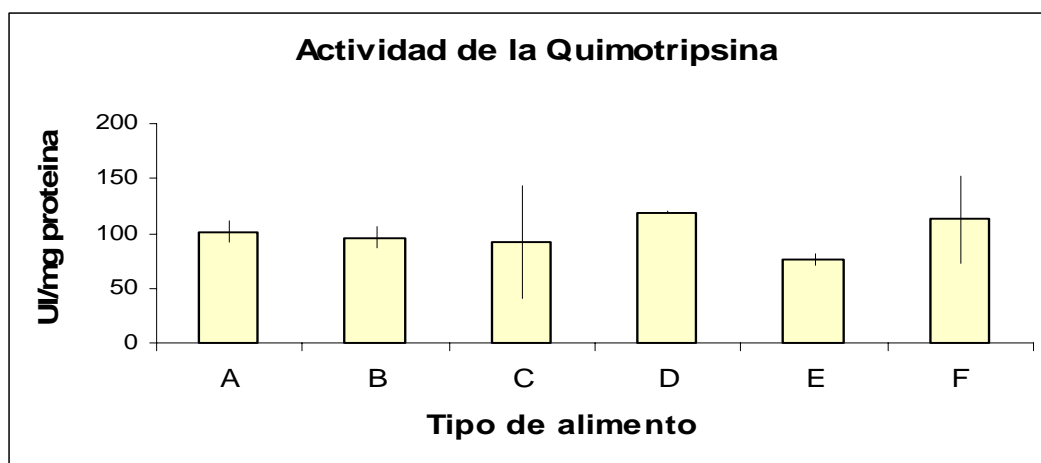


Gráfica 25. Actividad enzimática de la tripsina (UI/mg de proteína) de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína a las que se les extrajeron las grasas y en algunos casos se les readicionaron HUFAS (A=Tentáculo sin grasas, B=Jaiba sin grasas, C=CPSP sin grasas, D=Tentáculo de calamar con HUFAS, E=Jaiba con HUFAS, F=CPSP con HUFAS). Valores como promedio + E.S. Distintas letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 4.

Con la quimotripsina se observó una actividad uniforme entre tratamientos, presentando valores de 75.58 hasta 119.36 UI/mg de proteína, correspondiendo el primer valor a la jaiba con HUFAS y el segundo al CPSP con HUFAS (Gráfico 26). Dichos valores no fueron diferentes entre sí ( $P > 0.05$ ; Tabla 22).

Tabla 22. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la quimotripsina al usar diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas en la alimentación de juveniles de *O. maya*. Experimento 4.

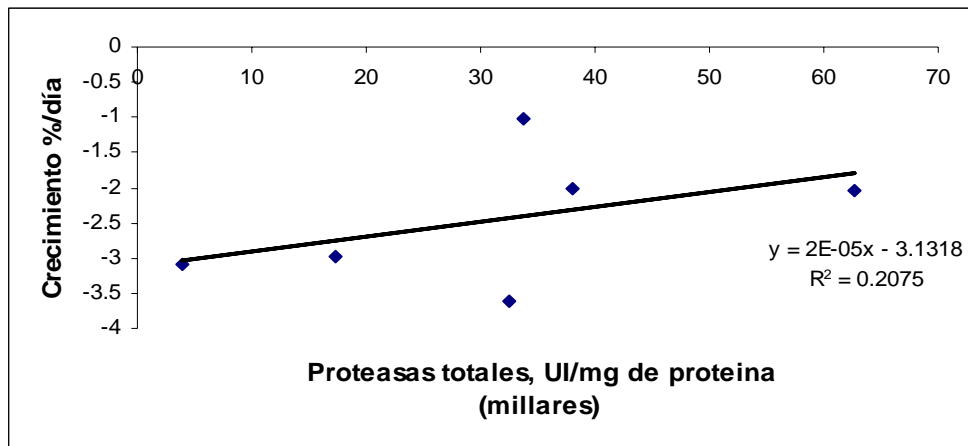
	SC	GL	MC	F	P	
<b>ANOVA</b>						
dieta	5.55E+03	5	1.11E+03	0.653	0.668	
<b>Tukey</b>						
	S/LTentáculo	S/L Jaiba	C/H Tentaculo	C/H Jaiba	S/L CPSP	C/H CPSP
S/L Tentáculo		0.99998	0.9999	0.9959	0.9783	0.8696
S/L Jaiba	0.99998		1	0.9871	0.9918	0.8103
C/H Tentáculo	0.9999		1	0.9831	0.9979	0.8177
C/H Jaiba	0.9959	0.9871	0.9831		0.8835	0.9906
S/L CPSP	0.9783	0.9918	0.9979	0.8835		0.6036
C/H CPSP	0.8696	0.8103	0.8177	0.9906	0.6036	



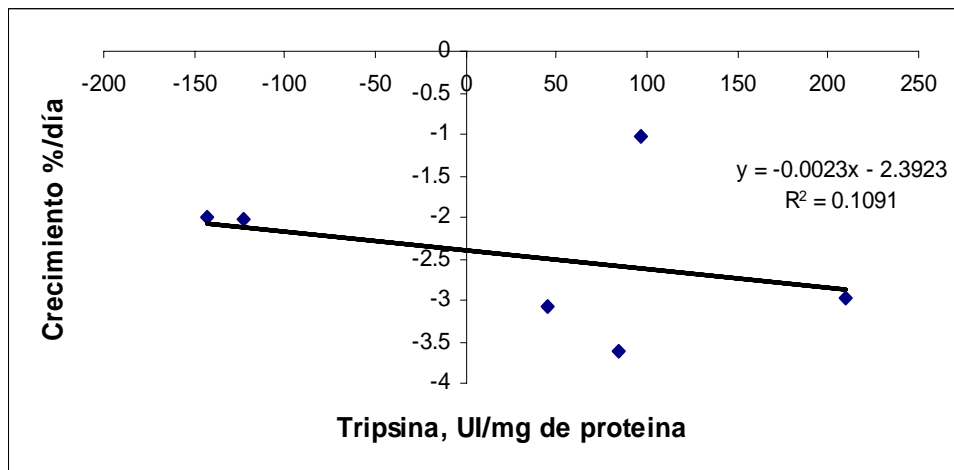
Gráfica 26. Actividad enzimática de la quimotripsina (UI/mg de proteína) de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína a las que se les extrajeron las grasas y en algunos casos se les readicionaron HUFAS (A=Tentáculo sin grasas, B=Jaiba sin grasas, C=CPSP sin grasas, D=Tentáculo de calamar con HUFAS, E=Jaiba con HUFAS, F=CPSP con HUFAS). Valores como promedio  $\pm$  E.S. Distintas letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 4.

Cabe mencionar que, observando comparativamente la actividad de cada enzima por tratamiento, no se encontró ningún patrón en el comportamiento de la actividad enzimática con respecto a las dietas más o menos eficientes.

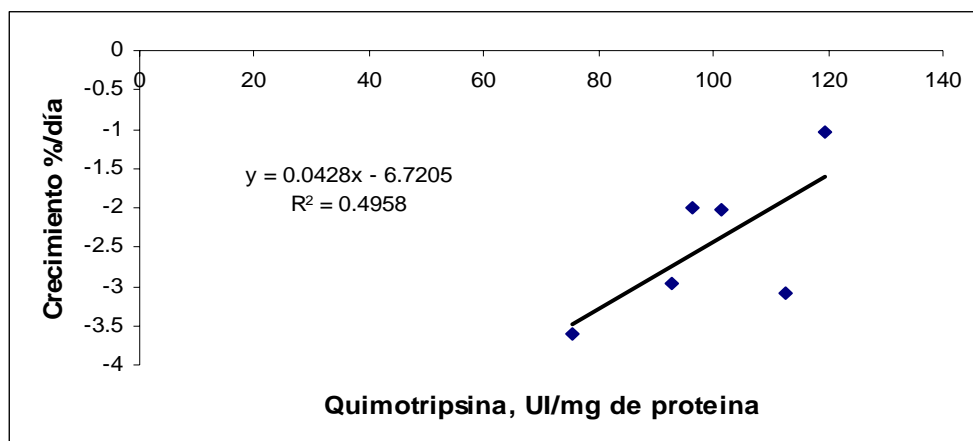
En cuanto a la relación entre el porcentaje de crecimiento por día y la actividad enzimática los resultados obtenidos no muestran una correlación evidente (Gráficas 27, 28 y 29).



Gráfica 27. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las proteasas totales de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas. Experimento 4.



Gráfica 28. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de la tripsina en juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas. Experimento 4.



Gráfica 29. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/mg de proteína) de la quimotripsina en juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas. Experimento 4.

d. Glucógeno. No se registraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ; Tabla 23) asociadas a la dieta. Así un valor promedio de  $1.30 \pm 0.03$  pudo ser calculado.

Tabla 23. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la concentración de glucógeno en músculo registrado en juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas. Experimento 4.

	SC	GL	MC	F	P
<b>ANOVA</b>					
dieta	0.318	5	0.064	1.126	0.363
<b>Parámetros Estadísticos</b>					
Promedio	1.3045				
Desv. Est.	0.2393				
n	46				
ES	0.0353				
CV	2.7044				

## Discusión

### Crecimiento y sobrevivencia.

#### Fuentes de proteína para la elaboración de piensos.

Es bien conocido que una de las mayores dificultades para la acuicultura de pulpos es justamente la alimentación de los organismos. A pesar de los intentos realizados, hasta el momento, no ha sido posible elaborar una dieta que satisfaga del todo los requerimientos nutricionales de estos organismos.

En este trabajo, en un esfuerzo por encontrar la formulación correcta que permita tener tasas de crecimiento y sobrevivencia óptimas, se probaron diferentes fuentes de alimento. Dado que el metabolismo de los pulpos es principalmente proteico, dichas fuentes se eligieron basándose principalmente en la dieta natural de los organismos y en su composición aminoacídica, poniendo especial cuidado en que fuesen fuentes de proteína de alta calidad. Solos o mezclados, con los insumos probados los organismos en general no mostraron buenos crecimientos.

En el primer experimento, las dietas diseñadas fueron elaboradas pensando en brindar a los animales experimentales un alimento con una composición aminoacídica balanceada. Este balance se realizó tomando en consideración tanto los perfiles de amino ácidos (aa) del pulpo como los de cangrejos que han provocado altas tasas de crecimiento, cuando estos últimos han sido utilizados como alimento (Domínguez et al., 2007; Aguila et al., 2007, Rosas et al., 2007). Así, con el alimento balanceado utilizado se preveía la posibilidad de que los aa no fueran un factor limitante de la dieta. De hecho se utilizó un hidrolizado (autolizado de pescado) que por su poder atrayente, al igual que el CPSP, podría garantizar el consumo y por tanto el efecto positivo que se esperaba de este alimento (Aguila et al., 2007). No obstante estas consideraciones, el alimento balanceado no fue efectivo provocando pérdida de peso en los organismos experimentales. Aunque Lee et al (1994) observaron, para *O. vulgaris*, que un balance en los niveles de aminoácidos provee aquellos que son mejores para obtener energía para el metabolismo (prolina, aspartato y arginina) y aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas, al parecer no solo es el balance de aa el que determina la efectividad de un alimento, sino otros factores asociados con el origen de la proteína que conforma el alimento. Resultados similares han sido obtenidos en otros cefalópodos que han sido alimentados

con diversas fuentes proteicas como surimi y filete de pescado, salchichas de pescado, dietas para camarón etc., (Domingues, 1999; Domingues et al., 2002; Domingues et al., 2005).

Con el fin de establecer los efectos de las diferentes fuentes proteicas en el crecimiento y la fisiología digestiva de los pulpos se realizaron una serie de experimentos diseñados para probar cada fuente por separado. Los resultados de ese ensayo mostraron que el CPSP promueve una sobrevivencia mayor del 80% mientras que los tentáculos de calamar promovieron un crecimiento marginal positivo. El resto de las fuentes proteicas utilizadas en la conformación de la dieta (Harina de almeja, almeja liofilizada, y la harina de pescado) produjeron importantes pérdidas de peso, por lo que no se consideraron como nutrientes apropiados y por tanto fueron eliminados. Nuevamente los animales alimentados con jaiba mostraron los mejores crecimientos. Estudios recientes llevados a cabo en *O. maya* demostraron que el CPSP es un buen atrayente para los pulpos y que posiblemente la forma en que se encuentran los péptidos y aa favorezca la asimilación de las proteínas (Aguila et al., 2007a). El papel atrayente del CPSP quedó nuevamente de manifiesto en el presente estudio, poniendo en evidencia que aunque el principal sentido utilizado en la alimentación de los pulpos es la visión, también las señales químicas y el olfato juegan un papel muy importante. Así es posible proponer el uso del CPSP como parte de la composición de los alimentos balanceados que si bien no proporciona un contenido de proteínas importante, es un elemento bien aceptado por los pulpos y que podría resultar como un buen instrumento atrayente en dietas artificiales. Así mismo al promover el consumo del alimento el CPSP podría además estar brindando elementos nutricionales necesarios para el mantenimiento, hecho que se resalta de los elevados valores de sobrevivencia que se observaron en el presente estudio. Estudios realizados en otros cefalópodos han sugerido que el empleo de fuentes de proteína más digerible en la elaboración de las dietas, que a su vez provean aminoácidos y péptidos favorece el crecimiento. En paralarvas de *O. vulgaris* se observó que los aminoácidos, además de ser necesarios para el metabolismo, juegan un papel importante dado que son ellos quienes brindan el efecto atrayente o de rechazo que tiene dieta, el cual afecta el comportamiento quimiotáctil de los pulpos (Villanueva et al., 2004).



De todas las fuentes proteicas probadas, la mayoría produjeron pérdida de peso en los animales, y sólo en el caso de los tentáculos de calamar liofilizados, se registró un crecimiento marginal. Así, se ratificó a la jaiba como el mejor alimento para la engorda de juveniles de *O. maya*, dado que en todos los experimentos fue la única que produjo tasas de crecimiento significativas, mismo fenómeno ya antes observado en otras pruebas realizadas con *O. maya* (Aguila et al., 2007a). El uso de tentáculos de calamar (*Dosidiscus gigas*) en la alimentación de pulpos ha estado limitado a los presentes experimentos. El uso de calamar como ingrediente de alimentos para animales acuáticos ha sido evaluado también en camarones peneidos (Córdova-Murueta and Garcia-Carreno, 2002). Estos autores reportaron que este insumo tiene una alta calidad nutricional con una composición química correspondiente a 68% de proteína, 4.7% de lípidos, 6.2% de cenizas y 0% de fibra cruda, con un perfil de AA similar al reportado para *O. maya* (Aguila et al., 2007). No obstante las aparentemente buenas características nutricionales del calamar, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que, por alguna razón aún no establecida, el calamar no promueve los mismos crecimientos que los que es posible obtener cuando los juveniles de *O. maya* son alimentados con carne de jaiba. En este sentido se ha propuesto que además de las cualidades químicas del alimento deben de considerarse otras propiedades como la textura, la dureza y la digestibilidad (Lee, 1994; Ezquerro et al., 1998; Córdova-Murueta and Garcia-Carreno, 2002). Este podría ser un punto a cuidar en futuros experimentos.

### Ácidos grasos

Es conocido que en general los cefalópodos presentan una baja digestibilidad de lípidos (Solis, 1997; Aguado-Giménez and García-García, 2003; Navarro and Villanueva, 2003; Petza et al., 2006; Pérez et al., 2006; Domingues et al., 2007). En esos estudios se ha observado que si bien los lípidos en exceso pueden reducir la digestibilidad de la dieta, también éstos tienen un papel importante en la síntesis de membranas. Estos diferentes enfoques han provocado que en el caso particular de los lípidos las conclusiones hayan sido controversiales. Diversos estudios han demostrado que las características químicas de la dieta, en particular las proteínas, juegan un papel importante en el crecimiento de los cefalópodos. El que las proteínas se presenten como principal fuente energética se debe a la importancia del tejido muscular en la locomoción y la ventilación de los cefalópodos, así como a su uso para el crecimiento somático (Moltschaniwskyi y Johnston, 2006). Si contrastamos lo anterior con los lípidos, lo primero que surge es el hecho de que éstos

son boyantes. Así, grandes y variables cantidades de ellos pueden afectar potencialmente la flotabilidad de los animales, aunado a que son un recurso metabólicamente caro de distribuir (Moltschaniwskyi y Johnston, 2006).

Diferentes investigaciones han sido realizadas para definir la importancia que los lípidos juegan en la alimentación de los cefalópodos, aunque se ha visto que la capacidad de asimilarlos puede variar de acuerdo a la especie. Moltschaniwskyi y Johnston (2006) encontraron que el calamar *Euprymna tasmanica* es capaz de digerir lípidos en mayores proporciones que otros cefalópodos, a pesar de que éstos no sean almacenados en la glándula digestiva. La explicación a este fenómeno fue asociada a los hábitos sedentarios del animal, los cuales conllevan menos restricciones de movilidad y flotabilidad asociadas con el almacenamiento de los mismos. Por su parte O' Dor y Wells (1987) encontraron que cuando los cefalópodos son alimentados con dietas que presentan un alto contenido de grasas, como por ejemplo sardina y anchovetas, los organismos producen heces que flotan, indicando una absorción ineficiente de lípidos. Petza et al (2006) demostraron que con este tipo de dietas también el crecimiento se ve reducido en comparación con dietas bajas en grasas y con un alto contenido proteico.

Basados en lo anterior, y dados los bajos valores de crecimiento obtenidos, una parte de los experimentos fue diseñado para conocer el papel que los ácidos grasos contenidos en las dietas experimentales juega al alimentar a los juveniles de *O. maya*. Esta especie presenta como base de su dieta natural mayoritariamente crustáceos. En diversas experiencias de cultivo ha resultado claro que es con la carne de jaiba con la que estos organismos alcanzan las mayores tasas de crecimiento y sobrevivencia, incluyendo el presente estudio. De acuerdo con Silva y Chapul (2000), el contenido lipídico del cangrejo es de 2.9 a 5.1%. Así, las dietas experimentales fueron elaboradas basadas en este perfil, tomando como bueno un porcentaje del 4% de lípidos en las dietas al re-engrasar.

Moltschaniwskyi y Johnston (2006) y (Navarro and Villanueva, 2003) sostienen que es necesario tener en consideración no solamente la cantidad sino también el tipo de ácidos grasos en la dieta. Los cefalópodos adultos se caracterizan por tener grandes concentraciones de cadenas largas de PUFA (Nash et al., 1978) (13). Entre ellos, ácidos como el DHA, el EPA y el AA son de gran importancia por estar implicados en la formación del sistema nervioso, visual, reproductivo y desarrollo larvario, entre otros (Sargent et al., 1995; Almansa et al., 1999; Arts et al., 2001). Así, se ha observado que

mientras la concentración de lípidos totales y monoinsaturados tiende a aumentar durante las primeras fases de vida, la de los lípidos polinsaturados (PUFA) tiende a disminuir (Navarro y Villanueva, 2000, 2003). En adición a ello, en sepias se ha visto que con PUFAS se puede acelerar la aceptación de dietas artificiales, observándose su efecto más importante durante los primeros 20 días de vida (Boucaud-Camou et al., 1985).

En el presente estudio a pesar de cuidar tanto la cantidad como la calidad de los ácidos grasos utilizados se observó que en ningún caso los valores de crecimiento se modificaron positivamente. Aunque pudiese ser que los lípidos estuviesen ocasionando la saturación o taponamiento de los puntos de absorción de las proteínas y así explicar la baja de peso, los resultados obtenidos en esa parte del estudio muestran que no parecen ser los lípidos los primeros causantes de las bajas tasas de crecimiento, sino que hay otros u otros factores interfiriendo en la digestibilidad de las proteínas y por ende en el crecimiento. Por ejemplo, no es posible saber si la forma de desengrasar las fuentes proteicas alteraron las proteínas afectando la disponibilidad de nutrientes para el pulpo, o si en el proceso de desengrasado algún residuo orgánico no esperado pudiera haber afectado la textura, el sabor o la absorción de nutrientes del alimento.

A pesar del gran número de experimentos realizados en el presente estudio no es posible asegurar si los lípidos en cantidad y/o calidad determinan la digestión de las proteínas. Sin embargo lo que sí queda claro es que no basta con brindar proteínas de buena calidad en la dietas para obtener resultados exitosos en el cultivo de pulpo, sino que hay que considerar de que manera esa proteína es dispuesta para ser digerida y asimilada. El tipo de proteína, el peso molecular de las proteínas usadas, su configuración alostérica, etc podrían estar involucrados en la nutrición de los pulpos determinando el uso y aprovechamiento de éstas y por ende sus efectos en el crecimiento.

#### Actividad de las enzimas digestivas.

Se ha demostrado que la actividad enzimática es un buen indicador del modo en que una dieta afecta el crecimiento y la sobrevivencia de los cefalópodos, así como de la manera en que los recursos proporcionados mediante esta son utilizados por los animales (Perrin et al., 2004; Águila et al., 2007; Moguel, 2008). Lo anterior gracias a que éstos tienen la capacidad de ajustar su metabolismo modificando sus secreciones enzimáticas a modo de lograr el aprovechamiento de los componentes de la dieta (Caruso et al., 1996;

Zambonino-Infante y Cahu,1994). Dicha capacidad ha sido observada en sepias (Perrin et al., 2004) así como en larvas de pulpo (Villanueva et al., 2002). Es por ello que en el presente estudio la actividad enzimática fue utilizada para evaluar el efecto de diferentes fuentes proteicas sobre el crecimiento de *O. maya*.

Dado que los cefalópodos son organismos carnívoros, con un metabolismo básicamente proteico, la atención de los estudios realizados, incluyendo este, se centra en la actividad de enzimas proteolíticas. Se ha visto que la presencia de una enzima no se encuentra sólo en función del tipo de alimento sino que depende también del estado de desarrollo del animal. Boucaud-Camou y Roper (1995) realizaron un estudio sobre enzimas digestivas en paralarvas de cefalópodos. Ahí notaron que en todos los especímenes estudiados el sistema digestivo se encontraba ya desarrollado y listo para digerir presas. No obstante, en sepias se ha demostrado que al nacer estos animales cuentan todavía con una reserva importante de vitelo y su sistema digestivo se encuentra aún inmaduro. El desarrollo del sistema digestivo inicia después del 5º día con la primera alimentación. Luego de la maduración del sistema digestivo, la digestión pasa de ser intracelular a extracelular, proceso durante el cual se diferencian las células encargadas de la secreción enzimática. En este proceso, estas células desarrollan la capacidad de secretar enzimas alcalinas las cuales harán el trabajo de digestión extracelular. Todos estos cambios están asociados con la transición entre una digestión post embrionaria a una juvenil – adulta (Perrin, 2002).

Dado que *O. maya* presenta desarrollo directo al igual que las sepias, resulta fácil suponer que estos animales cuenten igualmente con adaptaciones digestivas similares. Moguel (2008) encontró que durante los primeros 30 días de vida en los pulpos no existen cambios en la digestión, mostrándose en la misma magnitud la actividad de las enzimas intracelulares y extracelulares. Esto significa que la madurez ocurre simultáneamente tanto en células encargadas de la producción de proteasas como en las dedicadas a la absorción intracelular de nutrientes. En este mismo estudio se observó que la actividad de las fosfatasas ácidas fue siempre menor que el resto de las enzimas, mostrando que es la digestión extracelular la que juega el papel de mayor importancia en *O. maya*. No obstante resulta interesante notar que, a pesar de lo anterior, durante los primeros quince días después de la eclosión se observó un patrón irregular de la actividad enzimática, en donde se apreciaban picos de actividad para todas las enzimas digestivas a los días 3, 5,

9 y 14, periodo después del cual la actividad se estabilizó. Ello sugiere que si bien la maduración de los tipos celulares se da simultáneamente, también existe un ajuste de secreción enzimática durante los primeros 15 días de vida de *O. maya*, hecho que resulta definitivo en el aprovechamiento y desempeño de las dietas experimentales. Los resultados negativos obtenidos en cuanto a crecimiento y sobrevivencia durante el primer experimento de esta investigación, podrían deberse entre otras cosas precisamente a la forma en que el tipo de alimento se relaciona con los ajustes enzimáticos asociados con la edad.

En un trabajo realizado con *Sepia officinalis*, se llevó a cabo una serie de análisis en un intento de definir la forma en que los distintos órganos participan en la secreción de las enzimas digestivas. La máxima actividad de las proteasas totales, tripsina y fosfatasa ácida fue encontrada en la glándula digestiva. En el caso de la quimotripsina la mayor actividad fue registrada en las glándulas salivares posteriores, seguidas de la glándula digestiva (Perrin, 2002). En paralarvas de varias especies de cefalópodos así como en *O. maya* también se encontró la mayor actividad de las enzimas digestivas en la glándula digestiva (Boucaud-Camou y Roper, 1995; Águila et al., 2008). Esto permite establecer a la glándula digestiva como el principal órgano de síntesis de enzimas digestivas, razón por la cual todas las extracciones realizadas durante este estudio para observar la actividad enzimática se realizaron a partir de ese tejido.

Las fosfatasa ácida se encuentran involucradas en la digestión intracelular (Yim y Boucaud-Camou, 1980; Boucaud-Camou et al., 1985). Ellas agrupan varias isoenzimas que hidrolizan los monoésteres de fosfato y que están implicadas en numerosos procesos metabólicos como la permeabilidad membranal, la diferenciación celular, el metabolismo óseo y la síntesis de esteroides (Perrin, 2002). Por su parte, la digestión extracelular la realizan mayormente las proteasas. De éstas últimas las más estudiadas han sido la tripsina y la quimotripsina. Ambas son endoproteasas que cuentan con una estructura próxima y cuya diferencia es el lugar de corte en las proteínas. Los sitios ocupados por la tripsina son los correspondientes a la lisina y la arginina, mientras que para la quimotripsina son el triptofano, la tirosina y la fenilalanina. Estas enzimas son sintetizadas en el medio extracelular en forma de zimógenos (Perrin, 2002).

Se ha visto que la actividad de la tripsina y la quimotripsina baja en larvas de *O. vulgaris* con una dieta pobre, e igualmente para el caso de las fosfatasas en sepias. Conforme a lo observado por Yim (1978) y Boucher-Rodoni et al. (1987), las enzimas son secretadas desde la toma de comida. La disminución de la actividad enzimática corresponde a la degranulación de células digestivas y a la secreción de enzimas en la luz (Boucaud-Camou, 1973). La actividad continúa bajando junto con la secreción y la utilización de las enzimas.

Moguel (2008) al trabajar con juveniles de *O. maya* pudo notar que, en aquellos animales que registraron pérdidas de peso durante sus experimentos subió la actividad de la quimotripsina, lo cual fue interpretado como un indicador de inducción enzimática cuando se utilizan dietas deficientes. En cambio, cuando se observaron crecimientos positivos se registró una inducción de la tripsina, hecho que permitió pensar en la existencia de una relación directa entre la actividad de esta enzima y el crecimiento de los pulpos. Aunque en este estudio no se observó una relación directa entre crecimiento y actividad de las enzimas digestivas en todos los experimentos, se pudo observar que los alimentos ensayados modulan de manera distinta la capacidad digestiva de los pulpos lo que al final de cuentas afectó al crecimiento. Aunque todas las fuentes proteicas utilizadas se podrían considerar de alta calidad nutricional y digestiva no todas produjeron crecimientos positivos y activación enzimática que pudiera equipararse a lo observado cuando los pulpos son alimentados con carne de jaiba. Esto pone en evidencia que otras características, distintas a la cantidad de proteína total contenida en el insumo o su presentación (fresca, congelada o liofilizada) interfieren en la digestibilidad de los insumos, tal vez por la estructura misma de la proteína o la cantidad de proteína soluble presente en cada uno de ellos. Otros estudios deberán realizarse con el fin de establecer el origen del efecto aparentemente adverso que provocan los insumos utilizados para los juveniles de *O. maya* cultivados.

## Conclusiones

1. De las fuentes de proteína probadas, es la jaiba la que continúa arrojando los mejores resultados de crecimiento y sobrevivencia, ya sea fresca o liofilizada.
2. El que los pulpos alimentados con las fuentes de proteína experimentales no hayan mostrado buenos resultados en su tasa de crecimiento y sobrevivencia podría deberse no necesariamente a la calidad de la proteína brindada, sino a otras cuestiones como la interacción a nivel molecular entre los elementos proporcionados en el alimento y las enzimas digestivas, aspectos de configuración alostérica, etc. que resulta necesario evaluar posteriormente.
3. De las fuentes de proteína probadas en este estudio son el tentáculo de calamar liofilizado y el CPSP los que podrían mostrar atributos para mantener el crecimiento y la sobrevivencia de los pulpos respectivamente. Son estos elementos los que deben considerarse en estudios futuros para terminar de discernir su papel en la nutrición de los cefalópodos.
4. Aunque se reconoce que los lípidos pueden ser de gran importancia para los pulpos, en el presente estudio no se encontró un patrón definido sobre su efecto en el crecimiento de *O. maya*.
5. *O. maya* acepta sin problemas dietas artificiales, elaboradas a base de fuentes frescas o de harinas. Sin embargo, hasta el momento estas parecen no haber cumplido sus requerimientos nutricionales. Dado que se hicieron con base en la composición aminoacídica de los pulpos las dietas probadas prometían cubrir las necesidades nutricionales de *O. maya*, el que esto no haya sido así indica que es necesario poner atención en la interacción de las proteínas con los demás elementos en la dieta, así como en la interacción de las mismas con las enzimas digestivas de los pulpos en sus diferentes etapas de desarrollo.

6. La edad de los pulpos es un punto crucial a ser considerado en la elaboración de futuras dietas tomando en cuenta que existe un periodo de maduración del sistema digestivo con la edad, de acuerdo con otros estudios y con lo observado al usar animales de diferentes edades en los experimentos de esta investigación.

7. Aunque se observan cambios en la actividad de las enzimas digestivas evaluadas y el crecimiento de los animales según el alimento brindado a los organismos, la forma en que esta relación es modulada es altamente variable y no siempre sigue patrones fijos.

9. Aún no son claros todos los elementos de la dieta que afectan la actividad enzimática de *O. maya* ni la manera en que éstos interactúan durante la digestión. Se requiere una mayor caracterización de las enzimas digestivas de *O. maya*, proteasas y lipasas, para conocer mejor la interacción que estas están teniendo con la dieta y por consiguiente su efecto en el crecimiento de los animales.



## Referencias

- Aguado-Giménez, F., García-García, B., 2003. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International* 10, 361-377.
- Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, P., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., Rosas, C., 2007a. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* 273, 641-655.
- Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, P.M., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., Rosas, C., 2007b. Effect of dietary protein level on digestive capacity and energy balance of *Octopus maya* (Voss and Solis). *Aquaculture Nutrition* In press.
- Almansa, E., Cejas, M.J., Badía, P., Villamandos, J.R., Lorenzo, A., 1999. Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season. *Aquaculture* 170, 323-336.
- Arts, M.T., Ackman, R.G. and Holub, B.J., 2001. Essential fatty acids. In: *Aquatic ecosystems. A crucial link between diet and human health and evolution*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58, 122-137.
- Boucaud-Camou, E., 1973. Etude de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L (Mollusque Céphalopode). Essai d'analyse expérimentale des phénomènes digestifs. Thèse doc. Sci. Nat., Université de Caen. 208pp.
- Boucaud-Camou, E., Yim, M., Tregots, A., 1985. Feeding and digestion of young *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) during post hatching development. *Vie Milieu* 35, 263-266.
- Boucaud-Camou, E., Roper, C.F.E., 1995. Digestive enzymes in paralarval cephalopods. *Bulletin of Marine Science* 57 (2), 313-327.
- Boucher-Rodoni, R., Boucaud-Camou, E., Mangold, K., 1987. Feeding and digestion. *Cephalopod life cycles Vol. II*, 85-108. Academic Press.
- Caruso, G., Genovese, L., Greco, S., 1996. Preliminary investigation on the digestive enzymes of reared *Pagellus acarne* (Risso, 1826) juveniles in relation to two different diets. *Oebalia* XXII, 3-13.
- Castro, B., 1991. Can *Sepia officinalis* L. Be reared on artificial food? *Mar. Behav. Physiol.* 19, 35-38.
- Castro, B., DiMarco, F.P., DeRusha, R., Lee, P.G., 1993. The effects of surimi and pelleted diets on the laboratory survival, growth and feeding rate of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 170, 241-252.

- Castro,B., Lee,P.G., 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A , 1007-1016.
- Córdova-Murueta,J., Garcia-Carreno,F.L., 2002. Nutritive value of squid amd hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210, 371-384.
- Domingues,P., 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. University of the Algarve, Portugal, pp. 1-95.
- Domingues, P.M., Kingston, T., Sykes, A., and Andrade, J.P., 2001a. Growth of young cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) at the upper end of the biological distribution temperature range. *Aquacult. Res.* 32, 923-930.
- Domingues, P.M., T., Sykes, A., and Andrade, J.P., 2001b. The use of artemia or mysids as food for hatchlings of the cuttlefish *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758; effects on growth and survival throughout the life cycle. *Aquacult. Int.* 9, 319-331.
- Domingues, P.M., T., Sykes, A., and Andrade, J.P., 2002. The effects of temperature in the life cycle of two consecutive generations of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), cultured in the Algarve (South Portugal). *Aquacult. Int.* 10, 207-220.
- Domingues,P., Sykes,A., Sommerfield,A., Almansa,E., Lorenzo,A., Andrade,P., 2004. Growth and survival of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) of different ages fed crustaceans and fish. Effects of frozen and live prey. *Aquaculture* 229, 239-254.
- Domingues,P., DiMarco,F.P., Andrade,J.P., Lee,P.G., 2005. Effect of artificial diets on growth, survival and condition of adult cuttlefish, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758. *Aquaculture International* 13, 423-440.
- Domingues,P., López,N., Muñoz,J.A., Maldonado,T., Gaxiola,G., Rosas,C., 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition* 13, 1-9.
- Ezquerria,J.M., Garcia-Carreno,F.L., Carrillo,O., 1998. In vitro digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 163(1-2), 123-136.
- Forsythe,J.W., Hanlon,R.T., 1980. A closed marine culture system for rearing *Octopus joubini* and other large-egged benthic octopods. *Laboratory Animals* 14, 137-142.
- Forsythe, J. W. 1981. A study on the growth of *Octopus joubini* Robson, 1929 reared in controlled closed seawater systems. M. Sc. Thesis, Texas A&M University, College Station, Texas, 79 p.
- Forsythe, J. W. and Van Heukelem, W.F. 1987. Growth. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Vol. II. Academic Press, London, pp: 135-156.
- García-García,B., Aguado-Giménez,F., 2002. Influence of diet on growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 211, 173-184.

- Giménez,F.A., Garcia,E., 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): Influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International* 10, 361-377.
- Gomi,F., Yamamoto,M., Nakazawa,T., 1986. Swelling of egg during development of cuttlefish *Sepia japonica*. *Zoological Science* 3, 641-645.
- Hanlon,R.T., Forsythe,J.W., 1985a. Advances in the laboratory culture of Octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science* 35(33), 40.
- Hanlon,R.T., Forsythe,W., 1985b. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. *Lab. Anim. Sci.* 35, 33-40.
- Hochachka PW, Moon TW, Mustafa T. and Storey KB. 1975. Metabolic sources of power for mantle muscle of a fast swimming squid. *Comp. Biochem. Physiol.* 52B, 151-158.
- Houlihan DF, McMillan DN, Agnisola C, Genoio IT, Foti L. 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.*, 106, 251-259.
- Iwasaki M, Harada R. 1985. Proximate and amino acid composition of the roe and muscle of selected marine species. *J. Food Sci.* 1585 (50).
- Koueta,N., Alorend,E., Noël,B., Boucaud-Camou,E., 2006. Earlier acceptance of frozen prey by juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* in experimental rearing: effect of previous enriched natural diet. *Vie et Millieu* 56, 147-152.
- Koueta,N., Boucaud-Camou,E., Noel,B., 2002. Effect of enriched natural diets on survival and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Aquaculture* 203, 293-310.
- Lee,P.G., Forsythe,J.W., DiMarco,F.P., DeRusha,R., Hanlon,R.T., 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bull. mar. Sci.* 49, 362-372.
- Lee,P.G., 1994. Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 25, 35-51.
- Lee P.G., Turk P.E., Forsythe J.W. and DiMarco, F.P., 1998. Cephalopod Culture: Pysiological, Behavioral and Environmental requirements. *Suisan Zoshoku* 46(3), 417-422.
- Le Bihan,E., Perrin,A., Koueta,N., 2006. Influence of diet peptide content on survival, growth and digestive enzymes activities of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis*. *Vie et Millieu* 56, 139-145.
- Mangold K., 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of the National Museum Victoria* 44, 81-93.
- Miliou,H., Fintikaki,M., Kountouris,T., Verriopoulos,G., 2005. Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus *Octopus vulgaris*. *Aquaculture* 249, 245-256.

- Moguel, C.G. 2008. Efecto de una dieta artificial en la fisiología digestiva y el crecimiento de juveniles tempranos de *Octopus maya* (Voss y Solis). Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Yucatán. 90 p.
- Moltschaniwskyj, N., Johnston, D., 2006. Evidence that lipid can be digested by the dumpling squid *Euprymna tasmanica*, but is not stored in the digestive gland. *Marine Biology* 149, 565-572.
- Nash, D.M., Eaton, C.A. and Crewe, N.F., 1978. Lipid classes and fatty acid composition of squid (*Illex illecebrosus*). Technical Report of the Fisheries and Marine Service of Canada. 8 p.
- Navarro, J.C. and Villanueva, R., 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183, 161-177.
- Navarro, J.C., Villanueva, R., 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture* 219, 613-631.
- O'Dor, R.K. and Wells, M.J. 1987. Energy and nutrient flow. In: *Cephalopod life cycles* (Boyle, P.R. ed) Vol 2, 109-133. Academic Press, London.
- Okutani, T. 1990. Squids, cuttlefish and octopuses. *Mar. Behav. Physiol.* 18, 1-17. Van Heukelem, W.F. 1983. *Octopus maya* In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Vol. I. Academic Press, London, pp: 311-323.
- Pérez, M.C., López, D.A., Aguila, K., González, M.L., 2006. Feeding and growth in captivity of the octopus *Enteroctopus megalocyathus*. *Aquac Research* 37, 550-555.
- Perrin, A. 2002. Etude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Cephalopode): Impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. Thèse Dr. Université de Caen. 152 p.
- Perrin, A., Le Bihan, E., Koueta, N., 2004. Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 311, 267-285.
- Petza, D., Katsanevakis, S., Verriopoulos, G., 2006. Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed *ad libitum* on a high-lipid diet. *Mar. Biol.* 148, 827-832.
- Rosas, C., Caamal C., et al. 2006. Manual preliminar para el cultivo del pulpo *Octopus maya*. UNAM.
- Rosas, C., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., López, N., Maldonado, T., Domingues, P., 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab and artificial diet. *Marine Biology* 152, 371-378.

- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P. y Cuzon, G. 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture* 275, 291–297 p.
- Sargent, J.R., Bell, M.B., Bell, J.G. Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Origins and function of n-3 polynsaturated fatty acids in marine organisms. In: Phospholipids: characterizations, metabolism and novel biochemical applications. American Oil Chemical associations Press, Champaign, IL., USA, 248-259.
- Solis,M., 1997. The *Octopus maya* fishery of the Yucatán Peninsula. The Fishery and Market Potential of Octopus in California, CMSC 10, 1-10.
- Solís-Ramírez, M.J. 1994. La pesquería del pulpo del golfo de México y Caribe mexicano. Err. Atlas Pesquero y Pesquerías Relevantes de México. C.D. Multimedia. Secretaria de Pesca, INP. CENEDIC. Univ. de Colima, México.
- Solis-Ramirez, M.J. 1997. The *Octopus maya* fishery of the Yucatán Peninsula. Err. Lang, Hochberg & Ambrose (Eds.). The Fishery and Market Potential of *Octopus* in California, CMSC: pp. 1-10.
- Van Heukelem,W.F., 1976. Growth, bioenergetics and life span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. Univ. Hawaii, pp. 1-224.
- Van Heukelem,W.F., 1977. Laboratory maintenance, breeding , rearing and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Lab. Anim. Sci.* 27, 852-859.
- Vaz-Pires,P., Seixas,P., Barbosa,A., 2004. Aquaculture potential of the common octopus *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): a review. *Aquaculture* 238, 221-238.
- Villanueva, R., Koueta, N., Riba, J., Boucaud-Camou, E., 2002. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food uptakes during first feeding using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture* 205, 269– 286.
- Villanueva,R., Riba,J., Ruíz-Capillas,C., González,A.V., Baeta,M., 2004. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effects of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture* 242, 455-478.
- Vlieg P. 1984. Proximate composition of New Zealand squid species. *N. Z. J. Sci.*, 27, 45-150.
- Yim, M. 1978. Développement post-embryonnaire de la glande digestive de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Thèse Dr. 3<sup>e</sup> cycle, Université de Caen. 75 p.
- Yim, M., y Boucaud-Camou, E. 1980. Etude cytologique du developpement post-embryonnaire de la glande digestive de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, 69: 59-79.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C. 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology 109, 209-212.

## ANEXO I

### Generalidades de la especie *Octopus maya* (1)

#### TAXONOMÍA

Phyllum: Mollusca

Clase: Cephalopoda

Orden: Octopoda

Familia: Octopodidae

Género: *Octopus*

Especie: *Octopus maya* ( Voss y Solis, 1963)

**DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.** *Octopus maya* se distribuye en la Costa de la Península de Yucatán, México, desde Ciudad del Carmen hasta Isla Mujeres (Solís-Ramírez 1994, 1997). Se encuentra principalmente en aguas templadas y tropicales. Es una especie litoral de aguas someras (se halla mayormente de 1 a 4 brazas de profundidad), cuyos sustratos preferentes son de roca caliza y sedimento arena-limoso cubierto en parte por *Thalassia testudinum* y diversas algas. Por su posición en el medio es una especie demersal (bentónica) pero puede nadar activamente por la columna de agua.

**DESCRIPCIÓN.** Estos organismos presentan cuerpo blando y ocho brazos con dos filas de ventosas. Cuentan con un cerebro bien desarrollado además de ojos grandes y complejos que les proporcionan una visión aguda. La textura de su piel puede ser lisa o verrugosa y su color varía entre rojo, café y marrón según la situación.

**REPRODUCCIÓN.** *O. maya* presenta dimorfismo sexual marcado que incluye el desarrollo de estructuras propias en machos (hectocotilo y 1 sólo testículo) y en hembras (1 ovario, 1 o 2 oviductos y glándula oviductal). La cópula es a distancia y va precedida por diferentes movimientos y cambios de coloración característicos. Son ovíparos con desarrollo embrionario directo (no hay fase larval). La fecundidad de estos pulpos varía entre 500 y 1500 huevos por desove, mismos que presentan un desarrollo embrionario de entre 50 y 65 días en el medio natural y de 45 días en cautiverio, a temperaturas entre 24 y 26°C (Van Heukelem, 1983).

Son animales solitarios, cuya longevidad va de 9 meses a 1 año de vida. Se desplazan con ayuda de sus tentáculos pero en caso de peligro pueden hacerlo mediante la expulsión de un chorro de agua por la cavidad respiratoria.

**ALIMENTACIÓN.** Son carnívoros activos de peces, crustáceos y otros moluscos (bivalvos). Su saliva contiene una cefalotoxina que ayuda a inmovilizar a la presa. Presentan una tasa de alimentación que varía entre el 30% de su peso húmedo por día en las primeras fases de vida, hasta el 5% al acercarse a la etapa reproductiva. La tasa de crecimiento en juveniles va de 4% de su peso corporal por día a 20°C, hasta 7.8% por día a 30°C.

## **ANEXO II**

### **Procedimiento para extracción de grasas con el método “Soxhlet”**

El primer paso para armar el sistema fue sellar las partes esmeriladas con grasa de silicón. Posteriormente se introdujeron los dedales con las muestras previamente pesadas dentro del vaso de extracción (recolector). Se colocaron 150 ml de éter de petróleo de 30 a 60 °C de ebullición en cada uno de los matraces de ebullición, mismos que se ensamblaron con el recolector asegurando que hicieran buen contacto con las placas de la estufa. El agua del reservorio fue enfriada previamente al encendido de la bomba y cada una de las placas del sistema se ajustó a un nivel de calor de 4 o 4 ½. Se esperó a que el éter de petróleo estuviera en ebullición, verificando que este no se fugara por los sellos de silicón y que el agua que circulaba por el sistema se mantuviera fría.

Una vez pasadas 2 hrs con el sistema funcionando, se hizo una prueba para saber si aún se estaban extrayendo grasas. Esto se hizo con una tira de papel filtro que se humedeció con una gota de éter de las que caían del matraz, se dejó secar y después se observó si presentaba alguna mancha de grasa. De no ser así la muestra fue retirada. Para ello se escurrió el dedal con la muestra lo mejor posible y se puso a secar en la campana de extracción. Una vez finalizado el proceso se desmontó el equipo, teniendo cuidado de colocar el éter recuperado y la grasa en frascos destinados específicamente para cada uno de ellos.



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental de cada uno de los experimentos realizados con juveniles de <i>O. maya</i> cultivados para probar diversas fuentes de alimento. ....	18
Tabla 2. Composición de los alimentos balanceados empleados en el experimento 1, expresada en % total del insumo por cada 100 gramos de mezcla.....	20
Tabla 3. Composición de las dietas empleadas en el experimento 4, expresada como porcentaje por cada 100 g de mezcla.....	25
Tabla 4. Composición de la dieta empleada para engorda de los pulpos del experimento 4 antes del experimento. Porcentaje de ingredientes por cada 100 g de mezcla. ....	27
Tabla 5. Sustratos empleados en la medición de la actividad enzimática con cada una de las enzimas extracelulares. ....	29
Tabla 6. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al efecto del tipo de alimento en el crecimiento de juveniles tempranos de <i>O. maya</i> . Experimento 1. ....	35
Tabla 7. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al grado de lixiviación de cada una de las dietas experimentales empleadas en la alimentación de juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 1.....	37
Tabla 8. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al efecto de diferentes fuentes de proteína en el crecimiento de juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 2. ....	38
Tabla 9. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las proteasas, registrada al emplear diferentes fuentes de proteína para alimentar juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 2. ....	40
Tabla 10. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la tripsina, registrada al emplear diferentes fuentes de proteína para alimentar juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 2. ....	41
Tabla 11. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la quimotripsina, registrada al emplear diferentes fuentes de proteína para alimentar juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 2. ....	42
Tabla 12. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las fosfatasas ácidas, registrada al emplear diferentes fuentes de proteína para alimentar juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 2. ....	43
Tabla 13. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la concentración de glucógeno en músculo de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2. ....	46

Tabla 14. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al efecto de la mezcla de diferentes fuentes de proteína en el crecimiento de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con las mismas. Experimento 3. ....	47
Tabla 15. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las proteasas al emplear mezclas de diferentes fuentes de proteína en la alimentación de juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 3. ....	49
Tabla 16. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la quimotripsina al emplear mezclas de diferentes fuentes de proteína en la alimentación de juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 3. ....	50
Tabla 17. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las fosfatasas ácidas al emplear mezclas de diferentes fuentes de proteína en la alimentación de juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 3. ....	51
Tabla 18. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la concentración de glucógeno en músculo de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína. Experimento 3. ....	53
Tabla 19. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado al efecto de diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas en el crecimiento de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con las mismas. Experimento 4. ....	54
Tabla 20. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de las proteasas al usar diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas en la alimentación de juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 4. ....	57
Tabla 21. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la tripsina al usar diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas en la alimentación de juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 4. ....	58
Tabla 22. Resultados del análisis de varianza y de diferenciación de promedios de Tukey aplicado a la actividad enzimática de la quimotripsina al usar diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas en la alimentación de juveniles de <i>O. maya</i> . Experimento 4. ....	59

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto del tipo de alimento sobre la tasa de crecimiento específico (TCE % por día) de juveniles tempranos de <i>O. maya</i> . Valores como promedio + E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. ....	35
Gráfica 2. Supervivencia de juveniles tempranos de <i>O. maya</i> a lo largo de 12 días proporcionándoles diferentes tipos de alimento. Experimento 1. ....	36
Gráfica 3. Porcentaje de lixiviación de los diferentes tipos de alimentos proporcionados a juveniles tempranos de <i>O.maya</i> . Experimento 1.....	37
Gráfica 4. Efecto de diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca) sobre la tasa de crecimiento específico (TCE % por día) de juveniles de <i>O. maya</i> . Valores como promedio + E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 2. ....	38
Gráfica 5. Porcentaje de supervivencia de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2.....	39
Gráfica 6. Actividad enzimática de las proteasas totales (UI/mg de proteína) de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca). Valores como promedio + E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 2. ....	40
Gráfica 7. Actividad enzimática de la tripsina (UI/mg de proteína) en juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca). Valores como promedio + E.S. Experimento 2. ....	41
Gráfica 8. Actividad enzimática de la quimotripsina (UI/mg de proteína) en juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca). Valores como promedio + E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 2. ....	42
Gráfica 9. Actividad enzimática de las fosfatasas ácidas (UI/mg de proteína) de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína (A=harina de pescado, B=CPSP, C=harina de almeja, D=tentáculo de calamar liofilizado, E=almeja liofilizada, F=jaiba fresca). Valores como promedio + E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 2. ....	43
Gráfica 10. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las proteasas de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2. ....	44

Gráfica 11. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de la tripsina en juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2. ....	44
Gráfica 12. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de la quimotripsina en juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2. ....	45
Gráfica 13. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las fosfatasas ácidas de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína. Experimento 2. ....	45
Gráfica 14. Efecto de la mezcla de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca) sobre la tasa de crecimiento específico (TCE % por día) de juveniles de <i>O. maya</i> . Valores como promedio + E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 3. ....	47
Gráfica 15. Porcentaje de sobrevivencia de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca). Experimento 3. ....	48
Gráfica 16. Actividad enzimática de las proteasas totales (UI/mg de proteína) de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca). Valores como promedio + E.S. Experimento 3. ....	49
Gráfica 17. Actividad enzimática de la quimotripsina (UI/mg de proteína) en juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca). Valores como promedio + E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 3. ....	50
Gráfica 18. Actividad enzimática de las fosfatasas ácidas (UI/mg de proteína) de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína (A=CPSP-tentáculo de calamar liofilizado, B=tentáculo de calamar liofilizado- jaiba liofilizada, C=CPSP-jaiba liofilizada, D=jaiba liofilizada, E=jaiba fresca). Valores como promedio + E.S. Experimento 3. ....	51
Gráfica 19. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las proteasas totales de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína. Experimento 3. ....	52
Gráfica 20. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de la quimotripsina en juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína. Experimento 3. ....	52

Gráfica 21. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las fosfatasas ácidas de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con mezclas de diferentes fuentes de proteína. Experimento 3. ....	53
Gráfica 22. Efecto diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas sobre la tasa de crecimiento específico (TCE % por día) de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con las mismas. Valores como promedio + E.S. Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 4. ....	55
Gráfica 23. Porcentaje de sobrevivencia de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína a las que se les extrajeron las grasas y en algunos casos se les readicionaron HUFAS (A=Tentáculo sin grasas, B=Jaiba sin grasas, C=CPSP sin grasas, D=Tentáculo de calamar con HUFAS, E=Jaiba con HUFAS, F=CPSP con HUFAS). Experimento 4. ....	56
Gráfica 24. Actividad enzimática de las proteasas totales (UI/mg de proteína) de juveniles culticados de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína a las que se les extrajeron las grasas y en algunos casos se les readicionaron HUFAS (A=Tentáculo sin grasas, B=Jaiba sin grasas, C=CPSP sin grasas, D=Tentáculo de calamar con HUFAS, E=Jaiba con HUFAS, F=CPSP con HUFAS). Valores como promedio + E.S. Distintas letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 4. ....	57
Gráfica 25. Actividad enzimática de la tripsina (UI/mg de proteína) de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína a las que se les extrajeron las grasas y en algunos casos se les readicionaron HUFAS (A=Tentáculo sin grasas, B=Jaiba sin grasas, C=CPSP sin grasas, D=Tentáculo de calamar con HUFAS, E=Jaiba con HUFAS, F=CPSP con HUFAS). Valores como promedio + E.S. Distintas letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 4. ....	58
Gráfica 26. Actividad enzimática de la quimotripsina (UI/mg de proteína) de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína a las que se les extrajeron las grasas y en algunos casos se les readicionaron HUFAS (A=Tentáculo sin grasas, B=Jaiba sin grasas, C=CPSP sin grasas, D=Tentáculo de calamar con HUFAS, E=Jaiba con HUFAS, F=CPSP con HUFAS). Valores como promedio + E.S. Distintas letras indican diferencias entre tratamientos. Experimento 4. ....	59
Gráfica 27. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de las proteasas totales de juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas. Experimento 4. ....	60
Gráfica 28. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de la tripsina en juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas. Experimento 4. ....	60
Gráfica 29. Relación entre la tasa de crecimiento específica (TCE % peso por día) y la actividad enzimática (UI/ mg de proteína) de la quimotripsina en juveniles de <i>O. maya</i> alimentados con diferentes fuentes de proteína desengrasadas y reengrasadas. Experimento 4. ....	61