



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**



**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**BASES NUTRICIONALES PARA EL CULTIVO DEL PULPO**  
***Octopus maya* (Mollusca : Cephalopoda, Voss y Solis, 1966)**

**Estudiante: Biol. Abel Josué Águila y Elvira**

**Director de tesis: Dr. Carlos Rosas Vázquez**



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.

## **DEDICATORIAS**

### **A MIS PADRES**

### **A MIS HERMANAS**

### **A MIS PADRINOS**

Gracias por todo su apoyo, paciencia y sobre todo amor, el estar lejos me hace valorarlos más y sentirme orgulloso de la familia que tenemos.

### **“MADRE TE AMO”**

### **A VIANEY, ITZEL Y AL BB**

Gracias por darle a mi vida tanta felicidad

### **A mis amigos y compañeros de la universidad y de la UMDI**

Israel, Hugo, Alfredo, Rene, Marco y al grupo de pulperos especialmente a  
Morris

Parte esencial de mi vida y que aligeran los momentos difíciles

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Dr. Carlos Rosas**

Por ser guía para la elaboración de esta tesis y permitirme entrar al mundo de la investigación, así mismo le agradezco enormemente la confianza y apoyo tanto profesional como personal.

### **Dra. Gabriela Gaxiola**

Por sus enseñanzas, calidad humana, paciencia e interés en mi formación profesional

### **Dr. Agustín Hernández Herrera**

Gracias por su interés en la revisión cuidadosa y valiosas observaciones de esta tesis.

### **Dr. Edgar Zenteno Galindo**

Gracias por cederme un poco de su valioso tiempo con sus apreciables observaciones

### **Dr. Luis Soto Gonzalez**

Gracias por sus comentarios importantes para la culminación de la tesis

Este trabajo fue realizado en las Instalaciones de la UMDI UNAM sede Sisal, Yucatán, en la infraestructura aportada por PAPITT IN216006 y una beca de CONACYT a través del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM y una beca perteneciente al proyecto SAGARPA-CONACYT 11720

## INDICE

ABSTRACT	3
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Morfología del aparato digestivo de cefalópodos	7
Glándula intermedia	9
Estructura de la glándula digestiva	10
Fisiología de la digestión	10
Enzimas digestivas	10
Digestión de proteínas	11
Digestión de carbohidratos	11
Digestión de lípidos	12
Locales de absorción	12
Tasa de ingestión	13
Ruta del alimento	13
Duración de la digestión	14
Tasas de conversión	15
Balance energético	15
HIPOTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES.	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
a. Condiciones experimentales	18
b. Alimento y alimentación.	18
c. Crecimiento y sobrevivencia.	20
d. Balance energético.	21
e. Metabolitos sanguíneos.	24
f. Lípidos totales.	27
g. Enzimas digestivas.	27

RESULTADOS	29
Exp. 1.	
Efecto del nivel de proteínas de la dieta.	30
a. Crecimiento y sobrevivencia.	30
b. Enzimas digestivas.	30
c. Proteínas.	34
d. Hemocianina.	34
e. Glucógeno.	35
f. Lípidos totales.	36
g. Condición Fisiológica.	37
h. Balance energético.	37
Exp. 2	
Efecto de diferentes niveles de hidrolizado de pescado	40
a. Crecimiento y sobrevivencia	41
b. Enzimas digestivas	42
c. Metabolitos en sangre	48
d. Glucógeno	50
e. Lípidos totales	51
f. Condición Fisiológica	51
g. Balance energético	52
DISCUSION	57
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	72

## **ABSTRACT**

*Octopus maya* is a carnivorous species and protein is the main energy source. Taking into consideration protein needs for metabolism in the present study two experiments were done. In the first one two dietary protein levels (40 and 60% CP) were tested. In the second 5 different levels of fish soluble protein concentrate (SPCP; 0% 5% 10% 15% and 20%) were offered as an artificial diet. Frozen crab (*Callinectes spp*) was used as a control diet in both experiments. The form in which dietary protein level modulates the digestive capacity, the accumulated energy in tissue and energy budget of octopuses was evaluated through digestive enzyme activity in different tissues (salivary glands: anterior and posterior, digestive gland, pancreas and crop), energy content (muscle and digestive gland) and food ingestion, oxygen consumption, ammonia excretion and growth of juveniles of *O. maya*. Glycogen and total lipids accumulated in muscle and digestive gland were measured in order to determine how nutrients modulate reserves at tissues level. Results obtained in the present study demonstrated that crab is one of the best diets for *O. maya*. The artificial diet with 60%CP produced a low but positive growth rate, and in some cases, a physiological response similar to that observed in octopuses fed crabs. Also the diet with 15% of SPCP showed the best growth although lower than observed in octopuses fed crab. The present results show the capacity of *O. maya* juveniles to adjust their digestive enzymes to different types of food and protein level appears to be well correlated with growth.

## **RESUMEN**

El pulpo *Octopus maya* es una especie carnívora y las proteínas son la fuente principal de energía. Tomando en consideración que la proteína es necesaria para el metabolismo, en el presente estudio se formulo una dieta con dos niveles diferentes de proteína (40 y 60% PC) y otra con 5 diferentes niveles de hidrolizado de pescado (0% 5% 10% 15% y 20%) y se ofreció como una dieta

artificial y Cangrejo fresco congelado (*Callinectes sp*) se usó como una dieta control en los experimentos. La forma en que el nivel de la proteína modula la capacidad digestiva y la energía acumulada en los tejidos para el crecimiento se midió a través de la actividad de las enzimas digestivas (proteasas, tripsina y leucin amino-peptidasa) en glándulas salivales anteriores y posteriores, páncreas, ciego y glándula digestiva. La cantidad de energía en músculo, ingestión del alimento, consumo de oxígeno, excreción de amonio y crecimiento de juveniles de *O. maya*. Glucogeno y lípidos totales contenidos en músculo y la glándula digestiva fueron medidos para determinar cómo los nutrientes modulan reservas de los tejidos. Resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que el cangrejo es una de las mejores dietas para *O. maya*. La dieta artificial con 60% PC produjo una proporción de crecimiento baja pero positiva, y en algunos casos, una respuesta fisiológica similar a lo observado en pulpos alimentados con cangrejos. Así mismo, la dieta con 15% de hidrolizado de pescado mostró los mejores crecimientos, aunque baja en relación con los organismos alimentados con cangrejo. Los resultados presentes muestran la capacidad de juveniles de *O. maya* de ajustar sus enzimas digestivas a los diferentes tipos de comida y nivel de proteína, y esto parece tener relación con el crecimiento del pulpo.

## INTRODUCCION

Los cefalópodos se caracterizan por tener ciclos de vida cortos, que pueden llegar a ser de apenas 6 o 9 meses de edad (Okutani, 1990; Forsythe, 1981; Domingues *et al.*, 2001a, 2001b, 2002). Sin embargo, la mayoría de las especies vive de uno a dos años (Mangold, 1983). Se reproducen apenas una vez en su vida (Mangold, 1983). Son depredadores activos, que poseen un papel determinante en las estructuras tróficas de los océanos, y son también un importante recurso pesquero (Boletzky y Hanlon, 1983), siendo consumidos regularmente en diversas regiones de la tierra (Lee *et al.*, 1998).

En los últimos años se ha incrementado el interés en diversas especies de cefalópodos, principalmente en las ciencias biológicas y médicas, siendo estos animales usados como modelos de investigación al nivel de las ciencias neurológicas, fisiología, inmunología, bioquímica nutricional, envejecimiento, ontología, etología y biología molecular (Gilbert *et al.*, 1990; Oestman *et al.*, 1997).

El pulpo *Octopus maya* es una especie litoral que se distribuye en la Bahía de Campeche, la parte Norte de las costas de la península de Yucatán y también desde la punta Sur de Yucatán hasta Isla Mujeres (Solís, 1967). Más recientemente se amplió el intervalo de su distribución, que es desde Ciudad del Carmen, Campeche, a Isla Mujeres (Solís-Ramírez 1994; 1997). Ocupa fondos lodosos o calcáreos, con escondites ocasionales, pudiendo también ser encontrados en las praderas de pastos marinos formados principalmente por *Thalassia testudinum* (Solís, 1967).

*Octopus maya* presenta fácil adaptación a vivir en cautiverio, acepta alimento balanceado y fresco y posee un alto precio en el mercado. (Voss y Solís 1966). La tasa de crecimiento de los pulpos en general es muy alta. Aunque los pesos máximos de *O. maya* (3.5 kg en promedio) son menores que los observadas en *O. vulgaris* (12.5 kg en promedio) su tasa de crecimiento resulta atractiva pues

se sabe que *O. maya* alcanza su peso máximo entre los 8 y 9 meses después de la eclosión de los juveniles (Santos-Valencia 2000).

La mayoría de las especies de pulpos y demás cefalópodos tienen huevos pequeños con desarrollo larvario complejo (Boletzky, 1974). Contrario a lo que ocurre con estas especies como *Octopus vulgaris* (Villanueva, 1994), las que presentan huevos grandes y de desarrollo directo, y que aceptan dietas muertas después de las primeras fases de desarrollo son las más atractivas para la acuicultura, principalmente a nivel comercial, y han sido cultivadas en pequeña o media escala durante los últimos años. Entre estas está *O. maya* que ha sido cultivado en el laboratorio (Solis, 1967; Van Heukelem, 1976; 1977; DeRusha *et al.*, 1989), incluso por 4 (Hanlon y Forsythe, 1985) o 5 generaciones consecutivas (Van Heukelem, 1983). Esta especie puede alcanzar 1 Kg en 4 meses, y llegar a pesos superiores a los 3 Kg en 9 meses, cuando es cultivada a 25°C (Van Heukelem, 1983).

El ciclo de vida para *O. maya* fue determinado entre 8 y 12 meses (Hanlon y Forsythe, 1985), y entre 9 y 10 meses (Van Heukelem, 1983), para temperaturas de cultivo entre 25 y 30°C. El desarrollo embrionario para esta especie varía entre los 50 y los 65 días en el medio natural (Solis, 1967). Van Heukelem (1983) indica un desarrollo embrionario de 45 días a temperaturas entre 24 y 26°C. Los recién nacidos de esta especie pesan en promedio 0.1 g (Van Heukelem, 1983; Hanlon y Forsythe, 1985), y presentan un comportamiento similar al de los adultos (Hanlon y Forsythe, 1985). Durante las primeras fases del ciclo de vida es esencial que sean alimentados con presas vivas de tamaño adecuado. Entre estas están los misidáceos (Hanlon y Forsythe, 1985), o los gamarídeos, anfípodos e isópodos (Van Heukelem, 1983). Los juveniles pueden ser alimentados con gasterópodos y almejas cangrejos entre otras presas naturales. De preferencia se deben ofrecer presas vivas, porque el canibalismo aumenta cuando las dietas son muertas (Van Heukelem, 1983). Las tasas de alimentación (a temperaturas medias de 25°C) varían entre

20 % de su peso por día en las primeras fases de la vida, hasta un 5% al acercarse la etapa reproductiva (Hanlon y Forsythe, 1985). El sexo de esta especie no se puede determinar hasta por lo menos a los 3 meses de edad. Las gónadas de los individuos de esta especie aparecen entre los 3 y 5 meses de edad (25-450 g). El hectocotilo (tercer brazo derecho especializado y modificado en el macho para depositar los espermatoforos en el manto de la hembra) empieza a desarrollarse entre el cuarto y quinto mes de edad. La puesta suele ocurrir después de los 8 meses de edad, y la fecundidad real (huevos producidos) para esta especie varía entre 300 y 5000 por hembra. La hembra permanece junto a los huevos, airándolos y dándoles protección hasta que nacen las crías, y no sobrevive a la puesta (Van Heukelem, 1983). La mortalidad en los tanques de cultivo es baja (Van Heukelem, 1983). Hanlon y Forsythe (1985) reportan mortalidades entre 20 y 30% para la totalidad del ciclo de vida.

Uno de los factores más importantes que han impedido el desarrollo de la acuicultura de cefalópodos a escala comercial es la dependencia en dietas naturales para su alimentación (O'Dor y Wells, 1987; Lee *et al.*, 1991). Hay varias dietas naturales con que se pueden cultivar y mantener cefalópodos en cautiverio (Boletzky y Hanlon, 1983; DeRusha *et al.*, 1989; Castro *et al.*, 1993; Domingues *et al.*, 2002, 2003.). En el cultivo de cefalópodos, más del 50% del trabajo está asociado a la captura, mantenimiento o cultivo de las presas (Lee, 1994). Hasta el presente, se han realizado algunos intentos para producir dietas artificiales para pulpos y también para *S. officinalis* con resultados poco alentadores (DeRusha *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 1993; Castro y Lee, 1994; Domingues, 1999). Por los motivos descritos anteriormente, es también de vital importancia la determinación de los requerimientos nutricionales y ambientales básicos para cefalópodos, tanto a través del desarrollo de dietas artificiales equilibradas, eficientes y atractivas para *Octopus maya*, como la determinación de los factores físicos y ambientales más relevantes para la optimización del cultivo.

## **Morfología del aparato digestivo de cefalópodos**

La morfología del aparato digestivo determina la eficiencia con que estos organismos utilizan los nutrientes del alimento. Los cefalópodos tienen un modo de digestión similar al de los vertebrados, con secreciones pancreáticas de enzimas extracelulares y absorción tipo intestinal de pequeñas moléculas (en el ciego y el intestino); algunas especies presentan digestión intracelular (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983). El tracto digestivo de los cefalópodos tiene forma de U (Fig. 1). El ramo descendente, o parte anterior, incluye el esófago y el estomago. El ramo ascendente, o parte posterior, es constituido por el ciego (en forma de espiral) y un intestino de pequeñas dimensiones (Bidder, 1966; Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983). El ano se sitúa en posición posterior al sifón con excepción de los nautilus. La bolsa de tinta libera sus secreciones a través de un canal que está conectado al intestino, no muy alejado del ano (Bidder, 1966).

El esófago termina y el intestino comienza en donde se dobla el aparato digestivo, en el vestíbulo, que es la región hacia donde abren tanto el estomago como el ciego. Válvulas (esfínteres) permiten al estomago y el ciego estar aisladas del resto del aparato digestivo. Los dos canales digestivos, originados en la glándula digestiva, se unen justo antes del eje de la espiral del ciego. Una estría digestiva que conecta el ciego al vestíbulo permite que exista un pasaje libre entre la glándula intermedia y el estomago (Bidder, 1966). La estría digestiva y los esfínteres permiten que sustancias presentes en el estomago pasen a los canales digestivos o al intestino, y el flujo inverso, de los canales digestivos al estomago directamente, sin pasar por el ciego. Este mecanismo es muy importante y debe tenerse en cuenta para que podamos entender los procesos digestivos en los cefalópodos (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983).

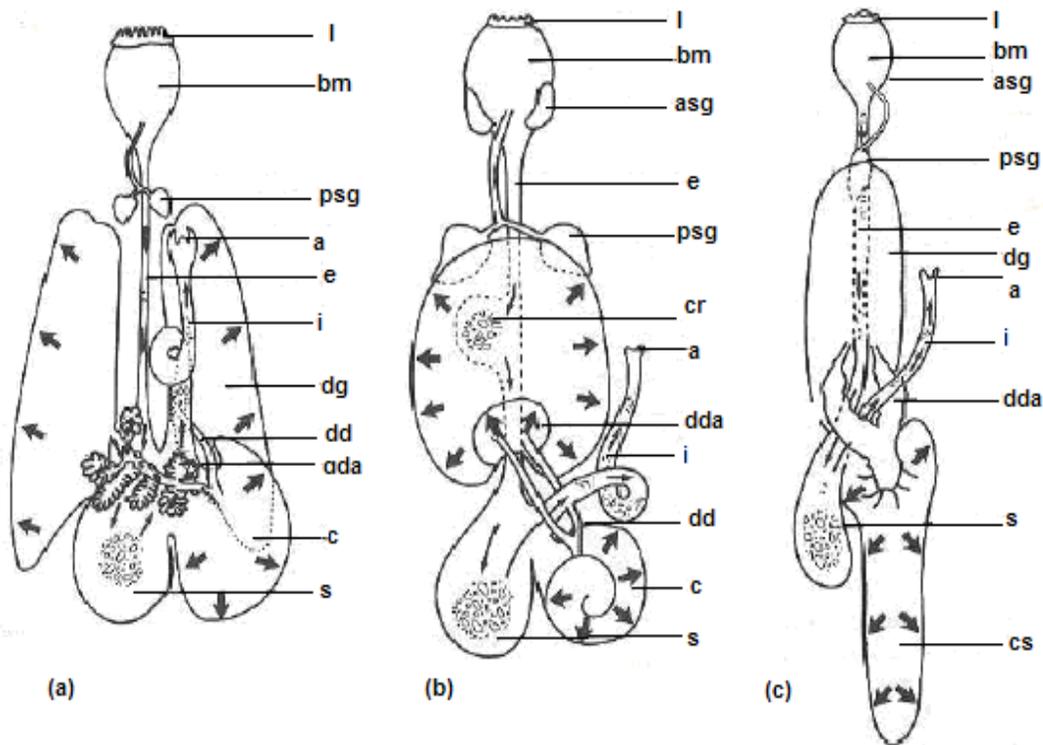


Figura 1 – Órganos digestivos de (a) *Sepia officinalis*, (b) *Octopus vulgaris* y (c) *Loligo vulgaris*. La bolsa de tinta no está representada. A, ano; asg, glándula salivar anterior; bm, masa bucal; c, ciego; cs, bolsa del ciego; dd, canales digestivos; dda, apéndices de los canales digestivos; dg, glándula digestiva; i, intestino; l, labios; e, esófago; psg, glándula salivar posterior; s, estomago. Las flechas finas indican el flujo de las partículas sólidas en el tracto digestivo. Las flechas gruesas indican sitios de absorción. (Bidder, 1966).

### Glándula Intermedia

En la mayoría de los cefalópodos (Coleoidea), la glándula intermedia se divide en dos partes de tamaño distinto, conectadas en serie; la parte anterior es la glándula digestiva, de color marrón, y la parte posterior es el páncreas, que está constituido por apéndices formados a partir de los canales digestivos (Fig. 1). En los pulpos, el páncreas está localizado dentro de la cápsula de la glándula digestiva (Fig. 1). En los cefalópodos decápodos el páncreas se sitúa en la bolsa del riñón, mientras que en los sepioidea cada tubo está cubierto por un epitelio celómico (Best, 1981).

## **Estructura de la glándula digestiva**

La glándula digestiva, además de sus funciones digestivas, es también un local de almacenamiento de reservas energéticas. Su color es acastañado, debido a la presencia de pigmentos (carotenos) provenientes de las presas que componen la dieta de los diferentes cefalópodos (Fox, 1966; Altman y Nixon, 1970). La glándula digestiva de los calamares, que se alimentan mayoritariamente de peces, no es tan rica en carotenos, en comparación con las de los pulpos o sepioidea, cuya dieta es mayoritariamente compuesta por crustáceos, ricos en este pigmento (Fox, 1966). Por ejemplo, la glándula digestiva de pulpos que se alimentan exclusivamente de peces tiene un color verde (Altman y Nixon, 1970).

En los adultos, la glándula digestiva es normalmente compuesta por un simple órgano, exceptuando los sepioidea (*Sepia* sp.), donde se distinguen fácilmente los dos lóbulos de la glándula. Este órgano se compone de diversos canales que abren en los canales digestivos.

## **FISIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN**

### **Enzimas digestivas:**

Enzimas proteolíticas, amilásicas y lipolíticas existen en distintos órganos del aparato digestivo; Su actividad varía de acuerdo con cada órgano, y estado de digestión. A pesar de que se haya encontrado actividad enzimática en todos los niveles del aparato digestivo, apenas algunos órganos poseen este tipo de actividad a nivel epitelial.

Los principales órganos que segregan enzimas digestivas son las glándulas intermedias, la glándula digestiva, el ciego y los canales digestivos. Ni el estómago, ni el esófago segregan enzimas. Así, las enzimas digestivas que degradan los alimentos en estos dos órganos tiene proveniencia de otros

órganos, principalmente de las glándulas salivares o digestiva (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983).

La actividad enzimática digestiva en adultos de pulpo (*O. vulgaris*) fue descrita por Morishita (1974) y Boucher-Rodoni *et al.*, (1987). La localización de las enzimas digestivas en juveniles fue descrita por Boucaud-Camou y Roper (1995, 1998). En paralarvas silvestres, la actividad proteolítica fue detectada en las glándulas salivares posteriores, glándula digestiva, estomago y ciego (Boucaud-Camou y Roper, 1995).

### **Digestión de proteínas:**

Según Lee (1994), la digestibilidad de proteínas en cefalópodos es alta (96%). La actividad proteolítica existe en el lumen del aparato digestivo, desde el esófago al intestino, usualmente más cerca del epitelio (Boucaud Camou, 1973). Esta actividad se origina en varias secreciones de distintos órganos; las glándulas salivares y digestiva, el ciego y el intestino. En las glándulas salivares posteriores de *Sepia* no se encontró actividad enzimática (Boucaud-Camou, 1969), mientras en los pulpos se observó actividad proteolítica en las glándulas salivares posteriores (Sawano, 1935; Morishita, 1974), estando en este caso probablemente asociados a la digestión externa. Morishita (1974) indica que las glándulas salivares posteriores desempeñan un papel importante en la digestión de proteínas. También Best (1981) presentó fuerte evidencia de este hecho en pulpos. En calamares, como *Todarodes* sp., que poseen glándulas salivares reducidas, la glándula digestiva, por su tamaño, es responsable por casi 90% de toda la actividad proteolítica (Takahashi, 1960). También Koslovskaya y Vaskovsky (1970) describen elevada actividad proteolítica en varias especies de cefalópodos. Sawano (1935) y Takahashi (1960) encontraron actividad proteolítica también en los canales digestivos de pulpos y calamares.

### **Digestión de carbohidratos:**

Un incremento en el nivel de glucosa en la sangre, proporcional a la concentración de carbohidratos en la dieta fue descrito por Boucaud-Camou

(1969). Una actividad enzimática de digestión de carbohidratos fue encontrada en el lumen intestinal en *Sepia* (Boucaud-Camou, 1969; 1973) y en la glándula digestiva para *Sepia* sp., *Todarodes* sp., *Loligo* sp. y *Eledone* sp. (Romijn, 1935; Takahashi, 1960; 1963; Boucaud-Camou, 1969; 1973). Igual que para las proteínas, no se pudo encontrar digestión de carbohidratos en el esófago o el estomago de cefalópodos, y las glándulas salivares de *Sepia*. Al revés, Romanini (1952) encontró este tipo de digestión en las glándulas salivares de pulpos.

La glándula digestiva presenta fuerte actividad en la digestión de carbohidratos. En *Sepia*, las amilasas fueron detectadas histoquímicamente en la lumina de los canales digestivos (Romijn, 1935; Boucaud-Camou, 1974), y la celulaza en la glándula digestiva de pulpos (d'Aniello y Scardi, 1971) y calamares (Okutani y Kimata, 1964).

### **Digestión de lípidos:**

La glándula digestiva y el ciego son los mayores órganos de absorción de lípidos, aunque esta actividad sea reducida (Romijn, 1935; Takahashi, 1960; 1963). Lee (1994) indica tasas de digestión de lípidos de 46% para *O. vulgaris*. O'Dor *et al.*, (1983) refiere que los cefalópodos tienen baja digestibilidad de lípidos, y pobre eficacia en oxidarlos.

### **Locales de absorción:**

El ciego es el principal órgano de absorción en los cefalópodos. La superficie del epitelio del ciego está aumentada por numerosos dobleces de la pared, y este hecho, está directamente relacionado con los procesos digestivos (Bidder, 1950). Boucaud-Camou (1977) comprobó la polaridad de la mucosa. La absorción ocurre en la parte elevada del doblez, mientras que las enzimas digestivas se concentran en la ranura. La importancia del ciego en la absorción es mayor en los pulpos que en la *Sepia* (Boucaud-Camou *et al.*, 1976). En los calamares (loliginidae), el largo ciego, pero también el intestino, son los principales órganos de absorción (Bidder, 1950). La glándula digestiva también

tiene un papel muy importante en la absorción. Usando alimento marcado, Boucaud-Camou y Péquignat (1973) indican que la absorción tiene lugar temprano en *Sepia*, en este órgano. Contrariamente, en *Loligo* sp. (Calamares), en la glándula digestiva no hay absorción (Bidder, 1966). Los canales digestivos son de los órganos más importantes en absorción en *Sepia* (Boucaud-Camou y Péquignat, 1973), pues siempre revelan gran actividad específica. Fue en este epitelio interno donde se registró mayor absorción de alimento marcado radiactivamente. En pulpos y *Sepia*, el intestino no parece tener un papel importante en la absorción de alimento, a pesar de que su estructura histológica es semejante a la del ciego, pero en calamares (*Loligo* sp.) es un órgano importante de absorción de lípidos (Bidder, 1950).

#### **Tasa de ingestión:**

Las tasas de ingestión dependen de la temperatura del agua (Richard, 1971; Boletzky, 1975; Domingues *et al.*, 2002), del alimento disponible y del tipo de presa que sirve de alimento (Mangold, 1983). Las tasas de ingestión de los cefalópodos pueden llegar al 50% peso día<sup>-1</sup> (Mangold, 1983; Boucher-Rodoni *et al.*, 1987; Domingues *et al.*, 2001a), pero disminuyen con la edad (Nixon, 1966; Domingues *et al.*, 2002). La tasa de ingestión está también determinada por la cantidad de alimento disponible (Richard, 1971; Pascual, 1978; Domingues *et al.*, 2001b; 2002).

García y Giménez (2002), reportan tasas de ingestión más elevadas para hembras antes de la fase de maduración. Una vez que las hembras necesitan más nutrientes y energía para la producción de huevos, comparado con los machos (O'Dor y Wells, 1978), esta elevada tasa de ingestión puede estar asociada a las necesidades de la reproducción.

#### **Ruta del alimento:**

El alimento pasa de la cavidad bucal al esófago y por movimientos peristálticos al estómago. Aquí, este es parcialmente descompuesto,

esencialmente por acción de enzimas elaboradas en la glándula digestiva, y también, en algunos casos, de glándulas salivares. El fluido digestivo entra seguidamente al ciego, a través de los canales digestivos y la glándula digestiva, por lo menos en *Sepia* y en los pulpos. El alimento que entra al ciego entra en las fases terminales de digestión, y es seguidamente absorbido en este órgano. En calamares como *Loligo* sp., el alimento no entra a la glándula digestiva, y es absorbido en los largos ciego e intestino (Bidder, 1966).

### **Duración de la digestión:**

La digestión en cefalópodos es más rápida que en peces (Boucher-Rodoni, 1975). La temperatura del agua es el factor de mayor importancia para determinar el tiempo de digestión, el cual varía entre especies. Otro factor importante que determina la duración de la digestión es el tipo de hábitat del cefalópodo en cuestión (bentónico, semi-bentónico o pelágico, siendo generalmente asociados a este tipo de hábitat los pulpos, la *Sepia* y los calamares, respectivamente). A una determinada temperatura, el tiempo de digestión es más elevado para una especie bentónica, comparado con una especie pelágica (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983). La cantidad de alimento ingerido no parece tener efecto sobre el tiempo de digestión, a no ser que sea una cantidad bastante reducida.

En todas las especies de cefalópodos, la velocidad de digestión es muy elevada durante las fases iniciales de la digestión, disminuyendo considerablemente en fases posteriores. Estos animales pueden ingerir otra presa aun antes de haber terminado la absorción de la anterior (Bidder, 1966). Estos procesos digestivos en fases sucesivas, en el estomago, ciego, y por lo menos en pulpos y *Sepia*, en la glándula digestiva, hacen posible la digestión de dos comidas simultáneamente, lo que permite a los cefalópodos un potencial proceso digestivo de extraordinaria eficiencia (Bidder, 1966; Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983).

### **Tasas de conversión:**

Los cefalópodos son animales que presentan tasas de crecimiento muy rápidas (Nixon, 1966; Choe, 1966; Richard, 1971; Mangold y Boletzky, 1973; Van Hewkelem, 1983; Forsythe *et al.*, 1994; Lee, 1994; Domingues *et al.*, 2001a, 2001b, 2002, 2003). Durante el proceso de crecimiento, la ingestión, absorción y tasas de conversión de alimento son etapas sucesivas que transforman el alimento ingerido en tejido animal.

Las tasas de conversión son muy altas, en comparación con los peces, por ejemplo (Choe, 1966; Nixon, 1966; Mangold, 1983; Domingues *et al.*, 2003; 2004). Siendo de las más elevadas encontradas en el reino animal, y que suelen ser superiores al 50% (Amaratunga, 1983; Van Hewkelem, 1976, 1977; 1983; Mangold, 1983; Forsythe y Van Hewkelem, 1987; Domingues *et al.*, 2004). Choe (1966) indica tasas de conversión que varían entre 9 y 71% peso día<sup>-1</sup>, con promedios de 38.7%, aunque Domingues *et al.*, (2001a; 2004) reporta que estas suelen variar entre 35 y 50%. Según Nixon, (1966), en pulpos, la conversión de alimento varía entre 25 y 55% durante el ciclo de vida. Tasas de conversión suelen ser más altas con crustáceos ( $\pm 50\%$ ) que con peces (25 a 30%) (Domingues *et al.*, 2003; 2004).

Según Van Hewkelem (1976), para *Octopus cyanea*, del valor calórico, el porcentaje convertido, usado para mantenimiento, funciones vitales, y no utilizado es de 60, 34 y 4%, respectivamente.

### **Balance energético.**

El consumo de oxígeno y las tasas de excreción del amonio de *O. vulgaris* han sido estudiadas a fondo por Wells *et al.* (1983) encontrando que la alimentación y el movimiento conducen a los aumentos grandes en el consumo del oxígeno y que los picos nocturnos representan períodos de actividad

importante con gastos energéticos. Así mismo Wells *et al.* (1983) determinaron que el costo metabólico de nadar para los pulpos, es cerca de tres veces el costo de nadar para un pescado de tamaño similar.

El consumo de oxígeno y la excreción de amonio se ve afectada por la actividad y alimentación. Boucher-Rodoni y Mangold (1985) encontraron que en *O. vulgaris*, el hambre induce una declinación en el consumo de oxígeno y mas aun en la excreción de amonio y un aumento en el cociente atómico de O/N.

Parra *et al.* (2000) midieron la tasa de respiración en juveniles tempranos de *O. vulgaris*. Encontrando que el consumo de oxígeno aumenta repentinamente (aproximadamente tres veces), en respuesta al aumento en los gastos energéticos debido a la actividad constante de la natación.

## **HIPÓTESIS**

Si los juveniles de pulpo tienen tasas de crecimiento elevadas cuando se les alimenta con cangrejos frescos o congelados entonces cuando sean alimentados con una dieta balanceada con composición similar a esos cangrejos mostrarán un comportamiento fisiológico, bioquímico y energético equivalente.

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la forma en que las proteínas del alimento modulan la cinética de la digestión y el flujo de energía en juveniles del pulpo *Octopus maya* en condiciones controladas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Determinar el efecto del nivel de proteínas de la dieta y del nivel de inclusión optima de hidrolizado de pescado en el crecimiento y

supervivencia de juveniles de *Octopus maya* en condiciones de laboratorio.

2. Determinar el efecto del nivel de proteínas de la dieta y del nivel de inclusión óptima de hidrolizado de pescado en la cinética de las enzimas digestivas de juveniles de *Octopus maya* en condiciones de laboratorio.
3. Determinar el efecto del nivel de proteínas de la dieta y del nivel de inclusión óptima de hidrolizado de pescado en el balance energético de juveniles de *Octopus maya* en condiciones de laboratorio.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

La colecta de los pulpos se realizó en la costa frente al puerto de Sisal, Yucatán mediante el método de gareteo. Este método consiste en la captura de organismos en una embarcación dotada de dos carrizos o jimbas de 4 a 5 m de longitud colocadas cada una en la proa y popa. A lo largo de estas y a un costado del bote se atan líneas de hilo nylon las cuales tienen en el extremo libre de la línea una jaiba como carnada. Aproximadamente a 20 cm de la jaiba se coloca un plomo. El bote entonces, se deja al garete o deriva, las líneas cuyo cebo es atrapado por el pulpo manifiestan cierta tensión y de inmediato se levanta y se sujeta al pulpo con la mano.

Los pulpos fueron transportados a la Unidad Multidisciplinaria de docencia e Investigación de la UNAM ubicada en Sisal, Yucatán. Los animales se colocaron en estanques de 5m de diámetro para su aclimatación. Posteriormente, se selecciono un grupo de 30 organismos de entre 200 y 800g y se trasladaron al laboratorio donde fueron sexados y pesados utilizando una balanza granataria ( $\pm 0.05g$ ) y posteriormente se fueron colocando individual y aleatoriamente en tanques de 80 L de capacidad (fig. 2) acondicionados con aireación constante y flujo de agua de mar natural equivalente a un recambio de 300% diario. En tales condiciones es posible asegurar niveles de nitrógeno amoniacal y nitrito por debajo de 0.1 mg/l, el nitrato por debajo de 50 mg/l y de pH entre 7.7 y 8.2 (Rosas *et al.*, 1997). Estos valores han sido recomendados como los más adecuados para el mantenimiento y cultivo de diferentes especies de *Octopus*, incluyendo a *O maya* (Hanlon y Forsythe, 1985).

### **a. Condiciones experimentales**

Ambos experimentos tuvieron una duración de 40 días, en el primer experimento se formaron tres grupos de 10 organismos cada uno y 6 grupos de 10 organismos cada uno en el segundo experimento.



Figura 2. Tanques de 80 L en donde se llevaron a cabo los experimentos de nutrición con juveniles de *O. maya*.

### **b. Alimento y alimentación.**

El alimento utilizado fue diseñado considerando dos niveles de proteínas en el experimento 1 y 5 niveles de hidrolizado de pescado en el experimento 2. En ambos se utilizaron cangrejos congelados como dieta control. En los dos experimentos el alimento balanceado fue proporcionado a los organismos en forma de pasta. Brevemente, el alimento fue preparado en el laboratorio mezclando todos los ingredientes hasta formar una pasta que contenía un 5% de humedad. La pasta fue almacenada en frío hasta que fue utilizada como alimento.

La composición de los alimentos experimentales se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Composición de la dieta artificial para evaluar el efecto del nivel de proteínas de la dieta en juveniles de *O. maya*. Experimento 1.

Ingredientes g/100 g	Niveles de proteína	
	40%	60%
Harina de pescado (Menhaden)	34.16	41
BIOCP <sup>1</sup>	4.17	5
Profine <sup>2</sup>	8.33	10
H. calamar ( <i>Loligo spp</i> )	8.33	10
Suero de leche	16.7	20
Lecitina de soya	1	1
Aceite de pescado	0.8	0
Almidón de maiz	16.4	4
Vit. DMS <sup>3</sup>	1	1
Rovimix STAY-C <sup>4</sup>	0.5	0.5
Carófila <sup>5</sup>	0.016	0.016
Relleno <sup>6</sup>	7.594	6.484
Alginato (carboximetilcelulosa)	1	1

Tabla 2. Composición de la dieta artificial para evaluar el efecto del nivel de hidrolizado de pescado en juveniles de *O. maya*. Experimento 2.

Ingredientes g/100 g	Niveles de hidrolizado de pescado				
	0%	5%	10%	15%	20%
Harina de pescado (Menhaden)	41	41	41	41	41
BIOCP <sup>1</sup>	0	5	10	15	20
Profine <sup>2</sup>	10	10	10	10	10
H. calamar ( <i>Loligo spp</i> )	10	10	10	10	10
Suero de leche	25	20	15	10	5
Lecitina de soya	1	1	1	1	1
Aceite de pescado	0	0	0	0	0
Almidón de maiz	4	4	4	4	4
Vit. DMS <sup>3</sup>	1	1	1	1	1
Rovimix STAY-C <sup>4</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Carófila <sup>5</sup>	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016
Relleno <sup>6</sup>	6.484	6.484	6.484	6.484	6.484
Alginato (carboximetilcelulosa)	1	1	1	1	1

1 Concentrado proteico de pescado

2 Concentrado proteico de soya

3 Premezcla de vitaminas y minerales

4 Vitamina C

5 Pigmento

6 Talco simple

En ambos experimentos los organismos se alimentaron dos veces al día, a las 9:00 hrs y a las 16:00 hrs (al 20% de su biomasa corporal). Para hacer esto el alimento en forma de pasta fue colocado en conchas de cangrejo vacías las cuales fueron colocadas en los tanques en los horarios respectivos. Cada 10 días se pesaron los organismos para ajustar el alimento suministrado. Para hacer esto los pulpos fueron anestesiados con una mezcla de alcohol al 5% en agua de mar. Se utilizó una balanza granataria Ohaus con capacidad de 1.5 kg y sensibilidad de 0.1g

### **c. Crecimiento y sobrevivencia.**

Una vez concluido cada experimento se calculó la tasa de crecimiento específica (TCE), utilizando la ecuación:  $TCE = [(LnP_2 - LnP_1)/(T_2 - T_1)] \times 100$  donde  $P_1$  y  $P_2$  son el peso húmedo inicial y final (g), respectivamente y  $T_1 - T_2$  son el tiempo inicial y final del período experimental. La supervivencia de los organismos se obtuvo de la diferencia de los animales al inicio y al final del periodo de crecimiento.

#### **d. Balance energético.**

Para la evaluación del balance energético se utilizó la ecuación (joules  $g^{-1}$  por día)  $I = H + N + R + P$ , donde I es la energía ingerida, H la energía perdida en las heces, N la energía perdida en los productos de excreción nitrogenada, R la energía utilizada en la respiración y P la energía dirigida a la producción de biomasa (Lucas, 1993).

##### Energía Ingerida (I).

Todos los días se evaluó la tasa de ingestión a partir de la diferencia entre el peso del alimento suministrado y el recuperado 4 horas después. Únicamente se utilizaron los datos de ingestión procedentes del periodo de alimentación comprendido entre las 9 y las 13 h.

La tasa de ingestión fue corregida por el valor obtenido de un ensayo de lixiviación del alimento balanceado. Este ensayo se llevó a cabo colocando muestras de 1g de alimento en un matraz de 50 ml el cual estará en agitación constante por 2 horas. Al final de este tiempo el alimento fue recuperado en la misma forma que durante el experimento y puesto a secar a 60°C hasta peso constante. La diferencia entre el peso recuperado y el peso inicial, expresada en porcentaje fue utilizada como factor de corrección de la tasa de ingestión medida durante el experimento. Así, la energía ingerida fue calculada a partir del producto de la tasa de ingestión (g/día) por el valor energético del alimento ofrecido (joules/g) y expresada en joules/día por g de animal cultivado. El valor energético del alimento fue obtenido al analizar muestras de éste en una bomba calorimétrica Parr®.

##### Heces producidas (H).

Todos los días se recuperaron las heces producidas las cuales fueron almacenadas en la estufa a 60° para su posterior análisis. El valor calórico de las heces se obtuvo al igual que el del alimento utilizando una bomba calorimétrica Parr®.

Eficiencia de Asimilación (EA).

La eficiencia de asimilación se calculó a partir de la relación entre la proporción de materia orgánica contenida en el alimento y las heces (Pérez et al., 2006). Esto se obtuvo a partir de muestras de alimento y de las heces las cuales fueron secadas en una estufa a 60°C y luego incineradas en una mufla a 500°C. La EA se calculó con la ecuación:  $(A/I) \times 100$

Excreción nitrogenada (N) y respiración (R).

El metabolismo nitrogenado y el consumo de oxígeno de los pulpos experimentales se determinaron después de 40 días de experimento. Siete organismos de cada tratamiento se colocaron individualmente en cámaras respirométricas las cuales estaban conectadas a un sistema cerrado de circulación de agua de mar en el cual fue posible controlar las temperaturas experimentales. El consumo de oxígeno se determinó utilizando la ecuación:

$$VO_2 = (Oxi_e - Oxi_s) \times F,$$

donde  $Oxi_e - Oxi_s$  es la diferencia entre la concentración de oxígeno a la entrada y salida de la cámara y F es el flujo de agua. El consumo de oxígeno fue convertido a unidades de energía utilizando el coeficiente oxicalórico de 13.6 joules/mg  $O_s$  consumido.

En el presente estudio la respiración se consideró como la suma de la energía utilizada en el metabolismo de rutina (Rrut) y la invertida en las transformaciones mecánicas y bioquímicas del alimento ingerido (Rica). Rrut fue evaluada en animales con 24 h de ayuno (Rrut).

Una vez medida la  $R_{rut}$  se procedió a alimentar a los pulpos en las cámaras experimentales con una ración equivalente a la suministrada durante el periodo de crecimiento. Posteriormente el consumo de oxígeno de los animales fue monitoreado cada hora durante 12 horas. La  $R_{ICA}$  fue calculada a partir de la diferencia entre el consumo de oxígeno de los animales en ayuno y el máximo registrado después de haber alimentado a los animales.



Fig. 3. Cámaras respirométricas utilizadas para *O. maya*

Así mismo, durante estos experimentos se evaluó la tasa de excreción de amonio analizando muestras de agua antes y después de su paso por cada cámara tanto en animales en ayuno ( $N_{rut}$ ) como alimentados ( $N_{ENPA}$ ).

El valor del amonio excretado se transformo a su equivalente energético utilizando el factor de 20.5 joules/mg de amonio excretado, el cual se utilizo para evaluar la energía perdida en los productos de excreción nitrogenada (U).

El efecto del tipo de alimento sobre el balance energético de los juveniles de *O. maya* será integrado como  $I = R + P + N + H$ , donde R y N serán producto de la suma de  $R_{rut} + R_{ICA}$  y  $N_{rut} + N_{ENPA}$ , respectivamente.

## Eficiencias energéticas

Las eficiencias se utilizan con el objeto de realizar comparaciones entre distintas condiciones experimentales, tipos de alimento etc., cuyas características aunque son diferentes, pueden afectar de manera proporcional a los organismos estudiados.

### **e. Metabolitos sanguíneos.**

Después de cada evaluación del consumo de oxígeno y excreción nitrogenada los organismos se sacrificaron con el fin de conocer el efecto del tipo de alimento en la condición nutricional. Para hacer esto se utilizaron como indicadores diversos componentes sanguíneos tales como el lactato, colesterol, proteínas, acilglicéridos, glucosa y hemocianina. También se midió la presión osmótica la cual es un indicador del equilibrio hidromineral de los organismos. La sangre de los pulpos fue obtenida directamente de la aorta dorsal. Para evitar que el estrés de manipulación alterara los niveles de los componentes sanguíneos los pulpos fueron colocados por 30 minutos en agua de mar a 18°C. En el primer experimento la sangre fue recuperada después de haber hecho un corte directamente en la aorta. En el segundo experimento un catéter fue colocado directamente en aorta con el fin de obtener la mayor cantidad de sangre posible con el mínimo de manipulación (fig. 4).

Una vez obtenida la muestra de sangre fue colocada suavemente sobre una película plástica (Parafilm®) colocada sobre una placa fría. De la sangre así obtenida se tomaron submuestras las cuales fueron utilizadas para la determinación de los diferentes metabolitos sanguíneos analizados. Para medir la hemocianina (oxyHc) 10µL de hemolinfa fueron inmediatamente diluidos con 990 µL de agua destilada en una cubeta para UV de 10 mm (1.0 ml, 1 cm de espesor) en donde se midió la absorbancia a 350 nm. La concentración de oxyHc se determinó utilizando un coeficiente de extinción de  $E = 17.26$  calculado en base a una sub unidad de 74000 Da. Chen y Cheng (1993).

Simultáneamente 20  $\mu\text{L}$  de sangre fueron tomados para medir la presión osmótica utilizando un micro osmómetro (American Advanced Instruments). Los metabolitos sanguíneos se determinaron en plasma el cual fue obtenido de sangre diluida con anticoagulante frío ( $8^{\circ}\text{C}$ ; 1:2 sangre:Anticoagulante). La solución salina fue preparada de acuerdo a Vargas-Albores *et al* (1993) (450 mM NaCL, 10 mM KCL, 10 mM EDTA-  $\text{Na}_2$ , 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm  $\text{kg}^{-1}$ ). La hemolinfa más anticoagulante fue centrifugada a 800  $g$  por 3 min y el sobrenadante fue separado para la evaluación de la concentración de los metabolitos. Se utilizaron kits comerciales para la determinación de la glucosa, acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas. Estas determinaciones fueron hechas en 20  $\mu\text{L}$  de plasma la cual se mezcló con 200  $\mu\text{L}$  del reactivo en los pozos de una microplaca. La absorbancia fue registrada en un lector de micro placas (BIO-RAD modelo 550) y la concentración del metabolito fue calculada usando una curva de calibración. Las proteínas fueron determinadas en plasma diluido (1:300) utilizando la técnica de Bradford (1976) y albúmina bovina como estándar.

La capacidad osmótica (CO) se calculó de la diferencia entre la presión osmótica (PO) de la sangre y la PO del agua de mar.





Fig. 4. Evaluación sanguínea de *Octopus maya*

Así mismo se obtuvieron las gónadas, glándulas digestivas y una muestra de músculo (brazo) para el análisis calórico. Estas muestras se secaron en una estufa a 60°C, para luego ser analizadas en una bomba calorimétrica (fig. 5) (Parr@).

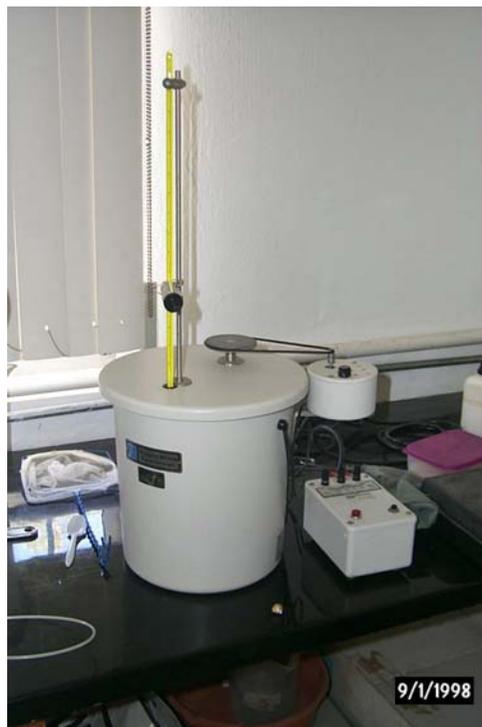


Fig. 5. Bomba calorimétrica utilizada para el análisis de las muestras de tejido, heces y alimento ofrecido a *O. maya*

#### **f. Lípidos totales**

Para la medición de lípidos totales en músculo y glándula digestiva se pesó una muestra del tejido en una balanza sartorius y posteriormente se homogenizó en un tubo añadiendo cloroformo-metanol. El tejido ya homogenizado se colocó en un matraz de 50ml y se puso en un agitador durante 15 min. Después de los 15 min. Se procedió a filtrar con ayuda de una bomba de vacío y papel filtro Watman No 42. Una vez filtrado se colocó la muestra en un embudo de separación y se le agregó agua-metanol, se agita y se deja reposar. Al observar la separación se vierte en frascos previamente pesados. Estos frascos se colocan en una campana de extracción y se retiran hasta que se evapore la muestra, posteriormente se pesan los frascos.

#### **g. Enzimas digestivas.**

Para la evaluación de la actividad enzimática, se extrajo durante el muestreo una muestra de páncreas, glándulas salivales anteriores y posteriores, ciego y glándula digestiva de cada organismo. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf, posteriormente estas muestras se asentaron en nitrógeno líquido, después fueron retiradas las muestras para ser colocadas a  $-40^{\circ}\text{C}$  en el REPCO hasta el momento de su evaluación.

Se prepararon los extractos adicionando 500  $\mu\text{l}$  de agua desionizada en el tubo de vidrio del homogenizador en el cual previamente se colocó el tejido, posteriormente se homogenizó la muestra en hielo por un minuto a velocidad máxima, después se vació el contenido en un tubo eppendorf limpio. Posteriormente se centrifugó la muestra por espacio de 20 minutos a 13,200 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se separó el sobrenadante y se hicieron diluciones: 1/10 (100  $\mu\text{L}$  del extracto homogenizado en 900 $\mu\text{L}$  de agua estéril) y 1/100 (10 $\mu\text{L}$  del extracto homogenizado en 990 $\mu\text{L}$  de agua estéril), seguidamente se agitaron en el vórtex las diluciones. Dichas diluciones fueron usadas inmediatamente para determinar el análisis de las enzimas.

### Determinación de proteasas totales

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se colocaron 125  $\mu$ l de AZOCOLL (Sigma A4341), (diluido en buffer sodio fosfato 10mM, ph 7) como sustrato, 75  $\mu$ l de agua libre de pirógenos, y 25  $\mu$ l de extracto (dilución 1:100) se agitó en el vórtex, incubando la reacción a 37 °C por 30 minutos, posteriormente se adiciona 1 mL de TCA al 5% (ácido tricloroacético) para parar la reacción haciendo que las proteínas se precipiten. Después se centrifugan las muestras a 10,000 rpm durante 10 min. Se lee el sobrenadante a 520 nm en espectrofotómetro (Spectronic modelo 21D), en la función de absorbancia de luz visible en sensibilidad media (Todd, 1949).

### Determinación de tripsina

Las determinaciones de Tripsina se realizaron de manera directa en las celdas del espectrofotómetro debido a que son reacciones rápidas, de acuerdo al siguiente procedimiento: se dispensaron 800 $\mu$ l de buffer TRIS, 0.1M NaCl .05M ph 8, 30 $\mu$ L de sustrato (BAPNA .025M), se adicionaron 170  $\mu$ l de extracto diluido (1:100), se mezcló y registró la absorbancia a 405 nm en el espectrofotómetro. (Geiger R. y Fritz, 1988).

### Leucin aminopeptidasa

Las determinaciones de Leucin aminopeptidasa se realizaron de manera directa en la celda del espectrofotómetro de acuerdo al siguiente procedimiento: se dispensaron 790 $\mu$ l de buffer TRIS, 0.1M ph 8, 10 $\mu$ l de sustrato (LPNA 100 mM), se mezcló y adicionó 200  $\mu$ l de extracto diluido (1:100), y posteriormente se registró la absorbancia a 410 nm en el espectrofotómetro. (Tuppy *et al.*, 1962)

## Carboxipeptidasa A

Las determinaciones de la Carboxipeptidasa A, se realizaron de manera directa en la celda de cuarzo en el espectrofotómetro, de acuerdo al siguiente procedimiento: se dispensaron 900  $\mu\text{l}$  de buffer TRIS .1M con NaCl 0.5 M ph 7.5, 50 $\mu\text{l}$  de sustrato HPLA (Hippuryl-DL-Phenyllactic acid), se mezcló y adicionó 50  $\mu\text{l}$  de extracto diluido (1:10), se registró la absorbancia a 262 nm a luz UV en el espectrofotometro. (McClure, W.O. *et al* 1964)

## RESULTADOS

En el presente estudio las condiciones experimentales utilizadas permitieron la evaluación de los efectos de distintos tipos de alimentos en el crecimiento, sobrevivencia y estado fisiológico y nutricional de *O. maya*. En general la sobrevivencia fue del 100% lo cual indica que los dispositivos individuales y la calidad del agua utilizados en el estudio fueron apropiados para esta especie (Fig. 5).

Como se puede apreciar la temperatura fluctuó entre 24° C y 25°C, el pH entre 8 y 8.2, la salinidad entre 36°/oo y 36.4°/oo, la concentración de oxígeno disuelto fluctuó entre 4.8 y 5.2 mg/l.

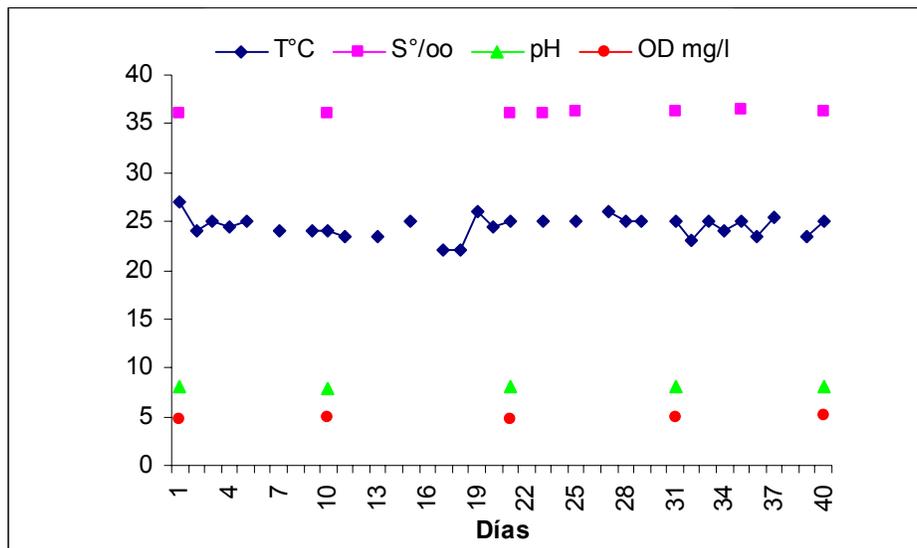


Figura 5. Parámetros fisicoquímicos del agua de los dispositivos experimentales

### Exp. 1.

#### Efecto del nivel de proteínas de la dieta.

##### a. Crecimiento y sobrevivencia

Tal y como se mencionó, la sobrevivencia de los organismos fue del 100% indicando que el tipo de alimento utilizado resultó favorable para el mantenimiento de los organismos experimentales. Sin embargo un efecto significativo sobre el crecimiento fue observado (Fig. 6). Los pulpos alimentados

con cangrejo fresco congelado mostraron un crecimiento 5.3 veces mayor que el obtenido en los animales alimentados con 60% de proteína cruda (PC) ( $P < 0.05$ ). Una tasa de crecimiento negativa fue observada en los organismos alimentados con 40% PC ( $P < 0.05$ ).

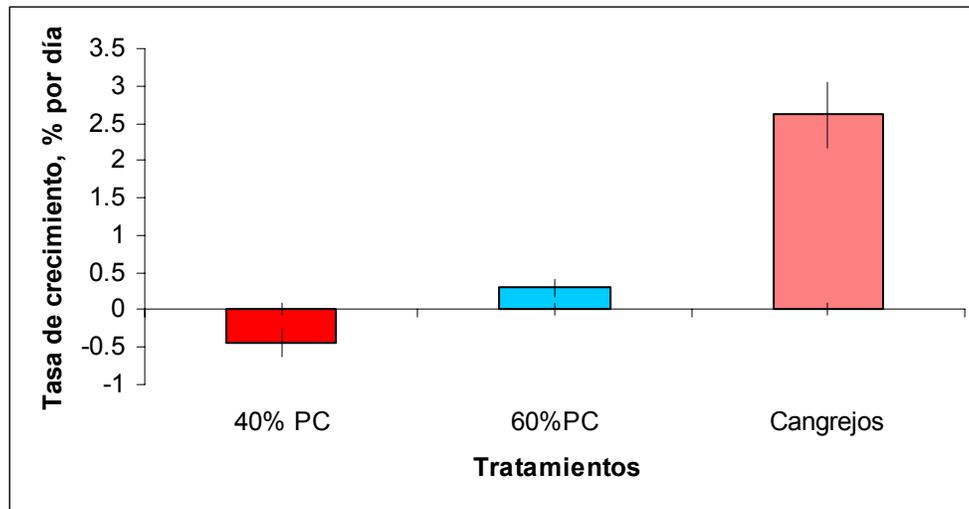


Figura 6. Efecto del tipo de alimento en la tasa de crecimiento de juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E

### **b. Actividad específica de las enzimas digestivas.**

Los ensayos realizados para la evaluación de las enzimas digestivas mostraron que con los métodos utilizados no fue posible detectar actividad de las carbohidrasas. En cambio la actividad de las proteasas generales, tripsina, leucin-amino-peptidasa y carboxipeptidasa-A fueron detectadas en los diferentes tejidos estudiados.

#### **b.1. Proteasas generales**

El tipo de alimento afectó significativamente la actividad de estas enzimas en las glándulas anteriores y posteriores, provocando una menor actividad en los animales alimentados con cangrejos frescos en comparación con el registrado en los organismos alimentados con el alimento balanceado ( $P < 0.05$ ; Fig. 7a y b). En contraste la actividad de las proteasas generales en el páncreas mostró una menor actividad en los pulpos alimentados con 40% PC en

comparación con lo observado en los alimentados con 60% PC y cangrejos frescos ( $P < 0.05$ ; Fig. 7c). En el ciego, al igual que en las glándulas salivales la actividad de las proteasas generales mostró un valor significativamente menor en los organismos alimentados con cangrejos en comparación con el observado en los animales alimentados con alimento balanceado. Es interesante hacer notar que la actividad de las proteasas generales en los organismos alimentados con 40% PC fue mayor que el observado en los organismos alimentados con 60%PC ( $P < 0.05$ ; Fig. 7d).

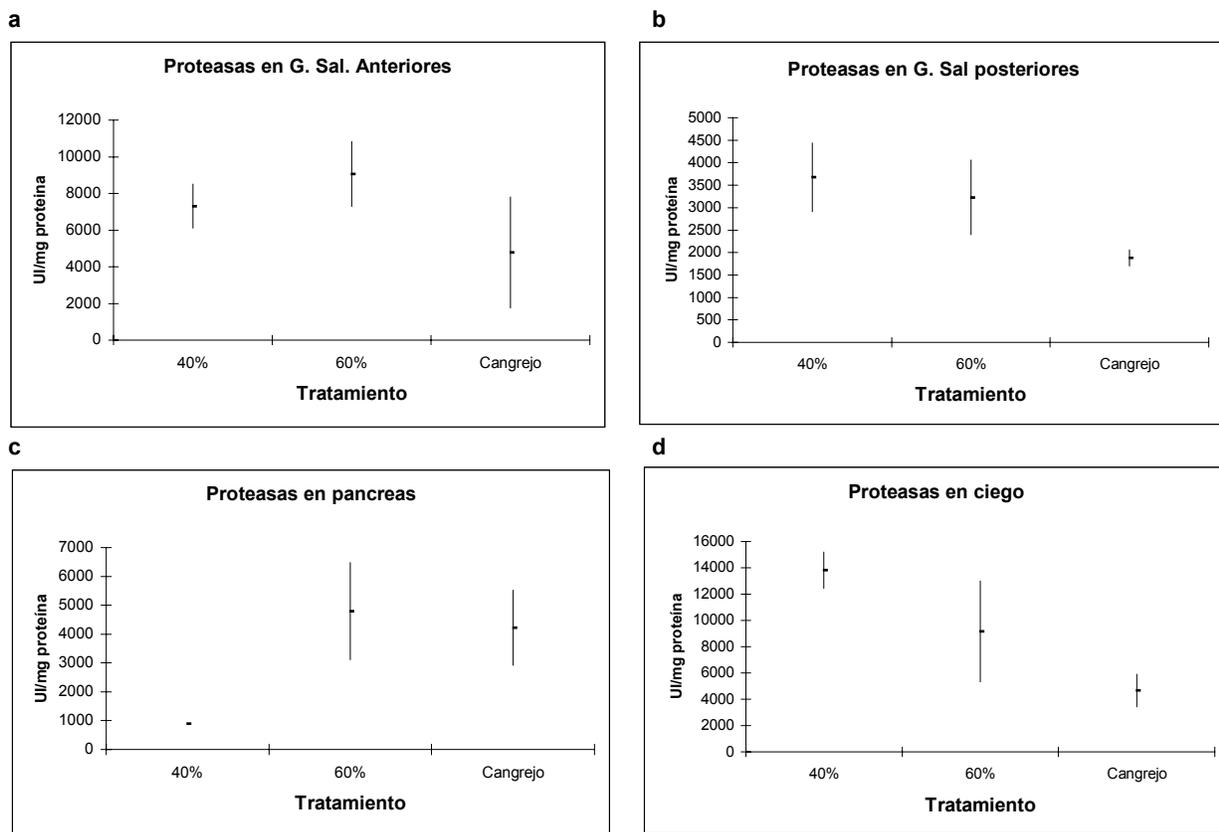


Figura 7. Efecto del tipo de alimento en la actividad de las Proteasas generales de los juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

## b.2. Tripsina.

La actividad de la tripsina en las glándulas anteriores y posteriores siguió patrones similares, con los valores menores en los animales alimentados con

cangrejos frescos, intermedios en los alimentados con 40%PC y mayores en los pulpos alimentados con 60% PC ( $P < 0.05$ ; Fig. 8 a y b). Siguiendo un patrón similar al observado con las proteasas generales, la tripsina en el páncreas mostró una mayor actividad en los pulpos alimentados con cangrejo fresco y con valores intermedios en los alimentados con 60%PC y menores en los alimentados con 40%PC ( $P < 0.05$ ; Fig. 8c). En el ciego la tripsina mostró sus valores menores en los animales alimentados con cangrejo fresco y los mayores en los alimentados con 40%PC. Un valor intermedio fue registrado en los organismos alimentados con 60%PC ( $P < 0.05$ ; Fig. 8d).

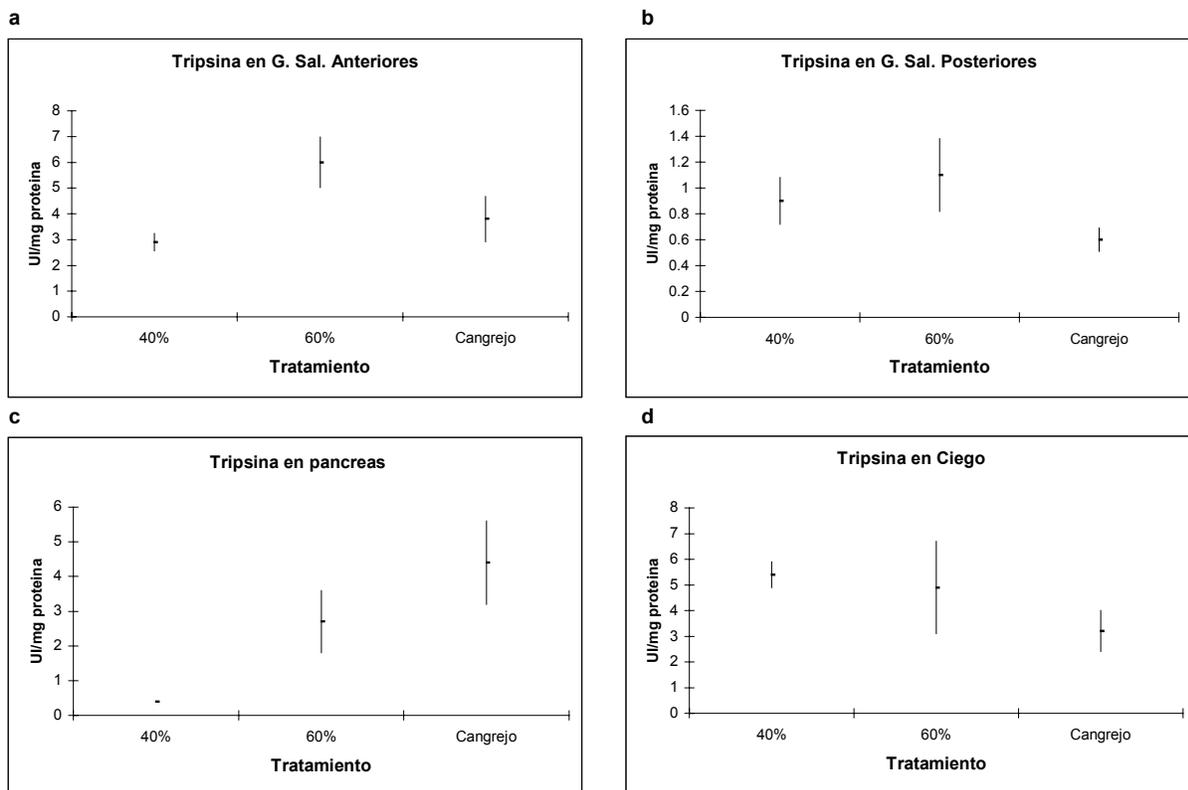


Figura 8. Efecto del tipo de alimento en la actividad de la Tripsina de juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

### b.3. Leucin amino-peptidasa.

En las glándulas salivales anteriores no se observaron diferencias significativas entre la actividad de esta enzima y los animales alimentados con

los distintos tipos de alimentos ( $P > 0.05$ ; Fig. 9 a). En las glándulas salivales posteriores una actividad significativamente menor fue registrada en los pulpos alimentados con cangrejos frescos en contraste con el observado en los organismos mantenidos con los alimentos balanceados ( $P < 0.05$ ; Fig. 9b). En el páncreas se observó mayor actividad en los organismos alimentados con 60% PC que con 40% PC y cangrejos frescos ( $P < 0.05$ ; Fig. 9c). En el ciego al igual que en glándulas salivales anteriores no se encontraron diferencias significativas entre los organismos alimentados con los distintos tratamientos ( $P > 0.05$ ; Fig. 9d).

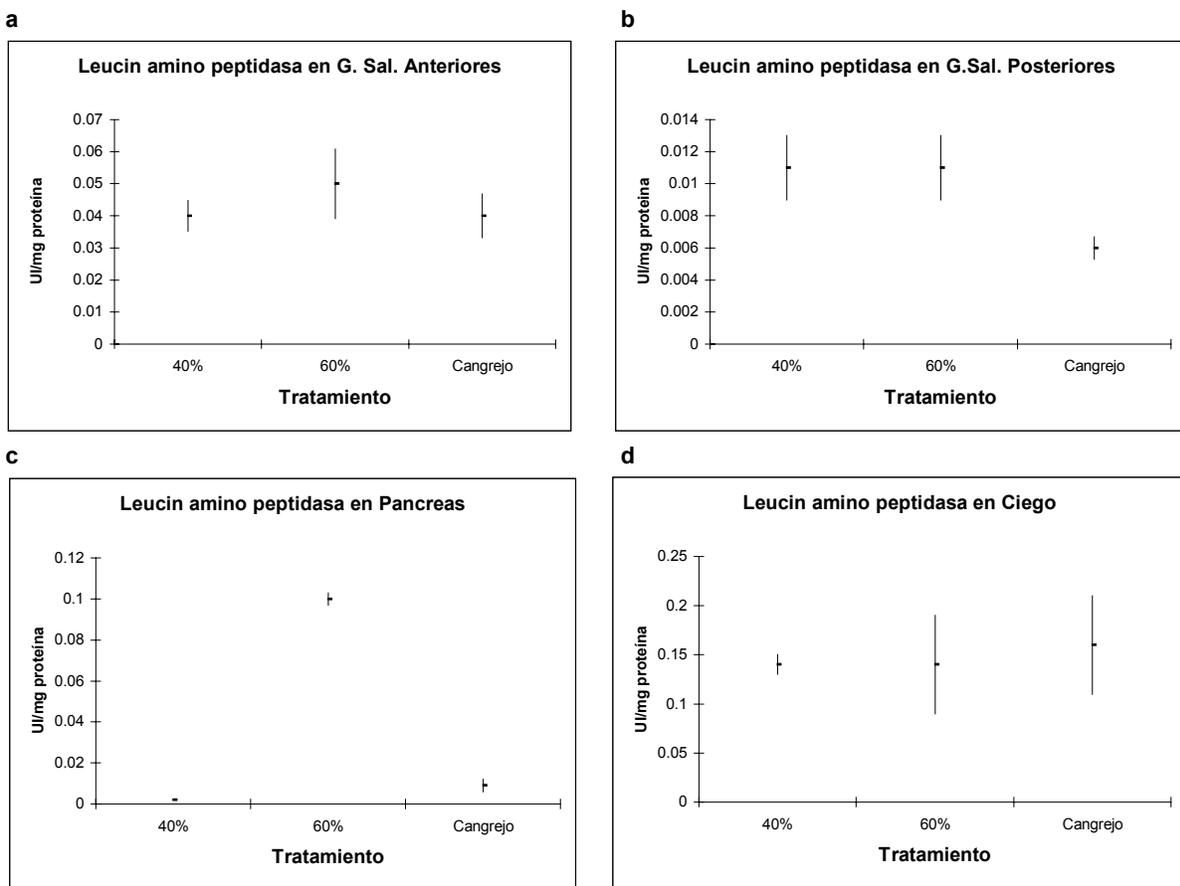


Figura 9. Efecto del tipo de alimento en la actividad de la Leucin amino-peptidasa de juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

### c. Proteínas

Los niveles de proteína en sangre no presentaron diferencias significativas entre tratamiento y un valor promedio de  $89.5 \pm 11$  mg/ml puede ser considerado como representativo de este grupo experimental de *O. maya* ( $p > 0.05$ ) (Fig. 10 a).

#### d. Hemocianina

El nivel de proteína de la dieta y el tipo de alimento afectaron los niveles de hemocianina (Hc) en los organismos experimentales. Los niveles de Hc obtenidos en los pulpos alimentados con 60% PC (2.6 mmol/L) resultó ser mayor que los observados en los animales alimentados con 40% PC (2.3 mmol/l) y con cangrejos (2.1 mmol/L) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 10 b).

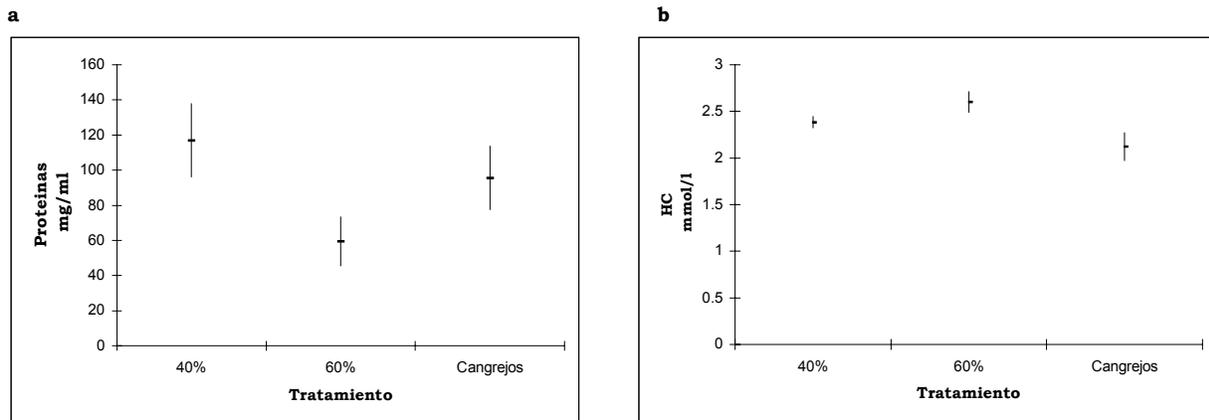


Figura 10. Concentraciones de proteínas y hemocianina en sangre de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes niveles de Proteína. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

#### e. Glucógeno

En la figura 11a se presentan las variaciones de glucógeno en glándula digestiva. Como se puede apreciar las concentraciones de glucógeno en los pulpos alimentados con 60% PC fueron significativamente menores que los observados en el grupo alimentado con 40% PC y cangrejos ( $p < 0.05$ ) (Fig. 11 a)

Los valores de glucógeno en músculo fueron afectados tanto por el nivel de proteína del alimento como por el tipo de alimento, con los valores mayores

registrados en los animales alimentados con cangrejos ( $P < 0.05$ ). Un valor de glucógeno del músculo significativamente mayor fue observado en los animales alimentados con 60% PC en comparación con los registrados en organismos alimentados con 40% PC ( $p < 0.05$ ) (Fig. 11 b)

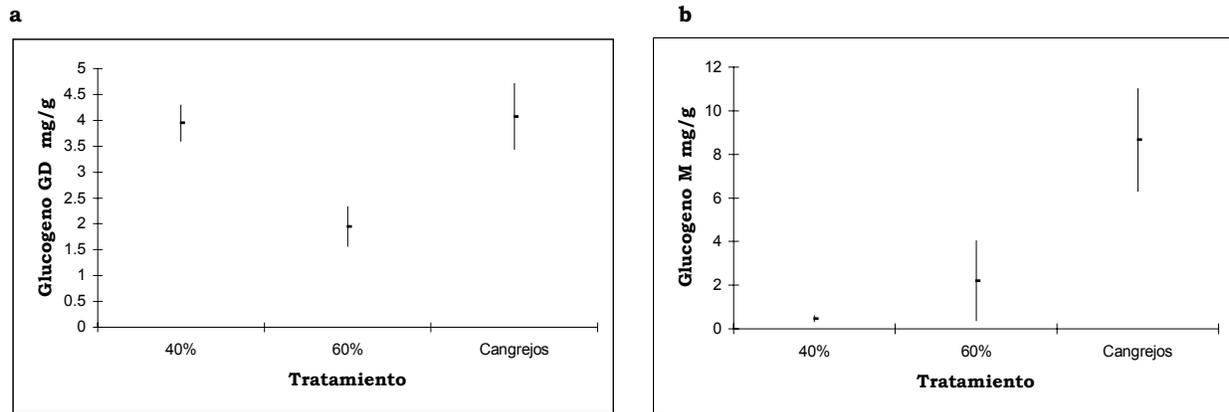


Figura 11 Concentraciones de Glucógeno en glándula digestiva y músculo de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes niveles de Proteína. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

### f. Lípidos totales

Los niveles de lípidos totales en glándula digestiva mostraron diferencias significativas con los valores mas altos en los organismos alimentados con jaiba ( $p < 0.05$ ) que los alimentados con 40% y 60% PC (figura 12a). En músculo los niveles de lípidos totales no muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) (figura 12b).

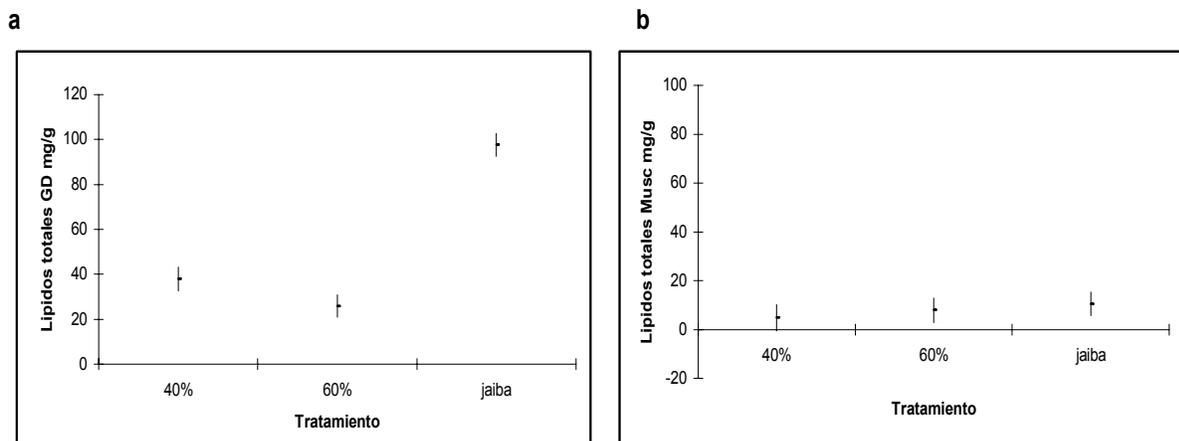


Figura 12 Nivel de lípidos totales en glándula digestiva y músculo de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes niveles de Proteína. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

## **g. Condición Fisiológica**

### **g.1. Capacidad osmótica**

La capacidad osmótica de los animales alimentados con 40% PC fue significativamente menor a la obtenida de los animales alimentados con 60% PC y con cangrejos ( $P < 0.05$ ; Fig. 13)

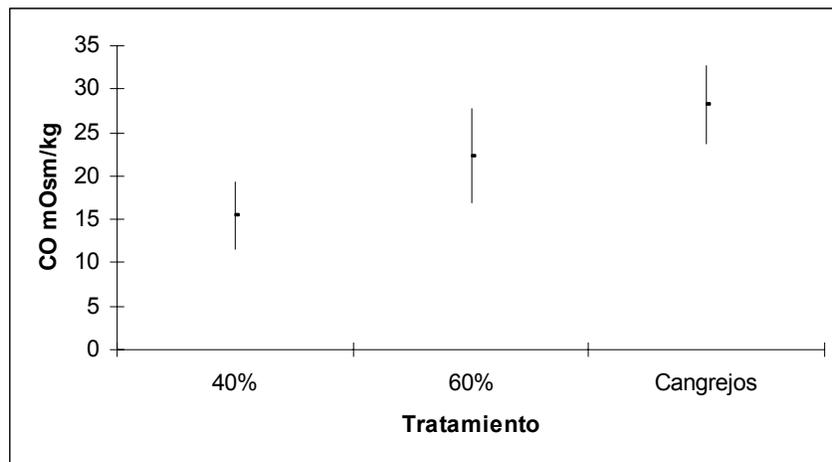


Figura 13. Variaciones de la capacidad osmótica de *O. maya* alimentados con diferentes tipos de alimento. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

## **h. Balance energético.**

### **h.1. Valor calórico**

La cantidad de energía por g de peso contenida en el músculo del brazo de *O. maya* fue afectada por el tipo y nivel de proteína de la dieta, con los valores más bajos en los organismos alimentados con 40 y 60 % PC y los más altos en los pulpos alimentados con cangrejo ( $P < 0.05$ ) (Fig. 14)

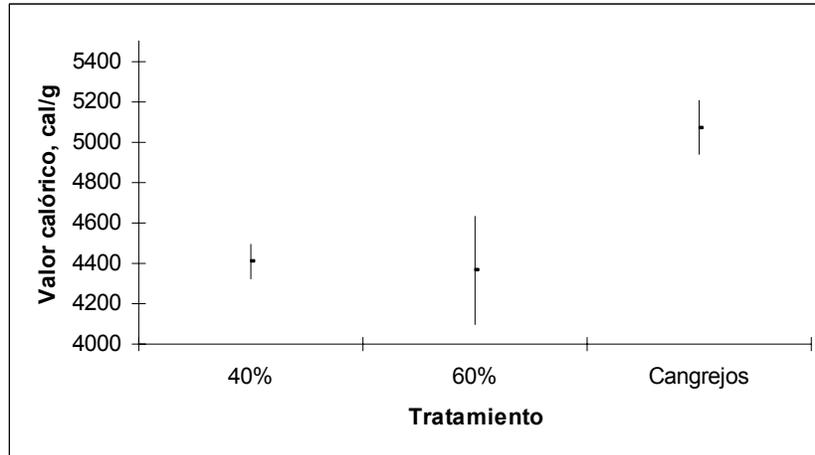


Figura 14. Efecto del nivel de proteína y tipo de alimento en el contenido calórico del músculo del brazo de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

## h.2. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno de los animales medido en ayuno mostró un incremento en relación con el nivel de proteínas de la dieta y el tipo de alimento, con los valores más altos en los pulpos alimentados con cangrejos y los más bajos en los alimentados con 40% PC ( $P < 0.05$ ) (Fig. 15 a). Así mismo el consumo de oxígeno medido después de alimentar a los organismos aumento de forma específica en los alimentados con 40% PC y con cangrejos, y solo un ligero aumento encontramos en los alimentados con 60% PC (Fig. 15 b).

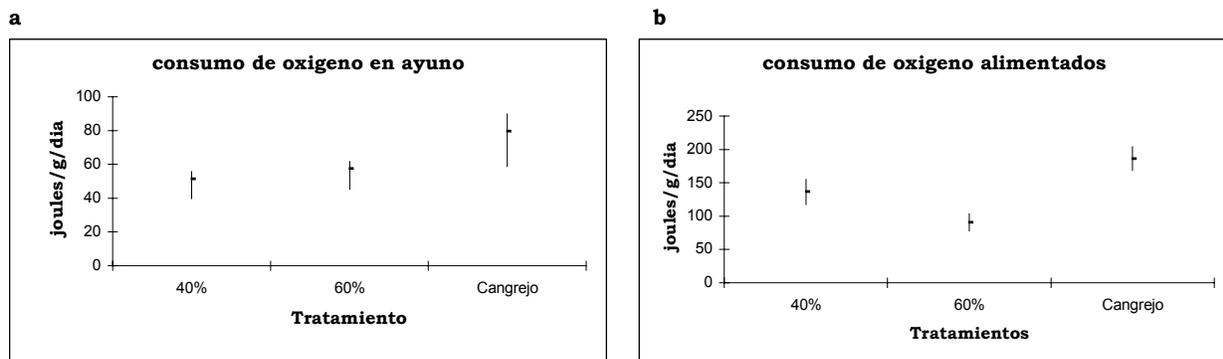


Figura 15. Efecto del tipo de alimento en el consumo de oxígeno de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

### h.3. Excreción nitrogenada

Una reducción de la excreción nitrogenada fue observada durante el ayuno en relación con las proteínas de la dieta y el tipo de alimento con los niveles más altos en los pulpos alimentados con 40% PC y los más bajos en los organismos alimentados con cangrejos (Fig. 16 a) ( $P < 0.05$ ). Después de alimentar a los organismos observamos un mayor aumento en los valores de la excreción nitrogenada en los organismos alimentados con 60% PC y cangrejos y ligeramente en los pulpos alimentados con 40% PC. (Fig. 16b)

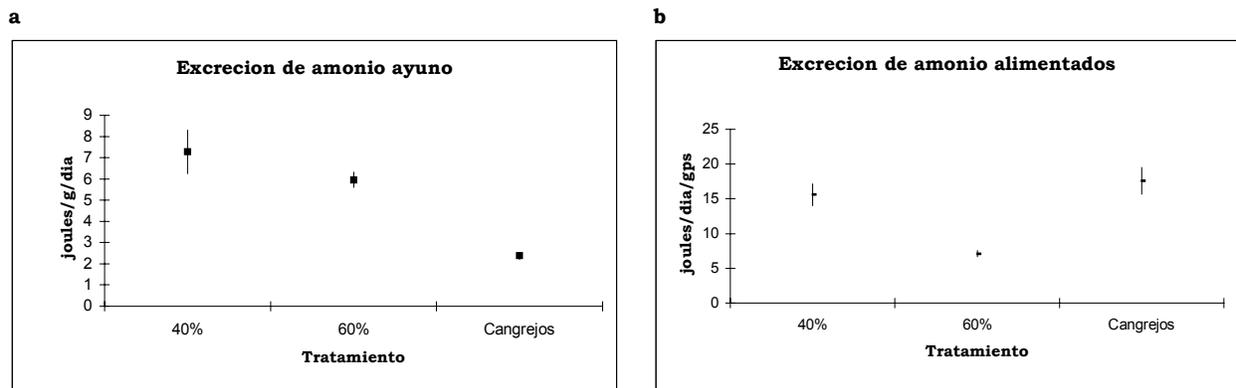


Figura 16. Efecto del tipo de alimento en la excreción nitrogenada de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

### h.4 Balance energético

El estudio del balance energético de *O. maya* muestra diferencias significativas tanto en la cantidad de energía absorbida como en la proporción de ésta que fue canalizada hacia el crecimiento. Los pulpos alimentados con cangrejo canalizaron una alta proporción de la energía absorbida hacia el crecimiento (72.4%). Así mismo se observó que únicamente un 20.4% de la energía absorbida fue utilizada en el metabolismo y sólo el 1.6% fue perdida en los productos de excreción nitrogenada (Tabla 3). En contraste los organismos alimentados con 60% PC canalizaron una alta proporción de la energía absorbida al metabolismo (54.0%) dejando únicamente 5.3% para el crecimiento. Es interesante hacer notar que estos animales perdieron 5.1% de la energía absorbida como productos del metabolismo nitrogenado.

Tabla 3 Efecto del nivel de proteína en el balance energético de juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

	40%			60%			Jaiba		
I	1381.8	$\pm$	35.0	1065.4	$\pm$	56.0	1300.6	$\pm$	385.0
H	539.7	$\pm$	203.0	520.7	$\pm$	91.0	234.5	$\pm$	231.0
Ab	842.1	$\pm$	62.2	544.7	$\pm$	124.2	1066.1	$\pm$	303.2
U	50.9	$\pm$	7.3	27.7	$\pm$	2.8	16.6	$\pm$	1.3
As	795.2	$\pm$	119.7	500.0	$\pm$	34.4	1152.3	$\pm$	431.8
Rica	560.5	$\pm$	57.5	179.2	$\pm$	7.4	100.1	$\pm$	27.4
Rrut	359.3	$\pm$	35.0	294.2	$\pm$	28.0	217.8	$\pm$	70.0
Rtot	919.8	$\pm$	131.1	473.4	$\pm$	90.4	317.9	$\pm$	124.3
P	-124.6	$\pm$	637.0	26.6	$\pm$	287.0	834.4	$\pm$	441.0
Ab/I	60.9			51.1			82.0		
AS/I,%	57.6			46.9			88.6		
AS/Ab,%	94.4			91.8			108.1		
H/I,%	39.1			48.9			18.0		
U/I,%	3.7			2.6			1.3		
U/Ab,%	6.0			5.1			1.6		
R/I,%	26.0			27.6			16.7		
R/Ab,%	42.7			54.0			20.4		
R/As,%	45.2			58.8			18.9		
P/I,%	-9.0			2.5			64.2		
P/Ab,%	-14.8			4.9			78.3		
P/As,%	-15.7			5.3			72.4		

## Exp. 2

### Efecto de diferentes niveles de inclusión óptima de hidrolizado de pescado.

De la misma forma que en el primer experimento, los dispositivos individuales y la calidad del agua utilizados en el estudio fueron apropiados para esta especie (Hanlon y Forsythe, 1985) (Fig. 16). Se observa que la temperatura fluctuó entre 25° C y 26°C, el pH entre 8 y 8.2, la salinidad se

mantuvo en 36°/oo y la concentración de oxígeno disuelto fluctuó entre 4.8 y 5.2 mg/l.

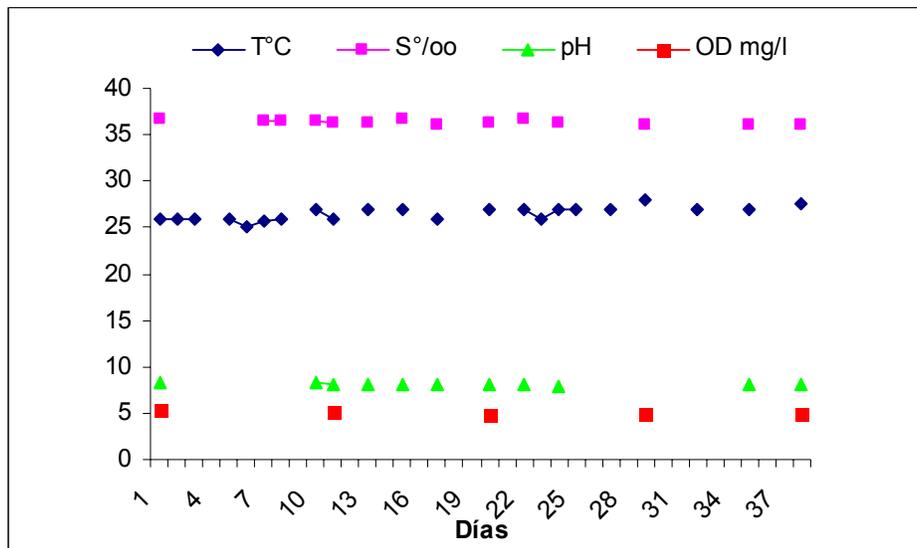


Figura 17. Parámetros fisicoquímicos del agua de los dispositivos experimentales

### a. Crecimiento y sobrevivencia

La sobrevivencia no fue afectada por el tipo de alimento ya que se registró un 100% durante el experimento en todos los tratamientos. La tasa de crecimiento específico (% por día) mostró diferencias significativas, con los valores más altos en los animales alimentados con cangrejos y los menores en los animales alimentados con alimento sin hidrolizado de pescado (0%) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 18). No se encontraron diferencias significativas entre los organismos alimentados con dietas artificiales con diferentes porcentajes de inclusión de hidrolizado de pescado entre 5% y 20% de inclusión. Como se puede apreciar los organismos alimentados con 0% presentaron pérdida de peso durante el experimento.

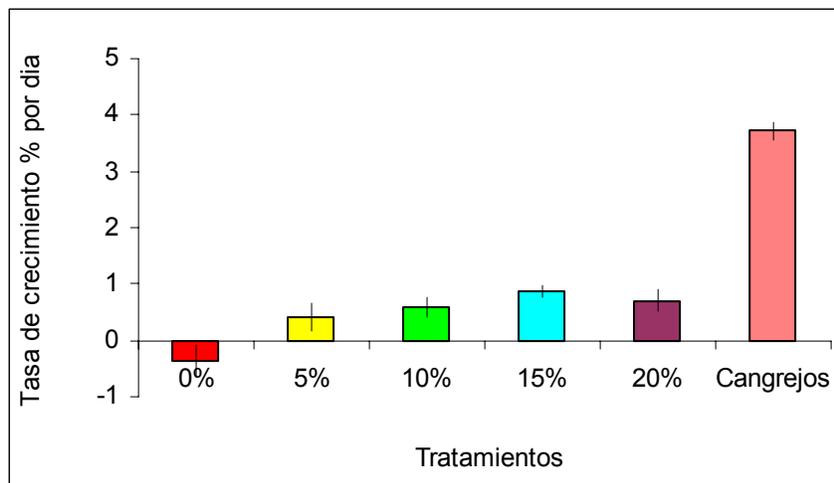


Figura 18. Efecto del nivel de hidrolizado de pescado en la tasa de crecimiento de juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

## **b. Enzimas digestivas.**

### **b. 1. Proteasas generales**

La actividad de las proteasas en las glándulas salivales anteriores fue significativamente menor en organismos alimentados con 15% de hidrolizado de pescado y con cangrejos en comparación con los pulpos alimentados con los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ; Fig. 19 a). Los valores de las proteasas en las glándulas salivales posteriores no presentan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$  Fig. 19 b). Al igual que en las glándulas salivales posteriores, la actividad de las proteasas en la glándula digestiva no presento diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $p > 0.05$ ; Fig. 19 c). La actividad de las proteasas en páncreas si presento diferencias significativas entre tratamientos, ( $P < 0.05$ ) con los valores mas altos en los pulpos alimentados con 0% de hidrolizado de pescado y el menor valor con los alimentados con cangrejos (Fig. 19 d). En el ciego no se encontraron diferencias significativas de la actividad de las proteasas, encontrando valores ligeramente mayores en organismos alimentados con 10% y 20% ( $p > 0.05$ ; Fig. 19 e).

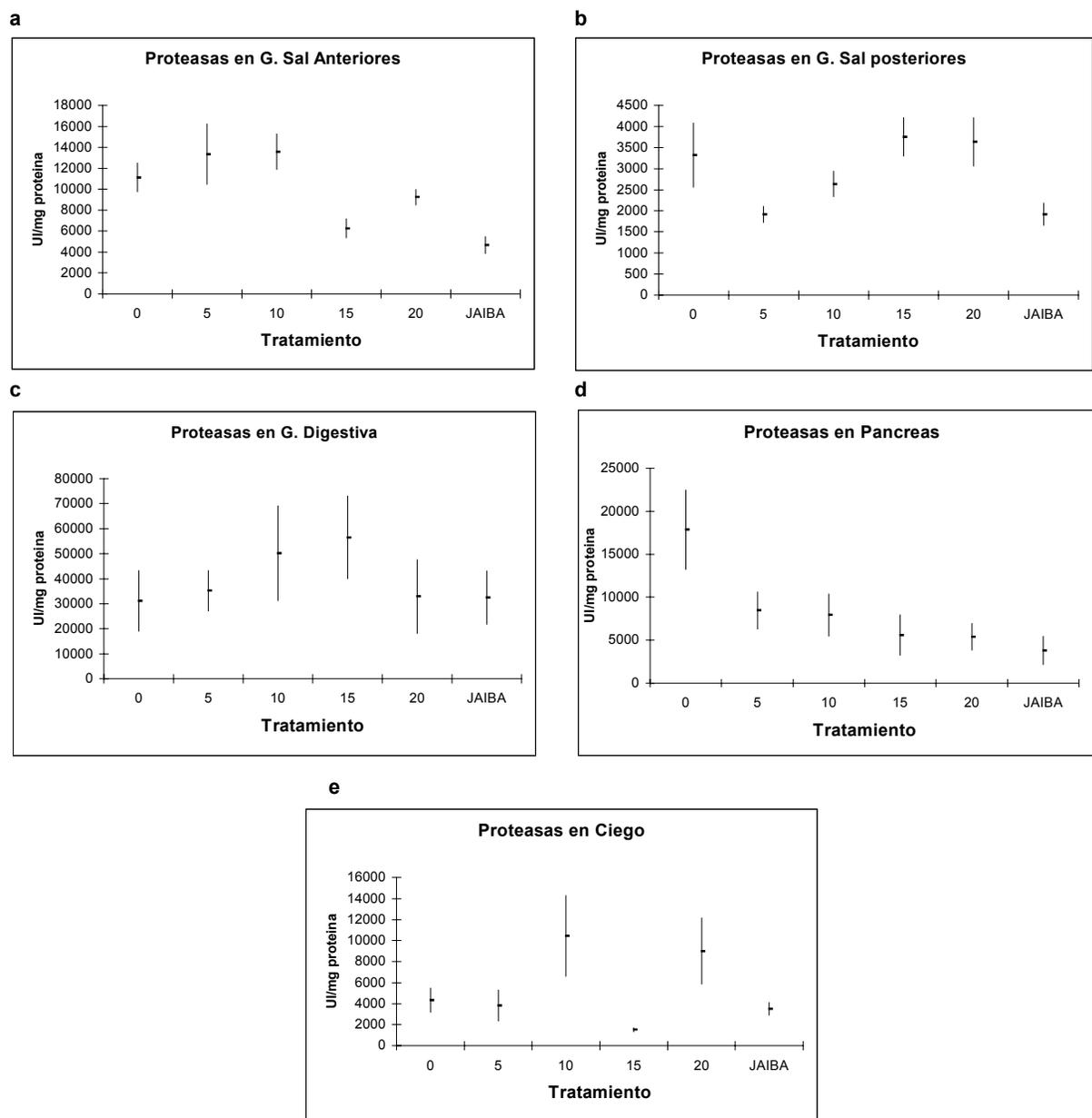


Figura 19. Efecto del tipo de alimento en la actividad de las proteasas de juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

## b. 2. Tripsina

La actividad de la tripsina en las glándulas salivales anteriores y posteriores no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes niveles de hidrolizado de pescado y cangrejo, encontrando los valores mas bajos en pulpos alimentados con cangrejo ( $p > 0.05$ ; Fig. 20 a y b). De la misma forma que en las

glándulas salivales, en la glándula digestiva no se encontraron diferencias significativas entre pulpos alimentados con las dietas y los alimentados con cangrejos ( $p>0.05$ ; Fig. 20 c). En páncreas se observan diferencias significativas ( $p<0.05$ ) de la actividad de la tripsina, encontrando los valores mas altos en pulpos alimentados con 0% de hidrolizado de pescado y los mas bajos en los alimentados con 15% y con cangrejos (Fig. 20 d). La actividad de la tripsina en el ciego mostró diferencias significativas entre los tratamientos, con los mayores valores encontrados en pulpos alimentados con 10 % y 20% y los menores en los alimentados con 15% de hidrolizado de pescado ( $p<0.05$ ; Fig. 20 e).

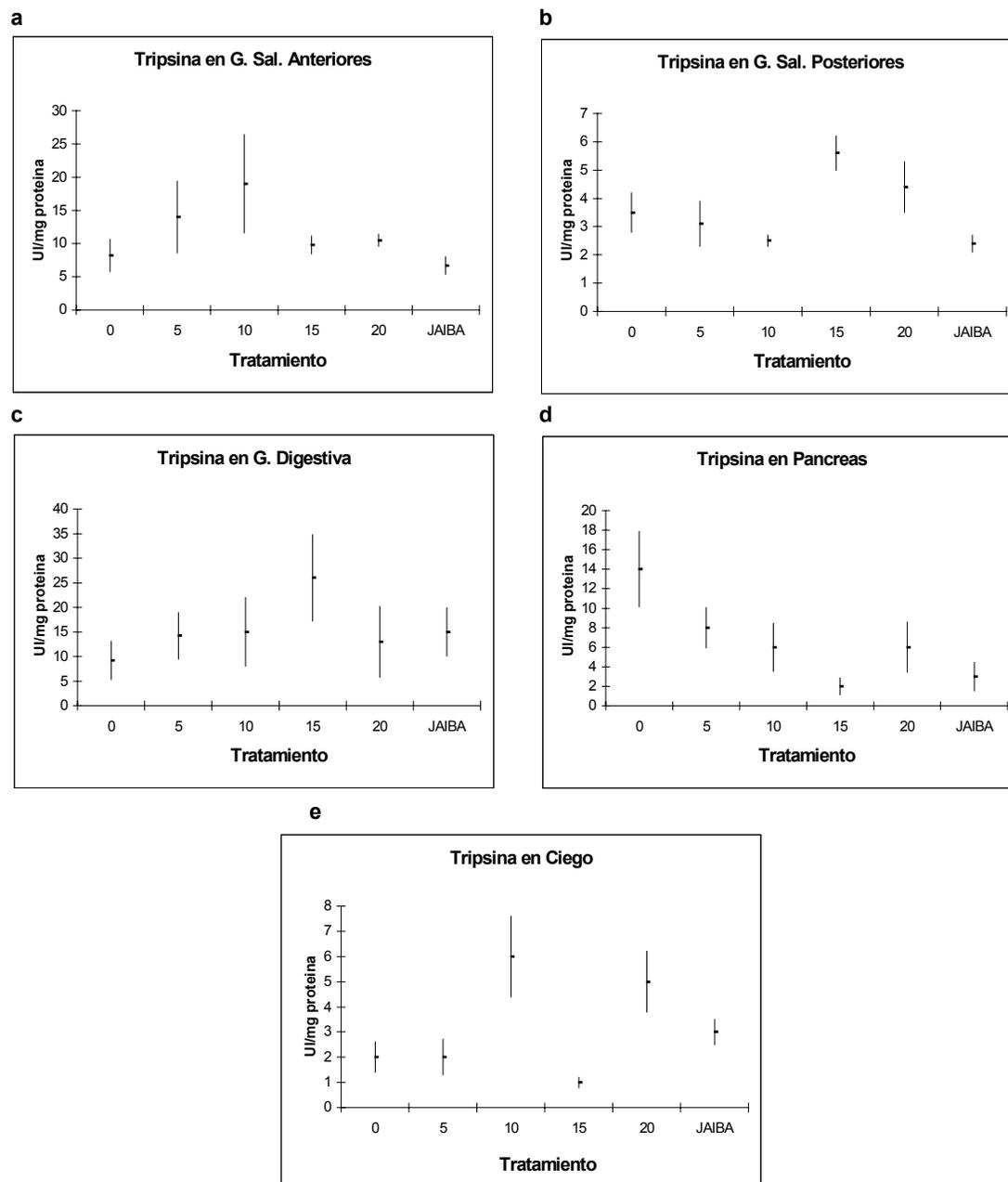


Figura 20. Efecto del tipo de alimento en la actividad de la tripsina de juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

### **b.3. Leucin amino-peptidasa.**

En glándulas salivales anteriores se encontraron diferencias significativas entre los valores de la actividad de la enzima Leucin amino-peptidasa tanto en los animales alimentados con las dietas artificiales como en los alimentados con cangrejos ( $p < 0.05$ ; Fig. 21 a) En glándulas salivales posteriores también se detectaron diferencias significativas, con un valor mayor encontrado en los organismos alimentados con 20% de hidrolizado de pescado ( $p < 0.05$ ; Fig 21 b). Opuesto a lo observado en glándulas salivales, la actividad de la leucin amino-peptidasa en la glándula digestiva no mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $P > 0.05$ ; Fig. 21 c). Así mismo no hubo diferencias entre tratamientos de la actividad de esta enzima en páncreas ( $P > 0.05$ ; Fig. 21 d). Los valores de la actividad enzimática de la leucin amino-peptidasa en el ciego, muestran diferencias significativas, encontrando valores elevados en organismos alimentados con 20% y cangrejos, y con los valores más bajos en los alimentados con 15% de hidrolizado de pescado ( $p < 0.05$ ; Fig. 21 e).

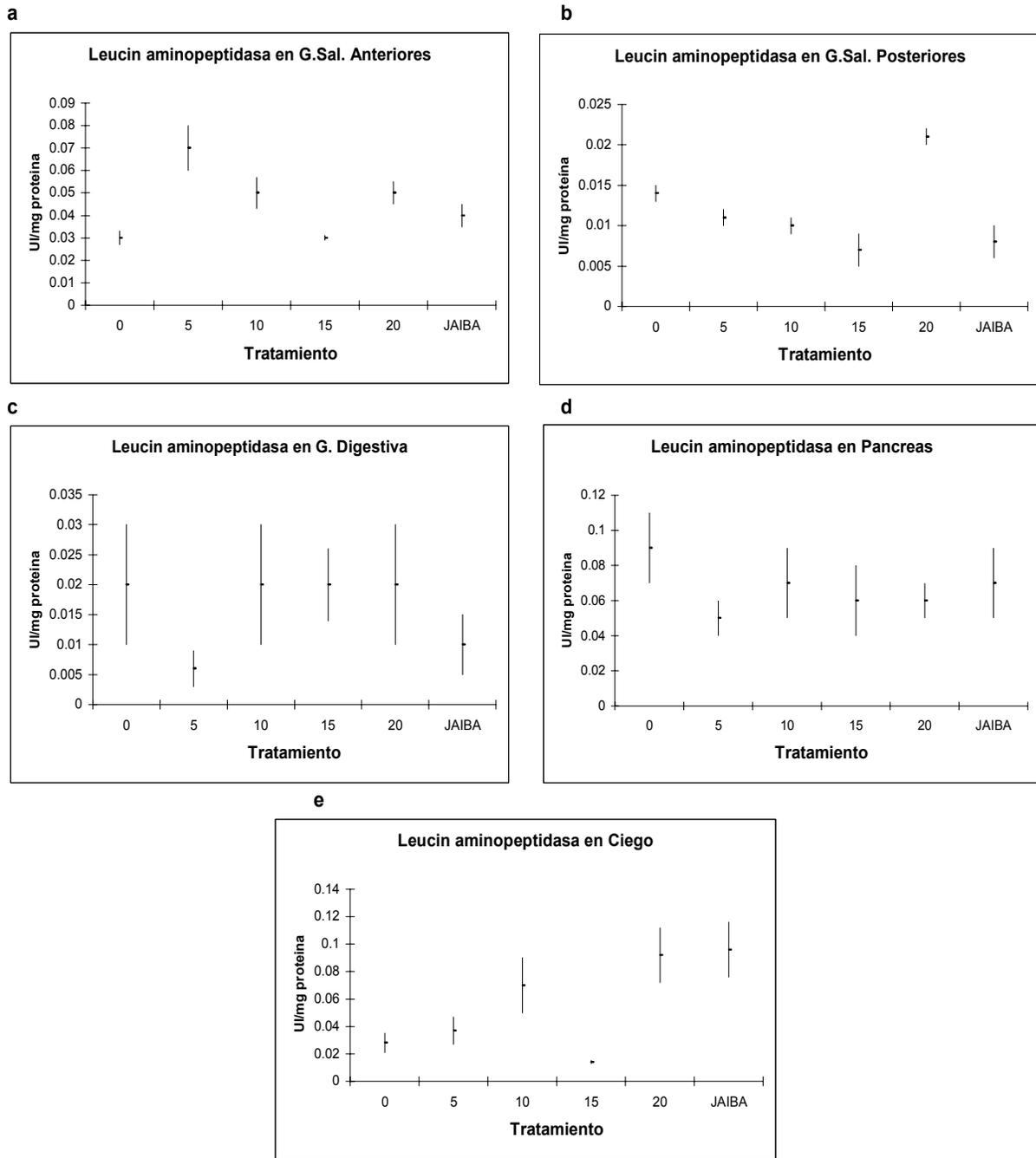


Figura 21. Efecto del tipo de alimento en la actividad de la leucin amino-peptidasa de juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E

#### **b.4. Carboxipeptidasa A.**

La carboxipeptidasa A mostró actividad únicamente en el páncreas, sin embargo no se observan diferencias significativas entre los pulpos alimentados con los diferentes tratamientos ( $P > 0.05$ ; Fig. 22).

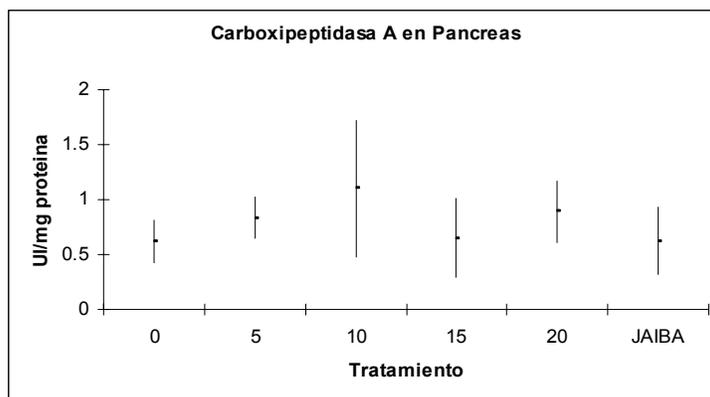


Figura 22. Efecto del tipo de alimento en la actividad de la carboxipeptidasa A de juveniles de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E

#### **c. Metabolitos en sangre.**

##### **c.1 Glucosa**

Los valores de glucosa sanguínea no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos. (Fig. 23a).

##### **c.2. Lactato**

Las concentraciones de lactato presentes en los organismos alimentados con 0% de hidrolizado de pescado mostraron valores significativamente mayores a los observados en los pulpos alimentados con el resto de los tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 23b). Un valor significativamente menor fue observado en los organismos alimentados con cangrejos frescos congelados ( $P < 0.05$ ).

##### **c.3. Colesterol**

Los niveles de colesterol obtenidos en los organismos alimentados con la dieta de 0% resultaron ser significativamente mayores que los observados en los pulpos alimentados con los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 23c).

#### c.4. Acilgliceridos

La concentración de acilgliceridos en sangre mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), con las concentraciones más altas en organismos alimentados con la dieta con 5% de inclusión de hidrolizado de pescado (Fig. 23d)

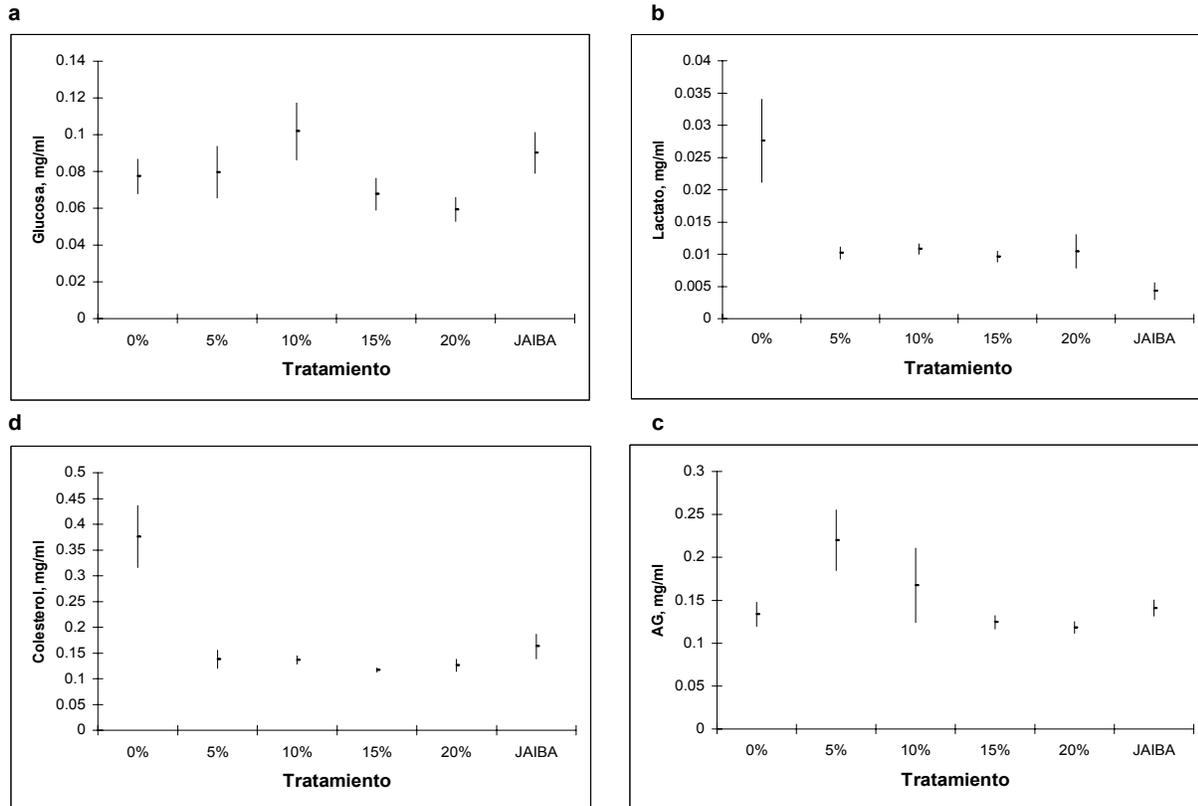


Figura 23. Efecto del tipo de alimento en las concentraciones de metabolitos sanguíneos de juveniles de *O. maya* Valores dados como promedio  $\pm$  E.E

#### c.5. Proteínas

Los niveles de proteína en sangre no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) (Fig. 24a).

#### c.6. Hemocianina

Los diferentes niveles de inclusión de aminoácidos en la dieta no afectaron los niveles de hemocianina (Hc) donde se observa que no hay

diferencias significativas en los organismos experimentales. ( $P > 0.05$ ) (Fig. 24b).

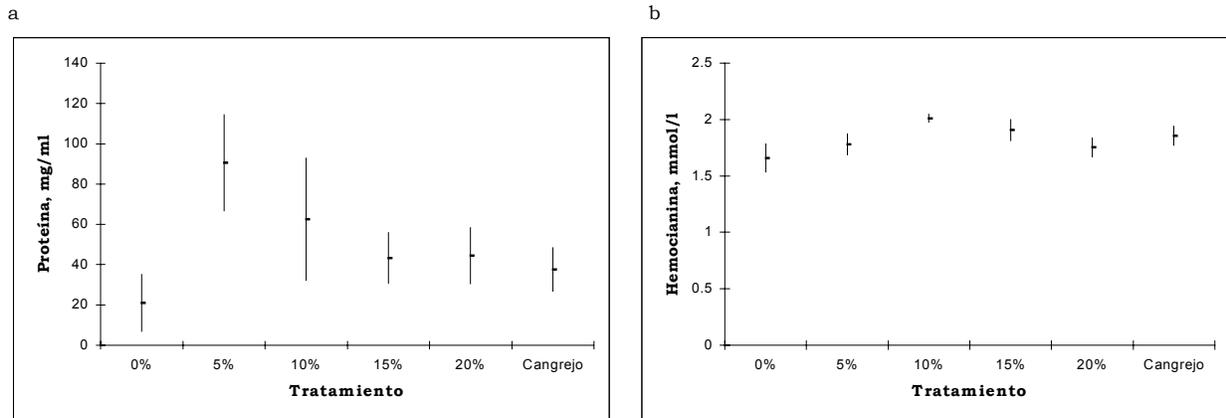


Figura 24 Concentraciones de proteínas y hemocianina en sangre de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes niveles de hidrolizado de pescado. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E

#### d. Glucógeno

Las variaciones de glucógeno tanto en glándula digestiva, como en músculo, (Fig. 25 a y b) no se vieron afectadas por el tipo de tratamiento, donde se puede apreciar que las concentraciones de glucógeno no presentan diferencias significativas entre los tratamientos. ( $p > 0.05$ )

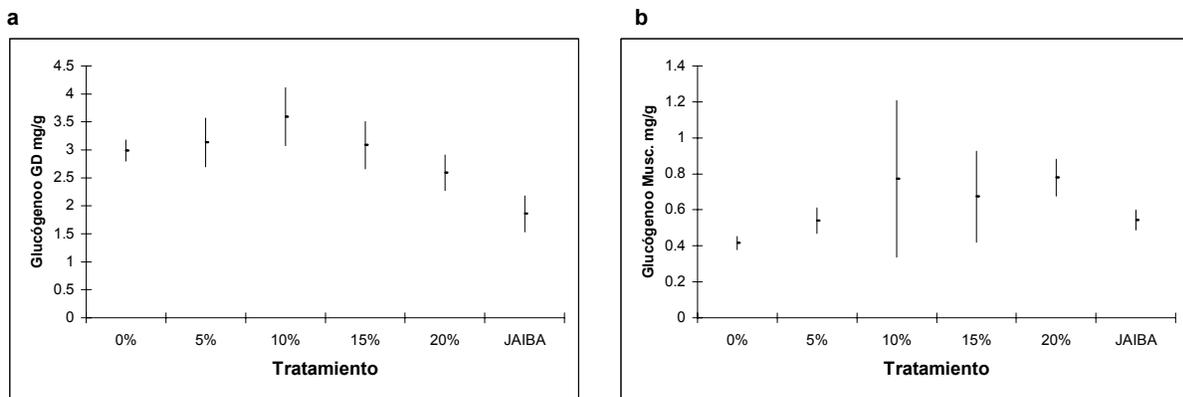


Figura 25 Concentraciones de Glucógeno en glándula digestiva y músculo de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes niveles de Hidrolizado de pescado. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

## e. Lípidos totales

Los niveles de lípidos en la glándula digestiva se vieron afectados por el tipo de tratamiento, encontrando los valores máximos en los organismos alimentados con cangrejos y los menores en organismos con 0% de hidrolizado de pescado ( $p < 0.05$ ) (fig. 26a). En el músculo los niveles de lípidos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, encontrando los valores más bajos en organismos alimentados con 0% y 20% de hidrolizado de pescado ( $p < 0.05$ ) (fig. 26b)

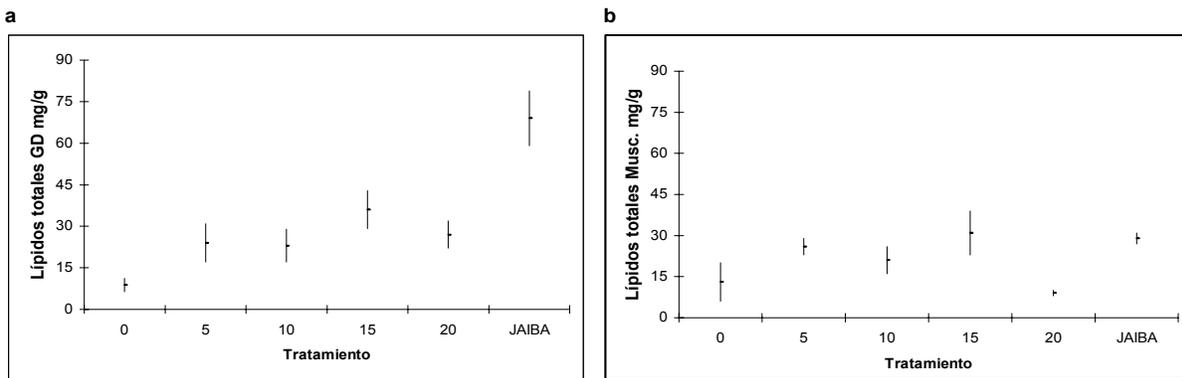


Figura 26 Nivel de lípidos en glándula digestiva y músculo de juveniles de *O. maya* alimentados con diferentes niveles de Hidrolizado de pescado. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

## f. Condición Fisiológica

### f.1. Capacidad osmótica

La capacidad osmótica no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, tanto en animales alimentados con diferentes niveles de inclusión de hidrolizado de pescado como los alimentados con cangrejos frescos congelados ( $P > 0.05$ ; Fig. 27)

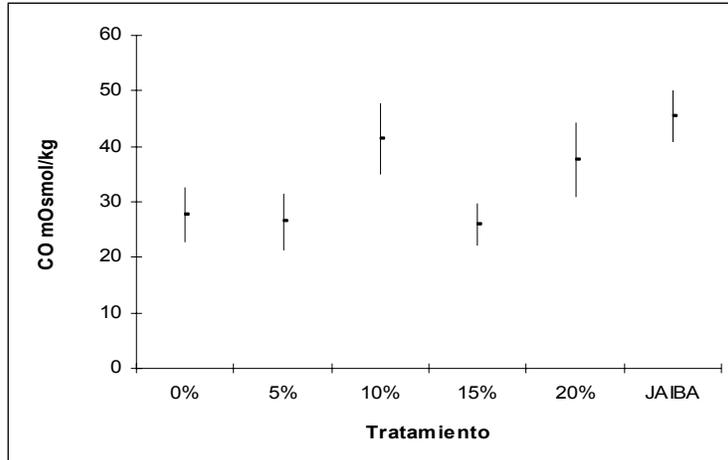


Figura 27. Variaciones de la capacidad osmótica de *O. maya* alimentados con diferentes niveles de hidrolizado de pescado. Valores promedio  $\pm$  E.E.

## g. Balance energético.

### g.1. Valor calórico

La cantidad de energía por g de peso contenida en el músculo del brazo de *O. maya* fue afectada por el tipo alimento, mostrando diferencias significativas con el valor más alto en los organismos alimentados con cangrejo, ( $P < 0.05$ ) mientras que no se presentaron diferencias entre los organismos alimentados con hidrolizado de pescado. (Fig. 28)

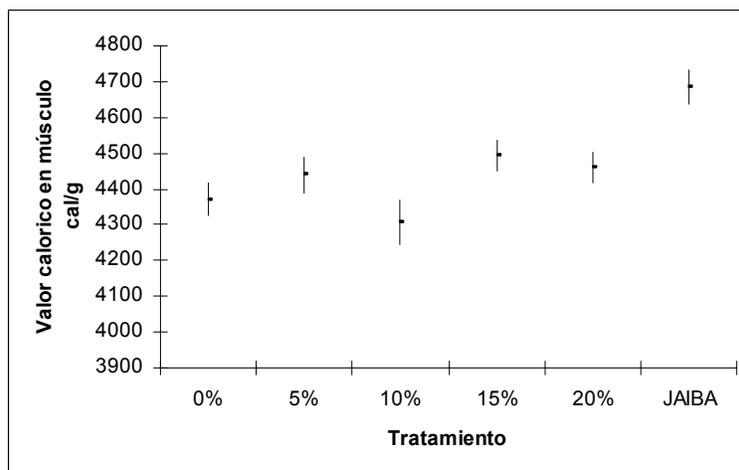


Figura 28 Efecto del nivel de Hidrolizado de pescado en el contenido calórico del músculo del brazo de *O. maya*. Valores promedio  $\pm$  E.E.

## g.2. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno de los animales medido en ayuno no mostró diferencias significativas en relación con el nivel de inclusión hidrolizado de pescado de la dieta y el tipo de alimento. ( $P > 0.05$ )(Fig. 29 a). Así mismo el consumo de oxígeno medido después de alimentar a los organismos aumento de forma específica en los alimentados con 0% y 10% de hidrolizado de pescado y en menor proporción con los demás tratamientos (Fig. 29 b).

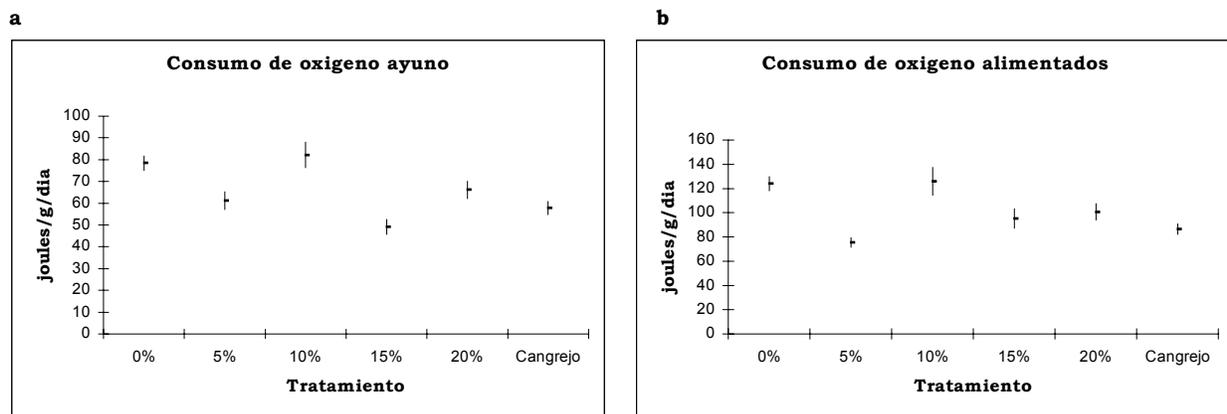


Figura 29. Efecto del tipo de alimento en el consumo de oxígeno de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

## g.3. Excreción nitrogenada

Una reducción de la excreción nitrogenada fue observada en relación con el tipo de alimento con los niveles más altos en los pulpos alimentados con 10, 20% y cangrejo, y los más bajos en los organismos alimentados con 0, 5 y 15% (Fig. 30 a) ( $P < 0.05$ ). En la excreción de amonio después de alimentar a los organismos se observó un mayor aumento en los valores de los organismos alimentados con 20% y cangrejos, y ligeramente en los pulpos alimentados con los demás niveles de inclusión de hidrolizado de pescado. (Fig. 30 b)

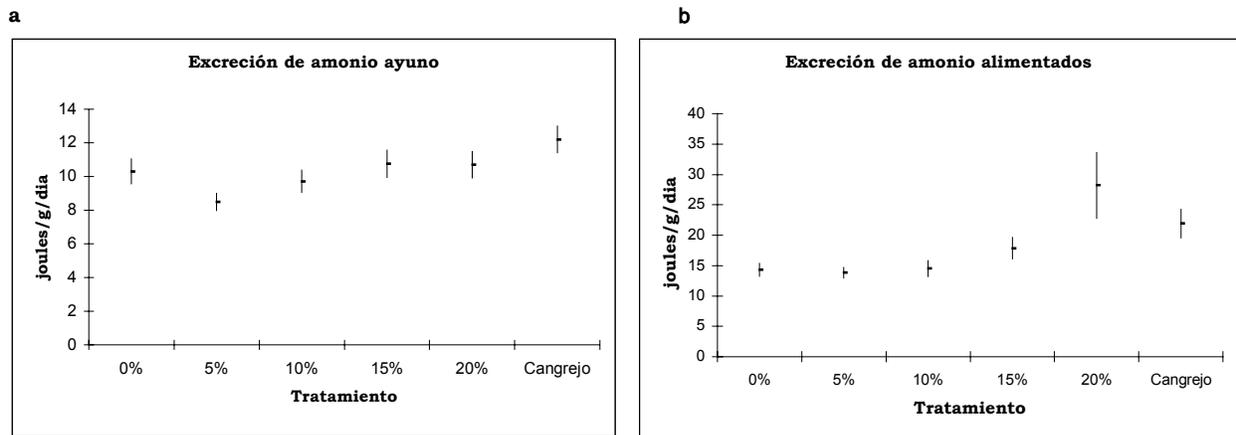


Figura 30. Efecto del tipo de alimento en la excreción nitrogenada de *O. maya*. Valores dados como promedio  $\pm$  E.E.

#### g.4. Balance energético

El estudio del balance energético de *O. maya* hasta ahora muestra diferencias significativas. Los pulpos alimentados con cangrejo obtuvieron las mayores proporciones de energía la cual al canalizarla al crecimiento, obtuvieron los mayores valores, (70.8%) en comparación con los pulpos alimentados con hidrolizado de pescado. Así mismo se observó que organismos alimentados con jaibas únicamente un 15.9% de la energía absorbida fue utilizada en el metabolismo y solo el 3.4% fue perdida en los productos de excreción nitrogenada (Tabla 4). En contraste los organismos que crecieron mejor con los alimentos experimentales (15% de inclusión de hidrolizado de pescado) canalizaron una alta proporción de la energía absorbida al metabolismo (21.6%) y la energía perdida en productos de excreción nitrogenada fue de 4.7% dejando 12.7% para el crecimiento. Los valores más bajos de producción de energía los encontramos en pulpos alimentados con 0% de hidrolizado de pescado coincidiendo con su mala alimentación y consecuente pérdida de peso.

El balance energético indica que pulpos alimentados con cangrejo canalizaron un mayor porcentaje de energía al crecimiento, mientras que los organismos

alimentados con dietas artificiales utilizaron más energía en el metabolismo y productos de excreción.

Tabla 4 Efecto del nivel de proteína en el balance energético de juveniles de *O. maya*. Valores  $\pm$ ES

	0		5		10		15		20		jaiba	
<b>I</b>	4074.0	$\pm$ 63.0	3724.0	$\pm$ 63.0	3717.0	$\pm$ 77.0	3808.0	$\pm$ 84.0	3899.0	$\pm$ 105.0	3090.9	$\pm$ 350.0
<b>H</b>	2576.1	$\pm$ 61.7	1940.8	$\pm$ 43.2	2350.4	$\pm$ 54.2	2218.0	$\pm$ 34.5	2142.8	$\pm$ 27.5	556.4	$\pm$ 56.0
<b>Ab</b>	1497.9	$\pm$ 42.0	1783.3	$\pm$ 42.0	1366.6	$\pm$ 56.0	1590.0	$\pm$ 91.0	1756.2	$\pm$ 35.0	2534.5	$\pm$ 28.0
<b>U</b>	72.1	$\pm$ 5.6	59.5	$\pm$ 3.5	67.9	$\pm$ 4.9	74.9	$\pm$ 5.6	74.9	$\pm$ 5.6	85.4	$\pm$ 5.6
<b>As</b>	818.9	$\pm$ 12.6	560.3	$\pm$ 25.2	934.9	$\pm$ 28.7	763.5	$\pm$ 29.4	782.0	$\pm$ 38.5	2068.6	$\pm$ 203.0
<b>Rica</b>	318.9	$\pm$ 24.7	100.0	$\pm$ 35.6	305.9	$\pm$ 35.1	322.2	$\pm$ 34.4	241.0	$\pm$ 21.8	200.8	$\pm$ 22.5
<b>Rrut</b>	549.1	$\pm$ 21.0	428.1	$\pm$ 28.0	575.0	$\pm$ 42.0	344.1	$\pm$ 28.0	463.5	$\pm$ 28.0	404.1	$\pm$ 21.0
<b>Rtot</b>	868.1	$\pm$ 21.0	528.0	$\pm$ 35.0	881.0	$\pm$ 35.0	666.3	$\pm$ 35.0	704.6	$\pm$ 21.0	604.9	$\pm$ 21.0
<b>p</b>	-49.2	$\pm$ 46.4	32.3	$\pm$ 43.0	53.9	$\pm$ 67.2	97.2	$\pm$ 315.0	77.5	$\pm$ 328.4	1463.7	$\pm$ 340.5
<b>Ab/I,%</b>	36.8		47.9		36.8		41.8		45.0		82.0	
<b>As/I,%</b>	20.1		15.0		25.2		20.0		20.1		66.9	
<b>As/Ab,%</b>	54.7		31.4		68.4		48.0		44.5		81.6	
<b>H/I,%</b>	63.2		52.1		63.2		58.2		55.0		18.0	
<b>U/I,%</b>	1.8		1.6		1.8		2.0		1.9		2.8	
<b>U/Ab,%</b>	4.8		3.3		5.0		4.7		4.3		3.4	
<b>R/I,%</b>	13.5		11.5		15.5		9.0		11.9		13.1	
<b>R/Ab,%</b>	36.7		24.0		42.1		21.6		26.4		15.9	
<b>R/As,%</b>	67.1		76.4		61.5		45.1		59.3		19.5	
<b>P/I,%</b>	-1.2		0.9		1.5		2.6		2.0		47.4	
<b>P/Ab,%</b>	-3.3		1.8		3.9		6.1		4.4		57.8	
<b>P/As,%</b>	-6.0		5.8		5.8		12.7		9.9		70.8	

## DISCUSION

En el presente estudio se realizaron dos experimentos con el fin de conocer la forma en que el alimento modula la fisiología digestiva, el balance energético y el crecimiento de los juveniles de *O. maya*. Los resultados obtenidos mostraron que en los dos experimentos la dieta consistente de cangrejo fresco-congelado fue la que produjo las mejores tasas de crecimiento, en comparación con las obtenidas con los alimentos balanceados.

El crecimiento es una respuesta integradora del estado fisiológico de los organismos pues en ésta es posible observar como se canalizan los excedentes de energía una vez que han sido satisfechas las necesidades que le permiten al animal mantener la homeostasis. (Prosser, 1950) La cantidad de energía contenida en los alimentos experimentales osciló entre 15 y 16 mil joules/g siendo prácticamente iso-energéticas para los animales alimentados con los diferentes niveles de proteína (Experimento 1). Este hecho permite asumir que las diferencias observadas ahora no estuvieron asociadas con la cantidad de energía presente sino con otros factores que están más relacionados con la digestibilidad o la composición de los nutrientes de estas dietas.

Cuando los animales fueron alimentados con diferentes niveles de proteína se observó que las proteasas generales (en todos los tejidos analizados), la tripsina (glándulas salivales y ciego) y leucin amino peptidasa (glándulas salivales posteriores y páncreas) mostraron una actividad inversamente proporcional al crecimiento; es decir una menor actividad fue observada en aquellos organismos que fueron alimentados con cangrejo fresco-congelado en comparación con los alimentados con alimento balanceado. Estudios realizados en otros invertebrados han demostrado que este tipo de respuesta es común y es reflejo de los mecanismos de compensación bioquímica que los animales despliegan cuando son alimentados con alimentos de baja digestibilidad. (Brito, 2000; Rodriguez *et al.* 1998). Aunque no existen referencias que indiquen una respuesta similar en cefalópodos, los resultados obtenidos ahora podrían indicar que los adultos de *O. maya* tienen la capacidad de aumentar la síntesis de las enzimas digestivas en un esfuerzo por aumentar la capacidad digestiva, sobre todo cuando el alimento es

deficiente. Es interesante hacer notar que la tripsina del páncreas presentó una mayor actividad en los animales alimentados con cangrejo fresco-congelado en comparación con la registrada en los animales alimentados con alimento balanceado. Estudios realizados en el hepatopáncreas de camarones peneidos han demostrado que la síntesis de tripsina es regulada transcripcionalmente y es modulada por la condición nutricional de los organismos. (Sanchez-Paza, 2003) Así mismo observaron que la síntesis de tripsina disminuye en animales con 72h de ayuno indicando que en condiciones nutricionalmente adversas la reducción en la síntesis pudiera significar un ahorro de proteínas al mismo tiempo que evita la autólisis potencialmente producida por un exceso de la enzima cuando el alimento esta ausente. Aunque los pulpos ingirieron el alimento balanceado, la baja secreción de tripsina en el páncreas pudiera indicar que, a través de alguna señal hormonal (Sanchez-Paza, 2003) la síntesis de tripsina fue inhibida provocando una secreción limitada de esta enzima. Es interesante hacer notar que en el ciego la actividad registrada de la mayoría de las enzimas (excepto la leucin amino peptidasa) fue menor en los animales alimentados con cangrejo fresco-congelado que en los alimentados con los alimentos balanceados.

Una vez que los nutrientes son absorbidos son rápidamente distribuidos a los tejidos en donde son utilizados como fuente de energía metabólica o para la síntesis de moléculas. El glucógeno contenido en la glándula digestiva y en el músculo se utilizó como indicador de este proceso. Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que el glucógeno de ambos tejidos fue registrado en los pulpos que presentaron el mayor crecimiento indicando una mayor acumulación de nutrientes en estos organismos. En un trabajo realizado en paralarvas de *O. vulgaris* (Villanueva *et al* 2004) reportaron que los amino ácidos juegan un papel importante como reserva de energía y son la base para la formación de glucógeno lo cual indica que las vías gluconeogénicas son altamente eficientes en cefalópodos. Este mecanismo de la formación de glucógeno a partir de proteínas ha sido observado en otros invertebrados. Cuzon *et al* (2001) y Rosas *et al* (2002), señalaron que el glucógeno del hepatopáncreas de camarones peneidos es sintetizado a partir de las proteínas de la dieta y que es utilizado en la síntesis de N-acetil-glucosamina, molécula base para la síntesis de quitina. La baja síntesis

de glucógeno en los juveniles de *O. maya* alimentados con alimentos balanceados indica que una menor cantidad de proteínas fue absorbida y por tanto poco glucógeno fue sintetizado. En contraste los niveles de glucógeno registrados en los animales alimentados con jaiba fresca-congelada indican una mayor absorción de proteínas la cual se vio reflejada en los niveles encontrados de glucógeno en los tejidos analizados. Estudios realizados en diferentes especies de cefalópodos han demostrado que los tentáculos son el sitio de mayor crecimiento lo que implica una alta demanda de energía a nivel celular (Rocha 2003). Por su parte (Koueta 2002) reportaron que en *Sepia officinalis* la energía para el crecimiento es derivada del glucógeno sintetizado a partir de proteínas por vías gluconeogénicas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en referencia al balance energético una limitación importante en la digestibilidad fue observada en los animales alimentados con ambos alimentos balanceados. Una proporción elevada de la energía perdida en las heces (entre el 40 y 50%) fue registrada en los pulpos alimentados con alimentos balanceados en comparación con lo observado en los alimentados con cangrejos frescos-congelados (18%). La energía perdida en heces indicó que una cantidad de energía limitada fue digerida, limitando la cantidad de energía y moléculas disponibles para ser utilizadas como fuente de energía metabólica y para el crecimiento.

Así, al igual que en otras especies de cefalópodos en *O. maya* los nutrientes del alimento y en particular las proteínas juegan un papel fundamental en el abasto de energía metabólica a través de la síntesis de glucógeno como a través de la síntesis de moléculas para el crecimiento. La cantidad de energía acumulada en el músculo, el balance energético y los niveles de glucógeno encontrados en los animales alimentados con cangrejos frescos-congelados mostraron que con esta dieta hubo una mayor acumulación de nutrientes que favoreció en crecimiento de los pulpos. Como resultado de las observaciones realizadas durante el primer experimento se pudo concluir que las diferencias en el crecimiento observadas entre los organismos alimentados con alimentos balanceados y cangrejos podrían estar asociadas con la composición propia del

alimento ofrecido o con las características asociadas con la digestibilidad de los nutrientes utilizados. Así mismo se pudo observar que, a diferencia de lo reportado en estudios previos, un crecimiento positivo fue observado en los pulpos alimentados con 60% PC lo cual también permitió observar que esa formulación podría estar en el camino para encontrar un alimento balanceado para *O. maya*.

Se ha demostrado que la composición del alimento interfiere de manera importante en el uso y aprovechamiento de los nutrientes del alimento. Estudios recientes llevados a cabo en *O. vulgaris* alimentados con sardina mostraron eficiencias de producción de biomasa de 23% indicando que este tipo de alimento limitó el crecimiento de esta especie. Esta limitación proviene de la composición proximal de la sardina la cual, al contener elevadas concentraciones de lípidos (más del 40%), limita la absorción de las proteínas en el ciego de los pulpos (García y Jiménez 2002, O'Dor, *et al* 1983, Petza *et al* 2006) Así mismo Lee *et al* (1998) encontraron que juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con pasta de pescado tipo surimi y otras fuentes proteicas presentaron baja asimilación de las proteínas y muy bajo crecimiento. Estos autores concluyeron que posiblemente la composición aminoacídica o la textura del alimento ofrecido pudieron haber intervenido en el crecimiento de esta especie.

Con base en los resultados obtenidos en el primer experimento se diseñaron dietas con diferentes niveles de inclusión de hidrolizado de pescado en un intento por ofrecer a los juveniles de *O. maya* un alimento con una proteína hidrolizada que podría ser de mejor digestión para los pulpos.

Un efecto positivo sobre el crecimiento de los juveniles de *O. maya* del nivel de inclusión de hidrolizado de pescado en el alimento fue observado. Los animales alimentados con 15% de inclusión de hidrolizado mostraron una tasa de crecimiento mayor que la observada en los pulpos alimentados con el alimento sin hidrolizado. La tasa de crecimiento de estos pulpos aunque positiva y mayor que la previamente registrada en el experimento 1, fue menor que la obtenida en los animales alimentados con cangrejo fresco-congelado. Estos resultados

indican que si bien la disponibilidad de proteína hidrolizada mejora la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento no alcanza a ser lo suficientemente eficiente para producir resultados similares a los obtenidos cuando los pulpos son alimentados con cangrejos.

Al hacer un análisis de los diferentes indicadores analizados se encontró que la actividad de las enzimas digestivas mostró patrones similares a los observados en el primer experimento: los animales que mostraron las mayores tasas de crecimiento (alimentados con 15% de inclusión de hidrolizado y cangrejos frescos-congelados) mostraron bajas actividades en las proteasas generales (glándulas salivales, glándula digestiva y ciego), tripsina (glándulas salivales, páncreas, y ciego) peptidasas (glándulas salivales, glándula digestiva y ciego) y carboxi-peptidasa (páncreas). Esto, al igual que lo observado podría ser interpretado como una reacción de los animales a un alimento que favorece (baja actividad de las enzimas) o limita (alta actividad) la absorción de nutrientes.

Los resultados del balance energético indican que los juveniles de *O. maya* alimentados con hidrolizado de pescado tuvieron una limitada absorción de nutrientes hecho que fue observado a partir de los valores de la relación energía absorbida/energía ingerida ( $Ab/I, \%$ ): valores de entre 37 y 48% fueron obtenidos en los animales alimentados con alimento balanceado en comparación con el 82% mostrado por los pulpos alimentados con cangrejos frescos-congelados. Así mismo una alta proporción de energía fue perdida en las heces (entre 52 y 63%) lo cual se reflejó en una producción de biomasa que osciló entre 0.9 y 2.6%. Es interesante hacer notar que la proporción de energía ingerida que fue utilizada en la respiración no fue muy distinta entre todos los tratamientos (entre 9 y 15%) indicando que ni los alimentos balanceados ni el cangrejo fresco congelado produjeron un mayor esfuerzo metabólico que pudiera afectar de manera importante la energía canalizada a la producción de biomasa. Esto es particularmente importante si se considera que en los estudios llevados a cabo con otras especies de cefalópodos se ha demostrado que el alimento puede llegar a incrementar la tasa respiratoria significativamente reduciendo la energía disponible para la síntesis de tejido nuevo (García y Jiménez 2002, O'Dor, *et al*

1983, Petza *et al* 2006). Es decir, los resultados obtenidos ahora demuestran que la formulación utilizada para fabricar el alimento balanceado con 15% de hidrolizado de pescado podría ser la apropiada para el crecimiento de *O. maya* ya que este alimento favorece una mayor acumulación de biomasa sin alterar la tasa metabólica.

Una forma de conocer los efectos nutricionales del alimento es a través de los metabolitos sanguíneos. Diversos estudios realizados en camarones peneidos han demostrado que algunos componentes de la sangre son útiles para establecer la condición nutricional de estos organismos (Pascual *et al* 2003). En el presente estudio se observó que los niveles sanguíneos de la glucosa en los juveniles de *O. maya* no presentaron ninguna relación con los tipos de alimentos ensayados. Aunque no hay referencias de evaluaciones de este tipo en cefalópodos los estudios realizados en camarones peneidos han demostrado que en general la glucosa es un indicador limitado del estado nutricional debido a que estos organismos concentran la mayor actividad metabólica en las proteínas. Así el uso de los carbohidratos derivados de la dieta está limitado a su uso como fuente de energía inmediata, muchas de las veces en el mismo hepatopáncreas (Pascual *et al* 2003).

Una situación muy diferente es la que enmarca a los niveles encontrados de lactato, los cuales mostraron valores mucho mayores en los animales alimentados con alimento sin hidrolizado (0%) que el registrado en pulpos alimentados con los otros alimentos. De acuerdo con Akagi y Ohmori (2004) en *O. vulgaris* el lactato puede ser sintetizado a partir de aminoácidos o de glicerol provenientes de la degradación de proteínas o de carbohidratos resultando ser un sub producto del ciclo de los ácidos tri-carboxílicos.

En condiciones normales, es evidente que la producción de lactato debería ser baja pues los pulpos aprovecharían mejor los aminoácidos para la formación de biomasa muscular o para satisfacer las demandas de energía en la formación de glucógeno. Esto fue observado en los organismos alimentados con hidrolizado y cangrejos. En contraste los pulpos alimentados sin hidrolizado

mostraron altos niveles de lactato los cuales podrían ser interpretados como una evidencia de que estos animales al estar en una condición nutricional deficiente se vieron obligados a utilizar sus propias proteínas siguiendo un proceso de autodigestión el cual tendría como producto final el lactato observado en la sangre. Otra evidencia que apoya esta hipótesis son los bajos niveles de proteína sanguínea registrados en los animales alimentados sin hidrolizado.

Aunque no hay referencias sobre el uso del colesterol como sub producto del metabolismo en cefalópodos, las evidencias observadas en otros invertebrados han demostrado que cuando hay una degradación de proteínas musculares en situaciones de estrés nutricional, aparecen elevadas concentraciones de colesterol como consecuencia de la liberación de esta molécula ya sea como sustituto de membranas o como sub producto de la degradación de éstas (Pascual *et al* 2006.) El patrón irregular observado en los niveles de acil glicéridos en sangre podrían indicar que, tal y como ha sido reportado para otras especies de pulpos, el metabolismo de lípidos es limitado en estos organismos (Romjin 1935,; Takahashi 1963). Es evidente de los resultados obtenidos ahora que el alimento hidrolizado y los cangrejos frescos-congelados utilizados como alimento afectaron de manera similar a los metabolitos sanguíneos, la hemocianina, al glucógeno y al contenido energético de la glándula digestiva y del músculo de *O. maya*. Esto permite establecer que, aunque el alimento balanceado con hidrolizado no fue apropiadamente digerido, su composición fue lo suficientemente adecuada para satisfacer las demandas de energía y moléculas que requiere esta especie para mantener la homeostasis. Así, los resultados obtenidos ahora permiten concluir que de las dos posibilidades propuestas como determinantes del efecto de los alimentos balanceados sobre el crecimiento de los pulpos (digestibilidad o composición de nutrientes) pudieran ser los problemas asociados a la digestibilidad de la fuente proteica los que resultaron ser limitantes para el crecimiento *O. maya*. Mejorar la digestibilidad del alimento facilitando la absorción de nutrientes deberá de ser el siguiente paso para lograr que la formulación que favoreció el crecimiento de los pulpos de cómo resultado tasas de crecimiento cercanas a las observadas cuando los animales son alimentados con cangrejos.

## CONCLUSIONES

### CRECIMIENTO

1. Los adultos silvestres de *O. maya* utilizados en el presente estudio se aclimataron bien a las condiciones de laboratorio.
2. Los organismos alimentados con jaibas del género *Callinectes*, sobrevivieron y crecieron a tasas similares a las reportadas en otros estudios que se llevaron a cabo con pulpos alimentados con otras especies de cangrejos y mantenidos en condiciones de cautiverio.
3. La tasa de crecimiento de los pulpos alimentados con cangrejos fue superior a la observada cuando se les alimento con alimento balanceado.
4. La dieta formulada con 60% PC y con 15% de SPCP mostraron un crecimiento positivo, sin embargo ninguno de estos alimentos satisfizo los requerimientos nutricionales de los pulpos.
5. Los niveles de glucógeno y de energía del músculo del brazo y de la glándula digestiva mostraron diferencias significativas entre tratamientos con valores mayores en los animales alimentados con cangrejos, indicando que la proteína nativa ingerida favorece la gluconeogénesis y por tanto la acumulación de energía.

### ENZIMAS DIGESTIVAS

6. *Octopus maya* puede regular la actividad de las enzimas digestivas en función del tipo de alimento que ingieren. En general se observo que dietas deficientes inducen una mayor actividad de las enzimas digestivas.

### BALANCE ENERGÉTICO

7. Los resultados obtenidos del balance energético indican que, al igual que otras especies de cefalópodos, *O maya* no digiere los alimentos balanceados afectando de manera importante la energía disponible para el crecimiento.
8. La baja digestibilidad registrada y la alta actividad de las enzimas digestivas observada en animales alimentados con alimento balanceado indica que antes de formular nuevamente se deberá de establecer la capacidad digestiva de los pulpos y su relación con los insumos que son mejor digeridos. Un estudio relacionado con el comportamiento de las enzimas digestivas durante las distintas fases del desarrollo de los juveniles asi como un estudio de digestibilidad de insumos deberá realizarse con el fin de establecer los insumos que son más apropiados para la formulación de dietas para *O. maya*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akagi, S. y S. Ohmori. 2004. "Threonine is the best substrate for D-lactate formation in octopus tentacle." *Amino Acids* 24: 169-174.
- Altman, J.S. 1967. The behavior of *Octopus vulgaris* Lam. in its natural habitat: A pilot study. *Underwater Assoc. Rep.*,77-83.
- Altman, J.S. y Nixon, M. 1970. Use of the beak and radula by *Octopus vulgaris* in feeding. *Zool* 161: 25-38.
- Amaratunga. T. 1983. The role of cephalopods in marine ecosystem. In: *Advances in assessments of World Cephalopod Resources*. FAO Fish. Tech. Pap. 23: 379-415.
- Best, E.H.M. 1981. Aspects of the digestive system and its control in *Octopus vulgaris*. Ph. D. Thesis, Cambridge University, England.
- Bidder, A. 1950. The digestive mechanism of the European squids *Loligo forbesi*, *Alloteuthis media* and *Alloteuthis subulata*. *Q. J. Microsc. Sci.* 91, 1-43.
- Bidder, A. 1966. Feeding and digestion in cephalopods. In: *Physiology of Mollusca*. (Ed. K.M. Wilbur, C.M. Young), Vol. 2, 97-124. Academic Press, New York & London.
- Boletzky S., 1975. The reproductive cycle of Sepiolidae. *Pubblicazione Stazione Zoologica Napoli* 39: 84-95.
- Boletzky S. y Hanlon R.T. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod mollusks. *Mem. Nat. Mus. Vic.* 44, 147-187.
- Boucaud-Camou, E. 1969. Etude histologique et histochimique de l'appareil digestif de *Sepiola atlantica* d'orbigny et *Sepia officinalis* L. *Bull. Soc. Linn. Normandie* 9 : 220-243.
- Boucaud-Camou, E. 1973. Etude de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L. (Mollusque: Cephalopode). *Essai d'analyse experimentale des phenomenes digestifs*. Ph. D. Dissertation, Univ. Of Caen, France.
- Boucaud-Camou, E. 1974. Localization d'activités enzymatiques impliqués dans la digestion chez *Sepia officinalis* L. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 115, 5-27.
- Boucaud-Camou, E., Boucher-Rodoni, R. y Mangold, K. 1976. Digestive absorption in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *J. Zool.* 179, 261-271.

- Boucaud-Camou, E. 1977. Structure et fonction de l'épithèle caecale de *Sepia officinalis* L. Biol. Cell. 29, 55-60.
- Boucaud-Camou, E. y Boucher-Rodoni, R. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. In: The Mollusca, Vol. 5, Academic Press, 149-187.
- Boucaud-Camou, E. y Pequignat, E. 1973. Etude expérimentale de l'absorption digestive chez *Sepia officinalis* L. Forma & Functio 6, 93-112.
- Boucaud-Camou, E. y Roper, C.F.E. 1995. Digestive enzymes in paralarvae cephalopods. Bull. Mar. Sci. 57, 313-327.
- Boucaud-Camou, E. y Roper, C.F.E. 1998. The digestive system of *rhycoteuthion* paralarvae (Cephalopoda: Ommastrephidae). Bull. Mar. Sci. 62, 81-88.
- Boucher-Rodoni, R. 1975. Vitesse de digestion chez les céphalopodes *Eledone cirrosa* (Lamarck) et *Illex illecebrosus* (Lesueur). Cah. Biol. Mar. 16, 159-175.
- Boucher-Rodoni R. y Mangold K. 1985. Ammonia excretion during feeding and starvation in octopus vulgaris. Marine biology 86.
- Boucher-Rodoni R, Boucaud-Camou E, Mangold K. 1987. Feeding and digestion. In: Boyle, PR (ed) Cephalopod Life Cycles, Vol. II. Academic Press, London, pp. 85-108.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brito, R., 2000 "Growth, metabolic rate, and digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarvae fed different diets." J.Exp.Mar.Biol.Ecol. 255: 21-36.
- Castro B.G., DiMarco F.P., DeRusha R. y 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. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 170, 241-252.
- Castro B.G. y Lee P.G. 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A(4), 1007- 1016.
- Chen, J. C. y S. Y. Cheng. 1993 "Studies in hemocyanin and hemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle." Comp.Biochem.Physiol.B 106: 293-96.
- Choe, S., 1966. On the eggs, rearing, habits of fry, and growth of some Cephalopoda. Bull. Mar. Sci. 16, 330-348.

- Cuzon, G.. 2001. "Effect of dietary carbohydrates on gluconeogenesis in premolt *Litopenaeus stylirostris* juveniles and pre adults." *Journal of Shellfish Research* 20: 931-37.
- D'Aniello, A. y Scardi, V. 1971. Attivita cellulasica nel polipo (*Octopus vulgaris*). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 47, 481-483.
- DeRusha R.H., Forsythe J.W., DiMarco F.P. y Hanlon R.T. 1989. Alternative diets for maintaining and rearing cephalopods in captivity. *J. Lab. Anim. Sci.* 39, 306-312.
- Domingues, P.M., Kingston, T., Sykes, A., y 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., y 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., y 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.M., Poirier, R., Dickel, L. Almansa, E. Sykes, A. y Andrade, J. 2003. Effects of culture density and live prey on growth and survival of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquaculture International* 11, 225-242.
- Domingues, P., Sykes, A., Sommerfield, A., Almansa, E., Lorenzo, A. y 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.
- 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. y Van Heukelem, W.F. 1987. Growth. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Vol. II. Academic Press, London, pp: 135-156.
- Forsythe, J.W., DeRusha, R. y Hanlon, R.T., 1994. Growth, reproduction and life span of *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Mollusca) cultured through seven consecutive generations. *J. Zool. Lond.* 233, 175-192.
- Forsythe, J.W. y 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. y Van Heukelem, W.F. 1987. Growth. In: Boyle, P.R. (Ed.), Cephalopod Life Cycles. Vol. II. Academic Press, London, pp: 135-156.

Fox, D.L. 1966. Pigmentation of molluscs. In: Physiology of Mollusca. (Ed. K.M. Wilbur, C.M. Young), Vol. 2, 249-274. Academic Press, New York and London.

García B.G. y Giménez, F.A. 2002. Influence of diet on growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). Aquaculture 211: 173-184.

Geiger R. y Fritz H. 1988. Tripsin, in Methods of Enzymatic Analysis. Vol. V Enzymes 3. Peptidases Proteinases and Their Inhibitors. Thrid edition. Bergmeyer J. And Grab IM editors. 119-124 pp.

Gilbert DL, Adelman WJ, Arnold JM (Eds) 1990. Squid as experimental animals. Plenum Press, New York.

Giménez, F.A. y García, B.G. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Couvier (1797): Influence of body weight, temperature, sex and diet. Aquaculture International 10, 361-377.

Hanlon, R.T. y Forsythe, J.W. 1985. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*, 33-40.

Hanlon R.T., Turk P.E. y Lee P.G., 1991. Squid and cuttlefish mariculture: An update perspective. *J. Ceph. Biol.* 2(1), 31-40.

Koslovskaya, E.P. y Vaskovsky, V.E. 1970. A comparative study of proteinases of marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 34, 137-142.

Koueta, N., Boucaud-Camou, E. y Noel, B. 2002. Effect of enriched natural diet on 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., Forsythe J.W., DiMarco F.P., DeRusha R. y 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. y DiMarco, F.P., 1998. Cephalopod Culture: Pysiological, Behavioral and Environmental requirements. *Suisan Zoshoku* 46(3), 417-422.

Lucas, A. 1993. Bioénergétique Des Animaux Aquatiques. Masson, Paris. pp 1-176.

Mangold, K. y Boletzky, S. 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.* 19, 7-12.

Mangold K., 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of the National Museum Victoria* 44, 81-93.

McClure, W.O., H. Neurath y K.A. Walsh. 1964. Reaction of Carboxypeptidase A with Hippuryl-DL- $\beta$ -Phenyllactate. Vol. 3, No. 12, December, 1964.

Morishita, T. 1974. Participation in digestion by proteolytic enzymes of the posterior salivary gland in *Octopus*. I. Confirmation of the existence of protein digestive enzymes in the posterior salivary gland. *Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.)*. 40, 601-607.

Nixon, M. 1966. Changes in body weight and intake of food by *Octopus vulgaris*. *Pubbl. Stn. Zool. Napoli* 34, 329-339.

O'Dor R.K. y Wells M.J. 1987. Energy and nutrient flow. In: *Cephalopod life cycles* (Boyle, P.R. ed), Vol. 2, pp. 109-133. Academic Press, London.

O'Dor , R.K. y Wells, M.J. 1978. Reproduction vs. Somatic growth: Hormonal control in *Octopus vulgaris*. *J. Exp. Biol.* 77, 529-540.

O'Dor, R.K., Mangold, K., Boucher-Rodoni, R., Wells, M.J. y Wells, J. 1983. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine Behavior and Physiology* 11, 239-258.

Oestmann D.J., Scimeca J.W., Forsythe J.W., Hanlon R.T. y Lee P.G. 1997. Special considerations for keeping cephalopods in laboratory facilities. *Contemporary Topics Lab. Anim. Sci.* 36, 89-93.

Okutani, T. 1990. Squids, cuttlefish and octopuses. *Mar. Behav. Physiol.* 18, 1-17.

Okutani, K. y Kimata, M. 1964. Studies on chitinolytic enzymes present in aquatic animals. III. Distribution of chitinase digestive organs of a few kinds of aquatic animals. *Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.)*. 30, 574-576.

Pascual, E. 1978. Crecimiento y alimentación de tres generaciones de *Sepia officinalis* en cultivo. *Investigación Pesquera* 42, 421-442.

Pascual, C., G. Gaxiola, y C. Rosas. 2003. "Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species." *Marine Biology* 142: 735-45.

Pascual, C, y C. Rosas. 2006 "Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*." Aquaculture Press, Corrected Proof, Available online 10 August 2005.

Petza, D., S. Katsanevakis, y G. Verriopoulos. 2006 "Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed *ad libitum* on a high-lipid diet." Mar.Biol. 148: 827-32.

Prosser, L. C. 1950.Comparative Animal Physiology. Philadelphia, USA

Richard, A. 1971. Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode). Thèse n° 248: Univ. Lille. 264 p.

Rocha, F. 2003. Biología, Ecología, Cultivo y Pesquerías De Cefalópodos. Vigo, España: Instituto de Investigaciones Marinas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). 1-207.

Rodríguez, C. Perez, J.A., Badía, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H. y Lorenzo-Hernández, A. 1998. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using appropriate DHA/EPA ratios in the diet. Aquaculture 169, 9-23.

Romanini, M.G. 1952. Osservazioni istochimicamente rivelabili dei fermenti delle ghiandole salivari anteriori e posteriori di *Octopus vulgaris*. Boll. Soc. Ital. Sper. 25, 1179-1180.

Romijn, C. 1935. Die Verdaunngsenzyme bei einigen ephalopoden. Arch. Neerl. Zool. 1, 373-431.

Rosas, C.; Cooper, E.L.; Pascual, C.; Brito, R.; Gelabert, R.; Moreno, T.; Miranda, G.; Sánchez, A. 2004 "Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae)." Marine Biology 145 (2004): 401-13.

Rosas, G., G. Cuzon, G. Gaxiola, y LePriol, P. C., J. Rissigniol, F. Contreras, A. Sanchez y A. Vanwormhoudt. 2002. "An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 268: 47-67.

Rosas, C.; Cuzon, G.; Pascual, C.; Gaxiola, G.; Chay, D.; López,N.; Maldonado,T.; Domingues, P. "Energy balance of *Octopus maya* fed crab and artificila diet" Marine Biology in press.

Sánchez-Paza, A. 2003. "Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions." J.Exp.Mar.Biol.Ecol. 292: 1-17.

Sawano, E. 1935. Proteolytic enzymes in *polypus vulgaris* Lamarck. Sci. Rep. Zool. Inst. Tokyo. 34, 101-126.

Solis, M.J. 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solis. *Inst. Nacional Investig. Biol. Pesqueras* (México), Publicación Num. 18, 90 p.

Solis-Ramirez, 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.

Takahashi, T. 1960. Biochemical studies on the viscera of cuttlefish, *Omastrephes sloani pacificus*. III. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.). 26, 500-507.

Takahashi, T. 1963. Studies on the viscera enzymes of cuttlefish *Omastrephes sloani pacificus*. J. Fac. Fish. Prefect. Univ. Mie. 5, 384-411.

Todd E. W., 1949. Quantitative Studies On The Total Plasmin: An the Tripsin Inhibitor or Human Blood Serum. J. Exp. Med., 89,295-308.

Tuppy, H.; Wisbaver, V.; Winterberger, E. Aminosäure-p-nitroanilide als Substrate for Aminopeptidase und andere proteolytische Fermente. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 329:278-288; 1962.

Van Heukelem, W.F. 1976. Growth, bioenergetics and life span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. Ph. D. thesis, Univ. Hawaii, 224 p.

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.

Van Heukelem, W.F. 1983. *Octopus maya* In: Boyle, P.R. (Ed.), Cephalopod Life Cycles. Vol. I. Academic Press, London, pp: 311-323.

Vargas-Albores, F., M. A. Gúzman, y J. L. Ochoa. "An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*)."  
Comp.Biochem.Physiol. 106A.2 (1993): 299-303.

Villanueva, R. 1994. Decapod crab zoeae as food for rearing cephalopod paralarvae. Aquaculture 128, 143-152.

Villanueva, R. 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 2639-2650.

Villanueva, R., Riba, J., Ruíz-Capillas, C., González, A.V. y 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

Voss, G.L. y Solis, M.J. 1966. *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche. *Bulletin of Marine Science* 16, 615-625.

Wells, M.J., O'dor, R.K., Mangold, K. y Wells, J. 1983. Diurnal changes in activity and metabolic rate in *Octopus vulgaris*. *Marine Behavior and Physiology* 9, 275-287.

## **ANEXOS**

### **Análisis proximal**

#### **Alimento semihúmedo sin hidrolizado de pescado**

<b>Determinaciones</b>	<b>Resultados</b>
Humedad (pérdida al secado)	39.80%
Cenizas	10.49%
Grasa (extracto etereo)	3.72%
Proteína (Nx6,25)	33.87%
Fibra cruda	1.54%
Extracto Libre de Nitrógeno	10.58%

#### **Alimento semihúmedo 5% de hidrolizado de pescado**

<b>Determinaciones</b>	<b>Resultados</b>
Humedad (pérdida al secado)	37.82%
Cenizas	10.90%
Grasa (extracto etereo)	3.54%
Proteína (Nx6,25)	38.09%
Fibra cruda	1.45%
Extracto Libre de Nitrógeno	8.20%

#### **Alimento semihúmedo 10% de hidrolizado de pescado**

<b>Determinaciones</b>	<b>Resultados</b>
Humedad (pérdida al secado)	39.03%
Cenizas	11.12%
Grasa (extracto etereo)	4.67%
Proteína (Nx6,25)	35.30%
Fibra cruda	.73%
Extracto Libre de Nitrógeno	9.15%

#### **Alimento semihúmedo 15% de hidrolizado de pescado**

<b>Determinaciones</b>	<b>Resultados</b>
Humedad (pérdida al secado)	38.34%
Cenizas	11.17%
Grasa (extracto etereo)	4.89%
Proteína (Nx6,25)	37.67%
Fibra cruda	1.32%
Extracto Libre de Nitrógeno	6.61%

#### **Alimento semihúmedo 20% de hidrolizado de pescado**

<b>Determinaciones</b>	<b>Resultados</b>
Humedad (pérdida al secado)	37.37%
Cenizas	10.86%

Grasa (extracto etereo)	4.01%
Proteína (Nx6,25)	39.33%
Fibra cruda	1.48%
Extracto Libre de Nitrógeno	6.95%

Humedad (pérdida al secado) Método AOAC934.01 Cap 4 Alimento para animales.

Cenizas Método Gravimétrico. Método AOAC 942.05 Cap 4 Alimento para animales.

Grasa (extracto etéreo) Método AOAC 920.39 Cap 4 Alimento para animales

Proteína (Nx6,25) Método Kjeldahl, Método AOAC 984.13 Cap 4 Alimento para animales.

Fibra cruda Método Gravimétrico. Método AOAC 962.09 Cap 4 Alimento para animales.

Extracto Libre de Nitrógeno. Calculo por diferencia NMX-Y-097.1974 Determinación del extracto libre de nitrógeno en alimentos para animales

### **Alimento semihúmedo sin hidrolizado de pescado**

<b>Aminoácidos totales: perfil anexo</b>	<b>(g.aa/100g prot.)</b>
Ácido aspartico	9,578
Treonina	4,180
Serina	4,546
Ácido glutâmico	15,636
Glicina	5,280
Alanina	6,059
Cisteína	0,604
Valina	5,008
Metionina	2,884
Isoleucina	3,987
Leucina	8,036
Tirosina	2,601
Fenilalanina	4,073
Histidina	2,177
Lisina	6,629
Triptofano	0,954
Amônio	1,386
Arginina	5,535
Prolina	4,982
Aminoácidos totales	94,155

### **Alimento semihúmedo 5% de hidrolizado de pescado**

<b>Aminoácidos totales: perfil anexo</b>	<b>(g.aa/100g prot.)</b>
Ácido aspartico	9,888

Treonina	4,450
Serina	4,468
Ácido glutâmico	15,390
Glicina	5,618
Alanina	6,363
Cisteína	0,492
Valina	5,296
Metionina	2,025
Isoleucina	4,480
Leucina	8,264
Tirosina	2,896
Fenilalanina	4,408
Histidina	2,455
Lisina	7.394
Triptofano	1.053
Amônio	1,428
Arginina	6,013
Prolina	5,054
Aminoácidos totales	97,445

#### **Alimento semihúmido 10% de hidrolizado de pescado**

<b>Aminoácidos totales: perfil anexo</b>	<b>(g.aa/100g prot.)</b>
Ácido aspartico	10,378
Treonina	4,627
Serina	4,644
Ácido glutâmico	14,770
Glicina	5,705
Alanina	7,048
Cisteína	0,598
Valina	5,372
Metionina	2,907
Isoleucina	4,221
Leucina	8,285
Tirosina	2,861
Fenilalanina	4,221
Histidina	2,922
Lisina	7,729
Triptofano	1,257
Amonio	1,286
Arginina	5,999
Prolina	4,606
Aminoácidos totales	99,471

#### **Alimento semihúmido 15% de hidrolizado de pescado**

Aminoácidos totales: perfil anexo	(g.aa/100g prot.)
Ácido aspartico	10,047
Treonina	4,468
Serina	4,462
Ácido glutâmico	14,154
Glicina	5,688
Alanina	6,869
Cisteína	0,573
Valina	4,996
Metionina	2,658
Isoleucina	4,008
Leucina	7,902
Tirosina	2,876
Fenilalanina	4,089
Histidina	2,732
Lisina	7,280
Triptofano	1,118
Amônio	1,327
Arginina	6,451
Prolina	4,416
Aminoácidos totales	96,113

### **Alimento semihúmido 20% de hidrolizado de pescado**

Aminoácidos totales: perfil anexo	(g.aa/100g prot.)
Ácido aspartico	9,896
Treonina	4,406
Serina	4,258
Ácido glutâmico	13,829
Glicina	5,703
Alanina	6,834
Cisteína	0,563
Valina	5,334
Metionina	2,345
Isoleucina	4,436
Leucina	7,945
Tirosina	2,930
Fenilalanina	4,146
Histidina	2,959
Lisina	8,284
Triptofano	1,088
Amônio	1,353
Arginina	6,111
Prolina	4,321
Aminoácidos totales	96,789

Aminoácidos totales.- Autoanalizador de aminoácidos Método AOAC 932.30  
Edición 2000. Preparacion con hidrólisis ácida inciso E.

Triptofano.- Autoanalizador de aminoácidos Método AOAC 988.15 Edición 2000.  
Hidrólisis alcalina.