



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**VALOR NUTRITIVO DE ENSILADO DE DESECHOS DE PESCADO PARA
JUVENILES DE PULPO OCTOPUS MAYA: CRECIMIENTO, ACTIVIDAD
DIGESTIVA Y RESERVAS NUTRITIVAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ASael CORTES GUTIERREZ

DIRECTOR DE TESIS: DOCTOR EN CIENCIAS. PEDRO PABLO GALLARDO

ESPINOSA

ASESOR: MAESTRO EN CIENCIAS. FERNANDO YAHIR GARCÍA GÓMEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx.

2019



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.

Esta tesis fue desarrollada con apoyo de una beca de parte de la DGAPA-UNAM con el proyecto PAPIIT número IT201117 bajo la responsabilidad del Dr. Pedro Pablo Gallardo Espinosa, con el apoyo técnico de la M. en C. Ariadna Sánchez y M. en C. Claudia Caamal.

DEDICATORIA

A mis papás, Bertha Gutiérrez Cabrera y Antonio Cortes Jiménez, que con trabajo, dedicación y amor han fomentado en sus hijos que siempre luchen por conseguir sus metas, a ellos atribuyo mis éxitos y todo lo que llegare a ser.

A mi hermana, Emelyn Cortes Gutiérrez, uno de los principales modelos a seguir, mujer inteligente y de grandes virtudes, siempre me ha motivado a tener una mente abierta, a descubrir el mundo y el deseo de conocer más.

A mis amigos, Gabriel, Mariana “abuelo”, Alan Sil, Víctor, Alan, Ángel, Israel, Andrés y Sergio. Todos tienen algo en común, son personas con las que te perfeccionan y enriqueces, haciendo de la vida un agradable viaje.

A Berenice Serrano Guzmán, mujer de personalidad complicada, esencia mística y gran inteligencia, se puede comparar con un buen libro, influye en ti, aprendes de ella y no puedes dejar de leerla.

A Estefany López, Xani Pimentel, Natalia Fitch, Yonel Alejandro Jiménez y Gabriel Carrera, increíbles amigos que conocí durante la realización de mi tesis, su alegría, apoyo y confianza hicieron de Sisal un lugar aún mejor.

“...algunos recorren el camino a nuestro lado, viendo muchas lunas pasar, mas otras apenas vemos entre un paso y otro. A todas las llamamos amigos y hay muchas clases de ellos.” Jorge Luis Borges

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Pedro Pablo Gallardo Espinosa, por su confianza en mi para este proyecto y permitirme cumplir mi meta de realizar una tesis, por su trabajo, apoyo y explicaciones durante todo el proceso, por el aprecio que le tomé a la nutrición, área en la que nunca pensé trabajar e introducirme al fascinante mundo de los cefalópodos.

Al doctor Carlos Rosas y Claudia Patricia Caamal, por su apoyo y calidez que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio, pero sobre todo por los conocimientos que me transmitieron y las oportunidades de participar en otras actividades, su pasión por la investigación siempre me inspiró.

A Ariadna Sánchez y Karla Escalante, por su trabajo y colaboración en el laboratorio central, sus enseñanzas y apoyo fueron fundamentales para el procesamiento de las muestras.

A don Antonio y doña Silvia, lo primero que aprendí sobre los pulpos y la pesca fue por parte de ellos, por abrirme las puertas de su casa y compartir la increíble comida que preparaban, por su generosidad y trabajo les estaré eternamente agradecido.

A la cooperativa Moluscos del Mayab, su esfuerzo y trabajo durante estos años pronto se verá recompensado.

A Sisal, por la calidez de su gente, la limpieza de sus playas, el azul de sus aguas, las tonalidades de sus atardeceres, sus paisajes, su flora y fauna, su cultura y gastronomía que tuve la fortuna de experimentar, una joya de la península de Yucatán.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y sus maestros, por todas las oportunidades y conocimiento que me brindaron.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, a la que estoy orgulloso de pertenecer.

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| DEDICATORIA | II |
| CONTENIDO..... | V |
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| ANTECEDENTES | 6 |
| CARACTERÍSTICAS GENERALES | 6 |
| TAXONOMÍA | 7 |
| DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT | 7 |
| ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN | 7 |
| AVANCES EN DIETAS ARTIFICIALES | 9 |
| ENSILADOS DE DESECHO DE PESCADO | 11 |
| COMPOSICIÓN DEL ENSILADO | 13 |
| CAMBIOS Y ALTERACIONES EN EL ENSILADO | 14 |
| USO DE ENSILADOS DE DESECHOS DE PESCADO EN OTRAS ESPECIES | 16 |
| JUSTIFICACIÓN | 17 |
| HIPÓTESIS..... | 18 |
| OBJETIVOS..... | 18 |
| OBJETIVO GENERAL | 18 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| MATERIA PRIMA | 19 |
| ELABORACIÓN DEL ENSILADO | 19 |
| OBTENCIÓN DE JUVENILES DE <i>O. MAYA</i> | 20 |

| | |
|---|-----------|
| DISEÑO EXPERIMENTAL | 21 |
| DISPOSITIVO EXPERIMENTAL..... | 22 |
| PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS..... | 23 |
| CRECIMIENTO Y TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO | 23 |
| SOBREVIVENCIA | 24 |
| ÍNDICE DE RENDIMIENTO | 24 |
| TASA DE INGESTIÓN..... | 24 |
| PORCENTAJE DE LIXIVIACIÓN..... | 25 |
| OBTENCIÓN DE MUESTRAS | 25 |
| METABOLITOS Y RESERVAS NUTRITIVAS..... | 26 |
| ACTIVIDAD ENZIMÁTICA..... | 27 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 29 |
| RESULTADOS | 29 |
| PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS..... | 29 |
| CONDICIONES FISICOQUÍMICAS DEL ENSILAJE DE LOS DESECHOS DE PESCADO..... | 32 |
| CRECIMIENTO DE JUVENILES DE O. MAYA | 36 |
| SOBREVIVENCIA | 37 |
| TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO | 38 |
| ÍNDICE DE RENDIMIENTO | 38 |
| TASA DE INGESTIÓN | 39 |
| METABOLITOS Y RESERVAS NUTRITIVAS EN MUSCULO | 41 |
| METABOLITOS Y RESERVAS NUTRITIVAS EN GLÁNDULA DIGESTIVA..... | 42 |
| ACTIVIDAD ENZIMÁTICA..... | 43 |
| DISCUSIÓN | 45 |
| PARÁMETROS..... | 45 |
| ENSILADO..... | 47 |

| | |
|---|-----------|
| CRECIMIENTO, TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA | 51 |
| TASA DE INGESTIÓN E ÍNDICE DE RENDIMIENTO | 53 |
| METABOLITOS Y SUSTANCIAS DE RESERVAS METABÓLICAS | 55 |
| ACTIVIDAD ENZIMÁTICA..... | 57 |
| CONCLUSIONES | 60 |
| REFERENCIAS..... | 62 |

Resumen

CORTES GUTIERREZ ASAEL. Valor nutritivo de ensilado de desechos de pescado para juveniles de pulpo *Octopus maya*: crecimiento, actividad digestiva y reservas nutritivas (Tutor principal: Doctor en ciencias. Pedro Pablo Gallardo Espinosa. Asesor: Maestro en Ciencias. Fernando Yahir García Gómez)

El pulpo rojo ha aumentado su demanda de pesca año con año y llevando a la especie a su límite sustentable. Las características que presentan lo hacen una especie viable para la acuicultura, sin embargo, los precios para realizar las dietas hacen que la aplicación en cultivo de las dietas sea inviable.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de cuatro dietas peletizada sobre el crecimiento, sobrevivencia, reservas metabólicas y actividad digestiva en juveniles de pulpo *Octopus maya*, utilizando como ingrediente ensilado químico de desechos de pescado generados de la pesca ribereña en Sisal, Yucatán.

Se utilizó la dieta jaiba-calamar como control (CT) y tres más donde se sustituyó parcialmente la carne de jaiba (ingrediente de mayor costo) con ensilados de desechos de pescado de 1 (dieta E1), 3 (dieta E3) y 10 (dieta E10) días de ensilaje. Las dietas se aplicaron en un bioensayo con 80 juveniles de *Octopus maya* (20 por tratamiento) durante 90 días, en los que se evaluó tasas de sobrevivencia y crecimiento, registrando peso al inicio y cada 30 días. Al final del bioensayo se tomaron muestras de músculo y glándula digestiva de 16 pulpos (4 de cada tratamiento) para evaluar metabolitos y actividad de proteasas. El ensilado de desechos se mantuvo estable durante el tiempo de ensilaje, permaneciendo en valores por debajo de pH4 sin la necesidad de una segunda incorporación de ácido, la temperatura permaneció en un promedio de 27°C y la proteína soluble aumento de manera exponencial hasta después del día 10. En vista de que no se observaron diferencias significativas entre los grupos de cada dieta, solo se podría especular que existe una tendencia en los pulpos alimentados con dietas que contenían el ensilado, siendo los de mayor crecimiento y tasa específica de crecimiento (TEC) (2.1 % día⁻¹) los pulpos mantenidos con la dieta E1, mientras que una mayor sobrevivencia e índice de rendimiento (85% y 1.57% día⁻¹ respectivamente)

fueron obtenidos por los pulpos alimentados con la dieta E3. La proteína soluble en músculo fue similar en pulpos alimentados con dietas control y E3, pero estos últimos presentaron mayores reservas de glucógeno. Los valores en concentración de colesterol, acilglicéridos y proteína soluble fueron similares y no presentaron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$). En relación a la actividad proteolítica, una menor actividad de proteasas alcalinas fue obtenida por los pulpos alimentados con dieta E3 en relación a la mostrada por los organismos sometidos a las otras dietas ($p < 0.05$). En cuanto a la actividad específica de proteasas ácidas y de lipasas no se observan diferencias significativas ($p > 0.05$).

Introducción

La flora y fauna acuática son recursos naturales de los cuales se pueden generar alimentos de alto valor nutritivo, lo que los vuelve de alta importancia económica, para las regiones donde se practica captura o cultivo de dichas especies, social, al ser la principal fuente de ingresos de comunidades y personas involucradas, cultural, al formar parte de la gastronomía que se desarrolla a nivel regional o nacional y nutricional, para la población que tiene acceso a estos productos y forma parte de su dieta como fuente de proteína de origen animal. En México, el sector pesquero es el encargado de capturar, cultivar, transformar y comercializar los productos obtenidos de las regiones pesqueras y acuícolas del país, formando parte del quehacer económico nacional por el alto número de divisas que este genera (Alvarez Torres, et al., 1999; Valero Jimenez, 2009)

Dentro de las principales capturas que se realizan en el litoral nacional se encuentra el pulpo, perteneciente al grupo de los cefalópodos, ocupando el primer lugar en volumen de captura y el segundo lugar en valor monetario en el Golfo de México y Mar Caribe (DOF, 2018). La captura en este sector se divide en dos especies: pulpo rojo (*Octopus maya*) con el 74% y pulpo patón (*Octopus vulgaris*) con el 26% de la captura, del cual se registra un porcentaje de 69% del total de captura para el estado de Yucatán. En 2014 se reportó una pesca total de 35, 637 toneladas (t), manteniendo un promedio anual de captura de 25 mil t durante el periodo 2001-2015, con tendencia al aumento (SAGARPA, 2014; DOF, 2018). El total de pulpo capturado aumenta su número año con año, lo que ha llevado a que se encuentre en un estatus de aprovechamiento máximo sustentable en el caso de *O. maya*, ya que *O. vulgaris* aún se encuentra en potencial de desarrollo (Valero Jimenez, 2009; INAPESCA, 2014; DOF, 2018).

Esta situación ha llevado a la necesidad de implementar estrategias que disminuyan el impacto que tiene la pesquería en las poblaciones de pulpo en la costa de Yucatán; uno de ellas es el aprovechamiento sustentable por producción de biomasa en cultivo (Bárcenas, 2013). *O. maya* presenta características que lo hacen un buen candidato para la acuicultura (Domingues, et al., 2007; Bárcenas, 2013)

- Huevos con desarrollo embrionario directo
- Altamente adaptable a condiciones de laboratorio
- Crecimiento rápido y altas tasas de crecimiento
- Altas tasas de conversión alimenticia
- Ciclos de vida cortos
- Acepta alimentos muertos o artificiales durante sus primeros ciclos de vida
- Alta demanda y alto valor comercial

Una de las principales razones por lo que no se ha podido desarrollar el cultivo de *O. maya* y otras especies de cefalópodos en la acuicultura, es debido a la falta de dietas adecuadas que cumplan con los requerimientos nutricionales que proporcionan las presas en su medio ambiente. La dependencia a dietas naturales representa altos costos de inversión reflejados en una rentabilidad negativa, haciendo que el cultivo se vuelva inviable (Bárceñas, 2013; Lee, et al., 1991). El alimento representa alrededor del 60% de los costos en una producción, de tal manera una dieta económica es un requisito básico para el éxito de la acuicultura comercial (Chen & Long, 1991; Domingues, et al., 2007). Además de económica, la dieta debe ser apropiada, esto quiere decir que las dietas deben cumplir con los requerimientos nutricionales y sustituir a las dietas naturales de la especie, reduciendo hasta un 40% los costos (Lee, 1994).

Otra situación con la pesquería es la alta generación de desechos desde la pesca de fauna no deseada, partes del pescado que no son aprovechadas, residuos y pérdidas durante manejo, almacenamiento, distribución y comercialización (Spanopoulos Hernandez, et al., 2010). A nivel mundial se generan 29 millones de t de desechos (FAO, 2009). En México, durante el 2007, se generaron 78,100 t (Gallardo, et al., 2012), mientras que en 2014 un volumen de 40,107 t de desechos fue reportados (CONAPESCA, 2014).

Ante la necesidad del uso de proteínas de origen animal para la formulación de dietas utilizadas en la acuicultura, los desechos de pescado representan una valiosa fuente de tan requerida proteína en la nutrición animal (Pulido Gomez, 1989), donde su suministro es competido y por tanto tiende al alza en los precios. Estos desechos de pescado conservan proteínas, lípidos, vitaminas y minerales de alta calidad que generalmente son desperdiciados y poseen un potencial biotecnológico al poder ser utilizados como ingredientes en la

alimentación animal (Gildberg, 1992), reemplazando principalmente a la harina tradicional de pescado que, en cuanto a la proteína, presenta un bajo valor biológico a causa de las altas temperaturas que se necesitan para su producción (González, et al., 2007). Una de las formas para obtener y aprovechar estos nutrientes es por el método del ensilaje que conserva los nutrientes sin pasar por procesos de calor, por tal motivo presenta mejores propiedades nutricionales que las harinas (Parin & Zugarramurdi, 1994). El ensilaje de desechos se puede describir como una tecnología simple, fácil de preparar y de baja inversión que disminuye la contaminación, al aprovechar los residuos de la industria pesquera (Lessi, 1994). Consiste en la hidrólisis de los desechos efectuada por las enzimas presentes en los tejidos, principalmente en las vísceras, y la adición de un ácido que permite mantener el pH menor a 4, evitando putrefacción y el crecimiento de bacterias y hongos (Mach & Nortvedt, 2010), estimulando la actividad proteolítica (Gildberg, et al., 1990) y con ello permitiendo la obtención de péptidos y aminoácidos libres desde el primer día de ensilaje.

Los pulpos presentan un metabolismo dependiente de proteínas (Lee, 1994), por lo que requieren elevadas cantidades para la síntesis de proteínas que son utilizados para cubrir sus funciones vitales, incluyendo el crecimiento. Una alta síntesis de proteínas conlleva a una alta tasa de crecimiento (Domínguez, et al., 2004). El ensilado de desechos de pescado además de presentar un alto contenido de proteína soluble, proteínas de bajo peso molecular y aminoácidos libres, necesarios para su metabolismo, contiene ácidos grasos polinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y docohexanoico (DHA) entre otros, esenciales para el desarrollo y crecimiento del pulpo (Gallardo, et al., 2017). El ensilado de pescado se ha utilizado y comprobado su eficiencia en animales como aves y cerdos (Ruiz-Medina, 2007; Guevara, et al., 1991), peces tropicales sustituyendo a la harina de pescado (Vidotti, et al., 2002; Goddard, et al., 2003), camarón blanco del atlántico (*Litopenaeus schmitti*) (González, et al., 2007) y en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Gallardo, et al., 2012).

Las características nutritivas del ensilado y su alto contenido de proteína soluble facilitan la digestión dentro del aparato digestivo del pulpo, lo que pone al ensilado de pescado como un ingrediente viable para el reemplazo parcial de la carne de jaiba en las dietas semihúmedas y secas. Así, la inclusión de ensilado de desechos de pescado se plantea como una alternativa

para la formulación de dietas eficientes y económicas que permitan avances hacia el cultivo de pulpo *O. maya*.

Considerando lo anterior, la presente investigación busca responder las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles son las condiciones óptimas para la elaboración del ensilado de pescado?
2. ¿Cuál es el efecto que tendrá sobre el juvenil de pulpo, un remplazo parcial de la carne de jaiba en una dieta peletizada?
2. ¿Qué efecto tendrá sobre el juvenil de pulpo, la inclusión de ensilado de desechos de pescado en dieta peletizada, sobre el crecimiento y sobrevivencia?
3. ¿Qué cantidad de proteína soluble y aminoácidos libres presentara el ensilado de pescado a los 1, 3 y 10 días de ensilaje?

Antecedentes

Características generales

Octopus maya o pulpo rojo es un cefalópodo endémico de la península de Yucatán (Solís Ramírez, 1967). Es un carnívoro activo desde sus primeras etapas, ya que eclosiona del huevo con sus características morfológicas de adulto, de cuerpo blando, ocho brazos, dos filas de ventosas por brazo y un corazón tricavitatorio, uno central y dos branquiales (Bárceñas, 2013). Su ciclo de vida es corto, al igual que el de otras especies de cefalópodos que viven entre uno y dos años (Mangold, 1983), se tiene registro que en condiciones de cautiverio a temperaturas entre 25 y 30°C, presentan ciclos de vida entre 9-10 meses (Van Heukelem, 1983), en los cuales alcanza su peso máximo. Se reproducen una sola vez en su vida (Mangold, 1983) desovando desde 680 hasta 3,600 huevos (Solís Ramírez, 1967), observado en hembras que fueron capturadas comercialmente (González y de la Rosa, et al., 1998), con un desarrollo embrionario entre los 50 y 65 días. Con temperaturas promedio entre 24-26°C en cautiverio, se registran hembras con 5,000 huevos y un desarrollo embrionario los 45 días (Van Heukelem, 1977).

El macho de la hembra se diferencia a los tres meses, momento en el que se empiezan a desarrollar las gónadas. El hectocotilo en el tercer brazo derecho (especializado y modificado) (Aguila, 2007) es utilizado generalmente para realizar el sexado.

Taxonomía

Phyllum: Mollusca

Clase: Cephalopoda

Subclase: Coleoidea

Orden: Octopoda

Suborden: Incirrata

Familia: Octopodidae

Género: Octopus

Especie: *Octopus maya* (Voss & Solis, 1966)

Distribución y hábitat

Octopus maya habita el litoral de las zonas tropicales, con rangos de temperatura ente 22-26°C (Noyola, et al., 2013), que se distribuye a lo largo de las costas de la península de Yucatán, desde Ciudad del Carmen, Campeche hasta Isla mujeres, Quintana roo.

Es un organismo bentónico que habita a profundidades de 1 a 4 brazas, en fondos lodosos o calcáreos, con sustratos de roca caliza y finos de arena y limo donde encuentra escondites ocasionales o también localizado en praderas de pastos marino, principalmente de *Thalassia testudinum* y diversas algas. (Solís Ramírez, 1967; Solís-Ramírez, 1994; Van Heukelem, 1977; Bárcenas, 2013; Aguila, 2007)

Alimentación y nutrición

En la naturaleza *O. maya* está asociada fuertemente a los crustáceos durante toda su vida, a pesar de ser un carnívoro oportunista que se alimenta dependiendo de la disponibilidad de la presa, pudiéndose alimentar de crustáceos, moluscos, peces e incluso otros pulpos. A pesar de la gran variedad de presas de las que se puede alimentar, *O. maya* presenta una preferencia innata por los cangrejos (Portelo Rodriguez, 2011).

Los pulpos son cazadores que exploran el fondo marino en busca de alimento con gran capacidad de adaptación a las variantes del medio ambiente, guiándose no solo por la vista, también por el tacto y la quimiorrepción, por lo que el movimiento en el alimento no siempre es necesario. Portelo (2011) explica que la dieta del pulpo se basa en dos factores: la preferencia y la disponibilidad del alimento, por lo que el pulpo mientras tenga la oportunidad de consumir cangrejos lo preferirá sobre las demás presas, pero si las

posibilidades de escoger son reducidas el pulpo se alimentara de la dieta de la que tenga mayor disponibilidad, aunque esta no sea su preferida. Esta característica oportunista en su forma de alimentación favorece que en cautiverio el pulpo se alimente de dietas peletizadas (Rosas, et al., 2007).

O. maya, tiene la capacidad de ingerir fuentes de alimento externas desde el primer día post-eclosión, no obstante, el juvenil eclosionado tiene que pasar por una etapa de transición que sucede dentro de los primeros 4 días post-eclosión, distinguiéndose tres fases: embrionaria, post-embrionaria y juvenil (Rosas, et al., 2007). En la fase post-embrionaria coexisten dos entradas de nutrientes, la primera se trata de las reservas de vitelo y la segunda proviene del alimento externo. Por ende, mientras las reservas vitelinas están presentes la actividad de caza será menor, ya que el estímulo hacia la presa es mínimo. Al finalizar la fase post-embrionaria el juvenil ya práctico su condición de cazador y comienza a alimentarse de presas (Portelo Rodriguez, 2011; Boletzky, 2003).

En cefalópodos como *O. maya*, *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis*, la digestión se divide en dos etapas: extracelular e intracelular (Gallardo, et al., 2017). Glándulas salivares posteriores inician la digestión externa de la presa al secretar proteasas, realizando una predigestión y produciendo proteína soluble y aminoácidos libres en el quimo. Gallardo (2017) explica que el primer quimo al ser ingerido, activa zimógenos en el jugo gástrico, así como enzimas y sitios de absorción en la glándula digestiva (GD), dando inicio a la digestión intracelular. De igual manera, se propuso que los aminoácidos presentes en el quimo estimulan las células acinares promoviendo una mayor eficiencia digestiva en la GD de *O. maya*; similar al proceso digestivo que se ha observado en aves (Martinez, et al., 2012).

La proteína es la principal fuente de energía de *O. maya* (Gallardo, et al., 2017; Rosas, et al., 2013; Aguila, 2007; Lee, 1994), al igual algunos lípidos también son utilizados como fuente de energía (Linares, et al., 2015), principalmente utilizan ácidos grasos polinsaturados (se encuentran en sus presas) (García-Garrido, et al., 2011) como lo son el ácido eicosapentaenoico, 20: 5n-3 (EPA) y ácido docosahexaenoico 22: 6n-3 (DHA). Martínez (2011) menciona que la proteína es la principal fuente de energía en el musculo y los lípidos la principal fuente en el metabolismo intracelular, haciendo al metabolismo del pulpo dependiente de grandes cantidades de aminoácidos para la elevada síntesis de proteínas para

energía y crecimiento (Lee, 1994). Por otra parte, un desequilibrio en la proporción de DHA/EPA en los valores nutricionales de una dieta se han asociado a un bajo crecimiento y altas mortalidad en *O. vulgaris* (Navarro & Villanueva, 2003). Los carbohidratos obtenidos a partir del alimento son poco utilizados como fuente de energía, representando solo el 1% base húmeda (BH) de la composición del pulpo (Valero Jimenez, 2009).

La glándula digestiva juega un papel importante en la nutrición de los pulpos, donde cumple con funciones de digestión y almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno, el producto energético final, a partir del catabolismo de las proteínas por vías gluconeogénicas (Martínez, et al., 2012; Rosas, et al., 2011; Gallardo, et al., 2017). Aminoácidos como alanina, glicina, metionina, histidina y arginina, presentes en carne de jaiba y calamar (Martínez, et al., 2012), entran al ciclo de Krebs como piruvato u otra molécula intermediaria para producir glucosa por vías gluconeogénicas a partir del fosfoenolpiruvato y reservarlo (Bárceñas, 2013). La digestión intracelular y la secreción de enzimas para la digestión extracelular que se lleva a cabo en la GD provoca cambios en su estructura celular, utilizando energía almacenada para llevar a cabo dichos cambios.

Avances en dietas artificiales

Ante la creciente demanda de los cefalópodos en el mercado se vio la necesidad de cultivar juveniles capturados en condiciones controladas y alimentarlos con dietas naturales vivas o congeladas, como crustáceos y peces, pero los altos costos de estos han llevado a la formulación de dietas artificiales que disminuya los costos, presente tasas de crecimiento y conversión alimenticia aceptable que evite la dependencia al alimento natural y permita el desarrollo de la acuicultura de cefalópodos.

Los primeros cefalópodos mantenidos en condiciones de laboratorio eran utilizados en experimentos con fines biomédicos, alimentados con camarones, palaemonidos, anfípodos, moluscos y cangrejos vivos o frescos (Van Heukelem, 1977; Hanlon & Forsythe, 1985; Hanlon, 1990).

Los altos costos por mantener y recolectar alimento vivo o almacenar alimento congelado, obligo a los investigadores en pensar en dietas artificiales a base de diferentes fuentes de proteínas. Las primeras dietas artificiales fueron probadas en *O. maya* y *S. officinalis* por su característica de desarrollo directo, eran pastas semihúmedas o peletizadas de camarón,

cangrejo, surimi, pollo crudo, croquetas para perro (Lee, et al., 1991; Forsythe, et al., 1991; Castro, 1991; Castro, et al., 1993) .

En el laboratorio del National Resource Center for Cephalopods, Texas, Lee (1991) probó diferentes fuentes proteicas en la alimentación de *S. officinalis*, con pobres resultados en su crecimiento, ya que solo camarón vivo y pollo crudo obtuvieron crecimientos positivos. Tiempo después, Castro (1993) obtuvo resultados similares con dietas a base de surimi comparado con una dieta de filete de pez gato congelado y pellet de camarón. Los experimentos con las anteriores dietas mostraron que crecimientos $> 7\%$ peso día solo se obtenía con alimentos vivos o congelados y $>3\%$ peso día se obtenía con dietas artificiales o con proteína que sufrió una modificación (Aguila, 2007; Valero Jimenez, 2009).

En posteriores experimentos con *S. officinalis*, las dietas artificiales con ingredientes similares a los ya utilizados, fueron suplementadas con aminoácidos, caseína, vitaminas y minerales, obteniendo crecimientos positivos, es decir, estos crecimientos siguieron estando por debajo de los obtenidos con alimento natural, pero mejoraron los resultados presentados en estudios anteriores con fuentes de proteína alternativa (Domingues, 1999; Castro & Lee, 1994; Domingues, et al., 2005).

En trabajos más recientes se ha seguido probando diferentes ingredientes que permitan elaborar una dieta que aporte proteínas de alta calidad, disponibilidad, asimilación y digestibilidad. Otros factores también son importantes en la formulación de una dieta, tales como, balance de aminoácidos (aa) y perfil químico similares a los del pulpo, textura, palatabilidad y estímulos químicos que favorezcan la quimiorrecepción de *O. maya* (Portelo Rodriguez, 2011). Los alimentos balanceados para camarón se han probado en *O. maya* considerándose mejores que el uso de surimi como ingrediente, aunque el crecimiento sigue siendo malo, descartándolo como dieta para la acuicultura (Rodriguez & Carmona , 2008). Otros ingredientes que se han probado son: ensilados de pescado, manto de calamar, hidrolizado de proteínas de pescado (CPSP®) y la mezcla de estos (García-Garrido, et al., 2011; Bárcenas, 2013), de las cuales se mostró que el calamar presenta un perfil de aminoácidos similar a la composición de *O. maya* (Valero Jimenez, 2009) y si era mezclado con carne de jaiba en forma de pasta semihúmeda existía una sinergia entre los ingredientes, superando los resultados de crecimiento que se obtenían solamente alimentando con carne

de jaiba (Martínez, et al., 2014), de igual manera se propuso que los crustáceos se consideren ingrediente base en la preparación de cualquier dieta (Rosas, et al., 2008) y considerándose a la combinación 50-50%, 60-40%, 70-30% calamar-jaiba aglutinados con grenetina (pasta semihúmeda) (Martínez, et al., 2014; Rosas, et al., 2013) (grenetina al ser un aglutinante que favorece crecimiento, sobrevivencia y digestibilidad (Rosas, et al., 2008)) como los rangos de inclusión y opciones proteicas más adecuadas para el crecimiento y cultivo de *O. maya* (Bárceñas, 2013). A la par también se ha investigado y trabajado en la realización de dietas secas y peletizadas que promuevan el crecimiento (Rosas, et al., 2007; Rosas, et al., 2013), ya que los costos, almacenamiento y poca practicidad al momento de utilizarse de las pastas siguen siendo inviables para la acuicultura del pulpo.

Ensilados de desecho de pescado

Con los resultados que demostraron los experimentos de Martínez (2014) se empezó a considerar una mayor exploración del papel que juega los ensilados en la nutrición de *O. maya* y su utilización como ingrediente en la formulación de dietas, debido a sus resultados positivos.

La proteína de origen animal es altamente utilizada en la industria de los alimentos acuícolas, las demandas implican un aumento de su producción, en ocasiones viéndose rebasada obteniendo un bajo suministro y por consecuencia un alza en sus precios. Una forma de obtener proteína animal es por medio de la tecnología de los ensilados de desechos.

Del total de la materia prima solo el 40% es la carne que se comercializa, el resto son subproductos que se desechan. Órganos, tejidos y pesca de compañía provenientes de la industria pesquera son descartados, sin considerar que siguen siendo una fuente de proteína animal alternativa, representando una pérdida valiosa de proteína tan requerida en la nutrición animal. En ocasiones son aprovechados como harinas para la formulación de alimentos para el ganado en general.

Si bien las harinas de pescado son ingredientes altamente utilizados por la nutrición acuícola, estas pueden presentar un bajo valor biológico por las altas temperaturas con las que son realizadas. El calor desnaturaliza las proteínas al modificar las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias volviéndolas difícil de digerir, además de que estos procesos afectan su digestión al reducir los sitios donde actúan las proteasas (Santé-Lhoutellier, et al., 2008)

afectando la digestibilidad del pulpo (Gallardo, et al., 2017). En cambio la hidrólisis de la proteína a través del ensilado de los desechos facilita su biodisponibilidad y digestión (Ruiz-Medina, 2007), teniendo características similares o superiores a las harinas de pescado al no pasar por procesos que involucran calor (Parin & Zugarramurdi, 1994). Su calidad depende de tres factores: la materia prima con que se realiza, un proceso de elaboración correcto y un almacenamiento adecuado.

La tecnología del ensilaje brinda la oportunidad de reducir costos en la formulación de las dietas y reducir el impacto ambiental que se genera por un mal manejo de desechos sólidos en la pesquería; este se puede realizar desde un nivel industrial hasta de forma artesanal por acuicultores pequeños. El ensilado de desechos de pescado es un producto de apariencia semilíquida, como resultado de la hidrólisis causada por acción de enzimas proteolíticas presentes en el pescado, las cuales se ha observado que en presencia de ambientes de pH bajo aumentan su actividad, disminuyendo el tiempo de la hidrólisis (Tatterson, 1982), y por consiguiente permita conservar sus nutrientes aunque no sus características sensoriales. Fue desarrollado en los años 20' en Finlandia (Ruiz-Medina, 2007) y elaborado a nivel comercial en Dinamarca en 1948 (Vizcarra Magaña, 1999) . Para la obtención del ensilado se puede realizar mediante diferentes técnicas que reducen el pH: Fermentación por bacteria, hidrólisis por enzimas al añadir ácidos orgánicos o inorgánicos.

Ensilados biológicos: hecho a partir de bacterias ácido-lácticas y melaza como fuente de carbohidratos que sirven de energía para las bacterias; la fermentación permite estabilizar y mantener una buena calidad nutricional (Spanopoulos Hernandez, et al., 2010).

Ensilados químicos: como menciona Tatterson (1982) la actividad proteolítica de las enzimas presentes en el pescado se ve beneficiada al disminuir el pH, este se obtiene agregando uno o combinación de ácidos, estos pueden ser de origen orgánico o inorgánico. Algunos ácidos utilizados son: fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico. El fórmico asegura la conservación sin descenso excesivo del pH (Tatterson, 1982) manteniéndolo por debajo de 4, representando una buena opción en la inhibición de organismos patógenos y a su vez al momento de usarse, el ensilado no tiene que ser neutralizado como pasa con el uso de ácidos inorgánicos que reducen el pH >3 (Viana, et al., 1993; Toledo-Pérez & Llanes-Iglesias, 2007).

Tanto en ensilados biológicos o químicos es muy importante que la materia prima sea molida o triturada a un tamaño < 0.5 mm de diámetro (Gallardo, et al., 2012) y mezclada hasta lograr una homogenización completa con los lactobacilos o ácidos respectivamente, este puede llevarse a cabo por licuefacción añadiendo agua, dando un ensilado líquido.

Otra ventaja del ensilado es que no requiere refrigeración, incluso se puede mantener en óptimas condiciones a temperaturas altas, manteniendo un ensilado estable por periodos de un año (Raa & Gildberg, 1982). Las temperaturas altas también aceleran el proceso, aunque $>50^{\circ}\text{C}$ podría inactivar a las enzimas. Esta registrado que ensilados almacenados a 23°C los primeros días alcanza una solubilidad del 10-20% y a los 10 días se alcanza valores superiores al 75%. A mayor temperatura un 70% de solubilidad se puede alcanzar en una semana (Pulido Gomez, 1989). Ruiz (2007) reporta que en 48 horas existe una hidrólisis de 32.32% y en 216 horas se alcanza un 95.70% a un pH de 4 y temperatura de 37°C . Gallardo (2012) reporta que en ensilados químicos de desechos de pescados fileteados que incluían las vísceras presentan una elevada actividad proteolítica, obteniendo un 90% del hidrolizado de las proteínas en 3 días. Se concluye que, aunque la temperatura y pH influyen en el tiempo que tarda el ensilado en solubilizarse, también influye la materia prima que se utilizó.

Composición del ensilado

El ensilado se prepara utilizando pescados enteros, a los cuales se les ha retirado el filete, subproductos o sólo partes como las vísceras y agallas. Como se ha mencionado antes la calidad nutricional depende de la materia prima, la composición proximal de un ensilado se ha demostrado que es similar en valores de proteína y lípidos a los que presenta la materia prima con los que fueron realizados (Spanopoulus Hernandez, et al., 2010), de igual manera el pH evita el crecimiento de moho, levaduras y libres de bacterias patógenas como *salmonella spp.* y *Vibrio cholerae*

Un efecto observado es que hay un aumento en los niveles de péptidos y aminoácidos libres por la hidrólisis de la proteína (Ruiz-Medina, 2007) y ácidos grasos libres por deterioro de los aceites del pescado durante el almacenamiento (Tatterson & Windsor, 1974), el resto de composición química varía con el tipo de pescado y las partes utilizadas. Los ensilados a los que se les añade las vísceras y cabezas en su realización presentan una mayor cantidad de

nitrógeno proteico, proteasas y reducen su tiempo en hidrolizar la proteína (Espe & Lied, 1999) que aquellos realizados con solo carne y piel como materia prima (Backhoff, 1976).

Los pescados en general presentan una proteína bruta de 17-20% BH, la cual es de alto valor biológico debido a su contenido de aminoácidos esenciales y buena digestibilidad. Valores en nitrógeno no proteico (amoníaco, óxido de trietilamina, creatinina, aminoácidos libres, péptidos y bases púricas) de 9-18% BH en teleósteos y 33-38% BH en cartilagosos. En lípidos existe una diferencia entre pescados magros y grasos, con valores de 0.1-0.3% BH y 16-26% BH respectivamente (Belitz, 1988; Huss, 1999; Ruiz-Medina, 2007). Los pescados son bajos en carbohidratos, pero en un ensilado diseñado para alimentar pulpo no representa una desventaja.

Sin embargo, el pulpo si presenta una capacidad ineficiente en la digestión, movilización y oxidación de lípidos, por lo que un ensilado con contenido alto en lípidos representaría una desventaja al actuar como anti nutrientes. Estudios anteriores en pulpo alimentados con dietas ricas en lípidos o peces grasos, como Sardina (*Sardina pilchardus*) y Anchoa (*Engraulis encrasicolus*), presentaron una disminución en la digestibilidad, obstruyendo la digestión de otros nutrientes y por consecuencia obtuvieron bajas tasas de crecimiento (O'Dor, et al., 1984; Petza, et al., 2006; Rosas, et al., 2007). Barcenas (2013) reporta una disminución aproximada del 50% en el contenido total de grasas del ensilado al ser mezclado con manto de calamar.

Cambios y alteraciones en el ensilado

Aunque el ensilado aumenta las cantidades de aminoácidos libres, el triptófano se ve afectado durante el ensilaje, donde reduce su cantidad drásticamente de 35-45% del que presenta en la materia prima, debido a que es lábil e inestable en los pH bajos en su forma libre, siendo el aminoácido que más se pierde durante el ensilado (Ruiz-Medina, 2007) y uno de los aminoácidos limitantes en ensilados ácidos (Gallardo, et al., 2012). Otros aminoácidos que se reducen son la histidina y la metionina (Backhoff, 1976).

Otra situación en la que existe perdida de aminoácidos, sucede cuando se realiza un mal ensilado. Cuando el pH es >4.5 , existe deterioro bacteriano o por enzimas autolíticas, empieza una producción de nitrógeno volátil, amoníaco y aminos biogénicas (histamina, putrescina y cadaverina), provocando una pérdida de los aminoácidos por desaminación y

descarboxilación, respectivamente, disminuyendo la calidad del ensilado (Dapkevicius, et al., 2000; Ruiz-Medina, 2007).

Los lípidos pasan por reacciones que pueden generar cambios en las propiedades organolépticas del ensilado, principalmente alterando la palatabilidad al momento de usarse. La lipólisis se da por acción de enzimas lipolíticas presente en los desechos utilizados en el ensilado, aumentando los ácidos grasos libres. Los niveles de ácidos grasos libres que contiene un ensilado dependen de si la materia prima es cruda, sufrió procesos de cocción previo al ensilado, si el ensilaje es químico o biológico, temperatura y pH de almacenado (Espe & Lied, 1999).

El contenido de ácidos grasos polinsaturados en el pescado y el ensilado favorece la susceptibilidad de la reacción conocida como autooxidación. En esta oxidación los radicales lipídicos, producto de la escisión de un hidrogeno del carbono central en los ácidos grasos de doble enlace (Ruiz-Medina, 2007), reacciona rápidamente con oxígeno formando un peróxido, hidroperóxido y otros radicales. Estos radicales al ser inestables generan productos secundarios que pueden cambiar desde el olor, sabor o la coloración del ensilado o afectar su calidad al perderse ácidos grasos polinsaturados, necesarios en la dieta del pulpo, incluso tóxicos para los animales. Uno de estos productos es el malonaldehído (MDA), producto final de la descomposición oxidativa de los lípidos, presenta incrementos en los primeros días de ensilado. Estas reacciones pueden ser prevenidas mediante el uso de antioxidantes, encargados de frenar los procesos de oxidación en la parte lipídica del ensilado. El Butilhidroxitolueno (BHT) es uno de los antioxidantes más utilizados en los ensilados (Vizcarra Magaña, 1999), su uso de ha demostrado mantener los niveles de MDA bajos y constantes a través de los días de almacenamiento (Ruiz-Medina, 2007; Gallardo, et al., 2012). Otros procesos son la remoción del tracto digestivo disminuyendo el contenido de ácidos grasos libres (Vizcarra Magaña, 1999) y el desengrasado de la materia prima o del ensilado en los primeros días, antes de la liberación de ácidos grasos, acción que permite aumento en el contenido proteico (Tatterson & Windsor, 1974). Este último solo es costoso en una producción industrial.

Uso de ensilados de desechos de pescado en otras especies

El uso de ensilados de desechos de pescado ya se ha probado con éxito en producciones de animales como rumiantes, cerdos, aves, peces y camarones.

Dietas en aves en donde se incluyó el 5% de ensilado de pescado de la composición total, se notó una mejoría en crecimiento conversión alimenticia y producción de huevo en las gallinas alimentadas con dicha dieta (Guevara, et al., 1991). Con una inclusión similar del 5%, pero esta vez en dietas para cerdo, se encontró que las tasas de crecimiento fueron mayores y se concluyó que se necesitaba menor cantidad de alimento para producir un kg de carne (Avdalov, et al., 1992). Otros reportan que la inclusión de 10% de ensilado es el nivel óptimo, ya que a una inclusión >15% se aumenta el consumo de alimento con una mala conversión alimenticia (Ward, et al., 1985).

Pulido Gómez (1989) reporta que producir 1 kg de carne en tilapia es 25% más caro con una dieta comercial que con las dietas donde el principal ingrediente proteico fue el ensilado de pescado, no presentando diferencia significativa entre la dieta comercial y las de ensilado de pescado en cuanto a su factor de conversión alimenticia.

Experimentos con *Litopenaeus schmitti* en donde se realizaron dietas basándose en los requerimientos nutricionales del camarón, se incorporó un ensilado de sardina, mostrando que a una inclusión del 15%, la dieta no muestra diferencia significativa y es equiparable a los crecimientos y sobrevivencias que presentan cuando se alimentan con dietas comerciales (González, et al., 2007).

Gallardo (2012) reporta que el ensilado de desechos de pescado es un buen ingrediente en las dietas de camarón, pero no como única fuente proteica debido a sus bajos niveles de triptófano. Los niveles son mejorados al mezclarse con dietas comerciales para camarón, obteniendo mayores ganancias de peso y tasas de crecimiento que con el ensilado como única fuente. Sin embargo, es un buen sustituto de la harina de pescado en los alimentos acuícolas.

Justificación

Como recurso pesquero marítimo, la captura de pulpo es de alta importancia económica y social para la región y el sector pesquero. La demanda ha llevado a un aumento en los volúmenes de captura por año, aumentando la explotación y llevando a la especie *O. maya* al límite sustentable (Valero Jimenez, 2009) de su aprovechamiento. En consecuencia, se han implementado vedas a su captura (CONAPESCA, 2015), permitiendo la pesca de pulpo en temporadas cortas a lo largo del año de las cuales dependen pescadores que en ocasiones llega a ser el único ingreso del que disponen para su familia.

Numerosas investigaciones en diferentes campos de la ciencia buscan aprovechar el potencial de cultivo que tiene el pulpo rojo en la acuicultura. Lograr el desarrollo en la acuicultura del pulpo significaría un desarrollo económico alternativo para las comunidades pesqueras, dejando de depender exclusivamente de las temporadas de pesca, cubrir la demanda del mercado y reducir la carga que presenta actualmente la pesquería sobre la población silvestre (DOF, 2018).

Un alimento artificial que sustituya al natural, es indispensable para el desarrollo de la acuicultura en cualquier especie, por lo que las investigaciones en el área de la nutrición y la fisiología digestiva de *O. maya* se realizan para comprender sus necesidades nutritivas y como éste las aprovecha. Los trabajos realizados en la UMDI-Sisal de la UNAM permitieron el desarrollo de un alimento basado en pulpa de jaiba (*Callinectes spp*) y músculo del manto de calamar (*Dosidicus gigas*), aglutinada con grenetina y enriquecida con mezclas minerales y vitaminas en forma de pasta y pellet. Presentando mejor crecimiento y supervivencia hasta el momento, que dietas a base solo del uso de pulpa de jaiba fresca (Domingues, et al., 2007; Gallardo, et al., 2017; Martínez, et al., 2014; Rosas, et al., 2007; Rosas, et al., 2011; Rosas, et al., 2008).

Sin embargo, dicho alimento resulta inviable en cultivos a gran escala, debido a los altos costos que representa su realización. El presente estudio se diseñó con el fin de investigar los siguientes propósitos: condiciones para realizar un ensilado de desechos de pescado, los cambios en el contenido de proteína hidrolizada del ensilado en el tiempo y su uso como

f fuente proteica alternativa de bajo costo para sustituir parcialmente los ingredientes presentes en la dieta desarrollada en la UMDI-Sisal, evaluando así, el efecto en el rendimiento del cultivo de juveniles de pulpo *O. maya* y por tanto el desarrollo de alimentos viables para el cultivo piloto comercial o comercial de esta especie.

Hipótesis

El ensilado de desechos de pescado con alto contenido de proteína soluble hidrolizada, al ser utilizado como reemplazo parcial de carne de jaiba, aportará a la dieta proteínas de bajo peso molecular y aminoácidos libres de alta digestibilidad, los cuales promoverán durante los periodos de digestión la secreción y activación de zimógenos y enzimas proteolíticas en el tracto gastrointestinal, así como la estimulación de los sitios de absorción en la glándula digestiva de juveniles de pulpo *Octopus maya*, promoviendo digestión, asimilación y movilización de los nutrientes presentes en la dieta de manera similar o mejor a la dieta peletizada calamar-jaiba desarrollada en la UMDI-Sisal, beneficiando su actividad digestiva, producción de reservas nutritivas (metabólicas), y en conjunto con prácticas y condiciones adecuadas para su mantenimiento en cautiverio, también su crecimiento y sobrevivencia.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del ensilado de desecho de pescado generados de la pesca ribereña en el Puerto de Sisal, Yucatán, a través de una dieta peletizada sobre la respuesta nutritiva y la fisiología digestiva de juveniles del pulpo rojo *Octopus maya*.

Objetivos específicos

- Determinar las condiciones fisicoquímicas (pH y temperatura) de elaboración de ensilados de desechos de pescado.
- Evaluar y cuantificar el contenido de proteína soluble en el homogenizado de la mezcla de desechos de pescado, así como en ensilados de 1, 3 y 10 días posteriores a la adición de ácido fórmico.
- Evaluar el efecto del reemplazo parcial de carne de jaiba *Callinectes spp* a través de dietas peletizada con la inclusión del 23 % de ensilados de 1, 3 y 10 días de desarrollo sobre el crecimiento y sobrevivencia de juveniles de *Octopus maya*.

- Evaluar el efecto del reemplazo parcial de carne de jaiba *Callinectes spp* a través de dietas peletizadas con la inclusión del 23 % de ensilados de 1, 3 y 10 días de desarrollo sobre la actividad específica de proteasas acidas y alcalinas en juveniles de *O. maya*.
- Evaluar el efecto del reemplazo parcial de carne de jaiba *Callinectes spp* a través de dietas peletizada con la inclusión del 23 % de ensilados de 1, 3 y 10 días de desarrollo sobre el contenido de reservas nutritivas (proteína soluble total, acilglicéridos y colesterol) en juveniles *O. maya*.

Materiales y métodos

Materia prima

Los desechos de pescado se obtuvieron de la pesca ribereña en el Puerto de Abrigo, Sisal, Hunucmá, Yucatán. Se recolectaron desechos resultado del fileteado de la pesca con sedal, donde los pescadores locales retiran ambos filetes del pescado en la lancha durante su retorno al puerto o bien una vez desembarcada la pesca en el puerto, desechando piel, huesos, escamas, musculo (restos del filete), aletas, vísceras y cabeza completa, que muchas veces son arrojadas al agua. Las especies de las cuales se utilizaron sus desechos fueron el: Chacchi (*Haemulon plumieri*) y Armado (*Orthopristis chrysoptera*).

Los desechos fueron recolectados posterior al fileteado por lo que se encontraban frescos. Se trasladaron a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), UNAM, Sisal, transportados en una bolsa dentro de una hielera por una distancia aproximada de 600 m donde se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4°C para su inmediato procesamiento.

Elaboración del ensilado

Los desechos fueron pesados en una balanza (Scout pro SP2001, marca: Ohaus Corporation, USA), el peso obtenido fue de 3927 g y 1984 g de Armado y Chaac-chi, respectivamente y a los cuales se les monitoreo el pH. Los desechos representaban casi el pescado entero, a excepción del filete, por lo cual se molió en una licuadora industrial (LM-12 marca: Torrey) hasta obtener partículas $\leq 5\text{mm}$ (Gallardo, et al., 2012), a excepción de la piel, la cual no fue posible moler por completo. La mezcla se realizó con una proporción 2:1 (Armado: Chaac-chi) dando un total de 5,911 g de mezcla. La mezcla se homogenizó agregándole 200mL/kg

de agua potable (v/p), facilitando la incorporación de la materia y dándole al homogenizado una consistencia pastosa.

Al homogenizado se agregó BHT como antioxidante, para evitar la oxidación del componente graso de la mezcla de desechos, en una proporción de 0.02/100g de grasa, la mezcla de especies de pescado a utilizar presento un 20% de grasa (Gallardo, et al., 2012), por lo que se le agregó 0.23 g del antioxidante.

El homogenizado se colocó en una cubeta limpia con capacidad de 20 L. Para dar inicio al proceso de ensilaje se le agregó 20mL/kg de ácido fórmico (pureza 88%, Marca: Meyer, #lote A1001646, USA) y se mezcló utilizando un bastón de madera limpio, tratando de incorporar lo mejor posible el ácido al homogenizado. El pH y la temperatura se tomó al homogenizado, así como al comienzo del ensilaje, a las 12 horas y posteriormente cada 24 horas durante 30 días, utilizando un potenciómetro digital (Marca: Hanna), vigilando que el pH se mantuviera a valores menores o similares a 4. De igual manera durante el tiempo de almacenamiento, el ensilado fue homogenizado dos veces al día, limpiando las paredes de la cubeta para evitar el crecimiento de hongos.

Para conocer la producción de proteína soluble en el ensilado de desechos de pescado a través del tiempo, se tomaron muestras del ensilado al día 0, 1, 3, 5, 10 y hasta el 30, las cuales se leyeron en un refractómetro de proteínas, expresándolas en mg mL⁻¹.

Obtención de juveniles de *O. maya*

Se utilizaron juveniles de *O. maya* recién eclosionados provenientes de desoves, mantenidos en condiciones controladas a partir de reproductores silvestres.

Los reproductores se obtuvieron en el medio natural, a aproximadamente 4 km mar adentro frente a las costas de Sisal, Yucatán, utilizando el arte de pesca conocida como gareteo o a la deriva el cual consiste en dejar la embarcación a la deriva, arrastrando líneas de monofilamento o cordeles donde se sujeta la carnada, principalmente jaiba y cangrejo (CONAPESCA, 2015). Se utilizó varas de bambú fijadas a la embarcación en la proa y popa donde se atan de seis a siete líneas y al extremo libre se coloca la carnada, capturando machos y hembras que no estén en ovoposición, por lo que la captura es selectiva. Los reproductores capturados se colocaron en un tinaco (Marca: Rotoplas, capacidad de 250L) con flujo continuo de agua de mar durante su traslado en lancha al laboratorio de ecofisiología de la

UMDI-Sisal, donde fueron colocados en estanques externos de 26m³ con una relación de 2:1 machos y hembras, respectivamente. En los estanques externos permanecieron un periodo de aclimatación a una temperatura de 28±2°C por un aproximado de 10±3 días, donde ocurrió el proceso de copula. Las hembras copuladas se llevaron al área de maduración, donde se colocaron en estanques individuales de fibra de vidrio con capacidad de 80 L con aireación, circulación continua de agua de mar, fotoperiodos de luz oscura, intensidad de 30 Lx/cm² y temperatura de 24- 26°C, como refugio se le proporciono una caja de fibra de vidrio con tapa móvil donde la hembra desovo (Rosas, et al., 2014). Al finalizar el desove la tapa móvil fue removida y colocada en incubadoras con sistema de aireación, recirculación de agua de mar y temperatura de 26°C durante 45-47 días, transcurso de tiempo en que eclosionaron los juveniles de *O. maya* y se recolectaron. Fueron colocados en una jarra con capacidad de 10 litros.

Diseño experimental

Se aplicaron 4 tratamientos, el primer tratamiento fue una dieta peletizada control a base de pasta calamar- jaiba (50C:50J) (Martínez, et al., 2014), en los siguientes tres tratamientos se realizó una sustitución parcial del 23% del aporte de pulpa de jaiba por ensilado de desecho de pescado de un día (E1), tres días (E3) y diez días (E10) de ensilaje, realizando dietas peletizadas de calamar-jaiba-ensilado de desechos de pescado (50% Calamar- 27% Jaiba + 23% E1; E3; E10, respectivamente). La descripción de los tratamientos se muestra en el cuadro 1.

Se utilizo un total de 100 organismos, dividiéndolos en grupos de 20 juveniles de *O. maya* por cada tratamiento y 20 más se mantuvieron de reserva durante los primeros 5 días para reemplazo. Cada pulpo se le asigno un recipiente individual y fueron distribuidos aleatoriamente de acuerdo al dispositivo experimental.

Durante los primeros 10 días pasaron por un periodo de adaptación al alimento seco, en el que se alimentaron con la dieta peletizada control calamar: jaiba y se reemplazó la mortalidad que se presentó durante este periodo con los organismos reservados para dicho fin, esto con el propósito de que al inicio del experimento cada tratamiento iniciara con 20 organismos adaptados al alimento peletizado.

Pasado los 10 días el experimento inició aplicando los 4 tratamientos, se alimentó dos veces al día, una por la mañana a las 9:00 h y la segunda por la tarde a las 18:00 h. Los pulpos se alimentaron con los tratamientos, ofreciendo raciones equivalentes al 20% del peso vivo del pulpo al día, evitando desperdicio excesivo de alimento no consumido (Quintana, et al., 2011); todo lo anterior por un periodo de 90 días.

Cuadro 1 Composición de las dietas (g 100g de dieta⁻¹) conteniendo ensilados de desechos de pescado para la alimentación de juveniles tempranos de *O. maya*, durante un periodo de 100 días de bioensayo. N=80

| Ingredientes | g 100 g dieta ⁻¹ | | | |
|---|-----------------------------|------|------|------|
| | E1 | E3 | E10 | CT |
| Jaiba (g) | 33.5 | 33.5 | 33.5 | 43.5 |
| Calamar (g) | 43.5 | 43.5 | 43.5 | 43.5 |
| Ensilado 1 día (g) | 10 | — | — | — |
| Ensilado 3 días (g) | — | 10 | — | — |
| Ensilado 10 días (g) | — | — | 10 | — |
| Grenetina (g) | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Stay C (g) | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Pre-mezcla de vitaminas y minerales (g) | 1 | 1 | 1 | 1 |

Dispositivo experimental

Al inicio del periodo de aclimatación, los organismos se pesaron en una balanza analítica (Pmb moisture analyzer Marca: Adam equipment, USA), utilizando 100 juveniles recién eclosionados de *O. maya* con un peso promedio de 0.106 ± 0.008 g. Los pulpos fueron individualizados en recipientes de 500 mL de 12x12x6.5, cerrado con tapa hermética con seguro y ventanas cubiertas por malla en los laterales, permitiendo el flujo de agua a través del recipiente. A cada recipiente se le colocó un tubo de PVC de ½ pulgada que funcionó como refugio artificial para el pulpo.

A cada recipiente se le asignó un número del 1 al 80 y al azar se le asignó un tratamiento marcándolos con una cinta de color amarillo, plata, rojo y negro según la dieta control, ensilado 1 día, ensilado 3 días y ensilado 10 días, respectivamente.

Los recipientes se mantuvieron en 4 estanques cuadrados de 1.5x2 m con una columna de agua de 4.3 ± 0.3 cm y conectados a un sistema de recirculación de agua de mar y aireación,

con una temperatura ambiente dentro del laboratorio de 24-25°C, y fotoperiodos con ciclos de 12h luz/ 12hrs oscuridad. El flujo continuo de agua se ajustó a 4.4L/minuto en cada estanque, lo que permitió realizar un recambio total del agua marina del estanque 52 veces cada 24 h. En cada estanque se colocaron de manera aleatoria 5 organismos de cada tratamiento, permitiendo que los 20 recipientes se distribuyeran a lo largo de cada estanque.

Para mantener una calidad de agua óptima para los pulpos se realizó limpieza de los recipientes por el método de sifonado de fondo, retirando alimento no consumido y heces, dos veces por día, durante todo el periodo que duro el experimento. La primera limpieza se realizaba antes de alimentar por la mañana y la segunda se realizaba 6 h después de haber dado el primer alimento.

Parámetros físico-químicos

Los parámetros de temperatura, oxígeno disuelto y salinidad del agua se tomaron 3 veces a la semana, los días lunes, miércoles y viernes. Temperatura y oxígeno disuelto se tomaron con un medidor de calidad del agua multiparámetro (Marca: YSI Modelo: Pro 20), la salinidad se tomó con un refractómetro de mano para acuario (Marca: handheld). Se realizaban 4 mediciones al azar dentro de los recipientes por cada estanque.

Parámetros como niveles de amonio, nitritos, nitratos y pH se median una vez por semana de 4-6 horas después de la primera alimentación, con un kit test multiparamétrico (Marca LaMotte Modelo: AQ-4). Al igual que con los otros parámetros, se tomaban cuatro muestras de cada estanque al azar de cada uno de los parámetros. Todos los datos se anotaban en una bitácora.

Crecimiento y Tasa Específica de Crecimiento

Para conocer el peso de los juveniles eclosionados de *O. maya* se pesaron al inicio del experimento con una balanza analítica (Pmb moisture analyzer Marca: Adam equipment, USA), los siguientes pesajes se realizaron en la misma balanza para evitar posibles alteraciones que pudiera causar cambiar de equipo. Una vez iniciado el experimento con los tratamientos, las biometrías de los organismos fueron registrados al día 40 (10 días de aclimatación y 30 días de experimento), 70 y 100, día en el que finalizo el experimento. Antes de cada biometría los organismos se mantenían en un ayuno de 12 h que permitió asegurar un vacío estomacal, evitando interferencias en el registro del peso. El pulpo era colocado en

una caja de Petri con agua previamente tarada y se registraba en una bitácora el número del pulpo, tratamiento y peso.

Con los datos registrados se calcularon las ganancias netas de peso al final del experimento y se obtuvo el porcentaje de la tasa específica de crecimiento (TEC % día) para los días 40, 70 y 100, con la siguiente fórmula:

$$TEC\% = \left[\frac{\ln(Pf) - \ln(Pi)}{T} \right] * 100$$

Donde ln= logaritmo natural, Pf= peso final, Pi= peso inicial y T= tiempo.

Sobrevivencia

La mortalidad se revisaba todos los días durante la segunda alimentación, los organismos muertos que se encontraban se registraban en bitácora anotando fecha, número de organismo, tratamiento, estanque y peso.

Al final del experimento la sobrevivencia se calculó a partir de los registros de mortalidad, a partir de la diferencia de los animales que iniciaron y los que finalizaron el experimento, expresándolo en porcentaje. La fórmula es:

$$\text{Sobrevivencia (\%)} = \left[100 \left(\frac{ni - nf}{\text{número total}} \right) \right]$$

Donde *ni* es número de organismo iniciales y *nf* es el número de organismos final.

Índice de Rendimiento

El índice de rendimiento (IR) se obtiene a partir de la corrección de la TEC (% día¹) de los tratamientos al multiplicarlo por la sobrevivencia (%) de estos, transformando el porcentaje a valores absolutos (0-1). Fórmula:

$$IR = (TEC)(SUPERVIVENCIA)$$

Tasa de Ingestión

La tasa de ingestión se midió a partir de la diferencia del alimento administrado y el alimento recolectado después de 6 h. El muestreo se realizó recolectando el alimento de 10 organismos de cada tratamiento, recuperado mediante un sifón y retenido en un papel filtro (Marca:

Melitta 2) previamente pesado en balanza analítica (Pmb moisture analyzer Marca: Adam equipment, USA). El filtro con el alimento recuperado se enjuaga con agua destilada para quitar los restos de sales y minerales provenientes del agua marina, posteriormente se colocaron para su secado en un horno, a una temperatura de 60°C por 24 h, una vez seco, se pesaron en balanza analítica y al peso final se le resto el peso del papel filtro. El resultado se corrigió por el porcentaje de alimento lixiviado durante las 6 h que permaneció el alimento en el agua marina.

La tasa de ingestión se calculó con la siguiente formula:

$$TI = [(AO - AR)/T]Lix$$

Donde *AO* es el alimento ofrecido, *AR* es el alimento recuperado, *T* es el tiempo y *Lix* es el porcentaje de alimento lixiviado expresado en valores absolutos (0-1).

Porcentaje de lixiviación

La lixiviación es el porcentaje del alimento entregado que se pierde por acción del agua y no es consumido por el pulpo. Se realizó la prueba a cada tratamiento por triplicado, colocándolos en un matraz alimento previamente pesado con agua de mar sobre un agitador rotatorio por 6 horas. Al finalizar, en un papel filtro, previamente pesado, se separa el agua de mar del alimento, se enjuaga el filtro con agua destilada y se llevó a secar en un horno a 60°C por 24 h. El filtro seco se pesó y al resultado se le resto el peso del filtro para obtener el alimento no consumido o recuperado. Se expresó en valores de porcentaje, pero en la fórmula para obtener TI se expresa en valores absolutos (0-1).

Obtención de muestras

El muestreo para la cuantificación de metabolitos, reservas nutritivas y actividad enzimática se llevó a cabo al final de los 100 días de experimento. Para tomar las muestras se utilizó 4 organismos de cada tratamiento, estos fueron trasladados al laboratorio y se colocaron en un recipiente con agua de mar que se encontraba a 10°C por 2 min como método anestésico, disminuyendo su metabolismo al mínimo, observándose disminución en el movimiento del sifón y relajación de los brazos. Al pulpo se le practicó eutanasia mediante el corte, con tijeras quirúrgicas, del nervio frontal localizado a la mitad de la distancia que existe entre ambos

ojos. Una vez practicada la eutanasia el pulpo se diseccionó para obtener su glándula digestiva (GD), muestras de musculo tomados de brazos y segmentos del manto.

Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf marcados con números consecutivos del 1 al 16. Se introdujeron en nitrógeno líquido y posteriormente fueron trasladados a un congelador (Revco, Marca: Thermo Fisher Scientific™, USA) donde permanecieron a -40°C hasta su análisis.

Metabolitos y reservas nutritivas

En el laboratorio bioquímica, biología molecular e inmunología de la UMDI-Sisal se realizaron las mediciones colorimétricas de glucógeno, colesterol, acilglicéridos y proteínas solubles totales de las 16 muestras de glándula digestiva, de estas mismas muestras se obtuvo el extracto para la cuantificación de actividad enzimática de proteasas ácidas, proteasas básicas y lipasas. De las muestras de musculo se obtuvieron proteínas y glucógeno.

Se utilizaron kits comerciales (Bayer Sera Paak Plus B014507-01). El principio para todos los metabolitos se basa en los cambios de color diferencial, identificados espectrofotométricamente a través de la absorbancia de la solución en la longitud de onda correspondiente y registrada en densidades ópticas (Bárcenas, 2013).

a) Glucógeno

El glucógeno se extrajo de las muestras de musculo tomadas mediante ácido sulfúrico y fenol al 5%, cada muestra se hizo por triplicado. El musculo en un tubo Eppendorf se homogenizo con ácido tricloroacético al 5% (TCA 5%) en un homogeneizador (Marca: Thermo Modelo: Genesys 10uv) por 50 segundos a 3,340 G con 5 ayudado por 5 perlas dentro del tubo. Se centrifugo a 4,550 G por 6 minutos, al finalizar se tomó 100µL de sobrenadante y con ayuda de la micropipeta se homogenizo con 500µL de etanol al 95%, se dejaron incubar por 3 h a 37°C. Pasadas las tres horas los tubos se centrifugaron a 4550 G por 15 min, se desechó el sobrenadante y se puso a escurrir los tubos invirtiéndolos. Al glucógeno en el tubo se le adiciono 20µL de agua hirviendo, 200µL de fenol al 5%, 1 mL de ácido sulfúrico y mezclados en vortex (Marca: Wincom Modelo XH_D). 200µL del tubo fueron transferidos a la microplaca y colocada en un lector de microplacas (Marca: Benchmark plus, Biorad550) a 490 nm.

b) Proteína

Se utilizó el Método de Bradford (1976), determinando la concentración de proteínas solubilizada a través de una solución ácida de color, azul Coomasie, la cual cuantifico la reacción del reactivo con la presencia de proteínas, ligándose a los aminoácidos, especialmente a la arginina. Se utilizó el reactivo (Biorad-500-0006) ajustado para microplaca; la determinación de concentración de proteínas se realizó utilizando una curva de albumina bovina (500 0206- Biorad). Para la prueba se homogenizó las 16 muestras de GD con agua destilada, se tomó 10 μ L de la muestra y se mezcló con 200 μ L de Bradford para ser incubado por 5min a 25°C. La lectura se realizó en un lector de microplaca (Benchmark plus, Biorad550) a una absorbancia de 595nm, ya que el enlace con las proteínas sucede a una absorbancia máxima de 465-595nm.

c) Colesterol

Los ésteres del colesterol se hidrolizaron por la colesterol-éster hidrolasa para liberar colesterol y ácidos grasos. Se determinó el colesterol libre existente, en conjunta con el producido por el colesterol oxidasa.

Se colocó 10 μ L de extracto de GD en una microplaca, adicionando 200 μ L de solución reactiva del kit comercial (Sera-Pak, Cat. 6670). El análisis colorimétrico se realizó sobre la muestra con una adaptación para pequeñas muestras. Se incubó la reacción a temperatura ambiente por 10 min y se registró la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Marca: Bio-rad Mod:550). La concentración de colesterol (mg/mL) se calcula utilizando la constante de conversión del kit. Los resultados se expresan como mg g⁻¹.

d) Acilglicéridos

Los triglicéridos al hidrolizarse libera glicerol, el cual mediante la acción de lipoproteín-lipasa, se convirtió en glicerol-3-fosfato, el cual a su vez se oxidó mediante la acción de la glicerol-fosfato oxidasa, dando como resultado dihidroxiacetona y peróxido de hidrogeno. Por acción de la peroxidasa, el peróxido de hidrogeno oxidó al cromógeno 4-aminoantiripina/p-clorofenol en un compuesto de color naranja pálido. Se utilizó un lector de microplacas (Marca: Bio-rad Mod:550) a una absorbancia de 550nm.

Actividad enzimática

Para realizar el extracto se preparó el buffer ajustándolo al pH correspondiente para proteasas acidas y alcalinas, pH de 4 y 8 respectivamente. Se colocó 1ml de pH correspondiente a la

muestra y se homogenizo con un homogeneizador de mano de batería. Al homogenizado se centrifugo a 13200 rpm por 20 min a 4°C (Modelo 5420 Marca: Eppendorf), el sobrenadante se extrajo con micropipeta (Marca: Eppendorf). El extracto se diluyo en el buffer de pH correspondiente a un factor de dilución de 1:10. Para cuantificar la actividad enzimática se realizó un triplicado de cada muestra, por lo cual, el sobrenadante de cada muestra se colocó en tres tubos de 2mL (Marca: Eppendorf) según el Método de Anson (1938) y su respectivo control el cual consiste en una proteasa de actividad conocida y blanco, el cual consiste en agua destilada.

Proteasas alcalinas: en el tubo se colocó 0.5 mL de buffer y 0.5 mL de caseína 1.5% en buffer stauffer pH 3.0, se mezcló en vortex (Modelo XH_D Marca: Wincom) y se preincubo por 5 min a 30°C en baño termal. Finalizado los 5 min se adiciono 20 µL del extracto enzimático o agua destilada en los blancos y se homogenizo cada tubo con la ayuda de un vortex en un lapso de diferencia de 15 segundos, incubando por 10 min posteriormente en una rejilla a temperatura ambiente. Para detener la reacción se añadió 0.5 ml de TCA al 20% cada 15 segundos con posterior homogenizado en vortex y se refrigero por 15 min a 4°C para la precipitación de las proteínas. Con el objetivo de separar el sustrato no digerido, al finalizar la refrigeración, se centrifugo a 16200 g por 15 min a 4°C y se separó el sobrenadante con la ayuda de micropipeta, el cual fue colocado en una celda de cuarzo para su lectura. La absorbancia fue leída y determinada con la ayuda de un espectrofotómetro (Modelo 550 Marca: Biorad) a 280 nm.

Proteasas ácidas: en el tubo se colocó 0.5 mL de buffer y 0.5 mL de hemoglobina 1.5% en buffer stauffer pH 3.0 y se homogenizo. Los siguientes pasos son los mismos que se realizaron en la evaluación de proteasas alcalinas. La lectura se realiza colocando el sobrenadante en celda de cuarzo en un espectrofotómetro a 280 nm.

Lipasas: se realizó de acuerdo a los métodos de Gjellesvik, Lombardo y Walther (1992) ajustado a microplacas. Se diluyo 5µL de extracto se mezcló con 20µL de sustrato (TRIS 0.5M, pH 7.4, taurocolato de sodio 5mM, cloruro de sodio 100mM, 4 octanoato de nitrofenilo,35mM). La absorbancia se leyó en el espectrofotómetro (Marca: BIORAD 550) a 415nm, cada minuto, durante 2min a 25°C.

Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza de una vía de clasificación (ANDEVA) para los resultados de la tasa de crecimiento, sobrevivencia, tasa de ingestión, metabolitos y reservas nutritivas y de dos vías de clasificación (MANDEVA) para los resultados obtenidos de la actividad enzimática. Una prueba pos-hoc de Duncan se aplicó en los casos donde se encontraron diferencias estadísticas en los resultados. Se utilizó el programa Statistical 10.0, y para los análisis se utilizó un nivel de confianza de 95% (Zar, 2000).

Resultados

Parámetros físico-químicos

Los valores registrados durante los 100 días de bioensayo para el oxígeno disuelto se mantuvieron en un intervalo entre 3.6 mg L^{-1} y 6.75 mg L^{-1} , con un valor promedio de 4.87 mg L^{-1} en el agua de mar. En el análisis de varianza (ANDEVA), considerando el tiempo y los valores de O_2 disuelto en el agua de mar de los diferentes tratamientos, permitió observar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos y tiempo, y una interacción significativa entre estos al día 55 del experimento, como se observa en la figura 1.

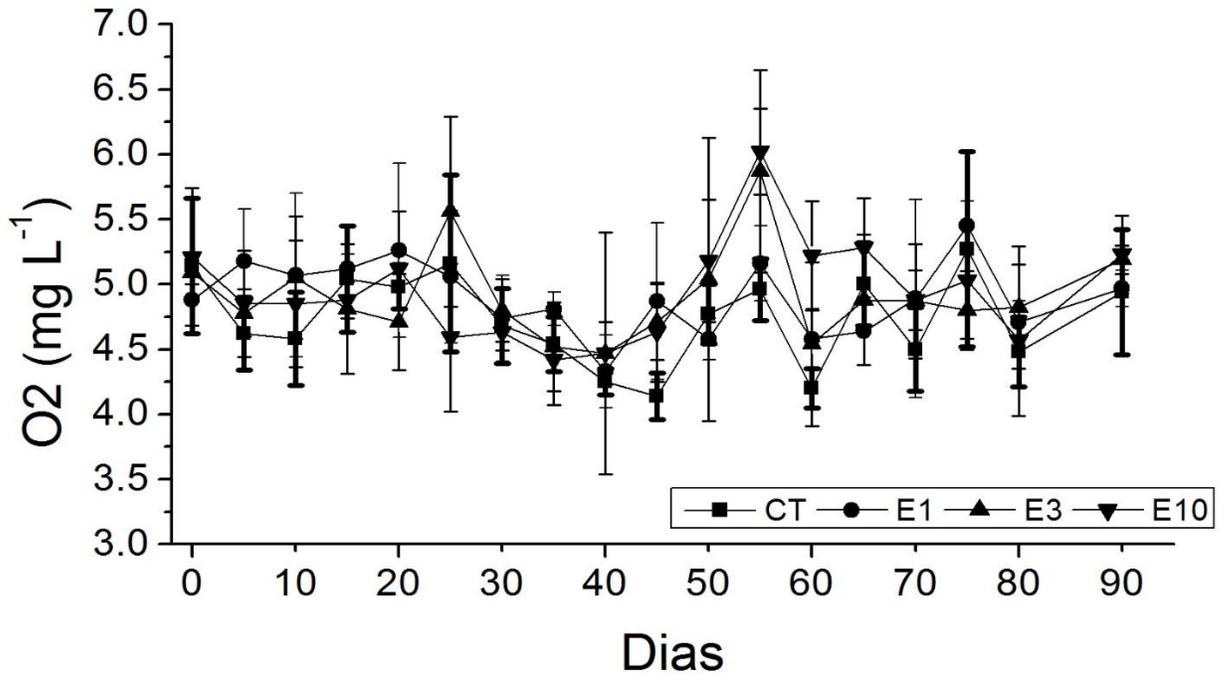


Figura 1.- Oxígeno disuelto (mg L^{-1}) del agua de mar en los estanques del dispositivo experimental donde se mantuvieron los juveniles de *O. maya* durante el bioensayo. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=80

Para los valores de temperatura, la prueba estadística reflejó que no hubo diferencias entre tratamientos, sin embargo, si con respecto al tiempo ($p < 0.05$), como se puede observar en la fig. 2, el incremento de la temperatura conforme al tiempo experimental. De igual manera se puede observar un descenso repentino a partir del día 15 hasta el 20 donde se registró la temperatura mínima de 23°C , a partir de esta fecha se registra un ascenso gradual de la temperatura hasta el valor máximo de 28.1°C al final del bioensayo y un promedio de 26°C .

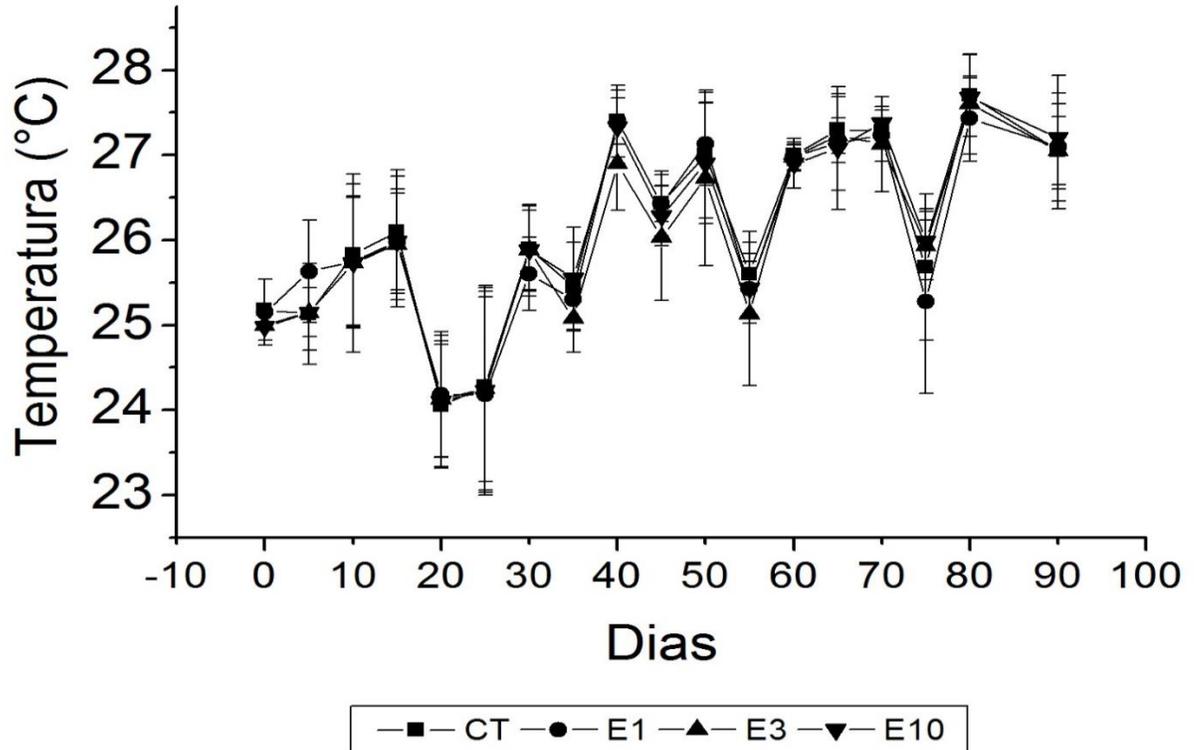


Figura 2 Temperatura (°C) del agua de mar en los estanques del dispositivo experimental donde se mantuvieron los juveniles de *O. maya* durante el bioensayo. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=80

La salinidad no presentó diferencias estadísticas entre tratamientos y tampoco en el tiempo. Así, se mantuvo en un intervalo de 38-40 g L⁻¹ durante el desarrollo del bioensayo, con un promedio de 39.13 g L⁻¹, como lo muestra la fig. 3. En cuanto al pH, un valor promedio de 7.5 en el agua de mar de los diferentes tratamientos fue registrado durante el desarrollo del experimento

En relación al contenido de los productos nitrogenados como amoníaco y nitritos, se mantuvieron en intervalos aceptables para el mantenimiento en cautiverio de *O. maya* durante el desarrollo del experimento en el agua de mar utilizada, con promedios de 0.25 y 0.05, respectivamente.

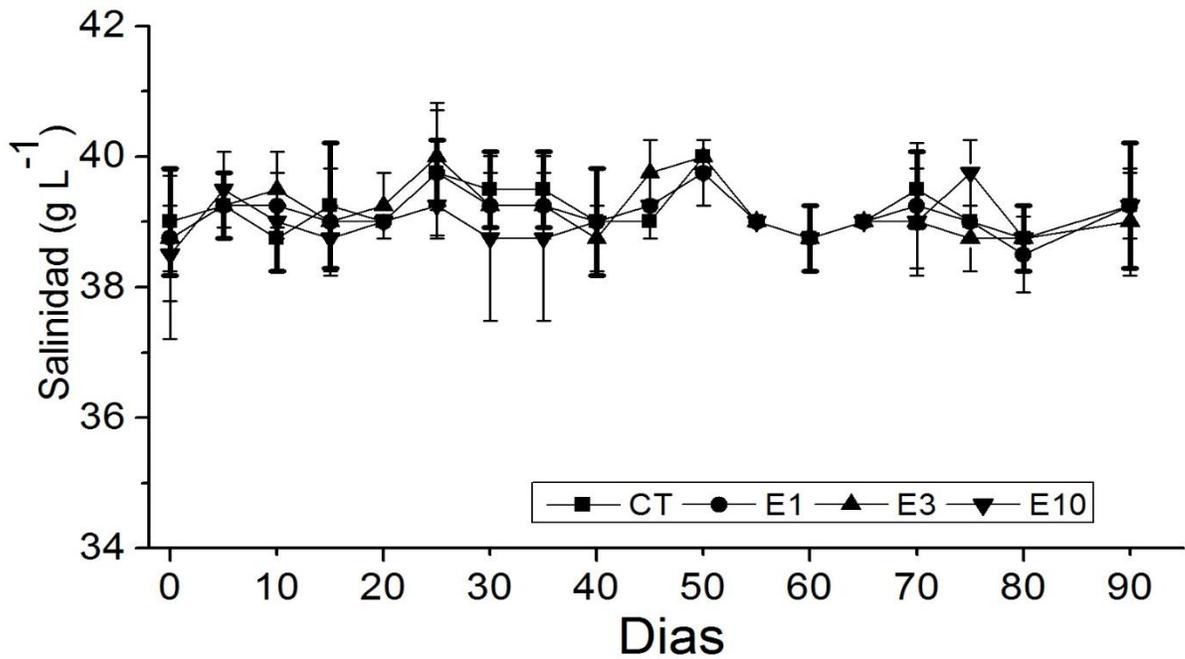


Figura 3 Niveles de salinidad (g L^{-1}) del agua de mar en los estanques del dispositivo experimental donde se mantuvieron los juveniles de *O. maya* durante el bioensayo. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=80

Condiciones fisicoquímicas del ensilaje de los desechos de pescado.

Se realizó un monitoreo de pH y la temperatura desde la preparación del homogenizado sin ácido fórmico, una vez agregado el ácido y cada 24 horas, hasta el día 30. El pH del homogenizado fue de 7, al agregarse el ácido el valor descendió a 3.78 y a las 5 horas registro un valor de 3.73. Durante el primer día se monitoreo el pH del ensilado a las 18 y 24 horas de agregar el ácido, cuyos valores fueron de 3.94 y 3,95 respectivamente. El valor del pH se mantuvo por debajo del 4 hasta el quinto día donde se registró un valor de 4.03, registrando un valor máximo de 4.04 al día 10 y 11.

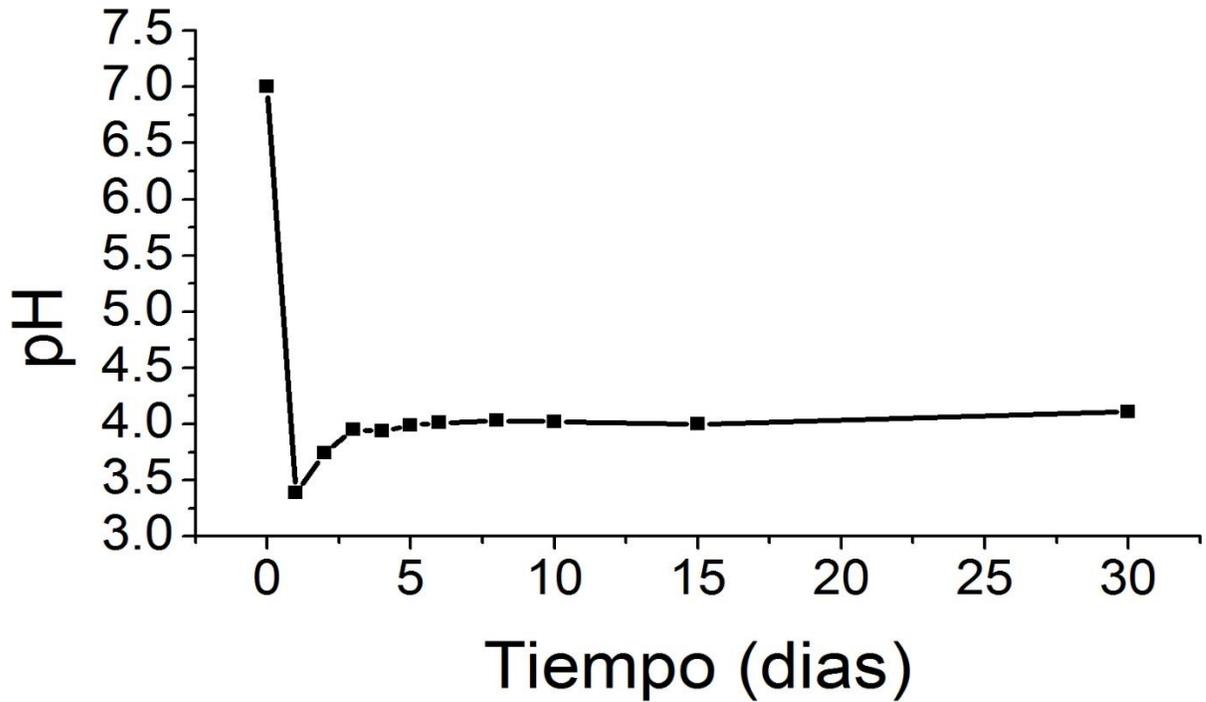


Figura 4 Valor del pH registrado en el homogenizado y en el ensilado de desechos de pescado durante los días de ensilaje hasta el día 30.

La temperatura se empezó a registrar a partir del primer día de ensilaje. El ensilado se mantuvo tapado no herméticamente y conservado en lugar seco y protegido de la luz, almacenado a temperatura ambiente, por lo que los registros de la temperatura tuvieron un promedio de 28.2°C durante los días de ensilaje. En la fig. 4 y 5, así como en el cuadro 2 se puede observar los registros de los primeros días, aunque el registro continuó hasta el día 30.

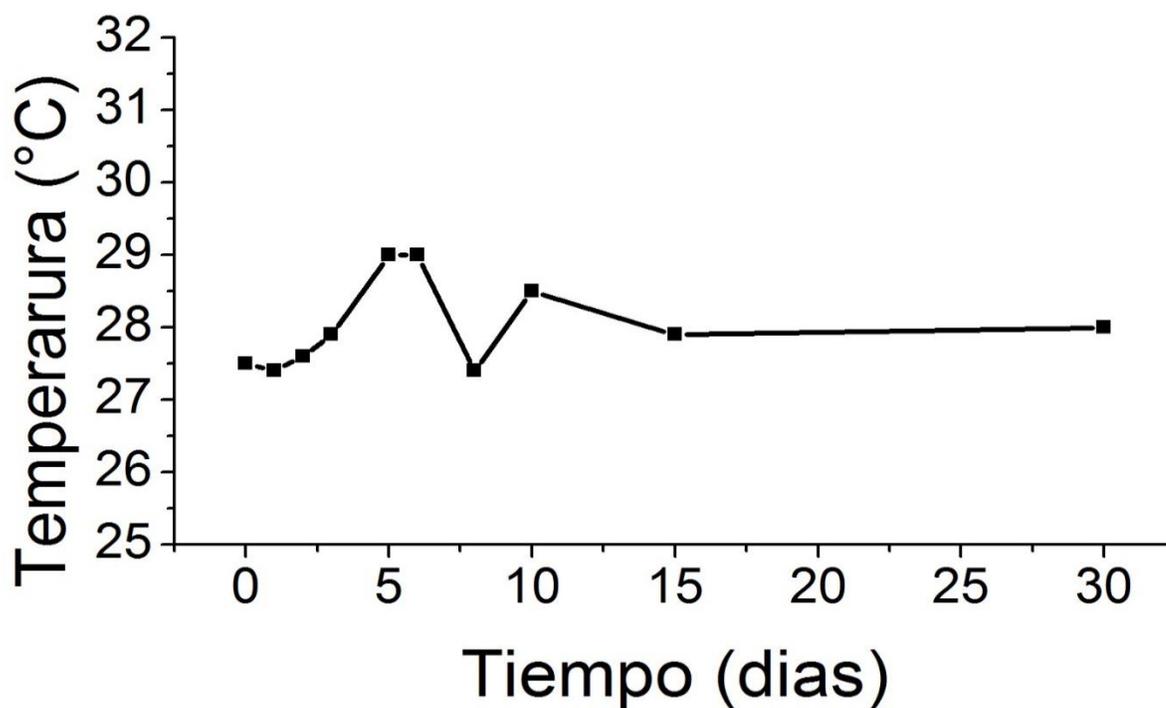


Figura 5 Temperatura (°C) registrada en el homogenizado y en el ensilado de desechos de pescado durante los días de ensilaje hasta el día 30.

Cuadro 2 Registro de los valores de pH y temperatura en el homogenizado y ensilado durante los primeros 11 días durante el cual se tomaron las muestras para la preparación del ensilado. D= día de ensilaje. *= días en los que se tomó muestra para la preparación de alimento.

| Muestra | Hora | pH | Temperatura(°C) |
|-------------------------|-------|------|-----------------|
| Homogenizado | 14:00 | 7 | - |
| Homogenizado+ac.formico | 14:00 | 3.78 | - |
| | 19:00 | 3.73 | |
| D1* | 9:00 | 3.94 | 27.4 |
| | 14:00 | 3.95 | |
| D2 | 14:00 | 3.94 | 27.6 |
| D3* | 14:00 | 3.99 | 27.9 |
| D4 | 14:00 | 3.99 | 28.0 |
| D5 | 14:00 | 4 | 29.0 |

| | | | |
|------|-------|------|------|
| D6 | 14:00 | 4.03 | 29.0 |
| D7 | 14:00 | 4.01 | 28.1 |
| D8 | 14:00 | 4.01 | 28.4 |
| D9 | 14:00 | 4.02 | 28.5 |
| D10* | 14:00 | 4.04 | 28.0 |
| D11 | 14:00 | 4.04 | 28.2 |

La hidrólisis que se llevó a cabo en el ensilado provocó que la producción de proteína soluble aumentara con los días.

La proteína soluble se midió desde el día 0, donde el homogenizado presentó un valor de 74 mg ml⁻¹, una vez iniciado el proceso de ensilaje la proteína soluble aumentó a 102, 126, 144, 148, 156, 164, 164 y 172 mg ml⁻¹ a los días 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20 y 30, respectivamente, encontrando diferencias estadísticas entre los promedios de cada día, excepto del día 15-30 donde ya no hay diferencia significativa, como se puede observar en la fig.6.

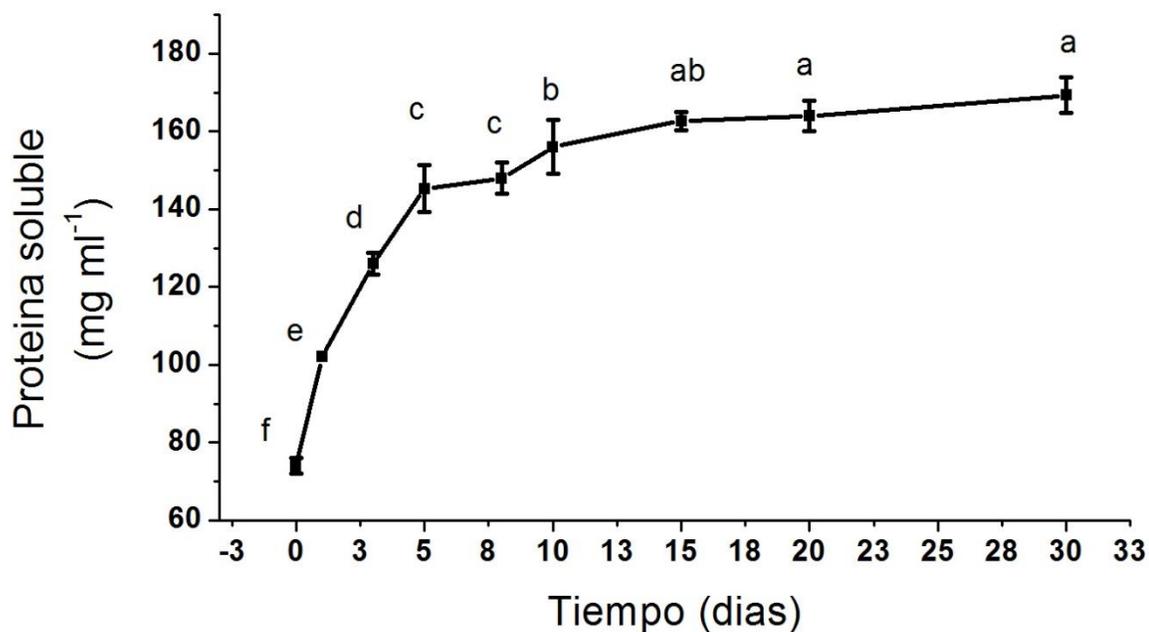


Figura 6 Producción de proteína soluble (mg ml⁻¹) con diferentes días de hidrólisis registrados en el ensilado de desechos de pescado. Promedio \pm Desviación estándar. Diferentes letras indican diferencia estadística.

Crecimiento de juveniles de *O. maya*

Los juveniles tempranos de *O. maya* se pesaron al día 0, con un promedio de 0.106 ± 0.001 g, presentando una baja variabilidad en los pesos de los organismos seleccionados. Los pesajes al día 40, 70 y 100 mostraron crecimientos exponenciales y a la vez un aumento en la variabilidad de los pesos de los juveniles, incluso en los mismos tratamientos.

Existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tiempo, aunque, es de aclararse que al hablar de crecimiento en organismos es normal. No existe diferencias significativas en el crecimiento en peso entre tratamientos, de igual manera no existe diferencias entre tratamiento y tiempo.

Aunque no existe diferencia entre tratamientos en el crecimiento, se muestra que los mayores pesos fueron obtenidos por los tratamientos con un día de ensilado (E1) y diez días de ensilado (E10) y los menores pesos los registraron el tratamiento control sin ensilado (CT) y un día de ensilado (E1) a partir del día 70 hasta el 100 (Fig.2).

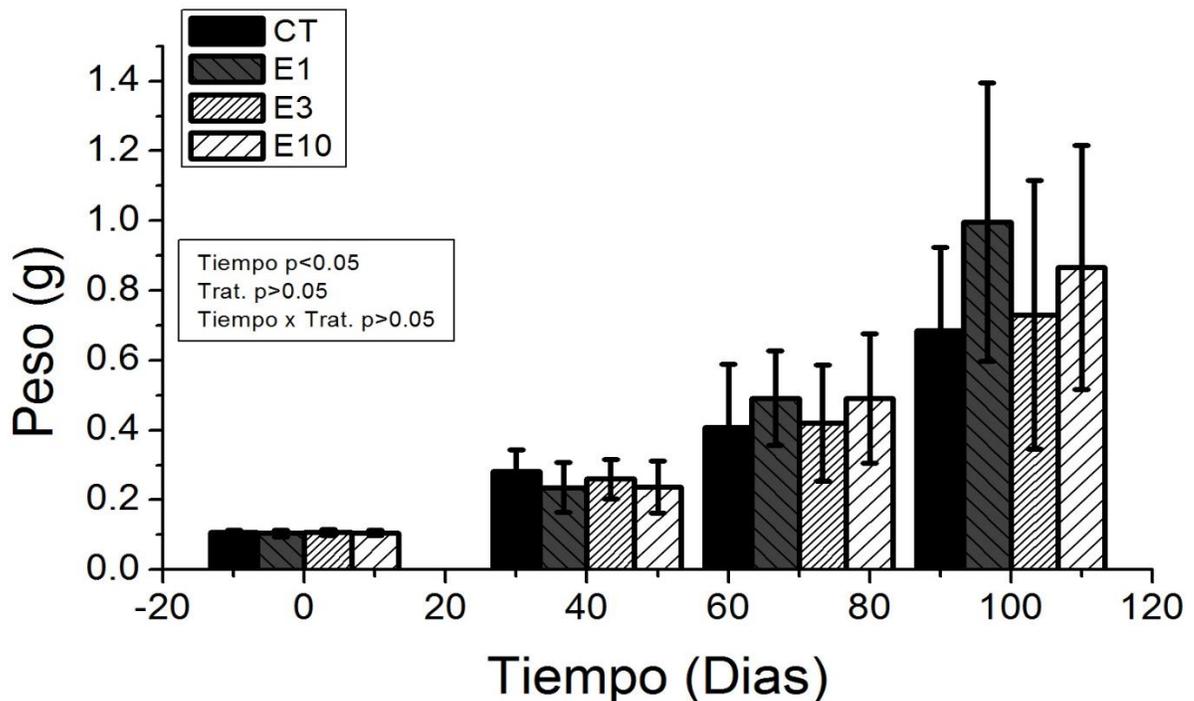


Figura 7 Crecimiento en peso (g) de juveniles tempranos de *O. maya* alimentados durante el bioensayo con dietas que contenían ensilados de desechos de pescado de diferentes días de hidrólisis. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=80

Sobrevivencia

Durante los 100 días que duro el experimento, los alimentos de cada tratamiento tuvieron un efecto positivo sobre los organismos, obteniendo una supervivencia en todos los tratamientos superior al 50%; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estos ($p < 0.05$).

Los pulpos alimentados con tratamientos E3 y E10 presentaron los valores más altos, con 85% y 75% de supervivencia, respectivamente. En la fig.8 se puede observar un repentino incremento de la mortalidad en los tratamientos con alimentos CT y E1, a partir del día 40 hasta el 100 y del día 20 hasta el 60, respectivamente.

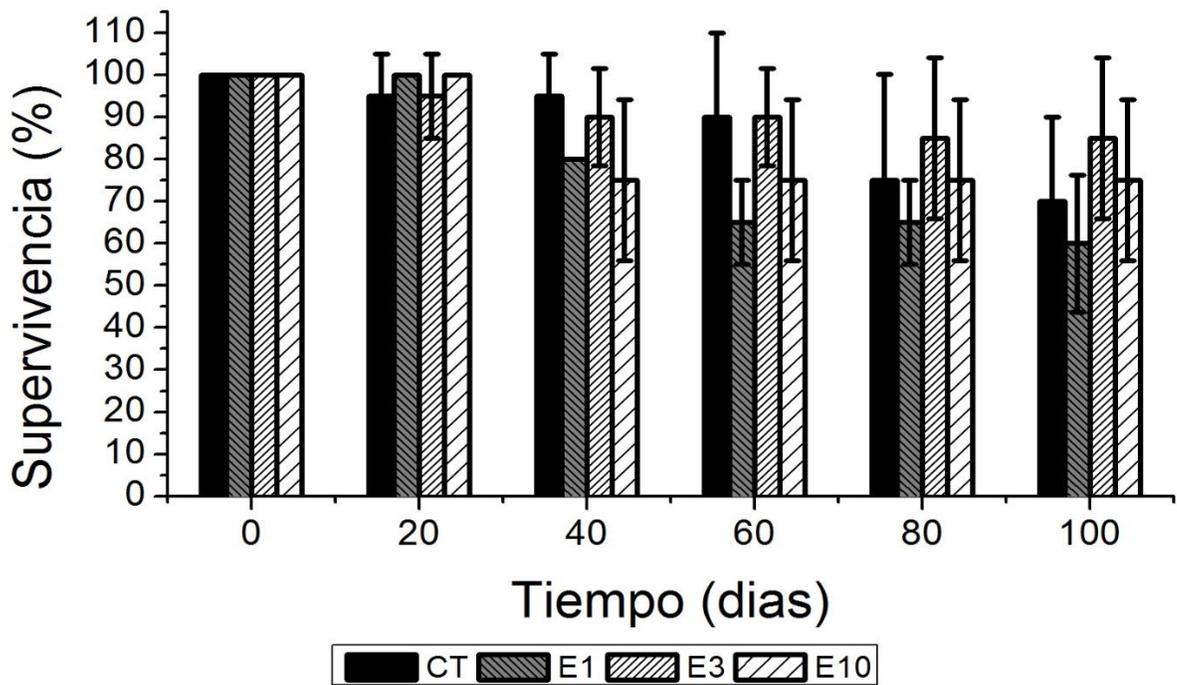


Figura 8 Supervivencia (%) de juveniles tempranos de *O. maya* alimentados durante el bioensayo con dietas que contenían ensilados de desechos de pescado de diferentes días de hidrólisis. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=80

Tasa Específica de Crecimiento

En todos los tratamientos utilizados en el experimento se presentó una Tasa específica de crecimiento (TEC%) positiva con valores superiores al 1.5 % día⁻¹, aunque de igual manera que en la ganancia en peso, no se presentaron diferencias significativas entre los valores obtenidos por los pulpos mantenidos con los diferentes tratamientos.

Los valores obtenidos por los pulpos mantenidos con los alimentos E1 y E10 fueron de 2.1% día⁻¹ y 2% día⁻¹ (respectivamente), ligeramente mayores al 1.8% día⁻¹ obtenido con los alimentos CT y E3 (fig.9) ($p>0.05$). 16

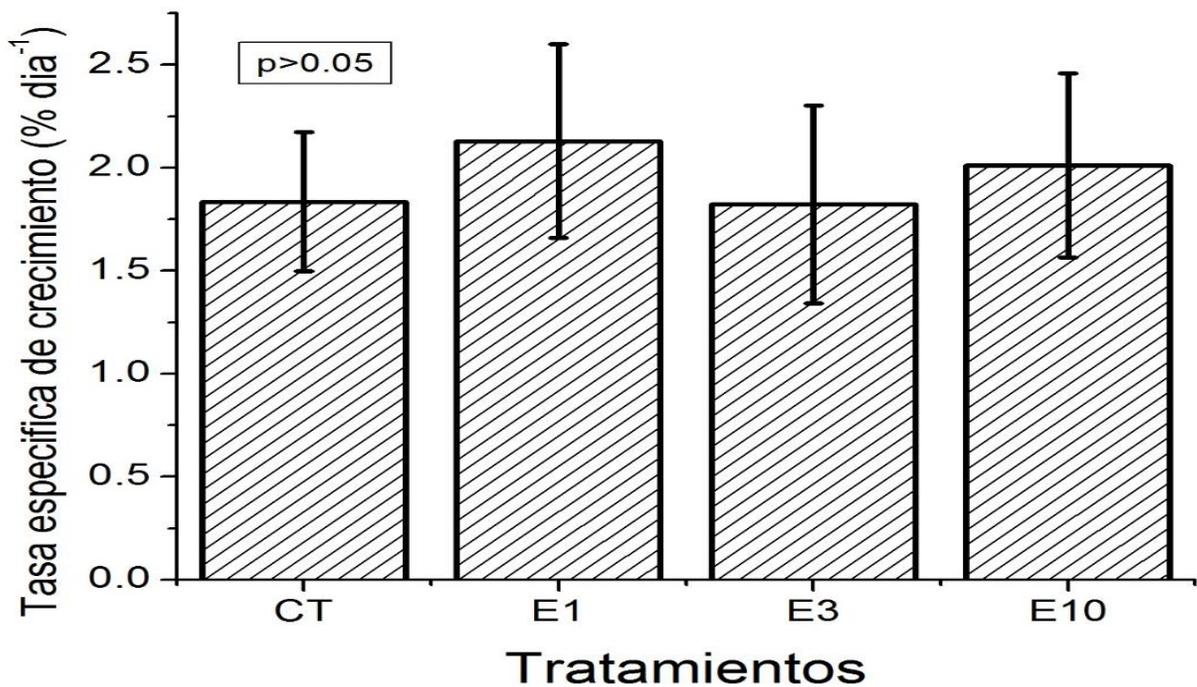


Figura 9 . TEC (% día⁻¹) de juveniles tempranos de *O. maya* alimentados durante el bioensayo con dietas que contenían ensilados de desechos de pescado de diferentes días de hidrólisis. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=80

Índice de Rendimiento

El crecimiento obtenido por los organismos de los diferentes tratamientos y calculado con la TEC fue relacionado y corregido con los valores de la supervivencia (en valores absolutos de 0-1), obteniendo el índice de rendimiento (IR). Los valores obtenidos (fig. 10) fueron

superiores al 1% día¹ en todos los tratamientos, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre ellos para este indicador.

Los pulpos mantenidos con el tratamiento E3 obtuvo el IR más alto (1.57% día¹), seguido de los tratamientos E10, E1 y CT (1.51%, 1.33% y 1.30% día¹, respectivamente).

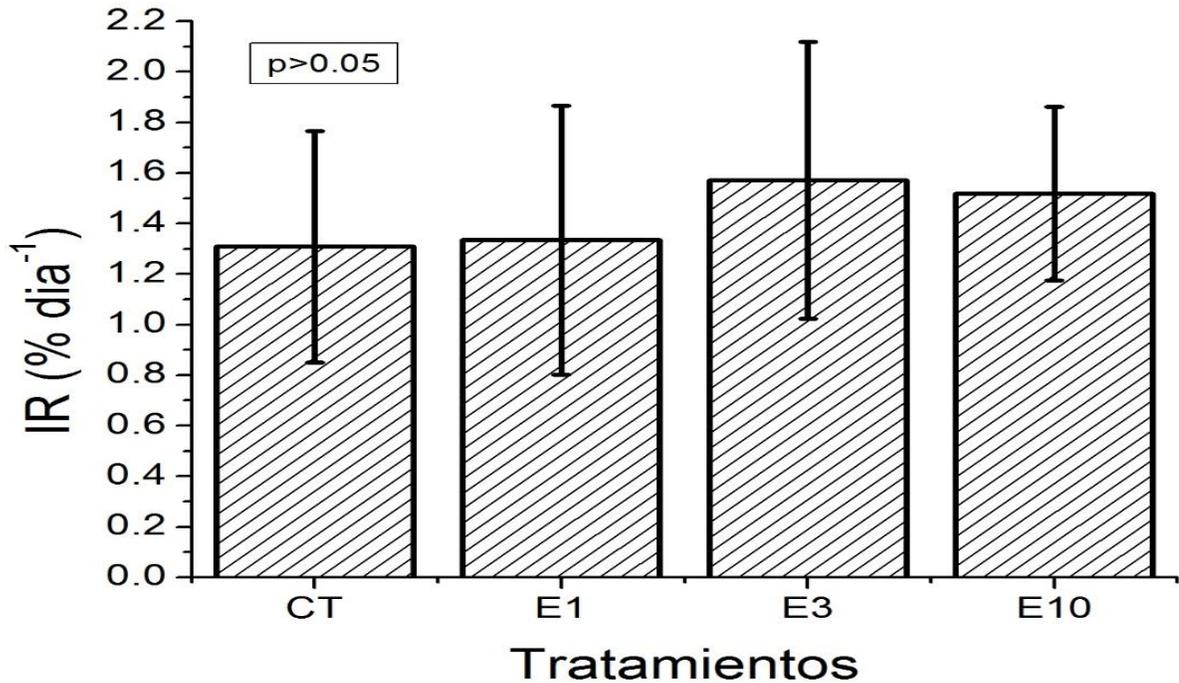


Figura 10 . Índice de rendimiento (% día⁻¹) de juveniles tempranos de *O. maya* alimentados durante el bioensayo con dietas que contenían ensilados de desechos de pescado de diferentes días de hidrólisis. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=80

Tasa de ingestión

El consumo de alimento se observó en el análisis sobre los datos de las tasas de ingestión de los pulpos durante el bioensayo, el cual no mostro diferencias significativas en el consumo de los organismos mantenidos con los diferentes tratamientos ($p > 0.05$). El promedio más alto de consumo de alimento por hora se mostró en los organismos correspondientes al tratamiento E10, con 0.0021 ± 0.0004 g H⁻¹, seguido de los organismos pertenecientes a los tratamientos E1, CT y E3, siendo este último el que presento menor consumo, como se puede observar en la fig. 11.

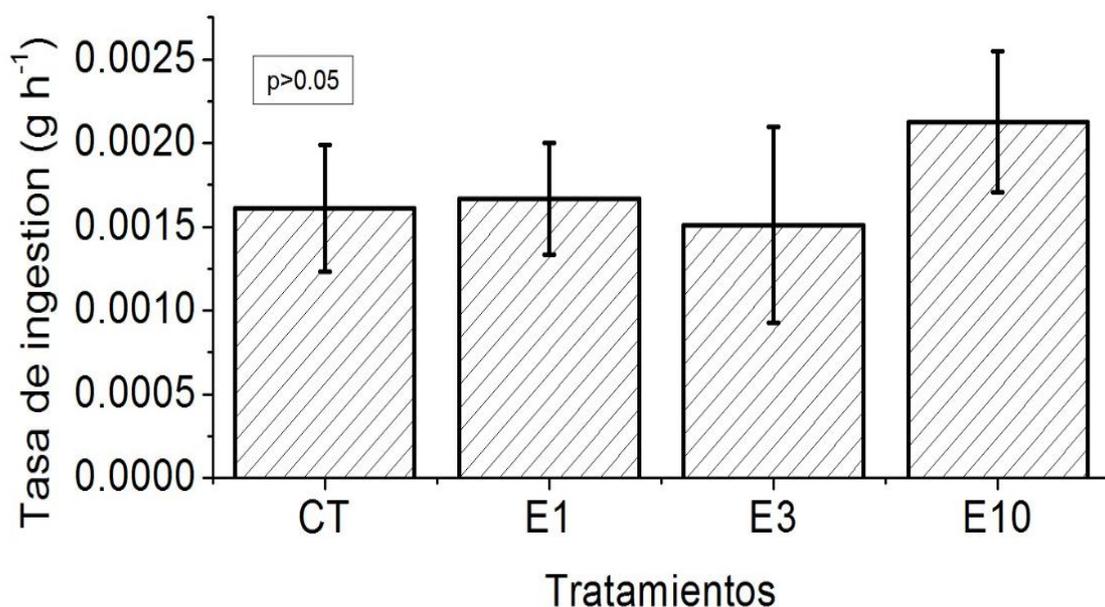


Figura 11. Tasa de ingestión (g H^{-1}) de juveniles tempranos de *O. maya* alimentados durante el bioensayo con dietas que contenían ensilados de desechos de pescado de diferentes días de hidrólisis. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=80

En el cuadro 3 se resumen los valores de los indicadores zootécnicos obtenidos del presente estudio.

Cuadro 3 Cuadro zootécnico de juveniles tempranos de *O. maya* mantenidos durante 100 días de bioensayo en el cual fueron alimentados con dietas con contenido de ensilado de desechos de pescado de diferentes días de hidrólisis. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado; TEC: Tasa específica de crecimiento; IR: Índice de rendimiento; TI: Tasa de ingestión. N=80

| Dato | CT \pm DE | E1 \pm DE | E3 \pm DE | E10 \pm DE |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Peso día 40 (g) | 0.28 \pm 0.06 | 0.24 \pm 0.07 | 0.26 \pm 0.06 | 0.24 \pm 0.08 |

| | | | | |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Peso día 70 (g) | 0.41±0.18 | 0.49±0.14 | 0.42±0.17 | 0.49±0.19 |
| Peso día 100 (g) | 0.69±0.24 | 1.00±0.40 | 0.73±0.38 | 0.87±0.35 |
| TEC día 40 (%) | 2.39±0.62 | 1.90±0.75 | 2.20±0.56 | 1.91±0.76 |
| TEC día 70 (%) | 1.79±0.68 | 2.12±0.40 | 1.87±0.60 | 2.09±0.53 |
| TEC día 100 (%) | 1.84±0.34 | 2.13±0.47 | 1.82±0.48 | 2.01±0.45 |
| Sobrevivencia (%) | 70±20 | 60±16.33 | 85±19.15 | 75±19.15 |
| IR (%) | 1.31±0.46 | 1.33±0.53 | 1.57±0.55 | 1.52±0.34 |
| TI (g H ⁻¹) | 0.0016±0. 0003 | 0.0016±0. 0003 | 0.0015±0. 0005 | 0.0021±0. 0004 |

Metabolitos y reservas nutritivas en musculo

Del musculo obtenido de los brazos de ejemplares de pulpo de cada tratamiento, se evaluó el contenido (mg mL⁻¹) de proteína soluble total y glucógeno. Los valores obtenidos son mostrados en la fig. 12.

Las concentraciones de proteína soluble que presentaron los pulpos, superaron los 10 mg mL⁻¹ en todos los tratamientos. Sin embargo, estos niveles de proteína en musculo no presentan diferencias significativas entre los pulpos obtenidos de los diferentes tratamientos. Los valores promedio obtenidos en los pulpos alimentados con los tratamientos CT y E3 fueron los más altos, siendo estos de 12.5 y 12.4 mg mL⁻¹ respectivamente.

La concentración de glucógeno en el musculo de los pulpos no presenta diferencias significativas entre los tratamientos. Aunque no significativo, los pulpos alimentados con el tratamiento E3 muestran concentraciones mayores (0.6 mg mL^{-1}) al resto de los tratamientos que presentan un promedio de 0.3 mg mL^{-1} para CT, E1 y E10.

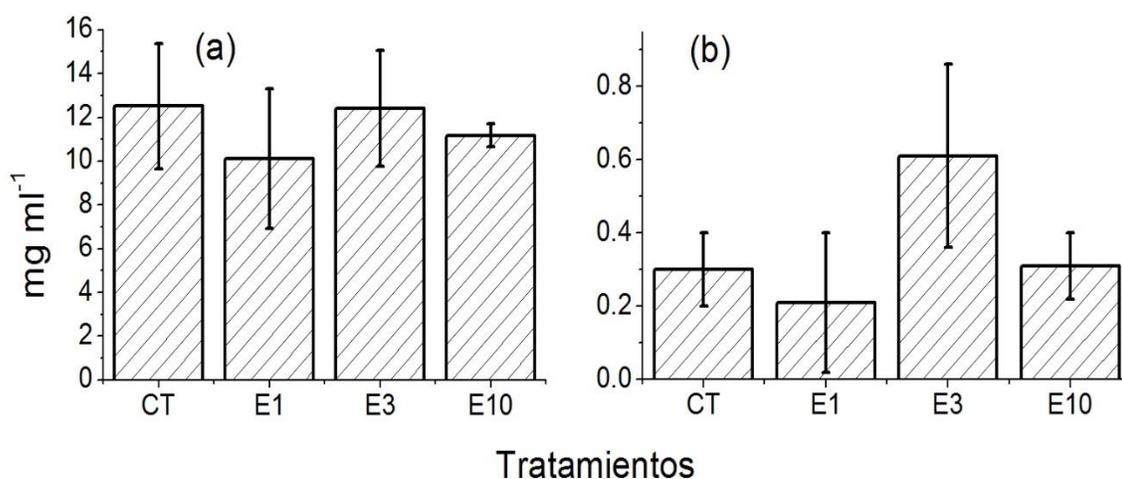


Figura 12 Concentración de proteína (a) y glucógeno (b) registrado en musculo (brazos) de juveniles tempranos de *O. maya* alimentados durante el bioensayo con dietas que contenían ensilados de desechos de pescado de diferentes días de hidrólisis. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N= 16

Metabolitos y reservas nutritivas en glándula digestiva

Se evaluó el contenido de proteína soluble total, colesterol, acilglicéridos y glucosa en la glándula digestiva de los juveniles de pulpos *O. maya* muestreados (N=16) de cada tratamiento. Las concentraciones promedio de cada metabolito y sustancia de reserva se observan en la fig.13. El contenido de proteína soluble obtenidos en glándula digestiva no muestra diferencias significativas entre los tratamientos, aunque, como se puede observar en la fig.13, los pulpos alimentados con el tratamiento E3 presenta una concentración de 21.1 mg mL^{-1} , mayor a los obtenidos en CT, E1 y E10 (15.7 , 17.4 y 15.5 , respectivamente).

El contenido de acilglicéridos en la glándula digestiva de los pulpos evaluados presento concentraciones similares para los cuatro tratamientos, siendo el alimento E1 el que registro el mayor valor, seguido por el E3, E10 y por último el CT (4.45, 3.92, 3.69, 3.67mg mL⁻¹, respectivamente). Dichos valores no presentan diferencias significativas entre tratamientos.

Las concentraciones promedio obtenidos para colesterol en GD se mantienen en un rango de 2-3 mg mL⁻¹, en los cuatro tratamientos. No se presenta diferencias significativas entre tratamientos en dichas concentraciones.

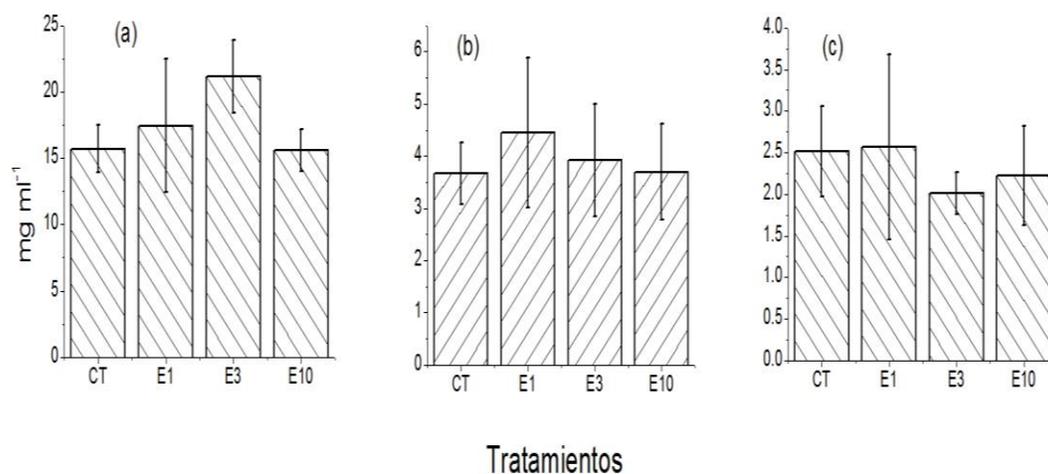


Figura 13 Concentración de proteína (a), acilglicéridos (b) y colesterol (c) registrado en glándula digestiva (GD) de juveniles tempranos de *O. maya* alimentados durante el bioensayo con dietas que contenían ensilados de desechos de pescado de diferentes días de hidrólisis. Promedio \pm Desviación estándar. CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=16

Actividad enzimática

Se evaluó la actividad enzimática en glándula digestiva de *O. maya*, midiendo las concentraciones de proteasas acidas, alcalinas y lipasas. Dichas concentraciones se presentan en la fig. 14.

La actividad de las proteasas acidas en la GD de los pulpos en los cuatro tratamientos fue mayor a 10 U mg proteína⁻¹, siendo el valor más alto de 17.9 U mg proteína⁻¹ obtenido de los

pulpos alimentados con el tratamiento E1 y el menor de 11.9 U mg proteína⁻¹ fue del CT. No se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos

El alimento utilizado en el tratamiento E3 afecto la actividad de las proteasas alcalinas en la GD, provocando una concentración significativamente menor ($P<0.05$) al resto de los tratamientos (CT, E1 y E10). De estos tratamientos el que presento mayor actividad fue el CT obteniendo una concentración promedio de 7.76 U mg proteína⁻¹ y la menor, como se mencionó anteriormente, fue E3 con 4.76 U mg proteína⁻¹.

La actividad de las lipasas en GD no presenta diferencias significativas entre los tratamientos, donde CT, E3 y E10 mostraron actividad muy similar entre ellos obteniendo un valor promedio de 0.026 U mg proteína⁻¹ y E1 tuvo la menor actividad con 0.016 U mg proteína⁻¹.

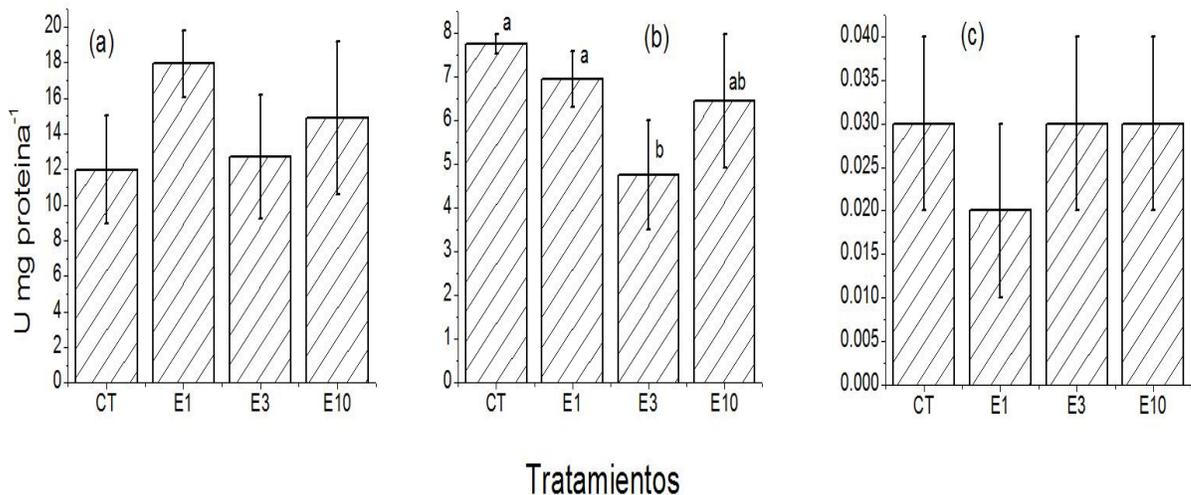


Figura 14 Actividad enzimática. Actividad de proteasas acidas (a), proteasas alcalinas (b) y lipasas (c) registrada en glándula digestiva (GD) de juveniles tempranos de *O. maya* alimentados durante el bioensayo con dietas que contenían ensilados de desechos de pescado de diferentes días de hidrólisis. Promedio \pm Desviación estándar. Diferentes letras representan diferencia significativa entre los tratamientos ($p<0.05$). CT: alimento sin ensilado; E1: alimento con un día de ensilado; E3: alimento con 3 días de ensilado; E10: alimento con 10 días de ensilado. N=16

Discusión

Parámetros

Las cantidades de oxígeno disuelto en el medio acuático son indispensables para la respiración de todos los organismos aeróbicos que habitan en este. A partir de este proceso, las moléculas de oxígeno se incorporan a los procesos bioquímicos del metabolismo, de los cuales se obtendrá energía, y esta será destinada para llevar a cabo procesos fisiológicos que permitan mantener la integridad y homeostasis del organismo (Manduzio, et al., 2005), crecimiento y reproducción.

A partir de estos procesos, como la respiración celular, en las que participan las moléculas de oxígeno, se producen radicales libres como peróxido de hidrogeno, aniones superóxido, radicales hidroxilos, óxido nítrico, fosfatos, sulfito de hidrógeno entre otros. Estas moléculas son especies reactivas de oxígeno que normalmente se encuentran en la célula y son eliminadas por vía enzimática, no enzimática y el sistema antioxidante. Cuando este sistema se ve rebasado, comienza un estado conocido como estrés oxidativo, dañando constituyentes celulares y llevando a la disfunción o muerte celular (Marnett, 2000; Manduzio, et al., 2005; Bárcenas Pazos, 2018). Factores que afectan la producción de radicales libres son la cantidad de oxígeno presente y la temperatura, al afectar la tasa metabólica y el transporte del oxígeno. Durante el bioensayo del presente estudio el intervalo de O_2 disuelto registrado en los estanques permaneció entre 3.6-6.75 $mg L^{-1}$, el cual se encuentra dentro de los valores recomendados para el mantenimiento adecuado de los organismos en el que no presentara daños, valores inferiores a 3 $mg L^{-1}$ es una concentración en la que las funciones vitales del organismo comienzan a disminuirse o afectarse (Cerezo Valverde & Garcia Garcia, 2005), considerando como punto crítico una concentración de oxígeno de 2.3 $mg L^{-1}$ (valor general para los octópodos), en la que juveniles de *O. maya* dejaron de ingerir alimento (Bárcenas Pazos, 2015).

La temperatura, dentro de los factores ambientales, es el que presenta mayor influencia sobre el metabolismo y sobre otros parámetros. Si la concentración de oxígeno en el medio genera condiciones de hipoxia, los mecanismos de compensación se despliegan de mejor o peor manera a diferentes temperaturas (Bárcenas Pazos, 2015). Al tener tan fuerte efecto sobre las

funciones biológicas de los ectotermos, esta se considera como el principal factor que influye sobre el crecimiento y su tasa de crecimiento (Forsythe & Van Heukelem, 1987; Forsythe & Hanlon, 1988; Leporati, et al., 2007; Seemans, et al., 2011; Bárcenas Pazos, 2018). Este efecto es particularmente mayor en los pulpos juveniles durante la fase de crecimiento exponencial que en los adultos con crecimiento más lento y potencial (Semmens, et al., 2004)

Durante el tiempo que duro el bioensayo, los organismos estuvieron expuesto a una variación de la temperatura comenzando a partir del día 15 donde hubo un descenso repentino de la temperatura alcanzando un mínimo de 23°C a partir del cual comienza un crecimiento exponencial hasta el fin del experimento. Este aumento de la temperatura se debió principalmente al fallo del equipo de aire acondicionado del laboratorio encargado de mantener un régimen constante de 24-25°C y al incremento de temperatura en el medio ambiente de Sisal durante la época de primavera-verano.

La mayoría de los experimentos realizados en cefalópodos mantienen un régimen de temperatura. Generalmente para *Octopus maya* la preferencia térmica final es de 23.4°C (Noyola, et al., 2013), sin embargo, estos regímenes ambientales no reflejan las ondulaciones de temperatura en la naturaleza (Leporati, et al., 2007). En la península de Yucatán al ser un sitio de transición entre el Golfo de México y el Mar Caribe es sujeto a distintas variaciones climáticas con oscilación de la temperatura del mar, que presenta una fluctuación entre 21-26°C con un promedio superficial de 26.85°C, temperaturas relativamente bajas para el clima tropical de la península debido al fenómeno de surgencia, donde vientos favorables todo el año permiten mantener estas temperaturas más bajas en el nicho donde habita *O. maya* durante el verano, causando oscilaciones en la temperatura del mar de $26\pm 4^\circ\text{C}$ en un día de verano y 9°C entre estaciones (Zavala-Hidalgo, et al., 2003; Rosas, et al., 2004; Zavala-Hidalgo, et al., 2006; Noyola, et al., 2013; Arreola Meraz, 2018), por lo que el aumento de 5°C y el intervalo de 25-27°C que se presentó durante el bioensayo seria semejante a las oscilaciones que un pulpo experimentaría en naturaleza. Sin embargo, este aumento pudo haber influido en el crecimiento de los organismos, ya que se reporta que el efecto de la temperatura sobre el crecimiento es mayor en cefalópodos juveniles durante su fase de crecimiento exponencial donde pequeñas diferencias en la temperatura experimentados por estos pueden producir TEC significativamente diferentes (Forsythe, 1993; Forsythe &

Hanlon, 1988; Forsythe, 2004). Seemans, et al. (2011) reporta que pulpos sub adultos sometidos a regímenes de temperatura creciente (14-18°C), decreciente (18-14°C) y constante (16°C) durante 100 días no se encontraron diferencias significativas en su TEC entre los tres tratamientos, aunque el régimen de temperatura creciente tuvo mejores porcentajes de TEC y un efecto en el crecimiento muscular diferente al régimen constante. En un experimento similar, pero con juveniles de *O. pallidus*, Leporati et al. (2007) mostró que, con un aumento exponencial de temperatura por 100 días, los pulpos presentaban una TEC constante. Un comportamiento diferente sucede cuando la temperatura disminuye, ya que la TEC alcanza un pico mientras la temperatura es alta seguida de una disminución conforme disminuye la temperatura.

La salinidad y pH se mantuvieron constantes y en rango óptimo durante el bioensayo de acuerdo a lo reportado en otros trabajos (Bárcenas, 2013; Martínez, et al., 2014). Los parámetros que evaluaron la calidad de agua (amoníaco y nitritos) permanecieron bajos y en rango óptimo debido al flujo de 4.4L min⁻¹ en el recambio de agua que se mantuvo en los estanques y la constante limpieza de las cajas para evitar acumulación y consecuente contaminación por restos de alimento o materia orgánica que pudiera afectar la sobrevivencia de los organismos.

Ensilado

El uso de la tecnología del ensilado para mantener y conservar el valor biológico de la materia prima, resulta un proceso muy adecuado para los desechos de pescado (Tatterson & Windsor, 1974), manteniéndolo estable a temperaturas altas y por largos periodos de almacenamiento, debido a su pH que evita la descomposición y la proliferación de bacterias patógenas, hongos y moho (Tatterson, 1982; Tatterson & Windsor, 1974; Pulido Gomez, 1989; Spanopoulos Hernandez, et al., 2010; Raa & Gildberg, 1982; Ruiz-Medina, 2007). Sin embargo, para tener un ensilado de calidad es importante que la materia prima con el que se realiza sea de calidad, conservando un buen estado y no presentando putrefacción. En el caso de los desechos de pescado, su estado de conservación se puede evaluar mediante el pH que estos presentan, manteniendo valores de 6-6.5 cuando está en buen estado y >7 comienza el estado descomposición (Belitz, 1988; Vizcarra Magaña, 1999; Ruiz-Medina, 2007). Los desechos de pescado utilizados en el presente estudio presentaron valores de pH de 7, encontrándose en los límites que se reportan para el pescado, sin embargo, se consideró en buen estado la

materia prima debido a que los desechos se obtuvieron de un pescado fresco recién capturado, manteniéndose en refrigeración a 4°C después de su colecta y su procesamiento para elaboración del ensilado fue el mismo día.

El uso de ácido fórmico (ácido orgánico) para dar inicio al proceso de ensilaje resulto en una adecuada elección, el cual es consistente con estudios previos, debido que al agregarse el ácido el pH descendió a 3.78 y como reportan Vizcarra (1999) y Gallardo et al (2012) el valor del pH se estabilizo a las 18 h, manteniéndose constante a partir de las 24 h, con valores entre 3.8-4 sin la necesidad de añadir más ácido. Esta condición ácida favoreció la actividad proteolítica al mantener el pH en el rango optimo (3-4) de actividad de las proteasas ácidas como la pepsina, que se encuentra en carne y vísceras principalmente, acelerando la hidrólisis de las proteínas en menor tiempo. El uso de ácidos orgánicos, como es el ácido fórmico, evita el proceso de neutralización en el ensilado al utilizarse en alimentos, como se realiza en ensilados donde se utilizó ácidos inorgánicos donde el pH se reduce a un valor < 3. De igual manera, el pH registrado durante el ensilaje fue de valores menores a 4, lo cual fue benéfico ya que en ensilados con pH >4, su calidad disminuye por la producción de nitrógenos volátiles y amoniaco los cuales reducen los aminoácidos presentes (Raa & Gildberg, 1982; Pulido Gomez, 1989; Espe & Lied, 1999; Viana, et al., 1993; Vizcarra Magaña, 1999; Vidotti, et al., 2002; Ruiz-Medina, 2007; Gallardo, et al., 2012; Arruda, et al., 2007).

La solubilidad en el ensilado aumento con el paso del tiempo, duplicando el contenido de proteína soluble con el que inicio, el cual fue de 74 mg mL⁻¹, a 145.33 mg mL⁻¹ al día 5. Este crecimiento exponencial en la producción de proteína soluble se mantuvo hasta el día 10 donde la mayor parte de la proteína estaba solubilizada y la producción se estabilizo. Por otra parte, durante los primeros días existe un aumento de ácidos grasos libres debido a la lipólisis de la fracción grasa de la materia prima (Tatterson & Windsor, 1976). La incorporación de vísceras al ensilado tuvo una participación importante en el tiempo de solubilización de la proteína de manera en que este se reduce, dicho de otro modo, las vísceras, en comparación con otros tejidos, aportan la mayor cantidad de enzimas proteolíticas y lipolíticas (Espe & Lied, 1999), luego, al estar en un ambiente ácido óptimo, en consecuencia del uso de ácido fórmico, la actividad enzimática es mayor y el tiempo de hidrólisis menor. Nitrógeno proteico es otro aporte de las vísceras al ensilado, tal y como se reporta en estudios anteriores al comparar ensilados que incluían vísceras con ensilados de solo musculo y piel, donde en este

último el nitrógeno proteico fue menor (Backhoff, 1976). Por estas razones, el ensilado mantiene valores similares a la composición química de la materia prima, por tanto, el valor de la proteína depende de la materia prima utilizada (Pulido Gomez, 1989; Spanopoulos Hernandez, et al., 2010).

El uso de BHT (Torrissen, et al., 1981; Vizcarra Magaña, 1999), el cual fue adicionado al ensilado desde el primer día de su elaboración como antioxidante permite evitar la oxidación de los lípidos y la formación de malonaldehído (MDA), en consecuencia se evita cambios físicos en el olor, color (oscurecimientos), textura y sabores rancios (Arruda, et al., 2007; Ruiz-Medina, 2007), los cuales hubieran resultado negativos para los pulpos experimentales, causando la disminución en la ingestión de la dieta, situación que no sucedió e incluso resulto atractiva para los pulpos, similar al poder atrayente que tienen los concentrados de proteína de pescado (CPSP) en los pulpos (Aguila, et al., 2007).

La temperatura a la que se mantiene el ensilado influye en el tiempo de hidrólisis (Ruiz-Medina, 2007), aunque generalmente la temperatura ambiente a la que se almacena es suficiente para que ocurran los cambios bioquímicos del ensilado (Arruda, et al., 2007), sin la necesidad de mantenerlo a una temperatura específica. En el presente estudio el ensilado se mantuvo a temperatura ambiente, con un promedio de 28°C durante 30 días, favoreciendo que más del 70% de hidrólisis se llevara a cabo en los primeros tres días y al décimo día la hidrólisis fuera de más del 90%, tal y como se observó en estudios anteriores, obteniendo 102, 126 y 156 mg ml⁻¹ de proteína soluble al día 1, 3 y 10 respectivamente, de los cuales se tomaron las muestras para la preparación de las tres dietas a probar. Pulido (1989) reporta que un ensilado de pescado almacenado a 23°C presenta una solubilidad de 10-20% en los primeros tres días, valores superiores a 75% a los 10 días, por lo que a mayor temperatura estos valores se obtienen en menor tiempo. Gilberg (1992) reporta una hidrólisis del 70% del NT en 4 días en ensilado de vísceras de pescado a 25°C, Vizcarra (1999) reporta un 60% de hidrólisis de la proteína total en 4 días a 37°C en almacenamiento, Ruiz (2007) reporta en un primer ensilado una hidrólisis proteica de 95.84% en 120 horas (5 días) a 37°C y un pH 4, en un segundo experimento, ensilados con ácido fórmico a 37°C presentaron una hidrólisis de 74.37% a las 24 horas y superando el 90 % al día 6, Mach & Nortvedt (2009) reportan 81% de solubilidad en ensilados de pescado crudo, pero solo 21% a los 4 días en ensilados donde el pescado fue cocinado, demostrando la importancia de las enzimas presentes en los

desechos de pescado en el proceso de ensilaje y la velocidad con la que se hidroliza la materia en los primeros días. Gallardo et al. (2012) reporta valores cercanos al 90% al día 3 en ensilados de desechos comparable al realizado en el presente estudio tanto en materia prima como en condiciones de elaboración.

Bárceñas (2013) menciona posibles efectos negativos por altas cantidades de grasa en los ensilados de desecho de pescado al actuar como anti nutrientes, debido a que en cefalópodos la digestibilidad de los lípidos es ineficiente y puede causar una saturación de los sitios de absorción en la GD, viéndose reducido principalmente el crecimiento (Petza, et al., 2006; Valero Jimenez, 2009). Sin embargo, Valero (2009) también reporta que la cantidad de lípidos no es la principal causa de bajas tasas de crecimiento, ya que el pulpo a lo largo de su vida necesita lípidos monoinsaturados y poliinsaturados (PUFA) como ácido docosahexaenoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA) abundantes en manto de calamar y jaiba (Bárceñas, 2013), respectivamente, que participan en el desarrollo del sistema nervioso, la fisiología reproductiva y en la formación de biomembranas durante el crecimiento en pulpos como *O. vulgaris* (Linares, et al., 2015). Con una primera dieta artificial cuyo contenido fue de 21% de lípidos y dirigida a cubrir los requisitos de energía de mantenimiento (Rosas, et al., 2007; Domingues, et al., 2007) se observó que los lípidos si fueron un factor limitante en la dieta. En estudios posteriores, se calculó que el requerimiento de *O. maya* es de 5.1-5.6% de lípidos (Rosas, et al., 2013) similar al contenido lipídico del cangrejo que va de 2.9-5.1% (Valero Jimenez, 2009), considerando también que buenas tasas de crecimiento y supervivencia no solo dependen de la cantidad o calidad de proteínas y lípidos, también dependen de la disponibilidad para ser asimiladas y como el pulpo los aproveche. Como se ha mencionado anteriormente la cantidad de lípidos varía dependiendo de la materia prima utilizada (peces magros o grasos y las partes que se utiliza de este), sin embargo, durante el ensilaje los niveles de lípidos disminuyen por actividad lipolítica (Spanopoulos Hernandez, et al., 2010) o al mezclarse con otros ingredientes en la dieta y debido a que el ensilado presenta fase lipídica, hidrosoluble y de sedimentos (Vizcarra Magaña, 1999), la fase lipídica puede ser disminuida, permitiendo ajustar el contenido lipídico del ensilado o retirada completamente por centrifugación, viéndose beneficiado el valor biológico proteico del ensilado. El beneficio es debido a un aumento en la asimilación de proteínas por parte del organismo (Strøm & Eggum, 1981) y utilizar la fracción lipídica retirada como aceite de

pescado en la formulación de dietas para peces u otros animales (Arruda, et al., 2007), claro que lo anterior solo es rentable en una producción industrial.

Crecimiento, tasa específica de crecimiento y sobrevivencia

En el presente estudio, las dietas donde se sustituyó la carne de jaiba con ensilado de desechos de pescado no mostraron diferencias significativas con la dieta control de calamar-jaiba, por lo que el uso de ensilados de desechos de pescado como ingrediente en la dieta de pulpos tiene efectos positivos con respecto al crecimiento, TEC y sobrevivencia.

Los cefalópodos durante su etapa juvenil presentan una fase de crecimiento exponencial y en algunos casos una hiperplasia (formación de nuevas fibras musculares) sostenida e hipertrofia (aumento de tamaño de fibras musculares existentes) que continua a lo largo de su vida, a diferencia de los animales con curvas de crecimiento asintótica donde el crecimiento por hiperplasia es interrumpido. Esta característica de los cefalópodos les permite tener un crecimiento acelerado y altas tasas de crecimiento, de hasta 6% día⁻¹, dependiendo de la especie, disponibilidad de alimento y calidad de este, entre otros factores (Forsythe & Van Heukelem, 1987; Forsythe & Hanlon, 1988; Semmens, et al., 2004; Seemens, et al., 2011; Bárcenas, 2013; Valero Jimenez, 2009).

Durante los tres meses (90 días) que duro el experimento, periodo promedio que dura la fase de crecimiento exponencial (Bárcenas, 2013), los pulpos que presentaron el mayor crecimiento alcanzaron pesos de 1.7 g , un crecimiento pobre si se compara con otro experimento donde juveniles de *O. maya* alcanzaron un valor promedio de 1.2±0.5 g peso vivo en un periodo de 30 días alimentado con pasta de cangrejo (Quintana, et al., 2011) y tomando en cuenta que *O. maya* puede alcanzar un 1 Kg en 4 meses a 25°C (Van Heukelem, 1983). Este aparente crecimiento inferior se puede deber a las condiciones de cautiverio, como el tamaño de tanque, espacio de desplazamiento, cantidad de organismos, entre otros y como estos afectan los procesos de crecimiento somático a nivel celular, modificando sus tamaños en cautiverio (Pec1 & Moltshaniwskyj, 1999; Leporati, et al., 2007). En su experimento con pulpos individualizados e incubados a la misma temperatura, Leporati (2007) obtuvo un tamaño promedio de 1.63 g en un periodo de 114 días en juveniles de *O. pallidus*. En el experimento de Bárcenas (2013) con condiciones de cautiverio y periodo de tiempo similar al presente estudio obtuvo promedios en tallas de juveniles de *O. mayas*

cercanos a los 2 g, por lo que si existe una influencia del cautiverio individualizado en el tamaño del pulpo.

Otro factor importante en el crecimiento de los pulpos fue la composición nutricional de las dietas. Como se ha mencionado anteriormente los pulpos presentan un metabolismo dependiente de proteínas, por lo que para que el organismo puede mantener elevadas tasas de crecimiento se requiere elevadas tasas de síntesis de proteínas y estas a su vez requiere un consumo elevado de aminoácidos (Houlihan, et al., 1990; Lee, 1994; Valero Jimenez, 2009). Muchos de estos aminoácidos esenciales para el crecimiento lo obtienen de la proteína animal que aporta los crustáceos, en especial los cangrejos al cual están fuertemente asociados a lo largo de toda su vida (Portelo Rodriguez, 2011), por lo que se considera que su inclusión en dietas artificiales es indispensable para obtener efectos positivos en el crecimiento (Portelo Rodriguez, 2011; Gallardo, et al., 2017) y reducir la mortalidad, la cual se ve aumentada en dietas carentes de crustáceos (Tuñón, et al., 2002). Sin embargo, esto no quiere decir que necesariamente sea el ingrediente de mayor inclusión y la sustitución con otra fuente de proteína animal, aunque no total, si puede ser parcial. En estudios con *O. vulgaris* alimentados con cangrejo y pescado (50%-50%) fresco reporto TEC promedio de 1.98 ± 0.30 día⁻¹ (García & Valverde, 2006) y $2.1 \pm 0.05\%$ día⁻¹ (Prato, et al., 2010), similar a lo obtenida por las tres dietas con inclusión de ensilado de desecho de pescado, con valor promedio de 2.1% día⁻¹, el cual también es similar a las tasas de 1.91 ± 0.14 día⁻¹ (Rosas, et al., 2008), 1.43 ± 1.25 y $1.71 \pm 0.643\%$ día⁻¹ (Rosas, et al., 2013) obtenido cuando se alimenta juveniles de *O. maya* con pasta de cangrejo, carne de jaiba fresca y liofilizada (respectivamente) y cercano a la tasa $3.04 \pm 0.39\%$ día⁻¹, obtenido con pasta calamar-jaiba (Martínez, et al., 2014). Las TEC obtenidas son bastante buenas debido a un correcto proceso de ensilaje, el cual permitió, mediante la hidrólisis la solubilidad de una gran parte de la proteína total (Gallardo, et al., 2012) ofreciendo un ensilado de calidad con una mayor cantidad de aminoácidos libres y proteínas de bajo peso molecular el cual puede sustituir la proteína nativa que aportan los crustáceos frescos (Domingues, et al., 2004) y mantener un crecimiento similar a estos.

Comparada con otros estudios donde utilizaron ensilados como ingrediente, los resultados son superior a lo reportado con *O. maya* alimentados con pasta a base de cangrejo-calamar-ensilado de pescado con TEC de $0.36 \pm 0.05\%$ día⁻¹ (Martínez, et al., 2014), probablemente debido a que se sometió el ensilado a un proceso de secado a 80°C lo cual pudo causar la

desnaturalización de su contenido de proteína, disminuyendo la proteína soluble disponible y disminuyendo la digestibilidad de estas por reducción de sitios donde actúan las enzimas (Santé-Lhoutellier, et al., 2008). Las altas temperaturas utilizadas para realizar las harinas causan un bajo valor biológico en los ingredientes, que, cuando se les administra a través de dietas para cefalópodos su crecimiento no supera el $0.5\% \text{ día}^{-1}$ (González, et al., 2007; Rosas, et al., 2013), y por tanto, una mejor alternativa para la incorporación de ensilados es que estos sean secados por liofilización.

Bárcenas (2013) reporta en su trabajo una sobrevivencia de 0% y una TEC negativa de -0.5 en juveniles de *O. maya* alimentados con dietas donde sustituyo el 100% de carne de jaiba con ensilado de pescado, similares a los valores obtenidos con la dieta reportada por Martínez (2014) donde se sustituye el cangrejo con el ensilado de pescado obteniendo una sobrevivencia de 20% y TEC de $-0.22 \pm 0.03\%$ y con la pasta calamar-jaiba-ensilado la sobrevivencia fue de 30% en 55 días.. La sustitución completa de la carne de jaiba, que como se mencionó antes aumenta la mortalidad, pudo causar la baja supervivencia en ambos tratamientos, mientras que con una sustitución parcial de la carne de jaiba (23%), como se realizó en el presente estudio, la supervivencia de las tres dietas que contenían ensilado fue mayor a 60% en 90 días (fig.8) observándose un claro efecto positivo en la supervivencia.

Tasa de ingestión e índice de rendimiento

La tasa de ingestión (TI) depende de la temperatura del agua, la preferencia por el alimento y su disponibilidad, llegando a consumir hasta el 50% de peso corporal por día, en el caso de dietas artificiales por la calidad y cantidad de sus ingredientes. La preferencia está asociado a los crustáceos, cangrejos principalmente, el cual cumple con la mayor parte del requerimiento energético para el metabolismo del pulpo. Si la disponibilidad del cangrejo no es buena, el pulpo busca otras fuentes de alimento que cubran sus requerimientos, sin embargo, cuando los alimentos no satisfacen estos requerimientos la tasa de ingestión aumenta para compensar la deficiencia en un intento de incrementar la energía ingerida (Domingues, et al., 2004; Domingues, et al., 2007; Rosas, et al., 2007; Portelo Rodriguez, 2011; Martínez, et al., 2014).

Domingues, et al. (2007) reporta pulpos alimentados con una dieta artificial que presentan una tasa de ingestión mayor a los pulpos alimentados con cangrejo fresco, debido a que la dieta no satisfacía los requerimientos de los pulpos, y por tanto estos ingerían mayor cantidad

de alimento. Similares resultados son reportados en otros experimentos (Rosas, et al., 2007) donde las dietas artificiales aportan más energía, pero limitan la absorción de esta y de nutrientes disponibles para el crecimiento, destinándolos solo al mantenimiento, ya que los pulpos mantenían su peso, pero no crecían. En el presente estudio las TI de los pulpos mantenidos con la dieta control y las dietas con ensilado fueron similares ($P>0.05$) y la sustitución de la carne de jaiba no causó un incremento de la ingestión de alimento en los pulpos debido a que el valor nutricional del ensilado de desechos de pescado junto con el de la jaiba y calmar fue asimilada eficientemente no solo para el mantenimiento del organismo, también una buena asimilación de los nutrientes le permitió al pulpo utilizar energía para su crecimiento viéndose reflejado en las tasas de crecimiento obtenidas, que, aunque no hayan presentado diferencia significativa, los valores de TEC más altos lo reportaron las dietas que contenían ensilado como ingrediente.

La TEC al ser corregida con la sobrevivencia dio el índice de rendimiento (IR), en la cual no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, pero se observan dos dietas con los valores más altos, el tratamiento E3 y E10. La dieta E3 presentó el mayor IR debido a la alta sobrevivencia (85%) que presentó y la menor TI, sin embargo, su TEC fue similar a la dieta control (jaiba-calamar), por lo que el valor nutrimental que aportó el ensilado a los 3 días de ensilaje satisface las necesidades de manera similar a como lo haría la carne de jaiba sustituida teniendo un efecto positivo en los pulpos, ya que el bajo peso molecular de las proteínas y aminoácidos presentes en el ensilado pueden mejorar la digestibilidad de la dieta (Koueta, et al., 2006; Le Bihan, et al., 2006; Aguila, et al., 2007). La dieta E10 tenía como ingrediente el ensilado con mayor cantidad de proteína soluble, el cual favoreció una alta tasa de crecimiento y buena sobrevivencia (75%), presentando el mejor valor de IR, aunque su TI fue la más alta, esta puede deberse al atractivo de la dieta para el pulpo, tanto por su valor nutricional como por su palatabilidad (Domingues, et al., 2007), ya que era la dieta mejor aceptada por los pulpos al momento de alimentar (observación personal). La TI y el IR nos indican que el ensilado de pescado en conjunto con la carne de calamar y jaiba no presentan un factor anti nutricional que limite la digestibilidad de los nutrientes, como se ha reportado en otras dietas artificiales (Aguila, et al., 2007).

Metabolitos y sustancias de reservas metabólicas

Para evaluar la calidad de un alimento es importante conocer el estado nutricional de los organismos en los que son probadas las dietas, debido a que este es considerado importante al momento de determinar la capacidad de los organismos de aprovechar los nutrientes aportados por las dietas. El estado nutricional se puede evaluar mediante el análisis de los niveles de metabolitos y reservas metabólicas almacenados en los tejidos del organismo, a donde son distribuidos después de la absorción y cumplen papeles como fuentes de energía metabólica o síntesis de moléculas (Aguila, et al., 2007; Bárcenas, 2013) interrelacionándose a través de diversas vías metabólicas (Martinez, et al., 2012). Los principales tejidos donde se almacenan los metabolitos son el musculo y la glándula digestiva (GD).

El glucógeno puede indicar los niveles de reservas metabólicas generadas a partir del alimento consumido (Quintana, et al., 2011). A mayor cantidad de proteína asimilada mayor síntesis de glucógeno, lo cual implica que este altamente relacionado con el crecimiento del pulpo, ya que se ha observado que animales con alta producción de biomasa presenta mayor acumulación de glucógeno y este a su vez se relaciona estrechamente con las proteínas y las cantidades que son absorbidas (Aguila, et al., 2007). Esto se debe al metabolismo de los pulpos, el cual es principalmente proteico (Lee, 1994) por lo que los aminoácidos tienen un papel como reserva de energía y son la base de la síntesis de glucógeno por medio de vías gluconeogénicas que sintetizan glucosa (Bárcenas, 2013), producto energético final del catabolismo de las proteínas (Gallardo, et al., 2017) y almacenándola en forma de glucógeno, siendo esta la principal fuente de energía.

Niveles altos de glucógeno y proteínas en musculo se relacionan siempre con los mejores crecimientos (Martinez, 2010). Para obtener dichos niveles, las muestras se toman del musculo del brazo por presentar el mayor crecimiento, por lo que a mayor crecimiento mayor es el costo energético y se requiere una fuente rápida de energía que cubra la demanda. Los valores de proteína registrados en el presente estudio fueron de 10-12 mg ml⁻¹ obteniendo los valores más altos con las dietas CT y E3, sin embargo, en los valores de glucógeno, aunque no diferentes estadísticamente, la dieta E3 presento el doble del valor obtenido con la dieta CT (fig.12) y mayor los otros dos tratamientos (E1 y E10), los cuales fueron los que más crecieron, contrario a lo que reporta Martínez (2014) . Las mayores TEC, en este caso los pulpos alimentados con las dietas E1 y E10, presentan los menores niveles de glucógeno

muscular. Esto se puede deber a que con estas dietas, los pulpos presentaron tasas de crecimiento mayores que demandaba mayor ingestión de alimento y gasto de energía metabólica, utilizando sus reservas de glucógeno para cubrir esos gastos o como estudios anteriores han demostrado que los aa que llegan a musculo transportado por la hemolinfa se utilizan primero para sintetizar proteína y después son utilizados como fuente de energía para sintetizar glucógeno (Linares, et al., 2015). Se puede concluir que estos organismos destinaban la mayor parte de aa a la síntesis de proteína y menor cantidad para glucógeno. Por otra parte, los pulpos sometidos a la dieta E3 presentaron una ingestión menor, pero los nutrientes que obtenía de la dieta con ensilado son altamente digestibles, razón por la cual muestra valores altos de proteína soluble en musculo. Esta proteína soluble asimilada le permitió cubrir sus requerimientos de mantenimiento, crecer (una TEC menor a E1 y E10) y almacenar energía, de acuerdo a lo mencionado por Gallardo et al (2017) donde explica que el tipo de alimento determina la cantidad de energía dirigida a crecimiento y almacenamiento. La GD es un órgano importante en el proceso de digestión del alimento en los pulpos, además de ser el sitio de síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción y asimilación de nutrientes (Linares, et al., 2015), también cumple un papel de almacenamiento de nutrientes utilizados como fuentes de energía o reservas metabólicas, lípidos principalmente en *O. maya* y en otros casos como el de *O. mimus* la glucosa como principal fuente (Gallardo, et al., 2017)

El alto aporte y asimilación de proteína soluble por parte de la dieta E3, se confirma al medir la proteína soluble en GD, la cual sigue la misma tendencia que en musculo, representando el valor más alto de los cuatro tratamientos (fig.13), seguidos por E1 y E10, dietas también de alta digestibilidad enriquecidas con la proteína soluble del ensilado, lo que propicia una buena asimilación en GD, y de ahí es enviada a musculo. Los niveles de proteína en GD concuerdan con la relación reportada por Martínez (2014) donde TEC altas presentan valores altos de proteína en GD, a excepción de la dieta E3 que presenta la TEC menor pero el mayor valor de proteína.

Colesterol (chol) y acilglicéridos (AG) cumplen un papel de energía metabólica en la GD de *O. maya*, donde son almacenados y utilizados directamente en la GD como combustible durante la digestión intracelular o transportados a diferentes tejidos con la misma función (Rosa, et al., 2005; Gallardo, et al., 2017), por lo que los niveles para analizarlos se tomaron

en dicho órgano. El colesterol y acilglicéridos son obtenidos del metabolismo de lípidos presentes en la dieta, aunque se ha reportado en colesterol, que sus niveles aumentan como sub producto de la degradación proteica del musculo cuando existe un estrés nutricional (Aguila, et al., 2007; Bárcenas, 2013).

Águila (2007) reporta valores de $0.16 \pm 0.02 \text{ mg ml}^{-1}$ y $0.14 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ para colesterol y acilglicéridos en hemolinfa (respectivamente), sin embargo, existe una relación inversa entre los valores en hemolinfa con los de GD, debido a que la movilización de lípidos de GD a tejidos es mayor cuando los niveles de péptidos y aminoácidos son bajos, en una estrategia para satisfacer los requerimientos nutricionales que las proteínas no pueden compensar. Los valores en el presente estudio se mantienen entre 2-2.5 y 3.5-4.5 mg ml^{-1} para chol y AG, respectivamente, probablemente a que los niveles de proteína satisfacían los requerimientos y no existe la necesidad de movilizar los lípidos por lo que estos eran almacenados. Valores similares en colesterol reporta Martínez (2014) en su dieta calamar-jaiba-ensilado e inferiores en acilglicéridos (2.54 y 0.20 mg g^{-1} , respectivamente).

Actividad enzimática

Las enzimas digestivas son producidas durante los procesos de digestión, presentando actividad en todos los niveles del aparato digestivo. A pesar de esto, no todos los órganos secretan enzimas, desde las proteasas producidas en las glándulas salivares posteriores (en pulpos) para la digestión externa hasta las secretadas por la GD y ciego, siendo estos dos los órganos secretores principales en la mayoría de los cefalópodos y donde se registra mayor actividad (Aguila, 2007), razón por la que la GD es un buen órgano para evaluar dicha actividad. Estudiar la actividad enzimática es otra forma de evaluar el efecto de los alimentos en los organismos. Estudios anteriores han demostrado que los procesos involucrados en la producción de enzimas digestivas se relaciona con las características nutricionales de las dietas ingeridas, siendo un mecanismo de *O. maya* para modular su capacidad digestiva dependiendo del alimento, aumentándola cuando las dietas son escasas en nutrientes, observando una relación entre los niveles de quimiotripsina y tripsina con la calidad de la dieta y el crecimiento (Aguila, 2007; Rosas, et al., 2007; Valero Jimenez, 2009; Moguel, 2008).

El uso de ensilado en dietas también presenta un efecto sobre la actividad enzimática, reportándose que debido a la pre hidrólisis de la proteína durante el ensilaje, el ensilado

aporta niveles altos de proteína soluble a la dieta, los cuales llegan en el primer quimo a la GD y ciego abriendo sus sitios de absorción, promoviendo la secreción de enzimas y activación de los zimógenos, de igual manera como lo realizaría la quimiotripsina al producir proteína soluble en la digestión externa, aumentando la capacidad digestiva y una mejor digestibilidad del quimo (Gallardo, et al., 2012; Bárcenas, 2013; Gallardo, et al., 2017) .

La actividad enzimática está altamente relacionada con crecimiento. Gallardo et al. (2017) menciona que la mayor actividad se da en pulpos alimentados con dietas pobres en nutrientes que provocan bajo crecimiento. Así también, Aguila (2007) menciona que hay una baja actividad enzimática en pulpos alimentados con cangrejo fresco, una de las dietas con las mejores tasas de crecimiento. En el presente experimento no se observó una relación tan clara entre la actividad enzimática con las tasas de crecimiento, ya que las dietas E1 y E3 que presentaron las TEC más altas también presentaban altos niveles de actividad enzimática. Aunque no existía diferencia entre los tratamientos, a excepción de la actividad de proteasas alcalinas, existe una relación del sustrato de la dieta con la actividad enzimática (Quintana, et al., 2011), lo que lleva a pensar que las dietas son de calidad e indujeron diferentes capacidades digestivas en los pulpos permitiendo crecimientos positivos para los pulpos sometidos a los cuatro tratamientos dietéticos.

Debido al metabolismo proteico de los pulpos, las proteasas ácidas y alcalinas tienen una mayor participación y son clave en la actividad enzimática, siendo las ácidas más activas que las alcalinas por su participación en la digestión extracelular (Martínez, et al., 2012; Martínez, et al., 2014). Los valores obtenidos en las proteasas evaluadas en el presente estudio (fig.14) sí indican una mayor actividad de las proteasas ácidas sobre las alcalinas.

Esta mayor actividad en GD de las proteasas ácidas, catepsinas principalmente, se debe a que, aparte de su papel en la digestión extracelular, participan en la hidrólisis proteica intracelular que se lleva a cabo en GD, al tener su mayor actividad en los pH bajos presente en la digestión intracelular y en general a lo largo de tracto digestivo, reportando valores de pH entre 5-6 para *O. maya* en diferentes etapas de la digestión (Martínez, et al., 2012; García, 2018). La actividad de proteasas ácidas requerida para llevar a cabo la digestión intracelular fue muy similar en los pulpos mantenidos con las dietas CT y E3, lo que indica que la digestión, absorción y asimilación de nutrientes fue muy similar en estas dos dietas. Los pulpos alimentados con las dietas E1 y E10 presentaron una actividad ligeramente mayor a

aquellos sometidos a las dietas CT y E3, probablemente debido a una mayor cantidad de proteína hidrolizada en la digestión extracelular o aportada por el ensilado en el caso de la dieta E10. Los valores encontrados en el presente estudio son similares a los reportados por Barcenas (2013) para proteasas ácidas en pulpos de la misma especie alimentados con diferentes porcentajes de inclusión jaiba-calamar.

Las proteasas alcalinas, tripsina y quimiotripsina principalmente, tienen actividad en la digestión extracelular en saliva (quimiotripsina) y jugo gástrico a lo largo del tracto digestivo (tripsina en GD) (García, 2018). En el presente estudio, los pulpos sometidos al tratamiento de la dieta control, presentaron la mayor actividad enzimática de proteasas alcalinas, probablemente debido a que las proteínas que aportaba este alimento eran más complejas o sus niveles de proteína soluble eran bajos, lo mismo sucede con la dieta E1, por lo que la digestión extracelular requería mayor actividad de proteasas alcalinas para producir proteína soluble, contrario a lo observado en los organismos alimentados con las otras dos dietas que incluían ensilado de desechos de pescado, específicamente la dieta E3 significativamente diferente al resto, donde la digestión extracelular fue menor debido al contenido de proteína soluble producida por los días de ensilaje, aportándola a la dieta, permitiendo que los pulpos alimentados con dicho tratamiento no necesitaran una alta actividad de proteasas alcalinas.

Las lipasas son enzimas que actúan hidrolizando los enlaces tipo éster en los acilglicéridos, teniendo su mayor actividad en GD y glándulas salivales (García, 2018). La actividad de lipasas es baja, debido a que, como se ha mencionado antes, el metabolismo de lípidos en pulpos y otros cefalópodos es baja, al ser pobre su digestibilidad y eficacia para oxidarlos (Lee, 1994; O'Dor, et al., 1984). Sin embargo, se ha reportado una mayor actividad de lipasas en pulpos recién eclosionados o paralarvas, debido a que, en los primeros días post-eclosión se utiliza más los lípidos como fuente de energía y posteriormente las proteínas (Hueicha, 2016). La actividad de estas enzimas presentada en GD de los pulpos alimentados con las cuatro dietas fue muy similar, siendo ligeramente menor en los pulpos sometidos a la dieta E1. La actividad de las lipasas se ve aumentada cuando la disponibilidad de los nutrientes es baja en la dieta, provocando que los organismos movilicen sus reservas lipídicas para ser hidrolizadas y compensar la deficiencia de la dieta (García, 2018), situación que no sucede en el presente estudio.

Conclusiones

En síntesis, los resultados obtenidos del presente trabajo muestran que una dieta formulada con ensilado de desechos de pescado tiene menor costo y por lo tanto mayor viabilidad económica del alimento para el cultivo de pulpo *O. maya* que cuando sólo se utilizan como fuentes proteicas en la dieta la combinación de calamar – jaiba, sin perder calidad nutricional o los efectos positivos que el alimento produce en el pulpo.

Lo observado en el estudio con respecto a los ensilados indica que es una tecnología ideal en la alimentación animal, fácil de producir y almacenar, permaneciendo estable por largos periodos. Estas propiedades del ensilado nos ofrecen un ingrediente de bajo costo. Por su parte, el uso de desechos como materia prima es favorable para el ambiente evitando contaminación y pérdida de nutrientes.

Conforme a lo visto en el ensilado sobre las condiciones fisicoquímicas, se puede deducir que la temperatura de almacenamiento no afecta su conservación, pero es cierto que a mayor temperatura menor es el tiempo de hidrólisis.

De igual modo, el ácido fórmico propicio un pH estable óptimo para la actividad proteolítica de las enzimas, de ahí que se considere un ácido bastante adecuado para la elaboración de ensilados. Adicionalmente evito la descomposición de los desechos de pescado, de lo que se concluye, en acuerdo a lo mencionado en la literatura (Mach & Nortvedt, 2010), no hubo o fue mínima la proliferación de microorganismos.

Una hidrólisis proteica favorecida dio como resultado generación de proteína soluble desde el primer día de ensilaje, lo cual apunta a la conclusión de que el uso de vísceras en la materia prima del ensilado si tiene un efecto positivo.

La proteína soluble aportada por el ensilado de desechos de pescado tiene un efecto similar a la proteína que hubiera aportado la carne de jaiba sustituida, consecuentemente la sustitución de fuentes proteicas no genero efectos negativos, al contrario, tanto crecimiento como sobrevivencia fueron similares

De igual manera, la sustitución de carne de jaiba con ensilado no presenta efectos negativos en la actividad enzimática y el almacenamiento de reservas metabólicas, ambas muy similares, y ciertamente se ve reflejado en una buena condición nutricional del pulpo.

Cierto es que en el estudio no existe diferencias significativas entre los tratamientos de ensilados de diferentes días de ensilaje, no obstante, los resultados muestran una posible tendencia a que la dieta E3 (50% Calamar, 38.5% Jaiba, 11.5% ensilado de 3 días) pueda ser una mejor base alimenticia, de ahí que es necesario realizar estudios a escala piloto comercial utilizando un mayor número de organismos con dicha dieta. Por otra parte, es necesario profundizar en el nivel máximo de inclusión de ensilado que sustituya parcialmente las fuentes proteicas de calamar y jaiba, sin afectar negativamente el crecimiento y bienestar nutricional de los organismos en cultivo.

Referencias

- Aguila, A. J., 2007. *Bases nutricionales para el cultivo del pulpo Octopus maya*. s.l.:Universidad Nacional Autónoma de México.
- Aguila, J. y otros, 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on Octopus maya (Voss and Solis) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture*, 273(4), pp. 641-655.
- Alvarez Torres, P., Ramírez Marínez, C. & Orbe Mendoza, A., 1999. Desarrollo de la acuicultura en México y perspectivas de la acuicultura rural. *Red de acuicultura rural en pequeña escala, Taller ARPE, FAO-UCT*.
- AOAC INTERNATIONAL, 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 20 ed. s.l.:OMA print.
- Arreola Meraz, P. L., 2018. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la expresión de genes en la glándula oviductal de la hembra Octopus maya.. *Tesis de maestría en ciencias, CICESE, Ensenada, Baja California*.
- Arruda, L. F. D., Borghesi, R. & Oetterer, M., 2007. Use of fish waste as silage: a review. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 50(5), pp. 879-886.
- Avdalov, N. y otros, 1992. Evaluacion del ensilado biológico de pescado en la alimentación de cerdos de engorde. *FAO informe de pesca*, Volumen 441, pp. 88-98.
- Backhoff, H. P., 1976. Some chemical changes in fish silage. *International journal of food science + technology*, 11(4), pp. 353-363.
- Bárceñas Pazos, G., 2015. Efecto del oxígeno disuelto y la temperatura en el metabolismo respiratorio de juveniles tempranos de Octopus maya. *Tesis para obtener el grado de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México*.

- Bárcenas Pazos, G., 2018. Evaluación del efecto de la temperatura en el crecimiento y respuesta antioxidante de *Octopus bimaculoides*, durante su desarrollo embrionario. *tesis para obtener el grado de maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.*
- Bárcenas, G. V., 2013. *Cultivo experimental de juveniles tempranos de O. maya mediante el uso de dietas prácticas: un aproximación a los requerimientos nutricionales de la especie.* México, D.F: Tesis que para optar por el grado de: Maestra en ciencias del mar y limnología..
- Belitz, H., 1988. *Química de los alimentos.* Zaragoza, España: Acribia.
- Boletzky, S. v., 2003. biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Advances in marine biology*, Volumen 44.
- Castro, B. G., 1991. Can *Sepia officinalis* L. be reared on artificial food?. *Marine Behaviour and Physiology*, 19(1), pp. 35-38.
- Castro, B. G., DiMarco, P., DeRusha, R. & Lee, P., 1993. The effects of surimi and pelleted diets on the laboratory survival, growth, and feeding rate of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 170(2), pp. 241-252.
- Castro, B. & Lee, P. G., 1994. Los efectos de las dietas semi-purificadas sobre el crecimiento y el estado de *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Comp Biochem Physiol*, Volumen 109, pp. 1007-1016.
- Cerezo Valverde, J. & Garcia Garcia, B., 2005. Suitable dissolved oxygen levels for common octopus (*Octopus vulgaris* cuvier, 1797) at different weights and temperatures: analysis of respiratory behaviour. *Aquaculture*, Volumen 244, pp. 303-314.
- Chen, X. & Long, L., 1991. Research and production of live feeds in China. *Rotifer and Microalgae Culture Systems*, pp. 187-202.

CONAPESCA, 2014. *Anuario estadístico de acuicultura y pesca*, Mazatlan, Sinaloa, México: Comisión nacional de acuicultura y pesca.

CONAPESCA, 2015. *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-008-SAG/PESC-2015, PARA ORDENAR EL APROVECHAMIENTO DE*, s.l.: Diario Oficial de la Federación.

Dapkevicius, M. y otros, 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 57(1-4), pp. 107-114.

DOF, 2018. *Acuerdo por el que se da a conocer la actualización de la carta nacional pesquera*, s.l.: INAPESCA.

Domingues, P., 1999. *Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish Sepia officinalis*. Portugal: University of the Algarve.

Domingues, P., DiMarco, F., Andrade, J. & Lee, P., 2005. Effect of artificial diets on growth, survival and condition of adult cuttlefish, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758. *Aquaculture international*, 13(5), pp. 423-440.

Domingues, P. y otros, 2007. Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, Issue 13, pp. 273-280.

Domingues, P. y otros, 2004. Growth and survival of cuttlefish (*Sepia officinalis*) of different ages fed crustaceans and fish. Effects of frozen and live prey. *Aquaculture*, 229(1-4), pp. 239-254.

Dominguez, P., Gaxiola, G. & Rosas, C., 2004. Alimentación y Nutrición de Moluscos Cefalópodos: Avances Recientes y perspectivas futuras. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, pp. 16-19.

- Espe, M. & Lied, E., 1999. Fish silage prepared from different cooked and uncooked raw materials: chemical changes during storage at different temperatures. *Journal of the science of food and agriculture*, 79(2), pp. 327-332.
- FAO, 2009. *Estado mundial de la pesca y la acuicultura*, Roma, Italia: Departamento de pesca y acuicultura de la FAO.
- Forsythe, J. W., 1993. A working hypothesis of how seasonal temperature change may impact the field growth of young cephalopods.. En: O. R. K. a. K. T. T., ed. *Recent Advances in Cephalopod Fisheries Biology*. Tokyo: Okutani, pp. 133-143.
- Forsythe, J. W., 2004. Accounting for the effect of temperature on squid growth in nature: from hypothesis to practice.. *Marine and freshwater research*, 55(4), pp. 331-339.
- Forsythe, J. W. & Hanlon, R. T., 1988. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Marine biology*, Volumen 98, pp. 369-379.
- Forsythe, J. W. & Hanlon, R. T., 1988. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Marine Biology*, 93(3), pp. 369-379.
- Forsythe, J. W., Hanlon, R. T. & DeRusha, R., 1991. *Pilot large-scale culture of Sepia in biomedical research*. Caen, France, The Cuttlefish Acta I .Int. Symp. Cuttlefish Sepia, Center Publications University.
- Forsythe, J. W. & Van Heukelem, W. F., 1987. *Growth. In Cephalopod Life Cycles, Vol. 2*. London: Boyle, P. R.
- Gallardo, P. P. y otros, 2012. Nutritive value of diets containing fish silage for juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. 2320 -2325.

- Gallardo, P. P. y otros, 2017. Digestive physiology of *Octopus maya* O. *mimmus*: temporality of digestion and asimilition processes. *Frontiers of physiology* , 8(355).
- García, B. G. & Valverde, J. C., 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on growing. *Aquaculture*, 253(1-4), pp. 502-511.
- García-Garrido, S. y otros, 2011. Effects of fish hydrolysate (CPSP®) on growth and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, Volumen 17, pp. 825-839.
- García, L. E. I., 2018. *Fisiología digestiva y nutrición del pulpo Octopus bimaculoides*. Centro de investigaciones biológicas del noroeste: Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias.
- Gildberg, A., 1992. Recovery of Proteinases and Protein Hydrolysates from Fish Viscera. *Bioresource Technology*, Volumen 39, pp. 271-276.
- Gildberg, A., Olsen, R. & Bjarnason, J., 1990. Catalytic properties and chemical composition of pepsins from Atlantic cod. *Comparative biochemistry and physiology*, 96(2), pp. 223-230.
- Goddard, J. S., McLean, E. & Wille, K., 2003. Co-dried sardine silage as in ingredient in tilapia, *Oreochromis aureus*, diets. *Journal of aquaculture tropical*, 18(3), pp. 257-264.
- González y de la Rosa, M. E., Santos Valencia, J. & Solís Ramírez, M. J., 1998. Evaluación del Pulpo (*Octopus maya*) de la Costa Norte de Campeche, Mexico..
- González, D., Córdoba, J., Indorf, F. & Buitrago, E., 2007. Formulación de dieta para camarón blanco utilizando ensilado de pescado. *Preliminary Studies of Fish Silage Use in White Shrimp (Litopenaeus schmitti) Diet Formulation*, 17(2), pp. 166-172.

- Guevara, J., Bello, R. & Montilla, J., 1991. Evaluacion del ensilado de pescado elaborado por vía microbiológica como suplemento proteínico en dietas para pollos de engorda. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 41(2), pp. 247-256.
- Hanlon, R., 1990. Maintenance, Rearing, and Culture of Teuthoid and Sepioid Squids. *Squid as Experimental Animals*, pp. 35-62.
- Hanlon, R. T. & Forsythe, J. W., 1985. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*, 35(1), pp. 33-40.
- Houlihan, D. F. y otros, 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 106(2), pp. 251-259.
- Hueicha, J. A., 2016. *Determinación de la actividad enzimática digestiva en embriones y paralarvas tempranas del pulpo rojo patagónico, Enteroctopus megalocyathus, en función del tipo de cultivo embrionario y temperatura.*. Universidad Austral de Chile: Tesis de Licenciatura.
- Huss, H. H., 1999. *El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad*. Dinamarca: FAO.
- INAPESCA, 2014. *ACUERDO POR EL QUE SE DA A CONOCER EL PLAN DE MANEJO PESQUERO DE PULPO (O. MAYA Y, s.l.: Diario Oficial de la Federación.*
- Koueta, N., Alorend, E., Noel, B. & Boucaud-Camou, E., 2006. Earlier acceptance of frozen prey by juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* in experimental rearing: effect of previous enriched natural diet. *Vie et milieu*, 56(2), pp. 147-152.
- Le Bihan, E., Perrin, A. & Koueta, N., 2006. Influence of diet peptide content on survival, growth and digestive enzymes activities of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis*. *Vie et Milieu*, 56(2), pp. 139-146.

- Lee, P., 1994. Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Marine and freshwater rbehaviour and physiology*, Volumen 25, pp. 35-51.
- Lee, P. G. y otros, 1991. Initial pallatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 49(1-2), pp. 362-372.
- Leporati, S. C., Pecl, G. T. & Semmens, J., 2007. Cephalopod hatchling growth: the effects of initial size and seasonal temperatures. *Marine biology*, 151(4), pp. 1375-1383.
- Lessi, E., 1994. *Ensilaje de Pescado en Brasil para la alimentación animal..* La Habana, Cuba, En: Taller “Tratamiento y utilización de desechos de origen animal y otros desperdicios en la ganadería”. FAO..
- Linares, M. y otros, 2015. Timing of digestion, absorption and assimilation in octopus species from tropical (*Octopus maya*) and subtropical-temperate (*O. mimus*) ecosystem. *Aquatic biology*, 24(2), pp. 127-140.
- Mach, D. & Nortvedt, R., 2010. Free amino acid distribution in plasma and liver of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed increased levels of lizardfish silage. *Aquaculture Nutrition*, p. 13.
- Mach, D. T. & Nortvedt, R., 2009. Chemical and nutritional quality of silage made from raw or cooked lizard fish (*Saurida undosquamis*) and blue crab (*Portunus pelagicus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(15), pp. 2519-2526.
- Manduzio, H. y otros, 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate survival journal*, 2(2), pp. 91-104.
- Mangold, K., 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. *memoirs of the national museum victoria*, Volumen 44, pp. 81-93.
- Marnett, L. J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), pp. 361-370.

- Martinez, R., 2010. *Bioquímica digestiva, cinética celular y fisiología energética de Octopus maya*. Tesis: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Martínez, R. y otros, 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, Volumen 426-427, pp. 310-317.
- Martinez, R. y otros, 2012. Partial characterization of hepatopancreatic and extracellular digestive proteinases of wild and cultivated *Octopus maya*. *Aquaculture International*, 19(3), pp. 445-457.
- Moguel, C. G., 2008. *Efecto de una dieta artificial en la fisiología digestiva y crecimiento de juveniles tempranos de Octopus maya*. Universidad Autónoma de Yucatán: Tesis profesional.
- Navarro, J. & Villanueva, R., 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, 219(1-4), pp. 613-631.
- Noyola, J. y otros, 2013. Thermal preference, tolerance and metabolic rate of early juveniles of *Octopus maya* exposed to different acclimation temperatures.. *Journal of thermal biology*, 38(1), pp. 14-19.
- Noyola, J. y otros, 2013. Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, Volumen 445, pp. 156-165.
- O'Dor, R. K. y otros, 1984. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, Volumen 11, pp. 239-258.
- Pacheco, j. N., 2018. *Efecto de alimentos secados a diferentes temperaturas sobre el crecimiento, enzimas digestivas y reservas nutritivas de crías post-eclosión del pulpo rojo*

Octopus maya(en proceso de publicación). México: Tesis para obtener el grado de licenciatura.

Parin, M. & Zugarramurdi, A., 1994. *Aspectos económicos del procesamiento y uso de ensilados de pescado*. La Habana, Cuba, En: Taller “Tratamiento y utilización de desechos de origen animal y otros desperdicios en la ganadería”. FAO..

Pecl, G. T. & Moltschaniwskyj, N. A., 1999. Somatic growth processes: how are they altered in captivity?. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1424), pp. 1133-1139.

Petza, D., Katsanevakis, S. & Verriopoulos, G., 2006. Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed ad libitum on a high-lipid diet. *Marine biology*, 148(4), pp. 827-832.

Portelo Rodriguez, E., 2011. *Caracterización de la conducta selectiva de alimentación de juveniles del pulpo rojo Octopus maya*. Yucatán, México: Tesis que para obtener el grado académico de maestra en cinecias del mar y limnología.

Prato, E., Portacci, G. & Biandolino, F., 2010. Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 309(1-4), pp. 203-211.

Pulido Gomez, L. A., 1989. *Evaluacion del ensilado de pescado como alimento para el hibrido de tilapia Oreochromis urolepis hornorum x Oreochromis mossambicus (Trewavas,1980)*. Tesis que para obtener el titulo de BIólogo ed. s.l.:Escuela nacional de estudios profesionales zargoza.

Quintana, D., Rosas, C. & Moreno-Villegas, E., 2011. Relationship between nutritional and rearing parameters of octopus maya juveniles fed with different rations of crab paste.

Aquaculture nutrition, 17(2), pp. e379-e388.

Raa, J. & Gildberg, A., 1982. Fish silage: a review. *CRC critical reviews in food science nutrition*, Volumen 16, pp. 384-419.

Rodriguez, M. & Carmona, C., 2008. Crecimiento y supervivencia de crías de pulpo (Octopus maya) : alimentados con dietas inertes bajo condiciones de laboratorio en Yucatán, México. *Hidrobiològica*, 8(3).

Rosa, M. E. G. Y. D. I., Santos Valencia, J. & Solís Ramírez, M., 1996. *Evaluación del pulpo (Octopus maya) de la costa norte de Campeche, México*, s.l.: s.n.

Rosa, R., Costa, P. R., Bandarra, N. & Nunes, M. L., 2005. Changes in tissue biochemical composition and energy reserves associated with sexual maturation in the ommastrephid squids *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae*. *The Biological Bulletin*, 208(2), pp. 100-113.

Rosas, C. y otros, 2007. *Adaptaciones morfológicas y digestivas durante los primeros días de vida de los juveniles de costa Octopus maya (Voss y solis)*. Veracruz, Veracruz, Memorias del XIII congreso bienal de nutrición AMENA.

Rosas, C. y otros, 2004. La condición reproductiva del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (crustacea; penaeidae): evidencias de deterioro ambiental en el sur del Golfo de México.. *Diagnóstico ambiental del Golfo de México INE-SEMARNAT*.

Rosas, C. y otros, 2007. Energy balance of Octopus maya fed crab or an artificial diet. *Marine biology*, 152(2), pp. 371-381.

Rosas, C. y otros, 2007. Energy balance of Octopus maya fed crab or an artificial diet.. *Marine Biology*, 152(2), pp. 371-381.

- Rosas, C. y otros, 2014. Capitulo 20. Octopus maya. En: J. Iglesias, L. Fuentes & R. Villanueva, edits. *Cephalopod Culture*. España: Springer, pp. 383-396.
- Rosas, C. y otros, 2011. Effects of two dietary protein levels on energy balance and digestive. *Aquaculture international*, 19(1), pp. 165-180.
- Rosas, C. y otros, 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of Octopus maya. *Aquaculture*, 275(1-4), pp. 291-297.
- Rosas, C. y otros, 2013. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity Octopus maya juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture research*, Volumen 44, pp. 1020-1044.
- Ruiz-Medina, E., 2007. *Elaboracion y evaluación de un ensilado de pescado diablo (Hypostomus plecostomus)*. Tesis que para obtener el título de Química en alimentos ed. México D.F: Facultad de Química.
- SAGARPA, 2014. Ficha estadística Yucatán, 2005 - 2014.. En: *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2014*. México: CONAPESCA, p. 306.
- Santé-Lhoutellier, V. y otros, 2008. Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), pp. 1488-1494.
- Seemens, J., Doubleday, Z., Hoyle, K. & Pecl, G., 2011. A multilevel approach to examining cephalopod growth using Octopus pallidus as a model. *Journal of Experimental Biology*, 214(16), pp. 2799-2807.
- Semmens, J. M. y otros, 2004. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology.. *Marine and Freshwater Research*, 55(4), pp. 367-377.
- Solís Ramírez, M. J., 1967. *Aspectos biológicos del pulpo: Octopus maya*. México: UADY.

- Solís-Ramírez, M., 1994. Mollusca de la península de Yucatán, México.. *Recursos Faunísticos del litoral de la Península de yucatán. Universidad Autónoma de Campeche, Estación Pacífico del Occidente de México* , Volumen 2, pp. 13-32.
- Spanopoulos Hernandez, M. y otros, 2010. Producción de ensilados biológicos a partir de desechos de pescado, del ahumado de atun aleta amarilla(*Thunnus albacares*) y del fileteado de tilapia (*Oreochromis spp*), para alimentación de especies acuícolas. *Revista mexicana de ingeniería química*, 9(2), pp. 167-178.
- Strøm, T. & Eggum, B. O., 1981. Nutritional value of fish viscera silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(2), pp. 115-120.
- Tatterson, I. N., 1982. Fish silage preparation, properties and uses. *Animal feed sciences and technology*, Volumen 7, pp. 153-159.
- Tatterson, I. N. & Windsor, M. L., 1976. Fish silage. *Process of biochemistry*, 11(10), pp. 17-19.
- Tatterson, I. & Windsor, M., 1974. Fish silage. *Journal of the science of food and agriculture*, 25(4), pp. 369-379.
- Toledo-Pérez, J. & Llanes-Iglesias, J., 2007. Estudio comparativo de los desechos de pescado ensilado por vías bioquímica y biológica. *Revista de veterinaria*, 8(9), pp. 1-7.
- Torrissen, O., Tidemann, E., Hansen, F. & Raa, J., 1981. Ensiling in acid—a method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by-products and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 26(1-2), pp. 77-83.
- Tuñón, E., Parada, A., Caeiro, C. & Rey-Méndez, M. ..., 2002. Estudio comparativo basado en la dieta diferenciada para el engorde de pulpo *Octopus vulgaris*, Cuvier 1797; G, en una

explotación industrial. En: J. F. C. M. I. R. M. Rey-Méndez, ed. *IV Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. España: s.n., pp. 255-269.

Valero Jimenez, A. M., 2009. *Efecto del tipo de alimento en el crecimiento y la actividad de las enzimas digestivas de juveniles cultivados de octopus maya (Voss y Solis)*, s.l.: Facultad de Ciencias.

Van Heukelem, W. F., 1977. Laboratory maintenance, breeding, rearing, and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Laboratory Animal Science*, 27(5), pp. 852-859.

Van Heukelem, W. F., 1983. *Octopus maya*. *Cephalopod life cycles*, Volumen 1, pp. 311-323.

Viana, M. T., Nova, C. & Solana-Sansores, A., 1993. Acid fish silage. Effect of preheating and addition of phosphoric and citric acid on the biochemical quality. *Ciencias del Mar*, 19(4), pp. 415-433.

Vidotti, R. M., Dalton, J. C. & Viegas, E. M., 2002. acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for pacu, *Piriacetus mesopotamicus*. *Journal world aqua*, 33(1), pp. 57-62.

Vizcarra Magaña, L. A., 1999. *Desarrollo de un alimento para aves a base del ensilaje de desperdicio de atuneras*. México, DF: Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.

Vizcarra Magaña, L. A., 1999. *Desarrollo de un alimento para aves a base del ensilaje de desperdicios de atuneras*. UNAM, México, DF: Tesis maestría.

Voss & Solis, M., 1966. *Octopus maya*, a new especie from the bay of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 16(3), pp. 615-625.

Ward, W. J., Parrott, G. A. & Iredale, D. G., 1985. Fish waste as silage for use as a feed supplement. *Canadian industry report of fisheries and aquatic sciences*, Volumen 158, pp. 4-10.

Zavala-Hidalgo, J. y otros, 2006. Seasonal upwelling on the western and southern shelves of the Gulf of Mexico.. *Ocean dynamics*, 56(3-4), pp. 333-338.

Zavala-Hidalgo, J., Morey, S. L. & O'Brien, J. J., 2003. Seasonal circulation on the western shelf of the Gulf of Mexico using a high-resolution numerical model. *Journal of Geophysical Research*, 3389(a108), pp. 1-19.