

TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE DIETAS  
ARTIFICIALES PARA EL PULPO  
COMÚN OCTOPUS VULGARIS  
(CUVIER, 1797), CON EL FIN DE  
OPTIMIZAR SU CULTIVO EN LA  
FASE DE ENGORDE



*Sandra García Garrido*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología  
y Medicina Legal



Sevilla, 2015



Programa de Doctorado Interdepartamental  
Estudios Avanzados en Alimentos



## TESIS DOCTORAL

Desarrollo de dietas artificiales para el pulpo común *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) con el fin de optimizar su cultivo en la fase de engorde

Memoria presentada por

**Sandra García Garrido**

Para optar al grado de Doctor  
por la Universidad de Sevilla

Dirigida y supervisada por:

**Dr. Pedro Domingues**

Sevilla, 2015





**PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL**

Curso Académico 2014 / 2015

**SERVICIO DE DOCTORADO**

El Departamento / Comisión Académica del programa de doctorado **ESTUDIOS AVANZADOS EN ALIMENTOS** utilizando el procedimiento acordado por su Consejo, previo informe del Director/es, así como del Tutor <sup>(1)</sup>, en su caso, ha acordado .. **AUTORIZAR** .... <sup>(2)</sup> la presentación de la Tesis doctoral cuyos datos se citan a continuación:

APELLIDOS		NOMBRE
GARCÍA GARRIDO		M <sup>a</sup> SANDRA
DENOMINACIÓN DEL PROGRAMA DE DOCTORADO/PROGRAMA OFICIAL DE POSGRADO CURSADO POR EL SOLICITANTE		
ESTUDIOS AVANZADOS EN ALIMENTOS		
DEPARTAMENTO RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO /CENTRO RESPONSABLE DEL PROGRAMA OFICIAL DE POSGRADO		
INGENIERÍA QUÍMICA		
DEPARTAMENTO RESPONSABLE DEL PROYECTO DE TESIS		
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL		
DIRECTORES/ES DEL PROYECTO DE TESIS		
NOMBRE Y APELLIDOS	DEPARTAMENTO	D.N.I.
PEDRO M. RODRIGUES DOS SANTOS DOMINGUES	INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA – CENTRO OCEANOGRÁFICO DE VIGO	X2555230E
TUTOR DEL PROYECTO DE TESIS (en su caso)		
ISABEL M <sup>a</sup> VICARIO ROMERO		
DENOMINACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS		
DESARROLLO DE DIETAS ARTIFICIALES PARA EL PULPO COMÚN <i>OCTOPUS VULGARIS</i> (CUVIER, 1797), CON EL FIN DE OPTIMIZAR SU CULTIVO EN LA FASE DE ENGORDE		

Sevilla 22 de.....SEPTIEMBRE.....de 2015

El Director/es de la Tesis.

El Tutor,

Fdo.: PEDRO RODRIGUES DOS SANTOS DOMINGUES

Fdo.: ISABEL VICARIO ROMERO

El Director del Departamento / Presidente de la Comisión Académica



Fdo. Fdo. ....

<sup>1</sup> Este apartado se rellenará sólo cuando el Director de la tesis no sea profesor del Departamento responsable.

<sup>2</sup> Autorizar / no Autorizar.

**EXCMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO**



Este trabajo ha sido desarrollado en el Centro Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) Agua del Pino, organismo autónomo adscrito a la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, y dentro del Programa de Doctorado Estudios Avanzados en Alimentos, Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Su financiación ha sido posible gracias a la concesión por parte del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de la beca predoctoral nº 47 (BOE nº 308 26/12/2006) y por la participación en los siguientes proyectos:

- ✓ Proyecto de Investigación *Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos de pulpo de roca Octopus vulgaris L* de la Junta Nacional de Cultivos Marinos (Enero 2010 – Diciembre 2012).
- ✓ Proyecto de Investigación *Optimización del engorde de pulpo Octopus vulgaris* de JACUMAR (Enero 2007 – Diciembre 2009).
- ✓ Proyecto de Investigación *Cultivo preliminar extensivo de choco, Sepia officinalis, en esteros* INIA TRT2006-00010-00-00 (Enero 2007 – Diciembre 2009).
- ✓ Proyecto *Estudios preliminares sobre la viabilidad de cultivo a gran escala del choco, Sepia officinalis* INIA RTA2005-00070-00-00 (Enero 2007 – Octubre 2008).





## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que, de un modo u otro, me han ayudado en la realización de este trabajo:

Al Dr. D. Pedro Rodrigues Dos Santos Domingues (Grupo de Acuicultura Marina del IEO de Vigo), por esta valiosa oportunidad, por confiar en mí, por ayudarme en todo y por enseñarme todo lo que sé. Gracias por tu apoyo, por tu excelente dirección y por orientarme en mi vida profesional.

A mi tutora de la Universidad de Sevilla, la catedrática Dña. Isabel Vicario Romero (Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Facultad de Farmacia), por ayudarme en todo lo posible para sacar adelante este trabajo. Gracias por tu paciencia.

A los Dres. D. Carlos Rosas Vázquez, D. Reinhard Saborowski y D. Juan Bautista Palomas, por brindarme la oportunidad de trabajar bajo sus tutelas en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación UMDI-Sisal de la UNAM (Yucatán, México), en el Alfred Wegener Institute (Bremerhaven, Alemania) y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla), respectivamente. Gracias por sus grandes consejos y por su hospitalidad.

A los Dres. D. Marcelino Herrera Rodríguez, D. Ismael Hachero Cruzado y Dña. Ana Rodiles Guerrero, por asesorarme en el complejo mundo de la investigación y ayudarme en todo momento. Mil gracias.

A todo el personal del centro IFAPA Agua del Pino que, además de excelentes compañeros de trabajo, son también magníficas personas.

A mis padres Antonio y Mari, por ser “los mejores del mundo”. Por su apoyo incondicional. A ellos debo todo.

A mis hermanas Cristina y Rocío, por su cariño día tras día, por vuestras risas. Gracias por estar siempre ahí.

A mi compañero, mi marido, mi amigo... Gracias Sergio, por animarme en mi trabajo y comprender mi dedicación al mismo. Por ser quien eres, por todo.

A mis princesas, mis muñecas, mis niñas. Gracias Irene y Laura. Os quiero más que la vida entera...



Porque la vida tuya es, y siempre tienes que luchar.  
Y a veces tienes que perder, para luego poder ganar.  
Para sentir, para vivir, para soñar...

(Manuel Carrasco)



## RESUMEN

El pulpo *Octopus vulgaris* es un cefalópodo con gran potencial para la diversificación de la acuicultura debido a sus altas tasas de crecimiento, su elevado precio en el mercado y su relevancia social. Sin embargo, existen problemas para conseguir su sólida acuicultura comercial como la alta mortalidad de las larvas y la falta de alimentos artificiales adecuados para su engorde. El desarrollo de una dieta artificial para *O. vulgaris* equilibrada, económica, con fácil mantenimiento y que dé lugar a un crecimiento aceptable es uno de los objetivos más importantes para el desarrollo de su cultivo comercial. Por ello, con el fin de desarrollar una dieta artificial para el pulpo y optimizar así su cultivo en la fase de engorde, se llevaron a cabo los diferentes experimentos que se relatan en la presente tesis doctoral.

En primer lugar, se realizó un ensayo donde se analizaron los efectos de la densidad de cultivo sobre el crecimiento y la supervivencia del pulpo a 20°C. Así, la densidad máxima sostenible para su engorde en tanques no debe exceder de 20 kg m<sup>-3</sup> para un periodo máximo de dos meses.

En segundo lugar, y hasta conseguir desarrollar una dieta artificial aceptable, la búsqueda de presas alternativas podría reemplazar a las presas utilizadas normalmente para el engorde del pulpo, como los cangrejos marinos, y así abaratar costes de producción. Por ello, se determinaron los efectos de diferentes presas (calamar, *Loligo gahi*, cangrejo de río, *Procambarus clarkii*, y merluza, *Merluccius gayi*) sobre el crecimiento, la supervivencia y el balance energético de *O. vulgaris*. Se obtuvo al calamar como la mejor presa para su cultivo en fase de engorde y que el pescado blanco como la merluza también da lugar a buenos resultados de crecimiento y podría utilizarse en el futuro.

En tercer lugar, se llevaron a cabo dos pruebas de aceptación de dietas artificiales con diferentes ingredientes y aglutinantes. Se observó que la gelatina puede ser un aglutinante adecuado en la elaboración de dietas para pulpo ya que su aceptación fue buena y el crecimiento aceptable. Y que el hidrolizado de proteínas de pescado (CPSP®) como ingrediente de las dietas elaboradas puede ser el causante de bajas tasas de crecimiento así como de la baja absorción de lípidos en la glándula digestiva.

La glándula digestiva de los pulpos juega un papel muy importante en la digestión y el metabolismo lipídico de cefalópodos. Por otra parte, el manto del animal es la parte consumible y la más importante desde el punto de vista culinario. Por ello, de forma simultánea al desarrollo de las pruebas de aceptación y mediante un ensayo adicional en condiciones de ayuno, se llevó a cabo el estudio lipídico del manto así como de la glándula digestiva de los pulpos. Además, y teniendo en cuenta que *O. vulgaris* se compone de un

80% de proteínas en peso seco y que juegan un papel fundamental en el crecimiento y metabolismo de esta especie ya que son la principal fuente de energía en los cefalópodos, en el ensayo adicional en condiciones de ayuno se estudió la composición proteica y en aminoácidos del manto. Todo ello nos dio los siguientes resultados:

El manto posee una gran estabilidad metabólica incluso en periodos de ayuno o de alimentación con dietas deficientes. Presenta alta estabilidad lipídica, característica beneficiosa desde el punto de vista del consumidor, y parece que este órgano es utilizado para necesidades metabólicas del pulpo durante estados de ayuno prolongado o inanición. El perfil en aminoácidos del manto de los pulpos, caracterizado por mayores contenidos en Arg, His, Lys, Gly, Leu y Pro podría indicar un estado prolongado de ayuno (> 20 días) o malnutrición. Por el contrario, los aminoácidos más abundantes en el manto de pulpos con un buen estado nutricional son Glu, Asp, Arg, Leu y Lys. Debería realizarse una consideración especial en lo concerniente a los aminoácidos Thr, Ile, Ser, Ala, Asx y Glx, por su rápido consumo, y con Lys e His, debido a sus contenidos estables, durante condiciones prolongadas de ayuno.

La glándula digestiva podría ser utilizada como un indicador del estado nutricional del animal. De esta forma, el nivel de ésteres de esteroles podría determinar cortos periodos de ayuno o subalimentación, mientras niveles bajos de triglicéridos y ésteres de esteroles podrían indicar largos periodos de ayuno o el uso de una inadecuada alimentación. La composición de ácidos grasos de la glándula digestiva se ve afectada por la dieta. Así, la mayoría de los ácidos grasos más importantes, como HUFA *n*-3, EPA y DHA, disminuyen en este órgano cuando las condiciones de alimentación no son las adecuadas. Aunque la cantidad de ácido araquidónico en la glándula digestiva es pequeña, éste parece ser un ácido graso muy importante en el metabolismo de lípidos de *O. vulgaris*. Los resultados de este estudio sugieren posibles rutas metabólicas diferentes para el uso de DHA y EPA en la glándula digestiva entre cefalópodos, como *O. vulgaris* y *Sepia officinalis*. Y que la vía de degradación de aminoácidos hasta piruvato e intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos es favorecida respecto a la vía de degradación de los aminoácidos cetogénicos.

Por último, y considerando la gran importancia del conocimiento de la fisiología digestiva como base para el desarrollo de dietas artificiales adecuadas para cefalópodos, se llevó a cabo una caracterización de la actividad proteasa del jugo gástrico y la glándula digestiva de *O. vulgaris* con la intención de determinar el pH y la temperatura óptimas de las proteasas digestivas y de buscar sus características bioquímicas usando inhibidores enzimáticos. Así, se observó que la actividad proteasa total del jugo gástrico mostró dos

picos, a pH 3 y pH 8; y en la glándula digestiva también dos picos, a pH 2 y pH 10. Las enzimas de la glándula digestiva son más estables a cambios de pH del medio que las enzimas del jugo gástrico. La actividad total de proteasas ácidas y alcalinas del jugo gástrico fue mayor a 30 y 50°C, respectivamente, mientras que para la glándula digestiva, la actividad de proteasas ácidas fue mayor a 20°C y no se encontraron diferencias entre temperaturas para proteasas alcalinas. Se apreció alta termoestabilidad en jugo gástrico para proteasas ácidas y alcalinas incubadas a 40°C durante 30 min. En la glándula digestiva destacan las proteasas ácidas a 25°C durante 50 min observándose las proteasas alcalinas menos termoestables. En el jugo gástrico se registró inhibición alta al reaccionar con PMSF, EDTA y Pepstatina A. Para la glándula digestiva, con PMSF y una inhibición intermedia con EDTA, E64 y TPCK. Los dos órganos muestran un perfil electroforético con bandas proteicas, principalmente, de bajo peso molecular. Se observa actividad enzimática en proteasas alcalinas del jugo gástrico con un peso molecular de 20,1 KDa. Así, parece ser que la glándula digestiva y el jugo gástrico de *O. vulgaris* poseen una batería de enzimas digestivas formada, principalmente, por serin-proteasas y metaloproteasas en medio alcalino y aspártico-proteasas en medio ácido.





**ÍNDICE**

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. Cefalópodos .....	2
2. Pesquería de cefalópodos .....	3
3. Biología del pulpo común, <i>Octopus vulgaris</i> (Cuvier, 1797) .....	7
4. Descripción morfológica .....	10
5. Descripción anatómo-fisiológica .....	12
6. El pulpo de acuicultura en España .....	15
7. Características generales de la acuicultura del pulpo .....	16
8. Lípidos .....	20
9. Proteínas. Enzimas digestivas .....	35
10. Bibliografía .....	41
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
<b>III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>51</b>
1. EFECTO DE TRES DENSIDADES DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA SUPERVIVENCIA DE <i>Octopus vulgaris</i> (CUVIER, 1797). .....	52
1.1. Resumen .....	52
1.2. Introducción .....	53
1.3. Material y métodos .....	54
1.4. Resultados .....	57
1.5. Discusión .....	61
1.6. Conclusión .....	65
1.7. Agradecimientos .....	65
1.8. Referencias bibliográficas .....	66
2. USO DE PRESAS ALTERNATIVAS (CANGREJO DE RÍO, <i>Procambarus clarkii</i> , Y MERLUZA, <i>Merluccius gayi</i> ) PARA EL CULTIVO DE <i>Octopus vulgaris</i> (CUVIER, 1797). .....	69
2.1. Resumen .....	69
2.2. Introducción .....	70
2.3. Material y métodos .....	72
2.4. Resultados .....	78
2.5. Discusión .....	83
2.6. Conclusión .....	86
2.7. Agradecimientos .....	86
2.8. Referencias bibliográficas .....	87

3. EFECTOS DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNAS DE PESCADO (CPSP®) SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE <i>Octopus vulgaris</i> (CUVIER, 1797) JUVENILES.	91
3.1. Resumen	91
3.2. Introducción	92
3.3. Material y métodos	93
3.4. Resultados	99
3.5. Discusión	114
3.6. Conclusión	119
3.7. Agradecimientos	120
3.8. Referencias bibliográficas	120
4. EFECTO DE DIETAS ARTIFICIALES SOBRE EL CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA, BALANCE ENERGÉTICO Y COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA Y MANTO DEL PULPO COMÚN, <i>Octopus vulgaris</i> (CUVIER, 1797).	124
4.1. Resumen	124
4.2. Introducción	125
4.3. Material y métodos	127
4.4. Resultados	137
4.5. Discusión	150
4.6. Conclusión	155
4.7. Agradecimientos	156
4.8. Referencias bibliográficas	157
5. COMPOSICIÓN LIPÍDICA EN MANTO Y GLÁNDULA DIGESTIVA DE JUVENILES DE <i>Octopus vulgaris</i> (CUVIER, 1797) EXPUESTOS A UN AYUNO PROLONGADO.	160
5.1. Resumen	160
5.2. Introducción	161
5.3. Material y métodos	162
5.4. Resultados	166
5.5. Discusión	177
5.6. Conclusión	182
5.7. Agradecimientos	182
5.8. Referencias bibliográficas	183
6. COMPOSICIÓN PROTEICA Y EN AMINOÁCIDOS DEL MANTO DE <i>Octopus vulgaris</i> JUVENILES EXPUESTOS A UN AYUNO PROLONGADO.	188
6.1. Resumen	188
6.2. Introducción	189
6.3. Material y métodos	191

6.4. Resultados .....	193
6.5. Discusión .....	197
6.6. Conclusión .....	202
6.7. Agradecimientos .....	202
6.8. Referencias bibliográficas .....	203
7. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA PARCIAL DE JUGO GÁSTRICO Y GLÁNDULA DIGESTIVA DE <i>Octopus vulgaris</i> .....	208
7.1. Resumen .....	208
7.2. Introducción .....	209
7.3. Material y métodos .....	212
7.4. Resultados .....	218
7.5. Discusión .....	229
7.6. Conclusión .....	234
7.7. Referencias bibliográficas .....	235
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>239</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>243</b>
<b>VI. ANEXOS .....</b>	<b>262</b>
1. LISTA DE FIGURAS .....	263
2. LISTA DE TABLAS .....	266
3. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....	268
4. BECAS Y PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN .....	271
5. ASISTENCIA A REUNIONES Y ESTANCIAS REALIZADAS .....	272



# INTRODUCCIÓN

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Cefalópodos

La Clase Cephalopoda (Cuvier, 1797) pertenece al Filo Mollusca, hecho por el cual comparte ciertas características anatómicas con gasterópodos, bivalvos y otros moluscos. Los cefalópodos aparecieron por primera vez hace alrededor de 500 millones de años, en el período Cámbrico (Paleozoico) (Smith & Caron, 2010). En el registro fósil se cuenta con conchas externas características de los cefalópodos más primitivos, que datan de principios del periodo Silúrico de la misma era (Boyle, 1991). Durante la historia geológica, estos animales han sido, en varias ocasiones, depredadores muy importantes y especies dominantes en los océanos (Young *et al.*, 2010).

Los cefalópodos son considerados como la clase de moluscos más activa y especializada. La gran mayoría son carnívoros, de vida pelágica, con gran movilidad, depredadores voraces y, salvo excepciones, sólo capturan presas vivas. La Clase Cephalopoda se compone de moluscos marinos, con simetría bilateral, celoma bien desarrollado y concha externa (reducida en las especies más actuales). Poseen una rádula (estructura especializada en raspar el alimento) situada dentro de mandíbulas quitinosas, un anillo de apéndices prensiles alrededor de la boca, 1 ó 2 pares de branquias, y el agua que circula en la cavidad del manto es expulsada a través de un conducto ventral mediante propulsión a chorro. Los cefalópodos poseen un sistema nervioso central, los sentidos muy desarrollados y un comportamiento bastante complejo. Los sexos son separados, la fecundación interna, el esperma es contenido en complejos espermatóforos, los huevos son grandes y el desarrollo directo (no veliger) (Boyle, 1991). En la actualidad existen dos grupos de cefalópodos:

Subclase Nautiloidea (Agassiz, 1847), formada por cefalópodos con concha externa. Familia Nautilidae (Blainville, 1825) a la que pertenece, por ejemplo, *Nautilus pompilius* (Linnaeus, 1758).

Subclase Coleoidea (Bather, 1888), formada por unas 700 especies entre las que se encuentran los calamares, las sepias y los pulpos. El manto es muscular y forma un saco que envuelve las vísceras. Poseen concha interna y reducida, un par de branquias y riñones, la cavidad del manto es grande, suelen presentar un saco de tinta, la piel contiene órganos con pigmentos (cromatóforos) y poseen un control neuromuscular variable (Boyle, 1991).

## I.2. Pesquería de Cefalópodos

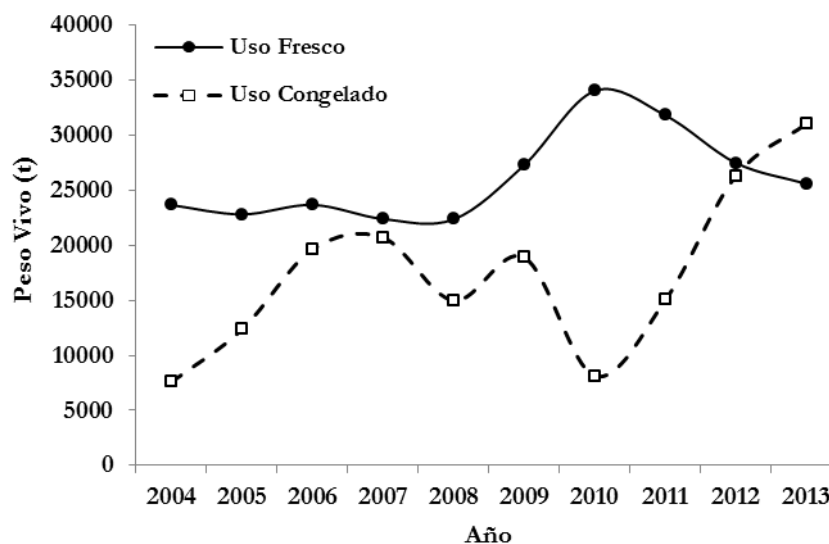
La pesquería de cefalópodos surgió como consecuencia de la sobreexplotación de los espáridos (García-Cabrera, 1968). Dentro de los recursos pesqueros de elevado interés comercial y contenido proteico, destacan los cefalópodos. Así, por ejemplo, el pulpo presenta un alto índice de aprovechamiento que llega al 85 % de su peso. La mayor parte es proteína y sólo un 3 % es grasa (Hernández-López, 2000).

España, Italia y Japón son los mayores consumidores e importadores de cefalópodos como calamares, sepias y pulpos. Tailandia es el mayor exportador de calamares y sepias seguido de España, China y Argentina, mientras que Marruecos y Mauritania son los principales exportadores de pulpo. En 2008 la proporción de cefalópodos (calamares, sepias y pulpos) en el comercio mundial de pescado fue del 4 % y las capturas anuales totales de cefalópodos fueron bastante estables, con unos 3,6 - 3,8 x 10<sup>6</sup> toneladas métricas (tm) (FAO, 2008). Por el contrario, el año 2009 se caracterizó por unas capturas reducidas de calamares en todo el mundo y un aumento de sus precios. A diferencia de ello, la oferta de pulpo fue notable y sus precios reducidos (FAO, 2010).

El pulpo común es una de las especies de cefalópodos de mayor interés comercial a escala mundial. Según Estadísticas Pesqueras (Noviembre, 2013), las capturas por buques españoles de calamares, jibias y pulpos para consumo humano en fresco fueron de 34.035 tm (peso vivo), 31.813 tm y 27.486 tm para 2010, 2011 y 2012, respectivamente. Y para 2013 de 25.594 tm (Estadísticas Pesqueras, Abril, 2015). Para consumo humano pero congelado, los valores fueron 8.128 tm, 15.021 tm y 26.298 tm en 2010, 2011 y 2012, y 31.054 tm en 2013, respectivamente.

A partir del 2009, la crisis económica mundial afectó al mercado europeo de cefalópodos. Así, hechos como un menor volumen de turistas en el sur de Europa provocó una menor demanda de cefalópodos. Además, a pesar de las limitaciones en los suministros, los precios no aumentaron. En el mercado japonés se observó la situación inversa, ya que la crisis económica dio lugar a más turismo en el propio país, siendo el pulpo el principal beneficiario de la buena demanda (Globefish, 2009). Los mercados de cefalópodos que sufrieron más por la crisis fueron el del calamar, cuya oferta mundial disminuyó en 2009, y el del pulpo, cuyo precio de mercado se redujo en los primeros meses de 2009. Las importaciones de pulpo desde países como Japón, Italia o España también disminuyeron a principios de 2009, manteniéndose e incluso ampliándose las exportaciones desde Mauritania y Marruecos (Globefish, 2009). En España, la demanda fue baja en 2009

y el precio de especies de alto valor económico como el pulpo se redujo drásticamente en el transcurso del año. Las importaciones de pulpo también disminuyeron en el primer semestre de 2009 a 22.900 tm, 5.500 tm menos que en 2008 (Globefish, 2009).



**Figura I.1** Captura por buques españoles de calamares, jibias y pulpos. Peso vivo (t, toneladas) para uso en fresco y congelado desde 2004 a 2013. Fuente: [www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/](http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/)

En 2010 disminuyeron las importaciones japonesas de pulpo, tendencia que continúa en 2011. A principios de 2011, las importaciones japonesas de pulpo cayeron más del 16 %, a sólo 6.200 tm. La reducción de capturas en países como Mauritania y Marruecos parece ser la principal causa de este problema. Así, las exportaciones de Marruecos a Japón disminuyeron drásticamente en el primer trimestre de 2011, de 2.500 tm en el mismo periodo de 2010 a sólo 300 tm en 2011. En Mauritania la situación se mantuvo estable, con 2.000 tm exportadas. Por el contrario, las exportaciones chinas de pulpo a Japón crecieron casi un 18 % a principios de 2010, situando a China como país proveedor al mismo nivel que Mauritania. Aunque los precios disminuyeron en 2010, comenzaron a recuperarse en 2011 (Globefish, 2011). España también ha sufrido la disminución en capturas, especialmente de su principal proveedor, Marruecos. A principios de 2011, las exportaciones marroquíes disminuyeron en 1.800 tm, casi un 28 % en comparación con el mismo período del año anterior. En 2010, las importaciones totales españolas también decrecieron un 16,6 % respecto 2009. En Italia, al contrario que en España y Japón, Marruecos y Mauritania sólo representan una pequeña parte de las importaciones, siendo más importantes proveedores como México, Túnez e Indonesia. Este hecho puede



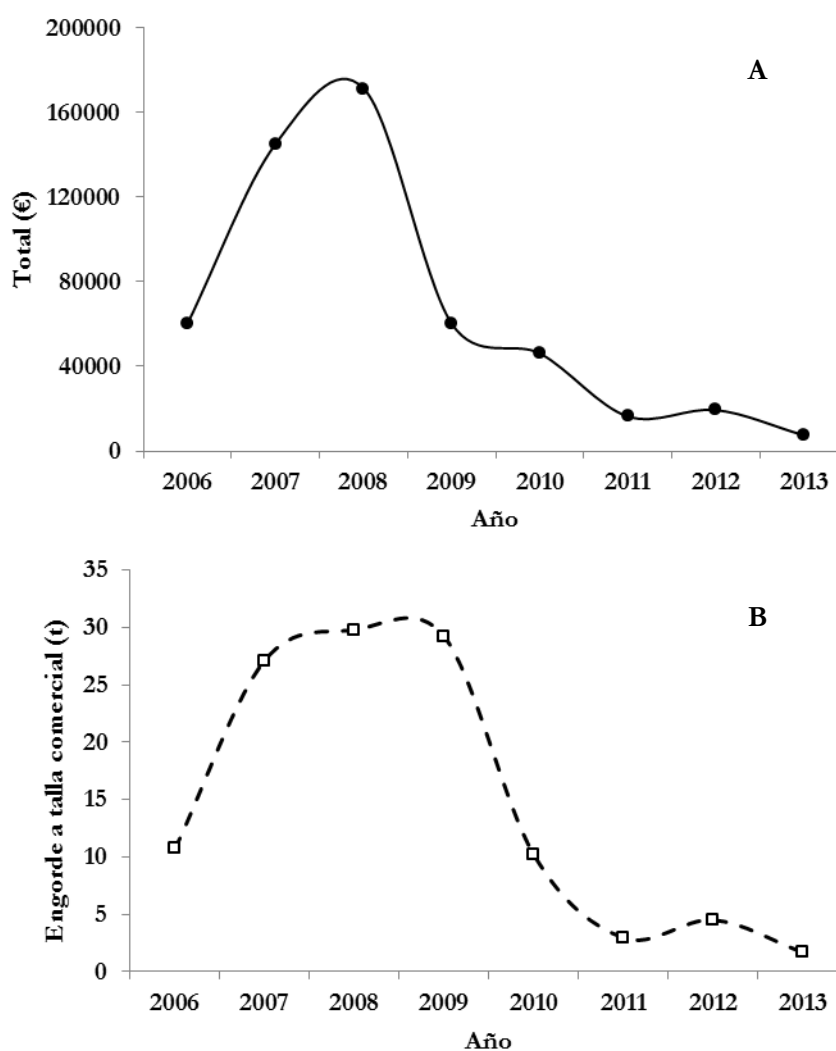
suponer la principal razón por la que Marruecos y Mauritania han reducido sus capturas y, por tanto, sus exportaciones a países como España y Japón (Globefish, 2011).

Aunque durante 2011 y 2012 el comercio del pulpo tuvo problemas debido principalmente a su suministro, el volumen de importación de los principales mercados se mantuvo relativamente estable. Las importaciones de Japón (38.400 tm) cayeron un 14 % en comparación con el año anterior logrando mantener su posición tanto Mauritania como Marruecos. Las importaciones españolas de pulpo se redujeron ligeramente en un 1,7 % durante 2011 manteniéndose Marruecos como su principal proveedor, aunque las importaciones procedentes de Mauritania se incrementaron en un 34 %. Para el mercado italiano, en 2011 las importaciones aumentaron un 10 % respecto al año anterior. España fue su principal proveedor y hubo un aumento significativo en las procedentes de Indonesia, Senegal y Túnez, mientras que disminuyeron las de Mauritania y Marruecos (Globefish, 2012).

La crisis económica de los últimos años ha afectado a la venta de cefalópodos en Europa, donde las importaciones se han reducido. Así, aunque la UE afirma que las poblaciones del noroeste de África están sobre-explotadas, las exportaciones de pulpos desde Marruecos y Mauritania han aumentado. Esta situación un tanto ambigua parece responder a un posicionamiento político en el que los intereses chinos se están moviendo en el sector de pulpo mauritano. Por otra parte, el mercado japonés se ha ido recuperando durante 2012. La importación española de pulpo en 2012 se redujo en un 12,3%, consecuencia del estado de la oferta y del estado de la economía del país. Sus principales proveedores fueron Marruecos, Mauritania y Portugal. Finalmente, parece que los precios del pulpo se han estabilizado tanto en Japón como en Europa y se espera que dicha estabilidad continúe durante algún tiempo (Globefish, 2013).

Respecto a los últimos datos, 2014 fue un año extraordinario para la producción de pulpo. La producción total de pulpo se elevó a cerca de 370.000 toneladas, que es el nivel más alto desde 2009. El principal productor fue China (120.000 tm), seguido por Japón (35.000 tm) y México (34.000 tm). La región de Yucatán, en México, es el principal productor de pulpo del país con un total de 24.527 tm capturadas en 2014 tanto de *Octopus maya* como de *O. vulgaris*. De la producción total, aproximadamente el 70% se exporta a la UE (principalmente España e Italia), mientras que el resto se consume en gran medida a nivel local y una pequeña cantidad se envía a Japón. Los principales proveedores de Japón (Marruecos y Mauritania) redujeron entre 30 – 50% los desembarques siendo la gran beneficiada China, que aumentó sus desembarques a Japón un 23%. Las importaciones de

pulpo italianos aumentaron un 9% en 2014, a 46.200 tm. El principal proveedor en 2014 fue Marruecos (21%) seguido de España con 7.500 toneladas (16,2%) y México (11%). España también aumentó sus importaciones de pulpo en 2014, de 41.800 tm en 2013 a 44.200 tm en 2014 (+ 5,7%). El principal proveedor fue Marruecos, 18.900 tm - 42,8%, seguido por Mauritania (7.200 tm - 16%) y Portugal (6.400 tm - 14,5%). Cabe destacar que en la última década, EEUU ha aumentado sus importaciones de pulpo. Desde unas 13.000 tm en el año 2000 a casi 20.000 tm en 2014. Las perspectivas en el mercado del pulpo son buenas en cuanto a producción, principalmente en Japón, con lo que se espera una mejora considerable en los precios (Globefish, 2015).



**Figura I.2** Acuicultura en España de *Octopus vulgaris* (Cultivo en jaulas) desde 2006 a 2013. A. Cantidad total en euros (€) al año por la producción de pulpo común. B. Engorde de pulpo común a talla comercial en toneladas (t) al año.

Ante la situación de crisis económica en la pesquería de cefalópodos durante los últimos años, existen noticias alentadoras para que en un futuro cercano el cultivo en cautividad de algunas especies como el pulpo se haga realidad. Así, a escala mundial, se está desarrollando un proyecto mediado por las autoridades de Honduras y la Universidad Nacional Autónoma de México (Globefish, 2011). También en Yucatán, se están desarrollando importantes investigaciones relacionadas con el cultivo de *O. maya*, produciéndose importantes avances en los últimos años tanto en el diseño de tanques de engorde como en el desarrollo de una dieta que hace posible su cultivo hasta unos 250 gr, tamaño aceptable para el mercado mexicano (Globefish, 2015). El pulpo *O. vulgaris* posee un gran potencial para el cultivo, aunque los intentos a nivel industrial para conseguir su cultivo integral no se han conseguido aún debido, principalmente, a la alta mortalidad larvaria (Iglesias *et al.*, 2004). No obstante, sí tienen éxito los procesos de engorde en cautividad a partir de juveniles procedentes de la pesquería (Chapela *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2006; Domingues *et al.*, 2010). De hecho, según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, [http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/planes\\_nacionales/Listado\\_planes.aspx?Id=es](http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/planes_nacionales/Listado_planes.aspx?Id=es), en España se posee un enorme interés por su cultivo como así demuestran los Planes Nacionales sobre pulpo existentes desde 1996: Cultivo larvario y juvenil del pulpo (1997), Desarrollo de experiencias encaminadas a la cría experimental de pulpo (1996-1997), Cultivo integral del pulpo en el Mediterráneo: Reproducción y Cultivo larvario (1999) y Preengorde-Engorde (1999), Aclimatación y engorde de pulpo (1999), Cultivo de Pulpo (2001-2003), Optimización del engorde de Pulpo (2007-2011) y Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos de pulpo (2010-2013).

### **I.3. Biología del pulpo común, *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797)**

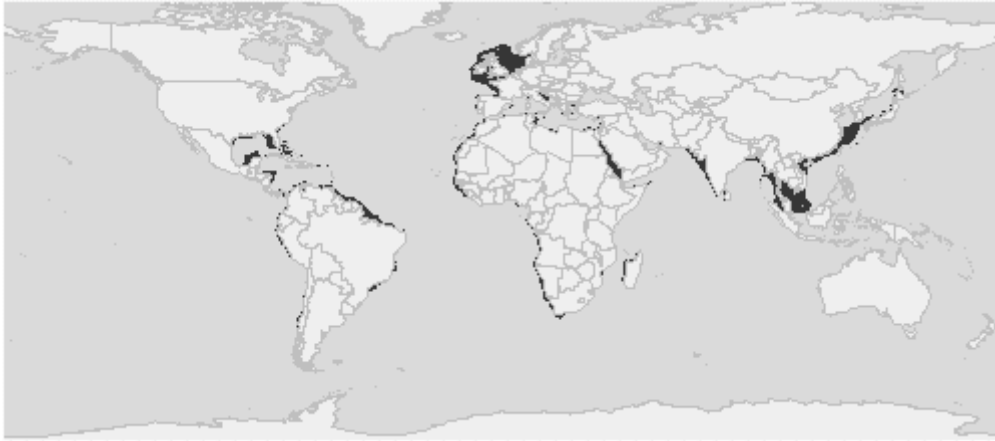
El pulpo común *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) es uno de los cefalópodos más conocidos y uno de los mejor estudiados en áreas como crecimiento, cultivo, biología, comportamiento, fisiología y reproducción (Mangold, 1983; O'Dor & Wells, 1987; Wells, 1990; Portner & O'Dor, 1994; Hanlon & Messenger, 1996; Cagnetta & Sublimi, 2000; Vaz-Pires *et al.*, 2004). En la Tabla I.1 se describe la identidad taxonómica de esta especie, según Sweeney & Roper (2001) y Young *et al.* (2010).

*O. vulgaris* es una especie bentónica y nerítica que habita zonas que abarcan desde la línea de costa, en la zona intermareal, hasta el borde de la plataforma continental (de 0 a 200 m) (Vaz-Pires *et al.*, 2004). Suele vivir en aguas poco profundas, desde 0 a 20 m de profundidad (Roper *et al.*, 1984). Se pueden encontrar en distintos ecosistemas como zonas rocosas, praderas de fanerógamas, charcos intermareales, arenales o zonas fangosas de fondos planos y abiertos. Esta especie posee un óptimo de temperatura alrededor de 16 - 21 °C (Aguado-Giménez & García-García, 2002) y suele vivir en aguas con una salinidad en torno a 32 - 40 g l<sup>-1</sup> según la región que habite (Guerra, 1992).

**Tabla I.1** Identidad taxonómica de *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797).

Categoría taxonómica	Taxón	
Reino	Animalia	Linnaeus, 1758
Filo	Mollusca	Linnaeus, 1758
Clase	Cephalopoda	Cuvier, 1797
Subclase	Coleoidea	Bather, 1888
Superorden	Octopodiformes	Young <i>et al.</i> , 1998
Orden	Octopoda	Leach, 1817
Suborden	Incirrata	Grimpe, 1916
Familia	Octopodidae	Orbigny, 1840
Subfamilia	Octopodinae	Grimpe, 1921a
Género	Octopus	Cuvier, 1797
Especie	<b><i>Octopus vulgaris</i></b>	<b>Cuvier, 1797</b>

Es un cefalópodo muy abundante. Para un gran número de autores como Quetglas *et al.* (1998), esta especie vive en aguas tropicales y subtropicales de los Océanos Atlántico, Índico y Pacífico y en aguas del Mar Mediterráneo. Dicha distribución ha sido cuestionada por otros autores como Guerra (1982) y Mangold (1998). Así, Mangold (1998) cree que esta especie se distribuye sólo por aguas del Océano Atlántico, Mar Mediterráneo y Mar Negro. Datos genéticos más recientes han permitido determinar que *O. vulgaris* está presente en aguas del Mar Mediterráneo, el Océano Atlántico este y oeste y en aguas de Taiwán y Japón en el Pacífico noroeste (Warnke *et al.*, 2004). En definitiva, actualmente su distribución geográfica no está completamente descrita (Otero-Villar, 2006).



**Figura I.3** Distribución mundial del pulpo común *Octopus vulgaris*. Fuente: [http://www.geoportal.org/web/guest/geo\\_home?cache\\_control=0](http://www.geoportal.org/web/guest/geo_home?cache_control=0).

Los pulpos poseen un sistema nervioso muy bien organizado que les permite tener comportamientos complejos de aprendizaje. Suelen ser animales solitarios con un comportamiento territorial, no muy desarrollado en juveniles (Hernández-López, 2000). Se puede considerar que la maduración sexual marca el final de la fase juvenil y el inicio del comportamiento adulto y territorial (Mangold & Boletzky, 1973). Los adultos se agregan sólo en períodos reproductivos, en zonas de aguas someras, para llevar a cabo la fecundación (Hernández-López, 2000). Pueden ser descritos como animales exploradores y oportunistas (Mather & O'Dor, 1991).

Son animales carnívoros (Lee *et al.*, 1994) y depredadores activos (Boletzky & Hanlon, 1983). Su dieta se compone principalmente de crustáceos y moluscos y, en menor medida, de peces y otros invertebrados (Nigmatulin & Ostapenko, 1976; Guerra, 1978; Guerra & Nixon, 1987) como gasterópodos, poliquetos e incluso cefalópodos, incluyendo así el canibalismo. Su alimentación depende de diversos factores como la temperatura (Aguado-Giménez & García-García, 2002) y el área geográfica en el que se encuentren (Hanlon & Messenger, 1996). Prefiere las presas vivas siendo el ataque muy rápido y característico (Guerra, 1978; Wells, 1978). Existen diversas situaciones donde la alimentación de *O. vulgaris* puede interrumpirse. Así, durante el desove las hembras se ocupan por completo de la puesta y no se alimentan; el apareamiento puede afectar a la alimentación y el crecimiento; y la competición con otros predadores puede disminuir la disponibilidad de presas y, por tanto, reducir su crecimiento (Hernández-López, 2000).

*O. vulgaris* se caracteriza por presentar un ciclo de vida corto, en torno a 10 - 18 meses (Vaz-Pires *et al.*, 2004), con mayor longevidad los machos ya que las hembras al final del

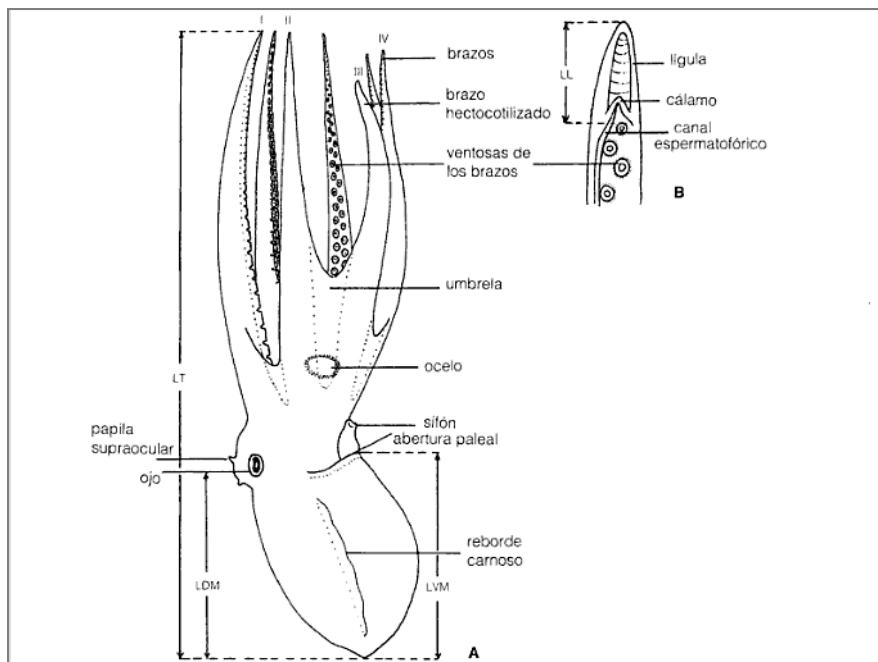
periodo de incubación de los huevos perecen (Seixas, 2009). La edad máxima a la que puede llegar es de dos años (Mangold, 1997). También se caracteriza por presentar una tasa de reproducción muy alta (Mangold, 1983; Iglesias *et al.*, 1997), una tasa de conversión del alimento del 40 al 60 % (Mangold & Boletzky, 1973; Wells, 1978; Mangold, 1983; Smale & Buchan, 1981), tasas de crecimiento rápidas (3 % pc día<sup>-1</sup>) (Mangold & Boletzky, 1973; Mangold, 1983; Aguado-Giménez & García-García, 2002; Iglesias *et al.*, 2006; 2007), un contenido proteico en torno a 70 - 90 % de su composición corporal, en peso seco (Lee, 1994), y una alta fecundidad, con 100.000 a 500.000 huevos por hembra (Mangold, 1983; Iglesias *et al.*, 1996; 1997; 2000).

#### **I.4. Descripción morfológica**

El cuerpo de los cefalópodos se puede separar en dos regiones: la anterior (cefalopodio) que consta de la cabeza con dos ojos esféricos, una corona de ocho brazos alrededor de la boca y un sifón; y la parte posterior (visceropáleo), que está compuesta por un saco muscular o manto que forma una cavidad donde se alojan las vísceras y las branquias (Guerra, 1992). *O. vulgaris* es un animal de tamaño medio - grande (Longitud dorsal del manto: 20 - 250 mm en machos, 20 - 200 mm en hembras) que puede alcanzar 2 - 3 kg de peso en estado adulto, aunque existen datos sobre individuos con más peso (hasta de 15 kg). El manto posee forma oval y sacciforme, siendo más ancho en la mitad posterior del cuerpo y con una abertura paleal que sobrepasa los bordes laterales del cuerpo. Presenta la cabeza más estrecha que el manto y, por lo general, las extremidades laterales son algo más cortas que las centrales. Sus brazos son largos y robustos, disminuyendo hasta reducirse en puntas redondeadas. Se unen entre sí por una membrana y constan de dos filas de ventosas en su cara interna (Mangold, 1998; Hernández-López, 2000). Las ventosas son móviles y de tamaño mediano. Entre las ventosas 15 – 19 de los brazos laterales de ambos sexos aparecen de dos a tres ventosas ampliadas (Mangold, 1998). Los brazos derecho e izquierdo del mismo par son generalmente de igual longitud excepto el tercer brazo derecho hectocotilizado de los machos, que es más corto y se modifica como adaptación a la cópula. El hectocotilo es un canal espermatofórico que corre por todo el brazo y termina en su punta en una estructura con forma de cuchara, la lígula (Guerra, 1992). El sifón, embudo cónico situado en la parte posterior de la cabeza, es alargado y su abertura relativamente estrecha (Mangold, 1998). Este órgano participa en el movimiento mediante propulsión a chorro y en la respiración, además de ser vía de paso para la tinta, la orina, los

excrementos, los huevos y las sustancias que se emplean para formar sus envolturas externas (Guerra, 1992).

La piel de *O. vulgaris* posee una estructura compleja. Consta de epitelio externo, donde se localizan tres tipos de células con pigmentos (cromatóforos, iridóforos y leucóforos); una túnica externa con abundantes fibras de colágeno; una capa muscular formada por tres tipos de músculos (longitudinales, radiales y circulares) que participan en la respiración y en el movimiento mediante propulsión a chorro; una fina capa de tejido conjuntivo con nervios y vasos sanguíneos; y una túnica interna (Guerra, 1992). Los cromatóforos actúan concentrando o extendiendo pigmentos de diferentes colores, mientras que los iridóforos y leucóforos reflejan y refractan la luz. El pulpo posee al nacer 65 cromatóforos, pudiendo llegar en un año hasta 1 ó 2 millones (Packard & Sanders, 1969). Presenta un mayor número de cromatóforos en la superficie dorsal que en la ventral (Ferguson & Messenger, 1991). Las variadas combinaciones posibles entre estos pigmentos y el alto control nervioso permiten al pulpo cambiar de color rápidamente.



**Figura I.4** A: Visión lateral de un octópodo incirrado. B: Región distal del hectocotilo de un octópodo incirrado. LT: Longitud total; LDM: Longitud dorsal del manto; LVM: Longitud ventral del manto; LL: Longitud de la ligula (según Okutani *et al.*, 1987). Fuente: Guerra, 1992.

## I.5. Descripción anatomo - fisiológica

El sistema respiratorio consta de dos branquias bien vascularizadas, suspendidas en la cavidad del manto. El agua fluye entre las laminillas de cada branquia en dirección opuesta al flujo de la sangre a través de los tejidos, un sistema a contra-corriente que maximiza el intercambio de gases (Wells & Wells, 1982). Las branquias transfieren el oxígeno del agua a la circulación sanguínea y después a la hemocianina, pigmento transportador de oxígeno de la sangre, con cobre en su centro activo y responsable del color azul de la sangre de estos animales (Hernández-López, 2000).

El sistema circulatorio es cerrado. La sangre oxigenada procedente de las branquias es recogida por el corazón arterial a través de sus dos aurículas. Ésta se dirige al ventrículo de donde es distribuida por todos los tejidos mediante la red de vasos sanguíneos. La sangre de retorno, no oxigenada, se recoge en la vena cava anterior. Dicha vena se divide en dos venas cavas laterales que dirigen la sangre hacia los dos corazones branquiales, cuya función es la de bombear la sangre de nuevo al sistema capilar de las branquias (Hernández-López, 2000).

La excreción se produce directamente desde las células digestivas al lumen del intestino o a través del tejido excretor que rodea la vena cava lateral. Cerezo *et al.* (2003) observó que, en comparación con otras especies como la lubina (*Dicentrarchus labrax*) o la dorada (*Sparus aurata*), la excreción de amonio por peso corporal en los pulpos es elevada. La orina es isosmótica (D'Aniello *et al.*, 1986).

El sistema nervioso de los pulpos está altamente desarrollado. Consta de los ganglios típicos de moluscos pero mejor y en mayor grado fusionados creando así el encéfalo o cerebro del pulpo, localizado en la región cefálica. La complejidad del sistema nervioso de los cefalópodos rara vez es conseguida en otros invertebrados, catalogándose a los pulpos como los invertebrados más inteligentes, con una gran memoria e incluso capacidad de aprendizaje. A diferencia de los vertebrados, en los pulpos el conocimiento se aprende durante la vida del animal y no se adquiere de sus progenitores, pues las hembras mueren cuando nacen las paralarvas y los machos no cuidan de las crías.

El pulpo posee todos los órganos de los sentidos muy desarrollados, excepto el oído. El sentido del tacto está particularmente desarrollado en las ventosas de los brazos, donde se pueden localizar células quimiorreceptoras y táctiles. El principal órgano de los sentidos en los cefalópodos son los ojos, destacando en los pulpos la visión tan desarrollada que

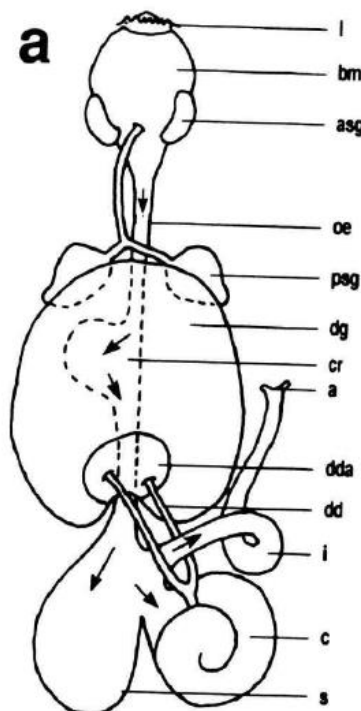


poseen. Los ojos son muy parecidos al de los peces y con una estructura común a la de mamíferos: iris, cristalino, retina, córnea y párpados (Hernández-López, 2000).

Los pulpos tienen sexos separados. Por ello, el sistema reproductor de los machos produce espermatozoides que son almacenados en los espermatóforos hasta que son introducidos en el oviducto de las hembras a través del hectocótilo. El sistema reproductor de las hembras lo forma los ovarios donde se producen los ovocitos. Las glándulas nidamentarias de la hembra recubren los huevos fecundados (2,5x1 mm) con unas estructuras de protección. Luego los distribuye en su refugio en forma de racimos y los cuida, limpia y oxigena hasta su eclosión. La duración del desarrollo embrionario depende de la temperatura del agua. Suele durar 125 días a 13 °C y 20 - 25 días a 25 °C. Los paralarvas de pulpos recién eclosionadas (manto, 2 mm) forman parte del plancton durante un tiempo también dependiente de la temperatura del agua. Después de unos 40 - 55 días (a 21 °C) pasan a ser bentónicas (Villanueva *et al.*, 1995).

Los cefalópodos poseen un sistema digestivo completo que consta de cavidad bucal, esófago, estómago, intestino y ano (Figura I.3). En la cavidad bucal se localizan el pico y las glándulas salivares anteriores, extrabulbares, y de la misma parten un par de glándulas salivares posteriores. En las anteriores parece ser que se producen enzimas proteolíticas además de mucus; en las posteriores se sintetizan también enzimas proteolíticas junto con quitinasas, cefalotoxinas y aminos biógenas. En el esófago, cuya función es transportar el alimento hacia el estómago, se encuentra el crop o buche, donde se almacenan los alimentos intactos o predigeridos. Al estómago, lugar donde ocurre la digestión mecánica y enzimática, desembocan las secreciones procedentes de la glándula digestiva o hepatopáncreas. Esta glándula parece llevar a cabo diferentes funciones como son la síntesis de enzimas digestivas, la absorción de nutrientes y el almacenamiento de lípidos durante un corto espacio de tiempo (Mangold & Young, 1998). La glándula digestiva está unida a un apéndice, conocido como el “páncreas”, de donde parten dos conductos digestivos que llegan hasta el ciego. De esta forma la glándula digestiva está conectada con el estómago permitiendo que las sustancias ingeridas pasen del estómago al intestino o a la glándula a través de los conductos, o a la inversa (Domingues *et al.*, 2004). El intestino posee una zona en forma de espiral donde se localiza el ciego, y finaliza en el ano. En el intestino se almacenan y eliminan las heces, y en el ciego se han observado diferentes funciones como la producción de enzimas, la absorción de nutrientes, el almacenamiento de nutrientes en las últimas etapas de la digestión y la eliminación de partículas no digeribles (Mangold & Young, 1998).

El tracto digestivo tiene forma de U. La rama descendente está formada por la cavidad bucal y el esófago. Éste se sitúa en la cara dorsal de la glándula digestiva. El estómago y el ciego se localizan en la curva de la U. La rama ascendente está formada por el intestino y el ano. El intestino se sitúa en la parte ventral de la glándula digestiva y el ano se localiza en posición posterior al sifón. La tinta de los pulpos es liberada de una bolsa situada en una pared de la glándula digestiva, que desemboca al exterior mediante un conducto no muy alejado del ano (Bidder, 1966; Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983; Mangold & Young, 1998; Domingues *et al.*, 2004).



**Figura I.5** Órganos del sistema digestivo de *Octopus vulgaris*. Abreviaturas: a, ano; asg, glándulas salivares anteriores; bm, masa o cavidad bucal; c, ciego; cr, buche o crop; dd, conductos digestivos; dda, apéndice de los conductos digestivos; dg, glándula digestiva; i, intestino; l, pico; oe, esófago; psg, glándulas salivares posteriores; s, estómago. Las flechas indican el flujo de las partículas sólidas en el tracto digestivo. Fuente: Mangold & Young, 1998

## I.6. El pulpo de acuicultura en España

Los moluscos y el hombre se han visto ligados desde antes del nacimiento de las civilizaciones, ya que el hombre los ha usado como alimentos, armas, herramientas e incluso como instrumentos musicales. En la medida en que las civilizaciones se hicieron más complejas, aumentó la especialización en sus usos (Montolio-Fernández & Serrano-Jerez, 2006). La acuicultura más antigua que se conoce es la llevada a cabo con los moluscos (ostricultura) en China hacia el año 460 a.C., teniendo constancia de dicha práctica en Europa en el momento de la ocupación romana en el año 237 a.C. (Corral *et al.*, 2000). De igual forma es conocido el consumo de pulpo e incluso el diseño de métodos para su engorde desde la época de ocupación romana en España, hace más de 2000 años (Fernández-Pérez, 2005). Así, los romanos mantenían a los pulpos en caletas resguardadas donde los alimentaban hasta su posterior consumo (Rocha, 2003).

Los intentos de efectuar cultivos de cefalópodos se vienen realizando desde hace mucho tiempo, pero sólo a partir de mediados del siglo XX se da la tecnología necesaria para completar el ciclo de vida de los cefalópodos en cautividad realizándose verdaderos cultivos de estas especies (Rocha, 2003). En la década de los sesenta se consiguen en Japón los primeros cultivos con éxito de *O. vulgaris* (Itami *et al.*, 1963), donde se obtuvieron 31 juveniles bentónicos en 33 días a 24,7 °C y con un 5 % de supervivencia a los 60 días. Durante la década de los 80 se llevaron a cabo, principalmente en Japón, diversos experimentos encaminados principalmente en la obtención de juveniles bentónicos (Imamura, 1990; Hamazaki *et al.*, 1991). Ya en la década de los 90, científicos españoles iniciaron investigaciones sobre *O. vulgaris* en la acuicultura, enfocadas en la cría de paralarvas y también en el crecimiento de sub-adultos capturados del medio marino (Iglesias *et al.*, 2007). El ciclo de vida completo fue conseguido por primera vez en el norte de España (Iglesias *et al.*, 2004).

*Octopus vulgaris* es una especie con alto potencial para la diversificación de la acuicultura. El engorde industrial del pulpo comenzó en Galicia, al noroeste de España, en 1996 llegando a una producción de 12 tm en 1997. El interés por el pulpo surgió a partir de resultados obtenidos sobre el cultivo de la especie por investigadores del Instituto Español de Oceanografía, IEO (Iglesias *et al.*, 1997), donde se comprobó que juveniles de 750 g alcanzaban el tamaño comercial de 2,5 - 3 kg en sólo 4 meses y se consiguieron buenos resultados relativos a la obtención de puestas bajo condiciones de cautividad y altas tasas de crecimiento con ejemplares juveniles confinados en tanques y jaulas (incrementos en peso

húmedo de 0,5 a 1 kg / mes), y de la Universidad de Santiago (Rama-Villar *et al.*, 1997), dando lugar a la concesión de varios permisos de explotación pioneras en España, ubicadas en las Rías Bajas gallegas (García-García *et al.*, 2004).

En estas empresas se llevaron a cabo experiencias de cultivo industrial de pulpo en tanques de cemento, estanques en tierra, bateas e incluso jaulas, con circuito abierto o semicerrado, a distintos volúmenes, densidades y tiempos de cultivo, y con o sin refugios, entre otras características. Se obtuvieron resultados preliminares de interés que marcan muchas de las características generales necesarias para la acuicultura del pulpo.

El engorde de esta especie sigue siendo frecuente en Galicia (Rodríguez *et al.*, 2003), cuya producción máxima anual fue de 27,1 tm durante el 2007 (Estadísticas Pesqueras, Diciembre, 2008). Pero debido a que su cultivo posee una alta dependencia de juveniles capturados en el medio marino y a la ausencia de una dieta artificial apropiada, el desarrollo de un sólido e importante cultivo comercial del pulpo no se ha conseguido aún. Es así como la producción anual mediante engorde de pulpos en Galicia se ve reducida a tan solo 4,5 tm en 2012 (Estadísticas Pesqueras, Abril, 2013). Para ello, los esfuerzos de los investigadores se centran en resolver la alta mortalidad larvaria (Iglesias *et al.*, 2006; 2007) que impide la producción de juveniles, y en la búsqueda de dietas artificiales (Domingues *et al.*, 2007; 2008; Quintana *et al.*, 2008; Cerezo-Valverde *et al.*, 2012; 2013; Estefanell *et al.*, 2012; 2013; 2014; 2015; Morillo-Velarde *et al.*, 2012; Querol *et al.*, 2013; 2014; Vidal, 2014; Rodríguez-Gonzalez *et al.*, 2015) para el engorde industrial de esta especie.

## **I.7. Características generales de la acuicultura del pulpo**

El cultivo del pulpo común puede ser dividido en dos etapas básicas: Etapa desde eclosión hasta juvenil y Etapa de engorde (Rocha, 2003).

### **Etapa desde eclosión hasta juvenil**

Esta fase presenta grandes dificultades técnicas y biológicas. Se puede dividir, a su vez, en cuatro subetapas:

- Obtención y mantenimiento de las puestas: Los pulpos presentan cuidado parental por lo que no debe ser separada la puesta de la madre ya que si es así los huevos se infectan rápidamente. El mantenimiento de la puesta es fácil siempre que se controle factores ambientales como la temperatura y la calidad del agua.
- Eclosión: Suele ocurrir durante varios días en una misma puesta.

- Primera alimentación: Es el paso más difícil ya que en las primeras fases de vida los pulpos sólo aceptan presas vivas y de éstas, la mejor aceptadas son las larvas o zoeas de crustáceos. La mortalidad natural durante la fase planctónica es muy elevada y es debida a diferentes causas como la temperatura y calidad del agua así como el contenido energético, el tamaño, la velocidad de nado y el tipo de presas utilizadas. Pasada esta fase, los pulpos van al fondo haciéndose bentónicos de manera gradual y muestran un manto de 8 – 9 mm, pesan 0,15 gr y sus brazos cuentan con 18 – 20 ventosas. En este momento comienzan a aceptar mezclas de presas vivas y muertas.
- Crecimiento hasta juvenil: Es la fase más fácil manteniéndose buenos niveles de alimento vivo y adaptándose a los nuevos hábitos alimentarios de los pulpos ahora bentónicos.

### **Etapa de engorde**

En esta fase los pulpos que ya adoptan la forma adulta (juveniles) son alimentados hasta llegar al tamaño y peso deseado. El mantenimiento es fácil ya que al ser especies bentónicas y vivir en refugios no necesitan grandes superficies. Sin embargo, al ser territoriales es muy importante tener en cuenta el número máximo de individuos que pueden convivir en un mismo lugar, ya que si éste factor es excesivo ocurren episodios de ataques y canibalismo. Además, la alimentación supone uno de los mayores problemas en el cultivo de esta especie porque aunque aceptan bien determinados alimentos inertes, resulta difícil determinar y lograr una alimentación artificial (pienso) con el que poder, de manera ideal y productiva, cultivar al pulpo a escala industrial.

Vaz-Pires *et al.* (2004) evaluó el potencial del pulpo común para su uso en acuicultura. Para ello, resumió las principales aportaciones realizadas por la comunidad científica que pueden mejorar y/ o definir cómo debe ser el cultivo de *O. vulgaris* en cautividad:

- Ciclo de vida corto (12 - 18 meses).
- Crecimiento rápido, superior al 13 % de su peso corporal por día.
- Tasas de conversión de alimento en torno a 15 - 43 %.
- Fácil y rápida adaptación a la vida en cautividad.
- Gran resistencia al transporte y al estrés en su manipulación.
- Rápida alimentación en tanques.
- Rápida aparición del comportamiento reproductivo.

- Los parámetros de calidad del agua que más fluctúan en sistemas abiertos son temperatura y salinidad. En sistemas cerrados, pH, oxígeno (O<sub>2</sub>), amonio (NH<sub>3</sub>), nitrito (NO<sub>2</sub>) y nitrato (NO<sub>3</sub>).
- Poca tolerancia a niveles bajos de sal ya que son especies marinas estrictas. En la naturaleza viven a unos 35 g l<sup>-1</sup> y su mínimo se encuentra alrededor de 27 g l<sup>-1</sup>.
- Elevada excreción de amonio por peso corporal.
- El consumo de oxígeno tras la ingestión (post-pandrial, tras 6-16 h) aumenta, incluso a valores duplicados a los presentes antes de ser alimentados.
- La temperatura de cultivo debe mantenerse entre 10 - 20 °C para obtener un óptimo crecimiento. En este rango, en los valores superiores de temperatura, el crecimiento aumenta. La temperatura óptima está entre 16 – 21 °C.
- Cuando la hembra desova en cautividad, lo hace en algún refugio (tubo, caja, etc.) donde ubica sus huevos en forma de racimo sobre las paredes. Permanece con la puesta, limpiando, cuidando y oxigenándola hasta que eclosiona. Durante este proceso la hembra no se alimenta y cuando termina, muere por inanición.
- Las hembras maduras producen aproximadamente de 100.000 a 500.000 huevos.
- La temperatura del agua y las condiciones de salinidad, para una ratio 1:1 de machos y hembras en reproducción, se establecen a 13 - 20 °C y 32 - 35 g l<sup>-1</sup>.
- La época de desove depende de la región pero, en general, se pueden observar dos picos de puesta al año: el primero, sobre Abril-Mayo, y el segundo, en Octubre.
- La temperatura es uno de los principales factores ambientales que influyen en la duración del desarrollo embrionario de cefalópodos.
- Es un especie con una fase larvaria planctónica (paralarvas).
- Las paralarvas son muy pequeñas cuando nacen (2 mm de longitud del manto).
- Muy baja supervivencia larvaria, siendo el paso de huevo a sub-adulto un factor limitante para conseguir la acuicultura comercial del pulpo común.
- La temperatura influye en el tiempo que las paralarvas tardan en alcanzar una talla mínima que asegure su supervivencia (>7,5 mm longitud del manto, independientemente de la edad).
- Los requerimientos nutricionales son muy importantes en el estadio paralarvario obteniéndose supervivencia sólo a escala de laboratorio al alimentar a las paralarvas con *Artemia* y zoeas de varios crustáceos.
- Relación entre el perfil de ácidos grasos de la dieta y el de las paralarvas y subadultos de pulpo.

- Una vez que pasan a estado subadulto (bentónico) y, aunque siguen mostrando preferencia por alimento vivo, también aceptan presas muertas como cangrejos, peces o moluscos. A medida que crecen necesitan presas cada vez más grandes.
- Prefieren comer lentamente siendo más activos durante la noche o en oscuridad.
- Regulan la cantidad de alimento ingerido rechazando el exceso de comida
- La humedad de la dieta es una propiedad muy importante que parece afectar a la capacidad de ingestión del pulpo.
- El comportamiento alimenticio es iniciado por estímulos visuales, pero la ingestión depende tanto de características químicas (calidad nutricional de la dieta) como físicas (textura del alimento).
- Tallas iniciales similares para engorde en tanques evitan eventos de canibalismo.
- Densidad inicial no superior a  $10 \text{ kg m}^{-3}$ .
- Cultivo por separado de hembras y machos.
- Mayor crecimiento del pulpo si existe suficiente espacio y libertad de movimiento en el tanque.
- En fase bentónica los pulpos presentan fototaxia negativa y conducta solitaria si en cautividad se respetan estas dos características. De ahí que se recomiende la presencia de refugios en los tanques de cultivo en número similar al de animales.
- Los pulpos pueden cultivarse tanto en tanques de cultivo como en jaulas flotantes presentando buenas tasas de crecimiento y una mortalidad baja.
- Tasa de digestión rápida (12 h a  $18 - 19 \text{ }^\circ\text{C}$ ), dependiente de la temperatura, el sexo y el estado de maduración sexual.
- Metabolismo proteico muy eficiente que conduce a altas tasas de crecimiento. La síntesis proteica presenta tasas altas, la retención de proteína sintetizada es muy eficiente y la degradación proteica muy baja.
- Los machos alcanzan pesos mayores que las hembras debido a que éstas sufren fuertes cambios metabólicos durante la maduración sexual. Sin embargo, antes de la maduración sexual, machos y hembras crecen igual de rápido.
- Las patologías del pulpo en cautividad no son frecuentes.
- Los sistemas cerrados de recirculación de agua son una buena opción para el cultivo del pulpo, ya que pueden mantener el óptimo de temperatura ( $16 - 21 \text{ }^\circ\text{C}$ ) con facilidad.

## I.8. Lípidos

### Definición

Los **lípidos** son un conjunto de moléculas orgánicas, principalmente biomoléculas, muy heterogéneo. De hecho, la enorme variación estructural refleja la diversidad funcional de los lípidos (Fahy *et al.* 2011). Según Christie & Han (2010) este término suele referirse a los ácidos grasos y sus derivados naturales (amidas y ésteres), además de otros compuestos relacionados biosintética y/o funcionalmente. En general, los lípidos se caracterizan por presentar una serie de propiedades comunes como son:

- Están compuestos por carbono, hidrógeno, oxígeno y, en menor medida, pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno
- Son insolubles en agua
- Son solubles en solventes orgánicos (éter, benceno, cloroformo y alcoholes)

Los **ácidos grasos** son compuestos sintetizados en la naturaleza a través de la condensación de unidades de malonil coenzima A mediante el complejo ácido graso sintasa. Por lo general, contienen números pares de átomos de carbono en cadenas rectas (comúnmente de C14 a C24), pueden ser saturados o insaturados y también puede contener otros grupos sustituyentes (Christie & Han, 2010).

### Funciones

Los lípidos poseen diversas funciones en los seres vivos entre las que destacan:

**FUNCIÓN ENERGÉTICA:** Los lípidos, principalmente en forma de triacilgliceroles, forman la reserva energética de muchos organismos. Su contenido calórico es muy alto (10 Kcal/gramo) y representan una forma compacta y anhidra de almacenamiento de energía.

**FUNCIÓN ESTRUCTURAL:** Los lípidos son los principales constituyentes de las membranas biológicas formando por ejemplo la bicapa lipídica, cuya función esencial es delimitar el espacio celular. Esta interfase se constituye de lípidos anfipáticos, moléculas con una zona hidrófila y otra hidrófoba. También delimitan los orgánulos de las células eucariotas (núcleo, mitocondria, etc.). Los lípidos con función estructural más importante son los fosfolípidos y las ceras.



**FUNCIÓN REGULADORA:** Los organismos generan señales químicas, como las hormonas, que permiten la comunicación entre órganos y tejidos. Muchas de estas hormonas poseen estructura lipídica (esteroides, prostaglandinas, leucotrienos, etc.). También existen determinados lípidos que, al hidrolizarse, liberan sustancias que actúan como segundos mensajeros participando en cascadas de señales que regulan importantes procesos metabólicos. Por otra parte, encontramos a las vitaminas liposolubles (A, E, K y D) que poseen una función reguladora y catalítica ya que actúan como cofactores de enzimas. En su ausencia, las enzimas no funcionan y las vías metabólicas quedan interrumpidas.

Los lípidos también pueden presentar otras funciones como la de reserva de agua metabólica o la producción de calor. Como ejemplo de reserva de agua encontramos las reservas de grasas de la joroba de camellos, que se movilizan esencialmente para producir agua. Para la producción de calor es ejemplo la grasa parda o marrón de los animales, principalmente de los que hibernan.

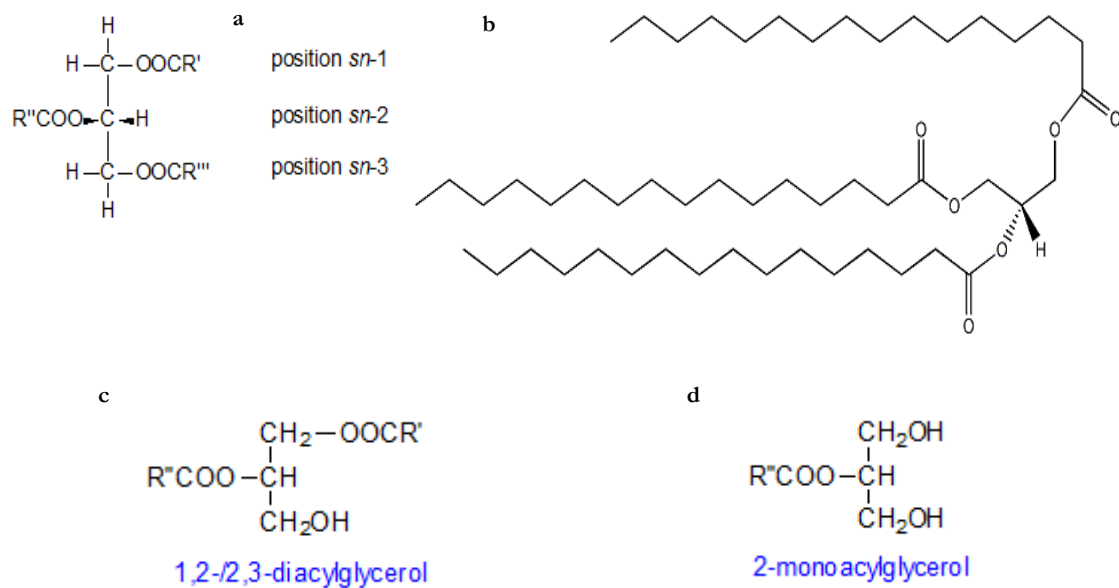
### **Clasificación**

Los lípidos pueden clasificarse en dos grupos, especialmente por fines cromatográficos (Christie & Han, 2010). Los **lípidos simples** se definen como aquellos que por hidrólisis producen como máximo dos tipos de productos primarios por mol; los **lípidos complejos** producen por hidrólisis tres o más productos primarios por mol. Los términos **Neutros** y **Polares** son utilizados para definir cada grupo, respectivamente, pero son menos exactos.

#### ▪ **Lípidos Simples**

Los lípidos simples se constituyen por uno o dos tipos de compuestos, generalmente neutros, a excepción de los ácidos grasos libres. En este grupo podemos encontrar:

- **Triacilgliceroles.** Prácticamente todas las grasas de importancia comercial y los aceites de origen animal y vegetal están compuestos casi exclusivamente de triacilgliceroles (o triglicéridos). Consisten en unidades de glicerol esterificadas en sus tres grupos hidroxilos con ácidos grasos. Su principal función biológica es energética.



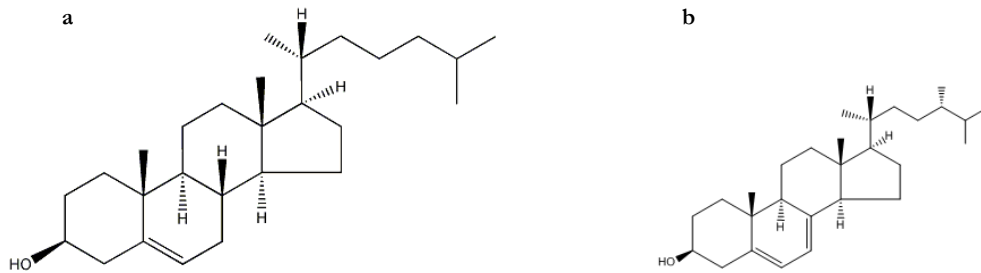
**Figura I.6** a. Proyección de Fischer de un triacil-*sn*-glicerol. b. Triacilglicerol 1,2,3-trihexadecanoyl-*sn*-glicerol. c. 1,2-/2,3-Diacilglicerol. d. 2-Monoacilglicerol. Fuente a: Christie & Han (2010). Fuente b: <http://www.lipidmaps.org>. Fuente c y d: Christie (2012).

- Los **Diacilgliceroles** (o diglicéridos) y los **Monoacilgliceroles** (monoglicéridos) contienen en su estructura un mol de glicerol por cada dos moles y uno de ácidos grasos, respectivamente. Estos lípidos no son tan comunes como los triglicéridos pero sí están presentes a niveles traza tanto en tejidos animales como vegetales. Los diacilgliceroles (1,2-diacil-*sn*-gliceroles) son intermediarios en la biosíntesis de triacilgliceroles y otros lípidos, participando como segundos mensajeros celulares (generados mediante hidrólisis del fosfatidilinositol por la Fosfolipasa C). Los monoacilgliceroles (2-monoacil-*sn*-gliceroles) se forman como subproductos o productos finales de la hidrólisis enzimática de triacilgliceroles y poseen un alto poder surfactante. La migración del grupo acil- puede ocurrir muy rápido cuando estos lípidos se exponen a altas temperaturas, a solventes alcohólicos o en presencia de ácidos o bases; incluso a temperatura ambiente. Por ello, para su aislación o análisis se necesitan procedimientos especiales.

- **Esteroles** y **Ésteres de esterol**. Presentan un sistema anular tetracíclico con un doble enlace en uno de sus anillos y un grupo hidroxilo libre en posición 2, que puede esterificarse formando derivados éster. El Colesterol es uno de los esteroles más conocidos y que está presente de forma abundante en el tejido animal. Puede estar en estado libre, siendo destacado su papel en la regulación de la fluidez de membranas biológicas, y

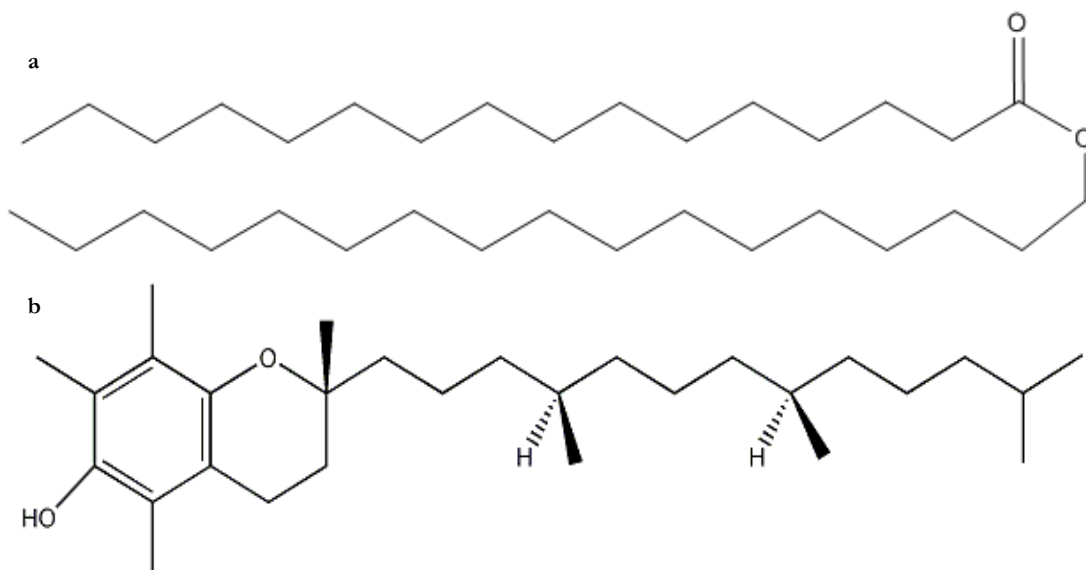
esterificado. El colesterol es el precursor de los ácidos biliares y de las hormonas esteroideas.

En plantas el colesterol está presente pero en pequeñas cantidades siendo más destacados los Fitoesteroles (Estigmasterol, Sitosterol, Ergosterol, etc.), cuya función principal es similar a la del colesterol en animales.



**Figura I.7** Proyección de Fischer del Colesterol (a) y del Ergosterol (b). Fuente a y b: <http://www.lipidmaps.org>.

- **Ceras o Ésteres de Cera.** En su forma más común, los ésteres de cera son moléculas constituidas por ácidos grasos esterificados con alcoholes de cadena larga y longitud similar. Estos ácidos grasos suelen ser saturados o poseer sólo un doble enlace. Los ésteres de cera están presentes en tejidos de animales, plantas y microorganismos y poseen diversas funciones como la de almacén de energía, impermeabilización y lubricación.



**Figura I.8** a. Ésteres de Cera: Heptadecil-hexadecanoato (Heptadecil-Palmitato). b.  $\alpha$ -Tocoferol o Vitamina E. Fuente: <http://www.lipidmaps.org>.

- **Tocoferoles.** Presentan una estructura común que consta de un anillo complejo llamado cromano, con el núcleo de benzopirano, y una larga cadena lateral. Los distintos tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) se diferencian por el número o posición de los grupos metilos presentes en el anillo aromático. El  $\alpha$ -tocoferol es el más abundante, recibe el nombre de vitamina E y es un potente agente antioxidante.

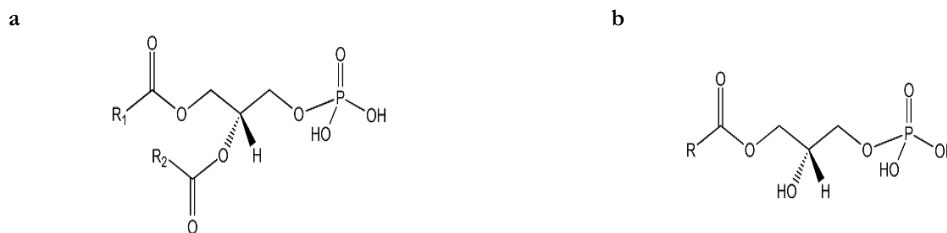
- **Ácidos Grasos Libres.** Son pequeños constituyentes de los tejidos vivos pero de gran importancia biológica ya que actúan como precursores de lípidos, fuente energética y mensajeros celulares. En el apartado I.8.1 se lleva a cabo una descripción más detallada.

### ▪ Lípidos Complejos

Los lípidos complejos o polares contienen tres o más identidades químicas de las que al menos una les confiere el carácter polar. Podemos distinguir los siguientes grupos principales: los **Glicerofosfolípidos** (o Fosfolípidos), que contienen un esqueleto de glicerol y un radical polar de fósforo; y los Glicolípidos (**Glicoglicerolípidos** y **Glicoesfingolípidos**), que contienen un radical polar de carbohidrato. También son de importancia considerable los Esfingofosfolípidos y los Fosfoglicolípidos.

## GLICEROFOSFOLÍPIDOS

- **Ácido Fosfatídico** o 1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfato. Es una molécula compleja formada por glicerol, al que se esterifican dos ácidos grasos (uno saturado y otro insaturado) y un grupo fosfato. En circunstancias normales el Ácido Fosfatídico se encuentra en tejidos en cantidades traza, pero posee una gran importancia metabólica como precursor biosintético de otros glicerolípidos. Posee un fuerte carácter ácido.



**Figura I.9** **a.** Ácido Fosfatídico (1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfato). **b.** Ácido Lisofosfatídico (1-acil-sn-glicero-3-fosfato). Fuente: <http://www.lipidmaps.org>.

- **Ácido Lisofosfatídico.** Al combinarse un mol de ácido graso por mol de lípido (en posición sn-1) se forma este ácido, que es un mensajero celular clave y se usa como marcador del cáncer de ovarios.

- **Fosfatidilglicerol** o 1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosforil-1'-sn-glicerol. Suele ser constituyente traza en la mayoría de los tejidos siendo a menudo el principal componente de las membranas bacterianas. Posee funciones muy importantes como la de tensioactivo pulmonar, un papel esencial en la fotosíntesis, el precursor biosintético de la cardiolipina y, en algunas especies bacterianas, el radical 3'-hidroxil del fosfatidilglicerol se une a un aminoácido (lisina, ornitina o alanina) para formar los O-aminoacilfosfatidilglicerol o complejos "Ácido Lipoamino".

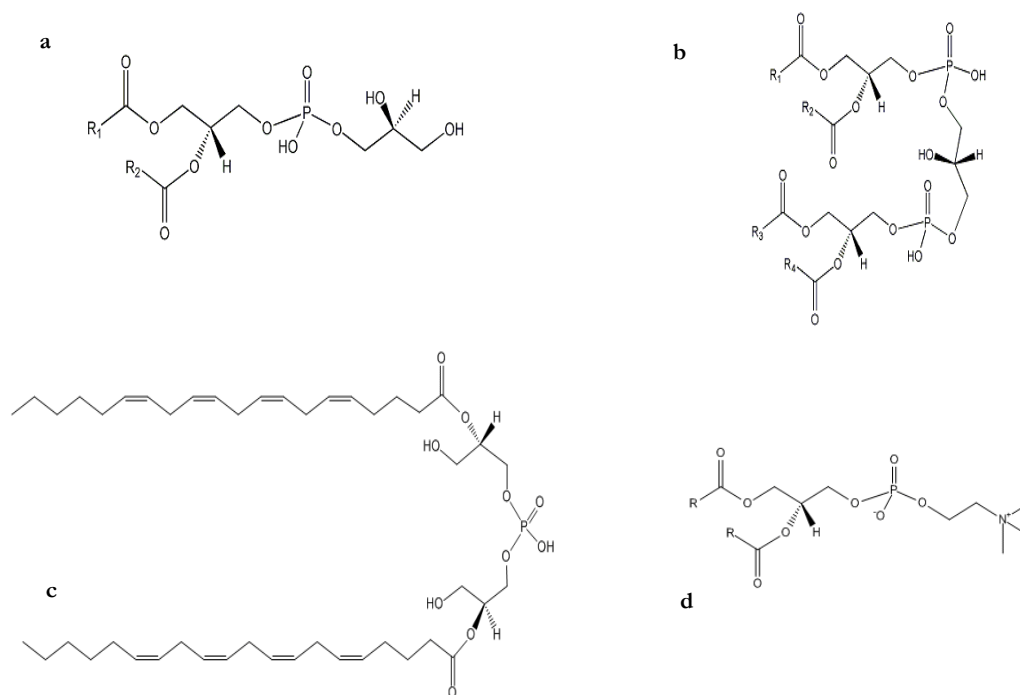
- **Cardiolipina** (difosfatidilglicerol o 1,3-bis(sn-3'-fosfatidil)-sn-glicerol). Es un fosfolípido con estructura dimérica que posee cuatro grupos acilo y dos cargas negativas (carácter ácido). Es un constituyente muy importante de los lípidos mitocondriales y, especialmente, el músculo del corazón es una fuente muy rica de Cardiolipina. Juega un papel muy importante en la modificación de las actividades enzimáticas relacionadas con la fosforilación oxidativa.

- **Ácido Lisobifosfatídico** (bis(monoacilglicerol)-fosfato). Es un lípido interesante ya que su configuración estereoquímica difiere de la del resto de glicerofosfolípidos de origen animal en que el radical fosfodiéster está unido al glicerol en las posiciones sn-1 y sn-1' en lugar de en la posición sn-3 en la que los ácidos grasos son esterificados. Normalmente se trata de un componente relativamente minoritario de los tejidos animales pero abunda en las membranas lisosomales del hígado y parece que es un marcador para estos orgánulos. El esqueleto de glicerofosfato es particularmente muy estable, posiblemente por su inusual estereoquímica.

- **Fosfatidilcolina** (1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosforilcolina o Lecitina, aunque este término se suele usar para la mezcla de fosfolípidos a partir de semillas de aceite refinado). Normalmente es el lípido más abundante en las membranas de tejido animal, con frecuencia el principal componente lipídico de las membranas vegetales y sólo en algunas ocasiones aparece en las membranas bacterianas. Al igual que la esfingomiélin (fosfolípido que contiene también colina) es un componente estructural clave y, principalmente,

constituye muchos de los lípidos presentes en la monocapa externa de la membrana plasmática de las células animales.

- **Lisofosfatidilcolina.** Contiene sólo un ácido graso unido a la molécula, normalmente en posición sn-1. En ocasiones está presente en los tejidos pero como componente minoritario de los mismos. Es un potente surfactante y más soluble en agua que la gran mayoría de los lípidos.



**Figura I.10** a. Fosfatidilglicerol (1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosforil-1'-sn-glicerol). b. Cardiolipina (1,3-bis(sn-3'-fosfatidil)-sn-glicerol). c. Ácido Lisobifosfatídico (Bis-2-icosanoil)-3-liso-sn-glicero-1-fosfato). d. Fosfatidilcolina (1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosforilcolina).

Fuente: <http://www.lipidmaps.org>.

- **Fosfatidiletanolamina** (conocido también comúnmente como Cefalina). Es el segundo fosfolípido más abundante de los tejidos animales y vegetales y puede llegar a ser la principal clase lipídica en microorganismos. En el marco de un proceso celular importante, su grupo amino puede ser metilado enzimáticamente para ceder, primero, el fosfatidil-N-monometiletanolamina y, después, el fosfatidil-N, N-dimetiletanolamina. En ningún caso estos subproductos se acumulan en cantidades significativas siendo el producto final Fosfatidilcolina.

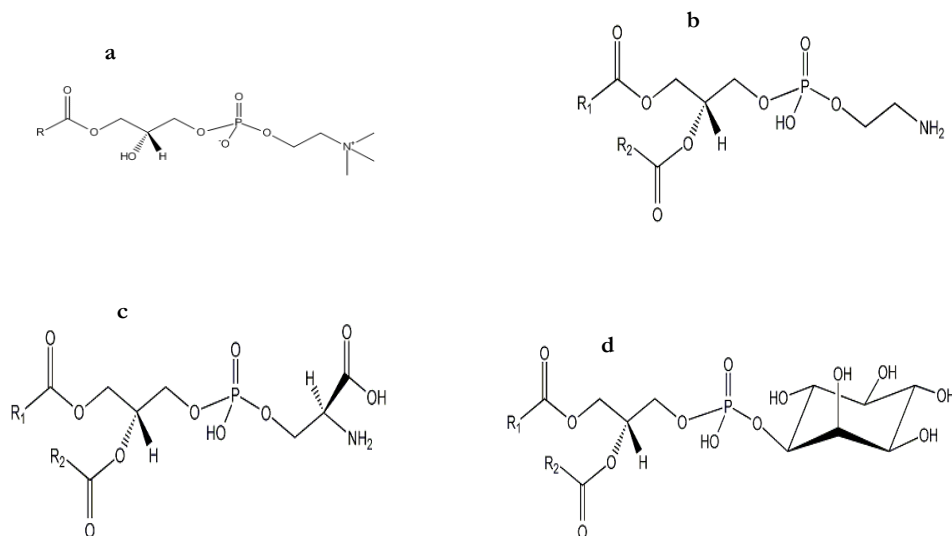
La N-Acilfosfatidiletanolamina es un componente minoritario de algunos tejidos vegetales, sobre todo en cereales, y en ocasiones aparece también en animales donde actúa como

precursor de algunas amidas biológicamente activas. La Lisofosfatidiletanolamina contiene sólo un mol de ácido graso por mol de lípido.

- **Fosfatidilserina.** Es un lípido ligeramente ácido que se encuentra en la mayoría de los tejidos animales y vegetales y también presente en microorganismos. Se localiza en la superficie de la monocapa interna de la membrana plasmática y de otras membranas celulares. Este lípido es un cofactor esencial para la activación de la Proteína Quinasa C y está implicado en muchos procesos biológicos, incluidas la coagulación sanguínea y la apoptosis (muerte celular programada). La N-Acilfosfatidilserina ha sido detectada en algunos tejidos animales.

- **Fosfatidilinositol.** Cuando contiene la forma inactiva del inositol, el mio-inositol, es constituyente lipídico común de animales, plantas y microorganismos. Principalmente en tejidos animales puede ir acompañado de pequeñas cantidades de Fosfatidilinositol 4-fosfato y Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. Estos compuestos poseen una alta tasa metabólica en células animales, y son convertidos a metabolitos como Diacilgliceroles e Inositol Fosfatos los cuales son muy importantes para procesos vitales de regulación. Por ejemplo, los Diacilgliceroles regulan la actividad de un grupo de enzimas conocido como Proteína Quinasa C el cual, a su vez, controla muchas funciones celulares clave incluyendo diferenciación, proliferación, metabolismo y apoptosis. Además, el Fosfatidilinositol es fuente primaria del Araquidonato usado para síntesis de Eicosanoides en animales, y es conocido por ser el anclaje al que se pueden unir una gran variedad de proteínas por la cara externa de la membrana plasmática mediante un enlace glicosil.

- **Fosfolípidos.** Son lípidos con Ácido Fosfónico esterificado con Glicerol mediante, por ejemplo, un enlace carbono-fósforo que no es fácilmente hidrolizado por agentes químicos. Así, la Fosfonil-etanolamina se encuentra mayoritariamente en invertebrados marinos y en protozoos. Una Ceramida análoga se encuentra con frecuencia en estos mismos organismos.



**Figura I.11** a. Lisofosfatidilcolina (1-*acil*-sn-glicero-3-fosfocolina). b. Fosfatidiletanolamina (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina). c. Fosfatidilserina (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoserina). d. Fosfatidilinositol (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol)). Fuente: <http://www.lipidmaps.org>.

- **Lípidos Éter.** Muchos Glicerolípidos, principalmente Fosfolípidos y en especial los de origen animal o microbiano, contienen ciertos residuos alifáticos unidos al carbono 1 de *L*-Glicerol por un enlace éter (R-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>) o un enlace éter vinílico (R-O-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>). Cuando un lípido contiene un enlace de estos dos tipos normalmente se le nombra como **Plasmalógeno** (Plasmanil- o Plasmenil-“lípido” según sea el enlace éter/alquil- o enlace éter vinílico/alquenil-). Pueden ser abundantes en los fosfolípidos de animales y microorganismos, especialmente en la fracción de Fosfatidiletanolamina. En este caso, se recomienda denominarlos como Plasmeniletanolamina y Plasmaniletanolamina. Los enlaces éter son estables tanto en hidrólisis ácida como alcalina, pero los enlaces éter vinílicos se rompen con facilidad bajo condiciones ácidas formando aldehídos.

- **Factor Activador de Plaquetas** o 1-alkil-2-acetil-*sn*-glicerofosforilcolina es un éter-fosfolípido ampliamente estudiado porque puede ejercer grandes efectos biológicos en mínimas cantidades. Por ejemplo, influye en la agregación de plaquetas a concentraciones tan bajas como 10<sup>-11</sup> M, e induce una respuesta hipertensiva también en niveles muy bajos. Es un mediador de la inflamación y posee funciones como mensajero.

- **Alquildiacilglicéridos y alquenildiacilglicéridos.** Son análogos de los triglicéridos pero con un enlace éter en el carbono 1 de tipo alquil (-O-CH<sub>2</sub>-) o *O*-alquenil

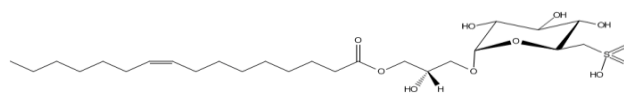
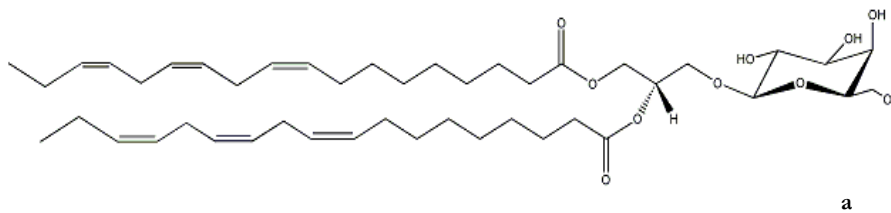


éter o vinílico ( $-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}-$ ). Los alquildiacilglicéridos parecen ser una forma de reserva lipídica en animales marinos. A los alquenildiacilglicéridos se les nombra también como plasmalógenos neutros.

## GLICOLICEROLÍPIDOS

Una gran proporción de lípidos presentes en plantas, principalmente en tejidos fotosintéticos, consisten en 1,2-diacil-*sn*-gliceroles unidos por un enlace glicosídico en posición *sn*-3 a un radical carbohidrato.

- Los principales compuestos son **mono-** y **digalactosildiacilgliceroles** aunque también han sido descritos algunos con más de cuatro unidades de galactosa y otros en los que alguna unidad es reemplazada por un radical de glucosa. Es obvio que poseen un papel importante en la fotosíntesis pero actualmente se sigue trabajando en su descripción ya que existen detalles aún por conocer.



**Figura I.12** a. 1,2 di-octadecatrienoil-3- $\beta$ -galactosil-*sn*-glicerol. b. sulfoquinovosylmonoacylglycerol. Fuente: <http://www.lipidmaps.org>.

- **Sulfoquinovosil- diacilglicerol (Sulfolípido de plantas)**, glicolípido único en plantas que contiene un residuo de ácido sulfónico unido a un radical 6-deoxiglucosa de un monoglicosildiacilglicerol. Presente exclusivamente en cloroplastos.

Los monogalactosildiacilgliceroles no son lípidos exclusivos en plantas ya que también pueden aparecer en pequeñas cantidades en tejido nervioso y cerebro de algunos animales. Una serie de complejos gliceroglicolípidos, tanto en forma diacil como alquil, también han sido caracterizados en tejido del tracto intestinal y del pulmón. Estos compuestos son destruidos por algunos métodos de aislamiento de glicoesfingolípidos y parece ser que son más abundantes de lo que pensamos. Así, un complejo glicoglicerosulfolípidos, denominado **Seminolípido** y cuyo componente es 1-O-hexadecil-2-O-hexadecanoil-3-O-(3'-sulfo-β-D-galactopiranosil)-sn-glicerol, es el principal glicolípidos en los testículos y el esperma. Un grupo adicional de complejos glicolípidos aparece en bacterias y otros microorganismos, frecuentemente con manosa como un radical carbohidrato. Estos compuestos poseen azúcares acilados que no contienen glicerol.

## ESFINGOMIELINA Y GLICOESFINGOLÍPIDOS

Los **esfingolípidos** se forman a partir de una larga cadena base, unida por un enlace amida a un ácido graso y con el grupo hidroxil terminal unido a un complejo carbohidrato o a radicales fosforilados. La larga cadena base (bases de esfingoide o esfingoides) forman la unidad estructural de los esfingolípidos. Consta de una cadena larga (12 a 22 átomos de carbono) de aminas alifáticas, con dos o tres grupos hidroxilos, y a menudo aparece un doble enlace trans- en posición 4. El más común o abundante en tejido animal es la **esfingosina** ((2S, 3R, 4E)-2-amino-4-octadeceno-1, 3-diol). Se han encontrado más de cien largas cadenas base en animales, vegetales y microorganismos. Muchas aparecen únicamente en un tejido y casi siempre formando parte de un lípido complejo. Las cadenas alifáticas pueden ser saturadas, mono y di-insaturadas, con dobles enlaces tanto en configuración cis como trans, y a veces contienen sustituyentes metilados. Además, también se han descrito trihidrohi bases saturadas y monoenoicas en cadenas rectas y ramificadas, como la **fitoesfingosina** ((2S, 3S, 4R)-2-amino-octadecanotriol), muy común en tejidos de origen vegetal.

- **Ceramidas.** Contienen ácidos grasos unidos mediante enlace amida a un grupo amino de una cadena base larga. En general, suelen aparecer en tejidos a niveles bajos, pero son intermediarios claves para la biosíntesis de complejos esfingolípidos. Además, poseen importantes funciones en la señalización celular, especialmente en la regulación de la apoptosis, la diferenciación, transformación y proliferación celular. Existen unas ceramidas inusuales localizadas en la epidermis del cerdo y de humanos que predominantemente se

unen a un ácido graso esencial, el ácido linoleico. Se cree que su función principal es la de prevenir la pérdida de humedad bajo la piel.

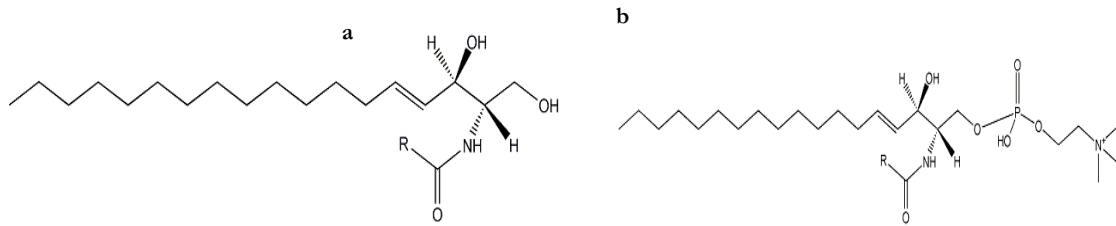
- **Esfingomielina.** Esfingolípido formado por una ceramida unida en la posición 1 a una fosforilcolina. Aparece como principal componente de lípidos complejos de todos los tejidos animales. En muchas de sus propiedades físicas se asemeja a la fosfatidilcolina y parece que puede sustituirla en las membranas en gran parte. Posee otras funciones, ya que es el principal constituyente de la membrana plasmática celular donde se concentra en ciertas regiones junto a esfingoglicolípidos y colesterol formando los dominios “rafts”. La esfingomielina es un precursor de un gran número de metabolitos esfingolípidos con importantes funciones en la señalización celular, formando parte del “ciclo de la esfingomielina”. Un correcto balance entre estos metabolitos es vital para un estado saludable. Además, es un componente muy importante del tejido nervioso.

- **Ceramida fosforiletanolamina** aparece en los lípidos de insectos y de algunos invertebrados de agua dulce. Su fosfolípido análogo se ha detectado en anémonas de mar y en protozoos.

- **Ceramida fosforilinositol** también aparece en algunos organismos y como el Fosfatidilinositol puede actuar como anclaje para oligosacáridos unidos a proteínas de membrana.

- **Glicosilceramidas neutras.** Es el grupo de glicoesfingolípidos más extendido siendo la forma más abundante en **monoglicosilceramidas** o **cerebrósidos**, que poseen un azúcar unido mediante enlace  $\beta$ -glucosídico al grupo hidroxilo de la ceramida. Si contienen galactosa son los galactocerebrósidos (membranas plasmáticas de células del tejido nervioso animal) y si contienen glucosa son los glucocerebrósidos (membranas plasmáticas de células de tejido no nervioso animal y vegetal). Las **oligoglicosilceramidas** están presentes, en bajos niveles, en la mayoría de tejidos animales. El diglicosil más abundante es la lactosilceramida que posee un importante papel en la respuesta inmune. En este oligo-grupo también aparecen los globósidos y los fucolípidos.

- Los **sulfoglicoesfingolípidos** (sulfatidas o lípidos sulfatos) son ésteres sulfatados de galactosil y lactosilceramidas. Es el principal componente de lípidos cerebrales cuando el grupo sulfato se une en posición 3 a un radical galactosil.

**Figura I.13 a.** Ceramida. **b.** Esfingomiolina. Fuente: <http://www.lipidmaps.org>.

- Los **fitoglicoesfingolípidos** son complejos esfingolípidos vegetales con glucosamina, ácido glucurónico o manosa unida a la ceramida vía fosforilinositol. Se aislaron y caracterizaron inicialmente de semillas aunque también se han descrito en otros tejidos vegetales y en hongos.

- **Gangliósidos**, oligoglicosilceramidas muy complejas con uno o más grupos de ácido siálico. Están presentes en muchos tejidos animales aunque fueron los primeros lípidos encontrados en células ganglionares del sistema nervioso central, de ahí su nombre. Son muy abundantes en las terminaciones nerviosas y suelen presentarse en la cara externa de las membranas por lo que se les considera receptores de membrana como, por ejemplo, de toxinas bacterianas (tétanos, cólera y botulismo). También actúan en el control de la diferenciación y el crecimiento celular así como en los sistemas de defensa inmune.

- La **esfingosina-1-fosfato** es el esfingolípidido de estructura más simple y está presente en niveles bajos sólo en tejidos animales. Actúa en muchas rutas de señalización celular como, por ejemplo, promoviendo la mitosis o en la agregación plaquetaria.

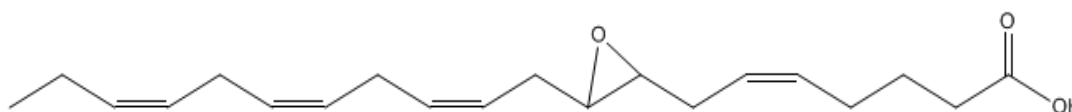
## EICOSANOIDES Y LÍPIDOS RELACIONADOS

Los **Eicosanoides** son lípidos derivados de ácidos grasos esenciales de 20 átomos de carbono tipo omega-3 y omega-6 siendo los principales precursores el ácido araquidónico, el ácido linoleico y el ácido linolénico. Se dividen en **Prostaglandinas**, **Tromboxanos** y **Leucotrienos**. Son constituidos mediante la acción de tres clases de enzimas: ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), lipoxigenasas (LOX) y citocromo P450 epoxigenasa.

Los derivados del ácido araquidónico son de especial importancia. Las prostaglandinas y los tromboxanos están relacionados con los procesos de inflamación. En general cumplen

variadas funciones como mediadores en el sistema nervioso central, los procesos de inflamación y de la respuesta inmune tanto de vertebrados como invertebrados. También se han descrito a los **Docosanoides** (**Resolvinas** y **Protectinas**), que son derivados a partir del ácido graso 22:6n-3 o DHA, y a los **Isoprostanos**, que son Eicosanoides producidos por vías no enzimáticas.

En tejidos vegetales se encuentran los **Jasmonatos** y otras **Oxilipinas** (derivadas de 18:3n-3 o ácido linolénico) generadas mediante lipoxigenasas. Actúan en respuestas ante daños físicos ocasionados por animales o insectos, estrés y ataque de patógenos.



**Figura I.14** Ácido eicosatetraenoico. Fuente: <http://www.lipidmaps.org>.

## ÁCIDOS GRASOS

Los **Ácidos Grasos** más comunes en tejidos vegetales son aquellos compuestos por cadenas rectas con 16 a 18 átomos de carbono (C16 a C18) y con hasta tres dobles enlaces. Estos ácidos grasos también son abundantes en tejidos animales junto con otros con cadenas más largas que pueden llevar hasta seis dobles enlaces en su estructura. Normalmente los dobles enlaces se encuentran en configuración cis siendo poco común la configuración trans (presente en lípidos naturales pero formados por hidrogenación durante el proceso alimentario). Los ácidos grasos más comunes de origen animal y vegetal se resumen en la tabla I.2.

El ácido graso más abundante en la naturaleza es el ácido palmítico o hexadecanoico (16:0). El ácido oleico o 9-octadecenoico (18:1n9) es el ácido graso monoinsaturado más común. Los ácidos linoleico (18:2n6) y linolénico (18:3n3) son los principales componentes en los vegetales incluyendo importantes aceites vegetales. Son ácidos grasos esenciales, es decir, no pueden ser sintetizados por los tejidos animales. Aún así, el ácido linoleico está casi siempre presente en los alimentos y por ello es relativamente abundante en tejidos animales. Estos ácidos grasos son precursores biosintéticos en sistemas animales de ácidos grasos poliinsaturados de C20 a C22 y con tres a seis dobles enlaces. Entre los derivados

del ácido linoleico destaca el ácido araquidónico (20:4n6), importante constituyente de fosfolípidos de membrana en tejidos mamarios y precursor de prostaglandinas y otros Eicosanoides. En peces, el ácido linolénico es el ácido graso esencial más importante y del que derivan el ácido eicosapentaenoico (20:5n3 o EPA), el ácido docosahexaenoico (22:6n3 o DHA) y ácidos grasos poliinsaturados de la serie n3.

**Tabla I.2** Ácidos grasos más comunes de origen animal y vegetal. Fuente: Christie (2012)

Nombre Sistemático	Nombre común	Abreviatura
<b>Ácidos Grasos Saturados</b>		
Etanoico	Acético	2:0
Butanoico	Butírico	4:0
Hexanoico	Caproico	6:0
Octanoico	Caprílico	8:0
Decanoico	Cáprico	10:0
Dodecanoico	Laúrico	12:0
Tetradecanoico	Mirístico	14:0
Hexadecanoico	Palmítico	16:0
Octadecanoico	Esteárico	18:0
Eicosanoico	Araquídico	20:0
Docosanoico	Behénico	22:0
<b>Ácidos Grasos Monoinsaturados</b>		
cis-9-hexadecenoico	Palmitoleico	16:1n7
cis-6-octadecenoico	Petroselínico	18:1n12
cis-9-octadecenoico	Oleico	18:1n9
cis-11-octadecenoico	Cis-vaccénico	18:1n7
cis-13-docosenoico	Erúcico	22:1n9
cis-15-tetracosenoico	Nervónico	24:1n9
<b>Ácidos Grasos Poliinsaturados</b>		
9,12-octadecadienoico	Linoleico	18:2n6
6,9,12-octadecatrienoico	$\gamma$ -linolénico	18:3n6
9,12,15-octadecatrienoico	$\alpha$ -linolénico	18:3n3
5,8,11,14-eicosatetraenoico	Araquidónico	20:4n6
5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	EPA	20:5n3
4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	DHA	22:6n3

## I.9. Proteínas. Enzimas digestivas

### Definición

Las proteínas son las macromoléculas más versátiles de los seres vivos y desempeñan funciones cruciales en casi todos los procesos biológicos. Entre sus propiedades destacan (Berg *et al.*, 2008):

- Son polímeros lineales formados por unos monómeros llamados aminoácidos. Las proteínas se pliegan espontáneamente en estructuras tridimensionales determinadas por la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) y su función depende directamente de dicha estructura tridimensional (especificidad).
- Poseen un gran número de grupos funcionales. Estos grupos contienen alcoholes, ácidos carboxílicos, carboxiamidas, grupos básicos, etc. y suelen ser químicamente activos. Al poder combinarse unos con otros confieren a las proteínas la capacidad de intervenir en numerosos procesos y de ahí el gran número de funciones que desarrollan en los seres vivos.
- Las proteínas pueden interactuar entre sí y con otras macromoléculas biológicas formando asociaciones complejas. Estas asociaciones pueden ser sinérgicas, es decir, se generan capacidades no existentes en las proteínas de forma individual.
- Algunas proteínas poseen estructuras muy rígidas mientras que otras presentan una gran flexibilidad. Así, pueden aparecer por su rigidez en el citoesqueleto, o actuar como “muelles o palancas” dentro de la señalización celular.
- Otras propiedades importantes de las proteínas son su solubilidad, que depende de la temperatura y del pH del medio, su capacidad electrolítica y su capacidad para amortiguar el pH debido a su carácter anfótero.

Tabla I.3 Aminoácidos y sus abreviaturas. Fuente: Berg *et al.* (2008)

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tripsina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Asparagina o ácido glutámico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z

### Clasificación

Según su forma las proteínas pueden clasificarse en **fibrosas**, de cadenas largas e insolubles en agua y en disoluciones acuosas, en **globulares**, cuyas cadenas toman forma esférica y son solubles en disolventes polares como el agua, o **mixtas**, que son las que presentan parte fibrilar y parte globular (Braverman, 1980).

Atendiendo a su composición química (Braverman, 1980) podemos clasificar a las proteínas en:

- **Simples.** Su hidrólisis sólo produce aminoácidos. Estas proteínas, como la insulina o el colágeno, se dividen a su vez en:



- Escleroproteínas. Son insolubles, fibrosas, resistentes a la acción de muchas enzimas y con funciones principalmente estructurales.
- Esferoproteínas. Con moléculas de forma esférica y según su solubilidad existen:
  - *Albúminas*. Solubles en agua y soluciones salinas diluidas (ovoalbúmina).
  - *Globulinas*. Insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas (miosina).
  - *Glutelinas*. Insolubles en agua o soluciones salinas, pero solubles en medios ácidos o básicos (glutelinas del trigo).
  - *Prolaminas*. Solubles en etanol al 50 - 80% (gliadina del trigo y zeína del maíz).
  - *Histonas*. Solubles en medios ácidos.
- **Conjugadas o heteroproteínas**. Su hidrólisis produce aminoácidos y otras sustancias no proteicas con un grupo prostético.

## Funciones

Como se ha comentado en el punto anterior, las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida y realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre las que destacan (Alberts *et al.*, 2006):

- **Enzima:** catálisis de la ruptura o formación de un enlace covalente. Las células vivas contienen miles de enzimas diferentes y cada una de ellas cataliza (acelera) una reacción en particular. Ejemplos: la pepsina degrada aminoácidos en el estómago y la triptófano sintetasa elabora el aminoácido triptófano.
- **Proteínas estructurales:** proporcionan soporte mecánico a las células y tejidos. Ejemplos: el colágeno y la elastina son constituyentes comunes de la matriz extracelular así como la tubulina forma microtúbulos rígidos y duros dentro de las células.
- **Proteínas de transporte:** transportan moléculas pequeñas o iones. Por ejemplo, en el torrente sanguíneo la albúmina sérica transporta lípidos, la hemoglobina oxígeno y la transferrina transporta iones.
- **Proteínas motoras:** generan movimientos en las células y tejidos. Así, la miosina en las células musculares esqueléticas proporciona la fuerza motriz para los movimientos humanos.
- **Proteínas de depósito:** almacenan pequeñas moléculas o iones. Por ejemplo, el hierro se almacena en el hígado mediante la unión a la proteína ferritina.

- **Proteínas de señalización:** transmiten señales de una célula a otra. Muchas hormonas y factores de crecimiento son proteínas como, por ejemplo, la insulina o el factor de crecimiento epidérmico (EGF).
- **Proteínas receptoras:** detectan señales y las transmiten a la maquinaria de respuesta de las células. Ejemplo: la rodopsina de la retina detecta la luz.
- **Proteínas reguladoras génicas:** se unen al ADN para activar o desactivar genes. Así, el represor de la lactosa en las bacterias silencia a los genes para las enzimas que degradan al azúcar lactosa.
- **Proteínas especiales:** con funciones muy variables como, por ejemplo, las proteínas anticongelantes de los peces del Ártico y de la Antártida que protegen a su sangre del congelamiento, o en mejillones y otros organismos marinos secretan proteínas adhesivas que los adhieren firmemente a las rocas incluso cuando están sumergidos en el agua.

## Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos que permiten que las reacciones metabólicas ocurran a gran velocidad en condiciones compatibles con la vida. La mayor parte de los catalizadores biológicos son proteínas, las cuales se han clasificado por parte de la Unión Internacional de Bioquímica en seis grandes grupos (Mathews & Van Holde, 1998):

- **Óxidoreductasas.** Actúan en reacciones de oxidación-reducción. Conocidas también como deshidrogenasas.
- **Transferasas.** Transfieren grupos funcionales de una molécula a otra. Las quinasas forman un grupo especializado en transferir grupos fosfato.
- **Liasas.** Rompen enlaces por mecanismos distintos a la hidrólisis o la oxidación. Ejemplos de liasas son las decarboxilasas y las aldolasas.
- **Isomerasas.** Catalizan reordenamientos intramoleculares, reacciones de interconversión de isómeros.
- **Ligasas.** Catalizan reacciones de unión de dos moléculas. También denominadas sintetetasas.
- **Hidrolasas.** Catalizan rupturas hidrolíticas, en las que al romper un enlace adicionan una molécula de agua.

El nombre específico de una enzima se compone, según nomenclatura, por cuatro números precedidos por la abreviatura EC (Código Enzimático) y hace referencia al sustrato y al tipo de reacción que cataliza.

### **Enzimas digestivas**

El presente trabajo se enfoca principalmente en la nutrición de juveniles de pulpo. Una vez que el alimento es tragado se inicia el proceso de digestión donde actúan una serie de enzimas que permitirán al animal obtener los nutrientes necesarios para ser asimilados. Por ello es imprescindible conocer el papel que juegan las enzimas digestivas. Muchas de ellas son del grupo de las Hidrolasas y según el tipo de nutriente que hidrolizan se han dividido en Proteasas, Amilasas, Lipasas y Fosfatasas (Álvarez-González, 2003).

#### PROTEASAS

Enzimas catalizadoras de la hidrólisis de enlaces peptídicos (EC 3.4) que forman la estructura primaria de las proteínas. Están presentes en muchos organismos. Las proteasas están implicadas en muchos procesos como la digestión de proteínas y la activación de proenzimas y prehormonas. Existen dos tipos de proteasas: **exopeptidasas**, que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (EC 3.4.11-19), y **endopeptidasas**, que hidrolizan enlaces peptídicos internos (EC 3.4.21-24). También son clasificadas en cuatro grupos principales según su mecanismo de acción:

- **Serinproteasas (EC 3.4.21)**. Grupo Serina en el centro activo.
- **Cisteínproteasas (EC 3.4.22)**. Grupo Cisteína en el centro activo.
- **Proteasas ácidas o aspárticas (EC 3.4.23)**. Ácido Aspártico en el centro activo y máxima actividad a pH ácido.
- **Metaloproteasas (EC 3.4.24)**. Residuo de Ácido Glutámico en el centro activo. Requieren un catión divalente (Zn, Ca, Mg) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico.

En el jugo gástrico de muchos organismos aparecen endoproteasas ácidas como la **pepsina** (EC 3.4.23.1), la **gastricina** (EC 3.4.23.3) y la **renina** (EC 3.4.23.4). La pepsina es la proteasa ácida más importante, que hidroliza a su máxima capacidad a pH 2. En el intestino de muchas especies se ha detectado otro tipo de enzimas que funcionan a pH alcalino como la **tripsina** (EC 3.4.21.4.) y la **quimotripsina** (EC 3.4.21.1). Son

serinproteasas (endopeptidasas) con un importante papel en la digestión de proteínas en todos los animales. Las **catepsinas** (EC 3.4) son enzimas relacionadas con la digestión intracelular.

Dentro del grupo de las exoproteasas destacan las **aminopeptidasas** (EC 3.4.11), que catalizan la hidrólisis de restos aminoacídicos desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos en iones metálicos ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  o  $Co^{2+}$ ) y en la especificidad por determinados dipéptidos. Entre sus funciones destacan la maduración del sistema digestivo, la degradación terminal de proteínas, la regulación hormonal y el control del ciclo celular. Las carboxipeptidasas son enzimas que liberan residuos aminoacídicos del extremo carboxiterminal de las proteínas. Se dividen en **serina carboxipeptidasas** (EC 3.4.16), con serina en su centro activo, y en **metalo carboxipeptidasas** (EC 3.4.17), que requieren de iones Zn para ser activas (Álvarez-González, 2003).

#### AMILASAS

Enzimas catalizadoras de la hidrólisis del enlace  $\alpha$ 1-4 del almidón y el glucógeno. Se dividen en alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), o endo y exo amilasas. Las  **$\alpha$ -amilasas** (EC 3.2.1.1) están presentes en el jugo pancreático de muchos animales y las  **$\beta$ -amilasas** aparecen exclusivamente en el reino vegetal (Álvarez-González, 2003).

#### LIPASAS

Se dividen en dos grupos (Álvarez-González, 2003):

- **Esterasas** (EC 3.1.1.1). Suelen actuar sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular que tienen cierta capacidad de solubilizarse.
- **Lipasas** (EC 3.1.1.3). Hidrolizan sustratos poco solubles. Pueden aparecer en páncreas, plasma sanguíneo, saliva o en el jugo pancreático.

#### FOSFATASAS

Las **fosfatasas ácida** y **alcalina** (EC 3.1.3.2 y 3.1.3.1) aparecen en epitelios intestinales y del estómago. Catalizan la separación de fósforo inorgánico a partir de fosfato orgánico actuando en procesos de mineralización de los huesos en vertebrados y en procesos de transporte de nutrientes a través de membranas (Álvarez-González, 2003).

## I.10. BIBLIOGRAFÍA INTRODUCCIÓN

- Agassiz L. 1847. An Introduction to the Study of Natural History: En: Series of Lectures Delivered in the Hall of the College of Physicians and Surgeons, New York. Greeley & McElrath. 58 pp.
- Aguado-Giménez F. & B. García-García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10: 361-377.
- Alberts B. & B. Dennis. 2006. Introducción a la Biología Celular, 2ª Edición. Traducido por: Ferrán J.L., Tzal K., Patrone U. Buenos Aires, Editorial Médica Paramericana, 864 p.
- Álvarez-González C.A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE). Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California (México). 164 pp.
- Bather F.A. 1888. Shell-growth in Cephalopoda (Siphonopoda). *Annals and Magazine of Natural History*, (series 6)1:298-310.
- Blainville H.M. Ducrotay de, 1825. Manuel de malacologie et de conchyliologie. Editado por: Levrault F.G. Paris (Francia). 242 pp.
- Braverman J.B.S. 1980. Introducción a la bioquímica de los alimentos. 2ª Edición. Z. Berk. Editorial El Manual Moderno. México. 358pp.
- Berg J.M., J.L. Tymoczko & L. Stryer. 2008. Bioquímica, 6ª Edición. Traducido por: Prof. Dr. Macarulla J.M. Barcelona, Editorial Reverté, 1026 p.
- Bidder A.M. 1966. Feeding and digestion in cephalopods. *Physiology of the Mollusca*, 2.
- Boletzky S.V. & R.T. Hanlon. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memoirs of the National Museum Victoria*, 44, 147-187.
- Boucaud-Camou E. & R. Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. *Mollusca: Physiology*, 5(2): 149-187.
- Boyle P.R. 1991. The UFAW handbook on the care and management of cephalopods in the laboratory. Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, U.K., 63 pp.
- Cagnetta P. & A. Sublimi. 2000. Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C.) when fed on a monodiet. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47: 331-336.
- Cerezo J., E. Gómez & B. García. 2003. Resultados preliminares sobre la producción de amoniaco en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) obtenidos mediante un electrodo de ion selectivo. En: *IX Congreso Nacional de Acuicultura, Cádiz* (pp. 12-16).
- Cerezo-Valverde J., M.D. Hernández, F. Aguado-Gimenez, P.S. Morillo Velarde & B. García-García. 2012. Performance of formulated diets with different level of lipids and glutamate supplementation in *Octopus vulgaris*. *Aquaculture Research*, 44: 1952-1964.
- Cerezo-Valverde J., S. Martínez-Llorens, A. Tomás-Vidal, M. Jover, C. Rodríguez, J. Estefanell, J.I. Gairín, P.M. Domingues, C.J. Rodríguez & B. García-García. 2013. Amino acids

- composition and protein quality evaluation of marine species and meals for feed formulations in cephalopods. *Aquaculture International*, 21: 413-433.
- Chapela A., A.F. González, E.G. Dawe, F.J. Rocha & A. Guerra. 2006. Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. *Scientia Marina*, 70: 121-129.
- Christie W.W. & X. Han. 2010. *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis* (4<sup>th</sup> edition), 446 pages (Oily Press, Bridgwater, U.K.)
- Christie W.W. 2012. What is a Lipid?. En: <https://lipidlibrary.aocs.org>. Last updated: February 24<sup>th</sup>, 2014.
- Corral M.L., H. Grizel, J. Montes & E. Polanco. 2000. La Acuicultura: Biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial. Tomo I. Análisis del desarrollo de los cultivos: medio, agua y especies, (Grupo Mundi-Prensa ed.) Fundación Alfonso Martín Escudero, Madrid, España. 258 pp.
- Cuvier G. 1797. Tableau elementaire de l'histoire naturelle des animaux. 710 pages, 14 plates. Paris.
- D'Aniello A., L. Strazzullo, G. D'Onofrio & M. Pischetola. 1986. Electrolytes and nitrogen compounds of body fluids and tissues of *Octopus vulgaris* Lam. *Journal of Comparative Physiology B*, 156(4), 503-509.
- Domingues P., G. Gaxiola-Cortés & C. Rosas-Vázquez. 2004. Alimentación y Nutrición de Moluscos Cefalópodos: Avances Recientes y Perspectivas Futuras. En: Cruz-Suárez L.E., D. Ricque-Marie, M.G. Nieto-López, D. Villarreal, U. Scholz & M. González (2004) Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México
- Domingues P., N. López, J. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola & C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatán octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13: 273-280.
- Domingues P., A. Ferreira, L. Márquez, J. Andrade, N. López & C. Rosas. 2008. Growth, absorption and assimilation efficiency by mature cuttlefish (*Sepia officinalis*) fed with alternative and artificial diets. *Aquaculture International*, 16: 215-229.
- Domingues P., S. García, I. Hachero, N. López & C. Rosas. 2010. The use of alternative prey (crayfish, *Procambarus clarkii*, and hake, *Merluccius gayi*) to culture *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Aquaculture International*, 18: 487-499
- Estadísticas Pesqueras (Diciembre, 2008). En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/>
- Estadísticas Pesqueras (Abril, 2013). En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/>
- Estadísticas Pesqueras (Noviembre, 2013). En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/>
- Estadísticas Pesqueras (Abril, 2015). En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/>
- Estefanell J., J. Roo, R. Guirao, J.M. Afonso, H. Fernandez-Palacios, M. Izquierdo & J. Socorro. 2012. Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) fed fresh and

- agglutinated moist diets based on aquaculture by-products and low price trash species. *Aquaculture Research*, 44(1): 93–105.
- Estefanell J., J. Socorro, M. Izquierdo & J. Roo. 2013. Growth, food intake, protein retention and fatty acid profile in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed agglutinated moist diets containing fresh and dry raw materials based on aquaculture by-products. *Aquaculture Research*, 45(1): 54-67.
- Estefanell J., J. Roo, R. Guirao, M. Izquierdo & J. Socorro. 2014. Biological performance of *Octopus vulgaris* in integrated aquaculture models: effect of two potential fresh diets, sex and sexual maturation during the grow-out phase. *Aquaculture Research*, 45: 1470–1480.
- Estefanell J., J. Socorro, M. Izquierdo & J. Roo. 2015. Effect of two fresh diets and sexual maturation on the proximate and fatty acid profile of several tissues in *Octopus vulgaris*: specific retention of arachidonic acid in the gonads. *Aquaculture Nutrition*, 21(3): 274-285.
- Fahy E., D. Cotter, M. Sud & S. Subramaniam. 2011. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637-647.
- FAO. 2008. *The state of the world fisheries, aquaculture 2008*. SOFIA, Rome, Italy. 176 pp.
- FAO. 2010. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*. SOFIA, Rome, Italy, 218 pp.
- Ferguson G.P. & J.B. Messenger. 1991. A countershading reflex in cephalopods. *Proc. Royal Soc. Lond. B* 243: 63-67.
- Fernández-Pérez J. 2005. Consideraciones sobre la pesca romana en Hispania. En: *Artifex: Ingeniería romana en España*, 456 pp (Fundación Juanelo Turriano & Ministerio de Cultura eds.) Ministerio de Fomento, Centro de Publicaciones, Madrid, España. ISBN 84-369-3567-5.
- García-Cabrera C. 1968. Biología y pesca del pulpo (*Octopus vulgaris*) y choco (*Sepia officinalis*) en aguas del Sáhara español. *Publicación Técnica de la Junta Estatal de Pesca*, 7, 98-141.
- García-García J., L.M. Rodríguez-González & B. García-García. 2004. Cost analysis of octopus ongrowing installation in Galicia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 531-537.
- Globefish. 2009. En: <http://www.globefish.org/cephalopods-november-2009.html>
- Globefish. 2011. En: <http://www.globefish.org/octopus-august-2011.html>
- Globefish. 2012. En: <http://www.globefish.org/cephalopds-may-2012.html>
- Globefish. 2013. En: <http://www.globefish.org/cephalopods-june-2013.html>
- Globefish. 2015. En: <http://www.globefish.org/octopus-june-2015.html>
- Grimpe G. 1916. Chunioteuthis.- Eine neue Cephalopoden-gattung. *Zoologische Anzeiger*, 46(12):349-359.
- Grimpe G. 1921a. Teuthologische Mitteilungen. VII. Systematische Übersicht der Nordsee-cephalopoden. *Zoologische Anzeiger*, 52(12/13):297-305.
- Guerra A. 1978. Sobre la alimentación y el comportamiento alimentario de *Octopus vulgaris*. *Inv. Pesq.*, 42(2): 351-364.



- Guerra A. 1982. Reflexiones sobre la distribución geográfica de *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). En: *Actas del IV Congreso Nacional de Malacología. Gijón* (Vol. 11).
- Guerra A. 1992. *Mollusca: Cephalopoda*. En: Ramos M.A. J. Alba, X. Bellés, J. Gosálbez, A. Guerra, E. Macpherson, F. Martín, J. Serrano & J. Templado (eds.), *Fauna Ibérica*. Vol. 1. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) Madrid. 327 p.
- Guerra A. & M. Nixon. 1987. Crab and mollusc shell drilling by *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) in the Ria de Vigo (north-west Spain). *Journal of Zoology*, 211(3), 515-523.
- Hamazaki H., K. Fukunaga, Y. Yoshida, & K. Maruyama. 1991. Effects of marine microalgae *Nannochloropsis* sp. on survival and growth on rearing pelagic paralarvae of *Octopus vulgaris*, and results of mass culture in the tank of 20 metric tons. *Saibai-giken*, 19, 75-84.
- Hanlon R.T. & J.B. Messenger. 1996. *Cephalopod Behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hernández-López J.L. 2000. Biología, ecología y pesca del pulpo común (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en aguas de Gran Canaria (Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).
- Iglesias J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1996. The octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier): a candidate for aquaculture? *International Council for the Exploration of the Sea*. Council Meeting. ICES 1996/ F: 10. Mariculture Committee.
- Iglesias J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier) en el IEO. En: Costa J., E. Abellán, B. García, A. Ortega & S. Zamora (eds.), *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura. Cartagena, 1997*. ISBN: 84-491-0323-1, 221-226 pp.
- Iglesias J., F.J. Sánchez, J.J. Otero & C. Moxica. 2000. Culture of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier): Present knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. *Cabiers Options Méditerranéennes*, 47: 313-321.
- Iglesias J., J.J. Otero, C. Moxica, L. Fuentes & F.J. Sánchez. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12: 481-487.
- Iglesias J., L. Fuentes, J. Sánchez, J.J. Otero, C. Moxica & M.J. Lago. 2006. First feeding of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) paralarvae using *Artemia*: effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261: 817-822.
- Iglesias J., F.J. Sánchez, J.G.F. Bersano, J.F. Carrasco, J. Dhont, L. Fuentes, F. Linares, J.L. Muñoz, S. Okumura, J. Roo, T. van der Meeren, E.A.G. Vidal & R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266: 1-15.
- Imamura S., 1990. Larval rearing of Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier). The progress of technological development and some problems remained. *Collect. Breed* 52, 339-343 (en japonés).
- Itami K., Y. Izawa, S. Maeda & K. Nakai. 1963. Notes on the laboratory culture of the octopus larvae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 29: 514-520.
- Leach W.E. 1817. Synopsis of the Orders, Families, and Genera of the Class Cephalopoda. The Zoological Miscellany; being Descriptions of New or Interesting Animals, 3(30):137-141.



- Lee P.G. 1994. Nutrition of cephalopods: Fueling the system. In: Pörtner H.O., R.K. O'Dor & D.L. Macmillan (eds). *Physiology of Cephalopod Molluscs: Lifestyle and Performance Adaptations*. Gordon & Breach Publishers, Switzerland, pp. 35-51.
- Lee P.G., P.E. Turk, W.T. Yang & R.T. Hanlon. 1994. Biological characteristics and biomedical applications of the squid *Sepioteuthis lessoniana* cultured through multiple generations. *The Biological Bulletin*, 186(3), 328-341.
- Linnaeus C. 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Holmiae, 1758, Leipzig 1894, (Ed. 10), 824 pp.
- Mangold K. 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44: 81-93.
- Mangold K. & S.v. Boletzky. 1973. New dates on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19: 7-12.
- Mangold K. 1997. *Octopus vulgaris*: review of the biology. In: Lang M.A. & F.G. Hochberg (eds) *Proceeding of the Workshop on The Fishery and Market Potential of Octopus in California*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution, pp. 85-90.
- Mangold K. 1998. The Octopodinae from the Eastern Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. In: Voss N.A., M. Vecchione, R.B. Toll & M.J. Sweeney (editors) *Systematics and Biogeography of Cephalopods*. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 586(2): 521-528.
- Mangold K. & R.E. Young. 1998. The Systematic value of the digestive organs. In: Voss N.A., M. Vecchione, et al. eds. *Systematic and biogeography of Cephalopods*. Washington, Smithsonian Institution. v. 1, p. 21-29.
- Mather J.A. & R.K. O'Dor. 1991. Foraging strategies and predation risk shape the natural history of juvenile *Octopus vulgaris*. *Bulletin of Marine Science*, 49(1-2), 1-2.
- Mathews C.K. & K.E. Van Holde. 1998. *Bioquímica* (2ª edición). McGraw-Hill/ Interamericana. Madrid.
- Montolio-Fernández M.A. & Serrano-Jerez M.A. 2006. *Conozcamos el mar: Suplemento Especial*, (Garrido-Rodríguez N. ed.) Editorial Academia. La Habana, Cuba. 32 pp.
- Morillo-Velarde P.D., J. Cerezo-Valverde, M.D. Hernández, F. Aguado-Gimenez & B. García-García. 2012. Growth and digestibility of formulated diets based on dry and freeze-dried ingredients in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 368: 139-144.
- Nigmatulin C.M. & A.A. Ostapenko. 1976. Feeding of *Octopus vulgaris* Lam. from the northwest African coasts. ICES Committee Meet (Shellfish Benthos Committee), K6: 1-13.
- O'Dor R.K. & M.J. Wells. 1987. Energy and nutrient flow. En: Boyle P.R. (Ed.) *Cephalopod life cycles*, vol 2., Academic Press, New York. 109-133 pp.
- Okutani T., Tagawa M. & H. Horikawa. 1987. *Cephalopods from continental shelf and slope around Japan*. Japanese Fisheries Resource Conservation Association. Tokyo. 194 pp.
- Orbigny A.d'. 1840. Mollusques. *Voyage dans l'Amerique Méridionale*, 5(3):1-758. Atlas of 85 plates.

- Otero-Villar J. 2006. Ecología del pulpo común (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) en un área de afloramiento costero (Galicia, NE atlántico). Tesis Doctoral. Universidad de Vigo (España). 187 pp.
- Packard A. & G.D. Sanders. 1969. What the octopus shows to the world? *Endeavor* 28(104): 92-99.
- Portner H.O. & R.K. O'Dor. 1994. Physiology of cephalopod molluscs. En: Macmillan D.L. (Ed.) *Lifestyle and performance adaptations*, 214 p. Gordon & Breach Publishers, Basilea, Suiza.
- Querol P., I. Gairin, G. Guerao, M. Jover & A. Tomas. 2013. Growth and feed efficiency of *Octopus vulgaris* fed on dry pelleted. *Aquaculture Research*, 1–7. DOI: 10.1111/are.12269.
- Querol P., I. Gairín, G. Guerao, R. Monge, M. Jover & A. Tomás. 2014. Effect of two extruded diets with different fish and squid meal ratio on growth, digestibility and body composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Aquaculture Research*, 1-9. DOI: 10.1111/are.12407.
- Quetglas A., F. Alemany, A. Carbonell, P. Merella & P. Sanchez. 1998. Biology and fishery of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, caught by trawlers in Mallorca (Balearic Sea, western Mediterranean). *Fisheries Research* 36, 237-249.
- Quintana D., P. Domingues & S. García. 2008. Effects of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*, 280: 161-164.
- Rama-Villar A., V. Faya-Angueira, C. Moxica & M. Rey-Méndez. 1997. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) en batea. En: Costa J., E. Abellán, B. García, A. Ortega & S. Zamora (Eds.). *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*, 245-250 pp, Cartagena, 1997. ISBN: 84-491-0323-1.
- Rocha F. 2003. Biología, Ecología, Cultivo y Pesquerías de Cefalópodos. Curso de Postgrado. Universidad Austral de Chile. Valdivia, 9 al 27 de junio de 2003. 235 pp.
- Rodríguez C., J.E. Carrasco & M. Rodríguez. 2003. Engorde de juveniles de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en jaulas. En: *IX Congreso Nacional de Acuicultura*, 268-269 pp, Cádiz, 11-16 May, 1993.
- Rodríguez C., J.F. Carrasco, J.C. Arronte & M. Rodríguez. 2006. Common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile ongrowing in floating cages. *Aquaculture*, 254(1): 293-300.
- Rodríguez-González T., J. Cerezo-Valverde, AV. Sykes, B. García-García. 2015. Performance of raw material thermal treatment on formulated feeds for common octopus (*Octopus vulgaris*) ongrowing. *Aquaculture*, 442: 37-43
- Roper C.F.E., M.J. Sweeney & C.E. Nauen. 1984. FAO species catalogue. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. Rome: FAO, 277 pp.
- Seixas P.F. 2009. Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797), alimentadas con juveniles de *Artemia* enriquecidos con microalgas y otros suplementos nutricionales. Tesis Doctoral. Universidad Santiago de Compostela. 289 pp.
- Smale M.J. & P.R. Buchan. 1981. Biology of *Octopus vulgaris* off the East coast of South Africa. *Marine Biology (Berlin)*, 65: 1-12.
- Smith M.R. & Caron J.B. 2010. Primitive soft-bodied cephalopods from the Cambrian. *Nature*, 465: 427-428.

- Sweeney M.J. & C.F.E. Roper. 2001. Current classification of recent cephalopoda. 1-59.
- The LIPID MAPS Lipidomics Gateway, <http://www.lipidmaps.org/>
- Vaz-Pires P., P. Seixas & A. Barbosa. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797): a review. *Aquaculture*, 238(1-4): 221-238.
- Vidal, E.A.G. 2014. Advances in marine biology. Advances in Cephalopod Science: Biology, Ecology, Cultivation and Fisheries. Vol 67. Academic Press. 452 p
- Villanueva R., C. Nozais & S.v. Boletzky. 1995. The planktonic life of octopuses. *Nature*, 377, 107.
- Warnke K., R. Söller, D. Blohm & U. Saint-Paul. 2004. A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 42(4): 306-312.
- Wells M.J. 1978. Octopus. *Physiology and behaviour of an advanced invertebrate*. Chapman & Hall, London. 417 p.
- Wells M.J. 1990. Oxygen extraction and jet propulsion in cephalopods. *Canadian Journal of Zoology*, 68: 815-824.
- Wells M.J. & J. Wells. 1982. Ventilatory currents in the mantle of cephalopods. *J. Exp. Biol.*, 99: 315-330.
- Young R.E., M. Vecchione & D.T. Donovan. 1998. The evolution of coleoid cephalopods and their present biodiversity and ecology, pp. 393-420. In: A.I.L. Payne, L. Lipinski, M.R. Clarke & M.A.C. Roeleveld (Eds.). Cephalopod Biodiversity, Ecology and Evolution. South African Journal of Marine Science, volume 20, 469 pp.
- Young R.E., E. Richard, M. Vecchione & K.M. Mangold (1922-2003). 2010. Cephalopoda Cuvier 1797. Octopods, squids, nautilus, etc. In: <http://tolweb.org/Cephalopoda/19386/2010.05.03> in The Tree of Life Web Project (<http://tolweb.org/>) Version 03 May 2010 (under construction).

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Desarrollo de dietas artificiales para el pulpo común *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797), con el fin de optimizar su cultivo en la fase de engorde.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1

Determinar los efectos de tres densidades de cultivo diferentes sobre el crecimiento y la supervivencia de juveniles de *O. vulgaris*, cultivados a una temperatura media de 20 °C.

2

Utilizar presas alternativas (cangrejo de río, *Procambarus clarkii*, y merluza, *Merluccius gayi*) para el cultivo de *O. vulgaris*.

Determinar los efectos de dos presas alternativas de bajo coste económico, comparado con crustáceos o calamar utilizados normalmente para el engorde de pulpos en nuestro laboratorio, sobre el crecimiento, la supervivencia y el balance energético de *O. vulgaris*.

Determinar la composición en ácidos grasos de la glándula digestiva en juveniles y adultos de *O. vulgaris* alimentados con presas alternativas.

3

Determinar si el crecimiento de *O. vulgaris* puede ser mejorado con incrementos en la concentración de hidrolizado de proteínas de pescado (CPSP<sup>®</sup>) en la dieta.

Evaluar si el uso de dos aglutinantes (gelatina y alginato) es adecuado en la elaboración de una dieta para *O. vulgaris*.

Evaluar el efecto de las dietas artificiales sobre la composición en lípidos de la glándula digestiva de juveniles de *O. vulgaris*.

4

Evaluar el efecto de dietas artificiales sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de *O. vulgaris*.

Estudiar el efecto de dietas artificiales sobre la fisiología energética de juveniles de *O. vulgaris*.

Determinar el efecto de dietas artificiales sobre la composición lipídica del manto y glándula digestiva de juveniles de *O. vulgaris*.

Determinar los efectos de dos aglutinantes (gelatina y alginato) sobre el crecimiento, la supervivencia, el balance energético parcial y la composición lipídica del manto y la glándula digestiva de *O. vulgaris* alimentado con diferentes dietas artificiales.

## 5

Determinar la composición en lípidos totales, clases lipídicas y ácidos grasos del manto y la glándula digestiva de pulpos mantenidos en ayuno durante 27 días.

Determinar cómo clases lipídicas y ácidos grasos del manto y glándula digestiva de pulpos bajo condiciones de ayuno prolongado, son mantenidos, transformados y utilizados por el animal.

Determinar la capacidad de usar como reservas nutricionales distintas clases lipídicas y ácidos grasos presentes en el manto y la glándula digestiva de pulpos mantenidos bajo condiciones de ayuno prolongado.

Determinar las clases lipídicas y los ácidos grasos esenciales en *O. vulgaris* para entender la importancia de éstos respecto a su metabolismo y nutrición así como en el desarrollo de dietas preparadas eficientes para el engorde de esta especie.

## 6

Determinar la composición proteica y en aminoácidos del manto de pulpos *O. vulgaris* mantenidos durante 27 días en ayuno.

Determinar cómo las proteínas y los aminoácidos son mantenidos, transformados y utilizados por el animal en condiciones de inanición.

Determinar la composición proteica y en aminoácidos del manto de pulpos para obtener información sobre su metabolismo y nutrición, y ayudar al desarrollo de eficientes alimentos artificiales para el engorde de dicha especie.

## 7

Caracterizar la actividad proteasa del jugo gástrico y la glándula digestiva de *O. vulgaris* con la intención de determinar el pH y la temperatura óptimas de las proteasas digestivas y de buscar sus características bioquímicas usando inhibidores enzimáticos.

Toda esta información dará una mejor idea de la forma en la que el proceso digestivo se desarrolla en *O. vulgaris* ayudando en la búsqueda de la mejor manera de alimentar a esta especie en condiciones de cautividad.

# **CAPÍTULOS EXPERIMENTALES**

## EFFECTO DE TRES DENSIDADES DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA SUPERVIVENCIA DE *Octopus vulgaris* (CUVIER, 1797).

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental están publicados en el artículo:

Domingues P, **García S**, Garrido D (2010) *Effects of three culture densities on growth and survival of Octopus vulgaris (Cuvier, 1797)*. Aquaculture International 18: 165-174. DOI 10.1007/s10499-008-9233-3.

### 1.1. Resumen

El principal objetivo de esta investigación fue analizar los efectos de tres densidades de cultivo sobre el crecimiento y la supervivencia en *Octopus vulgaris*. De manera aleatoria, 141 pulpos subadultos ( $1175,4 \pm 194,9$  g) fueron distribuidos en nueve tanques de  $2 \text{ m}^3$  cada uno ( $3,6 \times 1,1 \times 0,05$  m). Tres tanques fueron sembrados a una densidad de cultivo inicial baja ( $4 \text{ kg m}^{-3}$ ), tres tanques a una densidad inicial media ( $8 \text{ kg m}^{-3}$ ) y, por último, otros tres tanques a una densidad inicial alta ( $15 \text{ kg m}^{-3}$ ). Los pulpos se alimentaron con calamar (*Loligo gahi*) congelado, a una ración diaria del 5 % pc d<sup>-1</sup> (porcentaje del peso corporal al día). El experimento duró 70 días. La temperatura del agua varió entre  $20 \pm 2$  °C y la salinidad entre  $36 \pm 1$  ppt. Durante todo el experimento, la concentración de oxígeno disuelto fue siempre superior al 75 % y la concentración de amonio menor al  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en crecimiento ni en tasas de crecimiento ( $0,9 \pm 0,2$ ,  $1,1 \pm 0,2$  y  $1,2 \pm 0,1$  % pc d<sup>-1</sup>) entre pulpos cultivados a densidad alta, media y baja, respectivamente. Sin embargo, la mortalidad fue significativamente menor en pulpos a baja densidad, comparados con los cultivados a las otras dos densidades. La máxima densidad de cultivo en tanques ( $25 \text{ kg m}^{-3}$ ) se alcanzó tras 56 días de experimento.

**Palabras clave:** Densidad · Crecimiento · Cultivo · Mortalidad · *Octopus vulgaris*.



## 1.2. Introducción

*Octopus vulgaris* es uno de los cefalópodos mejor conocidos y más estudiados (Cagnetta & Sublimi, 2000; Vaz-Pires *et al.*, 2004). Esta especie posee una alta tasa de conversión del alimento (40 - 60 %) (Wells, 1978; Mangold, 1983; Smale & Buchan, 1981), una rápida tasa de crecimiento, en torno al 3 % pc d<sup>-1</sup> (Mangold & Boletzky, 1973), y un alto contenido proteico (70 - 90 % de su composición corporal, en peso seco) (Lee, 1994). Su fecundidad también es elevada, contabilizándose de 100.000 a 500.000 huevos por hembra (Iglesias *et al.*, 1996; 1997).

Japón fue pionera en cultivar con éxito esta especie (Itami *et al.*, 1963), obteniendo juveniles bentónicos a los 33 días. Durante la década de los noventa, científicos españoles comenzaron a investigar sobre la acuicultura de *O. vulgaris*, centrándose tanto en la cría de paralarvas como en el crecimiento o engorde de juveniles capturados del medio natural (Iglesias *et al.*, 2007). El ciclo de vida de *O. vulgaris* se completó por primera vez en España (Iglesias *et al.*, 2004).

*O. vulgaris* es una especie potencial para la diversificación de la acuicultura (García-García *et al.*, 2004). El engorde de esta especie se lleva actualmente a cabo en Galicia, en el norte de España (Iglesias *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2003), con una producción anual máxima en 1998 y 1999 de 33 tm (Sánchez *et al.*, 1998; Luaces-Canosa & Rey-Méndez, 2001; FAO, 2002; García-García *et al.*, 2004). La producción anual disminuyó a 14,6 tm en 2001 (García-García *et al.*, 2004) debido a la dependencia del cultivo en la captura de juveniles del medio natural y a la ausencia de una adecuada dieta artificial.

Los principales problemas para conseguir una sólida acuicultura comercial de *O. vulgaris* son la alta mortalidad en la fase paralarvaria del ciclo de cultivo (Iglesias *et al.*, 2004; 2006; 2007), que impide la producción de juveniles; y la falta de alimentos artificiales adecuados (Domingues *et al.*, 2007; 2008).

En la bibliografía existen diversos estudios sobre la influencia de las dietas durante el engorde de esta especie (Cagnetta & Sublimi, 2000; Aguado-Giménez & García-García, 2002; García-García & Aguado-Giménez, 2002), así como sobre el consumo de oxígeno durante el ayuno y después de ser alimentados (Cerezo-Valverde & García-García, 2004a; 2004b) y sobre la concentración de oxígeno adecuada según la temperatura en el cultivo (Cerezo-Valverde *et al.*, 2002; Cerezo-Valverde & García-García, 2004a; 2004b).

A pesar del gran interés por el cultivo de *O. vulgaris*, no existe mucha información sobre los efectos de la densidad de cultivo en esta especie. Además, al cultivar a altas densidades

otra especie de cefalópodo, *Sepia officinalis*, se observó un bajo crecimiento (Forsythe *et al.*, 2002; Domingues *et al.*, 2003; Correia *et al.*, 2005), mientras Otero *et al.* (2001) observó diferencias en la conversión de alimento y en el crecimiento de juveniles de *O. vulgaris* al encontrarse éstos a 10 y 20 kg m<sup>-3</sup> de densidad de cultivo. En el experimento de Otero *et al.* (2001) se alcanzó una densidad de cultivo final superior a 45,5 kg m<sup>-3</sup>, a temperaturas que variaron entre 13 y 16 °C. Dicho autor sugirió que la densidad inicial no debería ser mayor a 10 kg m<sup>-3</sup>.

El objetivo de esta investigación fue determinar los efectos de la densidad de cultivo sobre el crecimiento y la supervivencia de juveniles de *O. vulgaris*, cultivados a una temperatura media de 20 °C.

### 1.3. Material y métodos

#### Origen de los organismos y condiciones de aclimatación

Los pulpos fueron capturados en las costas de Huelva (sur de España) mediante nasas y transportados a las instalaciones de IFAPA Centro Agua del Pino (Cartaya, Huelva, España). Antes de llevar a cabo el estudio, los pulpos fueron aclimatados durante 15 días en tanques experimentales y alimentados con calamar (*L. gahi*).

#### Diseño experimental

Se distribuyeron 141 pulpos (1175,4 ± 194,9 g) aleatoriamente en 9 tanques de 2 m<sup>3</sup> cada uno (3,6 x 1,1 x 0,05 m) con flujo de agua abierto. Cada tanque de hormigón constaba de una malla metálica en su parte superior para evitar el escape de los animales.

Los pulpos fueron alimentados una vez al día (14:00 h) con calamar (*L. gahi*) congelado, a una ración diaria del 5 % pc d<sup>-1</sup> (peso húmedo alimento/ peso húmedo del animal). El calamar se descongelaba unas horas antes de su uso. Las raciones utilizadas estuvieron basadas en estudios previos (Aguado-Giménez & García-García, 2002; García-García & Aguado-Giménez, 2002; Chapela *et al.*, 2006), estimándose apropiadas para el engorde de esta especie. A la mañana siguiente, antes del siguiente período de alimentación, los restos de comida de cada tanque se retiraron y pesaron, para determinar la cantidad de alimento ingerido. La ración de alimento fue ajustada después de cada intervalo de muestreo.

La temperatura del agua fue de  $20 \pm 2$  °C, la salinidad de  $36 \pm 1$  ppt y el fotoperiodo natural, realizándose el experimento en Marzo de 2008. El flujo de agua fue ajustado para mantener la calidad de la misma en cada una de las tres densidades en estudio, con flujos de 1260, 1080 y 720 L h<sup>-1</sup> para los tanques con densidad alta, media y baja, respectivamente. Dicho flujo de agua mantuvo en los nueve tanques experimentales una concentración de oxígeno disuelto superior al 75 %, el pH entre 7,9 - 8,1 y una concentración de amonio menor al 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

La duración del experimento fue de 70 días debido a que en ese momento apareció el comportamiento reproductivo de la especie en todos los tanques experimentales.

### Densidad de cultivo

Se utilizaron tres densidades de cultivo: 1) Densidad inicial baja (4 kg m<sup>-3</sup>) en 3 tanques con siete pulpos cada uno; 2) Densidad inicial media (8 kg m<sup>-3</sup>) en otros 3 tanques, 14 pulpos tanque<sup>-1</sup>; y 3) Densidad inicial alta (15 kg m<sup>-3</sup>) en los últimos 3 tanques, 26 pulpos tanque<sup>-1</sup>. No hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los pesos de los animales entre los 9 replicados (tanques) al inicio del experimento.

### Crecimiento y consumo del alimento

Durante el experimento, los pulpos fueron pesados individualmente cada 3, 6, 8 y 10 semanas. Para cada intervalo de muestreo, se calcularon los siguientes parámetros:

- a. Tasa de crecimiento instantánea (IGR)

$$\text{IGR} = ((\ln W_2 - \ln W_1)/t) \times 100 \text{ (\% pc d}^{-1}\text{)}$$

Siendo:

- $W_2$  y  $W_1$ , el peso húmedo final e inicial (g) de los pulpos, respectivamente.
- $\ln$ , el logaritmo natural.
- $t$ , el número de días del periodo experimental.
- % pc d<sup>-1</sup>, porcentaje del peso corporal por día.

## b. Tasa de ingestión (FR)

$$FR = (FI / W \text{ promedio } (t)) \times 100 (\% \text{ pc } d^{-1})$$

Siendo:

- FI, la cantidad de alimento consumido (g).
- W promedio (t), promedio de peso húmedo ganado de los pulpos (g) por un período de tiempo t (días, d).
- % pc d<sup>-1</sup>, porcentaje del peso corporal por día.

## c. Eficiencia de conversión (FC)

$$FC = ((W_2 - W_1) / FI) \times 100 (\%)$$

Siendo:

- W<sub>2</sub>-W<sub>1</sub>, peso ganado (g) por los pulpos durante el período de tiempo en estudio.
- FI, la cantidad de alimento consumido (g).

## d. Densidad (D)

$$D = W / 2 (\text{kg } m^{-3})$$

Siendo:

- W, peso húmedo total de los pulpos (kg) de cada tanque para cada periodo de muestreo.
- 2, volumen de cultivo en cada tanque (m<sup>-3</sup>).

## e. Supervivencia (S):

$$S = ((P_2 \times 100) / P_1) (\%)$$

Siendo:

- P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>, número de pulpos al inicio y al final del periodo de muestreo (en cada tanque), respectivamente.

## Análisis estadístico

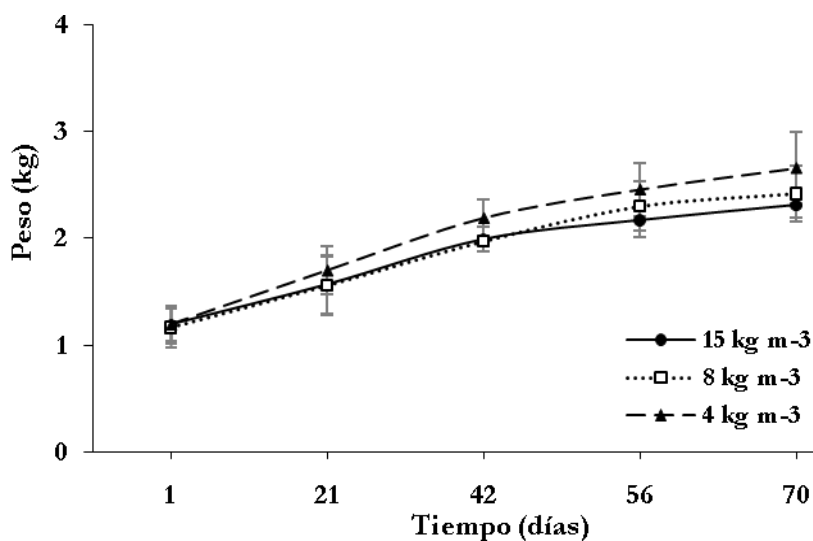
Las diferencias estadísticas en peso, crecimiento, tasas de ingestión y eficiencias de conversión entre los tres tratamientos ensayados fueron analizadas mediante el análisis de varianza (*ANOVA* de una vía) (Zar, 1999). Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó el test de Tukey de comparación múltiple (Zar, 1999) con un intervalo de confianza del 95%.

La distribución normal de los datos fue verificada mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov de una vía y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene (Zar, 1999). Se utilizó el programa estadístico STATISTICA 9.0.

## 1.4. Resultados

### Crecimiento

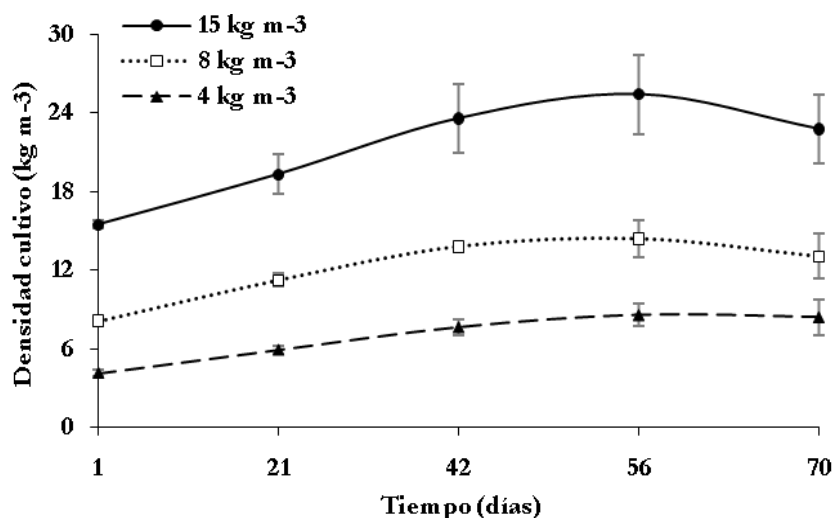
La Figura 1.1 muestra el crecimiento de los pulpos cultivados a las tres densidades en estudio. Para cada periodo de muestreo, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el peso de los pulpos entre los tanques o densidades de cultivo. El peso final de los pulpos fue de  $2310,4 \pm 121,1$ ,  $2419,2 \pm 258,0$  y  $2660,0 \pm 331,6$  g para pulpos cultivados a alta, media y baja densidad, respectivamente.



**Figura 1.1** Crecimiento en peso (kg) de juveniles del pulpo común *O. vulgaris* cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m<sup>-3</sup>) durante 70 días. Las barras indican desviación estándar.

## Densidad

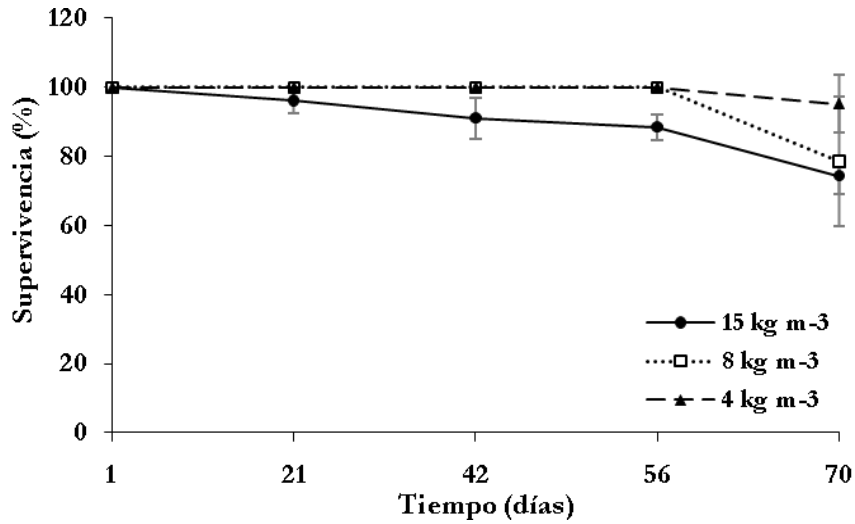
La Figura 1.2 muestra la densidad de cultivo de los pulpos ( $\text{kg m}^{-3}$ ) durante el estudio. La mayor densidad se obtuvo en tanques con densidad inicial alta y fue de  $25,4 \pm 3,0 \text{ kg m}^{-3}$  después de 56 días de experimento. A partir de este momento, la densidad disminuyó en los tanques con densidad inicial media y alta, y se mantuvo estable en los tanques con densidad baja.



**Figura 1.2** Densidad de cultivo por tanque ( $\text{kg m}^{-3}$ ) de juveniles del pulpo común *O. vulgaris* cultivado a tres densidades diferentes ( $15, 8$  y  $4 \text{ kg m}^{-3}$ ) durante 70 días. Las barras indican desviación estándar.

## Supervivencia

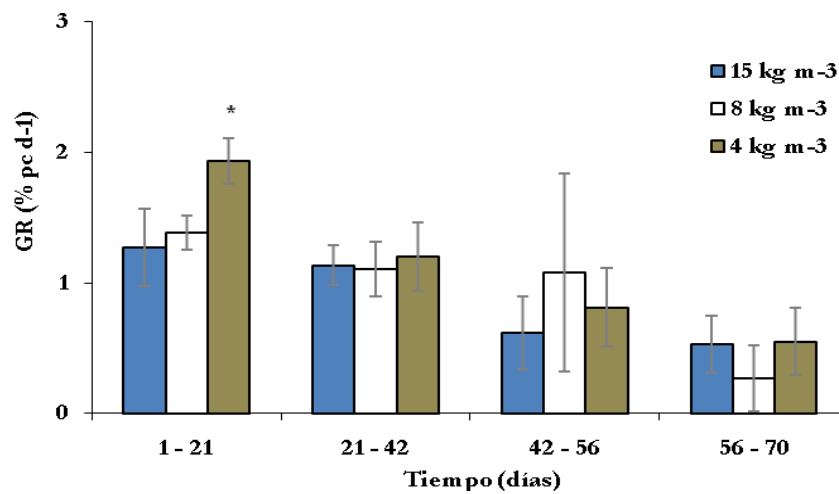
La Figura 1.3 muestra la supervivencia (%) durante el estudio. Hasta el día 56, no se registró ningún caso de mortalidad a densidad baja y media, pero a densidad alta hubo una mortalidad baja aunque constante. El porcentaje más bajo de supervivencia fue registrado durante las últimas dos semanas de experimentación en tanques con densidad alta y media, incluso con la calidad del agua y la temperatura constantes y sin cambios respecto a los primeros 56 días. Por el contrario, entre los tres tanques o replicados a densidad baja sólo se observó un caso de mortalidad.



**Figura 1.3** Supervivencia (%) de juveniles del pulpo común *O. vulgaris* cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m<sup>-3</sup>) durante 70 días. Las barras indican desviación estándar.

### Tasa de crecimiento

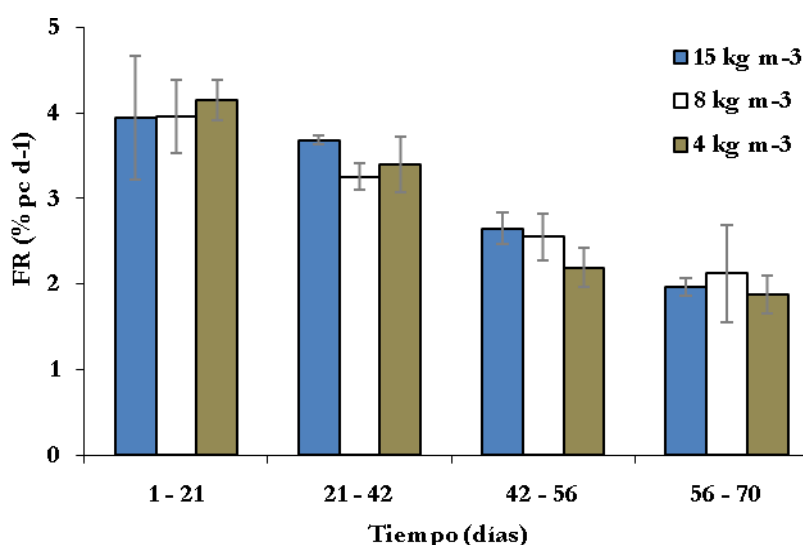
En cuanto a las tasas de crecimiento, sólo fueron significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) para baja densidad durante los primeros 21 días. Después de este periodo, las IGR fueron similares ( $p > 0,05$ ) bajo las tres densidades en estudio (Figura 1.4). Las tasas de crecimiento medias para todo el experimento fueron  $0,9 \pm 0,2$ ,  $1,1 \pm 0,2$  y  $1,2 \pm 0,1$  % pc d<sup>-1</sup> para densidad alta, media y baja, respectivamente, sin presentar diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellas.



**Figura 1.4** Tasas de crecimiento (GR; porcentaje del peso corporal por día, % pc d<sup>-1</sup>) para cada periodo de muestreo de juveniles del pulpo común *O. vulgaris* cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m<sup>-3</sup>), durante 70 días. Las barras indican desviación estándar.

### Tasa de ingestión

Las tasas de ingestión (Figura 1.5) disminuyeron de manera constante desde aproximadamente 4 al 2 % pc d<sup>-1</sup> al final del experimento, para las tres densidades. En ningún periodo de muestreo hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las densidades en estudio en cuanto a FR. Las tasas de ingestión totales fueron iguales entre sí ( $p > 0,05$ ), con valores de  $3,1 \pm 0,9$ ,  $3,0 \pm 0,8$  y  $2,9 \pm 1,1$  % pc d<sup>-1</sup> para pulpos cultivados a alta, media y baja densidad, respectivamente.

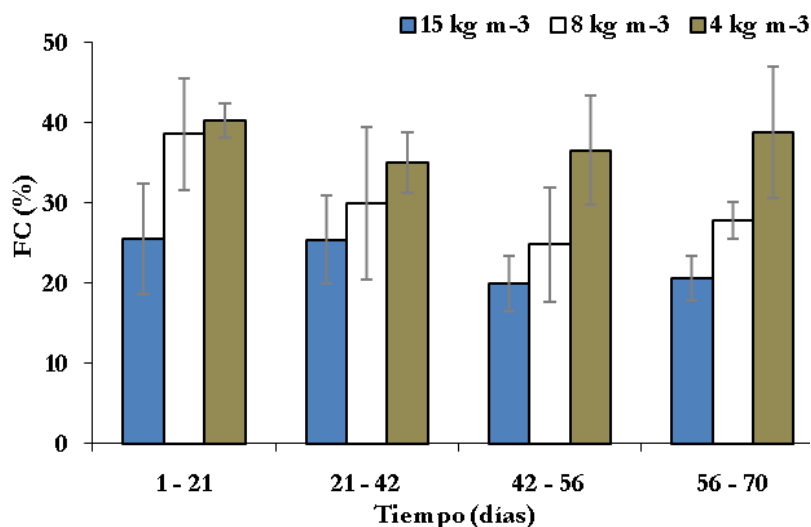


**Figura 1.5** Tasas de ingestión (FR; porcentaje del peso corporal por día, % pc d<sup>-1</sup>) para cada periodo de muestreo de juveniles del pulpo común *O. vulgaris* cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m<sup>-3</sup>), durante 70 días. Las barras indican desviación estándar.

### Eficiencia de conversión

Las eficiencias de conversión (Figura 1.6) totales fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para las tres densidades en estudio. Los valores observados fueron  $22,9 \pm 3,0$ ,  $30,3 \pm 5,9$  y  $37,7 \pm 2,3$  % para pulpos cultivados a densidad alta, media y baja, respectivamente.





**Figura 1.6** Eficiencias de conversión (FC; %) para cada periodo de muestreo de juveniles del pulpo común *O. vulgaris* cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m<sup>-3</sup>), durante 70 días. Las barras indican desviación estándar.

## 1.5. Discusión

El engorde industrial del pulpo *O. vulgaris* comenzó en Galicia (noroeste de España) a mitad de la década de los 90, donde pequeñas empresas se dedicaron al engorde de juveniles (750 g) capturados del medio natural (Rama-Villar *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 1998; Iglesias *et al.*, 2000; 2007; Luaces-Canosa & Rey-Méndez, 2001).

En la bibliografía hay disponible bastante información sobre el engorde de *O. vulgaris* en España (Iglesias *et al.*, 1997; 2000), Portugal (Sendao *et al.*, 1998) e Italia (Cagnetta & Sublimi, 2000). Las tasas de crecimiento obtenidas en este trabajo, cercanas al 1% pc d<sup>-1</sup>, fueron parecidas a las obtenidas para esta especie a temperaturas similares (Cagnetta & Sublimi, 2000; García-García & Aguado-Giménez, 2002) y superiores a las observadas por Iglesias *et al.* (2000), Otero *et al.* (2001) y Chapela *et al.* (2006), que llevaron a cabo el cultivo de *O. vulgaris* a baja temperatura. Así, la temperatura influye en gran medida en el crecimiento de los cefalópodos (Domingues *et al.*, 2005), en las eficiencias de conversión (Domingues, 1999) y en la ingestión (Domingues *et al.*, 2006; 2007).

Aunque las tasas de ingestión disminuyeron de 4 al 2 % pc d<sup>-1</sup> para las tres densidades estudiadas durante el experimento, no significa que los pulpos tomaran cada vez menor cantidad de comida. De hecho, la cantidad de alimento consumido fue similar durante el estudio para las tres densidades. FR es una tasa que correlaciona la cantidad de alimento ingerido con el peso del animal, por ello la disminución de FR refleja el aumento de peso

de los animales. Al ir creciendo los pulpos y mantener constante la cantidad de alimento ingerido, da lugar a una disminución de las tasas de ingestión.

Es común encontrar en la bibliografía valores de conversión entre 15 y 43 % para esta especie (Mangold & Boletzky, 1973; Vaz-Pires *et al.*, 2004). Los valores de conversión obtenidos para las tres densidades estudiadas estuvieron dentro de este rango. Sin embargo, para el cultivo a baja densidad ( $4 \text{ kg m}^{-3}$ ) FC fue cercana y mayor al 40 %, lo que indica que la densidad de cultivo no afectó al crecimiento y que las condiciones fueron las apropiadas para el engorde de los pulpos. Los valores de conversión de alimento para pulpos a alta y baja densidad (22 % y 30 %, respectivamente) fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) a la FC observada en pulpos cultivados a baja densidad. Teniendo en cuenta que no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para tasas de ingestión entre las tres densidades en estudio, los diferentes valores de conversión indican que cuando la densidad aumenta, los pulpos utilizan principalmente la energía consumida para fines metabólicos disminuyendo así la energía empleada para producción de biomasa o crecimiento. Probablemente, una alta densidad de cultivo provoca en los pulpos mayor estrés, derivando en una alta movilidad de los animales en el tanque y, consecuentemente, en un gasto energético superior para dicha movilidad y para confrontaciones territoriales entre ellos.

Por tanto, el crecimiento también se vio afectado por la densidad aunque no de manera significativa ( $p > 0,05$ ), ya que al final del experimento los pulpos fueron más grandes cuanto menor fue la densidad. La explicación más probable de no haber encontrado diferencias entre los pesos de los pulpos cultivados bajo las tres densidades puede atribuirse a la gran diferencia entre pesos por tanque, produciendo así una alta desviación estándar al final del experimento.

El hecho de no encontrar diferencias significativas en el crecimiento de *O. vulgaris* cultivado durante 70 días bajo tres densidades distintas fue para nosotros sorprendente. Incluso teniendo en cuenta la dispersión típica del peso en cefalópodos, que aumenta la desviación estándar y dificulta la obtención de diferencias significativas, esperábamos encontrarlas; así, en el choco (*Sepia officinalis*) tanto el área de fondo como la densidad de cultivo tienen un marcado efecto en su crecimiento (Forsythe *et al.*, 2002; Correia *et al.*, 2005). El carácter más bentónico de *O. vulgaris* con respecto a *S. officinalis*, y el hecho de que su movimiento en el tanque sea mucho menor que el del choco, podría hacer al pulpo una especie más resistente a altas densidades de cultivo.

Según Cagnetta & Sublimi (2000), es mejor el crecimiento del pulpo común alimentado con cangrejos que al ser alimentados con calamar o con peces. Sin embargo, en experimentos llevados a cabo en nuestro centro de investigación, observamos que el calamar (*L. gahi*) produce un crecimiento similar y una supervivencia comparable a la de pulpos alimentados con cangrejos, además de reducir considerablemente las labores de limpieza en tanques (Domingues *et al.*, 2010). Tal y como concluyeron Cagnetta & Sublimi (2000), el uso de una monodieta puede dar lugar a un buen crecimiento en estos animales. Así, el crecimiento alcanzando por los pulpos en el presente trabajo, alimentando con una monodieta basada en calamar, fue mayor que el obtenido usando varias presas simultáneamente (Otero *et al.*, 2001; Chapela *et al.*, 2006).

No se observó casos de canibalismo durante el experimento, al igual que en los trabajos de Iglesias *et al.* (2000) y Vaz-Pires *et al.* (2004). La biomasa total y la consecuente densidad de cultivo en los tanques aumentó considerablemente hasta el día 56 del experimento en los tres grupos. Incluso la baja mortalidad, sólo observada a densidad alta, no provocó que la biomasa total o la densidad de cultivo disminuyeran en este tratamiento. Esto puede explicarse por el considerable aumento del peso individual de los pulpos en los tanques. Desde el día 56 hasta el final del experimento, la biomasa total y la densidad de cultivo disminuyeron en los tanques a alta y media densidad. Este hecho fue causado exclusivamente por el aumento de la mortalidad a estas dos densidades de cultivo. Parece que después de alcanzar una densidad de 20 a 25 kg m<sup>-3</sup>, podría ponerse en marcha algún mecanismo compensatorio en los pulpos que cause la muerte de algunos animales impidiendo así el incremento lineal de la biomasa. Este mecanismo podría tratarse de un comportamiento jerárquico, donde los pulpos más grandes no permitieran la alimentación o dificultaran la accesibilidad al alimento de los más pequeños. Dicha hipótesis puede sustentarse en el hecho de que la mortalidad afectó principalmente a los animales más pequeños. El mismo comportamiento jerárquico podría también ser la causa del aumento de la mortalidad a densidad de cultivo media, aunque en este tratamiento la densidad final fue mucho menor (aproximadamente 12 kg m<sup>-3</sup>) que la conseguida a alta densidad. La existencia de una “densidad de cultivo máxima” para este tipo de tanques y condiciones no pudo ser confirmada debido a la aparición del comportamiento reproductor en todos los tanques de cultivo, lo que obligó a finalizar el experimento en dicho momento. De hecho, el comportamiento reproductor fue observado a los 60 días en algunos tanques, y en todos a partir del día 70. Cuando los pulpos maduran y comienza este comportamiento, los machos crecen más que las hembras porque éstas sufren grandes cambios metabólicos

durante la maduración sexual, parando incluso su crecimiento somático (O'Dor & Wells, 1987; Iglesias *et al.*, 2000; García-García & Aguado-Giménez, 2002), pudiendo comprometer así los resultados observados sobre crecimiento y pudiendo incluso disminuir las tasas de crecimiento durante la última parte del estudio, especialmente a densidad de cultivo baja, donde la mortalidad no fue un factor importante ni significativo.

Otero *et al.* (2001) observaron densidades de cultivo superiores a  $45 \text{ kg m}^{-3}$ ; sin embargo, existen dos factores que podrían explicar fácilmente la densidad tan alta conseguida por estos autores. En primer lugar, los pulpos fueron cultivados en mar abierto, sin restricciones o limitaciones en la calidad del agua, y usando jaulas más grandes que permitieron una densidad de cultivo mayor. Y en segundo lugar, los autores usaron una temperatura de cultivo más baja ( $13 - 16 \text{ }^\circ\text{C}$ ) que reduce el metabolismo considerablemente y, por consiguiente, su agresividad. A  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  los pulpos son mucho más activos y, por tanto, la densidad de cultivo tiene que ser reducida bastante.

La información previa de la que se dispone sobre el engorde de esta especie es, principalmente, en cultivos con jaulas y en mar abierto, a una temperatura media menor a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los resultados obtenidos en este trabajo son los primeros en cuanto al cultivo del pulpo en tanques de tierra, a temperaturas de cultivo superiores a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  y utilizando el mínimo caudal de agua requerido para mantener la calidad del agua en un rango aceptable.

La información recopilada durante este trabajo indica que la densidad apropiada para el cultivo del pulpo en tanques de hormigón debe ser significativamente inferior a la utilizada para el cultivo en jaulas en mar abierto debido, principalmente, a las limitaciones en cuanto obtención y mantenimiento de la calidad del agua durante el cultivo.

Por otra parte, el cultivo del pulpo común en Galicia, que se realiza a una temperatura media inferior a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , se inicia con pulpos de  $750 \text{ g}$  (talla mínima de captura), realizándose el engorde hasta que superan  $3 \text{ kg}$  de peso, sin llegar al comportamiento reproductivo. Hay que tener en cuenta que a temperaturas superiores,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , la madurez sexual puede alcanzarse a una talla menor. De hecho, durante este estudio, la madurez sexual apareció cuando el peso medio de los pulpos fue inferior a  $2,5 \text{ kg}$ . Si a este factor le unimos que la talla mínima de captura en el sur de España es  $1 \text{ kg}$ , el margen posible para el engorde de la especie se ve considerablemente reducido. Por lo tanto, serán necesarios nuevos estudios para determinar si el engorde del pulpo común, en las circunstancias descritas, es económicamente viable. Una posible solución a dicho problema sería obtener permisos para la captura de pulpos por debajo de su talla mínima comercial (p. ej.  $500 \text{ g}$ ), con el único objetivo de llevar a cabo su engorde. De hecho, el uso de pulpos más

pequeños (peso < 750 g) debería tenerse en cuenta como posible línea de investigación en un futuro. También debe ser considerada la separación por sexos antes de introducir los animales en los tanques de cultivo, ya que posiblemente se pueda retrasar el proceso de maduración y permitir el engorde del pulpo hasta tallas superiores a 2,5 kg de manera rentable.

## 1.6. Conclusión

Las conclusiones generales de este estudio son las siguientes:

a) La densidad máxima sostenible para el engorde de *Octopus vulgaris* a temperaturas de  $20 \pm 2$  °C no debería exceder de  $20 \text{ kg m}^{-3}$ .

b) Un aspecto importante a tener en cuenta es que a alta densidad y a partir de 56 días de cultivo, la mortalidad fue mayor ( $p < 0,05$ ) en comparación con baja y media densidad. Además, dicho aumento no fue relacionado con casos de canibalismo. En mi opinión, una densidad de cultivo apropiada para esta especie debe promover una alta supervivencia, siendo este hecho de suma importancia cuando el cultivo se realice a escala comercial.

c) La calidad del agua fue similar en las tres densidades estudiadas incluso cuando empezó a caer la supervivencia a alta y media densidad de cultivo, tras 56 días de experimentación. Por ello, sólo podemos atribuir esta mortalidad a un posible y fuerte comportamiento jerárquico del pulpo, que podría impedir o dificultar la alimentación de los animales más pequeños; y/o al hecho de que altas densidades provoquen una situación estresante en el pulpo (especie solitaria por naturaleza), por la cual las defensas del animal disminuyan considerablemente y pueda causar hasta su muerte. Este aspecto determinante indica que a mayor temperatura, la densidad de cultivo inicial debe ser menor debido al carácter territorial y a la agresividad natural del pulpo común *O. vulgaris*.

## 1.7. Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento por la financiación de este trabajo a JACUMAR – Plan Nacional “Engorde de pulpo *Octopus vulgaris*”, 2007/ 2009 y al Proyecto PROMAR (SP5.P117/03) “Cooperación Algarve – Andalucía para la promoción de recursos acuícolas marinos en el litoral suratlántico” del INTERREG III A Interregional (Fondo Europeo de Desarrollo Regional).

## 1.8. Referencias bibliográficas

- Aguado-Giménez, F. & B. García-García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10: 361-377.
- Cagnetta, P. & A. Sublimi. 2000. Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C.) when fed on a monodiet. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47: 331-336.
- Cerezo, J., F. Aguado & B. García-García. 2002. Consumo de oxígeno de rutina del pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) en función del peso y la temperatura. En: Rolán E. & J. Troncoso (Eds) *II International Congress of the European Malacological Societies*. Vigo, Spain, 40 p.
- Cerezo, J. & B. García-García. 2004a. Suitable dissolved oxygen levels for common Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) at different weights and temperatures: analysis of respiratory behaviour. *Aquaculture*, 244: 303-314.
- Cerezo, J. & B. García-García. 2004b. Influence of body weight and temperature on post-prandial oxygen consumption of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 233: 599-613.
- Chapela, A., A.F. González, E.G. Dawe, F.J. Rocha & A. Guerra. 2006. Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. *Scientia Marina*, 70: 121-129.
- Correia, M., P. Domingues, A. Sykes & P. Andrade. 2005. Effects of culture density on growth and broodstock management of the cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 245: 163-173.
- Domingues, P. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. Ph D. Thesis, University of the Algarve, Portugal, 95 p.
- Domingues, P., R. Poirier, L. Dickel, E. Almansa, A. Sykes & J.P. Andrade. 2003. Effects of culture density and live prey on growth and survival of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 11: 225-242.
- Domingues, P.M., F.P. DiMarco, J.P. Andrade & P.G. Lee. 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 13: 423-440.
- Domingues, P., V. Bettencourt & A. Guerra. 2006. Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie Milieu*, 56: 109-120.
- Domingues, P., N. López, J. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola & C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatán octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13: 273-280.
- Domingues, P., A. Ferreira, L. Márquez, J. Andrade, N. López & C. Rosas. 2008. Growth, absorption and assimilation efficiency by mature cuttlefish (*Sepia officinalis*) fed with alternative and artificial diets. *Aquaculture International*, 16: 215-229.
- Domingues, P., S. García, I. Hachero, N. López & C. Rosas. 2010. The use of alternative prey (crayfish, *Procambarus clarkii*, and hake, *Merluccius gayi*) to culture *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Aquaculture International*, 18: 487-499.
- FAO. 2002. *The state of the world fisheries and aquaculture*. En: FAO/ GIEWS (Ed.) Rome, Italy.

- Forsythe, J., P. Lee, L. Walsh & T. Clark. 2002. The effects of crowding on growth of the European cuttlefish, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 reared at two temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269: 173-185.
- García-García, B. & F. Aguado-Giménez. 2002. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 211: 171-182.
- García-García, J., L.M. Rodríguez-González & B. García-García. 2004. Cost analysis of octopus on-growing installation in Galicia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 531-537.
- Iglesias, J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1996. The octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier): a candidate for aquaculture? *International Council for the Exploration of the Sea. Council Meeting. ICES 1996/F: 10. Mariculture Committee*.
- Iglesias, J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier) en el I.E.O. En: Costa J., E. Abellán, B. García, A. Ortega & S. Zamora (Eds.) *Actas del VI C. Nacional de Acuicultura*, pp. 221-226. ISBN: 84-491-0323-1. Cartagena, España.
- Iglesias, J., F.J. Sánchez, J.J. Otero & C. Moxica. 2000. Culture of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier): Present knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47: 313-321.
- Iglesias, J., J.J. Otero, C. Moxica, L. Fuentes & F.J. Sánchez. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12: 481-487.
- Iglesias, J., L. Fuentes, J. Sánchez, J.J. Otero, C. Moxica & M.J. Lago. 2006. First feeding of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) paralarvae using *Artemia*: effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261: 817-822.
- Iglesias, J., F.J. Sánchez, J.G.F. Bersano, J.F. Carrasco, J. Dhont, L. Fuentes, F. Linares, J.L. Muñoz, S. Okumura, J. Roo, T. van der Meer, E.A.G. Vidal & R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266: 1-15.
- Itami, K., Y. Izawa, S. Maeda & K. Nakay. 1963. Notes on the laboratory culture of octopus larvae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 29(6): 514-520.
- Lee, P.G. 1994. Nutrition of cephalopods: fuelling the system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 25: 35-51.
- Luaces-Canosa, M. & M. Rey-Méndez. 2001. El engorde industrial de pulpo (*Octopus vulgaris*) en jaulas: análisis de dos años de cultivo en la Ría de Camariñas (Galicia). *Monografías Instituto Canario Ciencias Marinas*, 4: 184-189.
- Mangold, K. 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44: 81-93.
- Mangold, K. & S.v. Boletzky. 1973. New dates on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19: 7-12.
- O'Dor, R.K. & M.J. Wells. 1987. Energy and nutrient flow. En: Boyle, P.R. (ed.) *Cephalopod life cycles*, vol 2., 109-133 pp. Academic Press, New York.



- Otero, J.J., C. Moxica, F. J. Sánchez & J. Iglesias. 2001. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier) a diferentes densidades de estabulación. En: *Convergencia entre Investigación y Empresa: Un reto para el siglo XXI*. H. Fernández-Palacios & M. Izquierdo (eds.). *Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas* 4: 180-183.
- Rama-Villar, A., V. Faya-Angueira, C. Moxica & M. Rey-Méndez. 1997. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) en batea. En: Costa J., E. Abellán, B. García, A. Ortega & S. Zamora (Eds.). *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*, 245-250 pp, Cartagena, 1997. ISBN: 84-491-0323-1.
- Rodríguez, C., J.E. Carrasco & M. Rodríguez. 2003. Engorde de juveniles de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en jaulas. En: *IX Congreso Nacional de Acuicultura*, 268-269 pp, Cádiz, 11-16 May 1993.
- Sánchez, F.J., J. Iglesias, C. Moxica & J.J. Otero. 1998. Growth of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier), males and females under culture conditions. *Aquaculture and Water, European Aquaculture Society (Spec. Publ.)*, 26: 244-245.
- Sendao, J.C., V. Carvalho & T.C. Borges. 1998. Rearing octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) with three different diets. En: *Livro de resumos, VI Congresso Nacional de Aquacultura*. Viana do Castelo, Portugal, 15–16 October.
- Smale, M.J. & P.R. Buchan. 1981. Biology of *Octopus vulgaris* off the East coast of South Africa. *Marine Biology (Berlin)*, 65: 1-12.
- Vaz-Pires, P., P. Seixas & A. Barbosa. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797): a review. *Aquaculture*, 238(1-4): 221-238.
- Wells, M.J. 1978. Octopus. *Physiology and behaviour of an advanced invertebrate*. Chapman & Hall, London. 417 p.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical analysis, 4<sup>th</sup> ed. Ryu T. (ed.). Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ. 663 p.



## USO DE PRESAS ALTERNATIVAS (CANGREJO DE RÍO, *Procambarus clarkii*, Y MERLUZA, *Merluccius gayi*) PARA EL CULTIVO DE *Octopus vulgaris* (CUVIER, 1797).

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental están publicados en el artículo:

Domingues P, **García S**, Hachero I, López N, Rosas C (2010) *The use of alternative prey (crayfish, Procambarus clarkii, and hake, Merluccius gayi) to culture Octopus vulgaris (Cuvier, 1797)*. Aquaculture International 18: 487-499. DOI 10.1007/s10499-009-9259-1.

### 2.1. Resumen

La presente investigación, dividida en dos experimentos, se centró en el análisis de los efectos de dos presas alternativas (cangrejo de río y merluza) sobre el crecimiento y la supervivencia de juveniles y adultos de *Octopus vulgaris*. Al final del experimento I, los pulpos alimentados con dieta control (calamar) fueron más grandes ( $3,0 \pm 0,7$  kg) que aquellos alimentados con cangrejo ( $2,6 \pm 0,6$  kg). De igual forma, la tasa de crecimiento total fue mayor para pulpos con dieta calamar que con cangrejo:  $1,7 \pm 0,3$  y  $1,2 \pm 0,2$  % pc d<sup>-1</sup> (porcentaje del peso corporal por día), respectivamente. La tasa de ingestión no fue distinta, siendo  $6,5 \pm 0,9$  y  $7,5 \pm 0,9$  % pc d<sup>-1</sup> para pulpos con calamar y cangrejo, respectivamente. La conversión de alimento fue mayor en pulpos alimentados con calamar ( $42,4 \pm 2,7$  %) que con cangrejo ( $23,9 \pm 1,9$  %). En el experimento II se comparó la dieta calamar frente a merluza y cangrejo de río. El peso final de los pulpos alimentados con calamar, merluza y cangrejo fue  $1183,0 \pm 242,7$  g,  $1175,6 \pm 240,1$  g y  $922,3 \pm 160,1$  g; y las tasas de crecimiento fueron  $1,9 \pm 0,2$ ,  $1,9 \pm 0,3$  y  $1,1 \pm 0,3$  % pc d<sup>-1</sup>, respectivamente. Tanto el peso final como las tasas de crecimiento no fueron diferentes entre pulpos con calamar y merluza ( $p > 0,05$ ), siendo superiores ( $p < 0,05$ ) a los registrados con cangrejo. La tasa de ingestión fue  $4,6 \pm 1,5$ ,  $4,2 \pm 1,3$  y  $5,1 \pm 0,9$  % pc d<sup>-1</sup> y los valores de conversión igual a  $41,0 \pm 9,6$ ,  $40,5 \pm 9,9$  y  $21,3 \pm 7,4$  % para pulpos con calamar, merluza y cangrejo, respectivamente. La conversión fue mayor ( $p < 0,05$ ) con calamar y merluza respecto del cangrejo. Los resultados indican que el cangrejo de río no es un alimento adecuado para reemplazar a las presas normalmente utilizadas en el engorde del pulpo común, incluso considerando su bajo valor comercial.

**Palabras clave:** Cangrejo de río · Crecimiento · Cultivo · Merluza · Presa alternativa · Pulpo.

## 2.2. Introducción

*Octopus vulgaris* es uno de los cefalópodos mejor conocidos y uno de los más estudiados en muchas áreas como crecimiento, cultivo, biología, comportamiento, fisiología y reproducción (Mangold, 1983; O'Dor & Wells, 1987; Wells, 1990; Portner & O'Dor, 1994; Hanlon & Messenger, 1996; Cagnetta & Sublimi, 2000; Vaz-Pires *et al.*, 2004). Son diversas las características que hacen a *O. vulgaris* una especie potencial para la diversificación de la acuicultura. Así, esta especie posee una tasa de reproducción muy alta (Mangold, 1983; Iglesias *et al.*, 1997), una tasa de conversión del alimento del 40 al 60 % (Mangold & Boletzky, 1973; Wells, 1978; Mangold, 1983; Smale & Buchan, 1981), tasas de crecimiento rápidas (3 % pc d<sup>-1</sup>) (Mangold & Boletzky, 1973; Mangold, 1983; Aguado-Giménez & García-García, 2002; Iglesias *et al.*, 2006; 2007), un contenido proteico en torno a 70 - 90 % de su composición corporal, en peso seco (Lee, 1994), y una alta fecundidad, con 100.000 a 500.000 huevos por hembra (Iglesias *et al.*, 1996; 1997; 2000). Tanto el precio en el mercado como la relevancia social de los cefalópodos son elevadas (García-García *et al.*, 2004; Vaz-Pires *et al.*, 2004), siendo los precios más altos así como los mercados más grandes los del Mediterráneo, Latinoamérica y Asia (Iglesias *et al.*, 2004). Las capturas totales de cefalópodos alcanzaron un pico de 3,6 millones de toneladas en el año 2000. Marruecos fue líder mundial en capturas de pulpo, con un 35 % del total de la producción, seguido por Japón, Tailandia, España y México (FAO, 2003). Además, las capturas por pesquerías han disminuido (Globefish, 2006), con lo que el interés por su acuicultura ha ido aumentando.

Itami *et al.* (1963) consiguió por primera vez el cultivo con éxito de esta especie en Japón, obteniendo juveniles bentónicos tras 33 días de cultivo a 24,7 °C, con un 5 % de supervivencia a los 60 días. Científicos españoles comenzaron a investigar la acuicultura de *O. vulgaris* en la década de los 90, estudiando tanto la obtención de paralarvas como el engorde de juveniles capturados del medio natural (Iglesias *et al.*, 2007). El ciclo de vida de *O. vulgaris* se completó por primera vez en España (Iglesias *et al.*, 2004). La falta de alimentos artificiales adecuados (Domingues *et al.*, 2005; 2006; 2007; 2008; Rosas *et al.*, 2007) y la alta mortalidad de las paralarvas (Iglesias *et al.*, 2006) son los principales problemas para conseguir una acuicultura comercial para esta especie.

El engorde de *O. vulgaris* se realiza en Galicia, España (Iglesias *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2003; García-García *et al.*, 2004), con una viabilidad baja debido a la dependencia del cultivo en la captura de juveniles del medio natural y a la ausencia de una dieta artificial

adecuada (García-García *et al.*, 2004). La producción anual máxima en 1998 y 1999 fue menor a 33 tm (Sánchez *et al.*, 1998; Luaces-Canosa & Rey-Méndez, 2001; FAO, 2001; 2002; García-García *et al.*, 2004), disminuyendo en 2001 hasta 14,6 tm (García-García *et al.*, 2004). Otro dato importante sobre el engorde de *O. vulgaris* en Galicia recogido en la bibliografía (García-García *et al.*, 2004) indica la necesidad de un mínimo de 43 jaulas por instalación para que el cultivo o engorde del pulpo sea económicamente viable.

El desarrollo de dietas artificiales para cefalópodos se inició en la década 1990 pero hasta el momento sólo se ha conseguido poco crecimiento y una supervivencia baja con el uso de dietas preparadas (Castro, 1990; Castro *et al.*, 1993; Castro & Lee, 1994; Lee *et al.*, 1991; Domingues, 1999; Domingues *et al.*, 2005; 2006). Más recientemente, Cerezo *et al.* (2008) con *O. vulgaris*, así como Domingues *et al.* (2007), Rosas *et al.* (2007) y Águila *et al.* (2007) con *Octopus maya*, desarrollaron dietas artificiales pero éstas no fomentaron un adecuado crecimiento en los pulpos. Para *O. maya*, sólo con una dieta artificial húmeda basada en tejido muscular de cangrejo aglutinado con gelatina se obtuvo un crecimiento interesante y una supervivencia comparable a la que aportó el tejido muscular de cangrejo, utilizado comúnmente como dieta de control (Águila *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007).

Hasta que una dieta artificial aceptable sea desarrollada, la búsqueda de presas alternativas que puedan sustituir a las habituales en el engorde de pulpos (como son los cangrejos) podría ser una solución temporal que reduzca los costes económicos de producción. Además, según García-García *et al.* (2004), el aumento inevitable del precio del crustáceo en el mercado reducirá la rentabilidad, ya de por sí bastante baja, del engorde comercial de pulpo.

*O. vulgaris* se ha cultivado con diferentes dietas naturales pero los resultados obtenidos sobre crecimiento presentaron una gran variabilidad dependiendo, principalmente, de la especie utilizada (Cagnetta & Sublimi, 2000; Aguado-Giménez & García-García, 2002; García-García & Aguado-Giménez, 2002). Hasta el momento, las dietas compuestas sólo por crustáceos (Aguado-Giménez & García-García, 2002) o con crustáceos como la parte más importante de las mismas (Cagnetta & Sublimi, 2000; García-García & Cerezo-Valverde, 2006) son las que mejores resultados han aportado. Las dietas compuestas exclusivamente de pescado dieron lugar a los peores resultados (Aguado-Giménez & García-García, 2002; García-García & Cerezo-Valverde, 2006), especialmente cuando las especies utilizadas contenían un alto contenido en lípidos.

El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar los efectos de dos presas alternativas de bajo coste económico, en comparación con crustáceos y calamares utilizados normalmente para el engorde de pulpos en nuestro laboratorio, sobre el crecimiento, la supervivencia, el balance energético y la composición en ácidos grasos de la glándula digestiva de *O. vulgaris* juveniles y adultos.

### 2.3. Material y métodos

#### Origen de los organismos

Los pulpos fueron capturados en las costas de Huelva (sur de España) mediante redes artesanales de arrastre y transportados a las instalaciones de IFAPA Centro Agua del Pino (Cartaya, Huelva, España).

#### Condiciones experimentales: aclimatación y cultivo

Antes de cada experimento, los pulpos fueron aclimatados durante una semana en tanques experimentales y alimentados con calamar (*Loligo gahi*). Durante los dos experimentos, se suministró a cada pulpo una ración diaria del 10 % (peso húmedo alimento/ peso húmedo del animal; % pc d<sup>-1</sup>), una vez al día a las 9:00 h. A la mañana siguiente, antes del siguiente período de alimentación, los restos de comida fueron retirados de cada tanque y pesados. Las heces se recogieron diariamente de cada tanque y se mezclaron por dieta y para el experimento completo. Se usaron para determinar el contenido energético y la composición a fin de determinar el balance de energía parcial. La temperatura del agua fue de  $21 \pm 1$  °C, la salinidad de  $36 \pm 1$  ppt, y el fotoperiodo natural para ambos experimentos, que se realizaron entre Abril y Junio de 2007. El flujo de agua fue ajustado en cada tanque para mantener una concentración de oxígeno cercana a los niveles de saturación.

#### Dietas

Se utilizaron dos dietas: cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) y merluza (*Merluccius gayi*). Estos alimentos fueron seleccionados por su bajo precio en el mercado y por su disponibilidad, en comparación con las presas usadas comúnmente como cangrejos (*Carcinus maenas*) o calamar (*L. gahi*).

### Crecimiento y consumo del alimento

Durante el experimento I, los pulpos fueron pesados cada 2 semanas. En el experimento II, se pesaron cada 10 días. Para cada intervalo de muestreo, se calcularon los siguientes parámetros:

- f. Tasa de crecimiento instantánea (IGR)

$$\text{IGR} = ((\ln W_2 - \ln W_1)/t) \times 100 \text{ (\% pc d}^{-1}\text{)}$$

Siendo:

- $W_2$  y  $W_1$ , el peso húmedo final e inicial (g) de los pulpos, respectivamente.
- $\ln$ , el logaritmo natural.
- $t$ , el número de días del periodo experimental.
- $\% \text{ pc d}^{-1}$ , porcentaje del peso corporal por día.

- g. Tasa de ingestión (FR)

$$\text{FR} = (\text{FI} / \text{W promedio (t)}) \times 100 \text{ (\% pc d}^{-1}\text{)}$$

Siendo:

- FI, la cantidad de alimento consumido (g).
- W promedio (t), promedio de peso húmedo ganado de los pulpos (g) por un período de tiempo  $t$  (días, d).
- $\% \text{ pc d}^{-1}$ , porcentaje del peso corporal por día.

- h. Eficiencia de conversión (FC)

$$\text{FC} = ((W_2 - W_1) / \text{FI}) \times 100 \text{ (\%)}$$

Siendo:

- $W_2 - W_1$ , peso ganado (g) por los pulpos durante el período de tiempo en estudio.
- FI, la cantidad de alimento consumido (g).

## Experimento I

En el experimento I se utilizaron 36 pulpos adultos ( $n = 6$ ; cada replicado, 6 pulpos). Se ensayaron dos dietas:

- Calamar (*L. gahi*) como dieta control.
- Cangrejo de río (*P. clarkii*).

Tanto el calamar como el cangrejo de río se descongelaban 15 minutos antes de ser usados como alimento. Se usaron seis tanques de hormigón ( $3 \times 1 \times 1$  m; volumen =  $3 \text{ m}^3$ ). Se distribuyeron seis pulpos (3 hembras y 3 machos) por tanque. En tres tanques los pulpos fueron alimentados con calamar y en los tres restantes se alimentaron con cangrejo. El peso inicial medio de los pulpos fue de  $1,5 \pm 0,5$  kg. El peso medio inicial de los pulpos alimentados con calamar y cangrejo de río fue  $1,4 \pm 0,4$  kg y  $1,5 \pm 0,5$  kg, respectivamente. No hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los replicados.

## Experimento II

En el experimento II, 30 pulpos juveniles fueron individualizados en tanques cilíndricos (volumen = 80 L). Los pulpos se alimentaron con tres dietas:

- Calamar (*L. gahi*) como dieta control.
- Merluza (*M. gayi*).
- Cangrejo de río (*P. clarkii*).

El alimento se descongelaba 15 minutos antes de ser utilizado. El ensayo duró 40 días. El peso final de los pulpos fue  $573,3 \pm 131,6$  g. El peso medio inicial de los pulpos alimentados con calamar, cangrejo de río y merluza fue  $542,1 \pm 140,0$  g,  $563,2 \pm 140,0$  g y  $620,2 \pm 120,5$  g respectivamente, sin diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellos.

## Balance energético parcial

La ecuación de balance energético parcial que representa el flujo de energía a través de *O. vulgaris* es la siguiente:

$$I = P + G + R_{\text{tot}} + U_{\text{tot}} + F \quad (\text{Lucas, 1993})$$

Siendo:

- I, energía total ingerida.
- P, energía invertida en el crecimiento somático o producción de tejidos.
- G, energía invertida en el crecimiento gonadal.
- R<sub>tot</sub>, energía invertida en respiración.
- U<sub>tot</sub>, energía perdida como nitrógeno y otros productos de desecho excretados
- F, energía no absorbida y perdida en las heces.

La energía total ingerida (I) fue:

$$I = IR \times EFC$$

Siendo:

- IR es la tasa de ingestión ( $\text{g kg}^{-1}$  del animal  $\text{d}^{-1}$ )
- EFC, el contenido energético del alimento ( $\text{kJ g}^{-1}$ ).

La tasa de ingestión (IR) fue calculada como la diferencia entre el alimento suministrado y el recogido después de 4 horas, y corregida con el porcentaje de nutrientes filtrados. El alimento remanente fue sifonado y filtrado a través de filtros Wathman número 3 (5  $\mu\text{m}$ ) previamente pesados.

La energía absorbida (Ab, %) fue:

$$Ab = I \times AE$$

Donde:

- I es la energía total ingerida
- AE, la eficiencia de absorción.

La eficiencia de absorción (AE) fue calculada como:

$$AE = [(I' - F') / (1 - F') I'] \times 100 \quad (\text{Condrey } et \text{ al.}, 1972)$$

Donde:

- $I$  es la proporción entre el peso seco libre de cenizas (pslc) y el peso seco del alimento (ps).
- $F$ , la proporción entre pslc y ps de las heces.

El ps y el pslc del alimento y las heces fueron obtenidos con muestras de cada dieta y de las heces de pulpos alimentados con cada dieta, secadas a 60 °C hasta alcanzar un peso constante; y con muestras secadas en horno de mufla a 500 °C durante 4 h, respectivamente.

La energía empleada en crecimiento (P) se calculó usando la tasa de crecimiento de pulpo obtenida durante el período experimental. Se utilizó un valor de  $18,8 \pm 0,72$  kJ g<sup>-1</sup> ps para transformar los valores de crecimiento en unidades de producción (P; kJ g<sup>-1</sup> ps día<sup>-1</sup>). Estos datos fueron obtenidos analizando el contenido energético aplicado en tres replicados de animales completos mediante un calorímetro (Parr<sup>®</sup>) previamente calibrado con ácido benzoico.

### Lípidos y ácidos grasos

Se analizaron lípidos totales (LT) y ácidos grasos (AG) del total de lípidos, así como la humedad de las tres dietas. El contenido en humedad fue determinado en muestras de 500 mg por el método de Horwitz (1980). Los LT fueron extraídos con cloroformo:metanol (2:1 v/ v) más 0,01% de hidroxitolueno butilado (BHT) (v/ v) como antioxidante (Christie, 1982). El solvente orgánico fue evaporado bajo una corriente de nitrógeno y el contenido en lípidos determinado por gravimetría. Los lípidos totales extraídos fueron sometidos a trans-metilación ácido catalizada durante 16 h a 50 °C, usando 1 ml de tolueno y 2 ml de ácido sulfúrico al 1 % en metanol (v/ v). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos resultantes (FAME) fueron purificados mediante cromatografía de capa fina (TLC) y visualizados con yodina al 1 % (p/ v) en CHCl<sub>3</sub> (Christie, 1982). Antes de llevar a cabo la trans-metilación, el ácido nonadecanoico (19:0) fue añadido a la muestra de LT como estándar interno a una concentración de 1 mg/ ml (5 % LT). Los FAME fueron separados y cuantificados en un equipo de cromatografía de gases (Shimadzu GC-2010) con detector de ionización de llama (250 °C) y una columna capilar de sílice fundida Tecnokroma-Superwax-280<sup>™</sup> (10 m x 0,1 mm I.D.). El helio se usó como gas portador, y la temperatura



inicial del horno fue de 150 °C, seguida de un aumento a un ritmo de 90 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar una temperatura final de 250 °C a los 3 minutos.

Los FAME fueron identificados individualmente basándose en unos patrones de referencia originales de aceite de pescado bien caracterizados. El contenido en lípido total y en ácidos grasos de los lípidos totales (Tabla 2.2) de la dieta control (calamar) y de las dos dietas alternativas (merluza y cangrejo) fueron calculados como microgramos de lípido total por miligramo de tejido en peso seco ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  tejido ps). Para la identificación de los ácidos grasos se usó el programa GC Solution (Versión 2.30.00 SU 4). Para el cálculo del contenido ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  ps) en AG de los tejidos analizados se aplicó la ecuación:

$$\text{AG} = \frac{\text{SI} \times \% \text{AG} \times \text{LT}}{\% \text{SI}} \quad (\mu\text{g mg}^{-1} \text{ps})$$

Siendo:

- AG, el ácido graso a cuantificar.
- SI, estándar interno añadido al lípido analizado ( $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$  LT).
- % AG, el porcentaje del ácido graso a cuantificar en contenido.
- LT, lípido total ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  ps)
- % SI, el porcentaje de estándar interno (ácido nonadecanoico, 19:0).

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) fue el suministrador de BHT, cloruro de potasio, bicarbonato de potasio y yodina. Las placas TLC (20 cm x 20 cm x 0,25 mm) se adquirieron de Macheren-Nagel (Düren, Alemania). Todos los solventes orgánicos usados en cromatografía de gases fueron adquiridos de Panreac (Barcelona, España).

### **Análisis estadístico**

Las diferencias estadísticas entre los dos tratamientos de alimentación ensayados en el experimento I se analizaron mediante Test *t*-Student (Zar, 1999) para peso, crecimiento, tasas de ingestión, eficiencias de conversión y balance energético parcial.

En el experimento II, las diferencias estadísticas en peso, crecimiento, tasas de ingestión, eficiencias de conversión y balance energético parcial entre los tres tratamientos ensayados fueron analizadas mediante el análisis de varianza (*ANOVA* de una vía) (Zar,

1999). Cuando se encontraron diferencias, se aplicó el test de Tukey de comparación múltiple (Zar, 1999) con un intervalo de confianza del 95 %. La homogeneidad de varianzas fue verificada con el test de Cochran. Los valores obtenidos durante el tratamiento fueron comparados mediante la prueba múltiple de Duncan.

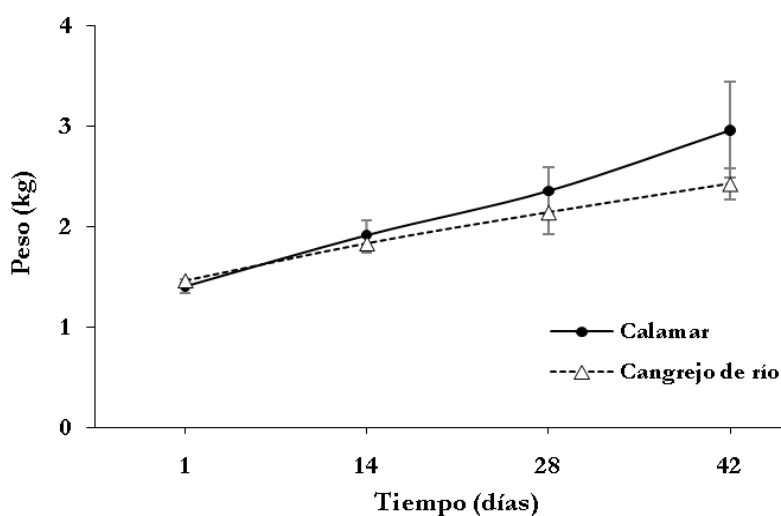
En los dos experimentos se utilizó el programa STATISTICA 9.0.

## 2.4. Resultados

### Experimento I: Crecimiento

Se registró un peso final mayor en pulpos alimentados con calamar que con cangrejo de río ( $p < 0,05$ ; Figura 2.1). Los pesos finales de pulpos alimentados con calamar y cangrejo de río fueron  $3,0 \pm 0,7$  kg y  $2,4 \pm 0,6$  kg, respectivamente. En consecuencia, la tasa de crecimiento calculada al final del estudio fue mayor ( $p < 0,05$ ) en animales alimentados con calamar ( $1,7 \pm 0,3$  % pc d<sup>-1</sup>) que en los alimentados con cangrejo ( $1,2 \pm 0,2$  % pc d<sup>-1</sup>). Ninguno de los 36 pulpos utilizados durante el experimento murió.

La tasa de ingestión no se vio afectada por el tipo de dieta, mostrando valores de  $6,5 \pm 0,9$  % pc d<sup>-1</sup> y  $7,5 \pm 0,9$  % pc d<sup>-1</sup> para pulpos alimentados con calamar y cangrejo de río, respectivamente. Por otra parte, la conversión de alimento fue mayor en pulpos alimentados con calamar ( $42,4 \pm 2,7$  %) que en los alimentados con cangrejo de río ( $23,9 \pm 1,9$  %).

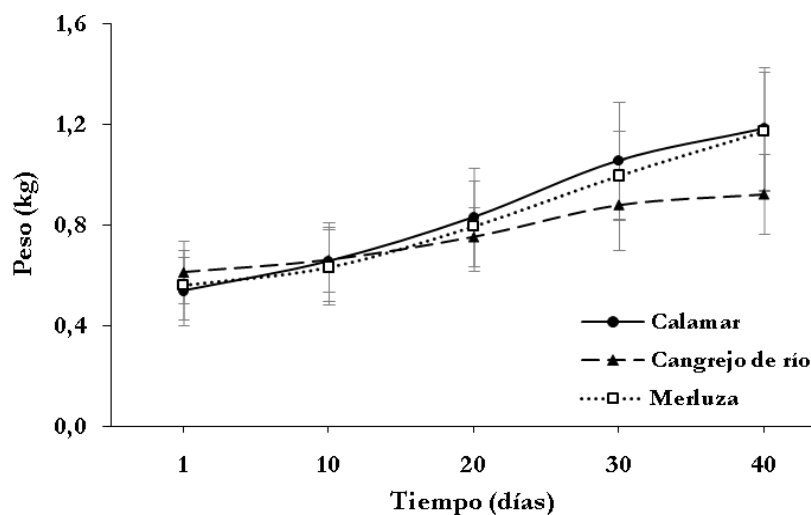


**Figura 2.1** Pesos de *O. vulgaris* alimentado con calamar (*L. gahi*) como dieta control y cangrejo de río (*P. clarkii*) durante el experimento I.

## Experimento II: Crecimiento

Se obtuvo un peso final mayor en pulpos alimentados con merluza y calamar en comparación con los alimentados con cangrejo, con valores de  $1183,0 \pm 242,7$  g,  $1175,6 \pm 240,1$  g y  $922,3 \pm 160,1$  g, respectivamente ( $p < 0,05$ ; Figura 2.2). La tasa de crecimiento se vio afectada por el tipo de dieta a lo largo del tiempo de experimentación, con valores superiores en animales alimentados con calamar y merluza ( $1,9 \pm 0,2$  % pc d<sup>-1</sup> y  $1,9 \pm 0,3$  % pc d<sup>-1</sup>, respectivamente) que los observados para los alimentados con cangrejo ( $1,1 \pm 0,3$  % pc d<sup>-1</sup>,  $p < 0,05$ ). Al final del experimento se registró una supervivencia del 70, 90 y 90 % en pulpos alimentados con calamar, merluza y cangrejo de río, respectivamente.

La tasa de ingestión fue  $4,6 \pm 1,5$  % pc d<sup>-1</sup>,  $4,2 \pm 1,3$  % pc d<sup>-1</sup> y  $5,1 \pm 0,9$  % pc d<sup>-1</sup>, respectivamente para pulpos alimentados con calamar, merluza y cangrejo ( $p > 0,05$ ). No hubo diferencias significativas entre valores de conversión de alimento de animales con dietas calamar y merluza a lo largo de todo el periodo experimental (con valores medios de  $41,0 \pm 9,6$  y  $40,5 \pm 9,9$  %, respectivamente;  $p > 0,05$ ). Estos valores fueron más altos que los registrados en pulpos alimentados con cangrejo de río ( $21,3 \pm 7,4$  %,  $p < 0,05$ ).



**Figura 2.2** Pesos de *O. vulgaris* alimentado con una dieta control (calamar, *L. gahi*) y dos presas alternativas (cangrejo de río, *P. clarkii*, y merluza, *M. gayi*) durante el experimento II.

### Balance energético parcial

El balance energético parcial mostró que la dieta afecta la forma en que los pulpos usan la energía derivada del alimento. Se registró una tasa de ingestión menor en animales alimentados con cangrejo que en aquellos alimentados con calamar o merluza. De hecho, los pulpos alimentados con merluza ingirieron (I) más energía que los alimentados con calamar y éstos, a su vez, más que con dieta cangrejo ( $p < 0,05$ ; Tabla 2.1). La energía absorbida (Ab %) fue mayor en pulpos con dietas calamar y merluza (valor medio 95,6 %,  $p > 0,05$ ) que con dieta cangrejo (81,9 %,  $p < 0,05$ ) (Tabla 2.1). Por tanto, la energía asimilada (As) fue mayor en los que comieron calamar y merluza que con cangrejo ( $p < 0,05$ ; Tabla 2.1). La energía invertida en el crecimiento o producción de tejidos (P) fue también superior en pulpos alimentados con calamar y merluza (valor medio 49,5 kJ kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) que en los alimentados con cangrejo (31,3 kJ kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ; Tabla 2.1). Las eficiencias bruta (P/I, %) y neta (P/As, %) de producción se vieron afectadas por el tipo de dieta suministrada a los pulpos, con valores más altos en animales alimentados con cangrejo y calamar (valor medio 19,1 %) que en los alimentados con merluza (9,5 %).

**Tabla 2.1** Efecto del tipo de dieta sobre el balance energético de *O. vulgaris* bajo condiciones controladas.

Dieta	I	Ab, %	As	P	P/I, %	P/As, %
(kJ kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	(kJ kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )		(kJ kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	(kJ kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )		
<b>Cangrejo</b>	201,70 ± 9,20 <sup>a</sup>	81,90 ± 17,40 <sup>a</sup>	165,19	31,33 ± 3,4 <sup>a</sup>	15,53	18,96
<b>Merluza</b>	454,60 ± 19,30 <sup>c</sup>	94,30 ± 17,60 <sup>b</sup>	428,69	40,91 ± 4,94 <sup>b</sup>	9,00	9,54
<b>Calamar</b>	310,40 ± 14,20 <sup>b</sup>	96,80 ± 20,40 <sup>b</sup>	300,47	58,01 ± 4,26 <sup>b</sup>	18,69	19,31

Dietas: Cangrejo, *P. clarkii*; Merluza, *M. gayi*; Calamar, *L. gahi*. I, Energía total ingerida; Ab, Energía absorbida; As, Energía asimilada; P, Energía invertida en la producción de tejidos; P/I, Eficiencia bruta de producción; P/As, Eficiencia neta de producción. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Valores representados como media ± D.E.

## Lípidos y ácidos grasos

El contenido de los lípidos totales registrado para las tres dietas fue igual a  $3,67 \pm 0,84$  %,  $6,45 \pm 1,07$  % y  $7,70 \pm 0,75$  % para cangrejo, merluza y calamar, respectivamente. El porcentaje de humedad fue similar entre presas naturales (78 - 83 %).

La composición en ácidos grasos de las presas naturales mostró diferencias según el tipo de dieta y el grupo de ácidos grasos analizados. La dieta cangrejo de río se caracterizó por niveles en saturados y poliinsaturados (PUFA) más bajos que los presentes en las dietas merluza y calamar ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2.2).

Entre los grupos de ácidos grasos omega (AG- $n$ ), la serie  $n-3$  presentó un contenido considerablemente menor en la dieta cangrejo de río, comparado con merluza y calamar ( $p > 0,05$ ). El contenido en AG de la serie  $n-9$  fue mayor en la dieta merluza que en las dietas calamar y cangrejo de río ( $p > 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre las dietas calamar, merluza y cangrejo para las series  $n-6$  y  $n-9$ . Estos valores fueron bajos en las tres dietas analizadas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2.2).

Por otra parte, también fueron cuantificados los contenidos en ácido araquidónico (ARA; 20:4  $n-6$ ) y en ácidos grasos altamente insaturados  $n-3$  (HUFA  $n-3$ ), especialmente el ácido eicosapentanoico (EPA; 20:5  $n-3$ ) y el ácido docosahexanoico (DHA; 22:6  $n-3$ ). No se encontraron diferencias significativas entre las dietas calamar, cangrejo de río y merluza para el contenido en ARA ( $p > 0,05$ ). En las dietas cangrejo de río y merluza se registró un contenido de EPA significativamente menor que en la dieta calamar ( $p < 0,05$ ). De manera similar, en la dieta calamar también se registró altos niveles de DHA en comparación con las dietas merluza y cangrejo de río ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2** Contenido en Ácidos grasos ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  tejido ps) de la dieta control Calamar (*L. gahi*), y de dos presas alternativas (Merluza, *M. gayi*, y Cangrejo de río, *P. clarkii*).

Dieta	Calamar		Merluza		Cangrejo	
14:0	1,10 $\pm$ 0,18	a	0,77 $\pm$ 0,55	ab	0,19 $\pm$ 0,10	b
14:1	0,08 $\pm$ 0,01	a	0,00 $\pm$ 0,00	b	0,03 $\pm$ 0,01	c
15:0	0,27 $\pm$ 0,20		0,15 $\pm$ 0,02		0,22 $\pm$ 0,11	
16:0	10,81 $\pm$ 1,55	a	8,83 $\pm$ 3,99	ab	3,04 $\pm$ 1,56	b
16:1 <i>n</i> -7	0,65 $\pm$ 0,14		1,68 $\pm$ 1,08		1,28 $\pm$ 0,87	
16:1 <i>n</i> -5	0,19 $\pm$ 0,07		0,08 $\pm$ 0,03		0,17 $\pm$ 0,09	
17:0	0,17 $\pm$ 0,01		0,09 $\pm$ 0,04		0,15 $\pm$ 0,07	
16:3 <i>n</i> -3	0,05 $\pm$ 0,02		0,16 $\pm$ 0,10		0,22 $\pm$ 0,15	
16:4	0,28 $\pm$ 0,16	ab	0,07 $\pm$ 0,04	a	0,41 $\pm$ 0,18	b
18:0	1,26 $\pm$ 0,19		1,21 $\pm$ 0,40		1,12 $\pm$ 0,47	
18:1 <i>n</i> -9	1,26 $\pm$ 0,08		7,11 $\pm$ 4,33		2,38 $\pm$ 1,11	
18:1 <i>n</i> -7	0,80 $\pm$ 0,07		1,12 $\pm$ 0,57		0,95 $\pm$ 0,80	
18:1 <i>n</i> -5	0,27 $\pm$ 0,07	a	0,12 $\pm$ 0,05	b	0,06 $\pm$ 0,03	b
18:2 <i>n</i> -6	0,17 $\pm$ 0,05	a	0,32 $\pm$ 0,21	a	1,19 $\pm$ 0,62	b
18:3 <i>n</i> -4	0,03 $\pm$ 0,01		0,11 $\pm$ 0,07		0,06 $\pm$ 0,04	
18:3 <i>n</i> -3	0,07 $\pm$ 0,01		0,11 $\pm$ 0,08		0,86 $\pm$ 0,67	
18:4 <i>n</i> -3	0,06 $\pm$ 0,01		0,12 $\pm$ 0,08		0,04 $\pm$ 0,02	
18:4 <i>n</i> -1	0,02 $\pm$ 0,00	ab	0,08 $\pm$ 0,05	a	0,00 $\pm$ 0,00	b
20:0	0,04 $\pm$ 0,01	a	0,05 $\pm$ 0,03	ab	0,13 $\pm$ 0,06	b
20:1 <i>n</i> -9	1,71 $\pm$ 0,24	ab	2,22 $\pm$ 1,31	a	0,11 $\pm$ 0,06	b
20:2 <i>n</i> -6	0,08 $\pm$ 0,01		0,06 $\pm$ 0,03		0,09 $\pm$ 0,04	
20:3 <i>n</i> -6	0,02 $\pm$ 0,02	a	0,04 $\pm$ 0,03	ab	0,11 $\pm$ 0,06	b
20:4 <i>n</i> -6	0,35 $\pm$ 0,07		0,43 $\pm$ 0,14		0,72 $\pm$ 0,34	
20:3 <i>n</i> -3	0,08 $\pm$ 0,01	a	0,03 $\pm$ 0,01	b	0,06 $\pm$ 0,03	ab
20:4 <i>n</i> -3	0,07 $\pm$ 0,01		0,18 $\pm$ 0,11		0,03 $\pm$ 0,01	
20:5 <i>n</i> -3	5,18 $\pm$ 0,19	a	2,66 $\pm$ 1,22	b	1,41 $\pm$ 0,74	b
22:1 <i>n</i> -11	0,24 $\pm$ 0,03	ab	1,54 $\pm$ 1,00	a	0,06 $\pm$ 0,01	b
22:1 <i>n</i> -9	0,05 $\pm$ 0,01		0,04 $\pm$ 0,02		0,03 $\pm$ 0,01	
21:5 <i>n</i> -3	0,04 $\pm$ 0,01		0,07 $\pm$ 0,04		0,04 $\pm$ 0,02	
22:4 <i>n</i> -6	0,02 $\pm$ 0,00		0,03 $\pm$ 0,02		0,02 $\pm$ 0,01	
22:5 <i>n</i> -6	0,05 $\pm$ 0,01		0,11 $\pm$ 0,04		0,05 $\pm$ 0,01	
22:5 <i>n</i> -3	0,15 $\pm$ 0,02		0,38 $\pm$ 0,17		0,08 $\pm$ 0,08	
24:0	0,00 $\pm$ 0,00	a	0,00 $\pm$ 0,00	a	0,03 $\pm$ 0,02	b
22:6 <i>n</i> -3	10,51 $\pm$ 2,27	a	7,10 $\pm$ 2,38	a	0,46 $\pm$ 0,29	b
NC	1,81 $\pm$ 1,15		1,57 $\pm$ 1,04		1,21 $\pm$ 0,55	

Tabla 2.2 continuación

Dieta	Calamar		Merluza		Cangrejo	
Saturados	13,64 ± 1,63	a	11,10 ± 4,99	ab	4,89 ± 2,36	b
Monoinsaturados	5,25 ± 0,31		13,91 ± 8,30		5,08 ± 2,76	
PUFA	17,34 ± 2,26	a	12,23 ± 4,69	ab	5,88 ± 3,10	b
<i>n</i> -3	16,21 ± 2,44	a	10,79 ± 4,09	a	3,17 ± 1,85	b
<i>n</i> -6	0,67 ± 0,11		0,99 ± 0,47		2,16 ± 1,06	
<i>n</i> -9	3,02 ± 0,33		9,37 ± 5,59		2,52 ± 1,16	
HUFA <i>n</i> -3	15,95 ± 2,44	a	10,38 ± 3,83	a	2,00 ± 1,06	b
<i>n</i> -3/ <i>n</i> -6	24,89 ± 7,12	a	11,30 ± 1,53	b	1,40 ± 0,35	b
DHA/ EPA	2,02 ± 0,37	a	2,86 ± 0,83	a	0,31 ± 0,14	b
EPA/ ARA	15,50 ± 3,47	a	6,04 ± 1,12	b	1,89 ± 0,44	b
DHA/ ARA	32,13 ± 11,89	a	16,64 ± 1,44	ab	0,62 ± 0,41	b
Mon/ HUFA <i>n</i> -3	0,33 ± 0,04	a	1,30 ± 0,65	b	2,65 ± 0,45	c
Mon/ PUFA	0,31 ± 0,03	a	1,09 ± 0,51	b	0,86 ± 0,05	ab
Mon/ Sat	0,39 ± 0,04	a	1,17 ± 0,30	b	1,00 ± 0,15	b

Valores representados como media ± D.E. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dietas calamar, merluza y cangrejo de río. NC, ácidos grasos no conocidos; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados; DHA, ácido docosahexanoico (22:6 *n*-3); EPA, ácido eicosapentanoico (20:5 *n*-3); ARA, ácido araquidónico (20:4 *n*-6).

## 2.5. Discusión

En el presente trabajo de investigación se observó una tasa de crecimiento mayor en *O. vulgaris* alimentado con merluza y calamar que con cangrejo de río, tanto en el experimento I (varios pulpos por tanque) como en el experimento II (pulpo en tanque individuales). Al mismo tiempo, el balance energético mostró que aquellas dietas que promovieron una tasa de crecimiento mayor fueron también ingeridas, absorbidas y asimiladas en mayor medida. Además, se registró un contenido en PUFA y ácidos grasos saturados menor en la dieta cangrejo de río, mostrando que dicho crustáceo no cubre los requerimientos nutricionales necesarios por esta especie de pulpo.

La tasa de ingestión fue similar para todas las dietas ensayadas en cada experimento. Por tanto, los bajos valores de conversión del alimento obtenidos con cangrejo de río indican que esta dieta no es apropiada para el cultivo de pulpos, en comparación con las otras dos dietas utilizadas. Mangold & Boletzky (1973) y Vaz-Pires *et al.* (2004)

determinaron que los valores normales de conversión de alimento para estas especies se encuentran entre 15 y 43 %. Los valores de conversión observados para las tres dietas estudiadas se encontraron dentro de este rango. No obstante, los valores obtenidos cuando se alimentaron con calamar o merluza fueron mucho mayores ( $> 40\%$ ), indicando que las dietas fueron apropiadas para el engorde del pulpo. Por el contrario, los valores de conversión de alimento en pulpos alimentados con cangrejo de río fueron bajos ( $\pm 20\%$ ), lo que indica que esta dieta no fue apropiada para el engorde de *O. vulgaris*.

Según Cagnetta & Sublimi (2000), el crecimiento del pulpo común alimentado con cangrejos es mejor que al ser alimentados con calamar o con peces. Sin embargo, en nuestro estudio observamos que el calamar (*L. gahi*) produce un crecimiento similar y una supervivencia comparable a la de pulpos alimentados con cangrejos, además de reducir considerablemente las labores de limpieza en tanques. Tal y como concluyeron Cagnetta & Sublimi (2000), el uso de una monodieta puede dar lugar a un buen crecimiento en estos animales. Así, en este trabajo, el crecimiento alcanzando por los pulpos, alimentando con una monodieta basada en calamar, fue mayor que el obtenido usando varias presas simultáneamente (Otero *et al.*, 2001; Chapela *et al.*, 2006).

El balance energético parcial fue utilizado para evaluar cómo el tipo de presa modula los cauces que la energía toma para producir biomasa. Los pulpos alimentados con merluza y calamar mostraron mayores proporciones de energía ingerida y absorbida que los pulpos alimentados con cangrejo de río. La energía asimilada o asimilación (As) excluye aquellas fracciones de la dieta que no son absorbidas (heces), la energía usada como combustible de la digestión, la pérdida por el organismo como resultado del tránsito del alimento (mucosa intestinal y excreción de enzimas digestivas) y aquellos nutrientes que son absorbidos pero no utilizados por el metabolismo (secreciones de las mucosas del organismo y nitrógeno procedente de la urea). La asimilación incluye la energía canalizada hacia el metabolismo respiratorio y la energía usada para producción de biomasa y tejidos de reproducción (Lucas, 1993). En pulpos las proteínas son la principal fuente de energía y, por esta razón, la composición en aminoácidos ha sido reconocida como la principal llave nutricional en cefalópodos (Lee, 1994; Villanueva *et al.*, 2004). En este estudio, As fue mayor en animales alimentados con merluza y calamar que con cangrejo de río, sugiriendo que diferencias en la composición de aminoácidos podrían modular el uso de las proteínas como fuente de energía. Se observó un porcentaje bajo de energía total ingerida y asimilada en pulpos alimentados con merluza en comparación con los alimentados con calamar y cangrejo, lo que sugiere que la merluza no cubre todos los requerimientos



nutricionales de *O. vulgaris*. Esta deficiencia, si existe, fue compensada por la tasa de ingestión, obteniéndose al final del experimento II una tasa de crecimiento similar a la observada con pulpos alimentados con calamar. Se ha demostrado que existe una alta digestibilidad (medida como eficiencia de absorción, Ab %) en varias especies de pulpos alimentados con crustáceos. Daly & Peck (2000) consiguieron valores de Ab entre 95 y 97 % para el pulpo *Pareledone charcoti* alimentado con krill (crustáceo *Euphasia superba*), mientras que un 96,5 % de Ab fue obtenido para *O. cynea* y *O. maya* alimentados con cangrejos (Van Heukelem, 1976; Rosas *et al.*, 2007).

Actualmente existe en la bibliografía información sobre pulpos alimentados con cangrejos y otras especies de crustáceos que presentan tasas de crecimiento altas, comparadas con la de pulpos alimentados con peces u otros alimentos congelados. Así, García-García & Aguado-Giménez (2002) mostraron una tasa de crecimiento para *O. vulgaris* menor al 1 % día<sup>-1</sup> cuando los pulpos se alimentaron con sardina (*Sardina pilchardus*) y boga (*Boops boops*), mientras que Petza *et al.* (2006) también obtuvo a partir de *O. vulgaris* alimentado con peces con alto contenido lipídico (*Engraulis encrasocoulus*) una tasa de crecimiento de 0,43 - 0,95 % día<sup>-1</sup>. Ambos estudios confirmaron los efectos deletéreos de las dietas con alto contenido lipídico. Por otra parte, cuando los pulpos fueron alimentados con crustáceos marinos, mostraron una tasa de crecimiento alta. Según Aguado-Giménez & García-García (2002) *O. vulgaris* alcanzó una tasa de crecimiento superior al 1,5 % día<sup>-1</sup> cuando se alimentó con cangrejos *Macropipus depurator* y *Calappa granulata*. Recientemente, Cerezo-Valverde *et al.* (2008) obtuvo una tasa de crecimiento del 1,6 % día<sup>-1</sup> al alimentar a pulpos con cangrejos marinos (*Carcinus mediterraneus*), lo que sugiere que existen diferencias en palatabilidad, humedad, contenido en minerales y otros componentes de la dieta que podrían determinar las ventajas de los cangrejos marinos sobre otros tipos de dietas. En este trabajo de investigación observamos un comportamiento inverso: los organismos alimentados con peces y calamar tuvieron una tasa de crecimiento mayor que los que fueron alimentados con crustáceos de agua dulce.

En otros estudios recientes se sugiere que los ácidos grasos juegan un papel relevante en la nutrición del pulpo común *Octopus vulgaris* tanto en el estado paralarva como durante el crecimiento de juveniles (Navarro & Villanueva, 2003; Miliou *et al.*, 2005; Okumura *et al.*, 2005). En todos estos trabajos los autores hacen especial énfasis en la proporción DHA/EPA como llave para explicar diferencias en la supervivencia y crecimiento del pulpo común. En este estudio se observó una alta proporción DHA/ EPA para calamar y merluza, dietas que dieron lugar a una alta tasa de crecimiento en pulpos, tanto en

contenido como cuando es comparada con cangrejo de río. Por otra parte, se observó una tasa de crecimiento baja para el pulpo común cuando se alimentó con cangrejo de río, dieta que presenta una baja proporción DHA/ EPA. De hecho, observamos que todos los lípidos identificados tuvieron niveles menores en cangrejo que en las otras dos dietas, sugiriendo que el cangrejo de río no es una presa alternativa adecuada para alimentar a pulpos juveniles. La ratio DHA/ EPA, como otras ratios de poliinsaturados, fue menor que la observada para el cangrejo azul *Callinectes sapidus* (cangrejo marino usado como alimento para pulpos; Rosas *et al.*, 2007), lo que sugiere que los niveles de DHA/ EPA registrados para cangrejo de río están por debajo del nivel mínimo requerido por *O. vulgaris* (1,5 - 1,7; Navarro & Villanueva, 2000). En este sentido, valores como 0,31 (DHA/ EPA), 1,89 (EPA/ ARA) y 0,62 (DHA/ARA) deberían ser considerados inadecuados para la formulación de dietas para *Octopus vulgaris*.

## 2.6. Conclusión

Las conclusiones generales de esta investigación son las siguientes:

a) Parece que el cangrejo de río no es un buen candidato para reemplazar a las presas utilizadas normalmente en el cultivo de *O. vulgaris*, ya que da lugar a tasas de conversión bajas (cerca al 20 %) y presenta las mismas dificultades de trabajo que las existentes cuando se alimenta con otras especies de cangrejos. Además, la parte del cangrejo de río que es consumida por los pulpos supone menos del 35 % del animal, lo que hace que dicha dieta sea incluso menos atractiva cuando se tiene en cuenta el bajo crecimiento obtenido. Sin embargo, se podría sugerir que el pescado blanco, como la merluza, da lugar a buenos resultados de crecimiento y podría utilizarse para el engorde de *O. vulgaris* en el futuro.

b) Finalmente, otras dietas o presas alternativas para el pulpo común como descartes de la pesca (p. ej. boga, *Boops boops*) o de la acuicultura de la dorada (*Sparus aurata*) deberían ser analizadas con el fin de reducir costes de producción.

## 2.7. Agradecimientos

Los autores agradecen al Plan Nacional de Pulpo – JACUMAR – Proyecto “Engorde de pulpo *Octopus vulgaris*”, 2007/ 2009, por la financiación de esta investigación.

## 2.8. Referencias bibliográficas

- Aguado-Giménez, F. & B. García-García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10: 361-377.
- Águila, J., G. Cuzon, C. Pascual, P. Domingues, G. Gaxiola, A. Sánchez, T. Maldonado & C. Rosas. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss & Solís) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture*, 273: 641-655.
- Cagnetta, P. & A. Sublimi. 2000. Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C.) when fed on a monodiet. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47: 331-336.
- Castro B.G. 1990. Can *Sepia officinalis* L. be reared on artificial food? *Marine Behavior & Physiology*, 19: 35-38.
- Castro, B.G., F.P. DiMarco, R.H. DeRusha & P.G. Lee. 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: 241-252.
- Castro B.G. & P.G. Lee. 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L (Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry & Physiology*, 109A: 1007-1016.
- Cerezo-Valverde, J., M.D. Hernández, F. Aguado-Giménez & B. García-García. 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*, 275: 266-273.
- Chapela, A., A.F. González, E.G. Dawe, F.J. Rocha & A. Guerra. 2006. Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. *Scientia Marina*, 70: 121-129.
- Christie, W.W. 1982. *Lipids analysis*, 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: Pergamon Press.
- Condrey, R.E., J.G. Gosselink & H.J. Bennet. 1972. Comparison of the assimilation of different diets by *Penaeus setiferus* and *Penaeus aztecus*. *Fish. Bull.*, 70: 1281-1291.
- Daly, H.I. & L.S. Peck. 2000. Energy balance and cold adaptation in the octopus *Pareledone charcoti*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 245: 197-214.
- Domingues, P. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. Ph D. Thesis, University of the Algarve, Portugal, 95 p.
- Domingues, P.M., F.P. DiMarco, J.P. Andrade & P.G. Lee. 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 13: 423-440.
- Domingues P., V. Bettencourt & A. Guerra. 2006. Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie et Milieu*, 56: 109-120.
- Domingues, P., N. López, J. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola & C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatán octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13: 273-280.
- Domingues P., A. Ferreira, L. Márquez, J. Andrade, N. López & C. Rosas. 2008. Growth, absorption and assimilation efficiency by mature cuttlefish (*Sepia officinalis*) fed with alternative and artificial diets. *Aquaculture International*, 16: 215-229.

- FAO. 2001. *Fish and fisheries products*. En: FAO/ GIEWS (Ed.) Rome, Italy, 344 p.
- FAO. 2002. *The state of the world fisheries and aquaculture*. En: FAO/ GIEWS (Ed.) Rome, Italy.
- FAO. 2003. *FAO Globefish Cephalopods commodity update*. En: [www.globefish.org](http://www.globefish.org)
- García-García, B. & F. Aguado-Giménez. 2002. Influence of diet on ongrowing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 211: 171-182.
- García-García, B. & J. Cerezo-Valverde. 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) ongrowing. *Aquaculture*, 253: 502-511.
- García-García, J., L.M. Rodríguez-González & B. García-García. 2004. Cost analysis of octopus ongrowing installation in Galicia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 531-537.
- Globefish. 2006. En: <http://www.globefish.org/homepage.html>. Septiembre, 2006.
- Hanlon, R.T. & J. Messenger. 1996. *Cephalopod behaviour*. University Press, Cambridge, 278 p.
- Horwitz, W. 1980. Methods of analysis, 13<sup>th</sup> edn. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington D.C.
- Iglesias, J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1996. The octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier): a candidate for aquaculture? *International Council for the Exploration of the Sea*. Council Meeting. ICES 1996/ F: 10. Mariculture Committee.
- Iglesias, J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier) en el I.E.O. En: Costa J., E. Abellán, B. García, A. Ortega & S. Zamora (Eds.) *Actas del VI C. Nacional de Acuicultura*, pp. 221–226. ISBN: 84-491-0323-1. Cartagena, España.
- Iglesias, J., F.J. Sánchez, J.J. Otero & C. Moxica. 2000. Culture of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier): Present knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. *Cabiers Options Mediterraneennes*, 47: 313-321.
- Iglesias, J., J.J. Otero, C. Moxica, L. Fuentes & F.J. Sánchez. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12: 481-487.
- Iglesias, J., L. Fuentes, J. Sánchez, J.J. Otero, C. Moxica & M.J. Lago. 2006. First feeding of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) paralarvae using *Artemia*: effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261: 817–822.
- Iglesias, J., F.J. Sánchez, J.G.F. Bersano, J.F. Carrasco, J. Dhont, L. Fuentes, F. Linares, J.L. Muñoz, S. Okumura, J. Roo, T. van der Meeren, E.A.G. Vidal & R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266: 1-15.
- Itami, K., Y. Izawa, S. Maeda & K. Nakay. 1963. Notes on the laboratory culture of octopus larvae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 29(6): 514-520.
- Lee, P.G. 1994. Nutrition of cephalopods: fuelling the system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 25: 35-51.
- Lee, P.G., J.W. Forsythe, F.P. DiMarco, R. DeRusha & R.T. Hanlon. 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 49: 362-372.

- Luaces-Canosa, M. & M. Rey-Méndez. 2001. El engorde industrial de pulpo (*Octopus vulgaris*) en jaulas: análisis de dos años de cultivo en la Ría de Camariñas (Galicia). *Monografías Instituto Canario Ciencias Marinas*, 4: 184-189.
- Lucas, A. 1993. *Bioénergétique Des Animaux Aquatiques*. Masson, Paris.
- Mangold, K. 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44: 81-93.
- Mangold, K. & S.v. Boletzky. 1973. New dates on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19: 7-12.
- Miliou, H., M. Fintikaki, T. Kountouris & G. Verriopoulos. 2005. Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 249: 245-256.
- Navarro, J.C. & R. Villanueva. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture*, 183: 161-177.
- Navarro, J.C. & R. Villanueva. 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, 219: 613-631.
- O'Dor, R.K. & M.J. Wells. 1987. Energy and nutrient flow. En: Boyle, P.R. (Ed.) *Cephalopod life cycles*, vol 2., 109-133 pp. Academic Press, New York.
- Otero, J.J., C. Moxica, F. J. Sánchez & J. Iglesias. 2001. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier) a diferentes densidades de estabulación. En: *Convergencia entre Investigación y Empresa: Un reto para el siglo XXI*. H. Fernández-Palacios & M. Izquierdo (eds.). *Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas*, 4: 180-183.
- Okumura, K., A. Kurihara, A. Iwamoto & T. Takeuchi. 2005. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture*, 244: 147-157.
- Petza, D., S. Katsanevakis & G. Verriopoulos. 2006. Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed *ad libitum* on a high-lipid diet. *Marine Biology (Berl.)*, 148: 827-832.
- Portner, H.O. & R.K. O'Dor. 1994. Physiology of cephalopod molluscs. En: Macmillan D.L. (Ed.) *Lifestyle and performance adaptations*, 214 p. Gordon & Breach Publishers, Basilea, Suiza.
- Rodríguez, C., J.E. Carrasco & M. Rodríguez. 2003. Engorde de juveniles de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en jaulas. En: *IX Congreso Nacional de Acuicultura*, 268-269 pp, Cádiz, 11-16 May, 1993.
- Rosas, C., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, D. Chay, N. López, T. Maldonado & P.M. Domingues. 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, 152: 371-381.
- Sánchez, F.J., J. Iglesias, C. Moxica & J.J. Otero. 1998. Growth of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier), males and females under culture conditions. *Aquaculture and Water, European Aquaculture Society (Spec. Publ.)*, 26: 244-245.
- Smale, M.J. & P.R. Buchan. 1981. Biology of *Octopus vulgaris* off the East coast of South Africa. *Marine Biology (Berlin)*, 65: 1-12.

- Van Heukelem, W.F. 1976. Growth, bioenergetics and life span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. *Ph.D. thesis*, University of Hawaii, 224 p.
- Vaz-Pires, P., P. Seixas & A. Barbosa. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797): a review. *Aquaculture*, 238(1-4): 221-238.
- Villanueva, R., J. Riba, C. Ruíz-Capillas, A.V. González & M. Baeta. 2004. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effects of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*, 242: 455-478.
- Wells, M.J. 1978. Octopus. *Physiology and behaviour of an advanced invertebrate*. Chapman & Hall, London. 417 p.
- Wells, M.J. 1990. Oxygen extraction and jet propulsion in cephalopods. *Canadian Journal of Zoology*, 68: 815-824.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4<sup>th</sup> ed., 663 p. En: Ryu, T. (Ed.) Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, N.J.

## EFFECTOS DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNAS DE PESCADO (CPSP®) SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE *Octopus vulgaris* (CUVIER, 1797) JUVENILES

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental están publicados en el artículo:

**García-Garrido S**, Hachero-Cruzado I, Domingues P, López N, Rosas C (2011) *Effects of fish hydrolysate (CPSP®) on growth and digestive gland lipid composition of Octopus vulgaris (Cuvier, 1797) juveniles*. Aquaculture Nutrition, 17: e825–e839. DOI 10.1111/j.1365-2095.2010.00839.x

### 3.1. Resumen

En este trabajo se analizaron los efectos de varias dietas artificiales sobre el crecimiento y la composición lipídica de la glándula digestiva (GD), en pulpos *Octopus vulgaris* juveniles. En el Experimento I se usaron tres dietas: (1) SQUID: calamar (*Loligo gahi*) como dieta control; (2) GEL20: pasta de calamar e hidrolizado de proteínas de pescado CPSP®, aglutinados con gelatina; y (3) GEL40: pasta de calamar, CPSP® y gelatina. En el Experimento II, las tres dietas usadas fueron: (1) SQUID: dieta control; (2) ALG10: pasta de calamar, CPSP® y alginato como aglutinante; y (3) ALG20: pasta de calamar, CPSP® y alginato. Para ambos experimentos, las tasas de crecimiento obtenidas para los pulpos alimentados con la dieta control fueron las más altas ( $p < 0,05$ ), no encontrándose diferencias en crecimiento entre los pulpos alimentados con las dietas artificiales ( $p > 0,05$ ). Todas las dietas dieron lugar a un crecimiento similar, con independencia de las distintas concentraciones de CPSP® y aglutinantes utilizados. Las tasas de crecimiento obtenidas son, hasta ahora, de entre las más altas conseguidas en *O. vulgaris* alimentado con dietas artificiales. La composición en ácidos grasos de la GD reflejó en gran medida el bajo crecimiento presentado con el uso de dietas artificiales. Los grupos de ácidos grasos más importantes, como los ácidos grasos  $n-3$  altamente insaturados, disminuyeron en la GD de los pulpos alimentados con dietas artificiales. El contenido en lípidos, en especial en lípidos neutros, fue mayor en la GD de los pulpos alimentados con SQUID, indicando una mejor condición nutricional en estos animales comparados con los alimentados con dietas artificiales.

**Palabras clave:** Ácidos grasos · Crecimiento · Dietas artificiales · Glándula digestiva · Lípidos · Pulpo.



### 3.2. Introducción

*Octopus vulgaris* es una especie potencial para la diversificación de la acuicultura debido a sus altas tasas de crecimiento (Iglesias *et al.*, 2007), su elevado precio en el mercado (FAO, 2008) y su gran demanda en muchas regiones del mundo. Actualmente, el engorde de esta especie se lleva a cabo en Galicia, Norte de España (Iglesias *et al.*, 1997). Sin embargo, su viabilidad es baja debido a la dependencia del cultivo a la captura de juveniles del medio natural y a la ausencia de una adecuada dieta artificial (Domingues *et al.*, 2009). Así, los principales problemas para conseguir una acuicultura comercial de *O. vulgaris* son la alta mortalidad en la fase paralarvaria del ciclo de cultivo (Iglesias *et al.*, 2007) y la inexistencia de alimentos artificiales adecuados para su engorde (Domingues *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007).

El interés por el desarrollo de dietas artificiales para cefalópodos comenzó hace aproximadamente 30 años (Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983; DeRusha *et al.*, 1989), centrándose principalmente en *Sepia officinalis*. Pellets secos y húmedos (Castro, 1990; Castro *et al.*, 1993; Castro & Lee, 1994) y surimi (concentrado de proteína miofibrilar de peces) (Castro *et al.*, 1993; Castro & Lee, 1994; Domingues, 1999; Domingues *et al.*, 2005) fueron inicialmente utilizados pero con resultados no muy óptimos (Castro *et al.*, 1993; Castro & Lee, 1994; Domingues *et al.*, 2005). En los últimos años, se ha llevado a cabo un gran esfuerzo para la consecución de dietas elaboradas en diversos cefalópodos, especialmente en *O. vulgaris* (Cerezo-Valverde *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008) y *Octopus maya* (Domingues *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007).

Para el desarrollo de dietas artificiales, el uso de aglutinantes como estabilizantes de la dieta es una práctica común en acuicultura. Se han utilizado como aglutinantes de dietas de pescado, entre otros, almidón de trigo y maíz, goma arábica, celulosa y lignosulfatos (Yamamoto & Akiyama, 1995). No existe mucha información sobre digestibilidad de los alimentos, observándose en la mayoría de los aglutinantes una baja incidencia sobre dicha digestibilidad. El alginato es uno de los aglutinantes más utilizados y diferentes niveles del mismo pueden endurecer y alterar las heces o reducir la contaminación (Cho & Bureau, 2001; Brinker *et al.*, 2005). Morales *et al.* (1993) y Arzel *et al.* (1995) demostraron la relación entre el alginato y la digestibilidad de los nutrientes. Existen referencias donde se observan los efectos negativos del alginato en la lubina (*Dicentrarchus labrax*), al incluir cantidades superiores a 150 g kg<sup>-1</sup> del mismo en la dieta (Gabaudan, 1987).



Cerezo-Valverde *et al.* (2008) utilizó alginato como aglutinante en la boga (*Boops boops*) y camarón para preparar dietas con las que no se obtuvo crecimiento en *O. vulgaris*. Sin embargo, una dieta artificial húmeda basada en cangrejo y aglutinada con gelatina dio lugar a un considerable crecimiento y supervivencia en *O. maya* (Rosas *et al.*, 2007). Además, dietas aglutinadas con alginato produjeron un crecimiento moderado en juveniles de la misma especie (Águila *et al.*, 2007).

La glándula digestiva es un órgano activamente implicado en la digestión de lípidos y en su almacén (Rosa *et al.*, 2005). De hecho, las concentraciones más altas de lípidos en cefalópodos se han encontrado en este órgano (Mangold, 1983; Moltschaniwskyj & Johnston, 2006). Además, existen evidencias de que no es utilizada como almacén de lípidos a largo plazo (Boucher-Rodoni *et al.*, 1987; Fluckiger *et al.*, 2008). La GD es considerada un buen indicador del estado nutricional (García *et al.*, 2011) como así las tasas de crecimiento se consideran un buen indicador de la condición o estado de los cefalópodos. En consecuencia, en estos experimentos, se determinaron la composición en Lípidos totales (LT), Clases lipídicas (CL) y Ácidos grasos (AG) de la glándula digestiva.

El objetivo de esta investigación ha sido determinar si incrementos en la concentración de hidrolizado de proteínas de pescado (CPSP®, comúnmente utilizado en la elaboración de dietas elaboradas debido a su alto contenido en cadenas cortas de aminoácidos) podrían mejorar el crecimiento de *O. vulgaris* y si el uso de los dos aglutinantes (gelatina y alginato) fue adecuado para la elaboración de una dieta para esta especie. La composición lipídica de la glándula digestiva y de las dietas fue determinada para poder evaluar los efectos de las dietas artificiales sobre el contenido en lípidos de la glándula digestiva. Como dieta control se utilizó calamar congelado ya que con su uso se obtuvo un buen crecimiento en el engorde de esta especie en nuestro grupo de investigación (Quintana *et al.*, 2008).

### 3.3. Material y métodos

#### Origen de los organismos y condiciones de aclimatación

La captura de los pulpos se realizó mediante trampas en la costa de Huelva (Sur de España) y para facilitar la investigación fueron transportados al IFAPA Centro Agua del Pino (Cartaya, Huelva, España). Para cada experimento, treinta animales fueron distribuidos individualmente en un sistema con flujo continuo de agua de mar compuesto

por 30 tanques cilíndricos de 80 L de volumen cada uno. Los pulpos fueron alimentados con calamar (*L. gahi*) y aclimatados en estos tanques durante una semana.

### Diseño experimental y protocolo de muestreo

Tras el periodo de aclimatación, los pulpos fueron pesados (valores medios  $\pm$  desviación estándar (D.E.):  $320,3 \pm 162,5$  g y  $623,3 \pm 129,1$  g para el Experimento I y II, respectivamente) y distribuidos aleatoriamente entre los treinta tanques experimentales. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los pesos de los diez pulpos alimentados con las dietas SQUID, GEL20 y GEL40 ( $359,9 \pm 149,7$  g,  $318,1 \pm 208,0$  g y  $268,9 \pm 115,4$  g, respectivamente) al inicio del Experimento I. De igual forma, los pesos de los diez pulpos alimentados con SQUID, ALG10 y ALG20 al inicio del Experimento II ( $701,8 \pm 41,6$  g,  $578,9 \pm 157,4$  g y  $590,1 \pm 131,3$  g, respectivamente) no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ).

Durante los dos experimentos, se suministró una ración diaria de  $100 \text{ g kg}^{-1}$  (peso húmedo del alimento/ peso húmedo del animal) a cada pulpo una vez al día a las 9:00 h. Los restos de comida fueron retirados de cada tanque 6 h después de la alimentación. Debido a la inestabilidad de las dietas en el agua, no fue posible determinar el peso de los restos de comida.

Todos los pulpos fueron pesados individualmente cada diez días; para cada intervalo de muestreo los datos obtenidos se utilizaron para calcular la Tasa de crecimiento instantánea (IGR,  $\text{g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ), definida como:

$$\text{IGR} = ((\ln W_2 - \ln W_1)/t) \times 1000$$

Siendo:

- $W_2$  y  $W_1$ , el peso húmedo final e inicial (g) de los pulpos, respectivamente.
- $\ln$ , el logaritmo natural.
- $t$ , el número de días del periodo experimental.
- $\text{g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ , gramos por kilogramo de peso corporal por día.

La temperatura del agua medida durante los experimentos fue  $20 \pm 1$  °C, la salinidad igual a  $36 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$  y el pH,  $7,9 \pm 0,1$ . El flujo de agua fue ajustado en todos los tanques para mantener la concentración de oxígeno cercana a los niveles de saturación. Para ambos

experimentos, se usó un fotoperiodo natural, correspondiente a la estación de primavera del área geográfica de Huelva (14 h D: 10 h N). Cada experimento duró treinta días.

Posteriormente, el contenido en proteínas, carbohidratos y cenizas fue determinado a partir de muestras liofilizadas, en triplicado. El contenido proteico se calculó a partir de 1 a 2 mg de muestras tomadas de cada dieta. El contenido en carbohidratos fue también determinado a partir de 2 a 3 mg de muestras tomadas de cada dieta. El contenido en cenizas se calculó con muestras de 100 a 200 mg de cada dieta utilizada. La humedad fue calculada en muestras de 500 mg, tanto de las dietas como de las GD de los pulpos alimentados con ellas.

Finalmente, tres muestras (2 g/ muestra) de cada dieta y de la glándula digestiva de tres pulpos alimentados con cada dieta fueron utilizadas para determinar el contenido en LT, CL y AG. Las muestras tomadas fueron mezcladas con cloroformo: metanol (2:1 volumen/volumen; v/ v), inmediatamente colocadas en hielo seco y almacenadas a -80 °C hasta el análisis de lípidos.

### **Elaboración de dietas: Experimento I**

Las tres dietas utilizadas en el Experimento I (10 pulpos / dieta) fueron las siguientes:

- Dieta SQUID: calamar (*L. gahi*) previamente congelado, como dieta control.
- Dieta GEL20: pasta de calamar (*L. gahi*) (700 g kg<sup>-1</sup>), hidrolizado de proteínas de pescado CPSP® (200 g kg<sup>-1</sup>) y gelatina (100 g kg<sup>-1</sup>) como aglutinante.
- Dieta GEL40: pasta de calamar (*L. gahi*) (500 g kg<sup>-1</sup>), hidrolizado de proteínas de pescado CPSP® (400 g kg<sup>-1</sup>) y gelatina (100 g kg<sup>-1</sup>).

Las dietas GEL20 y GEL40 fueron elaboradas cada 2 días. El hidrolizado de proteínas de pescado CPSP® fue adquirido en Sopropeche (Francia) y el aglutinante utilizado fue gelatina comercial (Aditio 80-100 Blooms, Panreac®, España).

### **Elaboración de dietas: Experimento II**

Las tres dietas utilizadas en el Experimento II (10 pulpos / dieta) fueron las siguientes:

- Dieta SQUID: calamar (*L. gahi*) como dieta control.
- Dieta ALG10: pasta de calamar (*L. gahi*) (750 g kg<sup>-1</sup>), hidrolizado de proteínas de pescado CPSP® (100 g kg<sup>-1</sup>) y alginato (150 g kg<sup>-1</sup>) como aglutinante.

- Dieta ALG20: pasta de calamar (*L. gahi*) (650 g kg<sup>-1</sup>), hidrolizado de proteínas de pescado CPSP® (200 g kg<sup>-1</sup>) y alginato (150 g kg<sup>-1</sup>).

Las dietas ALG10 y ALG20 fueron elaboradas cada 2 días. CPSP® fue adquirido en Sopropêche (Francia) y el aglutinante utilizado fue alginato comercial (Pokel Merl® y Pokel Cal®, Prosur, España).

### **Proteínas**

El contenido proteico de cada dieta se determinó mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) modificado por Bensadoun & Weinstein (1976) y Hess *et al.* (1978). El contenido en proteínas se cuantificó como gramos por kilogramo en peso seco (g kg<sup>-1</sup> ps).

### **Carbohidratos**

El contenido en carbohidratos de cada dieta se determinó mediante el método de la Antrona (Fraga, 1956) y se cuantificó como gramos por kilogramo en peso seco (g kg<sup>-1</sup> ps).

### **Cenizas**

Para la determinación del contenido en cenizas, muestras (100-200 mg) de cada dieta, congeladas en hielo seco, fueron colocadas en crisoles de porcelana previamente marcados y pesados. Los crisoles con las muestras se introdujeron en un horno a 550 °C durante 12 h, siendo después enfriadas en un desecador y de nuevo pesados. El contenido en cenizas se cuantificó como gramos por kilogramo en peso seco (g kg<sup>-1</sup> ps).

### **Humedad**

El contenido en humedad se determinó usando el método de Horwitz (1980), siendo cuantificada como gramos por kilogramo en peso húmedo (g kg<sup>-1</sup> ph).

### **Energía**

El contenido energético del alimento se determinó mediante bomba calorimétrica (Parr®) calibrada con ácido benzoico y expresado como kilojulios por kilogramo de dieta (kJ kg<sup>-1</sup> dieta).

### Lípidos totales

Los LT fueron extraídos con cloroformo: metanol (2: 1 v/v) más 0,01 % de hidroxitolueno butilado (BHT) (v/v) como antioxidante (Christie, 1982). El solvente orgánico fue evaporado bajo una corriente de nitrógeno y el contenido en lípidos determinado por gravimetría.

La cuantificación del contenido en LT de las dietas y de la GD de *O. vulgaris* se realizó en gramos por kilogramo en peso seco ( $\text{g kg}^{-1}$  ps).

### Clases lipídicas

La separación en CL se realizó mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC), de doble desarrollo y unidimensional. Se usó como solvente polar metil-acetato/ isopropanol/ cloroformo/ metanol/ cloruro de potasio (0,25 %, masa/ volumen) (25:25:25:10:9 vol.), y como solvente para lípidos neutros hexano/ dietil-éter/ ácido acético glacial (80:20:2 vol.). Las CL resultantes se cuantificaron mediante carbonización con reactivo de acetato de cobre seguido de densitometría, usando CAMAG TLC Scanner 3 de doble longitud de onda (Olsen & Henderson, 1989).

La cuantificación del contenido en Lípidos Neutros (LN), Lípidos Polares (LP) y CL de las dietas y de la GD de *O. vulgaris* alimentado con cada dieta se realizó en gramos por kilogramo en peso seco ( $\text{g kg}^{-1}$  ps).

### Ácidos grasos

Los extractos de lípidos totales extraídos fueron sometidos a trans-metilación ácido-catalizada durante 16 h a 50 °C, usando 1 ml de tolueno y 2 ml de ácido sulfúrico al 1 % en metanol (v/ v). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos resultantes (FAME) fueron purificados mediante cromatografía de capa fina (TLC) y visualizados con yodina en cloroformo/ metanol (2: 1 v/ v) al 98 % (v/ v) y 0,01 % de BHT (Christie, 1982). Antes de llevar a cabo la trans-metilación, el ácido nonadecanoico (19:0) fue añadido a la muestra de LT como estándar interno a una concentración de 1 mg/ml (5 % LT). Los FAME fueron separados y cuantificados en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 (Duisburg, Alemania) equipado con un detector de ionización de llama (250 °C) y una columna capilar de sílice fundida Tecnokroma-Superwax-280<sup>TM</sup> (10 m x 0,1 mm I.D.). El helio se usó como gas portador, y la temperatura inicial del horno fue de 150 °C, seguida de un aumento a un

ritmo de 90 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar una temperatura final de 250 °C a los 3 minutos. Los FAME fueron identificados individualmente basándose en unos patrones de referencia de aceite de pescado bien caracterizados (FAME Mix C4-C24 y Menhaden Oil; SUPELCO, Bellefonte, PA, EEUU).

Los ácidos grasos del total de lípidos de las dietas y de la GD de *O. vulgaris* alimentado con cada dieta fueron cuantificados en gramos de ácido graso por kilogramo de dieta o GD en peso seco (g kg<sup>-1</sup> ps). Para la identificación de los ácidos grasos se usó el programa GC Solution (Versión 2.30.00 SU 4). Para el cálculo del contenido (g kg<sup>-1</sup> ps) en AG se aplicó la ecuación:

$$AG = \frac{SI \times \% AG \times LT}{\% SI} \quad (g \text{ kg}^{-1} \text{ ps})$$

Siendo:

- AG, el ácido graso a cuantificar.
- SI, estándar interno añadido al lípido analizado (g g<sup>-1</sup> LT).
- % AG, el porcentaje del ácido graso a cuantificar en contenido.
- LT, lípido total (g kg<sup>-1</sup> ps)
- % SI, el porcentaje de estándar interno (ácido nonadecanoico, 19:0).

BHT, cloruro de potasio, bicarbonato de potasio y yodina fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). Las placas de TLC (20 cm x 20 cm x 0,25 mm) se adquirieron de Macheren-Nagel (Düren, Alemania). La cámara de fondo plano (para placas 10 x 10 cm) y las placas HPTLC (10 x 10 cm x 0,2 mm) recubiertas con gel de sílice (sin indicador fluorescente) fueron adquiridas a Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los solventes orgánicos usados en cromatografía de gases fueron reactivos de calidad adquiridos de Panreac (Barcelona, España).

### **Análisis estadístico**

En ambos experimentos, las diferencias en crecimiento, composición lipídica de la glándula digestiva y composición proximal entre los tres grupos de pulpos alimentados con las dietas fueron analizadas mediante ANOVA de una vía. Cuando se encontraron diferencias se aplicó el test de Tukey de comparación múltiple. Todos los datos fueron analizados verificando la normalidad de la distribución mediante la prueba no paramétrica Kolmogórov-Sminov así como la homogeneidad de varianzas fue verificada con el test de

Cochran. Cuando no se pudo verificar una distribución normal y/o la homogeneidad de varianzas, los datos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ANOVA de una vía) (Zar, 1999). Los resultados obtenidos en ambos experimentos se expresaron como el valor medio de triplicados  $\pm$  D.E. Todos los ensayos estadísticos se llevaron a cabo con el programa STATISTICA 6.0., considerándose estadísticamente diferente  $p < 0,05$  para todas las pruebas estadísticas utilizadas (Zar, 1999).

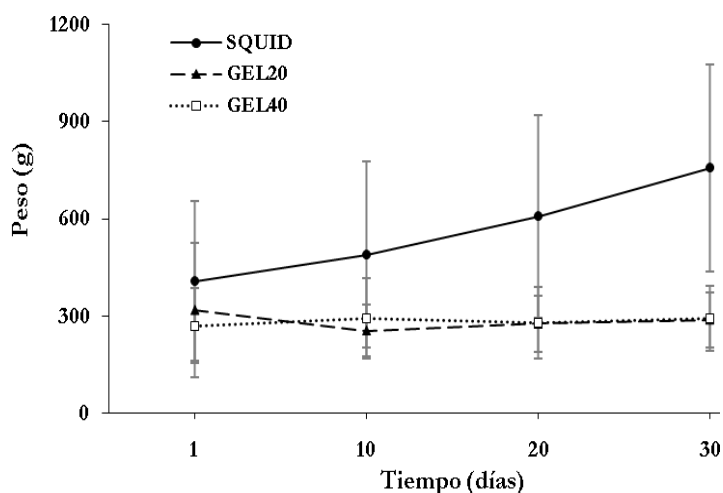
Para el caso de la composición en AG y CL, donde la interpretación de los resultados a partir de las tablas es complicada, se realizó el Análisis de Componentes Principales (ACP) para poder determinar posibles diferencias entre composición de dietas y de la GD de los pulpos. El factor clave de este tipo de análisis es la determinación de variables que expliquen el mayor porcentaje posible de varianza, y puedan informar sobre una proporción aceptable del total de la varianza en estudio. De esta forma, los datos sobre AG y CL fueron analizados mediante ACP. Los gráficos de resultados obtenidos tras generar los dos componentes principales se utilizaron para establecer grupos basados en la descripción de la dieta suministrada (GEL\_SQUID: para muestras de GD de pulpos alimentados con la dieta control SQUID en el Experimento I, ALG\_SQUID: para muestras de GD de pulpos alimentados con la dieta control SQUID en el Experimento II, ALG10, ALG20, GEL20, GEL40). Las variables seleccionadas fueron adecuadas para el ACP de acuerdo con los resultados obtenidos al aplicar el test Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y el test de esfericidad de Bartlett.

Todos los ensayos estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 17 (Chicago, IL, EEUU), con un nivel de confianza del 95 % (Zar, 1999).

### 3.4. Resultados

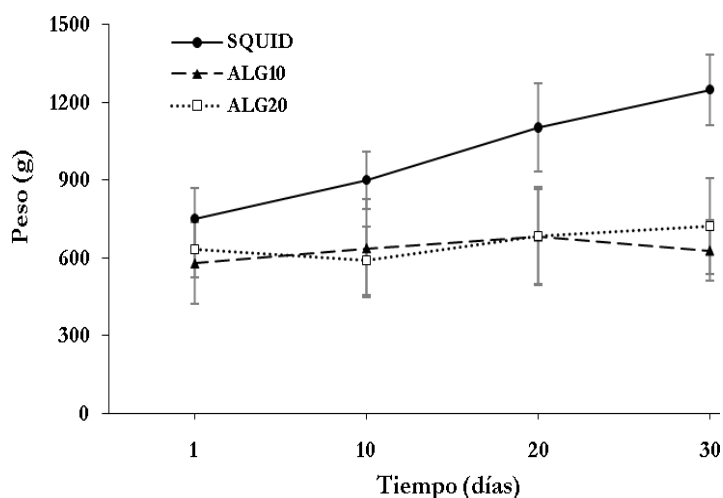
#### Crecimiento

La Figura 3.1 muestra el peso final de los pulpos en el Experimento I. Los animales alimentados con la dieta SQUID crecieron significativamente más ( $p < 0,05$ ) que los alimentados con las dos dietas artificiales, entre los cuales no hubo diferencias ( $p > 0,05$ ). El peso final de los pulpos alimentados con SQUID, GEL20 y GEL40 fue  $757,6 \pm 319,4$  g,  $288,4 \pm 85,2$  g y  $302,8 \pm 98,4$  g, respectivamente. Las tasas de crecimiento medias fueron  $25,1 \pm 3,2$ ,  $8,9 \pm 5,8$  y  $6,1 \pm 4,9$  g kg<sup>-1</sup> pc d<sup>-1</sup> para pulpos alimentados con la dietas SQUID, GEL20 y GEL40, respectivamente; siendo más alta la presentada por pulpos con dieta control ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.1** Peso medio (g) de los pulpos alimentados con la dieta SQUID y las dos dietas artificiales (GEL20 y GEL40) en los diferentes periodos de muestreo del Experimento I. Las barras indican desviación estándar.

La Figura 3.2 muestra el peso final de los pulpos en el Experimento II. Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) fueron observadas entre los pulpos alimentados con la dieta SQUID y los alimentados con las dietas artificiales, entre los cuales no hubo diferencias ( $p > 0,05$ ). El peso final de los pulpos alimentados con SQUID, ALG10 y ALG20 fue  $1249,8 \pm 136,8$  g,  $628,2 \pm 116,7$  g y  $722,1 \pm 183,2$  g, respectivamente. Las tasas de crecimiento medias fueron  $18,3 \pm 3,3$ ,  $8,0 \pm 5,1$  y  $5,9 \pm 5,0$   $\text{g kg}^{-1} \text{pc d}^{-1}$  para pulpos alimentados con la dietas SQUID, ALG10 y ALG20, respectivamente; siendo más alta la presentada por pulpos con dieta control ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.2** Peso medio (g) de los pulpos alimentados con la dieta SQUID y las dos dietas artificiales (ALG10 y ALG20) en los diferentes periodos de muestreo del Experimento II. Las barras indican desviación estándar.



Durante el Experimento I se registró una mortalidad del 20 % en pulpos alimentados con la dieta control y GEL20, y no se observaron casos en pulpos con la dieta GEL40. En el Experimento II, la mortalidad registrada fue del 20 % para pulpos con dieta SQUID y ALG10, y del 40 % para los alimentados con la dieta ALG20.

## Composición de las dietas experimentales

### Composición proximal de las dietas elaboradas

En la Tabla 3.1 se muestra la composición proximal de las dietas elaboradas utilizadas en los Experimentos I y II. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre dietas en los contenidos en proteína, lípidos y energía; pero sí se observó diferencias en humedad ( $p < 0,05$ ). El contenido en cenizas fue similar ( $p > 0,05$ ) para las dietas GEL20 y GEL40, y mayor ( $p < 0,05$ ) en las dietas SQUID, ALG10 y ALG20, entre las que no hubo diferencias ( $p > 0,05$ ).

### Ácidos grasos de las dietas elaboradas

El contenido en ácidos grasos ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) de las dietas elaboradas para los Experimentos I y II se muestra en la Tabla 3.2. En ella se puede observar que entre las dietas utilizadas no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el contenido de AG saturados, siendo el ácido palmítico (16:0) el más importante ( $p < 0,05$ ) en la dieta SQUID, comparado con las otras dietas (excepto la dieta GEL20;  $p > 0,05$ ).

**Tabla 3.1** Composición proximal de las dietas elaboradas para los Experimentos I y II.

Dieta	SQUID	GEL20	GEL40	ALG10	ALG20
<b>Humedad</b>	794,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	569,0 ± 4,0 <sup>d</sup>	417,6 ± 2,7 <sup>e</sup>	725,5 ± 2,2 <sup>b</sup>	646,6 ± 3,8 <sup>c</sup>
<b>Energía</b>	18,0 ± 1,1	18,0 ± 1,2	18,2 ± 0,9	17,9 ± 1,1	18,0 ± 1,0
<b>Proteínas</b>	727,4 ± 67,4	768,2 ± 99,0	762,3 ± 60,5	763,4 ± 21,2	712,2 ± 58,5
<b>Lípidos</b>	81,5 ± 7,6	88,5 ± 5,2	86,9 ± 9,6	70,9 ± 9,4	78,5 ± 5,0
<b>Cenizas</b>	97,4 ± 11,0 <sup>a</sup>	56,4 ± 6,4 <sup>b</sup>	46,9 ± 9,7 <sup>b</sup>	100,9 ± 5,4 <sup>a</sup>	97,1 ± 1,4 <sup>a</sup>
<b>Carbohidratos</b>	85,8 ± 1,9 <sup>c</sup>	75,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	82,4 ± 3,0 <sup>ac</sup>	79,5 ± 6,3 <sup>ab</sup>	87,5 ± 8,3 <sup>c</sup>

Los valores ( $n = 5$ ; media ± D.E.) representados como  $\text{g kg}^{-1}$  (humedad),  $\text{kJ kg}^{-1}$  (energía) y como  $\text{g kg}^{-1}$  ps (proteínas, lípidos, cenizas y carbohidratos). Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre dietas.

El contenido en monoinsaturados fue mayor ( $p < 0,05$ ) en las dietas GEL20, GEL40 y ALG20, comparadas con ALG10 y SQUID; y, a su vez, mayor ( $p < 0,05$ ) en ALG10 que en SQUID. Las mismas diferencias fueron observadas en el grupo de ácidos grasos monoinsaturados omega 9, donde el ácido oleico (18:1  $n-9$ ) fue el más abundante presentando una concentración más baja ( $p < 0,05$ ) en la dieta SQUID.

En todas las dietas se registró un contenido similar ( $p > 0,05$ ) de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), excepto en la dieta GEL40 que presentó un valor más bajo ( $p < 0,05$ ). Los ácidos grasos altamente insaturados omega 3 (HUFA  $n-3$ ) y el grupo omega 3 fueron más abundantes ( $p < 0,05$ ) en las dietas SQUID y GEL20 comparadas con el resto de las dietas. Los AG  $n-3$  más importantes fueron el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6  $n-3$ ) y el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5  $n-3$ ), con altos contenidos ( $p < 0,05$ ) en la dieta control SQUID. Es destacable que aunque existieron diferencias en los contenidos de estos dos AG entre las dietas, la ratio EPA/ DHA fue cercana a 0,5 y similar ( $p > 0,05$ ) entre todas las dietas utilizadas en los Experimentos I y II.

Los AG  $n-6$  fueron más importantes en las dietas artificiales que en la dieta control ( $p < 0,05$ ). El ácido araquidónico (ARA, 20:4  $n-6$ ), para la dieta SQUID, y el ácido linoleico (18:2  $n-6$ ), para las dietas elaboradas, fueron los AG  $n-6$  más importantes. Así pues, las ratios ARA/ EPA y ARA/ DHA fueron generalmente más bajas en la dieta SQUID respecto del resto de dietas experimentales, y significativamente menores ( $p < 0,05$ ) comparadas con la dieta GEL40.

#### Clases lipídicas de las dietas elaboradas

En la Tabla 3.3 se muestra el análisis de clases lipídicas ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) de las dietas elaboradas para los Experimentos I y II. El contenido en lípidos totales fue similar ( $p > 0,05$ ) en todas las dietas (aproximadamente  $80 \text{ g kg}^{-1}$  ps). El total de lípidos neutros (LNT) fue mayor ( $p < 0,05$ ) en las dietas GEL20 y GEL40, así como lo fue en ALG20 y SQUID ( $p > 0,05$ ) respecto de la dieta ALG10. El total de lípidos polares (LPT) fue superior ( $p < 0,05$ ) en la dieta SQUID comparado con las dietas artificiales. LNT presentaron un contenido mayor que LPT en todas las dietas, siendo tres veces superior en la dieta SQUID y cuatro veces en el caso de las dietas artificiales. Los LN más importantes fueron el colesterol (CT) y los ácidos grasos libres (AGL) para la dieta SQUID, y para las dietas artificiales lo fueron los AGL y los triglicéridos (TG). Los ésteres de esteroles (EE) fueron más abundantes ( $p < 0,05$ ) en las dietas GEL20, GEL40 y ALG20 respecto de las dietas ALG10 y SQUID.

**Tabla 3.2** Contenido en Ácidos Grasos del total de lípidos (g AG kg<sup>-1</sup> ps) de las dietas elaboradas para los Experimentos I y II.

Dieta	SQUID	GEL20	GEL40	ALG10	ALG20
<b>14:0</b>	1,31 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,11 <sup>ab</sup>	1,76 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,33 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,55 ± 0,15 <sup>ab</sup>
<b>16:0</b>	11,63 ± 0,90 <sup>a</sup>	10,18 ± 0,35 <sup>ab</sup>	9,00 ± 0,86 <sup>b</sup>	9,11 ± 1,19 <sup>b</sup>	9,26 ± 0,77 <sup>b</sup>
<b>16:1 n-7</b>	<i>Tr</i>	1,67 ± 0,22 <sup>b</sup>	2,19 ± 0,23 <sup>c</sup>	1,12 ± 0,17 <sup>d</sup>	1,66 ± 0,17 <sup>b</sup>
<b>18:0</b>	1,47 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,86 ± 0,12 <sup>ab</sup>	1,95 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,49 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,75 ± 0,15 <sup>ab</sup>
<b>18:1 n-9</b>	1,49 ± 0,21 <sup>a</sup>	6,34 ± 0,81 <sup>b</sup>	8,28 ± 0,90 <sup>c</sup>	4,26 ± 0,63 <sup>d</sup>	6,23 ± 0,48 <sup>b</sup>
<b>18:1 n-7</b>	0,90 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,12 <sup>bc</sup>	1,59 ± 0,14 <sup>b</sup>	1,15 ± 0,18 <sup>ac</sup>	1,43 ± 0,20 <sup>bc</sup>
<b>18:2 n-6</b>	<i>Nd</i>	0,94 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,24 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,11 <sup>c</sup>	0,93 ± 0,09 <sup>bc</sup>
<b>20:1 n-9</b>	1,86 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,19 <sup>b</sup>	3,21 ± 0,35 <sup>b</sup>	2,25 ± 0,30 <sup>ac</sup>	2,78 ± 0,25 <sup>bc</sup>
<b>20:4 n-6</b>	0,61 ± 0,06	0,65 ± 0,10	0,56 ± 0,13	0,51 ± 0,06	0,56 ± 0,05
<b>20:5 n-3</b>	5,91 ± 0,36 <sup>a</sup>	4,50 ± 0,38 <sup>b</sup>	3,49 ± 0,57 <sup>b</sup>	4,19 ± 0,56 <sup>b</sup>	3,89 ± 0,37 <sup>b</sup>
<b>22:1 n-11</b>	<i>Nd</i>	1,69 ± 0,25 <sup>b</sup>	2,42 ± 0,41 <sup>c</sup>	1,06 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,69 ± 0,17 <sup>b</sup>
<b>22:6 n-3</b>	11,10 ± 0,61 <sup>a</sup>	8,61 ± 0,96 <sup>b</sup>	6,52 ± 1,11 <sup>b</sup>	7,88 ± 0,97 <sup>b</sup>	7,35 ± 0,83 <sup>b</sup>
<b>NC</b>	2,75 ± 0,26	2,99 ± 0,05	2,92 ± 0,31	2,44 ± 0,36	2,69 ± 0,17
<b>AGT</b>	42,58 ± 2,83	49,35 ± 3,37	49,15 ± 5,70	40,47 ± 5,38	45,39 ± 3,81
<b>Sat</b>	15,03 ± 1,17	14,38 ± 0,61	13,37 ± 1,26	12,53 ± 1,67	13,20 ± 1,12
<b>Mon</b>	5,49 ± 0,41 <sup>a</sup>	14,92 ± 1,64 <sup>b</sup>	18,36 ± 1,90 <sup>b</sup>	10,51 ± 1,55 <sup>c</sup>	14,53 ± 1,32 <sup>b</sup>
<b>PUFA</b>	19,05 ± 1,24 <sup>a</sup>	16,89 ± 1,51 <sup>ab</sup>	14,37 ± 2,30 <sup>b</sup>	14,82 ± 1,90 <sup>ab</sup>	14,83 ± 1,48 <sup>ab</sup>
<b>n-3</b>	17,80 ± 1,02 <sup>a</sup>	14,71 ± 1,38 <sup>ab</sup>	11,89 ± 1,90 <sup>b</sup>	13,27 ± 1,66 <sup>b</sup>	12,80 ± 1,36 <sup>b</sup>
<b>n-6</b>	0,93 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,81 ± 0,14 <sup>bc</sup>	2,00 ± 0,35 <sup>b</sup>	1,29 ± 0,20 <sup>ac</sup>	1,66 ± 0,12 <sup>bc</sup>
<b>n-9</b>	3,63 ± 0,31 <sup>a</sup>	9,63 ± 1,03 <sup>b</sup>	11,74 ± 1,15 <sup>b</sup>	6,80 ± 0,97 <sup>c</sup>	9,36 ± 0,76 <sup>b</sup>
<b>HUFA n-3</b>	17,36 ± 0,99 <sup>a</sup>	13,87 ± 1,38 <sup>ab</sup>	10,87 ± 1,76 <sup>b</sup>	12,61 ± 1,58 <sup>b</sup>	11,95 ± 1,27 <sup>b</sup>
<b>n-3/ n-6</b>	19,25 ± 0,99 <sup>a</sup>	8,11 ± 0,19 <sup>b</sup>	5,96 ± 0,25 <sup>c</sup>	10,36 ± 0,33 <sup>d</sup>	7,70 ± 0,30 <sup>b</sup>
<b>EPA/ DHA</b>	0,53 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,53 ± 0,01
<b>ARA/ EPA</b>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>ab</sup>
<b>ARA/ DHA</b>	0,05 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>ab</sup>
<b>Mon/ H n-3</b>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,70 ± 0,11 <sup>c</sup>	0,83 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,22 ± 0,08 <sup>b</sup>
<b>Mon/ PUFA</b>	0,29 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,29 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,71 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,98 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>Mon/ Sat</b>	0,36 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,37 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,84 ± 0,02 <sup>d</sup>	1,10 ± 0,01 <sup>b</sup>

Valores (n=3; media ± DE) representados como g de ácidos grasos (AG) kg<sup>-1</sup> ps. Letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre dietas. NC, AG no conocidos; AGL, AG totales; Sat, AG saturados; Mon, AG monoinsaturados; PUFA, AG poliinsaturados; HUFA, AG altamente insaturados; H n-3, AG altamente insaturados n-3; DHA, Ácido docosahexanoico (22:6 n-3); EPA, Ácido eicosapentanoico (20:5 n-3); ARA, Ácido araquidónico (20:4 n-6). Los AG no detectados ( $nd \leq 0,3$  g AG kg<sup>-1</sup> ps) o a nivel traza ( $tr = 0,3 - 0,5$  g AG kg<sup>-1</sup> ps) en todas las dietas no han sido incluidos en la tabla.

## Composición de las glándulas digestivas de los pulpos

### Humedad y Lípidos totales en la glándula digestiva

La humedad de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con las distintas dietas fue significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) en los dos experimentos (Tablas 3.4 y 3.5). La GD de los animales alimentados con las dietas artificiales tuvieron una humedad similar y mayor que la registrada para GD de pulpos con dieta SQUID ( $p < 0,05$ ).

El contenido en lípidos totales ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) de la GD de los pulpos alimentados con las dietas SQUID y GEL20 fue similar ( $p > 0,05$ ) y mayor ( $p < 0,05$ ) que en GD de pulpos con dieta GEL40 al final del Experimento I (Tabla 3.4). En el Experimento II, el contenido en LT de la GD de pulpos alimentados con SQUID fue superior ( $p < 0,05$ ) que el presentado por las dietas artificiales siendo también, a su vez, superior ( $p < 0,05$ ) en GD de pulpos con dieta ALG20 respecto de ALG10 (Tabla 3.5).

**Tabla 3.3** Clases lipídicas de las dietas elaboradas para los Experimentos I y II.

Dieta	SQUID	GEL20	GEL40	ALG10	ALG20
LT	81,5 ± 7,6	88,5 ± 5,2	86,9 ± 9,6	70,9 ± 9,4	78,5 ± 5,0
EM	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
FC	7,3 ± 0,9	7,1 ± 0,3	7,7 ± 1,1	6,0 ± 0,9	6,7 ± 0,4
LFS	2,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>bc</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>bc</sup>
FS	1,1 ± 0,0	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>Tr</i>
FI	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1
FE	7,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	4,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	4,5 ± 0,2 <sup>b</sup>
CT	19,0 ± 2,5 <sup>a</sup>	16,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>	14,2 ± 0,9 <sup>b</sup>	14,3 ± 2,1 <sup>b</sup>	14,0 ± 1,0 <sup>b</sup>
AGL	27,4 ± 3,1 <sup>a</sup>	19,4 ± 2,2 <sup>b</sup>	13,0 ± 1,6 <sup>c</sup>	17,2 ± 1,8 <sup>bc</sup>	15,4 ± 1,1 <sup>bc</sup>
TG	3,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	24,4 ± 1,8 <sup>bd</sup>	30,1 ± 3,4 <sup>b</sup>	15,2 ± 2,1 <sup>c</sup>	22,1 ± 1,4 <sup>d</sup>
EE	8,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,9 <sup>b</sup>	13,5 ± 1,4 <sup>b</sup>	8,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	11,4 ± 1,1 <sup>b</sup>
LPT	23,2 ± 2,8 <sup>a</sup>	16,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	16,0 ± 2,5 <sup>b</sup>	15,5 ± 2,6 <sup>b</sup>	15,5 ± 0,7 <sup>b</sup>
LNT	58,3 ± 4,9 <sup>ab</sup>	72,1 ± 5,1 <sup>a</sup>	70,9 ± 7,1 <sup>a</sup>	55,3 ± 6,8 <sup>b</sup>	63,0 ± 4,4 <sup>ab</sup>

Valores ( $n=3$ ; media  $\pm$  DE) representados como  $\text{g kg}^{-1}$  ps. Letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre dietas. LT, Lípidos totales; EM, Esfingomielina; FC, Fosfatidilcolina; LFS, Lisofosfatidilserina; FS, Fosfatidilserina; FI, Fosfatidilinositol; FE, Fosfatidiletanolamina; CT, Colesterol; AGL, Ácidos grasos libres; TG, Triglicéridos; EE, Ésteres de esteroles; LPT, Lípidos polares totales; LNT, Lípidos neutros totales. Las Clases Lipídicas no detectadas ( $nd \leq 0,3 \text{ g kg}^{-1}$  ps) o a nivel traza ( $tr = 0,3 - 0,5 \text{ g kg}^{-1}$  ps) en todas las dietas no han sido incluidos en la tabla.

### Ácidos grasos en la glándula digestiva

El contenido en ácidos grasos ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) de la glándula digestiva de los pulpos utilizados en los Experimentos I y II se muestra en las Tablas 3.4 y 3.5, respectivamente.

No se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) en el contenido en saturados de las GD de los pulpos alimentados con las dietas elaboradas y SQUID del Experimento I (Tabla 3.4), mientras que el contenido en saturados de la GD de pulpos con dieta SQUID del Experimento II fue mayor ( $p < 0,05$ ) que el de los animales alimentados con dietas elaboradas (Tabla 3.5).

En cuanto a monoinsaturados, el grupo *n-9* fue el más importante, presentando una concentración similar en las GD de pulpos alimentados con dietas elaboradas y superior ( $p < 0,05$ ) respecto de GD de pulpos con dieta SQUID en el Experimento I (Tabla 3.4). Entre GD de los animales del Experimento II no se detectaron diferencias significativas en el grupo *n-9* (Tabla 3.5). La importancia de los monoinsaturados fue considerablemente mayor en las dietas artificiales del Experimento I. Los monoinsaturados más relevantes fueron el 18:1 *n-9* en las dietas elaboradas y el ácido eicosanoico (20:1 *n-9*) en la dieta SQUID.

Las glándulas digestivas de los pulpos alimentados con SQUID (Experimentos I y II) presentaron una mayor concentración ( $p < 0,05$ ) de PUFA, HUFA *n-3* y *n-3*, respecto de los pulpos alimentados con dietas elaboradas, que presentaron concentraciones similares ( $p > 0,05$ ; Tablas 3.4 y 3.5) excepto para el contenido en PUFA del Experimento I, que fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) en pulpos con dieta SQUID respecto de los alimentados con GEL40 (Tabla 3.4). Estos hechos pueden ser explicados por las diferencias observadas en los contenidos en DHA y EPA. En ambos experimentos, DHA y EPA fueron más importantes ( $p < 0,05$ ) en la GD de pulpos alimentados con dieta SQUID respecto de las dietas elaboradas (Tablas 3.4 y 3.5), excepto para el contenido de DHA en el Experimento II, ya que sólo fue significativamente mayor en animales con dieta control respecto de los alimentados con ALG10 ( $p < 0,05$ ; Tabla 3.5).

**Tabla 3.4** Humedad de la glándula digestiva, Lípidos totales y Ácidos grasos del total de lípidos de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y dos dietas elaboradas (GEL20, GEL40) durante el Experimento I.

	SQUID			GEL20			GEL40		
<b>Humedad GD</b>	655	± 20	a	739	± 9	b	731	± 10	b
<b>Lípidos Totales</b>	464	± 142	a	383	± 90	a	246	± 57	b
<b>14:0</b>	6,55	± 1,06		5,20	± 1,37		3,73	± 1,39	
<b>15:0</b>	2,06	± 1,18		0,96	± 0,75		0,92	± 0,59	
<b>16:0</b>	49,68	± 8,75	a	35,50	± 9,94	ab	25,36	± 8,19	b
<b>16:1 <i>n-7</i></b>	2,17	± 0,70	a	7,90	± 2,22	b	6,29	± 2,59	ab
<b>16:1 <i>n-5</i></b>	1,28	± 0,69		0,52	± 0,21		0,52	± 0,27	
<b>16:2 <i>n-4</i></b>	1,59	± 0,87		1,16	± 0,54		1,12	± 0,66	
<b>17:0</b>	1,32	± 0,47		0,67	± 0,24		0,73	± 0,53	
<b>16:4</b>	1,62	± 0,39		2,35	± 0,71		1,63	± 0,58	
<b>18:0</b>	8,43	± 1,56		10,67	± 2,94		7,10	± 1,81	
<b>18:1 <i>n-9</i></b>	6,37	± 0,19	a	34,90	± 8,87	b	25,89	± 8,49	b
<b>18:1 <i>n-7</i></b>	4,32	± 0,43		6,04	± 1,33		4,82	± 1,31	
<b>18:1 <i>n-5</i></b>	1,36	± 0,48		1,08	± 0,42		0,83	± 0,36	
<b>18:2 <i>n-6</i></b>	0,92	± 0,15	a	8,08	± 2,82	b	5,52	± 1,67	b
<b>18:3 <i>n-4</i></b>	<i>tr</i>			0,51	± 0,12		<i>Tr</i>		
<b>18:3 <i>n-3</i></b>	0,56	± 0,12	a	2,25	± 0,55	b	1,70	± 0,61	ab
<b>18:4 <i>n-3</i></b>	<i>tr</i>			0,86	± 0,22		0,64	± 0,23	
<b>20:1 <i>n-9</i></b>	9,18	± 0,31		13,30	± 3,37		9,38	± 3,13	
<b>20:2 <i>n-6</i></b>	0,87	± 0,01		1,45	± 0,47		1,04	± 0,47	
<b>20:4 <i>n-6</i></b>	3,80	± 0,39		4,92	± 1,23		4,70	± 3,24	
<b>20:3 <i>n-3</i></b>	0,92	± 0,12	a	0,58	± 0,17	ab	<i>Tr</i>		b
<b>20:4 <i>n-3</i></b>	<i>nd</i>		a	0,98	± 0,25	b	0,78	± 0,33	ab
<b>20:5 <i>n-3</i></b>	29,46	± 1,96	a	15,84	± 5,07	b	10,00	± 4,13	b
<b>22:1 <i>n-11</i></b>	<i>tr</i>		a	6,84	± 1,79	b	4,96	± 1,15	b
<b>22:1 <i>n-9</i></b>	1,53	± 0,14		2,41	± 0,64		1,53	± 0,41	
<b>22:5 <i>n-6</i></b>	0,55	± 0,08		0,52	± 0,32		<i>nd</i>		
<b>22:5 <i>n-3</i></b>	0,88	± 0,11	a	3,44	± 1,45	b	2,03	± 0,68	ab
<b>22:6 <i>n-3</i></b>	71,30	± 8,27	a	33,09	± 10,21	b	20,30	± 7,10	b
<b>NC</b>	15,72	± 8,02		7,92	± 7,08		9,29	± 5,93	
<b>Saturados</b>	68,29	± 13,16		53,34	± 15,03		38,13	± 11,31	
<b>Monoinsaturados</b>	26,73	± 1,26	a	73,31	± 17,89	b	52,72	± 16,09	b
<b>PUFA</b>	114,26	± 8,20	a	77,05	± 22,08	ab	51,21	± 19,74	b
<b><i>n-3</i></b>	104,00	± 9,32	a	57,30	± 16,88	b	36,02	± 13,26	b
<b><i>n-6</i></b>	6,24	± 0,36		15,27	± 4,47		11,85	± 5,61	

Tabla 3.4 continuación

	SQUID			GEL20			GEL40		
<i>n-9</i>	17,08	± 0,28	<sup>a</sup>	50,61	± 12,65	<sup>b</sup>	36,80	± 11,99	<sup>ab</sup>
HUFA <i>n-3</i>	102,01	± 9,48	<sup>a</sup>	53,58	± 15,94	<sup>b</sup>	33,27	± 12,29	<sup>b</sup>
<i>n-3/ n-6</i>	16,61	± 1,80	<sup>a</sup>	3,77	± 0,47	<sup>b</sup>	3,18	± 0,63	<sup>b</sup>
EPA/ DHA	0,42	± 0,04		0,50	± 0,06		0,49	± 0,03	
ARA/ EPA	0,13	± 0,01	<sup>a</sup>	0,32	± 0,06	<sup>b</sup>	0,44	± 0,16	<sup>b</sup>
ARA/ DHA	0,05	± 0,01		0,16	± 0,01		0,22	± 0,09	
Mon/ HUFA <i>n-3</i>	0,27	± 0,03	<sup>a</sup>	1,46	± 0,18	<sup>b</sup>	1,65	± 0,18	<sup>b</sup>
Mon/PUFA	0,24	± 0,02	<sup>a</sup>	1,00	± 0,06	<sup>b</sup>	1,07	± 0,08	<sup>b</sup>
Mon/Sat	0,40	± 0,07	<sup>a</sup>	1,38	± 0,12	<sup>b</sup>	1,40	± 0,14	<sup>b</sup>

Valores (n=3; media ± DE) representados como g de Ácidos Grasos (AG) kg<sup>-1</sup> ps y como g kg<sup>-1</sup> ph para la Humedad GD (Glándula Digestiva). Letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pulpos alimentados con cada dieta. PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados; DHA, ácido docosahexanoico (22:6 *n-3*); EPA, ácido eicosapentanoico (20:5 *n-3*); ARA, ácido araquidónico (20:4 *n-6*); Mon, ácidos grasos monoinsaturados; Sat, ácidos grasos saturados; NC, ácidos grasos no conocidos. Los AG no detectados ( $nd \leq 0,3$  g kg<sup>-1</sup> ps) o a nivel traza ( $tr = 0,3 - 0,5$  g kg<sup>-1</sup> ps) en todas las dietas no han sido incluidos en la tabla.

En el Experimento I, el grupo *n-6* fue más importante en pulpos con dieta GEL20 ( $p < 0,05$ ) y GEL40 ( $p > 0,05$ ) comparados con los alimentados con dieta SQUID. El ARA fue el ácido omega-6 más importante en GD de pulpos con dieta control y el ácido linoleico en los alimentados con dietas elaboradas (Tabla 3.4). Los contenidos en ARA ( $p > 0,05$ ) y en ácido linoleico ( $p < 0,05$ ) fueron superiores en la GD de animales alimentados con dietas elaboradas. En el Experimento II, el grupo *n-6* fue más importante en pulpos con dieta SQUID respecto de los alimentados con ALG10 ( $p < 0,05$ ) y ALG20 ( $p > 0,05$ ). El ARA fue el ácido omega-6 más importante en todos los grupos de pulpos siendo superior ( $p < 0,05$ ) en GD de pulpos con dieta SQUID (Tabla 3.5).

La ratio EPA/ DHA (aproximadamente 0,5 y 0,4 en Experimentos I y II, respectivamente) fue similar en todos los pulpos (Tablas 3.4 y 3.5). En ambos experimentos, la ratio ARA/ EPA fue mayor ( $p < 0,05$ ) en GD de pulpos alimentados con dietas elaboradas respecto de los pulpos con dieta SQUID. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la ratio ARA/ DHA de las glándulas digestivas de los animales alimentados con dietas elaboradas y SQUID de los dos experimentos (Tablas 3.4 y 3.5).

Clases lipídicas en la glándula digestiva

En la Tabla 3.6 se muestra el análisis de clases lipídicas de la glándula digestiva de pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y con las dietas elaboradas (GEL20 y GEL40) durante el Experimento I. El contenido en Lípidos Polares Totales de la GD de animales con dieta SQUID fue menor que en los pulpos con dietas GEL20 y GEL40. El contenido en Lípidos Neutros Totales fue mayor ( $p < 0,05$ ) que el de LPT en los tres grupos de pulpos, siendo tres veces superior en animales alimentados con dietas elaboradas y ocho en pulpos con dieta SQUID.

Entre los Lípidos Neutros, los más abundantes fueron los TG y los EE, siendo el contenido en EE mayor ( $p < 0,05$ ) en pulpos alimentados con SQUID respecto de los alimentados con dietas elaboradas.

En la Tabla 3.7 se muestra el análisis de clases lipídicas de la glándula digestiva de pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y con las dietas elaboradas (ALG10 y ALG20) durante el Experimento II.

**Tabla 3.5** Humedad de la glándula digestiva, Lípidos totales y Ácidos grasos del total de lípidos de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y dos dietas elaboradas (ALG10, ALG20) durante el Experimento II.

	SQUID			ALG10			ALG20		
<b>Humedad GD</b>	657	± 21	a	730	± 24	b	722	± 23	b
<b>Lípidos Totales</b>	276	± 53	a	85,7	± 45,4	b	156,5	± 11,3	c
<b>14:0</b>	3,56	± 1,04	a	0,77	± 0,55	b	1,43	± 0,24	b
<b>15:0</b>	1,03	± 1,08		<i>Tr</i>			<i>tr</i>		
<b>16:0</b>	30,07	± 6,41	a	9,55	± 3,77	b	14,29	± 0,66	b
<b>16:1 n-7</b>	2,06	± 0,55		1,30	± 0,89		2,13	± 0,39	
<b>16:1 n-5</b>	0,54	± 0,23	a	<i>Nd</i>			<i>nd</i>		
<b>16:2 n-4</b>	0,82	± 0,26		<i>Tr</i>			0,60	± 0,20	
<b>17:0</b>	0,53	± 0,07		<i>Tr</i>			<i>tr</i>		
<b>16:4</b>	0,65	± 0,25		0,79	± 0,05		0,79	± 0,04	
<b>18:0</b>	5,00	± 0,91	a	3,16	± 0,66	b	4,04	± 0,31	ab
<b>18:1 n-9</b>	4,10	± 0,82		4,22	± 2,85		6,24	± 0,96	
<b>18:1 n-7</b>	2,59	± 0,53	a	1,27	± 0,73	b	1,99	± 0,06	ab
<b>18:1 n-5</b>	0,85	± 0,33	a	<i>Nd</i>		b	<i>tr</i>		ab
<b>18:2 n-6</b>	0,53	± 0,42		<i>Tr</i>			1,14	± 0,29	
<b>20:1 n-9</b>	5,76	± 1,67		3,02	± 1,72		4,23	± 0,40	



Tabla 3.5 continuación

	SQUID			ALG10			ALG20		
<b>20:2 n-6</b>	0,56	±	0,27	<i>nd</i>			<i>tr</i>		
<b>20:4 n-6</b>	2,50	±	0,53	<sup>a</sup>	1,09	±	0,22	<sup>b</sup>	1,44 ± 0,21 <sup>b</sup>
<b>20:3 n-3</b>	0,66	±	0,23	<sup>a</sup>	<i>nd</i>			<sup>b</sup>	<i>nd</i> <sup>b</sup>
<b>20:5 n-3</b>	20,90	±	5,52	<sup>a</sup>	3,87	±	1,70	<sup>b</sup>	5,96 ± 0,92 <sup>b</sup>
<b>22:1 n-11</b>	0,99	±	0,10		0,80	±	0,51		1,14 ± 0,33
<b>22:1 n-9</b>	<i>Nd</i>				0,68	±	0,37		0,92 ± 0,07
<b>22:5 n-3</b>	1,03	±	0,35	<sup>ab</sup>	<i>tr</i>			<sup>a</sup>	1,06 ± 0,30 <sup>b</sup>
<b>22:6 n-3</b>	54,81	±	19,35	<sup>a</sup>	9,35	±	5,21	<sup>b</sup>	16,37 ± 1,33 <sup>ab</sup>
<b>NC</b>	5,27	±	4,05		2,44	±	1,30		3,32 ± 0,55
<b>Saturados</b>	40,40	±	9,48	<sup>a</sup>	14,34	±	5,13	<sup>b</sup>	20,60 ± 1,04 <sup>b</sup>
<b>Monoinsaturados</b>	16,96	±	3,53		11,09	±	6,82		16,36 ± 2,14
<b>PUFA</b>	83,52	±	26,08	<sup>a</sup>	16,68	±	8,35	<sup>b</sup>	28,62 ± 2,02 <sup>b</sup>
<b>n-3</b>	78,30	±	25,13	<sup>a</sup>	14,15	±	7,40	<sup>b</sup>	24,43 ± 2,20 <sup>b</sup>
<b>n-6</b>	4,09	±	0,83	<sup>a</sup>	1,94	±	0,63	<sup>b</sup>	3,26 ± 0,05 <sup>ab</sup>
<b>n-9</b>	10,16	±	2,34		7,92	±	4,84		11,39 ± 1,33
<b>HUFA n-3</b>	77,08	±	24,83	<sup>a</sup>	13,69	±	7,16	<sup>b</sup>	23,69 ± 2,21 <sup>b</sup>
<b>n-3/ n-6</b>	19,06	±	2,87	<sup>a</sup>	6,91	±	1,94	<sup>b</sup>	7,68 ± 0,90 <sup>b</sup>
<b>EPA/ DHA</b>	0,39	±	0,03		0,45	±	0,11		0,36 ± 0,03
<b>ARA/ EPA</b>	0,12	±	0,01	<sup>a</sup>	0,32	±	0,11	<sup>b</sup>	0,25 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>ARA/ DHA</b>	0,05	±	0,01		0,15	±	0,09		0,09 ± 0,02
<b>Mon/ HUFA n-3</b>	0,23	±	0,02	<sup>a</sup>	0,79	±	0,14	<sup>b</sup>	0,70 ± 0,16 <sup>b</sup>
<b>Mon/ PUFA</b>	0,21	±	0,02	<sup>a</sup>	0,64	±	0,13	<sup>b</sup>	0,58 ± 0,12 <sup>b</sup>
<b>Mon/ Sat</b>	0,42	±	0,03	<sup>a</sup>	0,72	±	0,26	<sup>ab</sup>	0,79 ± 0,06 <sup>b</sup>

Valores (n=3; media ± DE) representados como g de Ácidos Grasos (AG) kg<sup>-1</sup> ps y como g kg<sup>-1</sup> ph para la Humedad GD (Glándula Digestiva). Letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pulpos alimentados con cada dieta.

PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados; DHA, ácido docosahexanoico (22:6 n-3); EPA, ácido eicosapentanoico (20:5 n-3); ARA, ácido araquidónico (20:4 n-6); Mon, ácidos grasos monoinsaturados; Sat, ácidos grasos saturados; NC, ácidos grasos no conocidos. Los AG no detectados ( $nd \leq 0,3$  g kg<sup>-1</sup> ps) o a nivel traza ( $tr = 0,3 - 0,5$  g kg<sup>-1</sup> ps) en todas las dietas no han sido incluidos en la tabla.

El contenido en LNT de la GD de pulpos con dieta SQUID fue superior ( $p < 0,05$ ) al presentado por pulpos con dietas artificiales. No hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tres grupos de pulpos analizados respecto al contenido en LPT. El contenido en LNT fue mayor ( $p < 0,05$ ) que el de LPT en pulpos con dietas SQUID, ALG10 y ALG20, siendo dos veces superior para los alimentados con ALG10, tres para los pulpos con dieta ALG20 y hasta cinco veces superior en las glándulas digestivas de los pulpos alimentados con SQUID.

Entre los LN analizados, los TG y los EE fueron los más abundantes. TG y CT fueron los más importantes ( $p < 0,05$ ) en GD de animales con dieta SQUID respecto de las GD de pulpos alimentados con dietas elaboradas.

**Tabla 3.6** Clases lipídicas de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y dos dietas elaboradas (GEL20, GEL40) durante el Experimento I.

	SQUID			GEL20			GEL40					
<b>FC</b>	22,2	±	4,9		37,8	±	9,3		24,6	±	3,8	
<b>FS</b>	9,6	±	1,8	<sup>a</sup>	19,2	±	3,6	<sup>b</sup>	13,0	±	2,1	<sup>ab</sup>
<b>FI</b>	<i>tr</i>			<sup>a</sup>	9,2	±	1,2	<sup>b</sup>	6,1	±	0,9	<sup>a</sup>
<b>FE</b>	16,7	±	4,5	<sup>a</sup>	31,4	±	7,7	<sup>b</sup>	21,1	±	3,7	<sup>ab</sup>
<b>NC LP</b>	0,8	±	0,7	<sup>a</sup>	5,0	±	1,1	<sup>b</sup>	3,4	±	0,4	<sup>b</sup>
<b>CT</b>	39,0	±	9,4		38,8	±	11,0		26,8	±	7,2	
<b>TG</b>	167,9	±	47,1		145,6	±	32,5		104,5	±	34,7	
<b>EE</b>	156,1	±	47,0	<sup>a</sup>	74,2	±	29,0	<sup>b</sup>	35,9	±	8,0	<sup>b</sup>
<b>NC LN</b>	47,57	±	10,62	<sup>a</sup>	21,14	±	3,41	<sup>b</sup>	10,89	±	7,36	<sup>b</sup>
<b>LPT</b>	53,1	±	12,3	<sup>a</sup>	102,9	±	21,9	<sup>b</sup>	68,2	±	10,5	<sup>ab</sup>
<b>LNT</b>	410,5	±	113,8	<sup>a</sup>	279,8	±	74,3	<sup>ab</sup>	178,1	±	55,2	<sup>b</sup>

Valores ( $n=3$ ; media  $\pm$  DE) representados como  $\text{g kg}^{-1}$  ps. Letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pulpos alimentados con cada dieta. FC, Fosfatidilcolina; FS, Fosfatidilserina; FI, Fosfatidilinositol; FE, Fosfatidiletanolamina; NC LP, Lípidos polares No conocidos; CT, Colesterol; TG, Triglicéridos; EE, Ésteres de esteroles; NC LN, Lípidos neutros No conocidos; LPT, Lípidos polares totales; LNT, Lípidos neutros totales. Las Clases Lipídicas no detectadas ( $nd \leq 0,3 \text{ g kg}^{-1}$  ps) o a nivel traza ( $tr = 0,3 - 0,5 \text{ g kg}^{-1}$  ps) en todas las dietas no han sido incluidas en la tabla.

**Tabla 3.7** Clases lipídicas de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y dos dietas elaboradas (ALG10, ALG20) durante el Experimento II.

	SQUID			ALG10			ALG20			
<b>FC</b>	16,8	±	1,9	12,1	±	4,3	16,9	±	1,0	
<b>FS</b>	7,3	±	1,0	5,6	±	2,1	7,3	±	1,1	
<b>FI</b>	3,3	±	0,7	3,6	±	1,3	3,8	±	0,7	
<b>FE</b>	12,8	±	2,0	8,8	±	3,5	12,5	±	1,0	
<b>NC LP</b>	<i>nd</i>			1,0	±	0,3	<sup>b</sup> 0,7	±	0,4	<sup>ab</sup>
<b>CT</b>	28,3	±	7,6	<sup>a</sup> 10,4	±	5,0	<sup>b</sup> 18,8	±	1,1	<sup>ab</sup>
<b>TG</b>	105,0	±	29,9	<sup>a</sup> 20,7	±	18,5	<sup>b</sup> 44,8	±	3,3	<sup>b</sup>
<b>EE</b>	74,7	±	23,8	<sup>a</sup> 21,5	±	11,8	<sup>b</sup> 47,3	±	7,0	<sup>ab</sup>
<b>NC LN</b>	15,9	±	4,2	<sup>a</sup> 1,6	±	0,5	<sup>b</sup> 4,0	±	0,8	<sup>b</sup>
<b>LPT</b>	41,5	±	5,6	31,4	±	11,3	41,7	±	3,7	
<b>LNT</b>	223,9	±	65,1	<sup>a</sup> 54,2	±	34,9	<sup>b</sup> 115,0	±	8,7	<sup>b</sup>

Valores (n=3; media ± DE) representados como g kg<sup>-1</sup> ps. Letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pulpos alimentados con cada dieta. FC, Fosfatidilcolina; FS, Fosfatidilserina; FI, Fosfatidilinositol; FE, Fosfatidiletanolamina; NC LP, Lípidos polares No conocidos; CT, Colesterol; TG, Triglicéridos; EE, Ésteres de esteroles; NC LN, Lípidos neutros No conocidos; LPT, Lípidos polares totales; LNT, Lípidos neutros totales. Las Clases Lipídicas no detectadas (*nd* ≤ 0,3 g kg<sup>-1</sup> ps) o a nivel traza ( $tr = 0,3 - 0,5$  g kg<sup>-1</sup> ps) en todas las dietas no han sido incluidas en la tabla.

### Análisis de componentes principales

Los resultados obtenidos mediante Análisis de Componentes Principales para la composición en ácidos grasos de la GD de los pulpos alimentados con cada dieta se representan en la Figura 3.3.

Los ácidos grasos y grupos de AG más representativos, seleccionados para el ACP, fueron: 14:0, 16:0, 16:1 *n*-7, 16:1 *n*-5, 17:0, 16:4 *n*-1, 18:0, 18:1 *n*-9, 18:1 *n*-7, 18:2 *n*-6, 18:3 *n*-4, 18:3 *n*-3, 18:4 *n*-3, 20:0, 20:1 *n*-9, 20:2 *n*-6, 20:4 *n*-6, 20:3 *n*-3, 20:4 *n*-3, 20:5 *n*-3, 22:1 *n*-11, 22:1 *n*-9, 22:5 *n*-3, 22:6 *n*-3, Saturados, Monoinsaturados, PUFA, *n*-3, *n*-6, *n*-9, HUFA *n*-3, *n*-3/*n*-6, EPA/ DHA, ARA/ EPA, ARA/ DHA, Monoinsaturados/ HUFA *n*-3 y Monoinsaturados/ Saturados. Los primeros dos factores principales generados explicaron el 77,2 % del total de la varianza (60,5 % el primer componente o PC 1 y 16,8 % el segundo componente o PC 2) (Figura 3.3).

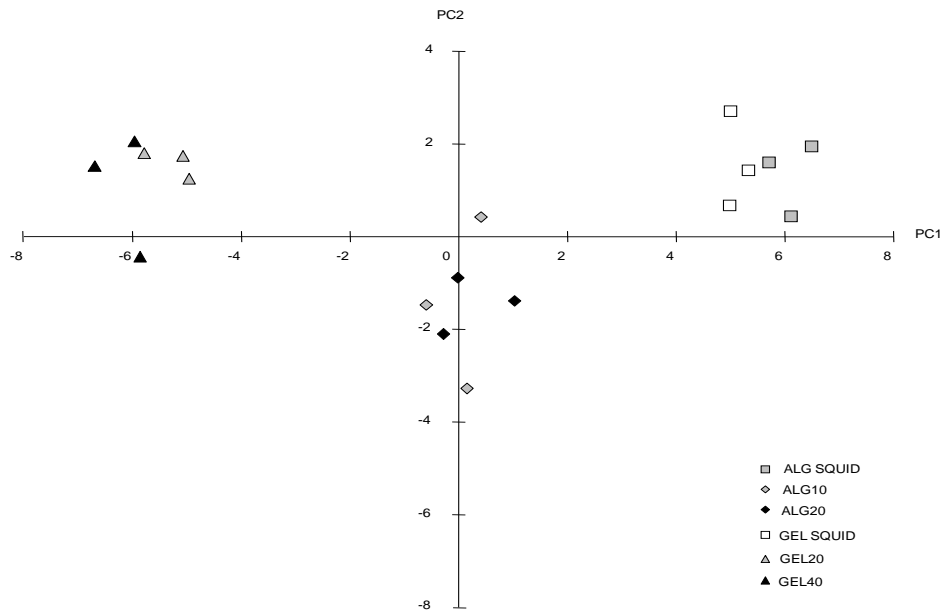
El análisis de la matriz de componentes nos permitió asociar el PC 1 con EPA, DHA, los ácidos grasos *n*-3 y HUFA *n*-3 por la zona positiva, y con 18:1 *n*-9, los monoinsaturados y los ácidos grasos *n*-6 y *n*-9 por la zona negativa. Los AG saturados, 16:0 y 18:0 fueron asociados con el lado negativo del PC 2.

El gráfico de resultado reveló tres grupos definidos sobre el primer componente, principalmente identificables con la ausencia de aglutinante (dietas control basadas en calamar: GEL-SQUID y ALG-SQUID), presencia del aglutinante gelatina (GEL20 y GEL40) o el aglutinante alginato (ALG10 y ALG20), aunque una muestra de GD de pulpos alimentados con la dieta ALG10 no fue clasificada en ningún grupo dietético siendo fuertemente asociada con la zona negativa del PC 2 (Figura 3.3). El segundo componente separó claramente a los AG de la GD de pulpos con dietas con y sin aglutinante de los pulpos alimentados con dietas aglutinadas con alginato. Los resultados indicaron que la concentración de CPSP® no afectó a la composición de la GD en ninguno de los dos experimentos. Además, parece que el perfil de AG de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con las dietas ALG10 y ALG20 difiere en mayor medida de los perfiles analizados en los otros grupos de dietas: SQUID y GEL (Figura 3.3).

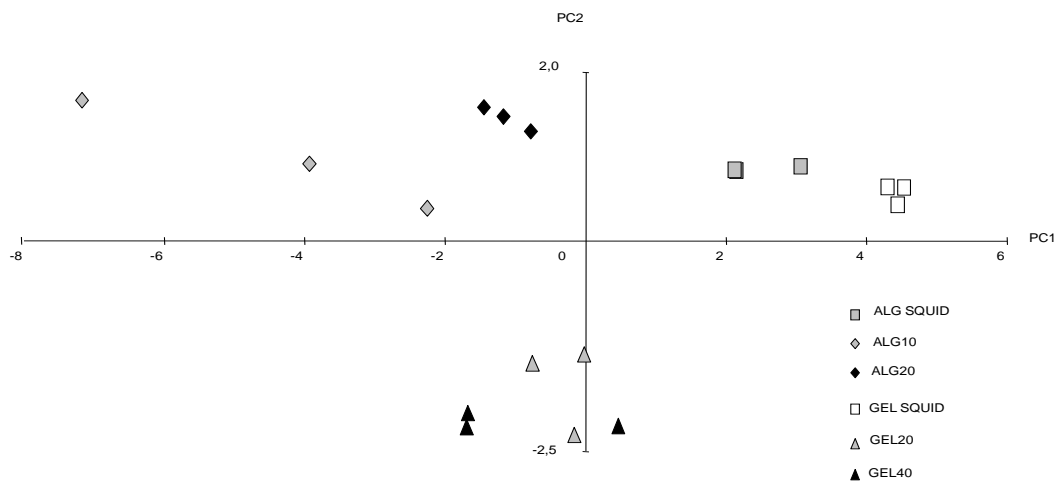
La Figura 3.4 se muestran los resultados obtenidos mediante ACP para la composición en clases lipídicas de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con cada dieta utilizada en los Experimentos I y II.

Las CL seleccionados para el ACP más representativas fueron: LFC (Lisofosfatidilcolina), EM (Esfingomielina), FC (Fosfatidilcolina), FS (Fosfatidilserina), FI (Fosfatidilinositol), FE (Fosfatidiletanolamina), NC LP (Lípidos Polares no conocidos), CT, TG, EE, NC LN (Lípidos Neutros no conocidos), LPT y LNT. Los dos primeros componentes principales generados explicaron el 82,5 % del total de la varianza (67,2 % el PC 1 y 15,4 % el PC 2) (Figura 3.4). El análisis de la matriz de componentes permitió asociar el PC 1 con LNT, especialmente con los TG, por la zona positiva, y con LPT, principalmente con FC y FE, por la zona negativa. Los EE fueron asociados con el lado positivo y los TG por el negativo del PC 2.

El gráfico de resultado reveló cuatro grupos definidos sobre el primer componente, principalmente identificables con la dieta que los pulpos habían ingerido durante el proceso experimental. De esta forma, de derecha a izquierda, los grupos dietéticos fueron GEL-SQUID y ALG-SQUID (asociados con la zona positiva del PC 1 y definidos principalmente por los LN), y ALG20 y ALG10 (asociados con la zona negativa del PC 1 y definidos por los LP), aunque este último grupo fue más disperso que los anteriores. El PC2 fue asociado principalmente por su zona negativa con los TG, separando claramente a los cuatro grupos previamente definidos del perfil de CL de la GD de pulpos alimentados con dietas aglutinadas con gelatina (GEL20 y GEL40), sin aparentemente ninguna influencia en ellos de la concentración de CPSP® en la dieta (Figura 3.4).



**Figura 3.3** Análisis de Componentes Principales para la composición en ácidos grasos de la glándula digestiva de pulpos alimentados con cada dieta (dietas control (ALG-SQUID y GEL-SQUID), ALG10, ALG20, GEL20, GEL40).



**Figura 3.4** Análisis de Componentes Principales para la composición en clases lipídicas de la glándula digestiva de pulpos alimentados con cada dieta (dietas control (ALG-SQUID y GEL-SQUID), ALG10, ALG20, GEL20, GEL40).

### 3.5. Discusión

Existen diversos estudios donde se demuestra que los pulpos pueden ser alimentados con dietas elaboradas aunque con ellos se obtuvieran bajas tasas de crecimiento o crecimiento nulo. Domingues *et al.* (2008) y Ferreira *et al.* (2010) cultivaron con dietas elaboradas semi-húmedas a *Sepia officinalis*, obteniendo un negativo crecimiento. Pero esta misma especie alimentada con otras dietas artificiales mostraron un crecimiento moderado según Castro *et al.* (1993), Castro & Lee (1994), Domingues (1999) y Domingues *et al.* (2005). De igual modo, *O. vulgaris* ha sido cultivado con dietas elaboradas basadas en pasta de calamar aglutinadas con gelatina siendo dichas dietas aceptadas por los animales y obteniendo un buen crecimiento ( $15 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ) (Quintana *et al.*, 2008). Sin embargo, esta dieta estaba basada exclusivamente en pasta de calamar y eso la hace no ser adecuada para alimentar a los pulpos en condiciones de cultivo, aunque demostró que la gelatina es un buen aglutinante de las dietas para pulpos.

Rosas *et al.* (2008) cultivó a *O. maya* con una dieta elaborada con pasta de cangrejo y gelatina o alginato como aglutinantes, obteniendo una mortalidad muy alta en pulpos alimentados con la dieta que contenía alginato y un aceptable crecimiento en los alimentados con la dieta aglutinada con gelatina ( $19,1 \pm 1,4 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ). Dichas diferencias fueron asociadas con la alta digestibilidad in vivo observada en pulpos alimentados con dietas aglutinadas con gelatina, que demostraba la baja capacidad que posee *O. maya* para digerir los carbohidratos de su dieta. García *et al.* (2011) mostró el balance energético de *O. vulgaris* alimentado con dietas artificiales compuestas de pasta de calamar, CPSP®, harina de pescado y gelatina o alginato como aglutinantes. Las tasas de crecimiento totales obtenidas en dicho estudio fueron  $13,7 \pm 2,1$ ,  $2,1 \pm 2,8$  y  $-2,4 \pm 2,9 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$  para pulpos alimentados con la dieta control (calamar) y las dos dietas artificiales aglutinadas con gelatina y alginato, respectivamente. Estos resultados sugieren que el principal problema de la dieta elaborada aglutinada con alginato fue consecuencia de su digestibilidad. Además, los pulpos cultivados con la dieta con alginato sólo absorbieron el 40 % de la energía ingerida, por lo que es posible que al menos otro 40 % de la energía se perdiera en las heces. García *et al.* (2011) obtuvo también una eficiencia de absorción similar entre pulpos alimentados con la dieta control y la aglutinada con gelatina, sugiriendo que las diferencias encontradas entre tasas de crecimiento y producción energética puedan estar relacionadas con el contenido nutricional de la dieta más que con la capacidad digestiva de los pulpos.

En el presente experimento, las tasas de crecimiento obtenidas fueron altas para pulpos cultivados con la dieta control mientras que con dietas artificiales se observó un crecimiento similar (entre GEL20 y GEL40 en el Experimento I y ALG10 y ALG20 en el Experimento II), no siendo influenciado por el tipo de aglutinante ni por la concentración de CPSP® presente en las dietas. Dichos resultados sugieren que *O. vulgaris* podría tener la misma limitación digestiva que *O. maya*, respecto a la digestión de los carbohidratos presentes en la dieta alginato, y las mismas deficiencias nutricionales para la dieta gelatina.

En este estudio, donde se utilizó un ingrediente preparado industrialmente (CPSP®) para alimentar a los pulpos, las dietas experimentales dieron lugar a tasas de crecimiento más bajas que las obtenidas a partir de la dieta control pero son, actualmente, de las más altas conseguidas en *O. vulgaris* cultivado con dietas artificiales. Domingues *et al.* (2007) alimentó a *O. maya* con una dieta artificial basada en pasta de calamar, CPSP® y un pellet utilizado para alimentar camarones. Los pulpos aceptaron bien la dieta pero no crecieron ( $0,0 \pm 3,0 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ). De manera similar, Rosas *et al.* (2007) alimentó a la misma especie con una dieta muy parecida a la anterior y obtuvo una aceptación buena pero crecimiento negativo ( $-0,8 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ). Águila *et al.* (2007) usó diferentes porcentajes de CPSP® en dietas aglutinadas con alginato, obteniendo tasas de crecimiento en *O. maya* por debajo de  $10 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ . Estas dietas dieron lugar a resultados similares a los obtenidos para *O. vulgaris* en este experimento, aunque éstos fueron mucho más grandes. García *et al.* (2011) utilizó dietas aglutinadas con gelatina o alginato y elaboradas con  $100 \text{ g kg}^{-1}$  de CPSP® y  $500 \text{ g kg}^{-1}$  de harina de pescado de alta calidad, obteniendo las tasas de crecimiento descritas anteriormente.

García *et al.* (2011) propuso varias hipótesis (que podrían ser confirmadas y/o soportadas en este trabajo) para explicar el bajo crecimiento obtenido al alimentar pulpos con dietas elaboradas. La primera hipótesis es que los cambios estructurales que sufren las proteínas durante la elaboración de los ingredientes eviten el ataque enzimático durante la formación del quimo, pudiendo afectar a la digestibilidad. La segunda hipótesis está relacionada con la calidad nutricional de la dieta. Durante la elaboración de la dieta, algunos aminoácidos y lípidos podrían perderse, reduciéndose la calidad nutricional de la dieta y afectando a la tasa de crecimiento debido al cambio en las características nutricionales.

Según los resultados disponibles en la bibliografía sobre capacidad digestiva, los cefalópodos no pueden digerir proteínas procesadas presentando tasas de crecimiento positivas sólo cuando son alimentados con proteínas nativas (Santé-Lhoutellier *et al.*,

2008). En esta investigación, los resultados mostraron una relación cuantitativa y directa entre la oxidación de proteínas por carbonilación y su agregación inducidas por el cocinado y la susceptibilidad proteolítica a la pepsina, afectando finalmente a la digestibilidad *in vitro* de las proteínas. Aunque *O. vulgaris* no posee pepsina, estudios recientes han demostrado la existencia de Catepsina L (*Dosidicus gigas*) y Catepsina D (*O. maya*), proteasas de la familia de la pepsina que presentan un importante papel digestivo en cefalópodos (Cárdenas-López & Haard, 2005; 2009; Martínez *et al.*, 2010). Es posible que la digestibilidad pueda verse afectada por el efecto del cocinado en las proteínas y, en consecuencia, la disponibilidad de los nutrientes se vea reducida influyendo así negativamente sobre el crecimiento.

Respecto a la segunda hipótesis, el CPSP® podría interferir en algún paso de la digestión o en las características nutricionales de la pasta de calamar, además de que el exceso de péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos característico del CPSP® podría saturar los lugares de absorción de nutrientes de las células de la glándula digestiva provocando una reducción del crecimiento por disminución de la disponibilidad de nutrientes (Águila *et al.*, 2007; García *et al.*, 2011).

En cefalópodos, los lípidos normalmente representan menos de 20 g kg<sup>-1</sup> (Almansa *et al.*, 2006), mientras que la glándula digestiva posee 4-5 veces más contenido en lípidos y actividad lipasa que el manto (Moltschanivskyj & Johnston, 2006). La GD juega un papel muy importante en la digestión y metabolismo de lípidos, secreción de enzimas, digestión y absorción (Semmens *et al.*, 1995). Además, existen evidencias de que este órgano podría utilizarse como almacén o reserva de lípidos a corto plazo (Fluckiger *et al.*, 2008), lo que le convierte en un buen candidato para el estudio del efecto de diferentes dietas en cuanto a composición lipídica y para el estudio de la condición nutricional de los cefalópodos (García *et al.*, 2011). Así, en esta investigación se muestra que el contenido en lípidos de la GD de los pulpos alimentados con dietas artificiales, que crecieron menos, fue menor que en aquellos que se alimentaron con la dieta control (Tablas 3.4 y 3.5).

Normalmente, la concentración en lípidos totales de la glándula digestiva de los cefalópodos disminuye con la edad, siendo este hecho descrito en *S. officinalis* (Ferreira *et al.*, 2010) y en este trabajo, donde los pulpos pequeños del Experimento I (320,3 ± 162,5 g) presentaron un contenido lipídico en la GD mayor que en los pulpos más grandes del Experimento II (623,3 ± 129,1 g).

En esta investigación, los ácidos grasos más abundantes en la GD de los pulpos fueron el ácido palmítico (16:0), DHA (22:6 *n*-3) y EPA (20:5 *n*-3). Estos datos también fueron



obtenidos en la GD de *S. officinalis* (Ferreira *et al.*, 2010), *O. vulgaris* (García *et al.*, 2011) y en el manto de muchas otras especies de cefalópodos (Miliou *et al.*, 2006; Zlatanos *et al.*, 2006). Entre las dietas utilizadas, este patrón fue seguido sólo por la dieta SQUID mientras que en las dietas artificiales (Experimentos I y II), aunque EPA fue uno de los ácidos grasos más abundantes, el contenido en EPA siempre fue superado por 18:1 *n-9* (Tabla 3.2).

Las glándulas digestivas de *S. officinalis* y *O. vulgaris* alimentados con dietas elaboradas presentaron bajos contenidos en saturados, monoinsaturados y PUFA en comparación con los alimentados con la dieta control (Ferreira *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011). Este hecho fue descrito igualmente para *Loligo vulgaris* y *O. vulgaris* (Zlatanos *et al.*, 2006). En el Experimento II de este estudio se confirmó dicho patrón para el contenido en saturados y PUFA, pero no para el de monoinsaturados (Tabla 3.5). En el Experimento I, las dietas elaboradas mostraron un bajo contenido en PUFA comparado con la dieta control, mientras que el contenido en monoinsaturados fue incluso mayor que el presentado por SQUID (posiblemente resultado de los altos niveles de 18:1 *n-9* en las dietas artificiales) (Tabla 3.4).

El análisis de componentes principales (Figura 3.3) separó claramente a los ácidos grasos según su composición en HUFA *n-3*, PUFA, EPA, DHA (con mayores valores en animales alimentados con SQUID) y monoinsaturados (18:1 *n-9*), con niveles superiores en los pulpos alimentados con dietas elaboradas. Es destacable que la composición de la GD en estos ácidos grasos fue cercana a las presentadas por las dietas ingeridas por cada grupo, siendo más visible cuando se analiza a los pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) o con las dietas elaboradas, sin tener en cuenta el porcentaje de CPSP® en cada dieta.

Los monoinsaturados son un sustrato energético muy común en especies marinas (Sargent *et al.*, 1995). Sin embargo, los cefalópodos presentan un metabolismo principalmente proteico (Domingues, 1999) que podría explicar la menor importancia que estos ácidos grasos presentan en la composición de la GD de *S. officinalis* (11-17 % LT) (Ferreira *et al.*, 2010) y en la GD de los pulpos alimentados con SQUID (6 % LT) en los dos experimentos de este estudio.

Por el contrario, la proporción de monoinsaturados con respecto al contenido en LT de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con dietas elaboradas, en ambos experimentos, fue mucho mayor en comparación con la presente en animales con dieta control (19,1 % y 21,4 % para GEL20 y GEL40 del Experimento I y 12,9 % y 10,4 % para

ALG10 y ALG20 del Experimento II). Estos resultados podrían indicar la importancia del resto de ácidos grasos ya que probablemente son utilizados antes que los monoinsaturados cuando la dieta no contiene todos los requerimientos nutricionales de los pulpos. Además, el aumento en monoinsaturados, particularmente en 18:1 *n-9*, podría estar asociado con una necesidad para modular el índice de insaturación (Sargent *et al.*, 1989). De manera similar a los resultados descritos por Miliou *et al.* (2006) para la composición del manto de *O. vulgaris*, el aumento en 18:1 *n-9* y PUFA *n-6* fue relacionado con la disminución en PUFA *n-3* en este trabajo, al comparar pulpos alimentados con la dieta natural, con buen crecimiento, y pulpos alimentados con dietas elaboradas, con un crecimiento moderado (Experimento I, Tabla 3.4). Esta observación también fue apoyada por los descubrimientos de Navarro & Villanueva (2003) en paralarvas de *O. vulgaris* alimentadas con dietas deficientes en HUFA *n-3*. En este sentido, en el presente estudio también se observó un aumento del grupo *n-6* en pulpos alimentados con dietas elaboradas en el Experimento I.

En ambos experimentos se observó unas considerablemente bajas concentraciones de DHA y EPA en la GD de animales alimentados con dietas elaboradas que podrían explicar las ratios tan altas de ARA/DHA y ARA/EPA registradas en pulpos con dietas artificiales.

La ratio EPA/DHA de la glándula digestiva durante este estudio varió entre 0,42 y 0,50 en el Experimento I y entre 0,39 y 0,45 en el Experimento II, sin diferencias entre dietas. Esto podría ser atribuido a la disminución simultánea de los dos ácidos grasos en la glándula digestiva de los pulpos alimentados con dietas elaboradas. Por el contrario, Ferreira *et al.* (2010) describió ratios mucho más altas, superiores a 1, en la GD de *S. officinalis* y con diferencias significativas entre los animales alimentados con crustáceos (entre 1,9 y 5,0), dietas elaboradas (1,0-1,1) y sardina (0,9). Fluckiger *et al.* (2008) también obtuvo ratios EPA/DHA bajas en la GD de *S. officinalis* cuando fue alimentada con pescado (0,5-0,6), mientras que cuando se alimentó con crustáceos (1,6-3,2) las ratios fueron similares a las obtenidas por Ferreira *et al.* (2010), y mucho mayores a las obtenidas en esta investigación.

El bajo crecimiento obtenido con las dietas elaboradas fue reflejado por la composición en ácidos grasos de la glándula digestiva. La mayoría de los ácidos grasos más importantes, como HUFA *n-3*, EPA y DHA, disminuyeron en la GD de los animales alimentados con estas dietas. Además, la composición de las propias dietas, con altos contenidos en PUFA, HUFA *n-3*, DHA y EPA (dieta SQUID) y 18:1 *n-9* (dietas elaboradas), fue reflejada en la composición de la GD de los pulpos alimentados con

dichas dietas durante los Experimentos I y II. Todo esto confirma que la glándula digestiva es un buen candidato para el estudio de los efectos de diferentes alimentos sobre la composición en ácidos grasos en *O. vulgaris*.

En cuanto a las clases lipídicas, el resultado más notable fue el alto contenido en LN, principalmente en EE y TG, de la GD de pulpos alimentados con SQUID en los dos experimentos (Tablas 3.6 y 3.7). Posiblemente, este hecho podría atribuirse a una mejor condición nutricional de dichos pulpos, reflejada en las altas tasas de crecimiento obtenidas en comparación con las presentadas por los que fueron alimentados con dietas artificiales. Probablemente la dieta SQUID permitió a los pulpos crear reservas energéticas (LN) en la glándula digestiva, hecho que no sucedió con las dietas elaboradas. En este caso, los pulpos pudieron estar utilizando sus lípidos de reserva, lo cual aumentó la importancia (proporción) de los LP en la GD, con funciones principalmente estructurales.

Los resultados indican que las diferencias en CL podrían estar asociadas con las distintas concentraciones de CPSP® presentes en las dietas aglutinadas con alginato o que las CL fueron influenciadas por algún otro factor como el peso de los pulpos o la humedad de las dietas. En este sentido, parece que el perfil de CL de la GD de los pulpos alimentados con dietas aglutinadas con gelatina difiere bastante de la GD de los pulpos alimentados con las dietas aglutinadas con alginato y las dietas control (SQUID).

### 3.6. Conclusión

Las conclusiones generales de este estudio son las siguientes:

- a) Al igual que en otras especies de cefalópodos, *O. vulgaris* no acepta fácilmente la alimentación con dietas elaboradas.
- b) Las bajas tasas de crecimiento observadas así como la baja absorción de lípidos en la glándula digestiva podrían estar relacionadas con el uso de CPSP® como ingrediente de las dietas elaboradas, ya que no existe otro ingrediente en la composición de las dietas que pudiera interferir en el crecimiento de los pulpos. De hecho, recientemente se ha demostrado que *O. vulgaris* puede crecer bien con dietas aglutinadas con gelatina (Quintana *et al.*, 2008) y alginato (Cerezo-Valverde *et al.*, 2008), lo que sugiere la existencia de otros factores a considerar en la preparación de dietas para cefalópodos.
- c) El siguiente paso a considerar para conseguir diseñar dietas elaboradas en cefalópodos podría ser la investigación de los efectos de la estructura de las proteínas de la dieta así como sus efectos sobre la actividad de las enzimas digestivas.

### 3.7. Agradecimientos

Los autores agradecen al Plan Nacional de Pulpo – JACUMAR – Proyecto “Engorde de pulpo *Octopus vulgaris*”, 2007/ 2009, por la financiación de esta investigación, y al Proyecto CONACYT – Básico 50118 (Carlos Rosas) del estado mexicano. Sandra García-Garrido también quiere expresar su agradecimiento al IFAPA Centro “Agua del Pino” y al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la concesión de la beca predoctoral n° 47 (BOE n° 308 26/12/2006).

### 3.8. Referencias bibliográficas

- Águila J., G. Cuzon, C. Pascual, P. Domingues, G. Gaxiola, A. Sánchez, T. Maldonado & C. Rosas. 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: 641–655.
- Almansa E., P. Domingues, A. Sykes, N. Tejera, A. Lorenzo & J.P. Andrade. 2006. The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture*, 256: 403-413.
- Arzel J., R. Métailler, C. Kerleguer, H. Le Delliou & J. Guillaumme. 1995. The protein requirement of Brown trout (*Salmo trutta*) fry. *Aquaculture*, 130: 67-78.
- Bensadoun A. & D. Weinstein. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry*, 70: 241-250.
- Boucaud-Camou E. & R. Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. In: *The Mollusca, 5, Physiology, Part 2* (Saleuddin A.S.M. & K.M. Wilbur eds.) Academic Press, New York. 149-187 pp.
- Boucher-Rodoni R., E. Boucaud-Camou & K. Mangold. 1987. Feeding and digestion. In: *Cephalopod Life Cycles* (Boyle P. ed.) Academic Press, London. 85-108 pp.
- Brinker A., W. Koppe & R. Rosch. 2005. Optimised effluent treatment by stabilized trout faeces. *Aquaculture*, 249: 125-144.
- Cárdenas-López J.L. & N.F. Haard. 2005. Cysteine proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 29(2): 171-186.
- Cárdenas-López J.L. & N.F. Haard. 2009. Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. *Food Chemistry*, 112(2): 442-447.
- Castro B.G. 1990. Can *Sepia officinalis* L. be reared on artificial food? *Marine Behavior & Physiology*, 19: 35-38.
- Castro B.G., F.P. DiMarco, R.H. DeRusha & P.G. Lee. 1993. The effects of surimi and pelleted diets on the laboratory survival, growth, and feeding rate of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 170: 241-252.
- Castro B.G. & P.G. Lee. 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L (Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry & Physiology*, 109A: 1007-1016.

- Cerezo-Valverde J., M. Hernández, F. Aguado-Giménez & B. García-García. 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*, 275: 266-273.
- Cho C. & D. Bureau. 2001. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research*, 32: 349-360.
- Christie W.W. 1982. *Lipids analysis*, 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: Pergamon Press.
- DeRusha R.H., J.W. Forsythe, F.P. DiMarco & R.T. Hanlon. 1989. Alternative diets for maintaining and rearing cephalopods in captivity. *Laboratory Animal Science*, 39: 306-312.
- Domingues P. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. Ph D. Thesis, University of the Algarve, Portugal, 95 p.
- Domingues P.M., F.P. DiMarco, J.P. Andrade & P.G. Lee. 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 13: 423-440.
- Domingues P., N. López, J. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola & C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatán octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13: 273-280.
- Domingues P., A. Ferreira, L. Márquez, J. Andrade, N. López & C. Rosas. 2008. Growth, absorption and assimilation efficiency by mature cuttlefish (*Sepia officinalis*) fed with alternative and artificial diets. *Aquaculture International*, 16: 215-229.
- FAO. 2008. *The State of the World Fisheries and Aquaculture 2008*. SOFIA, FAO, Rome, Italy. 176 p.
- Ferreira A., L. Márquez, E. Almansa, J. Andrade, A. Lorenzo & P. Domingues. 2010. The use of alternative diets to culture juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*: effects on growth and lipid composition. *Aquaculture Nutrition*, 16: 262-275.
- Fluckiger M., G.D. Jackson, P. Nichols, P. Virtue, A. Daw & S. Wotherspoon. 2008. An experimental study of the effect of diet on the fatty acid profiles of the European Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Marine Biology*, 154: 363-372.
- Fraga F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. *Inv. Pesq.*, 3: 69-74.
- Gabaudan J. 1987. *Studies of nutrients ADC in Sea Bass (Dicentrarchus labrax). II. Effects of sodium alginate on protein and lipid*. Nutrition Series. Ifremer publication, Plouzané, France. 8 p.
- García S., P. Domingues, J.C. Navarro, I. Hachero-Cruzado, D. Garrido & C. Rosas. 2011. Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquaculture Nutrition*, 17: e174-e187.
- Hess H.H., M.B. Lees & J.E. Derr. 1978. A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Analytical Biochemistry*, 85: 295-300.
- Horwitz W. 1980. *Methods of analysis*, 13<sup>th</sup> edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Iglesias J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier) en el I.E.O. In: *Actas del VI C. Nacional de Acuicultura* (Costa J., E.

- Abellán, B. García, A. Ortega & S. Zamora Eds.) ISBN: 84-491-0323-1. Cartagena, España. 221–226 pp.
- Iglesias J., F.J. Sánchez, J.G.F. Bersano, J.F. Carrasco, J. Dhont, L. Fuentes, F. Linares, J.L. Muñoz, S. Okumura, J. Roo, T. van der Meeren, E.A.G. Vidal & R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266: 1-15.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Mangold, K. 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44: 81-93.
- Martínez R., R. Santos, A. Álvarez, G. Cuzon, L. Arena, M. Mascaró, C. Pascual & C. Rosas. 2011. Partial characterization of hepatopancreatic and extracellular digestive proteinases of wild and cultivated *Octopus maya*. *Aquaculture International*, 19(3): 445-457.
- Miliou H., M. Fintikaki, M. Tzitzinakis, T. Kountouris & G. Verriopoulos. 2006. Fatty acid composition of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to rearing temperature and body weight. *Aquaculture*, 256: 311-322.
- Moltschaniwskyj N. & D. Johnston. 2006. Evidence that lipid can be digested by the dumpling squid *Euprymna tasmanica*, but is not stored in the digestive gland. *Marine Biology*, 149: 565-572.
- Morales A., G. Cardenete, A. Sanz, H. Akharbach & M. de la Higuera. 1993. Influence of different binders on dietary availability of nutrients in Rainbow Trout. *Fish Nutrition in Practice (Les Colloques)* INRA Editions. Paris, France. 449-452 pp.
- Navarro J.C. & R. Villanueva. 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, 219: 613-631.
- Olsen R.E. & R.J. Henderson. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129: 189-197.
- Quintana D., P. Domingues & S. García. 2008. Effects of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*, 280: 161-164.
- Rosa R., J. Pereira & M.L. Nunes. 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to giant squid, *Architeuthis* sp. *Marine Biology*, 146: 739-751.
- Rosas C., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, D. Chay, N. López, T. Maldonado & P.M. Domingues. 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, 152: 371-381.
- Rosas C., J. Tut, J. Baeza, A. Sánchez, V. Sosa, C. Pascual, L. Arena, P. Domingues & G. Cuzon. 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, 275: 291-297.
- Santé-Lhoutellier V., T. Astruct, P. Marinova, E. Greve & P. Gatellier. 2008. Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *J. Agric. Food. Chem.*, 56: 1488-1494.

- Sargent J.R., R.J. Henderson & D.R. Tocher. 1989. The lipids. In: *Fish Nutrition, 2<sup>nd</sup> edition* (Halver J.E. ed.) Academic Press, San Diego, 153-218 pp.
- Sargent J.R., J.G. Bell, R.J. Henderson & D.R. Tocher. 1995. Origins and functions of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. In: *Phospholipids: Characterization, Metabolism and Novel Biochemical applications* (Ceve G. & F. Paltauf eds.) Champaign, IL: American Oil Chemical Society Press. 248-259 pp.
- Semmens J.M., N.A. Moltschaniwskyj & C.G. Alexander. 1995. Effect of feeding on the digestive gland of the tropical sepioid *Idiosepius pygmaeus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 75: 885-897.
- Yamamoto T. & T. Akiyama. 1995. Effect of carboxymethylcellulose, alpha-starch, and wheat gluten incorporated in diets as binders on growth, feed efficiency, and digestive enzyme activity of fingerling Japanese flounder. *Fish Science*, 61: 309-313.
- Zar J.H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4<sup>th</sup> edition. Ryu T. (ed.). Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ. 663 p.
- Zlatanov S., K. Laskaridis, C. Feist, A. Sagredos. 2006. Proximate composition, fatty acid analysis and protein digestibility-corrected amino acid score of three Mediterranean cephalopods. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50: 967-970.



## **EFFECTO DE DIETAS ARTIFICIALES SOBRE EL CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA, BALANCE ENERGÉTICO Y COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA Y MANTO DEL PULPO COMÚN, *Octopus vulgaris* (CUVIER, 1797)**

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental están publicados en el artículo:

**García S**, Domingues P, Navarro JC, Hachero-Cruzado I, Garrido D, Rosas C (2011) *Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of Octopus vulgaris (Cuvier, 1797) fed with to artificial diets*. Aquaculture Nutrition, 17: e174-e187. DOI 10.1111/j.1365-2095.2009.00746.x.

### **4.1. Resumen**

En este artículo se analizaron los efectos de dos aglutinantes (gelatina y alginato) sobre el crecimiento, la supervivencia, el balance energético parcial y la composición lipídica del manto y la glándula digestiva (GD) de *Octopus vulgaris*. Las tres dietas utilizadas en el experimento fueron: CON, calamar (*Loligo gahi*) como dieta control; GEL, compuesta por pasta de calamar (*L. gahi*) (300 g kg<sup>-1</sup>), hidrolizado de proteínas de pescado CPSP<sup>®</sup> (100 g kg<sup>-1</sup>), y harina de pescado (500 g kg<sup>-1</sup>), aglutinado con 100 g kg<sup>-1</sup> de gelatina; y ALG, compuesta por pasta de calamar (*L. gahi*) (300 g kg<sup>-1</sup>), hidrolizado de proteínas de pescado CPSP<sup>®</sup> (100 g kg<sup>-1</sup>), y harina de pescado (500 g kg<sup>-1</sup>), aglutinado con 100 g kg<sup>-1</sup> de alginato. Las tasas de crecimiento obtenidas fueron 13,7 ± 2,1, 2,1 ± 2,8 y -2,4 ± 2,9 g kg<sup>-1</sup> pc d<sup>-1</sup> para pulpos alimentados con la dietas CON, GEL y ALG, respectivamente. La glándula digestiva de los pulpos posee una mayor concentración de ácidos grasos (AG) que el manto. La GD de los animales alimentados con dieta CON presenta mayor concentración de AG que la de aquellos alimentados con dietas elaboradas. El balance energético mostró que la energía suministrada requerida, como función de la masa corporal E(B), fue afectada por el tipo de dieta, con valores negativos (-32 kJ kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) de E(B) en animales alimentados con dieta ALG y valores positivos (276 y 285 kJ kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) para pulpos alimentados con GEL y CON, respectivamente. La dieta ALG no cubrió las necesidades fisiológicas para el crecimiento del pulpo.

**Palabras clave:** Aglutinantes · Balance energético · Dietas elaboradas · Lípidos · *Octopus vulgaris*.



## 4.2. Introducción

*Octopus vulgaris* presenta altas tasas de crecimiento (Aguado-Giménez & García-García, 2002; Iglesias *et al.*, 2006; 2007), precios elevados en el mercado (García-García *et al.*, 2004) y una gran demanda en muchas regiones del mundo, lo que la convierte en una especie potencial para la diversificación de la acuicultura. El engorde de *O. vulgaris* se realiza actualmente en Galicia, Norte de España (Iglesias *et al.*, 1997), pero su viabilidad es baja debido a la ausencia de una adecuada dieta artificial, entre otros aspectos (García-García *et al.*, 2004). De hecho, los dos principales problemas para conseguir una acuicultura comercial en esta especie son la alta mortalidad en la fase paralarvaria (Iglesias *et al.*, 2006) y la inexistencia de alimentos artificiales adecuados para su engorde (Domingues *et al.*, 2005; 2006; 2007; Rosas *et al.*, 2007).

Los estudios relacionados con dietas artificiales para cefalópodos se iniciaron a principios de los 90. Se usaron pellets secos o húmedos (Castro, 1990; Lee *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 1993; Castro & Lee, 1994) y surimi, un concentrado de proteína miofibrilar de peces (Castro *et al.*, 1993; Castro & Lee, 1994; Domingues, 1999; Domingues *et al.*, 2005) pero con resultados no muy óptimos. En los últimos años se han utilizado como modelos de experimentación a *O. vulgaris* (Cerezo-Valverde *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008) y *Octopus maya* (Domingues *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007; 2008) para entender los requerimientos metabólicos de los cefalópodos y así poder desarrollar dietas artificiales.

El uso de aglutinantes como estabilizantes de la dieta es una práctica común en acuicultura. Se han utilizado como aglutinantes de dietas de pescado almidón de trigo o maíz, goma arábiga, polímeros y celulosa, entre otros (Yamamoto & Akiyama, 1995).

La concentración de alginato en la dieta puede endurecer y alterar las heces o reducir la contaminación (Cho & Bureau, 2001; Brinker *et al.*, 2005), además de afectar a la digestibilidad de los nutrientes (Morales *et al.*, 1993; Arzel *et al.*, 1995). Existe en la bibliografía información sobre un efecto negativo de este aglutinante en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) al incluir más del 15% del mismo en la dieta (Gabaudan, 1987).

Cerezo-Valverde *et al.* (2008) utilizó gelatina y alginato como aglutinantes de boga (*Boops boops*) y camarón para preparar dietas para *O. vulgaris*, pero obtuvieron crecimiento negativo o moderado (menor al 10 g kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). Sin embargo, *O. maya* fue alimentado con una dieta artificial húmeda basada en tejido muscular de cangrejo aglutinada con gelatina obteniendo un crecimiento considerable (superior al 20 g kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) y supervivencia, comparado con el tejido muscular de cangrejo utilizado normalmente como dieta de esta

especie (Rosas *et al.*, 2008); además, dietas aglutinadas con alginato produjeron un crecimiento moderado (menor al  $10 \text{ g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) en juveniles de la misma especie (Águila *et al.*, 2007).

La Bioenergética se puede definir como la cuantificación de los intercambios y las transformaciones de la energía y la materia entre los organismos vivos y su medio ambiente (Lucas, 1993). Cuando es aplicada a los estudios nutricionales, la bioenergética ayuda a entender cómo los nutrientes modulan los mecanismos fisiológicos relacionados con la transformación de la energía del alimento en biomasa. La ecuación básica del balance energético es  $I = P + G + R_{\text{tot}} + U_{\text{tot}} + F$  (Lucas, 1993), donde I es la energía total ingerida; P, la energía invertida en el crecimiento somático o producción de tejidos; G, la energía invertida en el crecimiento gonadal;  $R_{\text{tot}}$ , la energía invertida en respiración;  $U_{\text{tot}}$ , la energía perdida como nitrógeno y otros productos de desecho excretados; y F, la energía no absorbida y perdida en las heces. En términos prácticos, esta ecuación puede proporcionarnos información sobre cuánta energía de los alimentos es necesaria para obtener un crecimiento máximo y cómo las distintas proporciones de los nutrientes son utilizadas como fuente de energía metabólica para el crecimiento, o se pierden como productos de desecho. Para algunos cefalópodos, como *Pareledone charvoti* (Daly & Peck, 2000), *Octopus vulgaris* (Petza *et al.*, 2006), *Enteroctopus megalocyathus* (Pérez *et al.*, 2006; Farias *et al.*, 2009) y *Octopus maya* (Rosas *et al.*, 2007; Farias *et al.*, 2009), de la energía total ingerida (100 %),  $U_{\text{tot}}$  varió de 2 al 14 % y  $R_{\text{tot}}$  de 23 al 68 %. Los modelos bioenergéticos suelen utilizarse para estimar el crecimiento o el consumo en animales acuáticos y son de gran utilidad para estudiar cómo diferentes tipos de alimentos modulan el destino de la energía ingerida. De hecho, los modelos bioenergéticos nos permiten estimar la digestibilidad de los alimentos, información muy importante para obtener buenos diseños de dietas equilibradas (Lucas, 1993). En animales acuáticos el uso de la energía de los alimentos cambia con el peso corporal debido, principalmente, a que las necesidades nutricionales cambian durante las diferentes fases del ciclo de vida moduladas también por la temperatura (Katsanevakis *et al.*, 2005; André *et al.*, 2009; Farias *et al.*, 2009). Desde un punto de vista acuícola, los modelos bioenergéticos pueden utilizarse para calcular el suministro requerido de energía (E) en función de la masa corporal (B). Para hacer un cálculo adecuado de este valor en cefalópodos es necesario tener en cuenta que parte de la energía ingerida se pierde por las heces, justo antes de que el alimento entre en el hepatopáncreas para ser digerido (Boucher-Rodoni *et al.*, 1987; Lucas, 1993). La diferencia entre la energía ingerida (I) y la energía perdida en las heces (F) se define como la energía

absorbida e incluye al metabolismo respiratorio (R) y a la producción de biomasa (P). En este sentido, E(B) puede calcularse como  $Ab(B) - R(B) - P(B)$ , donde E(B) debe mantenerse positivo para que un individuo consiga sobrevivir. El uso de este modelo para ensayar diferentes dietas en cefalópodos podría ser de gran utilidad porque a través de E(B) es posible integrar la relación entre las propiedades digestivas y energéticas de los alimentos con las demandas energéticas del metabolismo y la producción de biomasa (André *et al.*, 2009).

El contenido en lípidos de la glándula digestiva es considerablemente mayor que el que posee el músculo o carne (Semmens, 1998). La GD juega un importante papel en la digestión de lípidos y en el metabolismo de los cefalópodos (Semmens *et al.*, 1995), existiendo evidencias de que no es utilizado como almacén de lípidos a largo plazo (Semmens, 1998; Fluckiger *et al.*, 2008). Este órgano también es considerado como un buen indicador del estado nutricional y un buen candidato para el estudio del efecto de distintas dietas en la composición lipídica de cefalópodos, ya que la composición del manto o músculo no se ve afectada en la misma magnitud cuando el animal se ha alimentado con dietas que no satisfacen todos sus requerimientos nutricionales. Además, estudios recientes indican que los ácidos grasos (AG) juegan un papel fundamental en la nutrición de *Octopus vulgaris* durante sus primeros estadios larvarios (paralarvas) como durante el crecimiento de juveniles, haciendo especial énfasis en la proporción DHA/EPA (ácido docosahexanoico (22:6 *n*-3)/ ácido eicosapentanoico (20:5 *n*-3)) como factor clave para explicar las diferencias en supervivencia y crecimiento (Navarro & Villanueva, 2003; Miliou *et al.*, 2005; Okumura *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo de investigación ha sido determinar los efectos de dos aglutinantes (gelatina y alginato) sobre el crecimiento, el balance energético parcial y la composición lipídica del manto y la glándula digestiva de *Octopus vulgaris* alimentado con diferentes dietas.

### 4.3. Material y métodos

#### Origen de los organismos

Pulpos juveniles (<1 kg) fueron capturados mediante red de arrastre en la costa de Huelva (Sur de España) y transportados inmediatamente hasta las instalaciones del Centro de Cultivos Marinos IFAPA “Agua del Pino”, Cartaya, Huelva (España).

## Condiciones de aclimatación

Treinta animales fueron distribuidos aleatoria e individualmente en 30 tanques cilindro-cónicos de 80 L de volumen cada uno. Los pulpos se aclimataron en estos tanques durante cinco días, siendo alimentados con calamar (*Loligo gahi*) a una razón de 100 g kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (peso húmedo del alimento/ peso húmedo del animal), una vez al día, a las 9:00 h.

## Diseño de dietas y composición proximal

Las tres dietas utilizadas en el experimento fueron las siguientes:

- Dieta CON: calamar (*L. gahi*) como dieta control (el calamar fresco congelado; se descongelaba 15 minutos antes de ser usado como alimento);
- Dieta GEL: pasta de calamar (*L. gahi*) (300 g kg<sup>-1</sup>), hidrolizado de proteínas de pescado CPSP<sup>®</sup> (900 g kg<sup>-1</sup> contenido proteico, CP) (100 g kg<sup>-1</sup>), y harina de pescado de alta calidad (600 g kg<sup>-1</sup> CP) (500 g kg<sup>-1</sup>), aglutinado con 100 g kg<sup>-1</sup> de gelatina;
- Dieta ALG: pasta de calamar (*L. gahi*) (300 g kg<sup>-1</sup>), hidrolizado de proteínas de pescado CPSP<sup>®</sup> (100 g kg<sup>-1</sup>), y harina de pescado (500 g kg<sup>-1</sup>), aglutinado con 100 g kg<sup>-1</sup> de alginato.

Como dieta control se utilizó calamar congelado ya que con su uso se obtuvo un buen crecimiento para esta especie en trabajos anteriores (Quintana *et al.*, 2008).

Las dos dietas experimentales fueron preparadas a temperatura ambiente con calamar descongelado, el cual se trituró y mezcló con el CPSP y la harina. La pasta resultante fue aglutinada con gelatina (GEL) o alginato (ALG). La composición proximal de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 4.1.

La harina de pescado fue adquirida en Piensos Maqueda S.L. (Sevilla, España), el hidrolizado de proteínas de pescado CPSP<sup>®</sup> en Sopropeche (Francia), la gelatina (Aditio 80-100 Blooms) fue suministrada por Panreac<sup>®</sup> (España) y el alginato (Pokel Merl<sup>®</sup> y Pokel Cal<sup>®</sup>) por Prosur (Murcia, España).

**Tabla 4.1** Composición proximal de las dietas experimentales.

<b>g kg<sup>-1</sup></b>	<b>Dieta CON<sup>a</sup></b>	<b>Dieta GEL<sup>b</sup></b>	<b>Dieta ALG<sup>b</sup></b>
Proteínas (P)	726,0	605,0	550,0
Lípidos Totales (LT)	64,0	46,0	46,0
Cenizas (C)	65,0	76,1	76,1
Carbohidratos (CH)	144,0	85,3	85,3

a. Valores según EEUU National Nutrient Database para Standard Reference:  
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>

b. Composición proximal de ingredientes para ambas dietas:  
 Harina de pescado: 738 g kg<sup>-1</sup> P; 73 g kg<sup>-1</sup> LT; 140 g kg<sup>-1</sup> C; 0 g kg<sup>-1</sup> CH.  
 CPSP: 900 g kg<sup>-1</sup> P; 90 g kg<sup>-1</sup> LT; 10 g kg<sup>-1</sup> C; 0 g kg<sup>-1</sup> CH.

### Condiciones de cultivo y parámetros calculados

Al inicio del experimento, 10 pulpos de cada grupo, alimentados con las dietas CON, GEL y ALG, fueron pesados y se obtuvieron valores medios  $\pm$  desviación estándar siguientes:  $713,0 \pm 92,9$  g,  $708,3 \pm 152,3$  g y  $717,8 \pm 144,3$  g respectivamente, sin presentar diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ). Cada mañana, antes de alimentar, los restos de comida y las heces de cada tanque fueron retirados, separados y secados.

Los pulpos fueron pesados individualmente cada diez días, y para cada intervalo de muestreo, los datos obtenidos fueron utilizados para calcular los siguientes parámetros:

a. Tasa de crecimiento instantánea (IGR)

$$\text{IGR} = ((\ln W_2 - \ln W_1)/t) \times 1000 \text{ (g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}\text{)}$$

Siendo:

- $W_2$  y  $W_1$ , el peso húmedo final e inicial (g) de los pulpos, respectivamente.
- $\ln$ , el logaritmo natural.
- $t$ , el número de días del periodo experimental.
- $\text{g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ , gramos por kilogramo de peso corporal por día.

## b. Tasa de ingestión (FR)

$$FR = (FI / W \text{ promedio } (t)) \times 1000 \text{ (g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}\text{)}$$

Siendo:

- FI, la cantidad de alimento consumido (g).
- W promedio (t), promedio de peso húmedo ganado de los pulpos (g) por un período de tiempo t (días, d);
- g kg<sup>-1</sup> pc d<sup>-1</sup>, gramos por kilogramo de peso corporal por día.

## c. Eficiencia de conversión (FC)

$$FC = ((W_2 - W_1) / FI) \times 100 \text{ (\%)}$$

Siendo:

- W<sub>2</sub>-W<sub>1</sub>, peso ganado (g) por los pulpos durante el período de tiempo en estudio.
- FI, la cantidad de alimento consumido (g).

La temperatura del agua fue de 15 ± 1 °C y el fotoperíodo natural, entre los meses de Febrero y Marzo. El flujo de agua, 25 L h<sup>-1</sup>, fue ajustado en todos los tanques para mantener la concentración de oxígeno cercana a los niveles de saturación. El experimento duró treinta días. Después, tres pulpos alimentados con cada dieta fueron ubicados en cámaras de respiración, para determinar el consumo de oxígeno y la excreción de nitrógeno. Al final de este ensayo, se tomaron muestras de glándula digestiva y manto de cada pulpo, para calcular la composición en lípidos.

**Balance energético parcial**

La ecuación de balance energético parcial que representa el flujo de energía a través de *O. vulgaris* es la siguiente:

$$I = P + G + R_{tot} + U_{tot} + F \quad (\text{Lucas, 1993})$$

Siendo:

- I, energía total ingerida.
- P, energía invertida en el crecimiento somático o producción de tejidos.
- G, energía invertida en el crecimiento gonadal.
- R<sub>tot</sub>, energía invertida en respiración.
- U<sub>tot</sub>, energía perdida como nitrógeno y otros productos de desecho excretados
- F, energía no absorbida y perdida en las heces.

La energía total ingerida (I) fue calculada como:

$$I = IR \times EFC$$

Donde:

- IR es la tasa de ingestión ( $\text{g kg}^{-1}$  del animal  $\text{d}^{-1}$ )
- EFC, el contenido energético del alimento ( $\text{kJ g}^{-1}$ ).

La tasa de ingestión (IR) fue calculada como la diferencia entre el alimento suministrado y el recogido después de 4 horas, y corregida con el porcentaje de nutrientes filtrados. El alimento remanente fue sifonado y filtrado a través de filtros Wathman número 3 ( $5 \mu\text{m}$ ) previamente pesados.

La energía absorbida (Ab, %) fue calculada como:

$$Ab = I \times AE$$

Donde:

- I es la energía total ingerida
- AE, la eficiencia de absorción.

La eficiencia de absorción (AE) fue calculada mediante la ecuación definida por Condrey *et al.* (1972):

$$AE = [(I' - F') / (1 - F') I'] \times 100$$

Siendo:

- $I$  la proporción entre el peso seco libre de cenizas (pslc) y el peso seco del alimento (ps).
- $F$  la proporción entre pslc y ps de las heces.

El ps y el pslc del alimento y las heces fueron obtenidos con muestras de cada dieta y de las heces de pulpos alimentados con cada dieta, secadas a 60 °C hasta alcanzar un peso constante; y con muestras secadas en horno de mufla a 500 °C durante 4 h, respectivamente.

La energía empleada para crecimiento (P) fue calculada usando la tasa de crecimiento de pulpo obtenida durante el período experimental. Se utilizó un valor de  $18,8 \pm 0,72$  kJ g<sup>-1</sup> ps para transformar los valores de crecimiento en unidades de producción (P; kJ g<sup>-1</sup> ps día<sup>-1</sup>). Estos datos fueron obtenidos analizando el contenido energético aplicado en tres replicados de animales completos mediante un calorímetro (Parr®) previamente calibrado con ácido benzoico.

La tasa de consumo de oxígeno y excreción de amonio (mg h<sup>-1</sup>) fue calculada a partir de 9 pulpos mantenidos en ayuno al final del experimento. Estos animales fueron individualizados en cámaras de flujo metabólico continuo o respirómetros, conectados a un sistema de flujo directo. Por diferencia entre la concentración de oxígeno y de amonio en el agua que entra y la que sale de las cámaras, y conociendo la velocidad del flujo de agua que pasa a través de las cámaras, se puede determinar la cantidad de oxígeno que está consumiendo el animal o la cantidad de amonio que está excretando, por unidad de tiempo. Las medidas fueron hechas durante 9 horas, entre las 8:30 y 17:30 h.

El valor de consumo de oxígeno medio fue calculado como:

$$VO_2 = O_{2e} - O_{2ex} \times Fr$$

Siendo:

- $VO_2$ , el consumo de oxígeno (mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> animal<sup>-1</sup>).
- $O_{2e}$ , concentración de oxígeno a la entrada de la cámara (mg L<sup>-1</sup>).
- $O_{2ex}$ , concentración de oxígeno a la salida (mg L<sup>-1</sup>).
- $Fr$ , tasa de flujo de agua a través de la cámara (L h<sup>-1</sup>).



La concentración de oxígeno se midió con un oxímetro digital (YSI 50B digital, EEUU) con un sensor polarográfico ( $\pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ), previamente calibrado con agua de mar saturada de oxígeno a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La excreción de amonio fue calculada como:

$$\text{NH}_4 = \text{NH}_{4\text{ex}} - \text{NH}_{4\text{e}} \times \text{Fr}$$

Donde:

- $\text{NH}_4$  se refiere al amonio excretado ( $\text{mg NH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ animal}^{-1}$ ).
- $\text{NH}_{4\text{ex}}$  es la concentración a la salida de la cámara ( $\text{mg L}^{-1}$ ).
- $\text{NH}_{4\text{e}}$ , la concentración a la entrada ( $\text{mg L}^{-1}$ ).
- Fr es la tasa de flujo de agua a través de la cámara ( $\text{L h}^{-1}$ ).

La concentración de amonio se midió por espectrofotometría en un Espectrofotómetro Spectroquant® NOVA 60, utilizando un Test en cubeta para amonio Spectroquant® (Merck, Alemania).

Los factores de conversión para el consumo de oxígeno ( $14,3 \text{ kJ mg}^{-1}$ ) y amonio excretado ( $20,5 \text{ kJ mg}^{-1}$ ) sirvieron para transformar los valores de  $\text{VO}_2$  y  $\text{NH}_4$  de pulpos alimentados y en ayuno a unidades de energía R y U ( $\text{kJ h}^{-1} \text{ animal}^{-1}$ ), respectivamente (Lucas, 1993). Teniendo en cuenta el peso de los pulpos, R y U fueron expresados como  $\text{kJ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$  peso húmedo (ph). Los valores de consumo de oxígeno y amonio excretado obtenidos fueron transformados a  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y la proporción atómica O:N fue estimada.

Las eficiencias brutas de asimilación para respiración, producción y excreción fueron calculadas, respectivamente, como:

$$\text{R/I} \times 100$$

$$\text{P/I} \times 100$$

$$\text{U/I} \times 100$$

Siendo:

- I, energía total ingerida.
- P, energía invertida en el crecimiento somático.

- R, energía invertida en respiración.
- U, energía perdida como nitrógeno y otros productos de desecho excretados

Las eficiencias netas de respiración (RE) y de producción (PE) según la energía absorbida se calcularon, respectivamente, como:

$$\begin{aligned} \text{RE} &= (\text{R}/\text{Ab}) \times 100 \\ \text{PE} &= (\text{P}/\text{Ab}) \times 100 \end{aligned}$$

Y según la Energía asimilada, como:

$$\begin{aligned} \text{RE} &= (\text{R}/\text{As}) \times 100 \\ \text{PE} &= (\text{P}/\text{As}) \times 100 \end{aligned}$$

Donde:

- R, energía invertida en respiración.
- P, energía invertida en el crecimiento somático.
- Ab, energía absorbida.
- As, energía asimilada.

El suministro requerido de energía (E) como función de la masa corporal (B=1 kg) fue obtenido mediante la ecuación:

$$\text{E(B)} = \text{Ab} - \text{As} = \text{Ab} - (\text{R} + \text{P})$$

Siendo:

- R, energía invertida en respiración.
- P, energía invertida en el crecimiento somático.
- As, energía asimilada.
- Ab, energía absorbida.

Todos los valores fueron expresados como  $\text{kJ kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ .

## Lípidos y ácidos grasos

Se analizaron lípidos totales (LT) y ácidos grasos (AG) del total de lípidos del manto y GD de los pulpos, así como la humedad de las dietas, del manto y de la glándula digestiva. El contenido en humedad fue determinado por el método de Horwitz (1980). Los LT fueron extraídos con cloroformo: metanol (2: 1 v/ v) más 0,01 % de hidroxitolueno butilado (BHT) (v/ v) como antioxidante (Christie, 1982). El solvente orgánico fue evaporado bajo una corriente de nitrógeno y el contenido en lípidos determinado por gravimetría. Los lípidos totales extraídos fueron sometidos a trans-metilación ácido catalizada durante 16 h a 50 °C, usando 1 ml de tolueno y 2 ml de ácido sulfúrico al 1 % en metanol (v/ v). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos resultantes (FAME) fueron purificados mediante cromatografía de capa fina (TLC) y visualizados con yodina al 1 % (p/ v) en CHCl<sub>3</sub> (Christie, 1982). Antes de llevar a cabo la trans-metilación, el ácido nonadecanoico (19:0) fue añadido a la muestra de LT como estándar interno a una concentración de 1 mg/ ml (5 % LT). Los FAME fueron separados y cuantificados en un equipo de cromatografía de gases (Shimadzu GC-2010) con detector de ionización de llama (280 °C) y una columna capilar de sílice fundida Tecnokroma-Superwax-280™ (15 m x 0,1 mm I.D.). El helio se usó como gas portador, y la temperatura inicial del horno fue de 150 °C, seguida de un aumento a un ritmo de 90 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar una temperatura final de 250 °C a los 6 minutos. Los FAME fueron identificados individualmente basándose en unos patrones de referencia originales de aceite de pescado bien caracterizados. El contenido de lípido total del manto y la glándula digestiva de los pulpos fue calculado en gramo por kilogramo de peso seco (g kg<sup>-1</sup> ps). Los ácidos grasos fueron cuantificados como porcentaje de los ácidos grasos totales (Tablas 4.4 y 4.6) y en contenido (g kg<sup>-1</sup> ps) (Tablas 4.5 y 4.7). Para la cuantificación en porcentaje e identificación de los ácidos grasos se usó el programa GC Solution (Versión 2.30.00 SU 4). Para el cálculo de los AG expresados en porcentaje se eliminó el porcentaje del estándar interno (19:0). Para el cálculo del contenido (g kg<sup>-1</sup> ps) en AG de los tejidos analizados se aplicó la ecuación:

$$\text{AG} = \frac{\text{SI} \times \% \text{AG} \times \text{LT}}{\% \text{SI}} \quad (\text{g kg}^{-1} \text{ ps})$$

Siendo:

- AG, el ácido graso a cuantificar.
- SI, estándar interno añadido al lípido analizado ( $\text{g g}^{-1}$  LT).
- % AG, el porcentaje del ácido graso a cuantificar en contenido.
- LT, lípido total ( $\text{g kg}^{-1}$  ps)
- % SI, el porcentaje de estándar interno (ácido nonadecanoico, 19:0).

BHT, cloruro de potasio, bicarbonato de potasio y yodina fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Las placas de TLC (20 cm x 20 cm x 0,25 mm) se adquirieron de Macheren-Nagel (Düren, Alemania). Todos los solventes orgánicos usados en cromatografía de gases fueron reactivos de calidad adquiridos de Panreac (Barcelona, España).

### **Análisis estadístico**

Las diferencias en crecimiento, alimento ingerido y composición lipídica del manto y la glándula digestiva entre los tres grupos de pulpos alimentados con las dietas CON, GEL y ALG fueron analizadas mediante ANOVA de una vía. Cuando se encontraron diferencias se aplicó el test de Tukey de comparación múltiple. La homogeneidad de varianzas fue verificada con el test de Cochran. Los valores obtenidos durante el tratamiento fueron comparados mediante la prueba múltiple de Duncan. Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar los datos de consumo de oxígeno y excreción nitrogenada teniendo en consideración la posible interacción entre las dietas y la hora de alimentación. La homogeneidad de varianzas fue verificada mediante el test de Cochran.

Para el caso de la composición de ácidos grasos, es bastante difícil interpretar los resultados a partir de las tablas. Así, de manera adicional, se llevó a cabo el Análisis de Componentes Principales (ACP) determinando diferencias entre composición lipídica de dietas, manto y glándula digestiva de pulpos. ACP es un método que normalmente se utiliza para simplificar o reducir el número de variables perdiendo la mínima cantidad posible de información, sin ser necesario confirmar normalidad y distribución. Este método hace fácil entender y explicar los resultados obtenidos. Los nuevos factores o componentes principales son resultado de una combinación lineal de las variables originales, y son factores independientes entre ellos (Carrasco & Hernán, 1993). La clave de este análisis está en la determinación de las variables que expliquen el mayor porcentaje posible de varianza,

y puedan informar sobre una proporción aceptable del total de la varianza en estudio. Así pues, los datos sobre ácidos grasos fueron analizados mediante ACP. Los gráficos de resultados obtenidos tras generar los dos componentes principales se utilizaron para establecer grupos basados en características anatómicas (manto, GD) y dietéticas (CON, GEL, ALG). Para el ACP se seleccionaron los ácidos grasos más representativos, como 14:0, 16:0, 16:4, 18:1 *n*-9, 20:1 *n*-9, 20:2 *n*-6, 20:4 *n*-3, 20:4 *n*-6, 20:5 *n*-3, 22:1 *n*-11, 22:5 *n*-3, 22:6 *n*-3, Saturados, PUFA, Monoinsaturados, *n*-3 y *n*-6 totales. Las variables fueron dadas como % de los ácidos grasos totales (peso seco, ps) del manto y la glándula digestiva de pulpos alimentados con las tres dietas, siendo 3 réplicas de manto y glándula digestiva por dieta utilizada. Para establecer grupos según características anatómicas, se utilizaron los porcentajes de cada AG representativo según pertenecieran al manto o a la glándula digestiva de los pulpos, sin diferenciar la dieta con la que habían sido cultivados los animales. Para establecer los grupos según características dietéticas, se utilizaron las mismas variables pero esta vez, marcando la diferencia entre la dieta suministrada, y sin distinguir si pertenecían al manto o a la glándula digestiva. De esta forma, cada resultado obtenido en la gráfica de la Figura 4.5 (manto, GD) corresponde espacialmente con los obtenidos en la gráfica de la Figura 4.6 (CON, GEL, ALG).

Todos los ensayos estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 17, con un nivel de confianza del 95 % (Zar, 1999).

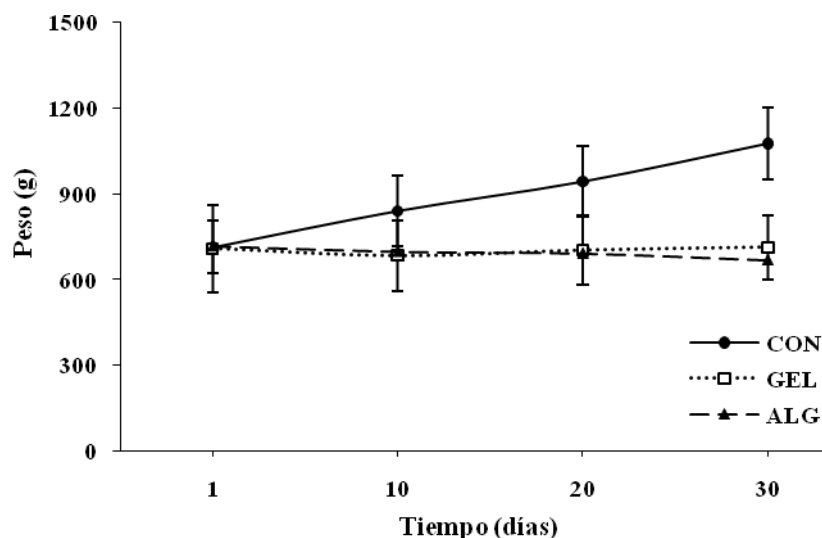
#### 4.4. Resultados

##### Crecimiento

Los animales alimentados con la dieta CON crecieron significativamente ( $p < 0,05$ ) comparados con los alimentados con las dos dietas artificiales, entre los cuales no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ; Figura 4.1).

El peso final de los pulpos alimentados con CON, GEL y ALG fue  $1075,8 \pm 127,8$  g,  $712,3 \pm 113,4$  g y  $667,8 \pm 134,7$  g, respectivamente. La dieta CON también dio lugar a mayores tasas de crecimiento ( $p < 0,05$ ), sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre pulpos alimentados con GEL y ALG. Las tasas de crecimiento total en el experimento fueron  $13,7 \pm 2,1$  g kg<sup>-1</sup> pc d<sup>-1</sup>,  $2,1 \pm 2,8$  g kg<sup>-1</sup> pc d<sup>-1</sup> y  $-2,4 \pm 2,9$  g kg<sup>-1</sup> pc d<sup>-1</sup>, para pulpos con la dieta CON, GEL y ALG respectivamente. Las tasas de crecimiento fueron significativamente diferentes entre dietas ( $p < 0,05$ ), siendo mayor ( $p = 0,000$ ) para el control, a la vez que la de pulpos con dieta GEL fue también superior ( $p = 0,002$ ) a la de pulpos con dieta ALG. Las

tasas de ingestión medias para pulpos con dieta CON, GEL y ALG fueron  $69,1 \pm 2,9 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ,  $70,9 \pm 3,2 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$  y  $72,8 \pm 2,8 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ , respectivamente, y no presentaron diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ). La eficiencia de conversión del alimento para los animales con dieta ALG fue negativa y de  $21,5 \pm 1,5\%$  y  $3,2 \pm 1,1\%$  para pulpos con dieta CON y GEL. La mortalidad fue del 10% para pulpos alimentados con dieta GEL, mientras que para los alimentados con dietas CON y ALG no se registraron bajas.



**Figura 4.1** Peso medio (g) de pulpo común alimentado con calamar (CON) y dos dietas artificiales (GEL y ALG) para los diferentes periodos de muestreo. Las barras indican desviación estándar (DE).

### Balance energético parcial

El tipo de dieta no afecta a la tasa de ingestión obteniéndose valores de  $83$  a  $89,6 \text{ g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  para pulpos alimentados con las dietas artificiales ( $p > 0,05$ ; Tabla 4.2). Los resultados de calorimetría mostraron que las dietas experimentales ofrecieron diferente cantidad de energía a los animales; las dietas elaboradas tuvieron un mayor contenido energético que la dieta control CON ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.2). En consecuencia, el tipo de dieta afectó a la cantidad de energía ingerida con valores mayores para animales con dieta ALG frente a dietas GEL y CON ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.2). La eficiencia de absorción (%) se vio también afectada por el tipo de dieta, siendo superior en pulpos alimentados con dietas GEL y CON ( $79,5\%$  y  $82,3\%$ , respectivamente) frente a los alimentados con dieta ALG ( $41\%$ ) ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.2).

Los pulpos con dieta ALG fueron energéticamente afectados por la dieta. Se obtuvo un valor negativo de P en dichos animales ( $P = -59,8 \text{ kJ kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ). Por el contrario, los pulpos alimentados con GEL y CON mostraron valores positivos de P, aunque con la dieta GEL el valor de P fue 18 veces más bajo que con la dieta CON ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.2).

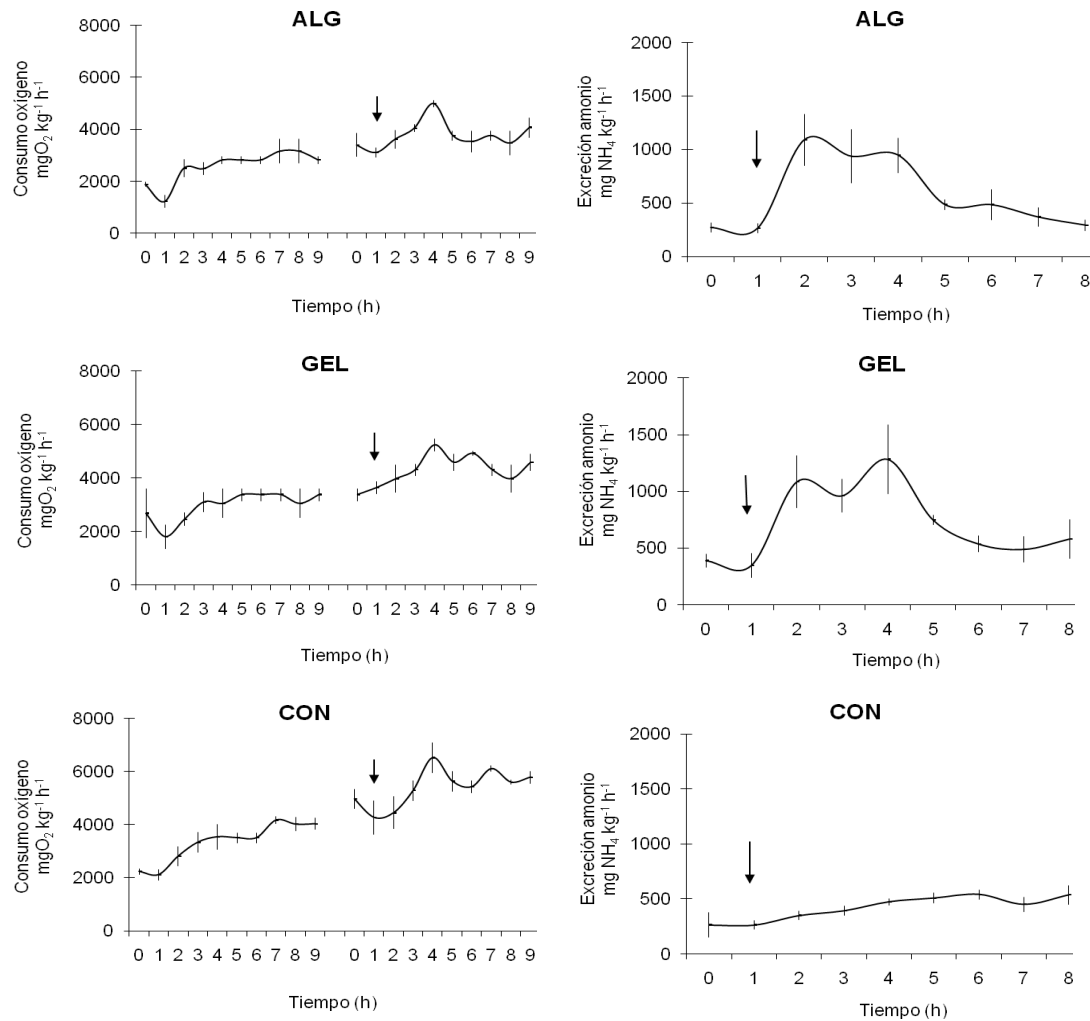
**Tabla 4.2** Tasas de ingestión ( $\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) y energía ingerida, absorbida y producida por *O. vulgaris* alimentado con calamar aglutinado con alginato (ALG) y gelatina (GEL). El calamar fresco se usó como dieta control (CON). Los valores son presentados como media  $\pm$  D.E. Letras distintas indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

Tipo de dieta	ALG	GEL	CON
Peso inicial, g	717,77 $\pm$ 45,63 <sup>a</sup>	692,34 $\pm$ 42,9 <sup>a</sup>	713,0 $\pm$ 42,9 <sup>a</sup>
Peso final, g	618,16 $\pm$ 65,88 <sup>a</sup>	712,32 $\pm$ 35,9 <sup>b</sup>	1075,8 $\pm$ 35,9 <sup>c</sup>
Días experimentales	30	30	30
Tasa de ingestión, $\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$	89,56 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	83,26 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>	87,38 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>
Energía del alimento, $\text{kJ g}^{-1}$	17,35 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	17,00 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	14,48 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
Energía ingerida, $\text{kJ kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$	1553,8 $\pm$ 16 <sup>c</sup>	1415,4 $\pm$ 22,8 <sup>b</sup>	1265,3 $\pm$ 6,96 <sup>a</sup>
Producción (P), $\text{kJ kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$	-59,76 $\pm$ 8,51 <sup>a</sup>	12,0 $\pm$ 5,62 <sup>b</sup>	217,6 $\pm$ 4,68 <sup>c</sup>
Eficiencia de absorción, %	40,8 $\pm$ 3,71 <sup>a</sup>	79,5 $\pm$ 6,36 <sup>b</sup>	82,3 $\pm$ 6,5 <sup>b</sup>

Los datos del consumo de oxígeno y excreción de amonio en período de ayuno y de alimentación para pulpos alimentados con las tres dietas experimentales se muestran en la Figura 4.2. El consumo de oxígeno en ayuno de pulpos con dieta ALG fue menor que el registrado para los animales con dietas control y GEL ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.3). Tras alimentar, el consumo de oxígeno de pulpos alimentados con las tres dietas alcanzó un pico a las 3 horas; nuevamente, un mayor consumo de oxígeno post pandrial fue observado en animales con GEL y CON frente a pulpos con dieta ALG ( $p < 0,05$ ; Figura 4.2).

No hubo diferencias significativas entre los valores de excreción de amonio registrados en los animales alimentados con las tres dietas experimentales, calculándose un valor medio de 307,8  $\text{mg NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $p > 0,05$ ; Tabla 4.3). Tras alimentar, se observó un aumento de la excreción de amonio (Figura 4.2). Los pulpos con dieta ALG alcanzaron un pico de excreción de amonio 2 horas después de ser alimentados. Por el contrario, los pulpos con dietas GEL y CON lo alcanzaron 4 y 6 horas después, respectivamente (Figura 4.2). La

excreción de amonio post pandrial registrada para pulpos con dieta control fue un 46% menor del alcanzado por los alimentados con las dos dietas elaboradas ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.3).



**Figura 4.2** Consumo de oxígeno ( $\text{mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y excreción de amonio ( $\text{mg NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) de juveniles de *O. vulgaris* alimentados con las dietas experimentales CON, GEL y ALG, y medidos en intervalos de una hora (h). Flechas, momento en el que los pulpos fueron alimentados. Los datos se presentan como media  $\pm$  D.E.

La proporción O:N en ayuno y en alimentación varió entre 4 y 15, indicando que los animales en experimentación poseen un metabolismo principalmente proteico (Mayzaud & Conover, 1988). Se consiguieron valores significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) en animales con dieta CON comparado con aquellos con dietas elaboradas (Tabla 4.3).



**Tabla 4.3** Consumo de oxígeno y excreción de amonio de *O. vulgaris* alimentado con calamar aglutinado con alginato (ALG) y gelatina (GEL). El calamar fresco se usó como dieta control (CON). Los valores son presentados como media  $\pm$  D.E. Letras distintas indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

Consumo Oxígeno	Ayuno			Alimentación			TRP	Rrut	RAHI	RTot
	mg O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>			mg O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>			h	kJ kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>	kJ kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>	kJ kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>
ALG	2385,28	$\pm$ 132,11	b	4983,37	$\pm$ 125,03	a	3	793,94	86,91	880,85
GEL	3145,20	$\pm$ 107,10	b	5235,82	$\pm$ 224,29	b	3	885,06	84,04	969,10
CON	2821,38	$\pm$ 83,80	a	6519,23	$\pm$ 572,63	b	3	671,22	166,18	837,40

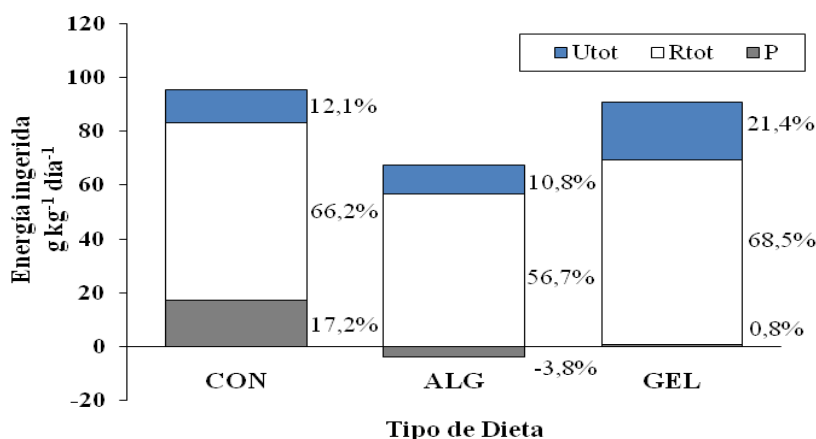
Excreción Amonio	Ayuno			Alimentación			TRP	U <sub>rut</sub>	U <sub>pp</sub>	U <sub>Tot</sub>
	mg NH <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>			mg NH <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>			h	kJ kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>	kJ kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>	kJ kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>
ALG	271,16	$\pm$ 41,75	a	1089,65	$\pm$ 237,64	b	2	122,89	44,89	167,78
GEL	388,21	$\pm$ 56,70	a	1285,29	$\pm$ 305,07	b	6	143,95	158,86	302,81
CON	264,22	$\pm$ 112,56	a	541,00	$\pm$ 43,56	a	4	108,86	44,58	153,44

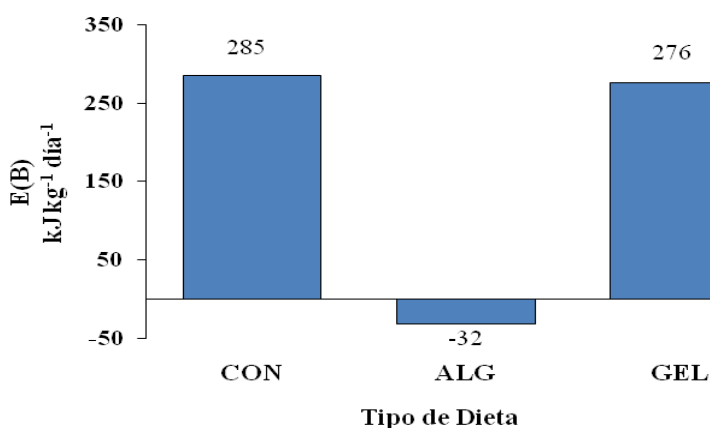
O:N	Ayuno	Alimentación
ALG	11,04	4,85
GEL	8,60	4,32
CON	9,58	12,79

TRP: Tiempo hasta alcanzar el pico; RRut: Metabolismo Respiratorio de Rutina; RAHI: Metabolismo Respiratorio Incremento de Calor Aparente; RTot: Metabolismo Respiratorio Total (RRut + RAHI); U<sub>rut</sub>: Metabolismo Excreción de Amonio de Rutina; U<sub>pp</sub>: Metabolismo Excreción de Amonio Post pandrial; U<sub>tot</sub>: Metabolismo Excreción de Amonio Total (U<sub>rut</sub> + U<sub>pp</sub>).

Una vez que el balance energético fue integrado, fue destacable que los animales alimentados con dieta ALG canalizaban el 57 % de la energía ingerida a R, 11 % perdían como U y sólo 4 % pasaba a P. En cambio, los pulpos con dieta GEL canalizaron 68,5 % a R, 21 % a U y 0,8 % a P; y con dieta CON 66 % a R, 12 % a U y 17 % a P (Figura 4.3). La energía suministrada requerida, como función de la masa corporal  $E(B)$ , fue  $-32$ , 276 y 285  $\text{kJ kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  para pulpos alimentados con ALG, GEL y CON, respectivamente (Figura 4.4). La energía asimilada ( $As = R + P$ ) fue calculada obteniéndose valores de 821, 981 y 1055  $\text{kJ kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  para animales alimentados con las dietas ALG, GEL y CON, respectivamente. La proporción de energía asimilada transformada a producción ( $P/As, \%$ ) fue 22,18 % con dieta CON, 1,14 % con dieta GEL y -7,3 % con dieta ALG.



**Figura 4.3** Balance energético de juveniles de *O. vulgaris* alimentados con dietas experimentales (ALG, GEL, CON). Los valores en columnas se presentan como  $\text{kJ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Los porcentajes indican la proporción de cada valor como Tasa de ingestión ( $I = 100 \%$ ). P, Metabolismo de Crecimiento; Rtot, de Respiración; Utot, de Excreción.



**Figura 4.4** Efecto del tipo de dieta según la energía suministrada a partir del alimento como una función de la masa corporal,  $E(B)$ , para pulpos alimentados con las dietas CON, GEL y ALG.

### Composición en lípidos y ácidos grasos

La humedad de las tres dietas (Tabla 4.4) y de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con las mismas (Tabla 4.6) fue significativamente diferente ( $p < 0,05$ ). La humedad de la dieta CON fue mayor ( $p < 0,05$ ) que la de las dietas elaboradas y, a su vez, la dieta GEL presentó mayor humedad ( $p < 0,05$ ) que la dieta ALG (Tabla 4.4). La glándula digestiva de los animales alimentados con las dos dietas artificiales tuvo una humedad similar ( $p = 0,773$ ), siendo menor que la obtenida para GD de pulpos con dieta CON ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.4).

El contenido de lípidos totales, en gramos por kilogramo de peso seco ( $\text{g kg}^{-1}$  ps), para el manto de pulpos con dietas CON, GEL y ALG fue similar ( $p > 0,05$ ) al final del experimento. Se presentan los resultados en porcentaje del total de ácidos grasos (Tabla 4.4) y en contenido ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) (Tabla 4.5).

Los grupos de ácidos grasos saturados y monoinsaturados del manto de pulpos con dietas CON y GEL fueron parecidos ( $p > 0,05$ ), y mayores ( $p < 0,05$ ) que los de pulpos con dieta ALG en contenido (Tabla 4.5), aunque en % de AG total no se encontraron diferencias entre las tres dietas en cuanto a saturados. Para el caso de monoinsaturados, sólo en los alimentados con ALG su importancia fue menor (Tabla 4.4). Los AG saturados y monoinsaturados más importantes fueron 16:0 y 20:1  $n-9$ , respectivamente (Tablas 4.4 y 4.5), cuyos valores fueron más bajos en pulpos con dieta ALG.

Los HUFA  $n-3$  más importantes fueron el ácido docosahexanoico (22:6  $n-3$ , DHA) y el ácido eicosapentanoico (20:5  $n-3$ , EPA), que tuvieron valores similares ( $p > 0,05$ ) en pulpos alimentados con las tres dietas experimentales (Tablas 4.4 y 4.5). La cantidad de AG  $n-3$  representa más de un tercio en % del total de AG (Tabla 4.4).

El AG  $n-6$  más abundante fue el ácido araquidónico (20:4  $n-6$ , ARA) para todas las dietas, siendo significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en los alimentados con dieta ALG, en % de AG total (Tabla 4.4), aunque no se encontraron diferencias en contenido (Tabla 4.5). La proporción DHA/ EPA fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) para pulpos con dieta ALG, pero EPA/ ARA y DHA/ ARA fueron superiores de forma significativa ( $p < 0,05$ ) para pulpos con dieta CON (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4** Humedad de las dietas y del manto ( $\text{g kg}^{-1}$  ph), Lípidos totales ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) del manto de pulpo y Perfil de ácidos grasos (% ps de los Ácidos Grasos Totales) del manto de pulpo alimentado con calamar (CON) y las dos dietas artificiales (GEL, ALG).

Composición Dieta	CON	GEL	ALG
<b>Humedad Dieta</b>	805 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	584 $\pm$ 21 <sup>b</sup>	499 $\pm$ 16 <sup>c</sup>
<b>Humedad Manto</b>	786 $\pm$ 25	802 $\pm$ 20	816 $\pm$ 25
<b>Lípidos Totales Manto</b>	52 $\pm$ 6	46 $\pm$ 7	41 $\pm$ 6
<b>14:0</b>	1,87 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	1,45 $\pm$ 0,43 <sup>ab</sup>	1,06 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
<b>15:0</b>	0,43 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,10
<b>NI 1</b>	1,64 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	1,45 $\pm$ 0,16 <sup>ab</sup>	1,36 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
<b>16:0</b>	23,88 $\pm$ 3,31 <sup>a</sup>	21,84 $\pm$ 0,55 <sup>ab</sup>	19,58 $\pm$ 1,91 <sup>b</sup>
<b>16:1 <i>n</i>-7</b>	1,18 $\pm$ 0,11	1,39 $\pm$ 0,34	0,94 $\pm$ 0,21
<b>16:1 <i>n</i>-5</b>	0,32 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,05
<b>17:0</b>	1,12 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	1,41 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	1,46 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>
<b>16:4</b>	3,40 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	5,02 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	5,43 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>
<b>18:0</b>	7,19 $\pm$ 0,88	8,98 $\pm$ 1,57	9,07 $\pm$ 0,58
<b>18:1 <i>n</i>-9</b>	2,77 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup>	3,07 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	2,16 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>
<b>18:1 <i>n</i>-7</b>	1,74 $\pm$ 0,16	1,77 $\pm$ 0,22	1,42 $\pm$ 0,18
<b>18:2 <i>n</i>-6</b>	0,46 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,08	0,49 $\pm$ 0,18
<b>20:1 <i>n</i>-9</b>	3,55 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	3,42 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	2,82 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>
<b>20:2 <i>n</i>-6</b>	0,41 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,07
<b>20:4 <i>n</i>-6</b>	2,97 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	4,47 $\pm$ 1,31 <sup>ab</sup>	6,17 $\pm$ 1,06 <sup>b</sup>
<b>20:4 <i>n</i>-3</b>	0,19 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	0,11 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
<b>20:5 <i>n</i>-3</b>	15,65 $\pm$ 1,25	13,32 $\pm$ 0,90	13,95 $\pm$ 2,08
<b>22:1 <i>n</i>-11</b>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	0,35 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>22:1 <i>n</i>-9</b>	1,45 $\pm$ 0,26	1,81 $\pm$ 0,23	1,57 $\pm$ 0,23
<b>22:5 <i>n</i>-3</b>	0,86 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,89 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,08 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
<b>22:6 <i>n</i>-3</b>	21,77 $\pm$ 2,38	18,43 $\pm$ 1,55	21,65 $\pm$ 2,15
<b>NI</b>	3,66 $\pm$ 0,54	5,01 $\pm$ 0,94	4,83 $\pm$ 1,18
<b>Totales</b>			
<b>Sat</b>	34,60 $\pm$ 3,96	34,21 $\pm$ 1,27	31,74 $\pm$ 2,09
<b>Mon</b>	12,13 $\pm$ 1,03 <sup>ab</sup>	13,14 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>	10,28 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>
<b>PUFA</b>	44,57 $\pm$ 4,42	41,17 $\pm$ 2,51	46,36 $\pm$ 3,80
<b><i>n</i>-3</b>	39,54 $\pm$ 3,51	33,85 $\pm$ 2,31	37,75 $\pm$ 4,24
<b><i>n</i>-6</b>	4,40 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	6,37 $\pm$ 1,16 <sup>ab</sup>	7,98 $\pm$ 1,12 <sup>b</sup>
<b><i>n</i>-9</b>	7,77 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	8,30 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>	6,54 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>
<b>HUFA <i>n</i>-3</b>	38,68 $\pm$ 3,56	33,08 $\pm$ 2,36	37,10 $\pm$ 4,24
<b><i>n</i>-3/<i>n</i>-6</b>	9,25 $\pm$ 1,68 <sup>a</sup>	5,43 $\pm$ 0,94 <sup>b</sup>	4,84 $\pm$ 1,20 <sup>b</sup>
<b>DHA/EPA</b>	1,39 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>	1,38 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,54 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
<b>EPA/ARA</b>	5,56 $\pm$ 1,40 <sup>a</sup>	3,15 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>	2,34 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>
<b>DHA/ARA</b>	7,73 $\pm$ 1,95 <sup>a</sup>	4,34 $\pm$ 1,11 <sup>b</sup>	3,62 $\pm$ 0,89 <sup>b</sup>
<b>Mon/HUFA <i>n</i>-3</b>	0,32 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	0,40 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,28 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>Mon/PUFA</b>	0,28 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	0,32 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,22 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
<b>Mon/Sat</b>	0,35 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,02
<b>18:1<i>n</i>-9/HUFA <i>n</i>-3</b>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	0,09 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>

NI: ácidos grasos no identificados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; DHA: ácido docosahexanoico (22:6 *n*-3); EPA: ácido eicosapentanoico (20:5 *n*-3); ARA: ácido araquidónico (20:4 *n*-6); Mon: ácidos grasos monoinsaturados; Sat: ácidos grasos saturados. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los valores representados como media  $\pm$  D.E.

**Tabla 4.5** Contenido en Ácidos grasos ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) del manto de pulpos alimentados con calamar (CON) y con dos dietas artificiales (GEL, ALG).

Composición Dieta	CON	GEL	ALG
14:0	0,39 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	0,26 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	0,15 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
15:0	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
NI 1	0,33 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,26 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	0,20 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
16:0	4,87 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	3,96 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	2,77 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>
16:1 <i>n</i> -7	0,24 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,25 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
16:1 <i>n</i> -5	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
17:0	0,23 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,02
16:4	0,69 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,16	0,78 $\pm$ 0,22
18:0	1,46 $\pm$ 0,04	1,63 $\pm$ 0,36	1,31 $\pm$ 0,33
18:1 <i>n</i> -9	0,57 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,55 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
18:1 <i>n</i> -7	0,36 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,20 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
18:2 <i>n</i> -6	0,10 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
20:1 <i>n</i> -9	0,73 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	0,62 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
20:2 <i>n</i> -6	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	0,05 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
20:4 <i>n</i> -6	0,61 $\pm$ 0,21	0,82 $\pm$ 0,30	0,89 $\pm$ 0,30
20:4 <i>n</i> -3	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
20:5 <i>n</i> -3	3,23 $\pm$ 0,64	2,43 $\pm$ 0,47	2,04 $\pm$ 0,67
22:1 <i>n</i> -11	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
22:1 <i>n</i> -9	0,29 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,08
22:5 <i>n</i> -3	0,18 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,05
22:6 <i>n</i> -3	4,52 $\pm$ 1,20	3,38 $\pm$ 0,75	3,15 $\pm$ 0,92
NI	0,76 $\pm$ 0,14	0,91 $\pm$ 0,20	0,67 $\pm$ 0,12
<b>Totales</b>			
Sat	7,06 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	6,20 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>	4,52 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>
Mon	2,50 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	2,36 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	1,45 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
PUFA	9,22 $\pm$ 2,20	7,53 $\pm$ 1,50	6,74 $\pm$ 1,92
<i>n</i> -3	8,18 $\pm$ 1,94	6,19 $\pm$ 1,27	5,50 $\pm$ 1,66
<i>n</i> -6	0,91 $\pm$ 0,26	1,16 $\pm$ 0,31	1,15 $\pm$ 0,34
<i>n</i> -9	1,60 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	1,49 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,93 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>
HUFA <i>n</i> -3	8,01 $\pm$ 1,90	6,07 $\pm$ 1,26	5,40 $\pm$ 1,64

NI: ácidos grasos no identificados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los valores representados como media  $\pm$  D.E.

Al igual que para la composición en lípidos del manto, los resultados obtenidos en la glándula digestiva se presentan en porcentaje de ácidos grasos totales (Tabla 4.6) y en contenido ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) (Tabla 4.7). El contenido de lípidos totales ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) para la GD de pulpos con dieta CON fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que con dieta GEL y ALG, siendo en estos pulpos el contenido similar ( $p > 0,05$ ) (Tabla 4.6).

El contenido de casi todos los ácidos grasos fue superior en la GD de pulpos con dieta CON que con las dos dietas artificiales (Tabla 4.7). Los pulpos con dieta CON presentaron un contenido significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) de saturados y monoinsaturados (Tabla 4.7). En cambio, en % de AG totales, los monoinsaturados fueron más abundantes en GD de pulpos con dieta GEL, y los saturados en GD de pulpos con dieta ALG (Tabla 4.6). El ácido graso saturado mayoritario fue el 16:0; el monoinsaturado mayoritario en dietas GEL y ALG fue el 18:1 *n*-9, y en la dieta CON, 20:1 *n*-9 (Tablas 4.6 y 4.7). El contenido de 16:0 fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en pulpos con dieta CON (Tabla 4.7), aunque en % de AG totales fue parecida ( $p > 0,05$ ) entre pulpos con dietas CON y ALG y mayor de forma significativa ( $p < 0,05$ ) que para la dieta GEL (Tabla 4.6).

Las concentraciones significativamente más altas ( $p < 0,05$ ) de HUFA *n*-3 fueron encontradas en la GD de pulpos con dieta CON (Tablas 4.6 y 4.7). Esto puede explicarse por las diferencias en contenido de DHA y EPA. Los HUFA *n*-3 mayoritarios fueron DHA y EPA (Tablas 4.6 y 4.7). Los ácidos grasos *n*-3 representaron, en porcentaje, casi la mitad del total de ácidos grasos para animales con dieta CON, y sobre un tercio en la glándula digestiva de pulpos con dietas elaboradas (Tabla 4.6).

Los ácidos grasos *n*-6 fueron relativamente más abundantes en animales con dietas GEL y ALG ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4.6). El *n*-6 mayoritario fue ARA para todas las dietas, siendo significativamente mayor en pulpos con dieta CON ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.7). En cambio, en abundancia relativa, fue más alto el valor obtenido para pulpos con dieta ALG (Tabla 4.6).

La proporción DHA/ EPA fue similar para pulpos alimentados con las tres dietas. Por el contrario, los valores de EPA/ ARA y DHA/ ARA fueron significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) en pulpos con dieta CON, seguido de los pulpos con dieta GEL ( $p < 0,05$ ) comparado con los alimentados con ALG (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6** Humedad de la GD ( $\text{g kg}^{-1}$  ph), Lípidos totales ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) de la GD del pulpo y Perfil de ácidos grasos (% ps de los Ácidos Grasos Totales) de la GD de pulpos alimentados con calamar (CON) y con dos dietas artificiales (GEL, ALG).

Composición Dieta	CON	GEL	ALG
<b>Humedad GD</b>	667 ± 12 <sup>a</sup>	746 ± 23 <sup>b</sup>	757 ± 21 <sup>b</sup>
<b>Lípidos Totales GD</b>	365 ± 67 <sup>a</sup>	129 ± 21 <sup>b</sup>	97 ± 22 <sup>b</sup>
<b>14:0</b>	3,87 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,77 ± 0,74 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,34 <sup>b</sup>
<b>15:0</b>	0,58 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,05 <sup>c</sup>
<b>NI 1</b>	0,73 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,34 <sup>ab</sup>	1,27 ± 0,13 <sup>b</sup>
<b>16:0</b>	20,71 ± 0,56 <sup>a</sup>	18,83 ± 0,84 <sup>b</sup>	19,72 ± 0,61 <sup>ab</sup>
<b>16:1 n-7</b>	2,06 ± 0,15 <sup>a</sup>	4,75 ± 0,53 <sup>b</sup>	1,92 ± 0,36 <sup>a</sup>
<b>16:1 n-5</b>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>17:0</b>	0,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,02 ± 0,07 <sup>b</sup>
<b>16:4</b>	0,59 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,55 ± 0,34 <sup>b</sup>	3,49 ± 0,79 <sup>c</sup>
<b>18:0</b>	3,89 ± 0,26 <sup>a</sup>	6,43 ± 0,62 <sup>b</sup>	10,77 ± 1,24 <sup>c</sup>
<b>18:1 n-9</b>	3,99 ± 0,24 <sup>a</sup>	6,89 ± 0,79 <sup>b</sup>	3,95 ± 0,89 <sup>a</sup>
<b>18:1 n-7</b>	2,36 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,61 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,23 <sup>b</sup>
<b>18:2 n-6</b>	0,46 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,54 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>20:1 n-9</b>	4,94 ± 0,39	5,18 ± 2,54	2,70 ± 0,26
<b>20:2 n-6</b>	0,56 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>20:4 n-6</b>	1,49 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,43 ± 0,30 <sup>b</sup>	5,12 ± 0,52 <sup>c</sup>
<b>20:4 n-3</b>	0,31 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,43 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,07 <sup>b</sup>
<b>20:5 n-3</b>	14,64 ± 0,25 <sup>a</sup>	9,79 ± 1,74 <sup>b</sup>	11,15 ± 1,41 <sup>b</sup>
<b>22:1 n-11</b>	0,31 ± 0,08	2,61 ± 2,57	0,64 ± 0,07
<b>22:1 n-9</b>	0,94 ± 0,07	1,13 ± 0,36	1,10 ± 0,11
<b>22:5 n-3</b>	0,62 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,11 <sup>b</sup>
<b>22:6 n-3</b>	29,10 ± 1,25 <sup>a</sup>	18,09 ± 4,50 <sup>b</sup>	23,18 ± 1,76 <sup>ab</sup>
<b>NI</b>	2,69 ± 0,28 <sup>a</sup>	5,47 ± 1,75 <sup>b</sup>	3,81 ± 1,63 <sup>ab</sup>
<b>Totales</b>			
<b>Sat</b>	29,71 ± 0,90 <sup>a</sup>	30,76 ± 0,79 <sup>a</sup>	33,70 ± 0,41 <sup>b</sup>
<b>Mon</b>	15,93 ± 0,67 <sup>a</sup>	24,79 ± 6,00 <sup>b</sup>	13,29 ± 0,33 <sup>a</sup>
<b>PUFA</b>	50,34 ± 1,69 <sup>a</sup>	36,42 ± 7,43 <sup>b</sup>	44,46 ± 2,60 <sup>ab</sup>
<b>n-3</b>	46,42 ± 1,53 <sup>a</sup>	30,56 ± 6,71 <sup>b</sup>	36,45 ± 3,42 <sup>b</sup>
<b>n-6</b>	2,84 ± 0,15 <sup>a</sup>	4,28 ± 0,56 <sup>b</sup>	6,49 ± 0,46 <sup>c</sup>
<b>n-9</b>	9,88 ± 0,63 <sup>ab</sup>	13,20 ± 3,61 <sup>a</sup>	7,75 ± 0,53 <sup>b</sup>
<b>HUFA n-3</b>	44,84 ± 1,41 <sup>a</sup>	29,46 ± 6,53 <sup>b</sup>	35,62 ± 3,40 <sup>ab</sup>
<b>n-3/n-6</b>	16,35 ± 0,40 <sup>a</sup>	7,08 ± 0,91 <sup>b</sup>	5,66 ± 0,90 <sup>b</sup>
<b>DHA/EPA</b>	1,99 ± 0,06	1,83 ± 0,16	2,09 ± 0,12
<b>EPA/ARA</b>	9,85 ± 0,32 <sup>a</sup>	4,02 ± 0,45 <sup>b</sup>	2,21 ± 0,47 <sup>c</sup>
<b>DHA/ARA</b>	19,58 ± 0,09 <sup>a</sup>	7,38 ± 1,37 <sup>b</sup>	4,58 ± 0,77 <sup>c</sup>
<b>Mon/HUFA n-3</b>	0,36 ± 0,03	0,92 ± 0,51	0,37 ± 0,03
<b>Mon/PUFA</b>	0,32 ± 0,02	0,74 ± 0,39	0,30 ± 0,01
<b>Mon/Sat</b>	0,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,21 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>18:1n-9/HUFA n-3</b>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>

GD: Glándula digestiva; NI: ácidos grasos no identificados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; DHA: ácido docosahexanoico (22:6 n-3); EPA: ácido eicosapentanoico (20:5 n-3); ARA: ácido araquidónico (20:4 n-6); Mon: ácidos grasos monoinsaturados; Sat: ácidos grasos saturados. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Valores representados como media ± D.E.

**Tabla 4.7** Contenido en Ácidos grasos ( $\text{g kg}^{-1}$  ps) de la glándula digestiva del pulpo alimentado con calamar (CON) y con dos dietas artificiales (GEL, ALG).

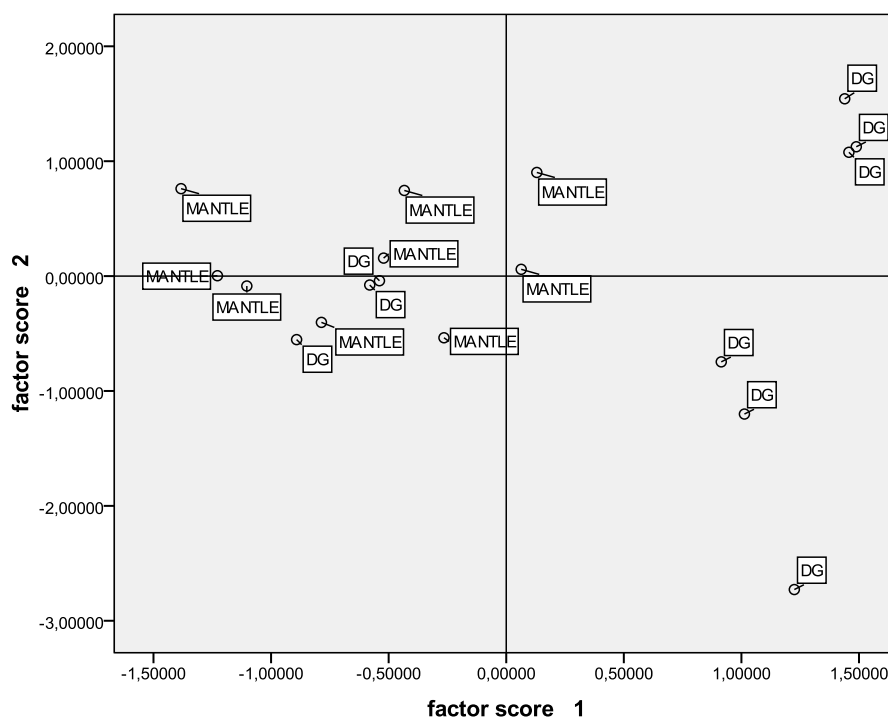
Composición Dieta	CON	GEL	ALG
14:0	9,55 ± 1,89 <sup>a</sup>	2,57 ± 0,97 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,22 <sup>b</sup>
15:0	1,42 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>b</sup>
NI 1	1,76 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,08 <sup>b</sup>
16:0	50,93 ± 8,86 <sup>a</sup>	12,50 ± 3,51 <sup>b</sup>	6,24 ± 1,75 <sup>b</sup>
16:1 <i>n</i> -7	5,14 ± 1,39 <sup>a</sup>	3,18 ± 1,02 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,25 <sup>b</sup>
16:1 <i>n</i> -5	0,79 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>
17:0	1,42 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,09 <sup>b</sup>
16:4	1,43 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,07 <sup>b</sup>
18:0	9,52 ± 1,44 <sup>a</sup>	4,18 ± 0,88 <sup>b</sup>	3,32 ± 0,53 <sup>b</sup>
18:1 <i>n</i> -9	9,82 ± 1,77 <sup>a</sup>	4,45 ± 0,83 <sup>b</sup>	1,29 ± 0,55 <sup>c</sup>
18:1 <i>n</i> -7	5,80 ± 1,01 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,42 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,09 <sup>b</sup>
18:2 <i>n</i> -6	1,16 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,05 <sup>c</sup>
20:1 <i>n</i> -9	12,08 ± 1,67 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,43 <sup>b</sup>	0,84 ± 0,15 <sup>b</sup>
20:2 <i>n</i> -6	1,39 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>b</sup>
20:4 <i>n</i> -6	3,69 ± 0,88 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,58 <sup>b</sup>	1,59 ± 0,27 <sup>b</sup>
20:4 <i>n</i> -3	0,76 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,03 <sup>c</sup>
20:5 <i>n</i> -3	36,22 ± 7,81 <sup>a</sup>	6,69 ± 2,56 <sup>b</sup>	3,58 ± 1,27 <sup>b</sup>
22:1 <i>n</i> -11	0,74 ± 0,17 <sup>ab</sup>	1,40 ± 0,83 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,07 <sup>b</sup>
22:1 <i>n</i> -9	2,31 ± 0,42 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,06 <sup>b</sup>
22:5 <i>n</i> -3	1,54 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,27 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,10 <sup>b</sup>
22:6 <i>n</i> -3	72,24 ± 17,10 <sup>a</sup>	12,50 ± 5,43 <sup>b</sup>	7,39 ± 2,32 <sup>b</sup>
NI	6,76 ± 1,26 <sup>a</sup>	3,52 ± 1,07 <sup>b</sup>	1,12 ± 0,14 <sup>c</sup>
<b>Totales</b>			
Sat	73,07 ± 12,63 <sup>a</sup>	20,38 ± 5,51 <sup>b</sup>	10,59 ± 2,61 <sup>b</sup>
Mon	39,15 ± 6,69 <sup>a</sup>	15,60 ± 1,29 <sup>b</sup>	4,20 ± 1,15 <sup>c</sup>
PUFA	124,87 ± 28,68 <sup>a</sup>	25,00 ± 10,03 <sup>b</sup>	14,13 ± 4,26 <sup>b</sup>
<i>n</i> -3	115,13 ± 26,39 <sup>a</sup>	21,02 ± 8,66 <sup>b</sup>	11,65 ± 3,83 <sup>b</sup>
<i>n</i> -6	7,07 ± 1,71 <sup>a</sup>	2,91 ± 1,03 <sup>b</sup>	2,02 ± 0,40 <sup>b</sup>
<i>n</i> -9	24,21 ± 3,83 <sup>a</sup>	8,26 ± 0,53 <sup>b</sup>	2,47 ± 0,76 <sup>c</sup>
HUFA <i>n</i> -3	111,16 ± 25,29 <sup>a</sup>	20,27 ± 8,40 <sup>b</sup>	11,39 ± 3,75 <sup>b</sup>

NI: ácidos grasos no identificados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los valores representados como media ± D.E.



## Análisis de componentes principales

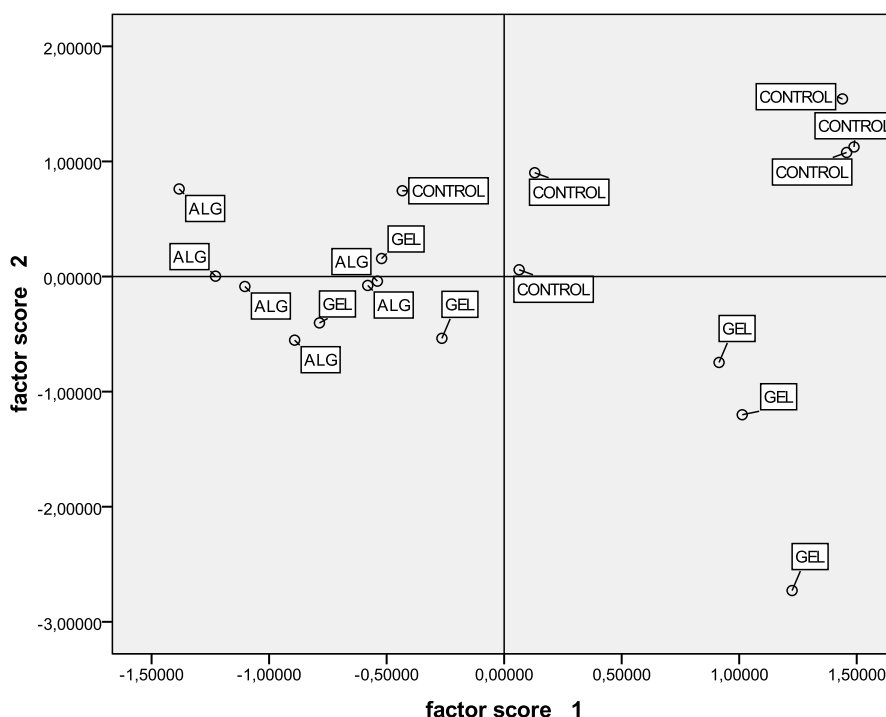
Las variables seleccionadas fueron adecuadas para el ACP ya que se obtuvo un valor de 0,6 al aplicar el test Kaiser-Meyer-Olkin (KMO), lo que indica que los datos se adecuaron a un modelo de análisis de factores; y con el test de esfericidad de Bartlett, un alto poder de significación ( $p < 0,000$ ). El test de esfericidad de Bartlett plantea una hipótesis nula ( $H_0$ ) de variables iniciales no correlacionadas. Una significación  $< 0,05$  indica que se puede rechazar la  $H_0$  y que, por lo tanto, tiene sentido aplicar el análisis factorial. Los primeros dos factores principales generados explicaron el 80 % del total de la varianza: 44,5 % el primer componente (factor score 1) y 35,5 % el segundo (factor score 2) (Figuras 4.5 y 4.6). El análisis de la matriz de componentes nos permitió asociar al primer factor el ácido graso 14:0, los monoinsaturados y los ácidos grasos  $n-9$  por la zona positiva, y los AG  $n-6$  por la negativa. PUFA, especialmente los  $n-3$ , fueron fuertemente asociados al lado positivo del segundo factor.



**Figura 4.5** Resultados obtenidos mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) para la composición en ácidos grasos (% ps) de la glándula digestiva (DG) y manto (MANTLE) de los pulpos utilizados en el experimento.

Los gráficos de resultados revelaron dos grupos definidos sobre el primer componente, principalmente identificables con la composición de la GD y del manto (características anatómicas), aunque los ácidos grasos de la GD de los pulpos con dieta ALG fueron clasificados junto a los obtenidos del manto de todas las dietas experimentales.

El segundo componente separó claramente a los AG de la GD de pulpos con dieta CON de los de pulpos con dieta GEL, según características dietéticas (Figuras 4.5 y 4.6).



**Figura 4.6** Resultados obtenidos mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) para la composición en ácidos grasos (% ps) de los pulpos alimentados con las tres dietas experimentales (CONTROL (CON), GEL, ALG).

#### 4.5. Discusión

Los cefalópodos han sido ya cultivados con dietas artificiales, pero con crecimiento bajo o negativo. Domingues *et al.* (2005, 2008) y Ferreira *et al.* (2010) han alimentado con dietas artificiales semi-húmedas a sepias (*Sepia officinalis*). Estas dietas dieron lugar a crecimiento negativo. Por el contrario, se obtuvo crecimiento moderado al alimentar con dietas artificiales a la misma especie por Domingues (1999), Castro *et al.* (1993), Castro & Lee (1994) y Domingues *et al.* (2005). Además, recientemente dos especies de pulpos han sido alimentadas con dietas elaboradas. *O. vulgaris* fue alimentado con dietas elaboradas

basadas en pasta de camarón o de calamar aglutinadas con gelatina (Quintana *et al.*, 2008), obteniendo un crecimiento moderado con la dieta basada en pasta de calamar ( $15 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ). Esta dieta artificial no es provechosa o rentable desde un punto de vista práctico, ya que únicamente se basaba en pasta de calamar, pero demostró que la gelatina es un buen aglutinante para las dietas para pulpos.

Recientemente, Rosas *et al.* (2008) alimentó a *O. maya* con una dieta artificial basada en pasta de cangrejo aglutinada con gelatina o con alginato. Se observó una alta mortalidad para pulpos alimentados con la dieta que contenía alginato y unas tasas de crecimiento aceptables para los alimentados con la dieta aglutinada con gelatina ( $19,1 \pm 1,4 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ), incluso mayor que la del control usado (carne de cangrejo;  $17,2 \pm 1,8 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ). En este experimento, altas tasas de crecimiento (aunque bajas si las comparamos con las del control) fueron obtenidas con la dieta artificial aglutinada con gelatina (GEL), mientras que los pulpos alimentados con la dieta con alginato (ALG) perdieron peso.

En el presente estudio, fueron utilizados ingredientes preparados industrialmente (harina de pescado y CPSP) para alimentar a los pulpos, siendo la pasta de calamar ( $300 \text{ g kg}^{-1}$ ) el único ingrediente natural. Como en otros trabajos, las dietas experimentales dieron lugar a tasas de crecimiento más bajas que las obtenidas a partir de la dieta control. Domingues *et al.* (2007) alimentó a *O. maya* con una dieta artificial basada en pasta de calamar, CPSP y un pellet utilizado para alimentar camarones. Los pulpos aceptaron bien la dieta pero no crecieron ( $0,0 \pm 3,0 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ). De igual forma, Rosas *et al.* (2007) alimentó a la misma especie con una dieta artificial también basada en pasta de calamar, CPSP y un pellet usado para cultivar camarones, con buena aceptación pero crecimiento negativo ( $-0,8 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ ).

Águila *et al.* (2007), trabajando con *O. maya* también, utilizó diferentes porcentajes de CPSP en dietas aglutinadas con alginato, obteniendo tasas de crecimiento por debajo de  $10 \text{ g kg}^{-1} \text{ pc d}^{-1}$ . Estas dietas dieron lugar a mejores resultados que los obtenidos con la dieta probada en este estudio, también aglutinada con alginato y con una concentración parecida de CPSP. Nosotros tenemos varias hipótesis que pueden explicar la ausencia o el bajo crecimiento obtenido cuando los pulpos son alimentados con dietas elaboradas. Una causa podría ser los cambios estructurales que sufren las proteínas durante la elaboración de la harina de pescado, consecuencia de la desnaturalización por calor (Domingues *et al.*, 2009), evitando el ataque enzimático durante la formación del quimo y así pudiendo afectar a la digestibilidad. Existen evidencias que demuestran que cocinar el alimento afecta a la susceptibilidad de las proteínas miofibrilares por las proteasas, reduciendo la digestibilidad

del alimento (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008; Gatellier & Santé-Lhoutellier, 2009). Otra hipótesis podría estar relacionada con la pérdida de las proteínas durante la elaboración de la dieta. Mientras las proteínas son procesadas, algunos aminoácidos y lípidos podrían perderse, reduciéndose así la calidad nutricional de la dieta y afectando a la tasa de crecimiento, no por vía de la digestibilidad sino por los cambios en las características nutricionales. De hecho, los resultados obtenidos con el balance energético demuestran que la energía fisiológicamente útil para el mantenimiento del animal, E(B), fue afectada por el tipo de dieta. Un valor negativo de E(B) se obtuvo para pulpos alimentados con dieta ALG, mientras que para pulpos con GEL y CON se obtuvieron valores positivos (276 y 285 kJ kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, respectivamente). Es evidente que la dieta ALG no cubre con los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento del pulpo. Los valores positivos de E(B) para pulpos con dietas GEL y CON fueron similares pero la tasa de crecimiento y la energía producida fueron mayores en los alimentados con dieta CON que con GEL. Este hecho sugiere que aunque GEL y CON pueden cubrir los requerimientos energéticos de mantenimiento, las características nutricionales de las dietas afectan, de forma diferente, al uso de la energía para la producción de biomasa. En el caso de la dieta GEL es evidente que, aunque fue bien aceptada por los animales, ellos invierten gran cantidad de energía para el metabolismo respiratorio (68,5 %) reduciéndose la energía disponible para producción de biomasa. Esta respuesta es típica cuando los organismos son alimentados con dietas que no cubren los requerimientos nutricionales, aunque sí puedan con los requerimientos basales de mantenimiento. Hasta la fecha, la mayoría de las dietas experimentales en el cultivo de cefalópodos tan sólo han conseguido tasas de crecimiento mínimas demostrando la utilización de dicha respuesta energética por parte de los animales.

Los resultados obtenidos con el balance energético sugieren que el principal problema de las dietas preparadas con alginato como aglutinante está relacionado con su digestibilidad. Sólo el 40 % de la energía ingerida fue absorbida por los pulpos con dieta ALG, lo que podría indicar que al menos otro 40 % de energía se perdió en las heces. Anteriores trabajos con *O. maya* mostraron que los cefalópodos podrían tener alguna limitación para digerir el alginato por la ausencia de fosfatasa (EC 3.1.3) (Rosas *et al.*, 2008). En este trabajo, los resultados sugieren que *O. vulgaris* podría tener la misma limitación digestiva. El hecho de que los valores de E(B) y eficiencia de absorción sean similares entre animales con dietas GEL y CON indican que las diferencias entre tasas de crecimiento y producción de energía podrían estar más relacionadas con el contenido

nutricional de la dieta que con la capacidad digestiva de los pulpos. Respecto al balance de energía parcial, el efecto del tipo de dieta sobre la asimilación pudo ser observado con el cálculo de la Energía de asimilación ( $As = R + P$ ). En este trabajo, se obtuvieron valores de 821, 981 y 1055  $\text{kJ kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  para animales alimentados con ALG, GEL y CON respectivamente. La proporción de energía asimilada ( $As$ ) que fue transformada a producción ( $P$ ) ( $P/As$ , %) se vio afectada por el tipo de dieta, siendo mayor en pulpos con dieta CON (22,18 %) que con dieta GEL (1,14 %) y dieta ALG (-7,3 %), lo que indica que algunos ingredientes de las dietas experimentales podrían afectar al proceso de asimilación del alimento. Para explicar estas diferencias podría ser de ayuda el estudio de la proporción de aminoácidos o de las clases de ácidos grasos.

Aunque los lípidos normalmente representan menos de un 2 % del total en cefalópodos (Almansa *et al.*, 2006), su importancia es mucho mayor en la glándula digestiva. Este órgano contiene 4 ó 5 veces más lípidos y actividad lipasa que el manto (Moltschaniwskyj & Johnston, 2006) y juega un papel muy importante en la digestión y metabolismo de lípidos, con diversas funciones como la secreción de enzimas, la digestión y la absorción lipídica (Semmens *et al.*, 1995). Por el contrario, hay evidencias de que la GD no es utilizada como almacén o reserva de grasas (Moltschaniwskyj & Johnston, 2006; Fluckiger *et al.*, 2008), lo que le hace ser, en cefalópodos, un buen candidato para el estudio de diferentes dietas en cuanto a su composición lipídica.

La concentración absoluta de casi todos los ácidos grasos, conseguidas en este trabajo, fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en la GD de animales alimentados con dieta CON, comparados con los de dietas artificiales (Tabla 4.7). Esto puede deberse a las grandes cantidades de lípidos, casi 4 veces más, que posee la GD de pulpos de dieta CON respecto a los pulpos alimentados con dietas artificiales. Para el manto, se dan algunas diferencias entre AG al comparar datos cualitativos (Tabla 4.4) y cuantitativos (Tabla 4.5), principalmente en saturados, *n*-6 y ARA.

Los ácidos grasos más abundantes, tanto en contenido como en % de AG totales, en el manto de los pulpos alimentados con cada dieta (CON, GEL, ALG) fueron: ácido palmítico (16:0), EPA (20:5 *n*-3) y DHA (22:6 *n*-3). Estos datos también han sido obtenidos para *Sepia officinalis* (Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou, 1998; Zlatanov *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010) *Eledone moschata* (Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou, 1998), *O. vulgaris* (Miliou *et al.*, 2006; Zlatanov *et al.*, 2006), *Todarodes sagittatus* (Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou, 1998) y *Loligo vulgaris* (Zlatanov *et al.*, 2006). De manera parecida, y de

acuerdo a Ferreira *et al.* (2010), estos tres ácidos grasos son los más abundantes en la glándula digestiva.

El manto de sepia o choco alimentado con dietas artificiales no mostró diferencias (en contenido) entre monoinsaturados, saturados y PUFA, comparado con los alimentados con dietas naturales (Ferreira *et al.*, 2010). Dicho patrón fue distinto en este trabajo para monoinsaturados y saturados de *O. vulgaris*, ya que los alimentados con dieta ALG (que promovieron crecimiento negativo) presentaron concentraciones más bajas de estos grupos de AG (Tabla 4.5). La GD de sepia alimentada con dietas artificiales mostró bajos contenidos de saturados, monoinsaturados y PUFA, en comparación con la GD de chocos con dietas naturales (Ferreira *et al.*, 2010), y este patrón sí fue confirmado en este estudio para GD de *O. vulgaris* (Tabla 4.7). Las especies marinas usan los monoinsaturados como sustratos energéticos (Sargent *et al.*, 1995) mientras que los cefalópodos presentan un metabolismo proteico (Domingues, 1999), lo que podría explicar la baja concentración de estos ácidos grasos en la composición del manto (< 12 %) y la GD de sepia (22 – 33 % de AG total) (Ferreira *et al.*, 2010) y en el manto (10 – 13 %; Tabla 4.4) y GD (< 25 %; Tabla 4.6) de los pulpos con dieta CON de este trabajo.

La proporción DHA/ EPA varió entre 1,4 y 1,6 en el manto, siendo mayor para animales alimentados con dieta ALG, donde el crecimiento fue negativo, lo que podría indicar una mayor utilización de EPA por parte de estos pulpos, los cuales estuvieron en peores condiciones por la alimentación con una dieta deficiente. La proporción DHA/EPA es similar a las obtenidas para manto de *O. vulgaris* por Zlatanov *et al.* (2006) (1,5), Miliou *et al.* (2006) (entre 1,5 y 1,9), y por Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou (1998) (1,5). En este estudio se confirma que los pulpos alimentados con dietas deficientes utilizan principalmente HUFA *n*-3, como EPA y DHA. De hecho, HUFA *n*-3 representa cerca de un 50 % del total de ácidos grasos de la glándula digestiva de animales alimentados con la dieta control, mientras que sólo un 30 % aparece en GD de pulpos con dietas artificiales.

Según Miliou *et al.* (2006) el aumento en concentración de ARA está relacionado con el crecimiento del manto de *O. vulgaris*, pero los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que no hay diferencias en concentración absoluta de ARA entre dietas (Tabla 4.5), e incluso un patrón inverso en % de AG totales, donde los pulpos con mayores tasas de crecimiento presentaban menor cantidad de ARA frente a los que sus tasas de crecimiento fueron menores (Tabla 4.4).

La proporción DHA/ EPA varió entre 1,8 y 2,1 para GD de *O. vulgaris* en este estudio (Tabla 4.6), siendo parecida entre la dieta natural y las artificiales, lo que puede ser explicado por la disminución simultánea de los dos ácidos grasos en GD de los animales alimentados con las dietas artificiales. No hemos encontrado información en la bibliografía consultada sobre efectos alimenticios de DHA/ EPA para *O. vulgaris*. Sin embargo, Fluckiger *et al.* (2008) obtuvo bajas proporciones de DHA/ EPA en la GD de *S. officinalis* alimentada con crustáceos (entre 0,3 y 0,6) o con pescado (entre 1,5 y 1,8). Ferreira *et al.* (2010) también indica bajas proporciones para GD de *S. officinalis*, con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los alimentados con crustáceos (0,2 a 0,5) y dietas artificiales (0,9 a 1,0).

De manera interesante, los ratios EPA/ ARA y DHA/ ARA en la GD mostraron una fuerte disminución relacionada con las tasas de crecimiento. Así pues, estas ratios parecen ser apropiados para entender el crecimiento y condición de los pulpos. Al contrario que DHA/ EPA, que no varía en GD con el crecimiento del pulpo.

Es destacable que la composición de ácidos grasos del manto de pulpos alimentados con todas las dietas fue parecida, según el análisis de componentes principales (Figura 4.5). Esta observación también aparece en el estudio de Ferreira *et al.* (2010), donde no se encontraron diferencias en la composición de ácidos grasos del manto de sepia cuando fue alimentada con distintas dietas, incluso si éstas dieron lugar a crecimiento negativo.

#### 4.6. Conclusión

Las conclusiones generales de este trabajo son las siguientes:

a) Aunque ninguna dieta artificial dio lugar a crecimiento satisfactorio, la gelatina parece ser un aglutinante adecuado en la elaboración de dietas para pulpo. La aceptación fue buena, y el crecimiento comparable al obtenido por otros autores usando mayores porcentajes de alimentos naturales, como pescado o calamar, en la elaboración de las dietas artificiales.

b) El menor crecimiento obtenido con las dietas artificiales fue reflejado en el contenido total de lípidos de la glándula digestiva y, consecuentemente, en el contenido de ácidos grasos en este órgano.

c) La composición similar de ácidos grasos del manto de pulpos alimentados con todas las dietas puede explicarse por la gran estabilidad metabólica de este órgano. Incluso en periodos de ayuno o de alimentación con dietas deficientes, los ácidos grasos no son extraídos fácilmente del manto.

d) Los pulpos alimentados con dieta ALG, y que perdieron peso, tuvieron una composición lipídica en la GD similar a la de su manto y a la del manto de pulpos alimentados con otras dietas. Esto confirma que los animales alimentados con dieta ALG estuvieron en peores condiciones nutricionales.

e) La dieta no afecta a la composición de ácidos grasos del manto, pero sí a la de glándula digestiva, principalmente en pulpos alimentados con dieta ALG.

f) La mayoría de los ácidos grasos más importantes, como HUFA *n*-3, EPA y DHA, disminuyen en la GD de los pulpos alimentados con dietas artificiales, lo que indica que las condiciones de alimentación fueron peores que las de pulpos con dieta CON.

g) Se observaron diferencias en el balance energético entre dietas, indicando que la dieta GEL fue digerida adecuadamente. Por tanto, lo que probablemente no funcionó de esta dieta fueron las características nutricionales que afectan a la producción de biomasa, como la proporción de ácidos grasos o de aminoácidos.

#### 4.7. Agradecimientos

Los autores agradecen al Plan Nacional de Pulpo – JACUMAR – Proyecto “Engorde de pulpo *Octopus vulgaris*”, 2007/ 2009 y al Proyecto CONACYT – Básico 50118 (Carlos Rosas) del estado mexicano, por la financiación de esta investigación. Sandra García-Garrido también quiere expresar su agradecimiento al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la concesión de la beca predoctoral n° 47 (BOE n° 308 26/12/2006).



#### 4.8. Referencias bibliográficas

- Aguado-Giménez, F. & B. García-García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10: 361-377.
- Águila, J., G. Cuzon, C. Pascual, P. Domingues, G. Gaxiola, A. Sánchez, T. Maldonado & C. Rosas. 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: 641–655.
- Almansa E., P. Domingues, A. Sykes, N. Tejera, A. Lorenzo & J.P. Andrade. 2006. The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture*, 256: 403-413.
- Carrasco, J.L. & M.A. Hernán. 1993. Estadística multivariante en las ciencias de la vida. En: Editorial Ciencia 3, S.L. *Fundamentos, métodos y aplicación*, pp. 65-75. Madrid, España.
- Castro B.G. 1990. Can *Sepia officinalis* L. be reared on artificial food? *Marine Behavior & Physiology*, 19: 35-38.
- Castro, B.G., F.P. DiMarco, R.H. DeRusha & P.G. Lee. 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 & Ecology*, 170: 241-252.
- Castro B.G. & P.G. Lee. 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L (Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry & Physiology*, 109A: 1007-1016.
- Christie, W.W. 1982. *Lipids analysis, 2<sup>nd</sup> edition*. Oxford: Pergamon Press.
- Condrey, R.E., J.G. Gosselink & H.J. Bennet. 1972. Comparison of the assimilation of different diets by *Penaeus setiferus* and *Penaeus aztecus*. *Fishery Bulletin*, 70: 1281-1291.
- Domingues, P. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. Ph D. Thesis, University of the Algarve, Portugal, 95 p.
- Domingues, P.M., F.P. DiMarco, J.P. Andrade & P.G. Lee. 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 13: 423-440.
- Domingues P., V. Bettencourt & A. Guerra. 2006. Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie et Milieu*, 56: 109-120.
- Domingues, P., N. López, J. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola & C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatán octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13: 273-280.
- Domingues, P., A. Ferreira, L. Márquez, J. Andrade, N. López & C. Rosas. 2008. Growth, absorption and assimilation efficiency by mature cuttlefish (*Sepia officinalis*) fed with alternative and artificial diets. *Aquaculture International*, 16: 215-229.
- Domingues, P., L. Márquez, N. López & C. Rosas. 2009. Effects of food thermal treatment on growth, absorption and assimilation efficiency of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 17: 283-299.

- Ferreira, A., L. Márquez, E. Almansa, J. Andrade, A. Lorenzo & P. Domingues. 2010. The use of alternative diets to culture juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*: effects on growth and lipid composition. *Aquaculture Nutrition*, 16: 262-275.
- Fluckiger, M., G.D. Jackson, P. Nichols, P. Virtue, A. Daw & S. Wotherspoon. 2008. An experimental study of the effect of diet on the fatty acid profiles of the European Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Marine Biology*, 154: 363-372.
- Gatellier, P. & V. Santé-Lhoutellier. 2009. Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor. *Meat Science*, 81, 405-409.
- Horwitz, W. 1980. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13<sup>th</sup> edition*. Washington DC, USA.
- Iglesias J., L. Fuentes, J. Sánchez, J.J. Otero, C. Moxica & M.J. Lago. 2006. First feeding of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) paralarvae using *Artemia*: effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261: 817-822.
- Lucas, A. 1993. *Bioénergétique Des Animaux Aquatiques*. Masson, Paris.
- Mayzaud, P. & R.J. Conover. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 45: 289-302.
- Miliou, H., M. Fintikaki, M. Tzitzinakis, T. Kountouris & G. Verriopoulos. 2006. Fatty acid composition of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to rearing temperature and body weight. *Aquaculture*, 256: 311-322.
- Moltschaniwskyj, N. & D. Johnston. 2006. Evidence that lipid can be digested by the dumpling squid *Euprymna tasmanica*, but is not stored in the digestive gland. *Marine Biology*, 149: 565-572.
- Quintana, D., P. Domingues & S. García. 2008. Effects of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*, 280: 161-164.
- Rosas, C., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, D. Chay, N. López, T. Maldonado & P.M. Domingues. 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, 152: 371-381.
- Rosas, C., J. Tut, J. Baeza, A. Sánchez, V. Sosa, C. Pascual, L. Arena, P. Domingues & G. Cuzon. 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, 275: 291-297.
- Santé-Lhoutellier, V., T. Astruct, P. Marinova, E. Greve & P. Gatellier. 2008. Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 56: 1488-1494.
- Sargent, J.R., J.G. Bell, R.J. Henderson & D.R. Tocher. 1995. Origins and functions of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. In: Ceve G. & F. Paltauf (Eds.) *Phospholipids: Characterization, Metabolism and Novel Biochemical applications*, 248-259 pp. Champaign, IL: American Oil Chemical Society Press.
- Semmens, J.M., N.A. Moltschaniwskyj & C.G. Alexander. 1995. Effect of feeding on the digestive gland of the tropical sepioid *Idiosepius pygmaeus*. *Journal of the Marine Biological (Ass. U.K.)*, 75: 885-897.

- Sinanoglou, V.J. & S. Miniadis-Meimaroglou. 1998. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Research International*, 31: 467-473.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4<sup>th</sup> edition, 663 p. Ryu T. (Ed.). Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ.
- Zlatanov, S., K. Laskaridis, C. Feist, A. Sagredos. 2006. Proximate composition, fatty acid analysis and protein digestibility-corrected amino acid score of three Mediterranean cephalopods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50: 967-970.

## COMPOSICIÓN LIPÍDICA EN MANTO Y GLÁNDULA DIGESTIVA DE JUVENILES DE *Octopus vulgaris* (CUVIER, 1797) EXPUESTOS A UN AYUNO PROLONGADO

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental están publicados en el artículo:

**García-Garrido S**, Hachero-Cruzado I, Garrido D, Rosas C, Domingues P (2010) *Lipid composition of the mantle and digestive gland of Octopus vulgaris juveniles (Cuvier, 1797) exposed to prolonged starvation*. *Aquaculture International* 18: 1223-1241. DOI 10.1007/s10499-010-9335-6.

### 5.1. Resumen

En el presente artículo se determinó la composición en lípidos del manto y glándula digestiva de pulpos *Octopus vulgaris* no alimentados durante 27 días. Cada 3 días, tres pulpos fueron sacrificados tomándose muestras de manto y glándula digestiva (GD) para determinar la cantidad en lípido total, clases lipídicas y ácidos grasos. La composición en lípido total (LT) en el manto fue similar hasta el día 21, luego disminuyó y se mantuvo constante hasta el final del experimento. La composición en lípidos totales de la GD disminuyó significativamente tras 3 días, luego se mantuvo constante hasta el día 21 para finalmente disminuir hasta el final del experimento. En cuanto a clases lipídicas, los componentes principales en la GD fueron triglicéridos y ésteres de esterol. Los ésteres de esterol sufrieron una fuerte reducción tras 10 días en ayuno, mientras la composición en triglicéridos fue similar hasta el día 21 y luego disminuyó hasta el final del experimento. El colesterol disminuyó gradualmente durante el período experimental. Para los lípidos polares, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina aumentaron durante los primeros 3 días y luego disminuyeron durante todo el experimento. En el manto, triglicéridos y ésteres de esterol fueron las únicas clases de lípidos neutros que decrecieron, mientras que ningún lípido polar disminuyó en este órgano. Fue destacable la disminución de casi todos los ácidos grasos tras 3 días de ayuno en la GD, sin observar diferencias en las concentraciones de ácidos grasos del manto durante todo el experimento.

**Palabras clave:** Ácidos grasos · Ayuno · Clases lipídicas · Glándula digestiva · Lípidos · Manto · *Octopus vulgaris*.

## 5.2. Introducción

*Octopus vulgaris* es una de las especies más prometedoras para la diversificación de la acuicultura. Presenta altas tasas de crecimiento (Aguado-Giménez & García-García, 2002; Iglesias *et al.*, 2006; 2007) y precios en el mercado (FAO, 2008), asociados con la gran demanda existente en muchas regiones del mundo. El pulpo común tiene una fase larvaria planctónica conocida como paralarva (Young & Harman, 1988) y que dura 33-40 días cuando se encuentra a una temperatura media de 24,7 °C (Itami *et al.*, 1963) antes de pasar a la fase bentónica juvenil. El engorde de *O. vulgaris* se realiza actualmente en Galicia, Norte de España (Iglesias *et al.*, 1997), pero con baja viabilidad debido a la dependencia de la captura de juveniles del medio natural y a la ausencia de una dieta artificial adecuada (Domingues *et al.*, 2010). Los principales cuellos de botella para la acuicultura comercial de esta especie son la alta mortalidad durante la fase paralarvaria del pulpo (Iglesias *et al.*, 2007) y la imposibilidad de obtener juveniles bentónicos a escala comercial en cautividad (Cerezo-Valverde *et al.*, 2008).

La investigación sobre la nutrición en cefalópodos comenzó a principios de los 80 (Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983; Boucaud-Camou *et al.*, 1985; DeRusha *et al.*, 1989). Una de las primeras especies estudiadas fue la sepia (*Sepia officinalis*). Inicialmente se usaron como dietas para cefalópodos pellets secos y húmedos (Castro, 1990; Lee *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 1993; Castro & Lee, 1994) o surimi, un concentrado de proteína miofibrilar de peces (Castro *et al.*, 1993; Castro & Lee, 1994; Domingues, 1999; Domingues *et al.*, 2005) pero con no buenos resultados (Castro *et al.*, 1993; Castro & Lee, 1994; Domingues *et al.*, 2005; 2006). En los últimos años se ha realizado un mayor esfuerzo para conseguir dietas artificiales en diversos cefalópodos, especialmente para *O. vulgaris* (Cerezo-Valverde *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008) y *Octopus maya* (Domingues *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007).

Existe un menor conocimiento, en comparación con peces, sobre la fisiología energética de cefalópodos como, por ejemplo, sobre las reservas energéticas durante periodos de inanición. Tait (1986) observó que tanto el manto como la glándula digestiva de *O. vulgaris* fueron los órganos que sufrieron los mayores cambios en cuanto a composición bioquímica tras un largo estado de ayuno. Investigaciones iniciales indicaron que varias especies de cefalópodos utilizan pequeñas cantidades de lípidos y/o carbohidratos durante el ayuno (Mommsen & Hochachka, 1981; O'Dor *et al.*, 1984; Boucher-Rodoni & Mangold, 1988; Segawa & Hanlon, 1988; Boucher-Rodoni, 1989) y se

basan en un metabolismo predominantemente proteico (Ballantyne *et al.*, 1981; Lee, 1994). Sin embargo, las mayores concentraciones de lípidos en cefalópodos se han encontrado en la glándula digestiva (Boucaud-Camou & Yim, 1980; Mangold, 1983; Moltschaniwskyj & Johnston, 2006), órgano activamente involucrado en la digestión de lípidos y su almacenamiento (Rosa *et al.*, 2005). Existen evidencias de que este órgano se usa como almacén de lípidos a corto plazo (Boucher-Rodoni *et al.*, 1987; Fluckiger *et al.*, 2008) y se considera como un buen indicador del estado nutricional del animal (García *et al.*, 2011). Además, la importancia de los lípidos en el metabolismo de cefalópodos se ha demostrado tanto en etapas tempranas del desarrollo (Navarro & Villanueva, 2000; 2003; Villanueva *et al.*, 2002) como en estado juvenil o adulto (Domingues *et al.*, 2003; Almansa *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011).

Debido a todo lo anterior, en este trabajo se ha determinado la composición en lípidos, clases lipídicas y ácidos grasos del manto y la glándula digestiva de pulpos mantenidos durante 27 días en ayuno. El objetivo ha sido poder definir cómo los lípidos son mantenidos, transformados y utilizados por el animal, en los dos órganos y bajo condiciones de inanición, y determinar la capacidad para usarlos como reservas nutricionales. Este estudio podría proporcionar información sobre las clases lipídicas y los ácidos grasos esenciales para *O. vulgaris*, comprender su importancia en el metabolismo y la nutrición del pulpo y ayudar al desarrollo de dietas preparadas eficientes para el engorde de esta especie.

### 5.3. Material y Métodos

#### Captura y aclimatación de los organismos

Pulpos juveniles fueron capturados mediante red de arrastre en la costa de Huelva (Sur de España), y transportados inmediatamente hasta las instalaciones del Centro de Cultivos Marinos IFAPA “Agua del Pino”, Cartaya, Huelva (España).

Los animales fueron aclimatados durante 2 semanas en un sistema con flujo de agua abierto, compuesto por 9 tanques de hormigón, con un volumen de 4,5 m<sup>3</sup> cada uno (3 m x 1 m x 1,5 m). Durante este tiempo, los pulpos se alimentaron con calamar (*Loligo gahi*) a una razón del 5 % pc d<sup>-1</sup> (porcentaje del peso corporal por día) (peso húmedo del alimento/ peso húmedo del animal), dos veces al día, a las 9:00 h y 15:00 h.

### Diseño experimental y protocolo de muestreo

Tras el periodo de aclimatación, un total de treinta pulpos ( $1618,3 \pm 175,5$  g; peso medio  $\pm$  desviación estándar) fueron distribuidos aleatoria e individualmente en un sistema de tanques cilindro-cónicos de 80 L de volumen cada uno, con un flujo de agua de  $30 \text{ L h}^{-1}$ , en circuito abierto. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el peso total inicial entre pulpos.

La temperatura del agua fue de  $20 \pm 1$  °C, la salinidad de  $36 \pm 1$  ppt y el pH de  $7,9 \pm 0,1$ . El flujo de agua fue ajustado en todos los tanques para mantener la concentración de oxígeno cercana a los niveles de saturación. En el experimento se utilizó el fotoperíodo natural presente en el Sur de España (14:10 h).

Cada 3 días, tres pulpos fueron sacrificados. El primer grupo de 3 pulpos sacrificados se usó como tratamiento control ya que estos animales fueron alimentados con calamar justo hasta el inicio del experimento y nunca se encontraron bajo condiciones de ayuno. Por ello, se consideró como día 0 del ensayo y, a partir de ese momento, no se suministró alimento al resto de los pulpos durante 27 días.

Para cada animal y en cada periodo de muestreo se registró el peso total (gramos de peso húmedo, g ph) y el peso de la glándula digestiva (g ph). Los pulpos fueron pesados vivos para calcular el peso total inicial y final. En cada periodo de muestreo, el peso de la GD se registró tras sacrificar a los pulpos, siendo anestesiados con hielo durante 2 minutos. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular en cada periodo de muestreo:

- a. Peso Perdido (PP):

$$PP = 100 - ((P_2 \times 100) / P_1) (\%)$$

Siendo:

- $P_1$  y  $P_2$ , peso húmedo inicial y final (g) de los pulpos, respectivamente.

- b. Índice de la Glándula Digestiva (IGD):

$$IGD = (PGD \times 100) / PT (\%)$$

Siendo:

- PGD, peso húmedo de la glándula digestiva (g) de los pulpos.
- PT, peso húmedo total (g) de los pulpos.

Se recogieron tres muestras (2 g cada una) del manto y de la GD de cada pulpo para determinar lípidos totales (LT), clases de lípidos (CL) y ácidos grasos (AG). Las muestras se tomaron de cada pulpo y se mezclaron con cloroformo/metanol (2:1 v/ v) para inmediatamente ser almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis lipídico.

Finalmente, el contenido en humedad fue determinado en muestras de 500 mg del manto y de la GD mediante el método de Horwitz (1980).

## **Determinaciones bioquímicas**

### Lípidos totales

Los LT fueron extraídos con cloroformo: metanol (2: 1 v/ v) más 0,01 % de hidroxitolueno butilado (BHT) (v/ v) como antioxidante (Christie, 1982). El solvente orgánico fue evaporado bajo una corriente de nitrógeno y el contenido en lípidos determinado por gravimetría.

### Clases lipídicas

La separación en CL se realizó mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC), de doble desarrollo y unidimensional. Se usó como solvente polar metil-acetato/ isopropanol/ cloroformo/ metanol/ cloruro de potasio (0,25 %, m/ v) (25:25:25:10:9 vol.), y como solvente para lípidos neutros hexano/ dietil-éter/ ácido acético glacial (80:20:2 vol.). Las CL resultantes se cuantificaron mediante carbonización con reactivo de acetato de cobre seguido de densitometría, usando CAMAG TLC Scanner 3 (Olsen & Henderson, 1989).

### Ácidos grasos

Los lípidos totales extraídos fueron sometidos a trans-metilación ácido-catalizada durante 16 h a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , usando 1 ml de tolueno y 2 ml de ácido sulfúrico al 1 % en metanol (v/ v). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos resultantes (FAME) fueron purificados mediante cromatografía de capa fina (TLC) y visualizados con 1 % de yodina en cloroformo: metanol (2:1 v/ v) 98 % (v/ v) con 0,01 % de BHT (v/ v) como antioxidante (Christie, 1982). Antes de llevar a cabo la trans-metilación, el ácido nonadecanoico (19:0)



fue añadido a la muestra de LT como estándar interno a una concentración de 1 mg/ ml (5% LT). Los FAME fueron separados y cuantificados en un equipo de cromatografía de gases (Shimadzu GC-2010) con detector de ionización de llama (250 °C) y una columna capilar de sílice fundida RTX-WAX™ (10 m x 0,1 mm I.D.). El helio se usó como gas portador, y la temperatura inicial del horno fue de 150 °C, seguida de un aumento a un ritmo de 90 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar una temperatura final de 250 °C a los 3 minutos. Los FAME fueron identificados individualmente basándose en unos patrones de referencia originales de aceite de pescado bien caracterizados (FAME Mix C4-C24 y Menhaden Oil, SUPELCO, USA).

#### Cuantificación: LT, CL y AG

El contenido en lípido total, lípidos neutros (LN), lípidos polares (LP) y clases lipídicas del manto y la GD de *O. vulgaris* en ayuno durante 27 días fue calculado en porcentaje de peso seco (% ps). Los ácidos grasos del total de lípidos del manto y la GD de *O. vulgaris* en ayuno durante 27 días se calculó en microgramos de ácido graso por miligramo de tejido, manto o GD, en peso seco ( $\mu\text{g AG mg}^{-1}$  ps).

Para la cuantificación en porcentaje e identificación de los ácidos grasos se usó el programa GC Solution (Versión 2.30.00 SU 4). Para el cálculo de los AG expresados en porcentaje se eliminó el porcentaje del estándar interno (19:0). Para el cálculo del contenido ( $\mu\text{g AG mg}^{-1}$  ps) en AG de los tejidos analizados se aplicó la ecuación:

$$\text{AG} = \frac{\text{SI} \times \% \text{AG} \times \text{LT}}{\% \text{SI}} \quad (\mu\text{g AG mg}^{-1} \text{ ps})$$

Siendo:

- AG, el ácido graso a cuantificar.
- SI, estándar interno añadido al lípido analizado ( $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$  LT).
- % AG, el porcentaje del ácido graso a cuantificar en contenido.
- LT, lípido total ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  ps)
- % SI, el porcentaje de estándar interno (ácido nonadecanoico, 19:0).

BHT, cloruro de potasio, bicarbonato de potasio y yodina fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Las placas de TLC (20 cm x 20 cm x 0,25 mm) se adquirieron de Macherey-Nagel (Düren, Alemania). La cubeta de fondo plano para placas 10 x 10 cm (con tapa de acero inoxidable) fue adquirida de Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los solventes orgánicos usados en cromatografía de gases fueron reactivos de calidad adquiridos de Panreac (Barcelona, España).

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se presentan como valor medio de 3 replicados  $\pm$  desviación estándar (DE). Todos los datos fueron analizados verificando la normalidad de la distribución mediante la prueba no paramétrica Kolmogórov-Sminov. Para verificar la homogeneidad de varianzas se utilizó el test de Levene y, cuando fue necesario, se realizó la transformación arcsen siendo ésta aplicada directamente en el caso de expresar los datos como porcentaje (Fowler *et al.*, 1998).

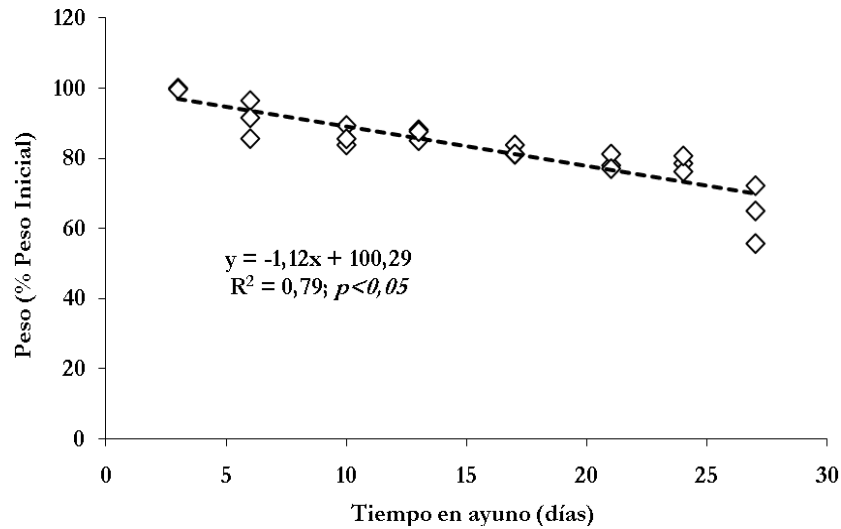
Durante el periodo de ayuno, los cambios en el IGD se analizaron mediante una técnica de correlación parcial. Cuando la normalidad y/ o la homogeneidad de varianzas no se verificaron, los datos fueron tratados mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ANOVA de una vía) (Zar, 1999). Las diferencias, entre los días de muestreo, en composición lipídica del manto y la glándula digestiva se analizaron mediante ANOVA de una vía. Cuando se encontraron diferencias se aplicó la prueba de Tukey de comparación múltiple. Para el estudio del PP total, las variaciones en el contenido en agua del manto y la glándula digestiva, y el IGD, se trabajó con regresiones polinómicas de tercer grado ( $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ ; Zar, 1999).

Todos los ensayos estadísticos se llevaron a cabo con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI. En cada prueba estadística se consideró un nivel de confianza del 95 %.

### **5.4. Resultados**

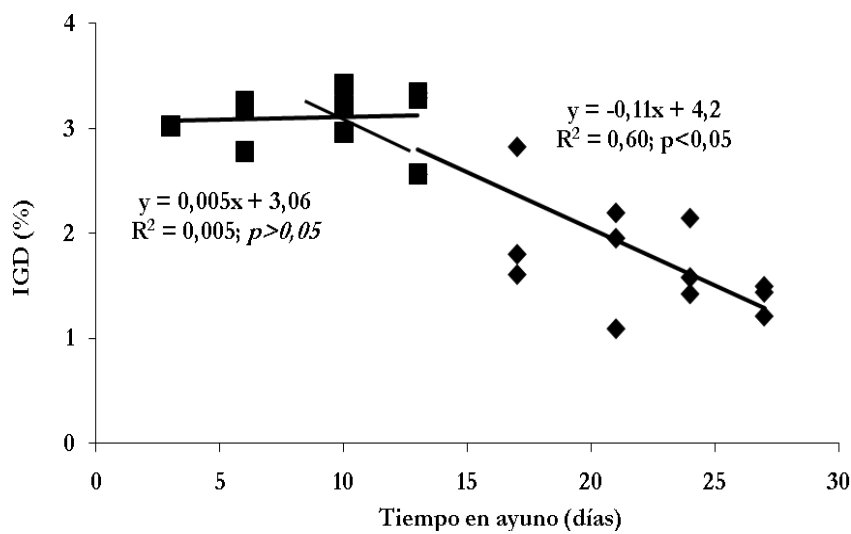
Se registró una reducción proporcional en el peso total de *O. vulgaris* de acuerdo al tiempo transcurrido en estado de ayuno. Al final del experimento y tras 27 días en ayuno, *O. vulgaris* perdió el 35 % de su peso total ( $p < 0,05$ ; Figura 5.1).

Al final del experimento, la mortalidad registrada en los treinta pulpos utilizados fue del 10 %. Los 3 pulpos que murieron lo hicieron los días 16, 20 y 23 del periodo de ayuno.



**Figura 5.1** Cambios en el peso total de *Octopus vulgaris* durante el periodo de ayuno (días). El peso final viene dado como porcentaje del peso inicial del animal (% Peso Inicial).

La Tabla 5.1 muestra el peso de los pulpos y de la glándula digestiva en gramos de peso húmedo (g ph), el PP por los pulpos y la GD en porcentaje (%), y el IGD (%) durante el experimento. Tras 27 días de ayuno, los pulpos perdieron sobre un 35 % de su peso total, y un 85 % del peso de la GD. El IGD mostró cambios significativos tras 3 días de ayuno ( $p < 0,05$ ; Tabla 5.1), disminuyendo durante los 27 días del periodo de ayuno y, de manera consistente, a partir del día 17 (Figura 5.2).



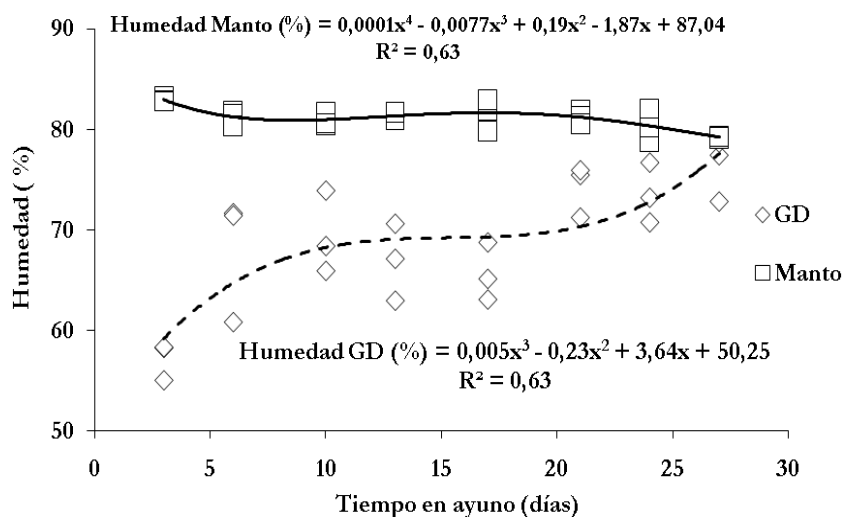
**Figura 5.2** Cambios en el índice de la glándula digestiva (IGD, %) durante el periodo de ayuno (días) de *Octopus vulgaris*.

**Tabla 5.1** Peso total de los pulpos (P Pulpo, gr), Peso de la glándula digestiva (P GD, gr), Peso perdido por los pulpos (PP Pulpo, %) y por la GD (PP GD, %), y el Índice de la Glándula digestiva (IGD, %) durante los 27 días de ayuno a los que se sometió *O. vulgaris* en el experimento.

Ayuno (días)	0	3	6	10	13	17	21	24	27
<b>Pulpo</b>									
P (gr)	1386,7±141,8 <sup>ab</sup>	1664,0±36,8 <sup>a</sup>	1568,7±104,9 <sup>ab</sup>	1469,0±276,3 <sup>ab</sup>	1266,7±116,1 <sup>ab</sup>	1256,3±221,0 <sup>ab</sup>	1176,0±88,6 <sup>c</sup>	1242,7±124,4 <sup>ab</sup>	1062,0±177,5 <sup>d</sup>
PP (%)		0,2 ± 0,3	8,8 ± 5,4	13,8 ± 2,8	13,1 ± 1,7	18,0 ± 1,5	21,3 ± 2,2	21,5 ± 2,2	35,7 ± 8,3
<b>GD</b>									
P (gr)	104,3 ± 21,6 <sup>a</sup>	68,6 ± 24,8 <sup>b</sup>	48,2 ± 6,0 <sup>bc</sup>	47,4 ± 11,6 <sup>bc</sup>	38,8 ± 6,6 <sup>bc</sup>	27,1 ± 13,6 <sup>c</sup>	20,4 ± 6,3 <sup>c</sup>	21,2 ± 3,7 <sup>c</sup>	14,9 ± 3,9 <sup>c</sup>
PP (%)		34,2 ± 23,7	53,7 ± 5,7	54,6 ± 11,1	62,8 ± 6,3	74,0 ± 13,0	80,4 ± 6,0	79,7 ± 3,5	85,8 ± 3,7
<b>IGD (%)</b>	7,7 ± 2,2 <sup>a</sup>	4,1 ± 1,1 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>bc</sup>	3,2 ± 0,2 <sup>bc</sup>	3,1 ± 0,4 <sup>bc</sup>	2,1 ± 0,7 <sup>bc</sup>	1,7 ± 0,6 <sup>bc</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>bc</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>c</sup>

Los datos se muestran como valor medio (n=3) ± D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

La humedad del manto del pulpo fue similar durante todo el ensayo ( $\sim 80\%$  ph; Tabla 5.2). Por otra parte, la humedad de la GD aumentó al inicio del experimento ( $57,7\%$  ph), siendo significativamente mayor tras 27 días sin alimentación ( $76,3\%$  ph) ( $p < 0,05$ ; Tabla 5.3). Se obtuvo un modelo polinómico de tercer grado que representa los cambios en el contenido de agua tanto del manto como de la GD de los pulpos durante el periodo de ayuno (Figura 5.3). Según este modelo, puede observarse como la humedad del manto y de la GD cambian al principio del ensayo. Después, existe un periodo de estabilidad entre los días 10 y 17 tras el que el ayuno provoca una reducción del contenido en agua del manto mientras la humedad de la GD aumenta (Figura 5.3).



**Figura 5.3** Variación del contenido de humedad en la glándula digestiva (GD) y el manto de *Octopus vulgaris* durante el periodo de ayuno (días).

### Lípidos Totales y Clases Lipídicas

La cantidad de LT del manto fue diferente ( $p < 0,05$ ) a los 21 días de ayuno, disminuyendo de  $5,24\%$  ps al inicio hasta  $3,31\%$  ps al final del experimento ( $p < 0,05$ ; Tabla 5.2). El total de lípidos neutros (LNT) del manto disminuyó gradualmente y su cantidad fue mucho menor ( $p < 0,05$ ) a los 17 días de ayuno. El total de lípidos polares (LPT) del manto sólo disminuyó a partir del día 21, pero a los 27 días de ayuno su cantidad no fue significativamente distinta ( $p > 0,05$ ) a la del control, al inicio del ensayo (Tabla 5.2). Ninguna clase lipídica del manto fue menor de manera significativa tras 27 días de ayuno, comparado con el control ( $p > 0,05$ ; Tabla 5.2).

**Tabla 5.2** Humedad, Lípidos totales, Lípidos neutros, Lípidos polares y Clases lipídicas del manto de *O. vulgaris* durante 27 días en ayuno.

Ayuno (días)	0	3	6	10	13	17	21	24	27
<b>Clases Lipídicas - Manto (% PS)</b>									
<b>EM</b>	0,04 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01
<b>FC</b>	0,87 ± 0,30 <sup>ab</sup>	0,86 ± 0,19 <sup>ab</sup>	1,05 ± 0,02	1,12 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,89 ± 0,18 <sup>ab</sup>	0,62 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,53 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,04 <sup>ab</sup>
<b>FS</b>	0,42 ± 0,18	0,39 ± 0,09	0,42 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,06	0,37 ± 0,02	0,47 ± 0,09	0,33 ± 0,10	0,25 ± 0,05	0,37 ± 0,04
<b>FI</b>	0,20 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,13 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,17 ± 0,13	0,22 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,13 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,09 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,03 <sup>ab</sup>
<b>FE</b>	0,78 ± 0,24 <sup>ab</sup>	0,69 ± 0,15 <sup>ab</sup>	0,78 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,83 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,78 ± 0,15 <sup>ab</sup>	0,52 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,43 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,04 <sup>ab</sup>
<b>DAG</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,16 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>CT</b>	0,79 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,85 ± 0,17 <sup>ab</sup>	0,93 ± 0,00	0,97 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,55 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,72 ± 0,11 <sup>ab</sup>
<b>AGL</b>	0,03 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,03 ± 0,15 <sup>ab</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,02 <sup>ab</sup>
<b>TG</b>	0,90 ± 0,25	0,66 ± 0,63	0,50 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,32 ± 0,26	0,74 ± 0,35	0,33 ± 0,27	0,28 ± 0,11	0,15 ± 0,11	0,15 ± 0,12
<b>EE</b>	1,21 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,42 <sup>ab</sup>	0,65 ± 0,48	0,40 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,37 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,20 <sup>ab</sup>
<b>NC</b>	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,05	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,01
<b>LT</b>	5,24 ± 0,71 <sup>a</sup>	4,26 ± 1,47 <sup>ab</sup>	4,59 ± 0,03	4,36 ± 0,31 <sup>ab</sup>	4,17 ± 0,86 <sup>ab</sup>	4,10 ± 1,01 <sup>ab</sup>	2,99 ± 0,50 <sup>b</sup>	2,46 ± 0,26 <sup>b</sup>	3,31 ± 0,53 <sup>b</sup>
<b>LNT</b>	2,93 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,14 ± 1,18 <sup>ab</sup>	2,11 ± 0,72 <sup>ab</sup>	1,70 ± 0,16 <sup>bc</sup>	2,19 ± 0,69 <sup>ab</sup>	1,74 ± 0,55 <sup>bc</sup>	1,34 ± 0,23 <sup>bc</sup>	1,11 ± 0,13 <sup>c</sup>	1,48 ± 0,36 <sup>bc</sup>
<b>LPT</b>	2,30 ± 0,86 <sup>ab</sup>	2,11 ± 0,49 <sup>ab</sup>	2,47 ± 0,56 <sup>ab</sup>	2,66 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,20 <sup>abc</sup>	2,33 ± 0,47 <sup>ab</sup>	1,59 ± 0,36 <sup>bc</sup>	1,31 ± 0,28 <sup>c</sup>	1,76 ± 0,16 <sup>abc</sup>
<b>Humedad (%)</b>	80,07 ± 0,87	82,51 ± 2,08	82,45 ± 0,92	82,31 ± 0,97	81,84 ± 0,43	81,11 ± 0,55	82,53 ± 0,11	81,04 ± 1,69	80,07 ± 0,85

Los datos se muestran como valor medio (n=3) ± D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

EM, esfingomielina; FC, fosfatidilcolina; FS, fosfatidilserina; FI, fosfatidilinositol; FE, fosfatidiletanolamina; DAG, diacilglicerol; CT, colesterol; AGL, ácidos grasos libres; TG, triglicéridos; EE, ésteres de esterol; NC, no conocido; LT, lípidos totales; LNT, lípidos neutros totales; LPT, lípidos polares totales.

**Tabla 5.3** Humedad, Lípidos totales, Lípidos neutros, Lípidos polares y Clases lipídicas de la glándula digestiva de *O. vulgaris* durante 27 días en ayuno.

Ayuno (días)	0		3		6		10		13		17		21		24		27	
<b>Clases Lipídicas - Glándula Digestiva (% PS)</b>																		
<b>EM</b>	0,03	± 0,06	0,48	± 0,09	0,00	± 0,00	0,02	± 0,04	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,03	± 0,05	0,00	± 0,00
<b>FC</b>	1,57	± 0,26 <sup>b</sup>	5,06	± 1,45 <sup>a</sup>	1,75	± 0,27 <sup>b</sup>	1,64	± 0,46 <sup>b</sup>	1,45	± 0,13 <sup>b</sup>	1,62	± 0,22 <sup>b</sup>	1,74	± 0,98 <sup>b</sup>	1,35	± 0,21 <sup>b</sup>	1,07	± 0,07 <sup>b</sup>
<b>FS</b>	0,58	± 0,06 <sup>c</sup>	1,14	± 0,36 <sup>a</sup>	0,88	± 0,25 <sup>abc</sup>	0,98	± 0,32 <sup>ab</sup>	0,61	± 0,09 <sup>bc</sup>	0,64	± 0,15 <sup>bc</sup>	1,07	± 0,38 <sup>a</sup>	0,82	± 0,07 <sup>abc</sup>	0,72	± 0,11 <sup>abc</sup>
<b>FI</b>	0,22	± 0,03	1,50	± 0,37	0,33	± 0,07	0,33	± 0,09	0,22	± 0,04	0,26	± 0,05	0,34	± 0,14	0,29	± 0,03	0,22	± 0,02
<b>FE</b>	1,21	± 0,17 <sup>b</sup>	3,33	± 0,79 <sup>a</sup>	1,65	± 0,32 <sup>b</sup>	1,53	± 0,34 <sup>b</sup>	1,17	± 0,16 <sup>b</sup>	1,22	± 0,21 <sup>b</sup>	1,62	± 0,78 <sup>b</sup>	1,28	± 0,27 <sup>b</sup>	0,90	± 0,07 <sup>b</sup>
<b>DAG</b>	0,49	± 0,20	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
<b>CT</b>	3,04	± 0,61	3,83	± 1,05	4,17	± 1,09	3,44	± 1,02	5,31	± 0,31	5,34	± 0,26	3,56	± 3,12	3,29	± 1,64	1,41	± 0,16
<b>AGL</b>	0,52	± 0,24 <sup>bc</sup>	0,42	± 0,09 <sup>c</sup>	0,55	± 0,15 <sup>bc</sup>	0,57	± 0,24 <sup>bc</sup>	0,82	± 0,09 <sup>ab</sup>	1,02	± 0,27 <sup>a</sup>	0,31	± 0,26 <sup>c</sup>	0,29	± 0,14 <sup>c</sup>	0,25	± 0,13 <sup>c</sup>
<b>TG</b>	14,65	± 3,46 <sup>a</sup>	6,81	± 1,97 <sup>bc</sup>	11,62	± 4,18 <sup>ab</sup>	10,77	± 4,23 <sup>ab</sup>	15,89	± 2,15 <sup>a</sup>	16,59	± 3,10 <sup>a</sup>	6,21	± 7,40 <sup>bc</sup>	6,09	± 3,59 <sup>bc</sup>	2,54	± 1,32 <sup>c</sup>
<b>EE</b>	13,13	± 2,73 <sup>a</sup>	6,30	± 1,29 <sup>c</sup>	7,15	± 3,77 <sup>bc</sup>	5,65	± 2,04 <sup>cd</sup>	11,64	± 0,98 <sup>ab</sup>	7,49	± 1,87 <sup>bc</sup>	4,62	± 4,65 <sup>cd</sup>	3,05	± 1,67 <sup>cd</sup>	1,45	± 0,55 <sup>d</sup>
<b>NC</b>	0,44	± 0,12	0,64	± 0,07	0,02	± 0,04	0,32	± 0,56	0,99	± 0,03	1,63	± 0,65	1,16	± 1,17	0,62	± 0,65	0,28	± 0,12
<b>LT</b>	35,88	± 7,64 <sup>a</sup>	29,61	± 4,55 <sup>ab</sup>	28,13	± 8,43 <sup>ab</sup>	25,27	± 8,35 <sup>ab</sup>	38,15	± 1,76 <sup>a</sup>	35,97	± 1,05 <sup>a</sup>	20,77	± 18,69 <sup>ab</sup>	17,17	± 7,85 <sup>ab</sup>	8,91	± 2,11 <sup>b</sup>
<b>LNT</b>	31,83	± 7,11 <sup>a</sup>	17,36	± 1,52 <sup>ab</sup>	23,48	± 9,11 <sup>ab</sup>	20,43	± 7,33 <sup>ab</sup>	33,66	± 2,04 <sup>a</sup>	30,44	± 1,84 <sup>a</sup>	14,70	± 15,25 <sup>ab</sup>	12,72	± 7,04 <sup>ab</sup>	5,73	± 2,03 <sup>b</sup>
<b>LPT</b>	3,61	± 0,54 <sup>b</sup>	11,60	± 3,11 <sup>a</sup>	4,63	± 0,93 <sup>b</sup>	4,52	± 1,22 <sup>b</sup>	3,50	± 0,37 <sup>b</sup>	3,89	± 0,63 <sup>b</sup>	4,91	± 2,37 <sup>b</sup>	3,84	± 0,63 <sup>b</sup>	2,98	± 0,22 <sup>b</sup>
<b>Humedad (%)</b>	57,66	± 2,29 <sup>a</sup>	59,82	± 2,18 <sup>a</sup>	66,87	± 9,11 <sup>ab</sup>	69,01	± 4,01 <sup>ab</sup>	66,50	± 0,93 <sup>ac</sup>	65,93	± 2,45 <sup>ac</sup>	78,60	± 3,09 <sup>b</sup>	74,47	± 3,31 <sup>bc</sup>	76,30	± 1,80 <sup>bc</sup>

Los datos se muestran como valor medio (n=3) ± D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

EM, esfingomielina; FC, fosfatidilcolina; FS, fosfatidilserina; FI, fosfatidilinositol; FE, fosfatidiletanolamina; DAG, diacilglicerol; CT, colesterol; AGL, ácidos grasos libres; TG, triglicéridos; EE, ésteres de esterol; NC, no conocido; LT, lípidos totales; LNT, lípidos neutros totales; LPT, lípidos polares totales.

La cantidad de LT de la GD disminuyó considerablemente de 36,5 % ps a 9,4 % ps durante 27 días de ayuno siendo diferente de forma significativa tan sólo a los 27 días ( $p < 0,05$ ; Tabla 5.3). La cantidad LNT de la GD fue sólo menor ( $p < 0,05$ ) al control a los 27 días de ayuno, mientras que la de LPT mantuvo un nivel similar ( $p > 0,05$ ) durante todo el experimento excepto a los 3 días de ayuno, donde se observa un importante aumento de LPT y de todas las clases lipídicas (Tabla 5.3). Para lípidos neutros, sólo triglicéridos (TG) y ésteres de esteroles (EE) presentaron un valor menor a los 27 días comparados con el control (Tabla 5.3). Es interesante destacar que si no consideramos el primer periodo de muestreo, la proporción de TG se mantiene hasta el día 21, a partir del cual disminuye; los EE, por el contrario, decrecen desde el principio del experimento (Tabla 5.3).

### Ácidos Grasos

En general, los AG del manto permanecen estables durante todo el periodo de ayuno (Tabla 5.4). La composición sólo fue menor en el día 17 del ayuno para el ácido pentadecanoico (15:0), el ácido palmitoleico (16:1 *n*-7), el ácido docosapentanoico (22:5 *n*-3), el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6 *n*-3), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácidos grasos omega 3 (*n*-3) y ácidos grasos altamente insaturados omega 3 (HUFA *n*-3). El ácido araquidónico (ARA, 20:4 *n*-6), el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 *n*-3) y el DHA, así como la ratio DHA/ EPA se mantienen sin cambios durante todo el experimento (Tabla 5.4).

En la GD, la mayoría de los AG mantienen valores estables hasta el día 17 de ayuno (Tabla 5.5). A partir de este momento, la concentración de muchos AG disminuye. Así, saturados, monoinsaturados y PUFA decrecen tras 17 días de ayuno. Sólo dos AG, ácido docosenoico (22:1 *n*-9) y 22:5 *n*-3, disminuyen de manera significativa tras tres días en ayuno ( $p < 0,05$ ; Tabla 5.5). La concentración del ARA permanece sin cambios durante todo el experimento, el DHA disminuye de forma gradual aunque su concentración es diferente ( $p < 0,05$ ) sólo a partir del día 27 del ayuno, y el EPA disminuye considerablemente tras 17 días de ayuno. Las concentraciones de HUFA *n*-3, ácidos grasos omega 9 (*n*-9) y la ratio DHA/ ARA también disminuyen gradualmente y de manera significativa a partir del día 21 de ayuno ( $p < 0,05$ ; Tabla 5.5). Al igual que en el manto, la ratio DHA/ EPA de la GD se mantiene sin cambios durante todo el experimento (Tabla 5.5).



Tabla 5.4 Contenido en Ácidos Grasos ( $\mu\text{g AG mg}^{-1}$  ps) del manto de *O. vulgaris* durante 27 días en ayuno.

Ayuno (días)	0	3	6	10	13	17	21	24	27
<b>Ácidos Grasos – Manto (<math>\mu\text{g AG mg}^{-1}</math> ps)</b>									
<b>14:0</b>	0,29 ± 0,12	0,35 ± 0,12	0,33 ± 0,14	0,29 ± 0,03	0,33 ± 0,07	0,14 ± 0,06	0,19 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,14 ± 0,01
<b>15:0</b>	0,07 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,10 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>ab</sup>	<b>0,04 ± 0,02<sup>b</sup></b>	<b>0,06 ± 0,01<sup>b</sup></b>	0,06 ± 0,02 <sup>ab</sup>	<b>0,05 ± 0,01<sup>b</sup></b>
<b>15:1</b>	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,08	0,12 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,03 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,02
<b>16:0</b>	3,97 ± 1,70	4,20 ± 0,86	4,37 ± 0,67	4,24 ± 0,37	3,86 ± 0,10	2,20 ± 0,64	2,82 ± 0,66	2,54 ± 0,25	2,59 ± 0,27
<b>16:1 n-7</b>	0,18 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,30 ± 0,20 <sup>ab</sup>	0,37 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,02 <sup>ab</sup>	<b>0,10 ± 0,09<sup>b</sup></b>	0,17 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,14 ± 0,05 <sup>ab</sup>
<b>17:0</b>	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,07	0,26 ± 0,06	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,04
<b>16:4 n-1</b>	0,55 ± 0,14	0,57 ± 0,10	0,60 ± 0,10	0,69 ± 0,08	0,54 ± 0,03	0,39 ± 0,18	0,55 ± 0,14	0,49 ± 0,10	0,56 ± 0,07
<b>18:0</b>	1,18 ± 0,37	0,79 ± 0,15	0,99 ± 0,15	0,96 ± 0,04	0,86 ± 0,05	0,61 ± 0,26	0,84 ± 0,20	0,74 ± 0,15	0,91 ± 0,23
<b>18:1 n-9</b>	0,44 ± 0,17	0,41 ± 0,18	0,34 ± 0,11	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,17 ± 0,08	0,23 ± 0,05	0,21 ± 0,06	0,20 ± 0,02
<b>18:1 n-7</b>	0,28 ± 0,10	0,25 ± 0,07	0,30 ± 0,03	0,31 ± 0,15	0,25 ± 0,02	0,12 ± 0,05	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,11	0,19 ± 0,06
<b>18:1 n-5</b>	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
<b>18:2 n-6</b>	0,07 ± 0,02	0,17 ± 0,19	0,19 ± 0,09	0,23 ± 0,15	0,16 ± 0,04	0,08 ± 0,07	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,05
<b>20:1 n-9</b>	0,56 ± 0,20	0,53 ± 0,16	0,56 ± 0,10	0,53 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,29 ± 0,14	0,38 ± 0,12	0,37 ± 0,09	0,38 ± 0,04
<b>20:2 n-6</b>	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,17 ± 0,18	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,03
<b>20:4 n-6</b>	0,41 ± 0,06	0,29 ± 0,14	0,35 ± 0,08	0,37 ± 0,08	0,30 ± 0,07	0,17 ± 0,09	0,27 ± 0,04	0,32 ± 0,10	0,30 ± 0,06
<b>20:5 n-3</b>	2,37 ± 0,41	2,43 ± 0,49	2,88 ± 0,54	2,73 ± 0,77	2,70 ± 0,43	1,38 ± 0,58	1,68 ± 0,40	1,73 ± 0,23	1,72 ± 0,25
<b>22:1 n-9</b>	0,25 ± 0,11	0,18 ± 0,05	0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,13 ± 0,06	0,18 ± 0,06	0,18 ± 0,03	0,21 ± 0,01
<b>22:5 n-3</b>	0,13 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,11 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>ab</sup>	<b>0,07 ± 0,04<sup>b</sup></b>	0,11 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,11 ± 0,03 <sup>ab</sup>
<b>22:6 n-3</b>	3,22 ± 0,55 <sup>ab</sup>	3,47 ± 1,02 <sup>ab</sup>	4,53 ± 1,19 <sup>a</sup>	3,72 ± 0,90 <sup>ab</sup>	3,86 ± 0,69 <sup>ab</sup>	<b>1,79 ± 0,83<sup>b</sup></b>	2,31 ± 0,52 <sup>ab</sup>	2,73 ± 0,64 <sup>ab</sup>	2,57 ± 0,31 <sup>ab</sup>
<b>NC</b>	0,56 ± 0,06	1,17 ± 1,02	1,66 ± 0,59	1,34 ± 0,28	0,90 ± 0,23	0,46 ± 0,47	0,84 ± 0,08	0,85 ± 0,28	0,70 ± 0,23
<b>Totales</b>									
<b>Saturados</b>	5,70 ± 2,27	5,63 ± 1,17	6,09 ± 0,78	5,82 ± 0,45	5,32 ± 0,10	3,13 ± 0,99	4,07 ± 0,92	3,69 ± 0,47	3,87 ± 0,54

Tabla 5.4 continuación

Ayuno (días)	0	3	6	10	13	17	21	24	27
<b>Ácidos Grasos – Manto (<math>\mu\text{g AG mg}^{-1} \text{ps}</math>)</b>									
<b>Monoinsaturados</b>	1,92 $\pm$ 0,70	2,00 $\pm$ 0,74	2,16 $\pm$ 0,23	2,03 $\pm$ 0,33	1,85 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,50	1,35 $\pm$ 0,27	1,34 $\pm$ 0,25	1,32 $\pm$ 0,11
<b>PUFA</b>	7,19 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	7,42 $\pm$ 1,79 <sup>ab</sup>	9,09 $\pm$ 1,69 <sup>a</sup>	8,66 $\pm$ 2,43 <sup>a</sup>	8,04 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>	<b>4,11 <math>\pm</math> 1,76 <sup>b</sup></b>	5,37 $\pm$ 1,20 <sup>ab</sup>	5,70 $\pm$ 1,06 <sup>ab</sup>	5,61 $\pm$ 0,80 <sup>ab</sup>
<i>n-3</i>	5,91 $\pm$ 1,04 <sup>ab</sup>	6,19 $\pm$ 1,57 <sup>ab</sup>	7,77 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	6,96 $\pm$ 1,92 <sup>ab</sup>	6,83 $\pm$ 1,11 <sup>ab</sup>	<b>3,37 <math>\pm</math> 1,44 <sup>b</sup></b>	4,22 $\pm$ 0,98 <sup>ab</sup>	4,65 $\pm$ 0,88 <sup>ab</sup>	4,54 $\pm$ 0,64 <sup>ab</sup>
<i>n-6</i>	0,63 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,17	0,62 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,47	0,57 $\pm$ 0,07	0,30 $\pm$ 0,15	0,46 $\pm$ 0,09	0,47 $\pm$ 0,15	0,46 $\pm$ 0,11
<i>n-9</i>	1,24 $\pm$ 0,48	1,12 $\pm$ 0,37	1,12 $\pm$ 0,22	1,09 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,28	0,79 $\pm$ 0,22	0,76 $\pm$ 0,18	0,79 $\pm$ 0,06
<b><i>n-3</i>HUFA</b>	5,78 $\pm$ 0,99 <sup>ab</sup>	6,05 $\pm$ 1,53 <sup>ab</sup>	7,60 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	6,72 $\pm$ 1,77 <sup>ab</sup>	6,68 $\pm$ 1,12 <sup>ab</sup>	<b>3,28 <math>\pm</math> 1,39 <sup>b</sup></b>	4,14 $\pm$ 0,93 <sup>ab</sup>	4,57 $\pm$ 0,87 <sup>ab</sup>	4,41 $\pm$ 0,58 <sup>ab</sup>
<i>n-3/n-6</i>	9,66 $\pm$ 1,75	11,31 $\pm$ 2,31	12,61 $\pm$ 3,52	9,41 $\pm$ 2,73	12,04 $\pm$ 1,28	11,90 $\pm$ 2,46	9,10 $\pm$ 1,33	10,10 $\pm$ 1,60	10,14 $\pm$ 1,30
<b>DHA/EPA</b>	1,38 $\pm$ 0,03	1,41 $\pm$ 0,14	1,56 $\pm$ 0,18	1,38 $\pm$ 0,17	1,43 $\pm$ 0,09	1,28 $\pm$ 0,09	1,38 $\pm$ 0,04	1,57 $\pm$ 0,18	1,50 $\pm$ 0,04
<b>EPA/ARA</b>	5,94 $\pm$ 1,65	9,15 $\pm$ 2,28	8,40 $\pm$ 0,63	7,34 $\pm$ 1,13	9,34 $\pm$ 2,19	8,99 $\pm$ 1,84	6,12 $\pm$ 0,69	5,68 $\pm$ 1,18	5,79 $\pm$ 0,91
<b>DHA/ARA</b>	8,21 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	<b>12,68 <math>\pm</math> 2,13 <sup>bc</sup></b>	<b>13,04 <math>\pm</math> 0,62 <sup>b</sup></b>	10,03 $\pm$ 0,27 <sup>ab</sup>	<b>13,24 <math>\pm</math> 2,21 <sup>b</sup></b>	11,40 $\pm$ 1,81 <sup>ab</sup>	8,43 $\pm$ 0,80 <sup>ac</sup>	8,86 $\pm$ 1,78 <sup>ab</sup>	8,70 $\pm$ 1,56 <sup>ab</sup>
<b>Mon/HUFA <i>n-3</i></b>	0,33 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,11	0,30 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,02
<b>Mon/PUFA</b>	0,27 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,02
<b>Mon/Sat</b>	0,35 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,09	0,36 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,09	0,33 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,04
<b>18:1 <i>n-9</i>/HUFA <i>n-3</i></b>	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01

Los datos se muestran como valor medio ( $n=3$ )  $\pm$  D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ), y en negrita se presentan concentraciones diferentes a la del control.

PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados; DHA, ácido docosahexanoico (22:6 *n-3*); EPA, ácido eicosapentanoico (20:5 *n-3*); ARA, ácido araquidónico (20:4 *n-6*); Mon, ácidos grasos monoinsaturados; Sat, ácidos grasos saturados; NC, ácidos grasos no conocidos.

**Tabla 5.5** Contenido en Ácidos Grasos ( $\mu\text{g AG mg}^{-1}$  ps) de la glándula digestiva de *O. vulgaris* durante 27 días en ayuno.

Ayuno (días)	0	3	6	10	13	17	21	24	27
<b>Ácidos Grasos – Glándula Digestiva (<math>\mu\text{g AG mg}^{-1}</math> ps)</b>									
<b>14:0</b>	9,08 $\pm$ 1,80 <sup>a</sup>	6,11 $\pm$ 1,68 <sup>ab</sup>	5,08 $\pm$ 2,86 <sup>ab</sup>	<b>3,80 <math>\pm</math> 1,76 <sup>b</sup></b>	<b>3,44 <math>\pm</math> 2,16 <sup>b</sup></b>	5,29 $\pm$ 1,34 <sup>ab</sup>	<b>2,52 <math>\pm</math> 1,24 <sup>b</sup></b>	<b>1,91 <math>\pm</math> 1,05 <sup>b</sup></b>	<b>0,65 <math>\pm</math> 0,42 <sup>b</sup></b>
<b>15:0</b>	1,35 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	0,55 $\pm$ 0,49 <sup>ab</sup>	0,66 $\pm$ 0,31 <sup>ab</sup>	0,68 $\pm$ 0,47 <sup>ab</sup>	0,69 $\pm$ 0,37 <sup>ab</sup>	0,99 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>	0,60 $\pm$ 0,43 <sup>ab</sup>	0,44 $\pm$ 0,29 <sup>ab</sup>	<b>0,10 <math>\pm</math> 0,07 <sup>b</sup></b>
<b>15:1</b>	0,73 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 1,19	0,27 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,45	0,67 $\pm$ 0,20	1,04 $\pm$ 0,73	0,65 $\pm$ 0,57	0,51 $\pm$ 0,51	0,05 $\pm$ 0,03
<b>16:0</b>	48,70 $\pm$ 8,32 <sup>a</sup>	40,80 $\pm$ 9,45 <sup>ab</sup>	34,47 $\pm$ 15,24 <sup>ab</sup>	25,42 $\pm$ 4,78 <sup>abc</sup>	<b>20,56 <math>\pm</math> 13,85 <sup>bc</sup></b>	29,67 $\pm$ 9,43 <sup>abc</sup>	<b>17,95 <math>\pm</math> 5,83 <sup>bc</sup></b>	<b>11,91 <math>\pm</math> 4,71 <sup>c</sup></b>	<b>5,74 <math>\pm</math> 1,63 <sup>c</sup></b>
<b>16:1 n-7</b>	4,78 $\pm$ 1,28	2,44 $\pm$ 0,86	1,55 $\pm$ 1,31	1,78 $\pm$ 1,64	1,87 $\pm$ 0,70	2,71 $\pm$ 1,07	1,66 $\pm$ 1,15	1,14 $\pm$ 0,88	0,26 $\pm$ 0,13
<b>17:0</b>	1,37 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>	1,79 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	1,19 $\pm$ 0,78 <sup>ab</sup>	1,02 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>	0,85 $\pm$ 0,42 <sup>ab</sup>	1,36 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>	1,06 $\pm$ 0,46 <sup>ab</sup>	<b>0,59 <math>\pm</math> 0,33 <sup>b</sup></b>	<b>0,37 <math>\pm</math> 0,02 <sup>b</sup></b>
<b>16:4 n-1</b>	1,38 $\pm$ 0,16 <sup>ab</sup>	0,64 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	1,27 $\pm$ 0,43 <sup>ab</sup>	1,41 $\pm$ 0,21 <sup>ab</sup>	1,13 $\pm$ 0,48 <sup>ab</sup>	1,17 $\pm$ 0,26 <sup>ab</sup>	<b>2,17 <math>\pm</math> 0,71 <sup>b</sup></b>	1,38 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>	0,99 $\pm$ 0,19 <sup>ab</sup>
<b>18:0</b>	9,21 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	6,68 $\pm$ 1,49 <sup>ab</sup>	6,89 $\pm$ 0,74 <sup>ab</sup>	5,88 $\pm$ 0,29 <sup>ac</sup>	<b>4,31 <math>\pm</math> 2,77 <sup>bc</sup></b>	6,77 $\pm$ 0,98 <sup>ab</sup>	6,03 $\pm$ 2,38 <sup>ac</sup>	4,24 $\pm$ 0,86 <sup>ac</sup>	<b>2,33 <math>\pm</math> 0,10 <sup>c</sup></b>
<b>18:1 n-9</b>	9,45 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	5,94 $\pm$ 1,47 <sup>a</sup>	4,10 $\pm$ 2,80 <sup>ab</sup>	3,17 $\pm$ 2,02 <sup>ac</sup>	2,73 $\pm$ 1,69 <sup>ac</sup>	3,87 $\pm$ 0,43 <sup>ab</sup>	<b>2,01 <math>\pm</math> 1,21 <sup>bc</sup></b>	<b>1,35 <math>\pm</math> 0,78 <sup>bc</sup></b>	<b>0,43 <math>\pm</math> 0,29 <sup>c</sup></b>
<b>18:1 n-7</b>	5,56 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	4,12 $\pm$ 0,98 <sup>ab</sup>	3,12 $\pm$ 1,70 <sup>ab</sup>	<b>2,58 <math>\pm</math> 1,52 <sup>b</sup></b>	<b>2,01 <math>\pm</math> 1,01 <sup>b</sup></b>	2,71 $\pm$ 0,48 <sup>ab</sup>	<b>1,38 <math>\pm</math> 0,67 <sup>b</sup></b>	<b>1,09 <math>\pm</math> 0,38 <sup>b</sup></b>	<b>0,30 <math>\pm</math> 0,13 <sup>b</sup></b>
<b>18:1 n-5</b>	1,08 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	0,75 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>	0,76 $\pm$ 0,24 <sup>ab</sup>	<b>0,49 <math>\pm</math> 0,07 <sup>bc</sup></b>	<b>0,40 <math>\pm</math> 0,32 <sup>bc</sup></b>	0,67 $\pm$ 0,16 <sup>ab</sup>	<b>0,38 <math>\pm</math> 0,15 <sup>bc</sup></b>	<b>0,29 <math>\pm</math> 0,12 <sup>bc</sup></b>	<b>0,12 <math>\pm</math> 0,05 <sup>c</sup></b>
<b>18:2 n-6</b>	1,09 $\pm$ 0,24	0,73 $\pm$ 0,35	0,54 $\pm$ 0,41	0,72 $\pm$ 0,85	0,66 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,55	0,60 $\pm$ 0,54	0,56 $\pm$ 0,32	0,04 $\pm$ 0,04
<b>20:1 n-9</b>	11,71 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>	7,17 $\pm$ 1,89 <sup>ab</sup>	5,34 $\pm$ 2,58 <sup>ab</sup>	<b>2,93 <math>\pm</math> 2,61 <sup>bc</sup></b>	4,45 $\pm$ 3,17 <sup>ac</sup>	5,26 $\pm$ 0,83 <sup>ab</sup>	<b>2,50 <math>\pm</math> 1,67 <sup>bc</sup></b>	<b>1,70 <math>\pm</math> 1,17 <sup>bc</sup></b>	<b>0,57 <math>\pm</math> 0,23 <sup>c</sup></b>
<b>20:2 n-6</b>	1,30 $\pm$ 0,30	0,69 $\pm$ 0,14	0,71 $\pm$ 0,17	0,55 $\pm$ 0,61	0,59 $\pm$ 0,19	0,72 $\pm$ 0,14	0,37 $\pm$ 0,16	0,38 $\pm$ 0,12	0,07 $\pm$ 0,03
<b>20:4 n-6</b>	3,46 $\pm$ 0,83	2,04 $\pm$ 0,37	2,80 $\pm$ 0,54	3,15 $\pm$ 0,60	2,12 $\pm$ 1,38	4,46 $\pm$ 1,17	4,19 $\pm$ 2,00	3,61 $\pm$ 0,97	1,86 $\pm$ 0,37
<b>20:5 n-3</b>	34,19 $\pm$ 7,36 <sup>a</sup>	22,33 $\pm$ 4,42 <sup>ab</sup>	21,45 $\pm$ 5,89 <sup>ab</sup>	18,82 $\pm$ 6,16 <sup>ac</sup>	<b>15,33 <math>\pm</math> 9,26 <sup>bc</sup></b>	25,58 $\pm$ 5,73 <sup>ab</sup>	<b>11,88 <math>\pm</math> 4,88 <sup>bc</sup></b>	<b>9,38 <math>\pm</math> 4,73 <sup>bc</sup></b>	<b>3,23 <math>\pm</math> 1,42 <sup>c</sup></b>
<b>22:1 n-9</b>	2,23 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	<b>1,10 <math>\pm</math> 0,29 <sup>bc</sup></b>	<b>1,13 <math>\pm</math> 0,34 <sup>bc</sup></b>	<b>0,93 <math>\pm</math> 0,21 <sup>bc</sup></b>	<b>0,95 <math>\pm</math> 0,59 <sup>bc</sup></b>	1,29 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>	<b>0,78 <math>\pm</math> 0,46 <sup>bc</sup></b>	<b>0,52 <math>\pm</math> 0,21 <sup>bc</sup></b>	<b>0,19 <math>\pm</math> 0,04 <sup>c</sup></b>
<b>22:5 n-3</b>	1,47 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	<b>0,59 <math>\pm</math> 0,20 <sup>bc</sup></b>	0,80 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>	<b>0,73 <math>\pm</math> 0,23 <sup>bc</sup></b>	<b>0,55 <math>\pm</math> 0,27 <sup>bc</sup></b>	<b>0,77 <math>\pm</math> 0,08 <sup>b</sup></b>	<b>0,35 <math>\pm</math> 0,09 <sup>cd</sup></b>	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,09 <sup>cd</sup></b>	<b>0,10 <math>\pm</math> 0,01 <sup>d</sup></b>
<b>22:6 n-3</b>	67,67 $\pm$ 16,17 <sup>a</sup>	43,19 $\pm$ 6,23 <sup>a</sup>	43,02 $\pm$ 8,68 <sup>a</sup>	46,28 $\pm$ 12,69 <sup>a</sup>	31,99 $\pm$ 19,00 <sup>ab</sup>	59,09 $\pm$ 15,90 <sup>a</sup>	29,94 $\pm$ 14,83 <sup>ab</sup>	22,93 $\pm$ 12,37 <sup>ab</sup>	<b>7,96 <math>\pm</math> 4,92 <sup>b</sup></b>
<b>NC</b>	6,41 $\pm$ 1,23	6,58 $\pm$ 3,57	3,76 $\pm$ 2,73	4,66 $\pm$ 3,05	5,07 $\pm$ 1,75	8,94 $\pm$ 4,86	5,96 $\pm$ 4,46	4,08 $\pm$ 4,17	1,26 $\pm$ 0,25

Tabla 5.5 continuación

Ayuno (días)	0	3	6	10	13	17	21	24	27
<b>Ácidos Grasos – Glándula Digestiva (<math>\mu\text{g AG mg}^{-1} \text{ps}</math>)</b>									
<b>Totales</b>									
<b>Saturados</b>	69,93 $\pm$ 11,87 <sup>a</sup>	55,94 $\pm$ 12,77 <sup>ab</sup>	48,36 $\pm$ 19,70 <sup>ab</sup>	37,92 $\pm$ 6,68 <sup>ac</sup>	<b>29,85 <math>\pm</math> 19,56</b> <sup>bc</sup>	44,11 $\pm$ 11,52 <sup>ac</sup>	<b>28,23 <math>\pm</math> 10,37</b> <sup>bc</sup>	<b>19,12 <math>\pm</math> 7,12</b> <sup>bc</sup>	<b>9,19 <math>\pm</math> 2,20</b> <sup>c</sup>
<b>Monoinsaturados</b>	37,58 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup>	23,36 $\pm$ 5,64 <sup>ab</sup>	17,13 $\pm$ 8,71 <sup>ab</sup>	13,21 $\pm$ 8,93 <sup>ac</sup>	13,97 $\pm$ 8,13 <sup>ab</sup>	19,03 $\pm$ 2,60 <sup>ab</sup>	<b>10,40 <math>\pm</math> 6,61</b> <sup>bc</sup>	<b>7,17 <math>\pm</math> 4,06</b> <sup>bc</sup>	<b>2,09 <math>\pm</math> 0,86</b> <sup>c</sup>
<b>PUFA</b>	118,64 $\pm$ 27,31 <sup>a</sup>	75,05 $\pm$ 12,69 <sup>ab</sup>	74,70 $\pm$ 17,47 <sup>ab</sup>	75,51 $\pm$ 20,52 <sup>ab</sup>	<b>54,73 <math>\pm</math> 32,71</b> <sup>bc</sup>	96,45 $\pm$ 22,26 <sup>ab</sup>	<b>52,00 <math>\pm</math> 24,45</b> <sup>bc</sup>	<b>40,32 <math>\pm</math> 19,16</b> <sup>bc</sup>	<b>15,42 <math>\pm</math> 6,94</b> <sup>c</sup>
<b><i>n-3</i></b>	108,13 $\pm$ 24,99 <sup>a</sup>	68,40 $\pm$ 11,50 <sup>ab</sup>	66,76 $\pm$ 14,91 <sup>ab</sup>	67,56 $\pm$ 19,05 <sup>ab</sup>	<b>48,87 <math>\pm</math> 29,44</b> <sup>b</sup>	87,05 $\pm$ 21,38 <sup>ab</sup>	<b>42,99 <math>\pm</math> 20,31</b> <sup>b</sup>	<b>33,28 <math>\pm</math> 17,46</b> <sup>b</sup>	<b>11,49 <math>\pm</math> 6,33</b> <sup>c</sup>
<b><i>n-6</i></b>	6,61 $\pm$ 1,62	4,50 $\pm$ 0,97	5,03 $\pm$ 1,92	5,17 $\pm$ 1,62	3,61 $\pm$ 1,86	6,53 $\pm$ 0,91	5,25 $\pm$ 2,62	4,69 $\pm$ 1,44	2,26 $\pm$ 0,50
<b><i>n-9</i></b>	23,38 $\pm$ 3,26 <sup>a</sup>	14,21 $\pm$ 3,64 <sup>ab</sup>	10,57 $\pm$ 5,48 <sup>ab</sup>	7,03 $\pm$ 4,71 <sup>ac</sup>	8,13 $\pm$ 5,45 <sup>ac</sup>	10,41 $\pm$ 1,06 <sup>ab</sup>	<b>5,29 <math>\pm</math> 3,34</b> <sup>bc</sup>	<b>3,57 <math>\pm</math> 2,12</b> <sup>bc</sup>	<b>1,19 <math>\pm</math> 0,49</b> <sup>c</sup>
<b>HUFA <i>n-3</i></b>	104,46 $\pm$ 23,91 <sup>a</sup>	66,44 $\pm$ 10,94 <sup>ab</sup>	65,55 $\pm$ 14,41 <sup>ab</sup>	66,27 $\pm$ 18,38 <sup>ab</sup>	<b>48,00 <math>\pm</math> 28,65</b> <sup>bc</sup>	85,74 $\pm$ 21,26 <sup>ab</sup>	<b>42,34 <math>\pm</math> 19,90</b> <sup>bc</sup>	<b>32,70 <math>\pm</math> 17,19</b> <sup>bc</sup>	<b>11,35 <math>\pm</math> 6,30</b> <sup>c</sup>
<b><i>n-3/n-6</i></b>	16,39 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	15,32 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>	13,81 $\pm$ 2,24 <sup>ab</sup>	13,26 $\pm$ 2,73 <sup>ab</sup>	13,01 $\pm$ 1,67 <sup>ab</sup>	13,39 $\pm$ 2,90 <sup>ab</sup>	<b>8,28 <math>\pm</math> 0,29</b> <sup>c</sup>	<b>6,83 <math>\pm</math> 2,17</b> <sup>bc</sup>	<b>4,86 <math>\pm</math> 1,66</b> <sup>c</sup>
<b>DHA/EPA</b>	1,97 $\pm$ 0,06	1,95 $\pm$ 0,13	2,03 $\pm$ 0,15	2,50 $\pm$ 0,46	2,10 $\pm$ 0,03	2,31 $\pm$ 0,25	2,45 $\pm$ 0,26	2,46 $\pm$ 0,27	2,34 $\pm$ 0,42
<b>EPA/ARA</b>	9,93 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	10,96 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	7,79 $\pm$ 2,23 <sup>a</sup>	5,88 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	7,49 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	5,91 $\pm$ 1,70 <sup>a</sup>	<b>2,91 <math>\pm</math> 0,25</b> <sup>b</sup>	<b>2,51 <math>\pm</math> 0,91</b> <sup>bc</sup>	<b>1,70 <math>\pm</math> 0,45</b> <sup>c</sup>
<b>DHA/ARA</b>	19,59 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>	21,34 $\pm$ 2,81 <sup>b</sup>	15,61 $\pm$ 3,34 <sup>ab</sup>	14,57 $\pm$ 2,16 <sup>a</sup>	15,75 $\pm$ 1,61 <sup>ab</sup>	13,40 $\pm$ 2,54 <sup>a</sup>	<b>7,09 <math>\pm</math> 0,18</b> <sup>c</sup>	<b>6,07 <math>\pm</math> 1,98</b> <sup>c</sup>	<b>4,09 <math>\pm</math> 1,78</b> <sup>c</sup>
<b>Mon/ HUFA <i>n-3</i></b>	0,36 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,09	0,29 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,08	0,23 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,06
<b>Mon/PUFA</b>	0,32 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,22 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	<b>0,17 <math>\pm</math> 0,08</b> <sup>b</sup>	0,26 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	0,21 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	<b>0,19 <math>\pm</math> 0,04</b> <sup>b</sup>	<b>0,17 <math>\pm</math> 0,04</b> <sup>b</sup>	<b>0,14 <math>\pm</math> 0,03</b> <sup>b</sup>
<b>Mon/Sat</b>	0,54 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,16	0,49 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,16	0,34 $\pm$ 0,12	0,35 $\pm$ 0,10	0,23 $\pm$ 0,06
<b>18:1 <i>n-9</i>/HUFA <i>n-3</i></b>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	<b>0,05 <math>\pm</math> 0,02</b> <sup>b</sup>	0,06 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	<b>0,05 <math>\pm</math> 0,01</b> <sup>b</sup>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01</b> <sup>b</sup>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01</b> <sup>b</sup>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01</b> <sup>b</sup>

Los datos se muestran como valor medio ( $n=3$ )  $\pm$  D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ), y en negrita se presentan concentraciones diferentes a la del control.

PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados; DHA, ácido docosahexanoico (22:6 *n-3*); EPA, ácido eicosapentanoico (20:5 *n-3*); ARA, ácido araquidónico (20:4 *n-6*); Mon, ácidos grasos monoinsaturados; Sat, ácidos grasos saturados; NC, ácidos grasos no conocidos.

## 5.5. Discusión

La mayoría de los cambios observados en la glándula digestiva, donde la pérdida de peso alcanzó el 85 % a los 27 días del periodo de ayuno, fueron diferentes de forma significativa ( $p < 0,05$ ) incluso tan sólo a los 3 días de ayuno (34 %). El periodo de ayuno provocó una pérdida de masa corporal en torno al 28 – 45 % del peso inicial, lo que sugiere que los animales estuvieron utilizando el músculo para sus necesidades metabólicas.

El IGD disminuyó considerablemente durante los 27 días de ayuno (de 7,7 % a 1,4 %), y de manera significativa incluso tras 3 días de ayuno (4,1 %) ( $p < 0,05$ , Tabla 5.1). Castro *et al.* (1992) también registró una disminución del IGD de 7,5 % a 4,1 % después de 53 días de ayuno en *Sepia officinalis*, aunque este descenso no fue tan pronunciado como el obtenido en el presente experimento. Además, se registró una reducción considerable del peso de la GD así como un incremento del contenido en humedad.

La composición lipídica del manto de los cefalópodos es cercana al 2 % (Lee, 1994). Durante el ayuno, tanto la fracción de lípidos neutros como la de polares del manto parecen ser iguales y cercanas al 50 % en contenido (Almansa *et al.*, 2006). Varios estudios muestran que el manto de cefalópodos es rico en fosfolípidos, especialmente en fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE) y colesterol (CT) (Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou, 1998, 2000; Navarro & Villanueva, 2000; Almansa *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo confirman dicho perfil para *O. vulgaris*. Sin embargo, es interesante destacar el alto contenido en ésteres de esteroles del manto al principio del experimento. En general, la composición lipídica del manto se mantiene estable, y sólo el contenido en EE es diferente ( $p < 0,05$ ) tras 10 días de ayuno. La disminución en EE podría ser debida a su utilización como fuente de energía en el manto de *O. vulgaris*.

En este estudio, los ácidos grasos más abundantes del manto de *O. vulgaris* fueron el ácido palmítico (16:0), el DHA (22:6 *n-3*) y el EPA (20:5 *n-3*), siendo la composición en AG similar a la de la glándula digestiva. El mismo hecho es observado en el manto de *S. officinalis* (Ferreira *et al.*, 2010) y en el manto de otras especies de cefalópodos (Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou, 1998; Miliou *et al.*, 2006; Zlatanov *et al.*, 2006).

No se registraron importantes diferencias entre AG y/o grupos de AG en el manto de los pulpos durante el periodo de ayuno estudiado. De hecho, destaca que las ratios DHA/EPA observadas ( $\approx 1,5$ ), inclusive tras 27 días de ayuno, fueron similares a las obtenidas

para el manto de *O. vulgaris* por Miliou *et al.* (2006), entre 1,5 y 1,9; por Zlatanov *et al.* (2006), 1,5; y por Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou (1998), 1,5. Incluso cuando *O. vulgaris* (García *et al.*, 2011) y *S. officinalis* (Ferreira *et al.*, 2010) estuvieron bajo una mala condición nutricional, consecuencia del uso de dietas inadecuadas, la ratio DHA/ EPA del manto se mantiene en los valores mencionados.

En términos generales, el manto de los cefalópodos no se caracteriza por variaciones significativas, a pesar de la composición en lípidos de su dieta, las proporciones de alimentos ingeridos o el ciclo de maduración en el que se encuentre (Moreno *et al.*, 1998; Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou, 1998; Moltschanivskyj & Jackson, 2000; Almansa *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010).

La glándula digestiva de los cefalópodos posee un alto contenido en lípidos y actividad lipasa (Moltschanivskyj & Johnston, 2006) y juega un importante papel en la digestión y metabolismo de lípidos, secreción enzimática, digestión y absorción (Semmens *et al.*, 1995). Además, existen evidencias de que la glándula digestiva podría ser utilizada como almacén de lípidos por un periodo corto de tiempo en algunos cefalópodos (Castro *et al.*, 1992; Fluckiger *et al.*, 2008).

Varios estudios (Fluckiger *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2010) han demostrado que la glándula digestiva de la sepia europea es rica en lípidos polares, especialmente en FC y FE según Ferreira *et al.* (2010), y lípidos neutros, principalmente en TG y EE (además de CT según Ferreira *et al.* (2010)). En este trabajo se confirma que la glándula digestiva de *O. vulgaris* muestra un patrón similar para LN y LP (Tabla 5.3). También, que bajo condiciones de desnutrición en *S. officinalis* (Ferreira *et al.*, 2010) o de ayuno (en este estudio), los niveles de LN, principalmente TG y EE, disminuyen de forma significativa ( $p < 0,05$ ).

Tanto Lípidos totales como Clases lipídicas, excepto EE, no mostraron diferencias significativas durante los primeros 10 días, siendo también la composición de CL en % del total de lípidos estable durante este periodo. Todos estos hechos sugieren que pudo haber existido un estado inicial de regulación para la movilización de lípidos durante los primeros 10 días de ayuno, pudiendo haber actuado mecanismos compensatorios para el mantenimiento de las funciones fisiológicas de la glándula digestiva, reflejándose así la adaptación de *O. vulgaris* para tolerar cortos periodos de ayuno. Después de 10 días en ayuno, los lípidos de la GD fueron usados de manera más activa.

La disminución de lípidos detectada en este trabajo fue causada por disminuciones en la fracción de LN, principalmente en TG y EE. Este hecho parece indicar que tanto los

triglicéridos como los ésteres de esteroles podrían estar implicados en la movilización de lípidos con fines energéticos. Se sabe que los TG pueden tener una doble función: una metabólica, donde actuarían como fuente de producción de ATP mediante oxidación; y otra estructural, como fuente de ácidos grasos en la biosíntesis de fosfolípidos (Sargent *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta lo anterior, es destacable que durante los primeros 3 días de ayuno todos los fosfolípidos de la glándula digestiva de *O. vulgaris* aumentaron de manera significativa, mientras los TG disminuyeron en ese mismo periodo significativamente. Este pico podría estar asociado a una posible biosíntesis de lípidos polares a partir de los ácidos grasos resultantes del metabolismo energético de los triglicéridos durante las primeras etapas de inanición o a la variabilidad genética asociada al organismo vivo. Castro *et al.* (1992) también observó una fuerte variación en las clases lipídicas de *S. officinalis* expuesta al ayuno durante 2 días, indicando que una posible explicación a este fenómeno podría ser el alto grado de variabilidad individual entre cefalópodos (Clarke *et al.*, 1989). Diferentes artículos sobre cefalópodos también recogen la existencia de síntesis o transporte de lípidos en otros tejidos distintos al manto y su posterior deposición en la glándula digestiva durante las primeras etapas de inanición (Heras & Pollero, 1989; 1990).

Por otra parte, las concentraciones de fosfolípidos en la glándula digestiva se mantuvieron estables durante los 27 días que los pulpos estuvieron sin alimentar. La función más característica de los lípidos polares, como parte estructural de las membranas, podría explicar su concentración tan estable en la glándula digestiva durante todo este tiempo en ayuno.

Los resultados de este trabajo mostraron que los ácidos grasos más abundantes en la GD de *O. vulgaris* fueron DHA (22:6 *n-3*), ácido palmítico (16:0) y EPA (20:5 *n-3*). Igualmente, estos tres ácidos grasos fueron los más movilizados durante la etapa de inanición que soportaron los pulpos y deberían ser considerados como los AG más importantes de la glándula digestiva de *O. vulgaris*. Este mismo hecho fue observado para *O. vulgaris* (García *et al.*, 2011) y *S. officinalis* (Ferreira *et al.*, 2010).

Un sustrato energético muy común entre las especies marinas son los monoinsaturados (Sargent *et al.*, 1995). En el presente trabajo los pulpos utilizaron los monoinsaturados durante el ayuno, observándose un uso preferencial de saturados y monoinsaturados (principalmente) tras 21 días sin alimentación ( $p < 0,05$ ). Esta observación es asumible y esperable ya que se obtiene un mayor rendimiento energético a través de la oxidación de monoinsaturados y saturados, al hecho de que muchos PUFA son esenciales y a que los niveles más altos de PUFA aparecen en lípidos estructurales. De igual manera,

las glándulas digestivas de sepia alimentada con dietas artificiales (y en una condición nutricional no buena) mostraron bajos contenidos en monoinsaturados, saturados y PUFA en comparación con las de sepia alimentada con dietas naturales (Ferreira *et al.*, 2010). Igualmente este hecho fue observado en el calamar *Loligo vulgaris* y en *O. vulgaris* (Zlatanov *et al.*, 2006). También fue observado el uso de monoinsaturados de la GD durante un periodo largo de inanición en *S. officinalis* (Castro *et al.*, 1992).

Como en otras especies marinas, los ácidos grasos omega 6 son minoritarios en la composición de lípidos totales a diferencia de los omega 3 (Sargent *et al.*, 1995). Sin embargo, en este estudio destaca la no detección de diferencias significativas en ARA de la glándula digestiva aunque sí existieron diferencias en otros ácidos grasos esenciales como EPA y DHA y que, por lo tanto, explican la disminución gradual en las ratios EPA/ ARA y DHA/ ARA observadas. Este fenómeno podría deberse bien al mantenimiento de este ácido graso o a una posible biosíntesis de ácido araquidónico. En este sentido, los perfiles de ácidos grasos resultantes de paralarvas de *O. vulgaris* (Navarro & Villanueva, 2000; Miliou *et al.*, 2006) mostraron que ARA, 18:2 *n-6* y otros metabolitos intermediarios omega 6 presentan, sorprendentemente, altos valores para pertenecer a una especie marina. A partir de estos datos y de hallazgos en otros moluscos marinos (Uki *et al.*, 1986; Dunstan *et al.*, 1996; Durazo-Beltrán *et al.*, 2003) se sugiere que el ácido graso 20:4 *n-6* podría no ser esencial ya que la capacidad de bioconversión enzimática de precursores C18 a 20:4 *n-6* podría estar presente en dichas especies. Además, Almansa *et al.* (2006) y Miliou *et al.* (2006) comentaron la posibilidad de un metabolismo para HUFA *n-6* en cefalópodos.

El ácido araquidónico es el precursor primario de los eicosanoides en mamíferos y peces, compitiendo en este papel con el EPA, y se libera de los fosfolípidos de membrana en respuesta a diversos estímulos durante la llamada “cascada del ácido araquidónico” (Miliou *et al.*, 2006). Los eicosanoides poseen una amplia gama de acciones fisiológicas como, por ejemplo, en la coagulación sanguínea, respuesta inmune, respuesta inflamatoria, el tono cardiovascular, la función renal, la función neuronal y la reproducción (Tocher, 2003). Por ello, las escasas diferencias observadas en contenido ARA durante este estudio podrían estar asociadas con las funciones metabólicas tan importantes de dicho ácido graso, y/o con el mantenimiento de la estructura y función de las membranas celulares como también fue sugerido por Miliou *et al.* (2006). Todas estas observaciones indican que el ARA es un ácido graso importante que debe ser considerado para la fisiología de *O. vulgaris*.



No se detectaron diferencias en la ratio DHA/ EPA de la glándula digestiva de los pulpos durante los 27 días sin alimentar, indicando que o bien no hubo un uso preferencial por uno de los dos ácidos grasos en la GD durante el ayuno, o que se intentó mantener el equilibrio mediante el uso de ambos AG. De manera similar, Navarro & Villanueva (2003) observaron la disminución en PUFA y particularmente de DHA en paralarvas de *O. vulgaris* alimentadas con dietas inadecuadas. Por el contrario, Ferreira *et al.* (2010) obtuvo ratios diferentes en la GD de *S. officinalis*, siendo mucho más bajos ( $< 0,5$ ), y en este caso con diferencias significativas entre animales alimentados con crustáceos (0,2 - 0,5) y dietas artificiales que promovieron un crecimiento negativo y una condición nutricional pobre (0,9 - 1,0). Ferreira también observó altos ratios cuando la alimentación fue con sardina (1,2). Fluckiger *et al.* (2008) obtuvo ratios DHA/EPA en la GD de *S. officinalis* menores a los encontrados en este trabajo cuando la alimentación se basó en crustáceos (0,3 - 0,6) y mayores cuando estuvo basada en peces (1,5 - 1,8). Castro *et al.* (1992) también observó bajos ratios DHA/ EPA en la glándula digestiva de cefalópodos ( $< 0,4$ ). Estos hallazgos podrían indicar que existen diferentes rutas de utilización de EPA y DHA entre las dos especies de cefalópodos (pulpo y sepia) sugiriendo, a su vez, que los requerimientos nutricionales y la formulación de la dieta podrían requerir distintos enfoques para cada una de estos cefalópodos.

El DHA juega un papel multifuncional en la fisiología de la membrana celular (Almansa *et al.*, 2003; Horrocks & Farooqui, 2004). Además, el EPA es uno de los precursores de eicosanoides más importantes, implicado en numerosos procesos fisiológicos (Sargent *et al.*, 1995). La importancia de EPA y DHA en la nutrición de cefalópodos juveniles, en este caso *S. officinalis*, ha sido destacada también por Perrin *et al.* (2004).

## 5.6. Conclusión

En conclusión, los resultados muestran que:

a) La estabilidad lipídica del manto puede ser una característica beneficiosa desde el punto de vista del consumidor.

b) La glándula digestiva podría ser utilizada como un indicador del estado nutricional del animal. De esta forma, el nivel de ésteres de esteroles podría determinar cortos periodos de ayuno o subalimentación, mientras niveles bajos de triglicéridos y ésteres de esteroles podrían indicar largos periodos de ayuno o el uso de una inadecuada alimentación.

c) Aunque la cantidad de ARA en la glándula digestiva es pequeña, éste parece ser un ácido graso muy importante en el metabolismo de lípidos de *O. vulgaris*.

d) Los resultados de este estudio sugieren posibles rutas metabólicas diferentes para el uso de DHA y EPA en la glándula digestiva entre cefalópodos, como *O. vulgaris* y *S. officinalis*.

e) Para una mejor y completa comprensión del metabolismo general de los cefalópodos deberían llevarse a cabo estudios similares a este trabajo, centrados en las proteínas (gran importancia en el metabolismo de cefalópodos) y la utilización de los aminoácidos en el manto y la glándula digestiva de los pulpos mantenidos en ayuno.

## 5.7. Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por el Plan Nacional de Pulpo – JACUMAR – Proyecto “Engorde de pulpo *Octopus vulgaris*”, 2007/ 2009. Sandra García-Garrido también quiere expresar su agradecimiento al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la concesión de su beca predoctoral nº 47 (BOE nº 308 26/12/2006).

## 5.8. Referencias bibliográficas

- Aguado-Giménez F. & B. García-García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10: 361-377.
- Almansa E., J.J. Sánchez, S. Cozzi, C. Rodríguez & M. Díaz. 2003. Temperature–activity relationship for the intestinal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase of *Sparus aurata*. A role for the phospholipid microenvironment? *The Journal of Comparative Physiology B*, 173: 231-237.
- Almansa E., P. Domingues, A. Sykes, N. Tejera, A. Lorenzo & J.P. Andrade. 2006. The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture*, 256: 403-413.
- Ballantyne J.S., P.W. Hochachka & T.P. Mommsen. 1981. Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Marine Biology Letters*, 2: 75-85.
- Boucaud-Camou E. & M. Yim. 1980. Fine structure and function of the digestive cell of *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *Journal of Zoology*, 191: 89-105.
- Boucaud-Camou E. & R. Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. *Mollusca: Physiology*, 5(2): 149-187.
- Boucaud-Camou E., M. Yim & A. Tresgot. 1985. Feeding and digestion of young *Sepia officinalis* L. during post-hatching development. *Vie et Milieu*, 35: 263-266.
- Boucher-Rodoni R. 1989. Consommation d'oxygène et excretion ammoniacale de *Nautilus macrophalus*. *C. R. Hebd Seances Acad. Sci. (Paris)*, 309: 173-179.
- Boucher-Rodoni R., E. Boucaud-Camou & K. Mangold. 1987. Feeding and digestion. En: P. Boyle (ed.) *Cephalopod life cycles*. London: Academic Press, pp 85-108.
- Boucher-Rodoni R. & K. Mangold. 1988. Comparative aspects of ammonia excretion in cephalopods. *Malacologia*, 29: 145-151.
- Castro B.G. 1990. Can *Sepia officinalis* L. be reared on artificial food? *Marine Behavior & Physiology*, 19: 35-38.
- Castro B.G. & P.G. Lee. 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L (Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry & Physiology*, 109: 1007-1016.
- Castro B.G., J.L. Garrido & C.G. Sotelo. 1992. Changes in composition of digestive gland and mantle muscle of the cuttlefish *Sepia officinalis* during starvation. *Marine Biology*, 114: 11-20.
- Castro B., F.P. DiMarco, R.H. DeRusha & P.G. Lee. 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 & Ecology*, 170: 241-252.
- Cerezo-Valverde J., M. Hernández, F. Aguado-Giménez & B. García-García. 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*, 275: 266–273.
- Christie W.W. 1982. *Lipids analysis, 2<sup>nd</sup> edition*. Oxford: Pergamon Press.

- Clarke A., P.G. Rodhouse, L.J. Holmes & P.L. Pascoe. 1989. Growth rate and nucleic acid ratio in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 133: 229-240.
- DeRusha R.H., J.W. Forsythe, F.P. DiMarco & R.T. Hanlon. 1989. Alternative diets for maintaining and rearing cephalopods in captivity. *Laboratory Animal Science*, 39(4): 306-312.
- Domingues P. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. Ph D. Thesis, University of the Algarve, Portugal, 95 p.
- Domingues P., R. Poirier, L. Dickel, E. Almansa, A. Sykes & J.P. Andrade. 2003. Effects of culture density and live prey on growth and survival of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 11: 225-242.
- Domingues P.M., F.P. DiMarco, J.P. Andrade & P.G. Lee. 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 13: 423-440.
- Domingues P., V. Bettencourt & A. Guerra. 2006. Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie et Milieu*, 56: 109-120.
- Domingues P., N. López, J. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola & C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatán octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13: 273-280.
- Domingues P., S. García, I. Hachero-Cruzado, N. López & C. Rosas. 2010. The use of alternative prey (crayfish, *Procambarus clarkii*, and hake, *Merluccius gayi*) to culture *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Aquaculture International*, 18: 487-499.
- Dunstan G.A., H.J. Baillie, S.M. Barrett & J.K. Volkman. 1996. Effect of diet on the lipid composition of wild and cultured abalone. *Aquaculture*, 140: 115-127.
- Durazo-Beltrán E., L.R. D'Abramo, J.F. Toro-Vásquez, C. Vasquez-Peláez & M.T. Viana. 2003. Effect of triacylglycerols in formulated diets on growth and fatty acid composition in tissue of green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture*, 224: 257-270.
- FAO. 2008. *The state of the world fisheries, aquaculture 2008*. SOFIA, Rome, Italy. 176 p.
- Ferreira A., L. Márquez, E. Almansa, J. Andrade, A. Lorenzo & P. Domingues. 2010. The use of alternative diets to culture juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*: effects on growth and lipid composition. *Aquaculture Nutrition*, 16(3): 262-275.
- Fluckiger M., G.D. Jackson, P. Nichols, P. Virtue, A. Daw & S. Wotherspoon. 2008. An experimental study of the effect of diet on the fatty acid profiles of the European Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Marine Biology*, 154: 363-372.
- Fowler J., L. Cohen & P. Jarvis. 1998. *Practical statistics for field biology*, 2<sup>nd</sup> edition. West Sussex, England: John Wiley & Sons. 259 p.
- García S., P. Domingues, J.C. Navarro, I. Hachero, D. Garrido & C. Rosas. 2011. Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with to artificial diets. *Aquaculture Nutrition*, 17: e174-e187.

- Heras H. & R.J. Pollero. 1989. Blood lipids of the small octopus *Octopus tehuacanus* (Mollusca: Cephalopoda) at different stages of sexual maturation. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 92 A: 571–575.
- Heras H. & R.J. Pollero. 1990. Occurrence of plasma lipoproteins in octopods. Partial characterization and interorgan transport of lipids. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 140: 29-38.
- Horrocks L.A. & A.A. Farooqui. 2004. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70: 361–372.
- Horwitz W. 1980. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13<sup>th</sup> edition*. Washington DC, USA.
- Iglesias J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier) en el IEO. En: Costa J., E. Abellán, B. García, A. Ortega & S. Zamora (eds.), *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*. Cartagena, 1997. ISBN: 84-491-0323-1, 221–226 pp.
- Iglesias J., L. Fuentes, J. Sánchez, J.J. Otero, C. Moxica & M.J. Lago. 2006. First feeding of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) paralarvae using *Artemia*: effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261: 817-822.
- Iglesias J., F.J. Sánchez, J.G.F. Bersano, J.F. Carrasco, J. Dhont, L. Fuentes, F. Linares, J.L. Muñoz, S. Okumura, J. Roo, T. van der Meeren, E.A.G. Vidal & R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266: 1-15.
- Itami K., Y. Izawa, S. Maeda & K. Nakai. 1963. Notes on the laboratory culture of the octopus larvae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 29: 514-520.
- Lee P.G. 1994. Nutrition of cephalopods: fuelling the system. *Marine & Freshwater Behaviour Physiology*, 25: 35-51.
- Lee P.G., J.W. Forsythe, F.P. DiMarco, R. DeRusha & R.T. Hanlon. 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 49: 362-372.
- Mangold K. 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44: 81-93.
- Miliou H., M. Fintikaki, M. Tzitzinakis, T. Kountouris & G. Verriopoulos. 2006. Fatty acid composition of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to rearing temperature and body weight. *Aquaculture*, 256: 311-322.
- Moltschaniwskyj N.A. & G.D. Jackson. 2000. Growth and tissue composition as a function of feeding history in juvenile cephalopods. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 253 (2): 229-241.
- Moltschaniwskyj N. & D. Johnston. 2006. Evidence that lipid can be digested by the dumpling squid *Euprymna tasmanica*, but is not stored in the digestive gland. *Marine Biology*, 149: 565-572.
- Mommsen T.P. & P.W. Hochachka. 1981. Respiratory and enzymatic properties of squid heart mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 120: 345-350.

- Moreno J.E.A., V.J. Moreno, L. Ricci, M. Roldán & M. Gerpe. 1998. Variations in the biochemical composition of the squid *Illex argentinus* from the South Atlantic Ocean. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 119 B: 631-637.
- Navarro J.C. & R. Villanueva. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stage of cephalopods: an approach to the lipid requirements. *Aquaculture*, 183: 161-177.
- Navarro J.C. & R. Villanueva. 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural profile. *Aquaculture*, 219: 613-631.
- O'Dor R.K., R. Boucher-Rodoni, M.J. Wells & J. Wells. 1984. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine Behavior & Physiology*, 11: 239-258.
- Olsen R.E. & R.J. Henderson. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 129 (2): 189-197.
- Perrin A., E. Le Bihan & N. Koueta. 2004. Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 311: 267-285.
- Quintana D., P. Domingues & S. García. 2008. Effects of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*, 280: 161-164.
- Rosa R., J. Pereira & M.L. Nunes. 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to giant squid, *Architeuthis* sp. *Marine Biology*, 146: 739-751.
- Rosas C., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, D. Chay, N. López, T. Maldonado & P.M. Domingues. 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, 152: 371-381.
- Sargent J.R., J.G. Bell, R.J. Henderson & D.R. Tocher. 1995. Origins and functions of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. En: Ceve G. & F. Paltauf (eds.) *Phospholipids: Characterization, Metabolism and Novel Biochemical applications*. Champaign, IL: American Oil Chemical Society Press. 248-259 pp.
- Segawa S. & T.R. Hanlon. 1988. Oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Octopus maya*, *Loligo forbesi* and *Lolliguncula brevis* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Behavior & Physiology*, 13: 389-400.
- Semmens J.M., N.A. Moltschanivskyj & C.G. Alexander. 1995. Effect of feeding on the digestive gland of the tropical sepioid *Idiosepius pygmaeus*. *Journal of the Marine Biological (Ass. U.K.)*, 75: 885-897.
- Sinanoglou V.J. & S. Miniadis-Meimaroglou. 1998. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Research International*, 31 (6-7): 467-473.
- Sinanoglou V.J. & S. Miniadis-Meimaroglou. 2000. Phospholipids in Mediterranean cephalopods. *Z. Naturforsch.*, 55 C: 245-255.
- Tait R.W. 1986. Aspects physiologiques de la sénescence post reproductive chez *Octopus vulgaris*. Ph. D. Thèse L'Université Paris VI.

- Tocher D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11: 107-184.
- Uki N., M. Sugiura & T. Watanabe. 1986. Requirement of essential fatty acids in the abalone, *Haliotis discus hannai*. *Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52: 1013-1023.
- Villanueva R., N. Koueta, J. Riba & E. Boucaud-Camou. 2002. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia nauplii* and compound diets. *Aquaculture*, 205: 269-286.
- Young R.E. & R.F. Harman. 1988. "Larva", "paralarvae" and "subadult" in cephalopod terminology. *Malacologia*, 29: 201-207.
- Zar J.H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4<sup>th</sup> edition. Ryu T. (Ed.) Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ. 663 p.
- Zlatanov S., K. Laskaridis, C. Feist & A. Sagredos. 2006. Proximate composition, fatty acid analysis and protein digestibility-corrected amino acid score of three Mediterranean cephalopods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50: 967-970.



## COMPOSICIÓN PROTEICA Y EN AMINOÁCIDOS DEL MANTO DE *Octopus vulgaris* JUVENILES EXPUESTOS A UN AYUNO PROLONGADO

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental están publicados en el artículo:

**García-Garrido S**, Hachero-Cruzado I, Rosas C, Domingues P (2013) Protein and amino acid composition from the mantle of juvenile *Octopus vulgaris* exposed to prolonged starvation. *Aquaculture Research*, 44: 1741-1751. DOI 10.1111/j.1365-2109.2012.03180.x

### 6.1. Resumen

En el presente trabajo se determinó la composición proteica y aminoacídica del manto de *Octopus vulgaris* juveniles durante un ayuno de 27 días. El contenido medio del manto de los pulpos (en proteínas) fue de  $711,19 \pm 46,80$  g Kg<sup>-1</sup> PS, disminuyendo conforme aumentaban los días en ayuno. El contenido en aminoácidos no esenciales (AANE:  $486,18 \pm 11,08$  g Kg<sup>-1</sup> proteína) fue mayor que en aminoácidos esenciales (AAE:  $425,82 \pm 9,15$  g Kg<sup>-1</sup> proteína) al inicio del experimento, en condiciones normales de alimentación. Los resultados sugieren que un perfil en aminoácidos del manto donde los más abundantes sean Arg, His, Lys, Gly, Leu y Pro podrían indicar un estado de ayuno prolongado (> 20 días) o una malnutrición en *O. vulgaris*. Este estudio apoya la idea del uso del manto para necesidades metabólicas en *O. vulgaris* en ayuno sugiriendo que la vía de degradación de aminoácidos hasta piruvato e intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (ATC) fue favorecida frente a la vía de degradación de los aminoácidos cetogénicos. Una especial consideración debe ser adoptada en relación con Thr, Ile, Ser, Ala, Asx (Asp, Asn), Glx (Glu, Gln)(debido a su rápida ingesta) y con Lys e His (por sus estables contenidos) durante un periodo de ayuno prolongado.

**Palabras clave:** Proteína · Aminoácido · Manto · Nutrición · Ayuno · *Octopus vulgaris*.



## 6.2. Introducción

*Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) presenta altas tasas de crecimiento (Aguado-Giménez & García-García, 2002; Iglesias *et al.*, 2006; 2007) y precios en el mercado (FAO, 2008) asociados con la gran demanda existente en muchas regiones del mundo, siendo una de las especies más prometedoras para la diversificación de la acuicultura. Sin embargo, la alta mortalidad durante su fase paralarvaria (Iglesias *et al.*, 2007) y la imposibilidad de obtener juveniles bentónicos a escala comercial en cautividad (Iglesias *et al.*, 2004; Villanueva *et al.*, 2004; Okumura *et al.*, 2005) son los principales cuellos de botella para la acuicultura comercial de esta especie. Otra limitación es la inexistencia de dietas formuladas adecuadas en cuanto a aceptabilidad y composición nutricional (Cerezo-Valverde *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2008).

Se datan de estudios sobre nutrición en cefalópodos desde la década de los 80 (Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983; Boucaud-Camou *et al.*, 1985; DeRusha *et al.*, 1989). No obstante, es en los últimos años cuando se ha realizado un mayor esfuerzo dirigido en desarrollar dietas artificiales para cefalópodos, especialmente *O. vulgaris* (Cerezo-Valverde *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008; Estefanell *et al.*, 2010) y *Octopus maya* (George-Zamora *et al.*, 2011; Rosas *et al.*, 2013).

Desde un punto de vista cuantitativo, los aminoácidos representan el componente mayoritario en peso seco de la mayoría de los sistemas vivos siendo moléculas prebióticas vitales para todos los seres vivos (Finn & Fyhn, 2010). El metabolismo y el crecimiento de los cefalópodos se caracteriza por un uso principal de las proteínas, siendo su asimilación mayor del 90% (Lee, 1994; George-Zamora *et al.*, 2011). *O. vulgaris* se compone de aproximadamente un 80% de proteína en peso seco. Las necesidades de aminoácidos para la producción de proteínas son altas, y un juegan un papel fundamental en el crecimiento y metabolismo de esta especie (Houlihan *et al.*, 1990), ya que son la principal fuente de energía en los cefalópodos (O'Dor *et al.*, 1984; Lee, 1994).

El papel de los aminoácidos en cefalópodos aún no se ha comprendido totalmente. Sin embargo, las funciones que realizan los aminoácidos en el metabolismo de especies de peces marinos son muchas y diversas, tales como la iniciación de cascadas de transducción de señal a través de la fosforilación de residuos específicos (Serina, Ser; Treonina, Thr; o Aspartato, Asp) (Gilbert, 2006; Hall, 2008); efectos quimio-estimulatórios que influyen en decisiones metabólicas (Lindsey & Rutter, 2008); efectos insulínótropicos (*L*-Alanina, Ala; Metionina, Met; Arginina, Arg; y Ser) (Andoh, 2007; Kim *et al.*, 2008); neurotransmisores

inhibidores o excitadores (Glutamato, Glu; o Glicina, Gly) (Lape *et al.*, 2008); síntesis de hormonas bioaminas como dopamina, adrenalina, serotonina, melatonina y tiroxina (Fenilalanina, Phe; Triptófano, Trp; y Tirosina, Tyr) (Finn & Fyhn, 2010); precursores del glutatión (Cisteína, Cys; Glu y Met) (Guerrero *et al.*, 2003; Shukla & Mossman, 2008); Arg como precursor de ornitina, creatina, óxido nitroso y urea, que juegan un papel fundamental en el metabolismo y osmorregulación de los animales (Finn & Fyhn, 2010); precursores de otras macromoléculas como nucleótidos, lípidos, glucógeno, esteroides y otros compuestos bioactivos (Finn & Fyhn, 2010); y síntesis de ciertos compuestos que proporcionan vínculos esenciales entre los metabolismos lipídico y proteico como la *L*-Carnitina (Lisina, Lys; y Met) (Harpaz, 2005). Además, los aminoácidos son una fuente de energía química muy importante para las reacciones metabólicas (Finn & Fyhn, 2010).

Existe poco conocimiento sobre fisiología energética de los cefalópodos. García-Garrido *et al.* (2010) reportaron que los ácidos grasos del manto de *O. vulgaris* en ayuno se mantuvieron sin cambios durante 27 días mostrando que los lípidos almacenados en el músculo no se utilizaron como fuente de energía durante el experimento, mientras que se observó que los lípidos almacenados en la glándula digestiva se redujeron desde los 3 días de ayuno hasta el final del experimento. Por el contrario, Tait (1986) describió que el manto de *O. vulgaris* es uno de los órganos que sufren mayor variación en composición bioquímica tras un largo periodo en ayuno, siendo las proteínas el sustrato metabólico que más se moviliza durante condiciones de inanición. Diversos autores opinan que, durante condiciones de inanición, es posible que los pulpos movilicen a los aminoácidos como principal fuente de energía en el intento de mantener la homeostasis (Vidal *et al.*, 2002; Villanueva *et al.*, 2004; Iglesias *et al.*, 2006; Grigoriou & Richardson, 2009; Solorzano *et al.*, 2009; George-Zamora *et al.*, 2011).

Por consiguiente, en este trabajo se estudió la composición proteica y en aminoácidos del manto de pulpos mantenidos durante 27 días en ayuno. Nuestro objetivo fue determinar cómo son mantenidos, transformados y utilizados por el animal en condiciones de inanición. Dicho estudio podría proveer de información importante sobre el metabolismo y la nutrición de proteínas y aminoácidos en pulpos; y ayudar al desarrollo de eficientes alimentos artificiales para el engorde de dicha especie.

### 6.3. Material y Métodos

#### Captura, diseño experimental y protocolo de muestreo

En el presente experimento se utilizaron los mismos animales que nuestro equipo de investigación ha usado para determinar la composición en lípidos y ácidos grasos de pulpos en ayuno. Así pues, la captura, el diseño experimental y el protocolo de muestreo ya se encuentran descritos por García-Garrido *et al.* (2010). Brevemente, los pulpos fueron aclimatados durante dos semanas en un sistema con flujo de agua abierto, compuesto por 9 tanques de hormigón, con un volumen de 4,5 m<sup>3</sup> cada uno (3 x 1 x 1,5 m), y alimentados con calamar (*Loligo gahi*) congelado a una ración del 5 % pc d<sup>-1</sup> (porcentaje del peso corporal por día) (peso húmedo del alimento/ peso húmedo del animal), dos veces al día, a las 9:00 h y 15:00 h.

Posteriormente, treinta pulpos inmaduros (1581,34 ± 179,28 g; peso medio ± desviación estándar) fueron distribuidos aleatoria e individualmente en un sistema de 30 tanques cilindro-cónicos de 140 L de volumen cada uno, con un flujo de agua de 30 L h<sup>-1</sup>, en circuito abierto. La temperatura del agua fue de 20 ± 1 °C, la salinidad de 36 ± 1 g L<sup>-1</sup> y el pH de 7,9 ± 0,1. El flujo de agua fue ajustado en todos los tanques para mantener la concentración de oxígeno cercana a los niveles de saturación. En el experimento se utilizó el fotoperiodo natural presente en el Sur de España (14:10 h).

En cada periodo de muestreo (0, 3, 6, 10, 13, 17, 21, 24 y 27) tres pulpos fueron sacrificados. El primer grupo de 3 pulpos sacrificados (día 0) se usó como tratamiento control ya que estos animales fueron alimentados con calamar justo hasta el inicio del experimento y nunca se encontraron bajo condiciones de ayuno. A partir del día 0 del ensayo no se suministró alimento al resto de los pulpos durante 27 días. Sólo fueron posibles nueve periodos de muestreo ya que a lo largo del experimento se perdieron tres pulpos debido a escapes de sus tanques, encontrándose éstos muertos en el suelo.

#### Humedad

El contenido en humedad fue determinado en muestras de manto de juveniles de *O. vulgaris* mediante el método de Horwitz (1980).

#### Contenido en Proteínas

El contenido en proteínas se determinó en muestras de manto de *O. vulgaris* (1 – 2 mg; N=3) para cada periodo de ayuno durante los 27 días mediante el método de Lowry

(Lowry, Rosebrough, Farr & Randall, 1951) modificado por Bensadoun & Weinstein (1976) y Hess, Lees & Derr (1978). El contenido proteico fue cuantificado en gramo por kilogramo en peso seco ( $\text{g Kg}^{-1}$  PS) en muestras de manto previamente liofilizadas.

### **Análisis de Aminoácidos**

El contenido en aminoácidos, cuantificado en gramos de aminoácidos por kilogramo de proteína ( $\text{g AA Kg}^{-1}$  proteína), se determinó en muestras liofilizadas de manto de *O. vulgaris* (N=3 por cada tratamiento) para cada periodo de muestreo. Muestras de tejido desgrasado (20 mg) fueron hidrolizadas con 200  $\mu\text{L}$  de HCl 6 N y 0,06 % de fenol en un vial cerrado y calentado a 110 °C durante 24 h. Los perfiles aminoacídicos fueron determinados de acuerdo con el siguiente procedimiento Waters AccQ-Tag™ (Milford, MA, EEUU): (1) Muestras hidrolizadas se secan con nitrógeno en una plataforma térmica a 60 °C y se rehidratan con 1 mL de agua con grado de pureza para HPLC. (2) Las muestras se filtran (0,45  $\mu\text{m}$ ) y se mantienen a -20 °C hasta su utilización. (3) Se derivatizan mediante el sistema Waters AccQ-Tag™. (4) Las muestras son cromatografiadas mediante una columna de fase inversa (3,9 x 150 mm) Nova Pak™ C-18 de 4  $\mu\text{m}$ , usando el gradiente de agua – acetonitrilo recomendado por el sistema Waters AccQ-Tag™, en un HPLC (high performance liquid chromatography, cromatografía líquida de alta eficacia) Waters™ y un detector de fluorescencia (excitación y emisión de longitud de onda: 250 y 395 nm, respectivamente). (6) El análisis se lleva a cabo a una temperatura constante de 39 °C. (7) La calibración de la señal HPLC y las curvas estándar se obtienen mediante una solución de aminoácidos estándar a tres concentraciones diferentes desde 18,75 a 150 pmol para cada aminoácido. Considerando que Met y Cys fueron parcialmente destruidos por la hidrólisis ácida, sus resultados se tomaron con precaución.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se presentan como valor medio de 3 replicados  $\pm$  desviación estándar (DE). Todos los datos fueron analizados verificando una distribución normal mediante la prueba no paramétrica Kolmogórov-Sminov. Para verificar la homogeneidad de varianzas se utilizó el test de Levene realizando las transformaciones oportunas cuando fueron necesarias. Cuando no se obtuvieron una distribución normal y/o la homogeneidad de varianzas, los datos fueron sometidos a la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ANOVA de una vía) basada en transformación de rangos (Zar, 1984). Las diferencias en composición de aminoácidos del manto entre distintos periodos de muestreo se analizaron

mediante ANOVA de una vía. Cuando se encontraron diferencias se aplicó la prueba de Tukey de comparación múltiple.

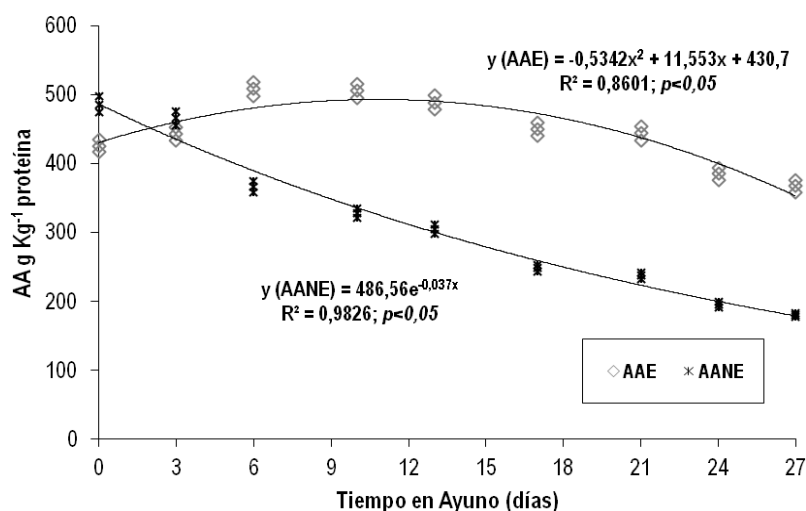
Además, para el estudio de las variaciones en aminoácidos esenciales y no esenciales durante el experimento, se trabajó con modelos de regresión, uno polinómico de segundo grado ( $y = cx^2 + bx + a$ ) y otro exponencial ( $y = ae^{bx}$ ).

Un análisis de componentes principales (ACP) se llevó a cabo para determinar diferencias entre la composición aminoacídica del manto durante los 27 días de inanición. Los aminoácidos más representativos se seleccionaron para introducirlos en al ACP. Teniendo en cuenta que Met y Cys fueron parcialmente destruidos por hidrólisis ácida, sus resultados no fueron seleccionados para dicho modelo. Se aplicaron la prueba Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y el test de Bartlett de esfericidad para determinar si los datos seleccionados eran o no adecuados para el ACP (Carrasco & Hernán, 1993).

Todos los ensayos estadísticos se llevaron a cabo con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI. En cada prueba estadística se consideró un nivel de confianza del 95 % (Zar, 1984).

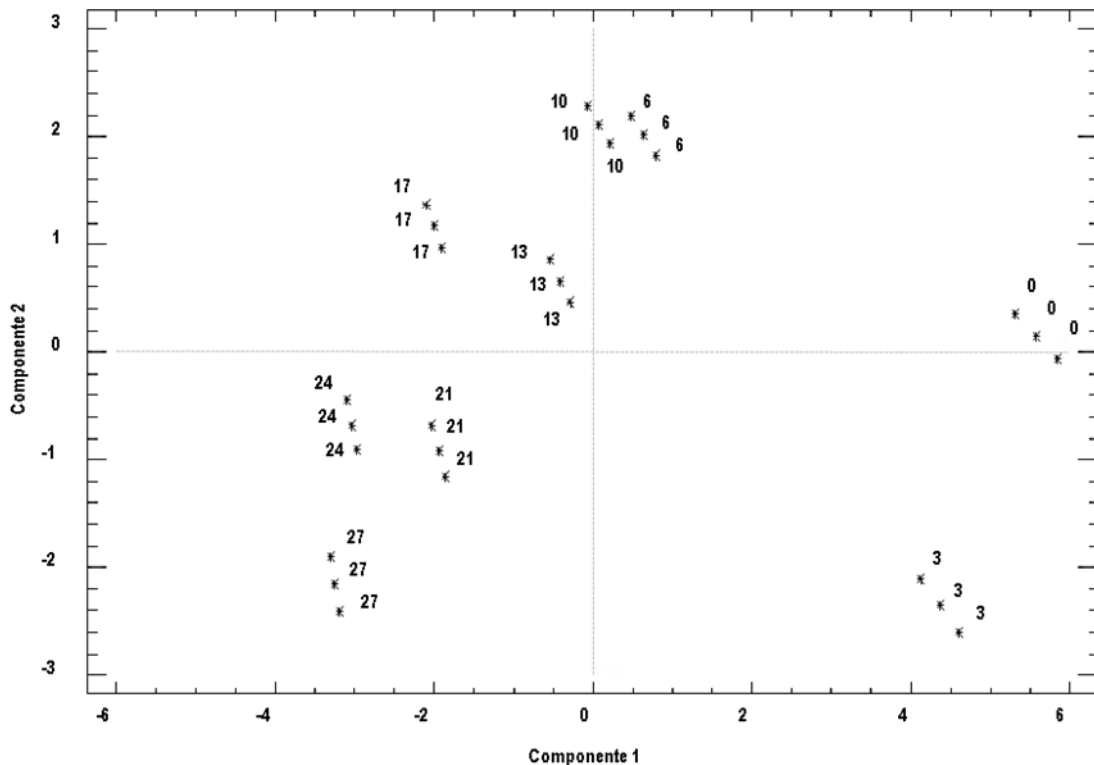
#### 6.4. Resultados

El contenido medio en proteínas del manto fue de  $711,19 \pm 46,80$  g Kg<sup>-1</sup> PS, siendo los contenidos proteicos registrados los días 17, 21, 24 y 27 significativamente menores respecto a los periodos de muestreo previos ( $p < 0,05$ ; Tabla 6.1).



**Figura 6.1** Contenido en Aminoácidos (AA g Kg<sup>-1</sup> Proteína) Esenciales (AAE) y No Esenciales (AANE) en el manto de *Octopus vulgaris* durante el periodo de ayuno (27 días).

La composición en aminoácidos no esenciales fue mayor (AANE =  $486,18 \pm 11,08$  g Kg<sup>-1</sup> proteína) que en aminoácidos esenciales (AAE =  $425,82 \pm 9,15$  g Kg<sup>-1</sup> proteína) al inicio del experimento ( $p < 0,05$ ). Además, el contenido en AANE disminuyó exponencialmente ( $p < 0,05$ ; Tabla 6.1; Figura 6.1) hasta alcanzar un valor de  $180,61 \pm 3,17$  g Kg<sup>-1</sup> proteína al final del ayuno, mientras que el contenido en AAE fue aumentando hasta el día 6 a partir del cual comienza a disminuir de forma continua hasta alcanzar un valor de  $367,49 \pm 8,53$  g Kg<sup>-1</sup> proteína al final del experimento ( $p < 0,05$ ; Tabla 6.1; Figura 6.1). Según los datos registrados, se obtuvo un modelo polinómico de segundo grado para las variaciones en el contenido en AAE durante el periodo en ayuno ( $R^2 = 86,01$  %;  $p < 0,05$ ; Figura 6.1). Para el contenido en AANE se obtuvo una relación exponencial ( $p < 0,05$ ). En este caso, el  $R^2$  fue 98,26 % y el coeficiente de correlación de -0,99124, lo que indica una relación negativa muy fuerte entre el contenido en AANE y el tiempo en inanición. El punto de inserción entre los dos modelos ocurre en el día 2 de ayuno (Figura 6.1), donde las concentraciones en AAE y AANE son similares ( $451,75$  g Kg<sup>-1</sup> proteína).



**Figura 6.2** Resultados del Análisis de Componentes Principales para la composición en aminoácidos del manto de *Octopus vulgaris* durante el periodo de ayuno (27 días).

Las concentraciones de AAE del manto en pulpos alimentados (día 0) más altas fueron las de Arg y Leucina (Leu). Estos valores se mantuvieron como los más altos respecto al resto de los aminoácidos durante todo el experimento. A los tres días de ayuno se observó una disminución en el contenido en Thr e Isoleucina (Ile) del manto. Al final del ensayo, AAE como Arg, Met, Ile, Valina (Val), Thr y Phe disminuyeron ( $p < 0,05$ ) en comparación a sus contenidos en el día 0. Por el contrario, las concentraciones de Lys e Histidina (His) aumentaron ( $p < 0,05$ ). Los AAE más consumidos al final del experimento fueron Thr, Ile, Val y Phe (Tabla 6.1).

Las concentraciones más altas de AANE del manto en pulpos alimentados fueron Glx (Glu y Glutamina (Gln)) y Asx (Asp y Asparragina (Asn)). Estas concentraciones disminuyeron constantemente hasta el final del experimento ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, el resto de los AANE como Ala, Cys, Ser y Tyr también disminuyeron de manera constante ( $p < 0,05$ ) durante el proceso de inanición. Gly y Prolina (Pro) fueron los AANE con las concentraciones más altas y similares a las registradas en el día 0 ( $p > 0,05$ ). Los AANE más consumidos al final del experimento fueron Glx, Asx, Ala y Ser (Tabla 6.1).

La figura 6.2 muestra los resultados del análisis de componentes principales llevado a cabo para el estudio de la composición en aminoácidos del manto de los pulpos expuestos a un periodo de ayuno prolongado (días). Los datos seleccionados se ajustaron bien al ACP ya que el valor de 0,513 obtenido mediante la prueba KMO y el test de Bartlett de esfericidad indica una alta significancia ( $p < 0,001$ ).

Los tres primeros componentes principales generados explicaron el 89,072 % del total de la varianza (componente principal 1 (CP1) = 60,28 %; CP2 = 17 %; CP3 = 11,80 %) (Figura 6.2). El análisis de la matriz de componentes permitió asociar al CP1 por el extremo positivo a los aminoácidos Ile, Asx, Glx, Ser y Thr, y por el extremo negativo a Lys e His. El aminoácido Arg fue asociado por el extremo positivo del CP2, y por el negativo con los aminoácidos Pro, Tyr y Gly.

**Tabla 6.1** Contenido en Proteínas (g Kg<sup>-1</sup>) y Contenido en Aminoácidos Totales (g Kg<sup>-1</sup> Proteína) del manto de *Octopus vulgaris* durante el tiempo de inanición (días).

Los datos se muestran como valor medio (n=3)  $\pm$  D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). His, Histidina; Thr, Treonina; Arg, Arginina; Val, Valina; Met, Metionina; Lys, Lisina; Ile, Isoleucina; Leu, Leucina; Phe, Fenilalanina; AAE, Aminoácidos Esenciales; Asx, Ácido Aspártico y Asparragina; Ser, Serina; Glx, Ácido glutámico y Glutamina; Gly, Glicina; Ala, Alanina; Pro, Prolina; Tyr, Tirosina; Cys, Cisteína; AANE, Aminoácidos No Esenciales; CP, Contenido en Proteínas.

(Tabla 6.1 se muestra en la siguiente página)

Tabla 6.1 (Continuación)

Aminoácidos (g Kg <sup>-1</sup> proteína)	Ayuno (días)									
	0	3	6	10	13	17	21	24	27	
His	19,18 ± 0,38 <sup>e</sup>	24,94 ± 0,50 <sup>d</sup>	41,43 ± 0,83 <sup>c</sup>	48,06 ± 0,96 <sup>b</sup>	52,87 ± 1,06 <sup>a</sup>	52,34 ± 1,05 <sup>a</sup>	49,72 ± 0,99 <sup>b</sup>	48,73 ± 0,97 <sup>b</sup>	53,60 ± 1,07 <sup>a</sup>	
Thr	43,06 ± 0,86 <sup>a</sup>	25,84 ± 0,52 <sup>b</sup>	8,61 ± 0,17 <sup>c</sup>	8,44 ± 0,17 <sup>c</sup>	7,09 ± 0,14 <sup>d</sup>	5,95 ± 0,12 <sup>e</sup>	4,82 ± 0,10 <sup>f</sup>	3,86 ± 0,08 <sup>g</sup>	3,05 ± 0,06 <sup>h</sup>	
Arg	72,97 ± 0,73 <sup>f</sup>	87,57 ± 0,88 <sup>e</sup>	168,56 ± 1,69 <sup>a</sup>	165,19 ± 1,65 <sup>a</sup>	135,46 ± 1,35 <sup>b</sup>	113,78 ± 1,14 <sup>c</sup>	93,30 ± 0,93 <sup>d</sup>	71,84 ± 0,72 <sup>f</sup>	58,91 ± 0,59 <sup>g</sup>	
Val	43,66 ± 1,35 <sup>b</sup>	50,65 ± 1,57 <sup>a</sup>	41,48 ± 1,29 <sup>b</sup>	40,65 ± 1,26 <sup>b</sup>	35,36 ± 1,10 <sup>c</sup>	29,71 ± 0,92 <sup>d</sup>	24,36 ± 0,76 <sup>e</sup>	18,76 ± 0,58 <sup>f</sup>	10,32 ± 0,32 <sup>g</sup>	
Met	22,54 ± 0,23 <sup>b</sup>	25,69 ± 0,26 <sup>a</sup>	20,96 ± 0,21 <sup>c</sup>	20,54 ± 0,21 <sup>c</sup>	18,48 ± 0,18 <sup>d</sup>	15,53 ± 0,16 <sup>e</sup>	13,97 ± 0,14 <sup>f</sup>	11,74 ± 0,12 <sup>g</sup>	11,15 ± 0,11 <sup>h</sup>	
Lys	74,71 ± 2,32 <sup>f</sup>	85,92 ± 2,66 <sup>e</sup>	112,07 ± 3,47 <sup>cd</sup>	109,83 ± 3,40 <sup>d</sup>	120,81 ± 3,75 <sup>c</sup>	132,90 ± 4,12 <sup>b</sup>	150,17 ± 4,66 <sup>a</sup>	147,17 ± 4,56 <sup>a</sup>	139,81 ± 4,33 <sup>ab</sup>	
Ile	43,53 ± 0,91 <sup>a</sup>	32,65 ± 0,69 <sup>b</sup>	21,76 ± 0,46 <sup>c</sup>	21,33 ± 0,45 <sup>c</sup>	17,49 ± 0,37 <sup>d</sup>	14,69 ± 0,31 <sup>e</sup>	11,90 ± 0,25 <sup>f</sup>	9,52 ± 0,20 <sup>g</sup>	7,62 ± 0,16 <sup>h</sup>	
Leu	70,36 ± 1,62 <sup>ab</sup>	73,87 ± 1,70 <sup>a</sup>	63,32 ± 1,46 <sup>d</sup>	62,05 ± 1,43 <sup>d</sup>	68,26 ± 1,57 <sup>bc</sup>	57,34 ± 1,32 <sup>e</sup>	64,79 ± 1,49 <sup>cd</sup>	49,89 ± 1,15 <sup>f</sup>	69,85 ± 1,61 <sup>ab</sup>	
Phe	35,81 ± 0,75 <sup>a</sup>	36,17 ± 0,76 <sup>a</sup>	30,44 ± 0,64 <sup>c</sup>	29,83 ± 0,63 <sup>c</sup>	32,82 ± 0,69 <sup>b</sup>	27,57 ± 0,58 <sup>d</sup>	31,15 ± 0,65 <sup>bc</sup>	23,99 ± 0,50 <sup>e</sup>	13,19 ± 0,28 <sup>f</sup>	
AAE	425,82 ± 9,15 <sup>b</sup>	443,29 ± 9,53 <sup>b</sup>	508,64 ± 10,21 <sup>a</sup>	505,93 ± 10,15 <sup>a</sup>	488,64 ± 10,21 <sup>a</sup>	449,80 ± 9,71 <sup>b</sup>	444,20 ± 9,97 <sup>b</sup>	385,49 ± 8,88 <sup>c</sup>	367,49 ± 8,53 <sup>c</sup>	
Asx	96,45 ± 2,22 <sup>b</sup>	110,91 ± 2,55 <sup>a</sup>	104,16 ± 2,40 <sup>a</sup>	70,83 ± 1,63 <sup>c</sup>	56,66 ± 1,30 <sup>d</sup>	34,0 ± 0,78 <sup>e</sup>	18,36 ± 0,42 <sup>f</sup>	8,08 ± 0,19 <sup>g</sup>	2,67 ± 0,06 <sup>h</sup>	
Ser	44,80 ± 0,94 <sup>a</sup>	22,40 ± 0,47 <sup>b</sup>	5,82 ± 0,12 <sup>c</sup>	5,71 ± 0,12 <sup>c</sup>	4,45 ± 0,09 <sup>d</sup>	3,74 ± 0,08 <sup>e</sup>	2,99 ± 0,06 <sup>f</sup>	2,30 ± 0,05 <sup>g</sup>	1,27 ± 0,03 <sup>h</sup>	
Glx	135,95 ± 4,21 <sup>a</sup>	114,20 ± 3,54 <sup>b</sup>	76,13 ± 2,36 <sup>c</sup>	74,61 ± 2,31 <sup>c</sup>	59,69 ± 1,85 <sup>d</sup>	50,14 ± 1,55 <sup>e</sup>	38,10 ± 1,18 <sup>f</sup>	29,34 ± 0,91 <sup>g</sup>	16,14 ± 0,50 <sup>h</sup>	
Gly	62,58 ± 0,63 <sup>e</sup>	93,86 ± 0,94 <sup>a</sup>	65,70 ± 0,66 <sup>cd</sup>	64,39 ± 0,64 <sup>de</sup>	70,83 ± 0,71 <sup>b</sup>	59,50 ± 0,59 <sup>f</sup>	67,23 ± 0,67 <sup>c</sup>	51,77 ± 0,52 <sup>g</sup>	72,48 ± 0,72 <sup>b</sup>	
Ala	60,50 ± 1,27 <sup>a</sup>	16,94 ± 0,36 <sup>d</sup>	22,99 ± 0,48 <sup>c</sup>	22,53 ± 0,47 <sup>b</sup>	18,02 ± 0,38 <sup>a</sup>	15,14 ± 0,32 <sup>a</sup>	13,63 ± 0,29 <sup>b</sup>	10,49 ± 0,22 <sup>b</sup>	5,77 ± 0,12 <sup>a</sup>	
Pro	40,78 ± 0,82 <sup>c</sup>	46,08 ± 0,92 <sup>a</sup>	36,70 ± 0,73 <sup>d</sup>	35,97 ± 0,72 <sup>d</sup>	39,56 ± 0,79 <sup>c</sup>	39,17 ± 0,78 <sup>c</sup>	44,26 ± 0,89 <sup>ab</sup>	42,05 ± 0,84 <sup>bc</sup>	40,36 ± 0,81 <sup>c</sup>	
Tyr	31,99 ± 0,74 <sup>bc</sup>	38,39 ± 0,88 <sup>a</sup>	31,35 ± 0,72 <sup>bd</sup>	30,73 ± 0,71 <sup>cd</sup>	29,80 ± 0,69 <sup>de</sup>	25,03 ± 0,58 <sup>f</sup>	28,29 ± 0,65 <sup>e</sup>	32,82 ± 0,75 <sup>b</sup>	31,50 ± 0,72 <sup>bd</sup>	
Cys	13,15 ± 0,26 <sup>e</sup>	23,40 ± 0,47 <sup>b</sup>	24,06 ± 0,48 <sup>b</sup>	23,58 ± 0,47 <sup>b</sup>	25,93 ± 0,52 <sup>a</sup>	21,78 ± 0,44 <sup>c</sup>	24,62 ± 0,49 <sup>b</sup>	18,95 ± 0,38 <sup>d</sup>	10,42 ± 0,21 <sup>f</sup>	
AAANE	486,18 ± 11,08 <sup>a</sup>	466,18 ± 10,13 <sup>a</sup>	366,92 ± 7,95 <sup>b</sup>	328,33 ± 7,08 <sup>c</sup>	304,95 ± 6,33 <sup>d</sup>	248,50 ± 5,12 <sup>e</sup>	237,48 ± 4,65 <sup>e</sup>	195,80 ± 3,86 <sup>f</sup>	180,61 ± 3,17 <sup>f</sup>	
CP (g Kg <sup>-1</sup> )	772,657 ± 16,68 <sup>a</sup>	764,93 ± 16,01 <sup>ab</sup>	741,75 ± 16,01 <sup>ab</sup>	734,02 ± 15,85 <sup>ab</sup>	727,84 ± 15,71 <sup>b</sup>	679,93 ± 14,68 <sup>c</sup>	672,21 ± 14,51 <sup>c</sup>	656,75 ± 14,20 <sup>c</sup>	650,67 ± 14,05 <sup>c</sup>	



Al final del periodo de ayuno todos los porcentajes de aminoácidos disminuyeron excepto para His, Lys y Gly (que aumentaron), y Leu y Pro (que se mantuvieron similares a los registrados el día 0). Por ello, el CP1 por su extremo positivo parece estar relacionado con los aminoácidos que más fueron consumidos y por su extremo negativo con aquellos que aumentaron su porcentaje durante el experimento. Además, la distribución de los aminoácidos en el ACP según el CP2 muestra que existe una relación entre el periodo de inanición y los perfiles de Arg y Gly. Así, el contenido en Arg aumentó desde el día 0 al día 10, disminuyendo hasta el final del experimento. Y el contenido en Gly aumentó desde el día 0 al día 3 de manera destacable. Estos hallazgos son claramente mostrados en el análisis de componentes principales (Figura 6.2).

## 6.5. Discusión

El papel metabólico de los aminoácidos durante la inanición podría ser un mecanismo generalizado en los cefalópodos (George-Zamora *et al.*, 2011). Por lo tanto, el uso de los aminoácidos mientras el animal está en ayuno podría ser una manera de compensar la falta de glucosa para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo ATC). Como los cefalópodos realmente no almacenan sus reservas en ningún lugar determinado, parte de sus propios músculos podrían utilizarse durante esta condición extrema.

Sin embargo, al comparar metabolismo y aspectos nutricionales hay que tener en cuenta que en cefalópodos, estrategias de vida diferentes se suelen asociar con una composición bioquímica distinta (Rosa *et al.*, 2005) y que las distintas opciones metabólicas usadas por peces y moluscos indican, dentro de un contexto medioambiental, una alta plasticidad de diseño metabólico (Ballantyne, 2004). Del mismo modo, Rosa *et al.* (2005) indican que las estrategias nectobentónicas y pelágicas fueron claramente separadas de las bentónicas, sugiriendo que estos grupos de especies se caracterizan por un menor contenido en lípidos y un alto contenido de proteínas en la gónada.

Castro *et al.* (1992) reportaron que la proteína muscular de *Sepia officinalis* disminuye tras 53 días de inanición, y García-Garrido *et al.* (2010) sugieren que *O. vulgaris* expuestos a un ayuno prolongado usaban la proteína del músculo para sus necesidades metabólicas. En este estudio, se produjo una pérdida del 35,5 % de la masa corporal después de 27 días de ayuno (García-Garrido *et al.*, 2010) lo que sugiere el uso de proteínas para mantener la homeostasis en los pulpos. Del mismo modo, George-Zamora *et al.* (2011) demostraron que los aminoácidos son usados como soporte energético en condiciones de inanición

para *O. maya*. Estos hechos también se apoyan en los resultados de Villanueva *et al.* (2004), donde se encuentran diferencias significativas entre los tejidos en cuanto a contenido total de aminoácidos, con un valor más alto en el músculo (52 % PS) en relación con los otros tejidos (gónadas: 26 % PS y glándula digestiva: 10 % PS). Por lo tanto, la estrategia de degradación de aminoácidos podría ser para formar los principales intermediarios metabólicos, los cuales se pueden convertir en glucosa u oxidarse en el ciclo ATC.

Los aminoácidos degradados a Acetil-CoA o Acetoacetil-CoA se llaman cetogénicos, y los aminoácidos que se degradan a Piruvato o intermediarios del Ciclo del Ácido Cítrico se llaman glucogénicos. De los 20 aminoácidos universales, sólo Leu y Lys son puramente cetogénicos. Ile, Phe, Trp y Tyr son tanto cetogénicos y glucogénicos. Los catorce aminoácidos restantes (His, Arg, Thr, Val, Met, Ser, Gly, Ala, Pro, Cys, Glu, Gln, Asp, Asn) son puramente glucogénicos (Stryer, 1995; Hochachka & Somero, 2002; Stryer *et al.*, 2002; Lehninger *et al.*, 2008). En este trabajo cabe destacar que los aminoácidos más consumidos durante el ayuno fueron glucogénicos o glucogénicos-cetogénicos, ninguno de ellos puede entrar en el ciclo ATC por una vía únicamente cetogénica. De hecho, los aminoácidos puramente cetogénicos (Leu y Lys) no disminuyeron durante el ayuno e incluso la proporción de Lys aumentó. En moluscos marinos, los cuerpos cetónicos no se utilizan cuando los hidratos de carbono son limitantes (Stuart *et al.*, 1998) ya que universalmente carecen de la enzima  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa ( $\beta$ -HBDH), que cataliza la reacción de acetoacetato a  $\beta$ -hidroxibutirato (Stuart & Ballantyne, 1996). Estos hallazgos sugieren que la vía de degradación de los aminoácidos hasta piruvato e intermediarios del ciclo ATC fue favorecida en el manto de *O. vulgaris* en comparación con la vía de degradación de los aminoácidos cetogénicos. Este hecho puede venir también influenciado con la posible movilización de Acetil-CoA y Acetoacetil-CoA para el metabolismo de los ácidos grasos (anabolismo); idea que podría ser apoyada por la composición constante en ácidos grasos del manto de *O. vulgaris* expuestos a un periodo de ayuno prolongado (García-Garrido *et al.*, 2010).

Los aminoácidos Arginina, Prolina y Glutamato son, junto con el glucógeno, utilizados como sustratos energéticos en diversos órganos y tejidos de cefalópodos, siendo demostrado por Morillo-Velarde *et al.* (2011) el uso del glucógeno durante el ayuno en *O. vulgaris*. Aunque existen varios artículos en los que se muestra la importancia energética de los aminoácidos nombrados anteriormente (Ballantyne *et al.*, (1981); Mommsen & Hochachka (1981); Hochachka & Fields (1982); Mommsen *et al.*, (1982); Mommsen *et al.*, (1983); D'Aniello *et al.*, (1995); Domingues (1999); Ruíz-Capillas *et al.*, (2002); Domingues

*et al.*, (2005)), en esta investigación no hubo diferencias significativas en Pro entre los días 0 y 27, y el contenido en Arg fue abundante tanto en buenas condiciones como tras 27 días de inanición. Por el contrario, Glu fue uno de los aminoácidos más abundantes al inicio y uno de los más consumidos durante el ayuno. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, sugerimos que los contenidos en Pro y Arg se mantienen durante la inanición mientras que Glu es el principal aminoácido utilizado por *O. vulgaris* como sustrato energético en condiciones de ayuno prolongado. De hecho, hay que destacar que Glu tiene un sistema enzimático específico para su oxidación en *O. vulgaris* así como en otras especies de cefalópodos (Rocca & Ghiretti (1958); Storey *et al.*, (1978); Hoeger *et al.*, (1987)).

Durante este trabajo, el mantenimiento del contenido en Pro no implica que este aminoácido no se consuma sino que es utilizado como reserva de Glu. Según Domingues *et al.* (2005), Pro es el aminoácido que más fácilmente se oxida a Glu para la producción de energía, siendo Glu uno de los aminoácidos más importantes en el manto de los cefalópodos. El menor uso de Pro podría deberse a que al tener Glu, no se hace necesario utilizar las reservas de Pro las cuales podrían movilizarse para periodos de ayuno superiores a 27 días en *O. vulgaris*. De esta manera, es posible que la conservación de Pro pudiera representar una ventaja debido al papel que Glu tiene como inhibidor de la vía de oxidación de Pro. En tales circunstancias, es posible pensar que durante el cuidado parental de la puesta, la hembra del pulpo podría usar aminoácidos energéticos siendo Pro fuente de Glu cuando éste se agote.

Por otro lado, Akagi & Ohmori (2004) propusieron una ruta del metabolismo de *D*-lactato en *O. vulgaris* incluyendo Thr y Gly como precursores. El ácido láctico juega un importante papel en diversos procesos bioquímicos como la fermentación láctica, en la cual los pulpos podrían obtener energía del músculo. Según estos autores, la Thr puede catabolizarse de manera efectiva como una fuente de energía siendo el amonio formado por esta vía excretado en el agua a través de la ruta amoniotélica en el paso final. Además, Fields & Hochachka (1982) sugirieron la existencia de una efectiva circulación y mecanismos para la rápida eliminación de metabolitos como la glucosa y los aminoácidos. En nuestro estudio, Thr fue uno de los aminoácidos más consumidos después de 27 días de ayuno, y cabe la posibilidad que este aminoácido se utilizara como precursor de *D*-lactato precursor tal y como sugieren Akagi & Ohmori (2004).

Iwasaki & Harada (1985) describieron que los aminoácidos predominantes en los tejidos de cefalópodos son Glu, Asp, Leu, Ala, Lys e Ile. Para *O. vulgaris*, *S. officinalis* y

*Loligo vulgaris* Glu, Asp y Lys son los aminoácidos más abundantes en el músculo según Zlatanov *et al.* (2006), mientras que en *O. maya* son Glu, Lys y Leu según Águila *et al.* (2007). Resultados similares también fueron descritos para las etapas tempranas de estas tres especies (Villanueva *et al.*, 2004). Este autor hizo hincapié en la importancia de los AAE en las etapas tempranas de los cefalópodos, y la capacidad de las paralarvas de *O. vulgaris* para la captación de aminoácidos del agua marina. Según Rosa *et al.* (2005) los principales AAE de catorce especies de cefalópodos fueron Leu, Lys y Arg en los tres tejidos estudiados (músculo, gónada y glándula digestiva), y los AANE principales fueron Glu, Asp y Pro. Del mismo modo, en nuestra investigación los aminoácidos más abundantes en el manto de pulpos en ayuno fueron Glu, Asp, Arg, Leu y Lys.

Aunque George-Zamora *et al.* (2011) reportó que *O. maya* juveniles utilizan preferentemente Thr, Phe, Ile, Ala, Glu y Ser durante ocho días de inanición, en este estudio parece que existe una mayor movilización de AANE (Glx, Asx, Ala y Ser) que de AAE (Thr, Ile, Val y Phe) en juveniles de *O. vulgaris* durante todo el período de ayuno. De hecho, el contenido de AANE se redujo el 62,9 % mientras que el contenido en AAE se redujo tan sólo el 13,7 % tras 27 días en ayuno. Esta observación concuerda con la idea de que la deficiencia de AAE limita el desarrollo de los organismos, ya que no pueden ser sintetizados y deben ser suministrados en la dieta. Por lo tanto, en un ayuno prolongado el metabolismo podría decidir un consumo preferente de AANE, ya que el propio sistema puede sintetizarlos.

Sin embargo, dejando a un lado las diferencias entre AAE y AANE, en nuestro trabajo se observó un patrón similar al presentado por George-Zamora *et al.* (2011). *O. vulgaris* consumió preferentemente Glx, Asx, Ala, Ser, Thr, Ile, Val y Phe durante 27 días de inanición destacando que los perfiles de aminoácidos de *O. vulgaris* después de 6 y 10 días de ayuno fueron más parecidos al perfil de aminoácidos tras 8 días de ayuno de *O. maya* (George-Zamora *et al.*, 2011). Posiblemente, el tiempo en ayuno al que fueron sometidas estas especies ha podido influir en los perfiles aminoacídicos obtenidos y una de las principales causas de los patrones observados. De hecho, esta idea conjuga con nuestros resultados en el ACP y nos ayuda a proponer cuatro grupos bien definidos dentro del período experimental:

- Composición en AA en el tiempo 0, cuadrante +0.
- Composición en AA en el tiempo 3, cuadrante +-.
- Composición en AA en los tiempos 6, 10, 13 y 17, cuadrante -+.
- Composición en AA en los tiempos 21, 24 y 27, cuadrante --.

Esta distribución sugiere que existen diferencias significativas en la composición de aminoácidos entre un estado nutricional bueno (tiempo 0), después de sólo 3 días en ayuno, entre los 3 y los 20 días de ayuno y, finalmente, tras 20 días de inanición. En resumen, un perfil de aminoácidos del manto donde los aminoácidos más abundantes sean Arg, His, Lys, Gly, Leu y Pro, junto con bajos niveles de triglicéridos y ésteres de esteroles en la glándula digestiva (García-Garrido *et al.*, 2010) podrían indicar una situación de ayuno prolongado (> 20 días) o un estado de malnutrición de *O. vulgaris*.

Finalmente, aunque fue determinada la composición en aminoácidos y proteínas del manto de *O. vulgaris* juveniles en ayuno durante 27 días, estos datos no pueden ser comparados con la composición en aminoácidos y proteínas del manto de juveniles de *O. vulgaris* alimentados con diferentes dietas artificiales. Somos conscientes de que no podemos proponer una dieta específica de proteínas para *O. vulgaris*. Para ello sería necesaria más información, en particular sobre digestibilidad o absorción de los ingredientes entre otros aspectos. No obstante, podemos sugerir la importancia de ciertos aminoácidos de acuerdo con los resultados obtenidos. Estos aminoácidos deben ser considerados en la formulación de dietas preparadas para esta especie. Por lo tanto, se debe prestar especial atención a Thr, Ile (AAE), Ser, Ala, Asx y Glx (AANE) para su rápido consumo. Además, el contenido en AAE Lys e His aumenta tras 27 días de ayuno alcanzando valores finales del doble y el triple de los iniciales (tiempo 0) respectivamente. Lys e His también deben ser considerados en la formulación de dietas preparadas, debido a su estabilidad a lo largo de un período de ayuno prolongado, lo que puede indicar que son necesarios para el mantenimiento de un cierto equilibrio metabólico.

## 6.6. Conclusión

En conclusión, los resultados muestran que:

a) El perfil en aminoácidos del manto de los pulpos, caracterizado por mayores contenidos en Arg, His, Lys, Gly, Leu y Pro, junto con bajos niveles de triglicéridos y ésteres de esteroles en la glándula digestiva (García-Garrido *et al.*, 2010) podrían indicar un estado prolongado de ayuno (> 20 días) o malnutrición en *O. vulgaris*.

b) Por el contrario, los aminoácidos más abundantes en el manto de pulpos con un buen estado nutricional son Glu, Asp, Arg, Leu y Lys.

c) Este trabajo apoya la idea de la utilización del manto para necesidades metabólicas de *O. vulgaris* durante estados de ayuno o inanición.

d) Los resultados de este estudio sugieren que la vía de degradación de aminoácidos hasta piruvato e intermediarios del ciclo ATC es favorecida respecto a la vía de degradación de los aminoácidos cetogénicos.

e) Debería realizarse una consideración especial en lo concerniente a los aminoácidos Thr, Ile, Ser, Ala, Asx y Glx, por su rápido consumo, y con Lys e His, debido a sus contenidos estables, durante condiciones prolongadas de ayuno.

## 6.7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional de Pulpo – JACUMAR – Proyecto “Engorde de pulpo *Octopus vulgaris*”, 2007/ 2010. Sandra García-Garrido agradece al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), por la concesión de su beca predoctoral nº 47 (BOE nº 308 26/12/2006), y a Ana Rodiles por sus valiosas sugerencias durante la elaboración de este artículo. Se agradece también a Lluvia Korynthia López Aguilar y a Arturo George Zamora por su participación en el análisis de aminoácidos.

## 6.8. Referencias bibliográficas

- Aguado-Giménez F. & B. García-García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10: 361-377.
- Águila J., G. Cuzon, C. Pascual, P. Domingues, G. Gaxiola, A. Sánchez, T. Maldonado & C. Rosas. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP®) level on *Octopus maya* (Voss & Solis) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture*, 273: 641-655.
- Akagi S. & S. Ohmori. 2004. Threonine is the best substrate for D-lactate formation in octopus tentacle. *Amino Acids* 26: 169-174.
- Andoh T. 2007. Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *General and Comparative Endocrinology* 151: 308-317.
- Ballantyne S. 2004. Mitochondria: aerobic and anaerobic design - lessons from molluscs and fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 139: 461-467.
- Ballantyne J.S., P.W. Hochachka & T.P. Mommsen. 1981. Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Marine Biology Letters*, 2: 75-85.
- Bensadoun A. & D. Weinstein. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry* 70: 241-250.
- Boucaud-Camou E. & R. Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. *The Mollusca, Physiology* 5: 149-187.
- Boucaud-Camou E., M. Yim & A. Tresgot. 1985. Feeding and digestion of young *Sepia officinalis* L. during post-hatching development. *Vie et Milieu*, 35: 263-266.
- Carrasco J.L. & M.A. Hernán. 1993. Estadística Multivariante en las Ciencias de la Vida. Editorial Ciencia 3, Madrid, Spain, 363pp.
- Castro B.G., J.L. Garrido & C.G. Sotelo. 1992. Changes in composition of digestive gland and mantle muscle of the cuttlefish *Sepia officinalis* during starvation. *Marine Biology*, 114: 11-20.
- Cerezo-Valverde J., M. Hernández, F. Aguado-Giménez & B. García-García. 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*, 275: 266-273.
- D'Aniello A., G. Nardi, A. DeSantis, A. Vetere, A. DiCosmo, R. Marchelli, A. Docena & G. Fisher. 1995. Free L-amino acids and D-aspartate content in the nervous system of Cephalopoda. A comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112: 661-666.
- DeRusha R.H., J.W. Forsythe, F.P. DiMarco & R.T. Hanlon. 1989. Alternative diets for maintaining and rearing cephalopods in captivity. *Laboratory Animal Science*, 39(4): 306-312.
- Domingues P. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. Ph D. Thesis, University of the Algarve, Portugal, 95 p.
- Domingues P.M., F.P. DiMarco, J.P. Andrade & P.G. Lee. 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 13: 423-440.



- Estefanell J., J. Socorro, F.J. Roo, R. Guirao, H. Fernández-Palacios & M. Izquierdo. 2010. Gonad maturation in *Octopus vulgaris* during on-growing, under different conditions of sex ratio. *ICES Journal of Marine Science*, 67: 1487–1493.
- FAO. 2008. *The state of the world fisheries, aquaculture 2008*. SOFIA, Rome, Italy. 176 p.
- Fields J.H.A. & P.W. Hochachka. 1982. Glucose and proline metabolism in Nautilus. *Pacific Science*, 36: 337-341.
- Finn R.N. & H.J. Fyhn. 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquaculture Research*, 41: 684-716.
- García-Garrido S., I. Hachero-Cruzado, D. Garrido, C. Rosas & P. Domingues. 2010. Lipid composition of the mantle and digestive gland of *Octopus vulgaris* juveniles (Cuvier, 1797) exposed to prolonged starvation. *Aquaculture International*, 18: 1223-1241.
- George-Zamora A., M.T. Viana, S. Rodríguez, G. Espinoza & C. Rosas. 2011. Amino acid mobilization and growth of juvenile *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) under inanition and re-feeding. *Aquaculture*, 314: 215-220.
- Gilbert S.E. 2006. *Developmental Biology*. Sinauer Associates Sunderland, MA, USA, 750pp.
- Grigoriou P. & C.A. Richardson. 2009. Effect of body mass, temperature and food deprivation on oxygen consumption rate of common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Marine Biology*, 156: 2473-2481.
- Guerrio G., A. Di Finizio & G. Ciarcia. 2003. Oxidative defenses in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 530: 681-688.
- Hall T.E. 2008. Pattern formation. In: *Fish Larval Physiology* (ed. by Finn R.N. & B.G. Kapoor), pp. 3-25. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Harpaz S. 2005. L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition: a review. *Aquaculture*, 249: 3-21.
- Hess H.H., M.B. Lees & J.E. Derr. 1978. A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Analytical Biochemistry*, 85: 295-300.
- Hochachka P.W. & J.H.A. Fields. 1982. Arginine, Glutamate, and Proline as substrates for oxidation and for glycogenesis in cephalopod tissues. *Pacific Science*, 36: 325-335.
- Hochachka P.W. & G.N. Somero. 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, New York, USA, 466pp.
- Hoeger U., T.P. Mommsen, R.K. O'Dor & D.M. Webber. 1987. Oxygen uptake and nitrogen in two cephalopods, octopus and squid. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87: 63-67.
- Horwitz W. 1980. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13<sup>th</sup> edition*. Washington DC, USA.
- Houlihan D.F., D.N. McMillan, C. Agnisola, T.L. Genoino & L. Foti. 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 106: 251-259.
- Iglesias J., J.J. Otero, C. Moxica, L. Fuentes & F.J. Sánchez. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using Artemia



- and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12: 481-487.
- Iglesias J., L. Fuentes, J. Sánchez, J.J. Otero, C. Moxica & M.J. Lago. 2006. First feeding of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) paralarvae using *Artemia*: effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261: 817-822.
- Iglesias J., F.J. Sánchez, J.G.F. Bersano, J.F. Carrasco, J. Dhont, L. Fuentes, F. Linares, J.L. Muñoz, S. Okumura, J. Roo, T. van der Meeren, E.A.G. Vidal & R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266: 1-15.
- Iwasaki M. & R. Harada. 1985. Proximate and amino acid composition of the roe and muscle of selected marine species. *Journal of Food Science*, 50: 1585-1587.
- Kim E., P. Goraksha-Hick, L. Li, T.P. Neufeld & K.L. Guan. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature Cell Biology*, 10: 935-945.
- Lape R., D. Colquhoun & L.G. Sivilotti. 2008. On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature*, 454: 722-727.
- Lee P.G. 1994. Nutrition of cephalopods: fuelling the system. *Marine and Freshwater Behaviour Physiology*, 25: 35-51.
- Lehninger A.L., M. Cox & D.L. Nelson. 2008. Principles of Biochemistry, W.H. Freeman, New York, USA.
- Lindsey S.M. & J. Rutter. 2008. Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139 B: 543-559.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Mommsen T.P. & P.W. Hochachka. 1981. Respiratory and enzymatic properties of squid heart mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 120: 345-350.
- Mommsen T.P., C.J. French, B. Emmett & P.W. Hochachka. 1982. The fate of arginine and proline carbon in squid tissues. *Pacific Science*, 36: 343-348.
- Mommsen T.P., P.W. Hochachka & C.J. French. 1983. Metabolism of arginine, proline and ornithine in tissues of the squid, *Illex Illecebrosus*. *Canadian Journal of Zoology*, 61: 1835-1846.
- Morillo-Velarde P., J. Cerezo-Valverde, R.M. Serra-Llinares & B. García-García. 2011. Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Molluscan Studies*, 77: 318-320.
- O'Dor R.K., R. Boucher-Rodoni, M.J. Wells & J. Wells. 1984. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine Behavior & Physiology*, 11: 239-258.
- Okumura K., A. Kurihara, A. Iwamoto & T. Takeuchi. 2005. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture*, 244: 147-157.
- Quintana D., P. Domingues & S. García. 2008. Effects of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*, 280: 161-164.

- Rocca E. & F. Ghiretti. 1958. Purification and properties of *D*-glutamic acid oxidase from *Octopus vulgaris* Lam. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 77: 336-349.
- Rosa R., J. Pereira & M.L. Nunes. 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to giant squid, *Architeuthis* sp. *Marine Biology*, 146: 739-751.
- Rosas C., J. Tut, J. Baeza, A. Sánchez, V. Sosa, C. Pascual, L. Arena, P. Domingues & G. Cuzon. 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, 275: 291-297.
- Rosas C., A. Valero, C. Caamal-Monsreal, I. Uriarte, A. Farias, P. Gallardo, A. Sánchez & P. Domingues. 2013. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research*, 44: 1029-1044.
- Ruiz-Capillas C., A. Moral, J. Morales & P. Montero. 2002. Characterisation of non-protein nitrogen in the cephalopods volador (*Illex coindetii*), pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrhosa*). *Food Chemistry*, 76: 165-172.
- Shukla A. & B.T. Mossman. 2008. Cell signaling by oxidants: pathway leading to activation of mitogenactivated protein kinase (MAPK) and activator protein-1 (AP-1). *Current Topics in Membranes*, 61: 191-209.
- Solorzano Y., M.T. Viana, L.M. López, J.G. Correa, C.C. True & C. Rosas. 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. *Aquaculture*, 289: 84-90.
- Storey K.B., J.H.A. Fields & P.W. Hochachka. 1978. Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, *Loligo pealeii*: role of the enzyme in energy production from amino acids. *Journal of Experimental Zoology*, 205: 111-118.
- Stryer L. 1995. Degradación de aminoácidos y ciclo de la urea. In: Bioquímica, 4<sup>th</sup> edition (ed. by Freeman W.H. & Co., J.M. Macarulla), pp. 629-652, 1009. Editorial Reverté SA, Barcelona, Spain.
- Stryer L., J.M. Berg & J.L. Tymoczko. 2002. Biochemistry, Freeman W.H. & Co., New York, USA.
- Stuart J.A. & J.S. Ballantyne. 1996. Correlation of environment and phylogeny with the expression of  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase in the mollusca. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 114: 153-160.
- Stuart J.A., E.L. Ooi, J. McLeod, A.E. Bourns & J.S. Ballantyne. 1998. *D*- and *L*- $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase and the evolution of ketone body metabolism in gastropod mollusks. *The Biological Bulletin*, 195: 12-16.
- Tait R.W. 1986. Aspects physiologiques de la sénescence post reproductive chez *Octopus vulgaris*. Ph. D. Thèse L'Université Paris VI.
- Vidal E.A.G., F.P. DiMarco, J.H. Wormuth & P.G. Lee. 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bulletin of Marine Science*, 71: 915-931.
- Vidal E.A.G., F.P. DiMarco & P.G. Lee. 2006. Effects of starvation and recovery on the survival, growth and RNA/DNA ratio in loliginid squid paralarvae. *Aquaculture*, 260: 94-105.

- Villanueva R., J. Riba, C. Ruíz-Capillas, A.V. González & M. Baeta. 2004. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effects of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*, 242: 455-478.
- Zar J.H. 1984. Multisample hypotheses: the analysis of variance. In: *Biostatistical Analysis*, 2<sup>nd</sup> edn (ed. by Kurtz B.), pp. 718. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, NJ.
- Zlatanov S., K. Laskaridis, C. Feist & A. Sagredos. 2006. Proximate composition, fatty acid analysis and protein digestibility-corrected amino acid score of three Mediterranean cephalopods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50: 967-970.

## CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA PARCIAL DE JUGO GÁSTRICO Y GLÁNDULA DIGESTIVA DE *Octopus vulgaris*

### 7.1. Resumen

Este trabajo describe la caracterización de la actividad proteasa del jugo gástrico (JG) y la glándula digestiva (GD) de *Octopus vulgaris* dentro del rango de pH 2 a 12, y temperaturas entre 10 y 70 °C. La actividad proteasa total del jugo gástrico mostró dos picos, uno a pH 3 y otro a pH 8; en la glándula digestiva también se obtuvieron dos picos, a pH 2 y pH 10. Las enzimas de la GD son más estables a cambios de pH en el medio que las del JG. La actividad total de proteasas ácidas y alcalinas del JG de *O. vulgaris* fue mayor a 30 y 50 °C, respectivamente, mientras que para la GD, la actividad de proteasas ácidas fue mayor a 20°C y no se encontraron diferencias entre temperaturas para proteasas alcalinas. Una alta termo-estabilidad para proteasas ácidas del JG se observó tras 30 min en muestras preincubadas a 40 °C. Para proteasas alcalinas, se observó actividad residual alta cuando los extractos se preincubaron a 25 y 40 °C tras 30 min. En la GD, la alta termo-estabilidad de enzimas ácidas fue registrada en extractos a 25 °C tras 50 min de preincubación. Las proteasas alcalinas preincubadas a 60 °C redujeron su actividad un 60% tras 10 minutos. En los extractos enzimáticos del JG se registró una inhibición alta cuando reaccionaron con PMSF (73 %), EDTA (77 %) y Pepstatina A (63%). Para el caso de la GD, la inhibición alta se observó con PMSF (82 %), y una inhibición intermedia de la actividad enzimática fue registrada con EDTA (53 %), E64 (46 %) y TPCK (39 %). El resto de los inhibidores testados mostraron un efecto inhibitor más bajo. Tanto el JG como la GD muestran un perfil electroforético con bandas proteicas, principalmente, de bajo peso molecular. Se observa actividad enzimática en proteasas alcalinas del JG con peso molecular de 20,1 KDa. Así, parece ser que la GD y el JG poseen una batería de enzimas digestivas formada, principalmente, por serin-proteasas y metaloproteasas en medio alcalino y aspártico-proteasas en medio ácido.

**Palabras clave:** Enzimas digestivas · Jugo gástrico · Glándula digestiva · Pulpos · Proteasas · pH · Temperatura

## 7.2. Introducción

*Octopus vulgaris* es una especie con un alto valor económico, y un elevado potencial para la diversificación en acuicultura debido a su rápido crecimiento y sus altas tasas de crecimiento (Vaz-Pires *et al.*, 2004; Iglesias *et al.*, 2007). Actualmente, el engorde de *O. vulgaris* se lleva a cabo en Galicia (NE de España), pero la viabilidad económica es baja debido a la inexistencia de dietas artificiales y a la dependencia de juveniles capturados del medio natural (Domingues *et al.*, 2010), que son los dos cuellos de botella más importantes para el cultivo a gran escala de cefalópodos (Domingues *et al.*, 2006).

Con el fin de diseñar con éxito dietas artificiales para cefalópodos, su particular metabolismo debe ser considerado. El animal debe ser capaz de equilibrar sus ganancias a partir de la dieta frente a sus costes metabólicos, con el fin de destinar una óptima distribución de la energía excedente para el crecimiento somático y, más tarde, para la reproducción. Para ello, el animal debe alimentarse con una dieta correctamente equilibrada a sus necesidades metabólicas a una temperatura dada (Rosas *et al.*, 2013).

El conocimiento de la fisiología digestiva, y en particular de la forma en que operan las enzimas digestivas, es de gran importancia para el desarrollo de dietas artificiales. Al constar los cefalópodos de un metabolismo altamente dependientes de las proteínas (Lee, 1994), las enzimas proteolíticas son determinantes en la digestión y en la disponibilidad de nutrientes. Uno de los principales parámetros que afectan a la actividad enzimática es el pH, ya que determina la estructura enzimática y su capacidad para transformar sustratos para necesidades energéticas (Murray *et al.*, 2001). Otro parámetro muy importante que influye sobre las enzimas es la temperatura describiéndose como la temperatura óptima aquella a la cual la enzima no solamente muestra una alta actividad, sino también una alta estabilidad a lo largo del tiempo (Álvarez-González. 2003).

Los cefalópodos poseen una digestión muy eficiente (Boucher-Rodoni *et al.*, 1987), dividida en dos fases, una extracelular y otra intracelular. La intracelular se lleva a cabo en la glándula digestiva mientras que la extracelular es el resultado de la degradación del alimento por la actividad de las enzimas que forman el jugo gástrico. La actividad enzimática digestiva refleja el metabolismo del animal. Publicaciones anteriores sobre caracterización enzimática de las especies muestran variaciones dependiendo de la fase de vida. En la etapa larvaria, trabajos anteriores (Boucaud-Camou, 1974, 1982; Perrin *et al.*, 2004; Le Bihan *et al.*, 2006) han identificado las enzimas fosfatasa ácida, quimotripsina, proteasa, lipasa y amilasa

en la glándula digestiva de sepia. En cuanto a la fase juvenil – adulto, Donaubauer & Schipp (1978) identificó las enzimas malato deshidrogenasa, monoamina oxidasa, fosfatasa ácida,  $\beta$ -glucoronidasa, adenosina trifosfatasa, anhidrasa carbónica, catalasa, transaminasa glutámico oxalacética, colinesterasa y fosfatasa alcalina. Dependiendo de la actividad enzimática que exista, el metabolismo pueda inferirse.

El conocimiento de la actividad enzimática digestiva en cefalópodos es limitado pero se trata de una información básica para el diseño de dietas. Estudios recientes demostraron que las enzimas digestivas intracelulares en *Dosidiscus gigas* poseen una mayor actividad a pH 4,5 (Cárdenas & Hard, 2009), mientras que en *S. officinalis*, Perrin (2004) observó una actividad óptima a pH entre 8 – 8,5. La última revisión sobre digestión en cefalópodos fue presentada por Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni (1983) hace más de 30 años. En ese estudio, los autores indicaron que en *O. vulgaris* se identificaron distintas proteasas, incluyendo proteasas alcalinas (como quimotripsina y tripsina principalmente en las glándulas salivares) y enzimas tipo catepsinas (en jugo gástrico). Muchas preguntas se plantearon en dicho estudio, incluyendo si las proteasas ácidas estaban o no presentes en el jugo gástrico o si diferentes especies de cefalópodos podrían tener distintas enzimas digestivas. También Budelmann *et al.* (1997) proporcionó detalles sobre características funcionales e histomorfológicas del tracto digestivo, demostrando así su complejidad. Existen también diversos estudios realizados con *O. maya* para el diseño de una dieta artificial. En primer lugar, Martínez *et al.* (2011a) sugirió que las principales proteasas de la glándula digestiva fueron proteinasas aspárticas (posiblemente Catepsina D) y algunas de ellas estaban presentes en el jugo gástrico. En este artículo, los autores concluyeron que la digestión extracelular de *O. maya* tiene lugar en un ambiente ácido, en torno a pH 6. Además, observaron que la digestión intracelular de la glándula digestiva se desarrolló a pHs entre 3-4, donde catepsinas D podrían ser las enzimas más importantes para *O. maya*. Estas hipótesis fueron probadas al evaluar el pH del jugo gástrico durante la digestión (Martínez *et al.*, 2012). En este trabajo, demostraron que el pH varía a lo largo del tracto digestivo de acuerdo con el tiempo postprandrial, siguiendo el tránsito del alimento. Al principio, el pH en el buche fue de 5, cambiando a 6 cuando el alimento llegó permitiendo activarse las enzimas ácidas e iniciando el proceso de digestión. Teniendo en cuenta que la formación del quimo se desarrolla en un ambiente ácido y con la participación de catepsinas como enzimas principales durante el proceso, fue diseñada una dieta artificial exitosa (Martínez *et al.*, 2014). Dicha dieta se elaboró considerando que la actividad de las enzimas catepsinas se reduce cuando los ingredientes cocinados se incluyen en la dieta,

inhibiendo la capacidad de digestibilidad de los pulpos. Recientes estudios con el tracto digestivo de *O. vulgaris* muestran que las enzimas de la glándula digestiva de esta especie tiene su óptimo a pH 4, confirmando la naturaleza ácida de estas enzimas (Hamdan *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que la digestión ácida de los pulpos podría ser un proceso generalizado.

El proceso digestivo en pulpos comienza con la presa, gracias a la participación de enzimas salivares (Morishita, 1972; Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983). Después el quimo se forma en el buche a partir del cual el jugo gástrico, conjunto de enzimas, realiza la digestión extracelular a lo largo del tracto digestivo hasta que es absorbido en la glándula digestiva. Allí ocurre la digestión intracelular donde el quimo se transforma en moléculas para ser transportadas por la hemolinfa a los distintos órganos del animal (Boucaud-Camou *et al.*, 1976; Heras & Pollero, 1990). Hasta la fecha existen pocos estudios donde las características enzimáticas del jugo gástrico de especies de pulpo se hayan estudiado, siendo esta mezcla de enzimas el primer contacto con al alimento ingerido al principio de la digestión. No se cuenta con suficiente información en *O. vulgaris* pero en otros cefalópodos se ha observado que las enzimas digestivas realizan un proceso continuo sugiriendo que las enzimas producidas para la digestión intracelular forman parte del paquete enzimático que participa en la digestión extracelular como jugo gástrico (Boucher-Rodoni *et al.*, 1987; Martínez *et al.*, 2011b; Semmens, 2002).

Considerando la gran importancia del conocimiento de la fisiología digestiva como base para el desarrollo de dietas artificiales adecuadas para cefalópodos, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la actividad proteasa del jugo gástrico y la glándula digestiva de *O. vulgaris* con la intención de determinar el pH y la temperatura óptimas de las proteasas digestivas y de buscar sus características bioquímicas usando inhibidores enzimáticos. Toda esta información dará una mejor idea de la forma en la que el proceso digestivo se desarrolla en *O. vulgaris* ayudando en la búsqueda de la mejor manera de alimentar a esta especie en condiciones de cautividad.

### 7.3. Material y Métodos

#### Captura y condiciones de aclimatación

Para la captura de pulpos juveniles (< 1 kg) en la costa de Huelva (Sur de España) se usaron redes de arrastre. Inmediatamente fueron transportados hasta las instalaciones del Centro de Cultivos Marinos IFAPA “Agua del Pino”, Cartaya, Huelva (España) para facilitar la investigación. Los animales fueron aleatoriamente distribuidos en tanques cilindro-cónicos de 80 L cada uno. Se consideró suficiente un periodo de cinco días para su aclimatación a condiciones de laboratorio. Los pulpos fueron alimentados *ad libitum* con calamar (*Loligo gahi*).

#### Preparaciones enzimáticas y cuantificación proteica

Antes del muestreo, los pulpos estuvieron en ayunas durante 24 horas. Para obtener suficiente volumen de jugo gástrico, se mostró comida a los animales dentro de una trampa transparente 30 minutos antes del muestreo previniendo así capturas del alimento y estimulando la producción del jugo. De esta forma, se evitaron interferencias entre proteínas de la comida y proteínas del jugo gástrico o glándula digestiva.

Tras el tiempo de estimulación, los pulpos fueron sacrificados después de ser anestesiados durante 2 minutos en hielo. El jugo gástrico se recogió tras realizar una incisión en el estómago de cada animal. Las muestras de glándula digestiva se tomaron en el mismo muestreo preservándolas en nitrógeno líquido hasta su análisis. En total, para obtener JG y GD se muestrearon 20 y 3 pulpos, respectivamente. Inmediatamente después del muestreo, se midió el pH del JG con un pHmetro usando un microelectrodo. Después, los jugos gástricos fueron transferidos a microtubos de 1,7 mL y centrifugados a 13000 g durante 5 minutos a 4 °C para separar sólidos. Una pequeña submuestra del sobrenadante se utilizó para medidas de actividad enzimática inmediata. El resto de los sobrenadantes se separaron en alícuotas de 100 µL cada una y se almacenaron a -80 °C. En el caso de las GD, éstas fueron extraídas y pesadas enteras. Después, muestras de 60 mg (peso húmedo) fueron mezcladas con 1 mL de agua destilada (3 réplicas por pulpo), homogenizadas y centrifugadas a 13000 g durante 30 minutos a 4 °C para separar sólidos. Los sobrenadantes se separaron en alícuotas de 100 µL cada una y se almacenaron a -80 °C. Antes de realizar las evaluaciones enzimáticas, las muestras fueron centrifugadas de nuevo a 13000 g durante



15 minutos a 4 °C. Durante las evaluaciones enzimáticas, los sobrenadantes usados de GD y JG se mantuvieron siempre en hielo.

La proteína soluble total se determinó de acuerdo a Bradford (1976) con el método del colorante azul de Coomassie y albúmina bovina (1 mg mL<sup>-1</sup>) como estándar.

### Actividad enzimática

La actividad de proteinasas ácidas a pH 3 se evaluó según el método de Anson (1938) modificado, usando una solución de hemoglobina bovina (Sigma H2625) al 0,5 % (peso/volumen; p/V) en 100 mM de tampón universal (Stauffer, 1989). La actividad de proteinasas alcalinas de los extractos a pH 8 se midió según el método de Kunitz (1947) modificado por Walter (1984), utilizando como sustrato caseína (MP Biomedicals 101289) al 0,5 % (p/V) en 100 mM de tampón universal. En ambos ensayos, 0,25 mL de solución sustrato fue mezclada en un tubo de reacción con 0,25 mL de tampón universal y 20 µL de preparación enzimática (diluciones 1:10 y 1:5 para jugo gástrico y glándula digestiva, respectivamente) e incubados a 25 °C durante 30 minutos. Después, la reacción se paró añadiendo 0,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % (p/V) y enfriándolas en hielo durante 15 minutos. El sustrato precipitado no digerido se separó por centrifugación a 13000 g por 15 minutos. La absorbancia de los sobrenadantes fue medida mediante espectrofotómetro a 280 nm. Como muestra control (o blanco) se emplearon una mezcla de 20 µL de agua destilada y 0,5 mL de solución sustrato (hemoglobina o caseína para ensayos de actividad de proteasas ácidas y alcalinas, respectivamente). La actividad enzimática de las proteasas totales fue referida en UI mg<sup>-1</sup> de proteína ( $U = \text{Abs}_{280} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ ).

Se utilizaron los métodos de Charney & Tomarelli (1947) y Delmar *et al.*, (1979) para tripsina y quimotripsina, respectivamente. La actividad de tripsina en los extractos fue medida usando 1 mM de BAPPNA (N  $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide) como sustrato, disuelto en 100 mM de tampón universal Stauffer a pH 8. Para medir actividad de quimotripsina se usó como sustrato 1,142 mM de SAPNA (Succinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-nitroanilide) disuelto en 100 mM de tampón universal Stauffer a pH 8. En ambos ensayos, 833 µL de solución sustrato se mezclaron con 167 µL de preparación enzimática (dilución 1:100) en un tubo de reacción, y se incubaron durante 1 hora a 25 °C ó 30 minutos a 37 °C, para tripsina y quimotripsina respectivamente. La absorbancia de los

sobrenadantes fue medida por espectrofotómetro a 410 nm. Una mezcla de 167  $\mu\text{L}$  de agua destilada con 833  $\mu\text{L}$  de solución sustrato se usó como muestra control (o blanco). La actividad enzimática de las proteasas totales será referida en  $\text{UI mg}^{-1}$  de proteína ( $\text{U} = \text{Abs}_{410} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ ).

### **Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

El pH óptimo para la actividad de proteasas se determinó usando el tampón universal Stauffer (1989) en el rango de pH 2 a 12. Para pHs 2 – 6, se utilizó como sustrato hemoglobina (0,5 % (p/V) en 100 mM de Stauffer, y para pHs 7 – 12 el sustrato usado fue caseína (0,5 % (p/V) en 100 mM de Stauffer. Los análisis con ambos sustratos se realizaron según lo descrito anteriormente para las actividades de proteasas ácidas y alcalinas. Para tripsina y quimotripsina (JG) los efectos del pH se determinaron usando tampón universal y BAPNA y SAPNA como sustratos, respectivamente, para pHs 6 – 12. Los análisis se llevaron a cabo según lo descrito para actividad de tripsina y quimotripsina.

### **Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática**

El efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad enzimática fue probado mediante preincubación de los extractos enzimáticos en el rango de pH 2 a 12 durante 120 minutos, seguido de la medición de la actividad residual. Dicha actividad fue comparada frente a muestras control las cuales se preincubaron con agua destilada. Para el rango pH 2 – 6, se usó como sustrato hemoglobina (0,5 % (p/V) en 100 mM de Stauffer, y para pHs 7 – 12 el sustrato usado fue caseína (0,5 % (p/V) en 100 mM de Stauffer. Los análisis con ambos sustratos se realizaron según lo descrito anteriormente para las actividades de proteasas ácidas y alcalinas. La actividad residual fue medida a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 minutos de preincubación y se expresó como porcentaje de actividad respecto al control.

### **Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática**

Las temperaturas óptimas para proteasas ácidas y alcalinas fueron determinadas mediante incubación durante 30 minutos de los extractos enzimáticos a su pH óptimo previamente descrito, con hemoglobina o caseína como sustratos para proteasas ácidas o

alcalinas respectivamente, a las temperaturas 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C. Los análisis con ambos sustratos se realizaron según lo descrito anteriormente.

### **Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática**

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad enzimática fue probado mediante preincubación de los extractos enzimáticos a diferentes temperaturas (25, 40 y 60°C) durante 70 minutos, seguido por la medición de la actividad residual como previamente se ha descrito. La actividad residual fue medida a los tiempos 0, 10, 30, 50 y 70 minutos y se comparó frente a muestras control preincubadas a 25 °C.

### **Efectos de inhibidores sobre la actividad enzimática**

Para evaluar las principales clases de enzimas proteolíticas, siguiendo los métodos descritos por Dunn (1989) y García-Carreño (1992), los extractos enzimáticos fueron incubados con inhibidores específicos (Alarcón *et al.*, 1998). Los inhibidores específicos utilizados fueron:

- PMSF (Fenilmetilsulfonil fluorida) 100 mM en DMSO (dimetilsulfóxido) (inhibidor de serin-proteasas).
- TLCK (Tosil-Lys-clorometil cetona) 10 mM en HCl 1 mM (inhibidor de tripsina).
- TPCK (Tosil-Phe-clorometil cetona) 5 mM en etanol (inhibidor de quimotripsina).
- E-64 (Epoxisuccinil leucilamida-4-guanidinio-butano) 1 mM en DMSO (inhibidor de cistein-proteasas).
- EDTA (Ácido etilendiaminotetracético) 0,5 M (inactivador de metaloproteasas).
- Pepstatina A 1 mM en DMSO (inhibidor de aspartic-proteasas o proteasas ácidas).

Los extractos enzimáticos (20 µL) fueron mezclados con 0,5 mL de 100 mM de tampón Universal, pH 8 (JG) o pH 10 (GD), y 10 µL de cada solución stock de inhibidor. Se incubaron durante 60 minutos a 25 °C. En el caso de inhibidores de proteinasas aspárticas, el tampón universal se calibró previamente a pH 3 (JG) o pH 2 (GD). Tras la incubación, las muestras con cada inhibidor fueron analizadas como ya se ha descrito en el apartado anterior según se midiera actividad de proteasas ácidas o alcalinas. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. El análisis incluyó controles internos para los extractos

enzimáticos además de enzimas como controles positivos para cada clase de proteinasas (tripsina y quimotripsina para serin-proteasas, papaína como control de cistein-proteasas, carboxipeptidasa A para metaloproteasas y pepsina para proteasas ácidas). La actividad residual fue expresada como porcentaje de actividad respecto del control (extracto enzimático sin inhibidor). El porcentaje de inhibición fue calculado en base a la actividad sin inhibidor y la actividad residual medida.

## Electroforesis

Se llevaron a cabo SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) de las proteínas y enzimas presentes en las preparaciones enzimáticas de acuerdo a Laemmli (1970). Las electroforesis se realizaron al 12 % de poliacrilamida y 0,1 % de SDS en dispositivos para electroforesis verticales (Hoeffer SE250, tamaño de gel 8 x 10 x 0,075 cm). Las preparaciones de las muestras y los zimogramas de la actividad enzimática fueron hechos según García-Carreño *et al.* (1993). La preparación de los geles de resolución y de apilamiento se indica en la Tabla 7.1. Las muestras se diluyeron 1:2 (V/V) con tampón de muestra y un marcador proteico de bajo peso molecular. Diez  $\mu$ l de muestra y 5  $\mu$ l de marcador proteico de bajo peso molecular se cargaron en cada pocillo del gel. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 150 V y como máximo a 15 mA por gel a 3°C.

La composición y la masa molecular de las proteasas ácidas y alcalinas se evaluaron mediante la técnica SDS-PAGE-sustrato (García-Carreño *et al.*, 1993). Para la actividad de proteasas alcalinas, los geles fueron lavados con agua destilada durante 5 minutos y transferidos a una bandeja con 100 ml de caseína al 3 % (p/V) en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8. Los geles se empaparon con la solución de sustrato durante 30 minutos en un baño de hielo, sobre un agitador a baja velocidad para permitir que el sustrato penetre en los geles. Después, los geles se incubaron a baja velocidad durante otros 45 min a 25°C. Tras la incubación, los geles se lavaron con agua destilada durante 15 min y teñidos con 0,05% de Coomassie Azul Brillante en una solución 40% metanol – 10% ácido acético a temperatura ambiente, bajo baja agitación durante toda la noche. Tras este proceso, los geles fueron desteñidos con una solución 40% metanol – 7% ácido acético durante 30 min (García-Carreño *et al.*, 1993). Para la actividad de proteasas ácidas, tras la electroforesis los geles se sumergieron en una solución de HCl 1 mM durante 5 min varias veces hasta conseguir que el colorante azul del frente de bromofenol cambie a amarillo. Seguidamente

se sumergen los geles en tampón Gly-HCl 100 mM pH 3 durante 10 min. Después, se transfirieron a bandejas con 100 ml de una solución de hemoglobina al 0,25% (p/V) en tampón Gly-HCl 100 mM pH 3. Finalmente, los geles fueron incubados, teñidos y desteñidos con el mismo procedimiento descrito anteriormente (Navarrete *et al.*, 2006). En aquellos lugares donde las proteasas fueron localizadas, la digestión de la caseína o hemoglobina produjo una banda clara en el fondo azul del sustrato teñido y no digerido.

**Tabla 7.1.** Reactivos y protocolo de preparación para geles de electroforesis.

Reactivos	Gel de Resolución (12%)	Gel de Apilamiento (4%)*
Agua Bidestilada	4,18 ml	2,80 ml
Tampón Gel Resolución <sup>1</sup>	3,13 ml	-
Tampón Gel Apilamiento <sup>2</sup>	-	1 ml
Poliacrilamida <sup>3</sup>	5 ml	0,60 ml
SDS <sup>4</sup>	125 µl	45 µl
APS <sup>5</sup>	63 µl	22 µl
TEMED <sup>6</sup>	10 µl	10 µl
<b>Volumen Total</b>	12,508 ml	4,477 ml

<sup>1</sup> 1,5 M Tampón Tris-HCl, pH 8,8

<sup>2</sup> 0,5 M Tampón Tris-HCl, pH 6,8

<sup>3</sup> Poliacrilamida, 30,8% (p/V) en agua destilada. Acrilamida:bisacrilamida ≡ 30:0,8.

<sup>4</sup> Dodecil Sulfato de Sodio (10%)

<sup>5</sup> Persulfato de amonio (10%)

<sup>6</sup> N,N,N',N'- Tetrametilendiamina

\* Después de polimerizar el Gel de Resolución, éste es cubierto con isopropanol para crear una línea de superficie recta entre los geles de resolución y de apilamiento. Cuando se consigue la polimerización, el isopropanol es retirado y después se vierte el gel de apilamiento sobre el de resolución.

- Tampón de muestra (0,2 mg ml<sup>-1</sup> azul de bromofenol, 25% tampón de apilamiento, 20% Gly, 4% SDS y 51% agua destilada).

- Tampón de Electroforesis (25 mM tampón Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM Gly y 0,1% SDS)

### Inhibidores y SDS-PAGE-Sustrato

Para identificar las clases de proteasas, las preparaciones enzimáticas de proteasas ácidas y alcalinas fueron incubadas con y sin inhibidores específicos (10 µl de muestra y 10 µl de inhibidor) durante 30 min a 30°C antes de que las muestras fueran diluidas 1:2 (V/V) con tampón de muestra y evaluadas mediante la técnica SDS-PAGE-Sustrato descrita previamente. Los zimogramas con y sin inhibidores fueron analizados por la presencia o

ausencia de bandas activas (bandas claras). La enzima digerirá el sustrato excepto en aquellos lugares donde el inhibidor tenga restringida a la enzima (García-Carreño *et al.*, 1996). Los inhibidores específicos usados fueron: PMSF 100 mM en DMSO, TLCK 10 mM en HCl 1 mM, TPCK 5 mM en etanol, E-64 1 mM en DMSO, EDTA 0,5 M, y Pepstatina A 1 mM en DMSO.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se presentan como valor medio  $\pm$  desviación estándar (DE) (n=3). Todos los datos fueron analizados verificando una distribución normal mediante la prueba no paramétrica Kolmogórov-Sminov. Para verificar la homogeneidad de varianzas se utilizó el test de Levene realizando las transformaciones oportunas cuando fueron necesarias. Cuando no se obtuvieron una distribución normal y/o la homogeneidad de varianzas, los datos fueron sometidos a la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ANOVA de una vía) basada en transformación de rangos (Zar, 1984). Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía. Cuando se encontraron diferencias se aplicó la prueba de Tukey de comparación múltiple. Todos los ensayos estadísticos se llevaron a cabo con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI. En cada prueba estadística se consideró un nivel de confianza del 95 % (Zar, 1984).

## **7.4. Resultados**

### **Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

La actividad total de proteasas del JG de *O. vulgaris* mostró dos picos: uno a pH 3 y otro a pH 8 (Tabla 7.2, Fig. 7.1). La actividad máxima total de las proteasas de la GD se observó a pH 2, seguido de un pico a pH 10 y otro entre pH 6 y 7 (Tabla 7.2, Fig. 7.1).

La máxima actividad de quimotripsina del JG se obtuvo a pH 8, mientras que la máxima actividad para tripsina se registró a pH 7 y pH 10 (Tabla 7.2, Fig. 7.2).

### **Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática**

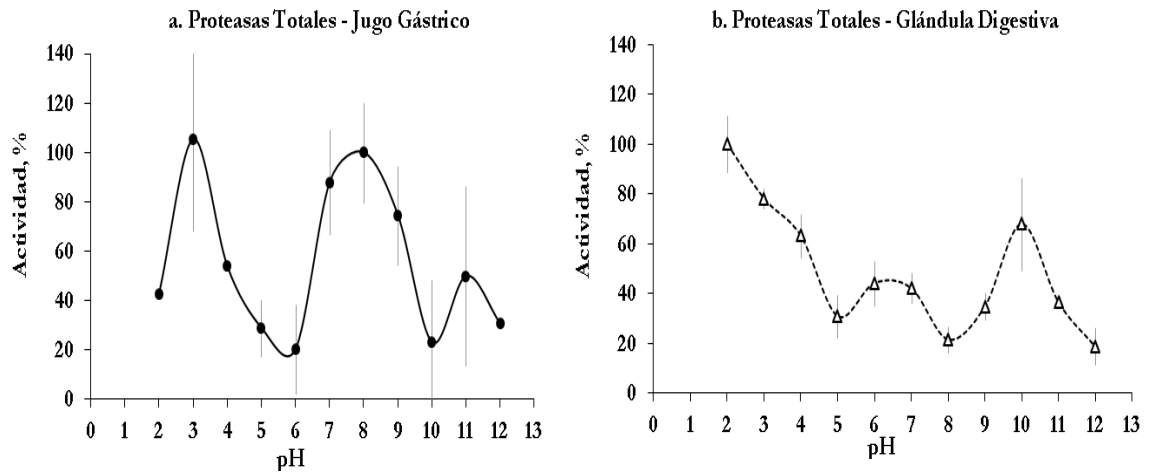
La figura 7.3 muestra los resultados obtenidos en relación al efecto del pH sobre la estabilidad enzimática de proteasas totales (Actividad Residual, %) en el jugo gástrico y la glándula digestiva de *O. vulgaris*. En ella se puede observar cómo las enzimas presentes en el

jugo gástrico (Fig. 7.3.a) son menos estables a distintos pHs que las presentes en la glándula digestiva (Fig. 7.3.b). Así, se puede observar en la Tabla 7.3 que en el JG no hay diferencias significativas entre actividades enzimáticas durante todo el tiempo de preincubación (120 min) para los pHs ácidos mientras que a pH 7 disminuye el % de actividad a partir de 60 min, a pH 9 a partir de 30 min, y a pH 12 a partir de 120 min. Para la GD sólo hay diferencias significativas a pH extremos (pH 2 y 12).

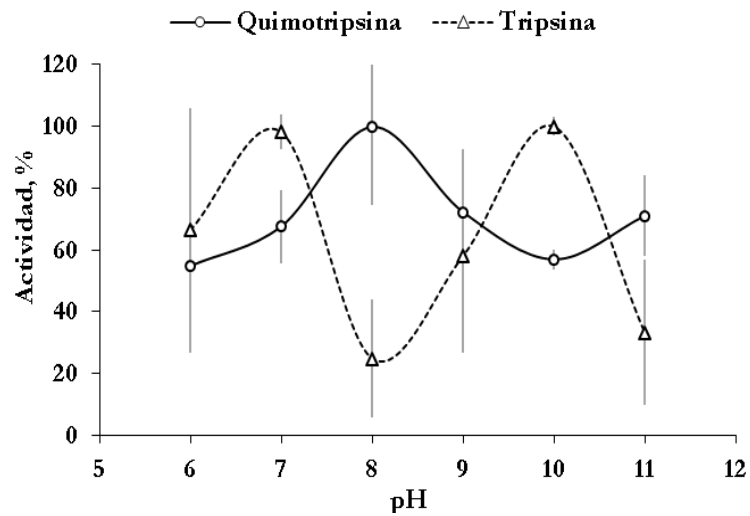
**Tabla 7.2** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de proteasas totales, tripsina y quimotripsina en jugo gástrico y proteasas totales de glándula digestiva de *Octopus vulgaris*.

Muestra	Jugo Gástrico			Glándula Digestiva	
	Proteasas	Tripsina	Quimotripsina	Proteasas	
pH	2	1526,60 ± 0,00 <sup>ab</sup>		11076,66 ± 1240,16 <sup>a</sup>	
	3	3746,52 ± 1311,90 <sup>d</sup>		8657,73 ± 455,58 <sup>b</sup>	
	4	1919,15 ± 0,00 <sup>abc</sup>		7005,43 ± 948,67 <sup>bc</sup>	
	5	1033,21 ± 407,89 <sup>a</sup>		3436,67 ± 945,50 <sup>def</sup>	
	6	727,98 ± 643,66 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,18 <sup>ab</sup>	3,00 ± 0,90 <sup>a</sup>	4905,91 ± 980,97 <sup>d</sup>
	7	3132,18 ± 747,23 <sup>cd</sup>	0,45 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,70 ± 0,65 <sup>a</sup>	4680,16 ± 699,08 <sup>d</sup>
	8	3558,33 ± 715,93 <sup>d</sup>	0,11 ± 0,09 <sup>c</sup>	5,48 ± 1,39 <sup>b</sup>	2406,12 ± 579,67 <sup>f</sup>
	9	2651,08 ± 702,09 <sup>bcd</sup>	0,26 ± 0,14 <sup>bc</sup>	3,96 ± 1,12 <sup>ab</sup>	3862,55 ± 607,82 <sup>de</sup>
	10	822,59 ± 901,49 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,12 ± 0,17 <sup>a</sup>	7533,51 ± 2057,71 <sup>c</sup>
	11	1780,71 ± 1286,37 <sup>ab</sup>	0,15 ± 0,11 <sup>bc</sup>	3,89 ± 0,71 <sup>ab</sup>	4066,96 ± 195,07 <sup>de</sup>
	12	1090,43 ± 0,00 <sup>a</sup>			2086,71 ± 803,20 <sup>ef</sup>

Los datos se muestran como valor medio (n=3) ± D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre distintos pHs para cada actividad enzimática medida (proteasas, tripsina y quimotripsina).

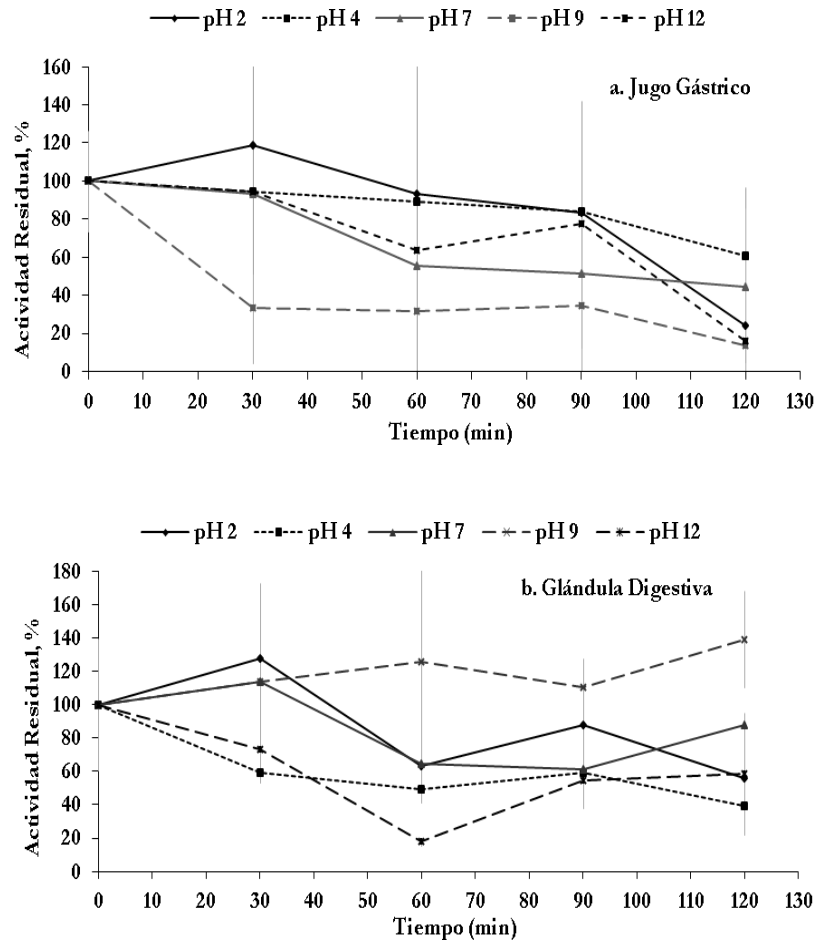


**Figura 7.1** Efecto del pH sobre la actividad de proteasas (%) en muestras de Jugo gástrico (a) y Glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media  $\pm$  D.E. (n=3).



**Figura 7.2** Efecto del pH sobre la actividad de Tripsina y Quimotripsina (%) en muestras de Jugo gástrico de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media  $\pm$  D.E. (n=3).





**Figura 7.3** Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática de proteasas totales (Actividad Residual, %) en jugo gástrico (a) y glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris* durante 120 minutos. Valores expresados como media  $\pm$  D.E. (n=3).

**Tabla 7.3** Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática de proteasas totales en jugo gástrico y glándula digestiva de *Octopus vulgaris* durante 120 minutos.

Tiempo Incubación (min)		0	30	60	90	120
Jugo Gástrico	Muestra pH					
	2	1526,60 ± 0,00	1814,40 ± 3664,14	1424,03 ± 1969,86	1269,75 ± 0,00	363,99 ± 321,83
	4	1919,15 ± 0,00	1813,31 ± 405,47	1708,65 ± 1572,03	1608,04 ± 810,09	1163,98 ± 696,33
	7	3132,18 ± 747,23 <sup>a</sup>	2917,27 ± 0,00 <sup>ab</sup>	1744,45 ± 988,08 <sup>ab</sup>	1608,46 ± 563,37 <sup>b</sup>	1395,94 ± 1285,10 <sup>b</sup>
	9	2651,08 ± 702,09 <sup>a</sup>	880,43 ± 768,91 <sup>b</sup>	844,28 ± 943,02 <sup>b</sup>	916,81 ± 981,27 <sup>b</sup>	364,74 ± 369,95 <sup>b</sup>
12	1090,43 ± 0,00 <sup>a</sup>	1029,23 ± 468,60 <sup>a</sup>	692,46 ± 690,16 <sup>ab</sup>	843,70 ± 705,67 <sup>ab</sup>	174,50 ± 118,03 <sup>b</sup>	
Glándula Digestiva	2	8080,00 ± 1178,04 <sup>a</sup>	10333,92 ± 3616,33 <sup>a</sup>	5113,06 ± 740,11 <sup>b</sup>	7094,61 ± 2836,55 <sup>ab</sup>	4536,67 ± 729,20 <sup>b</sup>
	4	16445,60 ± 3799,58	9724,69 ± 885,27	8127,82 ± 1283,52	9725,09 ± 3454,44	6513,67 ± 2694,95
	7	5340,80 ± 444,04 <sup>a</sup>	6833,28 ± 1739,41 <sup>b</sup>	3462,86 ± 1155,55 <sup>a</sup>	3281,79 ± 1079,89 <sup>a</sup>	4691,73 ± 402,84 <sup>ab</sup>
	9	3600,83 ± 117,59	4096,55 ± 2006,22	4525,85 ± 2370,48	3971,10 ± 625,13	5015,88 ± 1038,46
	12	6895,71 ± 2715,50 <sup>ab</sup>	5070,54 ± 1415,58 <sup>c</sup>	1227,16 ± 162,84 <sup>a</sup>	3763,85 ± 782,57 <sup>bc</sup>	4022,35 ± 2499,56 <sup>bc</sup>

Los datos se muestran como valor medio (n=3) ± D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos tiempos de incubación (minutos, min) para cada pH. La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas.

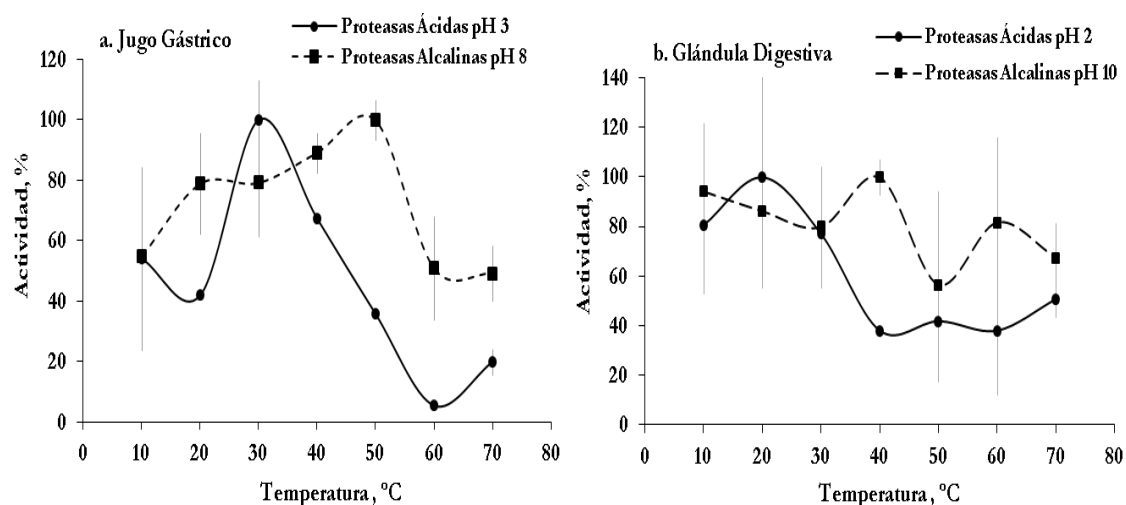
### Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La actividad total de proteasas ácidas y alcalinas del JG de *O. vulgaris* mostró altos valores a 30 y 50 °C, respectivamente (Fig. 7.4.a; Tabla 7.4). En la GD, la actividad máxima de proteasas ácidas se observó a 20 °C mientras que no se obtuvieron diferencias significativas en la actividad enzimática de proteasas alcalinas entre temperaturas, aunque la tendencia hacia una alta actividad se observó a 40 °C (Fig. 7.4.b; Tabla 7.4).

**Tabla 7.4** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de proteasas ácidas y alcalinas en jugo gástrico y glándula digestiva de *Octopus vulgaris*.

		Jugo Gástrico			Glándula Digestiva				
		T <sup>a</sup> °C			T <sup>a</sup> °C				
<b>Proteasas ÁCIDAS pH 3</b>	<b>10</b>	395,66	± 220,93	ab	<b>Proteasas ÁCIDAS pH 2</b>	<b>10</b>	5976,78	± 2051,15	ab
	<b>20</b>	306,89	± 0,00	ab		<b>20</b>	7416,12	± 3307,19	a
	<b>30</b>	730,18	± 96,07	a		<b>30</b>	5718,47	± 1146,70	ab
	<b>40</b>	492,39	± 0,00	ab		<b>40</b>	2812,64	± 181,74	b
	<b>50</b>	262,21	± 0,00	ab		<b>50</b>	3096,18	± 1793,66	b
	<b>60</b>	41,09	± 1,67	b		<b>60</b>	2811,12	± 1914,16	b
	<b>70</b>	146,37	± 31,53	b		<b>70</b>	3754,37	± 524,68	b
<b>Proteasas ALCALINAS pH 8</b>	<b>10</b>	2002,28	± 653,38	bc	<b>Proteasas ALCALINAS pH 10</b>	<b>10</b>	2839,97	± 834,14	
	<b>20</b>	2882,43	± 611,77	ab		<b>20</b>	2598,56	± 784,88	
	<b>30</b>	2893,01	± 641,10	ab		<b>30</b>	2404,41	± 741,58	
	<b>40</b>	3258,44	± 241,91	a		<b>40</b>	3013,63	± 211,60	
	<b>50</b>	3650,13	± 247,89	a		<b>50</b>	1699,73	± 1137,07	
	<b>60</b>	1861,66	± 628,86	c		<b>60</b>	2461,16	± 1042,66	
	<b>70</b>	1797,94	± 334,62	c		<b>70</b>	2032,62	± 415,45	

Los datos se muestran como valor medio (n=3) ± D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre distintas temperaturas (T<sup>a</sup>, °C) para cada actividad enzimática medida (proteasas ácidas y alcalinas de jugo gástrico y glándula digestiva). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas.



**Figura 7.4** Efecto de la temperatura (°C) sobre la actividad de Proteasas Ácidas y Alcalinas (%) en muestras de Jugo gástrico (a) y Glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media  $\pm$  D.E. (n=3).

### Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática

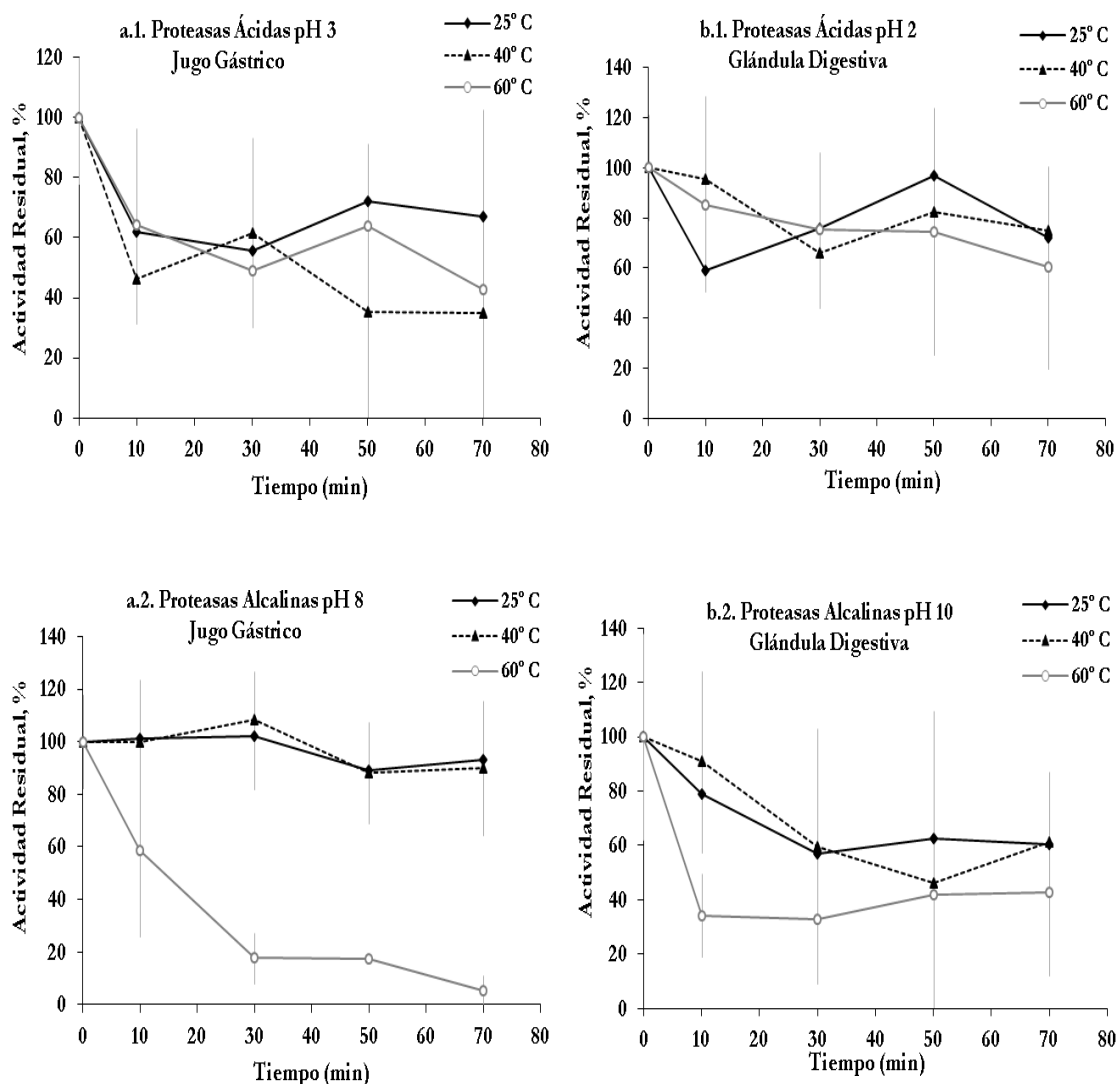
Una alta termo-estabilidad para proteasas ácidas de JG de *O. vulgaris* fue registrada tras 30 min cuando los extractos fueron pre-incubados a 40 °C. Cuando éstos fueron pre-incubados a 25 y 60 °C la actividad alta se registró tras 50 minutos. En el caso de proteasas alcalinas, la actividad residual alta se registró cuando los extractos enzimáticos fueron pre-incubados a 25 y 40 °C tras 30 min. Los extractos pre-incubados a 60 °C no mostraron una actividad residual máxima durante los 70 minutos de reacción (Tabla 7.5; Figura 7.5)

En la GD, la alta termo-estabilidad de enzimas ácidas se registró en extractos a 25 °C tras 50 min de pre-incubación. Tras 70 minutos, no hubo diferencias significativas entre actividades residuales de los extractos pre-incubados a 25, 40 o 60 °C (Fig. 7.5.b.1). Las proteasas alcalinas pre-incubadas a 60 °C redujeron su actividad residual un 60% tras 10 min; después, la actividad residual de estos extractos se mantuvo constante (Fig. 7.5.b.2). Los extractos pre-incubados a 25 y 40 °C disminuyeron su actividad tras 30 min y a partir de ahí se mantuvieron constantes hasta los 70 minutos de reacción (Fig. 7.5.b.2).

**Tabla 7.5** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de proteasas ácidas y alcalinas en jugo gástrico y glándula digestiva de *Octopus vulgaris*.

JUGO GÁSTRICO			GLÁNDULA DIGESTIVA			
Proteasas	T <sup>a</sup> °C	Tiempo Min	Proteasas	T <sup>a</sup> °C	Tiempo min	
ÁCIDAS pH3	25	0	264,92 ± 58,45	25	0	5979,62 ± 1178,26 <sup>a</sup>
		10	164,13 ± 64,51		10	3517,90 ± 346,68 <sup>b</sup>
		30	147,74 ± 66,87		30	4523,01 ± 852,73 <sup>ab</sup>
		50	191,12 ± 38,62		50	5805,21 ± 505,67 <sup>ab</sup>
		70	177,08 ± 94,40		70	4310,07 ± 1200,02 <sup>b</sup>
	40	0	264,92 ± 58,45 <sup>a</sup>	40	0	6101,09 ± 644,05
		10	122,10 ± 39,18 <sup>ab</sup>		10	5817,55 ± 2028,27
		30	163,38 ± 83,69 <sup>ab</sup>		30	4041,51 ± 1234,11
		50	93,65 ± 95,76 <sup>b</sup>		50	5035,81 ± 679,52
		70	92,02 ± 125,14 <sup>b</sup>		70	4568,55 ± 1112,62
	60	0	264,92 ± 58,45 <sup>a</sup>	60	0	5652,04 ± 1187,81
		10	170,45 ± 84,39 <sup>ab</sup>		10	4823,05 ± 1964,01
		30	129,33 ± 34,57 <sup>b</sup>		30	4255,98 ± 1758,84
		50	169,69 ± 71,80 <sup>ab</sup>		50	4219,72 ± 2800,55
		70	113,49 ± 52,23 <sup>b</sup>		70	3404,58 ± 2290,67
ALCALINAS pH8	25	0	1110,99 ± 159,72	25	0	2818,34 ± 501,84
		10	1123,38 ± 220,17		10	2225,44 ± 129,92
		30	1134,36 ± 225,72		30	1608,82 ± 1299,35
		50	990,61 ± 140,23		50	1765,02 ± 1118,46
		70	1033,44 ± 118,25		70	1706,95 ± 648,41
	40	0	1083,85 ± 193,16	40	0	3139,26 ± 1188,59
		10	1083,95 ± 255,94		10	2849,08 ± 1052,22
		30	1174,64 ± 201,33		30	1867,13 ± 170,64
		50	957,69 ± 209,42		50	1448,83 ± 1982,11
		70	974,56 ± 276,15		70	1922,16 ± 807,96
	60	0	1083,85 ± 193,16 <sup>a</sup>	60	0	4492,84 ± 572,46 <sup>a</sup>
		10	635,91 ± 356,97 <sup>b</sup>		10	1538,98 ± 686,05 <sup>b</sup>
		30	190,61 ± 105,83 <sup>c</sup>		30	1482,80 ± 1070,13 <sup>b</sup>
		50	186,01 ± 8,20 <sup>c</sup>		50	1879,75 ± 1530,00 <sup>b</sup>
		70	56,49 ± 62,63 <sup>c</sup>		70	1928,04 ± 1382,10 <sup>b</sup>

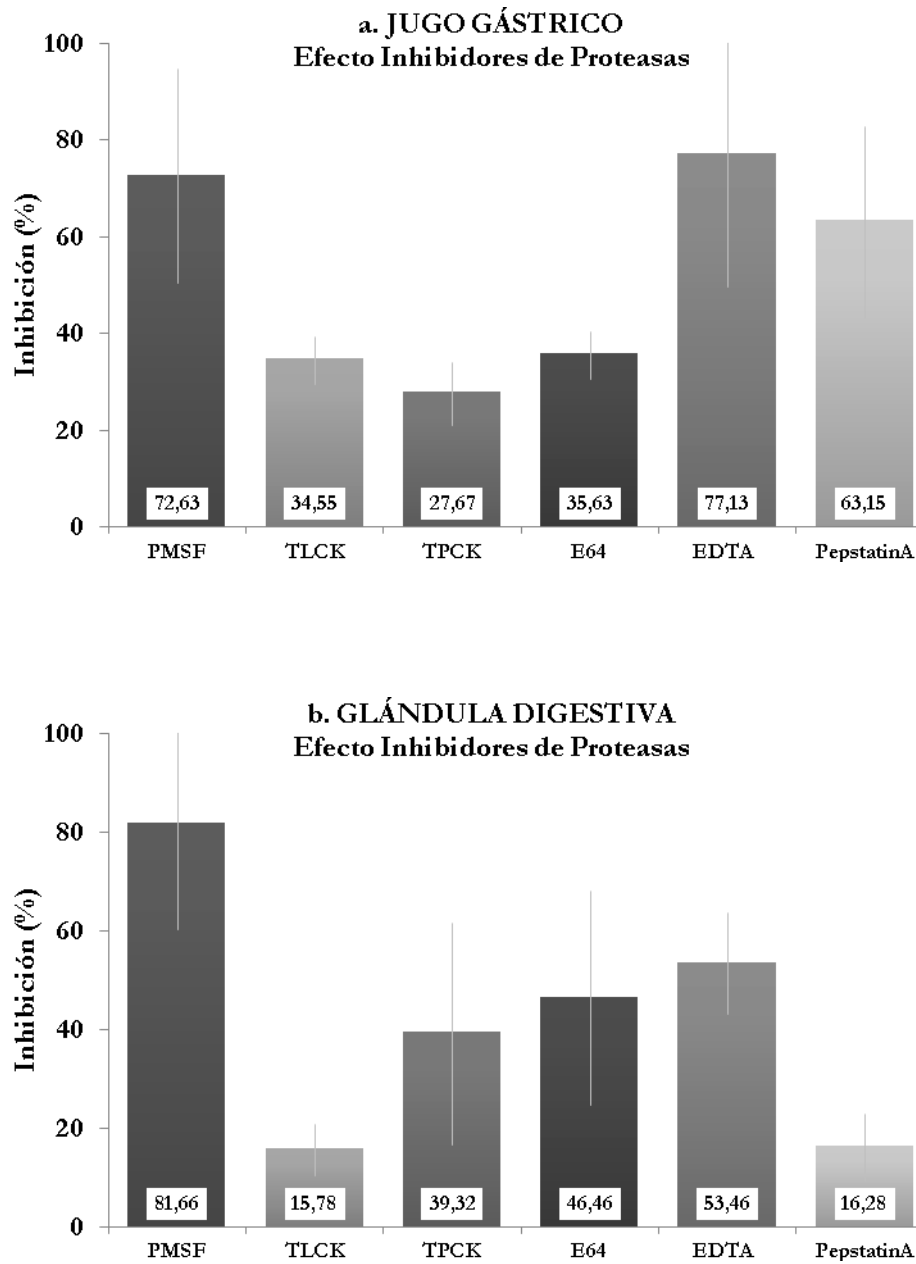
Los datos se muestran como valor medio (n=3) ± D.E. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre distintos tiempos (minutos, min) para cada actividad enzimática medida (proteasas ácidas y alcalinas de jugo gástrico y glándula digestiva) a diferentes temperaturas (T<sup>a</sup>, °C). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas.



**Figura 7.5** Termoestabilidad (Actividad Residual, %) de Proteasas Ácidas (1) y Alcalinas (2) a diferentes temperaturas (°C) y tiempos de preincubación (minutos, min) en extractos enzimáticos de Jugo gástrico (a) y Glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media  $\pm$  D.E. (n=3).

### Efectos de inhibidores sobre la actividad enzimática

Se registró una alta inhibición en extractos enzimáticos de JG cuando reaccionaron con PMSF (73%), EDTA (77%) y Pepstatina A (63%). El resto de los inhibidores testados mostraron una capacidad de inhibición baja sobre dichos extractos (Figura 7.6.a). En la GD, se observó inhibición alta al reaccionar los extractos con PMSF (82%). Una inhibición intermedia de la actividad enzimática pudo registrarse con EDTA (53%), E64 (46%) y TPCK (39%) (Fig. 7.6.b).



**Figura 7.6** Efecto (% de Inhibición) de diferentes tipos de inhibidores de proteasas sobre la actividad enzimática de Jugo gástrico (a) y Glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media  $\pm$  D.E. (n=3).

**Tabla 7.6** Efecto de diferentes tipos de inhibidores de proteasas sobre la actividad enzimática de Jugo gástrico y Glándula digestiva de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media  $\pm$  D.E. (n=3) en UI mg proteína<sup>-1</sup> y como % de Inhibición.

JUGO GÁSTRICO				GLÁNDULA DIGESTIVA			
Inhibidor	Actividad UI mg proteína <sup>-1</sup>			Inhibidor	Actividad UI mg proteína <sup>-1</sup>		
PMSF	Sin inhibidor	7615,92	$\pm$ 1759,79	PMSF	Sin inhibidor	4446,66	$\pm$ 4018,67
	Con inhibidor	2084,23	$\pm$ 632,48		Con inhibidor	815,31	$\pm$ 212,98
	% Inhibición	72,63	$\pm$ 22,04		% Inhibición	81,66	$\pm$ 21,33
TLCK	Sin inhibidor	7615,92	$\pm$ 1759,79	TLCK	Sin inhibidor	4446,66	$\pm$ 4018,67
	Con inhibidor	4984,45	$\pm$ 710,58		Con inhibidor	3745,20	$\pm$ 1247,13
	% Inhibición	34,55	$\pm$ 4,93		% Inhibición	15,78	$\pm$ 5,25
TPCK	Sin inhibidor	7615,92	$\pm$ 1759,79	TPCK	Sin inhibidor	4446,66	$\pm$ 4018,67
	Con inhibidor	5508,36	$\pm$ 1277,31		Con inhibidor	2698,02	$\pm$ 1538,91
	% Inhibición	27,67	$\pm$ 6,42		% Inhibición	39,32	$\pm$ 22,43
e64	Sin inhibidor	7615,92	$\pm$ 1759,79	e64	Sin inhibidor	4446,66	$\pm$ 4018,67
	Con inhibidor	4902,37	$\pm$ 675,18		Con inhibidor	<b>2380,93</b>	$\pm$ <b>1110,16</b>
	% Inhibición	35,63	$\pm$ 4,91		% Inhibición	<b>46,46</b>	$\pm$ <b>21,66</b>
EDTA	Sin inhibidor	7615,92	$\pm$ 1759,79	EDTA	Sin inhibidor	4446,66	$\pm$ 4018,67
	Con inhibidor	1741,57	$\pm$ 616,52		Con inhibidor	2069,35	$\pm$ 398,88
	% Inhibición	77,13	$\pm$ 27,31		% Inhibición	53,46	$\pm$ 10,31
PepstatinA	Sin inhibidor	4260,23	$\pm$ 2084,41	PepstatinA	Sin inhibidor	3078,50	$\pm$ 156,98
	Con inhibidor	1570,07	$\pm$ 492,08		Con inhibidor	2577,42	$\pm$ 1086,68
	% Inhibición	63,15	$\pm$ 19,79		% Inhibición	16,28	$\pm$ 6,86



## Electroforesis

Se obtuvieron zimogramas para jugo gástrico (A, B) y glándula digestiva (C) tanto en condiciones ácidas (B) como alcalinas (A, C), como podemos ver en la Figura 7.7. No pudo conseguirse un zimograma de la GD en condiciones ácidas donde al menos se observara una banda. En cuanto a la presencia de actividad enzimática en el jugo gástrico, se encontró una banda de 20,1 kDa para proteasas alcalinas (Fig. 7.7.D).

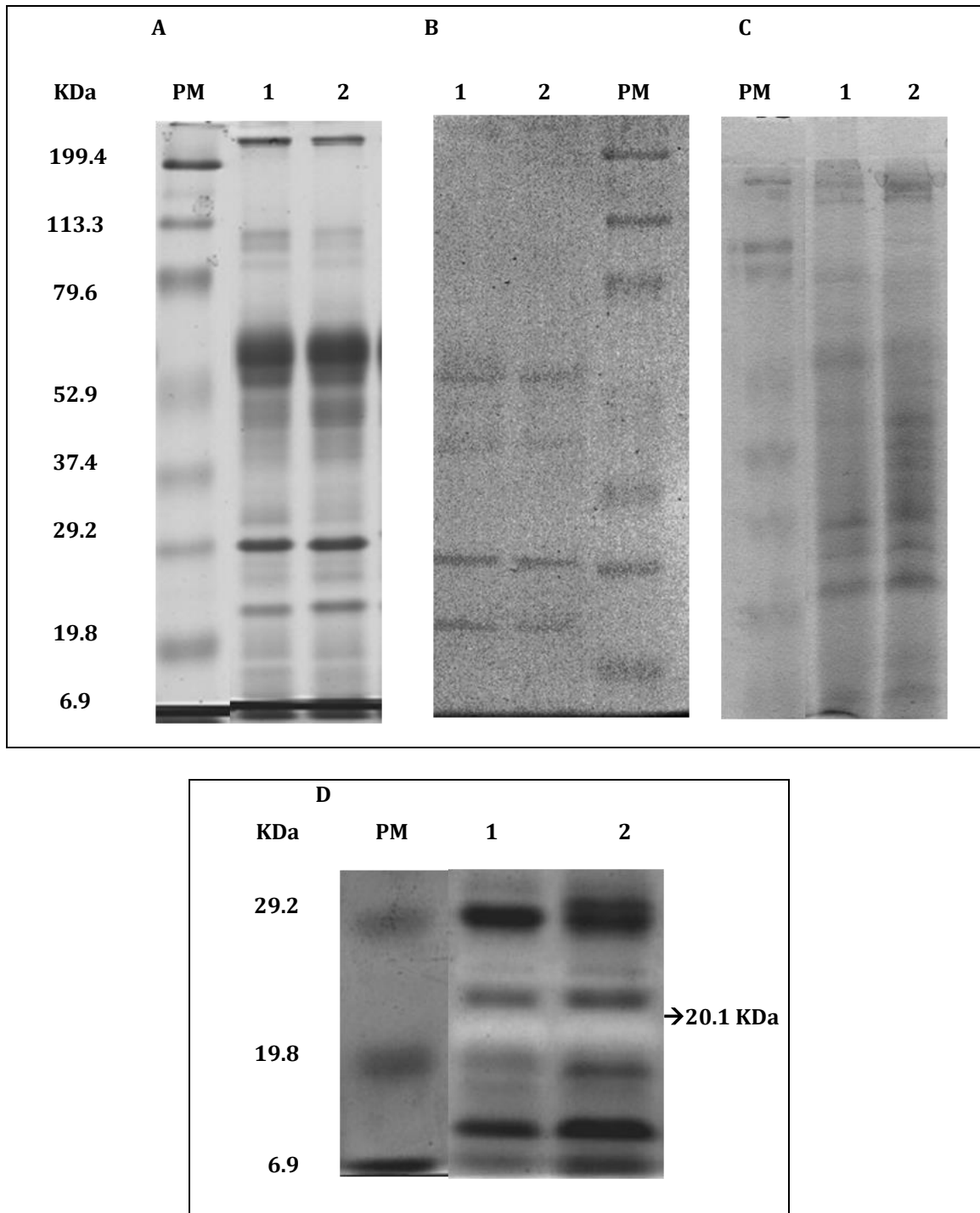
Respecto a la presencia de proteínas, se observó que en el JG en condiciones alcalinas (Fig. 7.7.A) aparecen varias bandas proteicas, destacando dos entre 20 y 30 KDa, tres entre 50 y 80 KDa, y dos más entre 80 y 115 KDa. En condiciones ácidas del JG (Fig. 7.7.B), el número de bandas proteicas fue menor destacando las dos bandas entre 20 y 30 KDa y otras dos entre 37 y 50 KDa. En el caso de la GD en condiciones alcalinas (Fig. 7.7.C), se registraron tres bandas entre 20 y 37 KDa, una a 50 KDa, otra a 80 KDa, y dos más sobre 200 KDa.

## Inhibidores y SDS-PAGE-Sustrato

No se obtuvieron zimogramas con presencia de actividad enzimática sin inhibición suficiente para poder ser comparados con zimogramas en presencia de inhibidores de una manera eficaz.

## 7.5. Discusión

Los resultados obtenidos mostraron que el JG de *O. vulgaris* posee tanto proteasas ácidas como alcalinas con actividades máximas a pH 7 - 9 para alcalinas y pH 3 para proteasas ácidas. De igual modo se observó que en la GD también hay presentes proteasas ácidas y alcalinas con picos de actividad máxima a pH 2 y 10 respectivamente. Estas observaciones indican que, como ocurre en otras especies, la digestión en *O. vulgaris* se produce en un ambiente digestivo donde las variaciones de pH sugieren que los pulpos se adaptan a la proteína animal que obtienen para maximizar su eficiencia. No hay dudas respecto a que la posibilidad de usar proteasas alcalinas y ácidas durante el mismo ciclo digestivo supone una ventaja adaptativa para este magnífico depredador carnívoro.



**Figura 7.7** Zimogramas de proteasas alcalinas (A, C, D) y ácidas (B) presentes en el jugo gástrico (A, B, D) y la glándula digestiva (C) de *Octopus vulgaris*. PM: Marcador Proteico; 1, 2: muestras de jugo gástrico o glándula digestiva.

A pesar de que *O. vulgaris* es una de las especies más estudiadas, tras Morishita (1972), este es el segundo estudio realizado para caracterizar las enzimas digestivas del jugo gástrico en esta especie de pulpo. Estudios previos (Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983), así como el más reciente de Hamdan *et al.* (2014) testaron enzimas de diferentes secciones del

tracto digestivo, pero sin incluir el jugo gástrico desde el estómago. Aunque dicho hecho no invalida los ensayos realizados por los autores mencionados, sugerimos que probablemente hayan obtenido diferentes resultados y conclusiones al medir las actividades en tejidos limpios sin presumiblemente influencia del jugo gástrico. En este sentido, Gestal *et al.* (2002) indicaron que para obtener una sección limpia del tracto digestivo, un tampón de fosfato (pH 7) debe utilizarse para lavar vigorosamente el tejido, antes del análisis enzimático.

Las proteasas digestivas presentes en especies marinas se han caracterizado de acuerdo a sus propiedades bioquímicas (Ribeiro *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2005; García-Esquivel & Felbeck, 2006). De hecho, hay estudios que demuestran que las enzimas digestivas en la glándula digestiva de los cefalópodos son esencialmente ácidas (calamar gigante y sepia) (Perrin *et al.*, 2004; Cárdenas-López & Haard, 2005; 2009). El papel de las proteasas ácidas en el pulpo durante la digestión se observó por primera vez por Morishita (1972), quien informó de que las enzimas del buche, estómago, intestino y ciego tenían tres valores óptimos de pH a 2,5, 6 y 7,5 para esas secciones del tracto digestivo. Mientras Morishita (1972) concluyó que las proteasas alcalinas de las glándulas salivales posteriores tienen un papel clave en la digestión externa de pulpo, Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni (1983) concluyeron que la fuerte actividad proteolítica con un pH ácido óptimo observado en la mayoría de las especies de cefalópodos investigados hasta ese momento, estaban relacionados con la presencia de enzimas catepsinas. En *O. maya* también se ha descrito un ambiente digestivo ácido, tanto en el jugo gástrico como en la glándula digestiva siendo identificadas proteinasas aspárticas (catepsina D) en ambos sitios (Martínez *et al.*, 2011a; Martínez *et al.*, 2011b).

Según Budelman *et al.*, (1997), las enzimas digestivas son liberadas por secreción apocrina en el lumen de los túbulos de la glándula digestiva donde se envían como zimógenos al tracto digestivo (Semmens, 2002; Martínez *et al.*, 2011a). La mayoría de estas enzimas son de naturaleza proteolítica y están presentes en lisosomas secretores (Morishita, 1972; Semmens, 2002; Martínez *et al.*, 2011b). Según varios investigadores, el número y el tamaño de estos lisosomas secretores están relacionados con la etapa digestiva o estado de la digestión (Boucher-Rodoni, 1973; Boucaud-Camou *et al.*, 1976; Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983; Semmens, 2002; Martínez *et al.*, 2011b). Durante la alimentación, el número de lisosomas secretores aumenta varias veces, dependiendo de la especie, lo que sugiere que las enzimas digestivas extracelulares se liberan en pulsos. Por lo tanto, es

posible inferir en la liberación y la actividad de las enzimas digestivas que también responden a la etapa del ciclo digestivo. En *O. maya*, *O. vulgaris* y *S. officinalis*, el diámetro y la densidad de los lisosomas secretores de la glándula digestiva cambia según el período postprandial con incrementos significativos a las 2 y 4 horas después de la alimentación, respectivamente (Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983; Martínez *et al.*, 2011b).

En el presente estudio se observó que en el jugo gástrico de *O. vulgaris*, las proteasas alcalinas mostraron una mayor actividad en comparación con las enzimas ácidas. Por el contrario, en la glándula digestiva se observó una alta actividad de proteasas totales ácidas. Se sugiere que en *O. vulgaris* existe un control de la forma en la que las enzimas se usan para la digestión intracelular y extracelular. Estos resultados contrastan con los obtenidos para *O. maya* explicando, al menos en parte, las diferencias en la forma en que cada especie puede utilizar diferentes tipos de alimentos (Martínez *et al.*, 2011a), o las diferencias relacionadas con el origen de los organismos. Estudios previos demostraron que la actividad enzimática de la GD de *Dosidicus gigas* cambia con las estaciones del año indicando que, cuando los animales salvajes se muestrean la estación del año es otro factor a considerar porque la historia nutricional de los animales afecta a la actividad de las enzimas digestivas (Ezquerro *et al.*, 2002). En este trabajo se observó que en *O. vulgaris* hubo dos picos de la tripsina en el jugo gástrico, uno con un pH de 7 y otra a un pH de 10 que sugiere una capacidad más amplia para digerir sustratos alcalinos que *O. maya*, que sólo mostró un pico a pH 8 para la tripsina (Martínez *et al.*, 2011a).

En nuestra investigación la temperatura óptima para proteasas ácidas (30 °C) del jugo gástrico de *O. vulgaris* resultó ser 20 °C más baja que la obtenida para proteasas alcalinas (50°C), mientras que en la glándula digestiva la temperatura óptima para proteasas ácidas fue de 20 °C y no se observaron diferencias en las enzimas alcalinas. Morishita (1972) obtuvo resultados similares informando que la temperatura óptima fue más alta para proteasas totales alcalinas que para las ácidas en la glándula digestiva de *O. vulgaris*. Entre las proteinasas ácidas identificadas en el jugo gástrico y la glándula digestiva de los cefalópodos se encuentran las catepsinas. En su método, Barret & Kirschke (1981) indicaron que las temperaturas óptimas para la catepsinas B, H y L fue de 40, 30 y 40 °C respectivamente, mientras que Komai *et al.* (2004) encontraron una temperatura óptima para la catepsina D de la GD del calamar común (*Todarodes pacificus*) a 40 °C. En *O. maya*, se obtuvo una temperatura óptima de 40 °C en el jugo gástrico para catepsinas donde D, L y H fueron identificadas (Rosas *et al.*, Datos no publicados). Todos estos resultados indican que las

proteasas ácidas poseen una temperatura óptima alrededor de 40 °C y, según los resultados obtenidos en el pescado (temperatura óptima a 40 °C para catepsinas B en peces *Lepeophtheirus salmonis*, Cunningham *et al.* (2010)), esta característica podría ser una característica más generalizada de las catepsinas.

Cuando la actividad enzimática del jugo gástrico y la glándula digestiva se midieron usando inhibidores enzimáticos, 73, 77 y 63 % de la actividad total en JG fue inhibida por PMSF, EDTA y Pepstatina A, respectivamente, y un 82 % fue inhibida en la GD por PMSF. Estos datos sugieren que el jugo gástrico está compuesto en su mayoría por serin-proteinasas (inhibida por PMSF) siendo estas enzimas uno de los componentes más importantes del paquete enzimático tanto del JG como de la GD, con metaloproteinasas y proteinasas tipo aspárticas también presentes. Esto demuestra que la tripsina, algunos metaloproteinasas y catepsinas D y/o E tienen papeles muy importantes en los primeros pasos de la digestión del pulpo, durante la formación del quimo. Es interesante destacar que un 35 y 28 % de las actividades tripsina y quimotripsina fueron inhibidas específicamente en el jugo gástrico siendo sólo un 39 % inhibida por TPCK en la GD, lo que indica que en el jugo gástrico la tripsina y la quimotripsina son las proteasas alcalinas más importantes, y solo la quimotripsina en la glándula digestiva. Entre las proteinasas ácidas, además de catepsinas D y E, se observó un 36 y 46 % de inhibición cuando se utilizó el inhibidor E-64 en JG y GD, respectivamente, lo que indica que las proteinasas ácidas como catepsina L podrían estar presentes tanto durante la formación del quimo como en la digestión intracelular de *O. vulgaris*.

Las proteasas del jugo gástrico de *O. vulgaris* son una mezcla entre proteasas ácidas y alcalinas donde ambas forman un potente jugo gástrico. Las proteasas ácidas (catepsinas D y E) son especialmente sensibles a la deshidratación debido a que estas enzimas requieren de una molécula de agua para activarse durante la formación del complejo enzima-sustrato. Por esa razón, para diseñar las dietas para *O. vulgaris* y otras especies de pulpo que tienen catepsinas en el jugo gástrico (*O. maya*, Martínez *et al.*, 2011a; Martínez *et al.*, 2011b) es necesario el uso de ingredientes con alto contenido en proteínas y que no hayan sufrido el proceso de deshidratación que ocurre generalmente durante la fabricación de productos de harina marinos. Los efectos negativos de ingredientes cocidos en dietas para *O. vulgaris* y otras especies de cefalópodos como *S. officinalis* y *O. maya* se demostró en el pasado (Domingues *et al.*, 2007; García-Garrido *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este presente estudio demuestran que otros ingredientes no cocidos deben ser utilizados para alimentar a esta especie de pulpo.

Según Martínez *et al.* (2011a) y Martínez *et al.* (2012), en la mezcla de enzimas presente en el JG y GD de *O. maya*, las proteínas muestran pesos moleculares entre 30 y 70 KDa. Además, existen otros trabajos donde se demuestra que las enzimas digestivas en organismos acuáticos poseen bajos pesos moleculares (Fu *et al.*, 2005; Perera *et al.*, 2008). De igual forma, nosotros podemos asumir que algunas de las bandas presentes fueron enzimas ya que reaccionaron con el sustrato puesto en el gel de electroforesis (banda de 20,1 KDa presente en el zimograma de JG para proteasas alcalinas) y que en *O. vulgaris* se observa el mismo hecho que para *O. maya*, bandas de bajo peso molecular tanto en los zimogramas de JG como en el de la GD.

## 7.6. Conclusión

La caracterización enzimática realizada muestra que la actividad proteasa total del jugo gástrico mostró dos picos, a pH 3 y pH 8; y en la glándula digestiva también con dos picos, a pH 2 y pH 10. Se observó que las enzimas de la GD son más estables a cambios de pH del medio que las enzimas del JG. La actividad total de proteasas ácidas y alcalinas del JG fue mayor a 30 y 50 °C, respectivamente, mientras que para la GD, la actividad de proteasas ácidas fue mayor a 20 °C y no se encontraron diferencias entre temperaturas para proteasas alcalinas. Se apreció alta termoestabilidad en JG para proteasas ácidas y alcalinas incubadas a 40°C durante 30 min. En la GD destacan las proteasas ácidas a 25°C durante 50 min observándose las proteasas alcalinas menos termoestables. En el JG se registró inhibición alta al reaccionar con PMSF, EDTA y Pepstatina A. Para la GD, con PMSF y una inhibición intermedia con EDTA, E64 y TPCK. Tanto el JG como la GD muestran un perfil electroforético con bandas proteicas, principalmente, de bajo peso molecular. Se observa actividad enzimática en proteasas alcalinas del JG con un peso molecular de 20,1 KDa. Así, parece ser que la GD y el JG de *O. vulgaris* poseen una batería de enzimas digestivas formada, principalmente, por serin-proteasas y metaloproteasas en medio alcalino y aspártico-proteasas en medio ácido.

## 7.7. Referencias bibliográficas

- Alarcón F.J., M. Díaz, F.J. Moyano & E. Abell. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 19(3): 257-267.
- Álvarez González C.A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidae: Serranidae). Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California (México). 164 pp.
- Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22: 79-89.
- Barret A.J. & H. Kirschke. 1981. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, pp. 535-561.
- Boucaud-Camou E. 1974. Localisation d'activités enzymatiques impliquées dans la digestion chez *Sepia officinalis* L. *Arch. Zool. Expérimentale Générale*, 115: 5-27.
- Boucaud-Camou E. 1982. Localization of some hydrolytic enzymes in digestive organs of juvenile *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Malacologia*, 22: 685-690.
- Boucaud-Camou E., R. Boucher-Rodoni & K. Mangold. 1976. Digestive absorption in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *J. Zool.*, 179: 261-271.
- Boucaud-Camou E. & R. Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. The *Mollusca*, *Physiology* 5(2): 149-187.
- Boucher-Rodoni R. 1973. Vitesse de Digestion d'*Octopus cyanea* (Cephalopoda: Octopoda). *Mar. Biol.*, 18: 237-242.
- Boucher-Rodoni R., E. Boucaud-Camou & K. Mangold. 1987. Feeding and digestion. En: P. Boyle (ed.) *Cephalopod life cycles*. London: Academic Press, pp 85-108.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.*, 72: 248-254.
- Budelmann B.U., R. Schipp & S. von Boletzky. 1997. Cephalopoda. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol. 6A, Mollusca (Harrison FW & A. Kohn, eds.) pp. 119-414.
- Cárdenas-López J.L. & N.F. Haard. 2005. Cysteine proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 29(2): 171-186.
- Cárdenas-López J.L. & N.F. Haard. 2009. Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. *Food Chemistry*, 112(2): 442-447.
- Charney J. & R. Tomarelli. 1947. A colorimetric method for the determination proteolytic activity of duodenal juice. *Biological Chemistry*, 171: 501-505.
- Cunningham E., E. McCarthy, L. Copley, D. Jackson, D. Johnson, J.P Dalton, G. Mulcahy. 2010. Characterisation of cathepsin B-like cysteine protease of *Lepeophtheirus salmonis*. *Aquaculture*, 310: 38-42.



- Delmar E.G., C. Largman, J.W. Brodick & M.C. Geokas. 1979. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, 99: 316-320.
- Domingues P., V. Bettencourt & A. Guerra. 2006. Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie et Milieu*, 56(2): 109-120.
- Domingues P., N. López, J.A. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola & C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13: 1-9.
- Domingues P., S. García, I. Hachero, N. López & C. Rosas. 2010. The use of alternative prey (crayfish, *Procambarus clarkii*, and hake, *Merluccius gayi*) to culture *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Aquaculture International*, 18: 487-4992009a.
- Donaubauer H.H. & R. Schipp. 1978. The localization of enzyme activities in the pancreatic appendages of *Sepia officinalis* L. (Cephalopoda). *Histochem.*, 59: 29-44.
- Dunn B.M. 1989. Determination of protease mechanism. In: *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (Beynon R.J. & J.S. Bond eds.) IRL Press, Oxford. pp. 57-81.
- Ezquerria J.M., N.F. Haard, R. Ramirez-Olivas, H. Olivas-Burrola, C.J. Velázquez-Sánchez. 2002. Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissue from jumbo squid (*Dosidiscus gigas*). *Journal of Food Biochemistry*, 26: 459-475.
- Fu X.Y., C.H. Xue, B.C. Miao, Z.J. Li, X. Gao & W.G. Yang. 2005. Characterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): High alkaline protease activity. *Aquaculture*, 246(1): 321-329.
- García-Carreño F. L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education*, 3: 145-150.
- García-Carreño F. L. 1996. Proteinase inhibitors. *Trends in Food Science & Technology*, 7(6): 197-204.
- García-Carreño F.L., L.E. Dimes N.F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.*, 214: 65-69.
- García-Esquivel Z. & H. Felbeck. 2006. Activity of digestive enzymes along the gut of juvenile red abalone, *Haliotis rufescens*, fed natural and balanced diets. *Aquaculture*, 261(2): 615-625.
- García-Garrido S., P. Domingues, J.C. Navarro, I. Hachero-Cruzado, D. Garrido & C. Rosas. 2011. Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquaculture Nutrition*, 17: e174-e187.
- Gestal C., M. Páez de la Cadena & S. Pascual. 2002. Malabsorption syndrome observed in the common octopus *Octopus vulgaris* infected with *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa). *Dis. Aquat. Org.*, 51: 61-65.
- Hamdan M., A. Tomás-Vidal, S. Martínez, J. Cerezo-Valverde & F.J. Moyano. 2014. Development of an in vitro model to assess protein bioavailability in diets for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquacult. Res.*, 45: 2048-2056.
- Heras H. & R.J. Pollero. 1990. Occurrence of plasma lipoproteins in octopods. Partial characterization and interorgan transport of lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 140: 29-38.



- Iglesias J., F.J. Sánchez, J.G.F. Bersano, J.F. Carrasco, J. Dhont, L. Fuentes, F. Linares, J.L. Muñoz, S. Okumura, J. Roo, T. van der Meeren, E.A.G. Vidal & R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266: 1-15.
- Komai T., C. Kawabata, C. Amano, B. Rho Lee & E. Ichishima. 2004. Todarepsin, a new cathepsin D from hepatopancreas of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*). *Comp Bioch Physiol. Part B*, 137: 373-382.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *J. Gen. Physiol.*, 20: 291-310.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Le Bihan E., C. Zatylny, A. Perrin & K. Koueta. 2006. Post-mortem changes in viscera of cuttlefish *Sepia officinalis* L. during storage at two different temperatures. *Food Chem.*, 98: 39-51.
- Lee P.G. 1994. Nutrition of cephalopods: fuelling the system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 25: 35-51.
- Martínez R., R. Santos, A. Álvarez, G. Cuzon, L. Arena, M. Mascaró, C. Pascual & C. Rosas. 2011a. Partial characterization of hepatopancreatic and extracellular digestive proteinases of wild and cultivated *Octopus maya*. *Aquaculture International*, 19: 445-457.
- Martínez R., E. López-Ripoll, O. Ávila-Poveda, R. Santos-Ricalde, M. Mascaró & C. Rosas. 2011b. Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus maya*, and cytological background of digestion in juveniles. *Aquatic Biology*, 11: 249-261.
- Martínez R., R. Santos, M. Mascaró, L. Canseco, C. Caamal-Monsreal & C. Rosas. 2012. Digestive dynamics during chyme formation of *Octopus maya* (Mollusca, Cephalopoda). *Aquaculture Research*, 43(8): 1119-1126.
- Martínez R., P. Gallardo, C. Pascual, J. Navarro, A. Sánchez, C. Caamal-Monsreal & C. Rosas. 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, 426: 310-317.
- Morishita T. 1972. Studies on the distribution of proteolytic enzymes in the internal organs of Octopus. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 38: 839-843.
- Murray R.K., P.A. Mayes, D.K. Granner V.W. Rodwell. 2001. *Bioquímica de Harper. Manual Moderno* (15ª ed.) pp. 747-772.
- Navarrete del Toro M.D.L.A., F. García-Carreño, M.D. López, L. Celis-Guerrero & R. Saborowski. 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305(8): 645-654.
- Perera E., F. Moyano, M. Díaz, R. Perdomo-Morales, V. Montero-Alejo, E. Alonso, O. Carrillo & G. Galich. 2008. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comp Biochem Physiol*, 150: 247-254.
- Perrin A. 2004. Etude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode): Impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. Université de Caen.

- Perrin A., E. Le Bihan & N. Koueta. 2004. Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 311: 267-285.
- Ribeiro L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu & M.T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179(1): 465-473.
- Rosas C., A. Valero, C. Caamal-Monsreal, I. Uriarte, A. Farias, P. Gallardo, A. Sánchez & P. Domingues. 2013. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research* 44, 1029-1044.
- Semmens J.M. 2002. Changes in the digestive gland of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1830) associated with feeding. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.*, 274: 19-39.
- Stauffer C. 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists*. Van Nostand Reinhold/AVI, New York. 552 pp.
- Vaz-Pires P., P. Seixas & A. Barbosa. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797): a review. *Aquaculture*, 238(1-4): 221-238.
- Walter H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. Ed. , *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270–277.
- Zar J.H. 1984. Multisample hypotheses: the analysis of variance. In: *Biostatistical Analysis*, 2<sup>nd</sup> edn (ed. by Kurtz B.), pp. 718. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, NJ.

## **CONCLUSIONES**

#### IV. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales de este estudio son las siguientes:

1. La densidad máxima sostenible para el engorde de *Octopus vulgaris* en tanques y a temperaturas de  $20 \pm 2$  °C no debe exceder de  $20 \text{ Kg m}^{-3}$ . Para cultivo en jaulas flotantes, Rodriguez *et al.* (2006) y Estefanell *et al.* (2014) sugieren  $10 \text{ Kg m}^{-3}$ . Para promover una alta supervivencia, hecho muy importante cuando el cultivo se realice a escala comercial, la densidad debe ser apropiada. Debe tenerse en cuenta que a una alta densidad ( $>20 \text{ Kg m}^{-3}$ ) y tras 56 días de cultivo la mortalidad aumenta de manera significativa; y que a mayor temperatura, la densidad de cultivo inicial debe ser menor debido al carácter territorial y a la agresividad natural del pulpo común *O. vulgaris*. Para engordes superiores a los dos meses, esta densidad de  $20 \text{ Kg m}^{-3}$  debería ser menor. En estos casos, es posible que  $10 \text{ Kg m}^{-3}$ , sugeridas por Rodriguez *et al.* (2006) y Estefanell *et al.* (2014) para engorde en jaulas sean más adecuadas.
2. En comparación con presas usadas comúnmente para el engorde de *O. vulgaris* como el calamar (*L. gahi*), el cangrejo de río (*P. clarkii*) no es un buen candidato para reemplazarlo ya que da lugar a tasas de conversión bajas (cerca al 20%) y presenta las mismas dificultades de trabajo que las existentes cuando se alimenta con otras especies de cangrejos. Además, la parte del cangrejo de río que es consumida por los pulpos supone menos del 35% del animal, lo que hace que dicha dieta sea incluso menos atractiva cuando se tiene en cuenta el bajo crecimiento obtenido. Sin embargo, se podría sugerir que el pescado blanco, como la merluza (*M. gayi*), da lugar a buenos resultados de crecimiento y podría utilizarse para el engorde de *O. vulgaris* en el futuro.
3. Aunque ninguna dieta artificial dio lugar a crecimiento satisfactorio, la gelatina parece ser un aglutinante adecuado en la elaboración de dietas para pulpo. La aceptación fue buena, y el crecimiento comparable al obtenido por otros autores usando mayores porcentajes de alimentos naturales, como pescado o calamar, en la elaboración de las dietas artificiales.
4. La composición de ácidos grasos del manto de pulpos alimentados con todas las dietas fue similar y puede explicarse por la gran estabilidad metabólica de este órgano. Incluso en periodos de ayuno o de alimentación con dietas deficientes, los

ácidos grasos no son extraídos fácilmente del manto. Así, la estabilidad lipídica del manto puede ser una característica beneficiosa desde el punto de vista del consumidor. Por otra parte y según los resultados obtenidos respecto a proteínas y aminoácidos, este trabajo apoya la idea de la utilización del manto para necesidades metabólicas de *O. vulgaris* durante estados de ayuno prolongado o inanición.

5. La dieta no afecta a la composición de ácidos grasos del manto, pero sí a la de glándula digestiva, principalmente en pulpos alimentados con dieta ALG. Resultados similares fueron obtenidos por Estefanell *et al.* (2013). La mayoría de los ácidos grasos más importantes, como HUFA *n*-3, EPA y DHA, disminuyen en la GD de los pulpos alimentados con dietas artificiales, lo que indica que las condiciones de alimentación fueron peores que las de pulpos con dieta CON.
6. Se observaron diferencias en el balance energético entre dietas, indicando que la dieta GEL fue digerida adecuadamente. Por tanto, lo que probablemente no funcionó de esta dieta fueron las características nutricionales que afectan a la producción de biomasa, como la proporción de ácidos grasos o de aminoácidos.
7. La glándula digestiva podría ser utilizada como un indicador del estado nutricional del animal. De esta forma, el nivel de ésteres de esteroles podría determinar cortos periodos de ayuno o subalimentación, mientras niveles bajos de triglicéridos y ésteres de esteroles podrían indicar largos periodos de ayuno o el uso de una inadecuada alimentación.
8. Aunque la cantidad de ARA en la glándula digestiva es pequeña, éste parece ser un ácido graso muy importante en el metabolismo de lípidos de *O. vulgaris*. Estefanell *et al.* (2013) también refiere que el ARA es uno de los ácidos grasos más importantes para el metabolismo de esta especie. Los resultados de este estudio sugieren posibles rutas metabólicas diferentes para el uso de DHA y EPA en la glándula digestiva entre cefalópodos, como *O. vulgaris* y *S. officinalis*. Además, los resultados también sugieren que la vía de degradación de aminoácidos hasta piruvato e intermediarios del ciclo ATC es favorecida respecto a la vía de degradación de los aminoácidos cetogénicos.
9. El perfil en aminoácidos del manto de los pulpos, caracterizado por mayores contenidos en Arg, His, Lys, Gly, Leu y Pro, junto con bajos niveles de triglicéridos

y ésteres de esteroles en la glándula digestiva (García-Garrido *et al.*, 2010) podrían indicar un estado prolongado de ayuno (> 20 días) o malnutrición en *O. vulgaris*. Por el contrario, los aminoácidos más abundantes en el manto de pulpos con un buen estado nutricional son Glu, Asp, Arg, Leu y Lys. Debería realizarse una consideración especial en lo concerniente a los aminoácidos Thr, Ile, Ser, Ala, Asx y Glx, por su rápido consumo, y con Lys e His, debido a sus contenidos estables, durante condiciones prolongadas de ayuno.

10. La caracterización enzimática realizada muestra que la actividad proteasa total del jugo gástrico mostró dos picos, a pH 3 y pH 8; y en la glándula digestiva también con dos picos, a pH 2 y pH 10. Se observó que las enzimas de la GD son más estables a cambios de pH del medio que las enzimas del JG. La actividad total de proteasas ácidas y alcalinas del JG fue mayor a 30 y 50 °C, respectivamente, mientras que para la GD, la actividad de proteasas ácidas fue mayor a 20 °C y no se encontraron diferencias entre temperaturas para proteasas alcalinas. Se apreció alta termoestabilidad en JG para proteasas ácidas y alcalinas incubadas a 40°C durante 30 min. En la GD destacan las proteasas ácidas a 25°C durante 50 min observándose las proteasas alcalinas menos termoestables. En el JG se registró inhibición alta al reaccionar con PMSF, EDTA y Pepstatina A. Para la GD, con PMSF y una inhibición intermedia con EDTA, E64 y TPCK. Tanto el JG como la GD muestran un perfil electroforético con bandas proteicas, principalmente, de bajo peso molecular. Se observa actividad enzimática en proteasas alcalinas del JG con un peso molecular de 20,1 KDa. Así, parece ser que la GD y el JG de *O. vulgaris* poseen una batería de enzimas digestivas formada, principalmente, por serin-proteasas y metaloproteasas en medio alcalino y aspártico-proteasas en medio ácido.

# BIBLIOGRAFÍA

- Agassiz L. 1847. An Introduction to the Study of Natural History: En: Series of Lectures Delivered in the Hall of the College of Physicians and Surgeons, New York. Greeley & McElrath. 58 pp.
- Aguado-Giménez F. & B. García-García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10: 361-377.
- Águila J., G. Cuzon, C. Pascual, P. Domingues, G. Gaxiola, A. Sánchez, T. Maldonado & C. Rosas. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss & Solís) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture*, 273: 641-655.
- Akagi S. & S. Ohmori. 2004. Threonine is the best substrate for D-lactate formation in octopus tentacle. *Amino Acids* 26: 169-174.
- Alberts B. & B. Dennis. 2006. Introducción a la Biología Celular, 2ª Edición. Traducido por: Ferrán J.L., Tzal K., Patrone U. Buenos Aires, Editorial Médica Paramericana, 864 p.
- Alarcón F.J., M. Díaz, F.J. Moyano & E. Abell. 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 19(3): 257-267.
- Almansa E., J.J. Sánchez, S. Cozzi, C. Rodríguez & M. Díaz. 2003. Temperature-activity relationship for the intestinal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase of *Sparus aurata*. A role for the phospholipid microenvironment? *The Journal of Comparative Physiology B*, 173: 231-237.
- Almansa E., P. Domingues, A. Sykes, N. Tejera, A. Lorenzo & J.P. Andrade. 2006. The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture*, 256: 403-413.
- Álvarez-González C.A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE). Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California (México). 164 pp.
- Andoh T. 2007. Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *General and Comparative Endocrinology* 151: 308-317.
- Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22: 79-89.
- Arzel J., R. Métailler, C. Kerleguer, H. Le Delliou & J. Guillaumme. 1995. The protein requirement of Brown trout (*Salmo trutta*) fry. *Aquaculture*, 130: 67-78.
- Ballantyne S. 2004. Mitochondria: aerobic and anaerobic design - lessons from molluscs and fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 139: 461-467.
- Ballantyne J.S., P.W. Hochachka & T.P. Mommsen. 1981. Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Marine Biology Letters*, 2: 75-85.
- Barret A.J. & H. Kirschke. 1981. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, pp. 535-561.
- Bather F.A. 1888. Shell-growth in Cephalopoda (Siphonopoda). *Annals and Magazine of Natural History*, (series 6)1:298-310.



- Bensadoun A. & D. Weinstein. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry* 70: 241-250.
- Berg J.M., J.L. Tymoczko & L. Stryer. 2008. Bioquímica, 6ª Edición. Traducido por: Prof. Dr. Macarulla J.M. Barcelona, Editorial Reverté, 1026 p.
- Bidder A.M. 1966. Feeding and digestion in cephalopods. *Physiology of the Mollusca*, 2.
- Blainville H.M. Ducrotay de, 1825. Manuel de malacologie et de conchyliologie. Editado por: Levrault F.G. Paris (Francia). 242 pp.
- Boletzky S.V. & R.T. Hanlon. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memoirs of the National Museum Victoria*, 44, 147-187.
- Boucaud-Camou E. 1974. Localisation d'activités enzymatiques impliquées dans la digestion chez *Sepia officinalis* L. *Arch. Zool. Expérimentale Générale*, 115: 5-27.
- Boucaud-Camou E. 1982. Localization of some hydrolytic enzymes in digestive organs of juvenile *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Malacologia*, 22: 685-690.
- Boucaud-Camou E., R. Boucher-Rodoni & K. Mangold. 1976. Digestive absorption in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *J. Zool.*, 179: 261-271.
- Boucaud-Camou E. & M. Yim. 1980. Fine structure and function of the digestive cell of *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *Journal of Zoology*, 191: 89-105.
- Boucaud-Camou E. & R. Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. *The Mollusca, Physiology* 5(2): 149-187.
- Boucaud-Camou E., M. Yim & A. Tregot. 1985. Feeding and digestion of young *Sepia officinalis* L. during post-hatching development. *Vie et Milieu*, 35: 263-266.
- Boucher-Rodoni R. 1973. Vitesse de Digestion d'*Octopus cyanea* (Cephalopoda: Octopoda). *Mar. Biol.*, 18: 237-242.
- Boucher-Rodoni R. 1989. Consommation d'oxygène et excrétion ammoniacale de *Nautilus macrophalus*. *C. R. Hebd Seances Acad. Sci. (Paris)*, 309: 173-179.
- Boucher-Rodoni R., E. Boucaud-Camou & K. Mangold. 1987. Feeding and digestion. En: P. Boyle (ed.) *Cephalopod life cycles*. London: Academic Press, pp 85-108.
- Boucher-Rodoni R. & K. Mangold. 1988. Comparative aspects of ammonia excretion in cephalopods. *Malacologia*, 29: 145-151.
- Boyle P.R. 1991. The UFAW handbook on the care and management of cephalopods in the laboratory. Universities Federaton for Animal Welfare, Potters Bar, U.K., 63 pp.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.*, 72: 248-254.
- Braverman J.B.S. 1980. Introducción a la bioquímica de los alimentos. 2ª Edición. Z. Berk. Editorial El Manual Moderno. México. 358pp.
- Brinker A., W. Koppe & R. Rosch. 2005. Optimised effluent treatment by stabilized trout faeces. *Aquaculture*, 249: 125-144.

- Budelmann B.U., R. Schipp & S. von Boletzky. 1997. Cephalopoda. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol. 6A, Mollusca (Harrison FW & A. Kohn, eds.) pp. 119-414.
- Cagnetta P. & A. Sublimi. 2000. Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C.) when fed on a monodiet. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47: 331-336.
- Cárdenas-López J.L. & N.F. Haard. 2005. Cysteine proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 29(2): 171-186.
- Cárdenas-López J.L. & N.F. Haard. 2009. Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. *Food Chemistry*, 112(2): 442-447.
- Carrasco, J.L. & M.A. Hernán. 1993. Estadística multivariante en las ciencias de la vida. En: Editorial Ciencia 3, S.L. *Fundamentos, métodos y aplicación*, pp. 65-75. Madrid, España.
- Castro B.G. 1990. Can *Sepia officinalis* L. be reared on artificial food? *Marine Behavior & Physiology*, 19: 35-38.
- Castro B.G., J.L. Garrido & C.G. Sotelo. 1992. Changes in composition of digestive gland and mantle muscle of the cuttlefish *Sepia officinalis* during starvation. *Marine Biology*, 114: 11-20.
- Castro B.G., F.P. DiMarco, R.H. DeRusha & P.G. Lee. 1993. The effects of surimi and pelleted diets on the laboratory survival, growth, and feeding rate of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 170: 241-252.
- Castro B.G. & P.G. Lee. 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L (Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry & Physiology*, 109A: 1007-1016.
- Cerezo, J., F. Aguado & B. García-García. 2002. Consumo de oxígeno de rutina del pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) en función del peso y la temperatura. En: Rolán E. & J. Troncoso (Eds) *II International Congress of the European Malacological Societies*. Vigo, Spain, 40 p.
- Cerezo J., E. Gómez & B. García. 2003. Resultados preliminares sobre la producción de amoníaco en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) obtenidos mediante un electrodo de ion selectivo. En: *IX Congreso Nacional de Acuicultura, Cádiz* (pp. 12-16).
- Cerezo, J. & B. García-García. 2004a. Suitable dissolved oxygen levels for common Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) at different weights and temperatures: analysis of respiratory behaviour. *Aquaculture*, 244: 303-314.
- Cerezo, J. & B. García-García. 2004b. Influence of body weight and temperature on post-prandial oxygen consumption of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 233: 599-613.
- Cerezo-Valverde J., M. Hernández, F. Aguado-Giménez & B. García-García. 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*, 275: 266-273.
- Cerezo-Valverde J., M.D. Hernández, F. Aguado-Gimenez, P.S. Morillo Velarde & B. García-García. 2012. Performance of formulated diets with different level of lipids and glutamate supplementation in *Octopus vulgaris*. *Aquaculture Research*, 44: 1952-1964.
- Cerezo-Valverde J., S. Martínez-Llorens, A. Tomás-Vidal, M. Jover, C. Rodríguez, J. Estefanell, J.I. Gairín, P.M. Domingues, C.J. Rodríguez & B. García-García. 2013. Amino acids composition and protein quality evaluation of marine species and meals for feed formulations in cephalopods. *Aquaculture International*, 21: 413-433.

- Chapela A., A.F. González, E.G. Dawe, F.J. Rocha & A. Guerra. 2006. Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. *Scientia Marina*, 70: 121-129.
- Charney J. & R. Tomarelli. 1947. A colorimetric method for the determination proteolytic activity of duodenal juice. *Biological Chemistry*, 171: 501-505.
- Cho C. & D. Bureau. 2001. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research*, 32: 349-360.
- Christie W.W. 1982. *Lipids analysis*, 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: Pergamon Press.
- Christie W.W. & X. Han. 2010. *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis* (4<sup>th</sup> edition), 446 pages (Oily Press, Bridgwater, U.K.)
- Christie W.W. 2012. *What is a Lipid?*. En: <https://lipidlibrary.aocs.org>. Last updated: February 24<sup>th</sup>, 2014.
- Clarke A., P.G. Rodhouse, L.J. Holmes & P.L. Pascoe. 1989. Growth rate and nucleic acid ratio in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 133: 229-240.
- Condrey, R.E., J.G. Gosselink & H.J. Bennet. 1972. Comparison of the assimilation of different diets by *Penaeus setiferus* and *Penaeus aztecus*. *Fish. Bull.*, 70: 1281-1291.
- Corral M.L., H. Grizel, J. Montes & E. Polanco. 2000. La Acuicultura: Biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial. Tomo I. Análisis del desarrollo de los cultivos: medio, agua y especies, (Grupo Mundi-Prensa ed.) Fundación Alfonso Martín Escudero, Madrid, España. 258 pp.
- Correia, M., P. Domingues, A. Sykes & P. Andrade. 2005. Effects of culture density on growth and broodstock management of the cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 245: 163-173.
- Cunningham E., E. McCarthy, L. Copley, D. Jackson, D. Johnson, J.P Dalton, G. Mulcahy. 2010. Characterisation of cathepsin B-like cysteine protease of *Lepeophtheirus salmonis*. *Aquaculture*, 310: 38-42.
- Cuvier G. 1797. Tableau elementaire de l'histoire naturelle des animaux. 710 pages, 14 plates. Paris.
- Daly, H.I. & L.S. Peck. 2000. Energy balance and cold adaptation in the octopus *Pareledone charcoti*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 245: 197-214.
- D'Aniello A., L. Strazzullo, G. D'Onofrio & M. Pischetola. 1986. Electrolytes and nitrogen compounds of body fluids and tissues of *Octopus vulgaris* Lam. *Journal of Comparative Physiology B*, 156(4), 503-509.
- D'Aniello A., G. Nardi, A. DeSantis, A. Vetere, A. DiCosmo, R. Marchelli, A. Docena & G. Fisher. 1995. Free L-amino acids and D-aspartate content in the nervous system of Cephalopoda. A comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112: 661-666.
- Delmar E.G., C. Largman, J.W. Brodick & M.C. Geokas. 1979. A sensitive new substrate for chymotrysin. *Analytical Biochemistry*, 99: 316-320.
- DeRusha R.H., J.W. Forsythe, F.P. DiMarco & R.T. Hanlon. 1989. Alternative diets for maintaining and rearing cephalopods in captivity. *Laboratory Animal Science*, 39: 306-312.

- Domingues, P. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. Ph D. Thesis, University of the Algarve, Portugal, 95 p.
- Domingues, P., R. Poirier, L. Dickel, E. Almansa, A. Sykes & J.P. Andrade. 2003. Effects of culture density and live prey on growth and survival of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 11: 225-242.
- Domingues P., G. Gaxiola-Cortés & C. Rosas-Vázquez. 2004. Alimentación y Nutrición de Moluscos Cefalópodos: Avances Recientes y Perspectivas Futuras. En: Cruz-Suárez L.E., D. Ricque-Marie, M.G. Nieto-López, D. Villarreal, U. Scholz & M. González (2004) Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México
- Domingues, P.M., F.P. DiMarco, J.P. Andrade & P.G. Lee. 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 13: 423-440.
- Domingues, P., V. Bettencourt & A. Guerra. 2006. Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie Milieu*, 56: 109-120.
- Domingues P., N. López, J. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola & C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatán octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13: 273-280.
- Domingues P., A. Ferreira, L. Márquez, J. Andrade, N. López & C. Rosas. 2008. Growth, absorption and assimilation efficiency by mature cuttlefish (*Sepia officinalis*) fed with alternative and artificial diets. *Aquaculture International*, 16: 215–229.
- Domingues, P., L. Márquez, N. López & C. Rosas. 2009. Effects of food thermal treatment on growth, absorption and assimilation efficiency of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 17: 283-299.
- Domingues P., S. García, I. Hachero, N. López & C. Rosas. 2010. The use of alternative prey (crayfish, *Procambarus clarkii*, and hake, *Merluccius gayi*) to culture *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Aquaculture International*, 18: 487-499.
- Donaubauer H.H. & R. Schipp. 1978. The localization of enzyme activities in the pancreatic appendages of *Sepia officinalis* L. (Cephalopoda). *Histochem.*, 59: 29-44.
- Dunn B.M. 1989. Determination of protease mechanism. In: *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (Beynon R.J. & J.S. Bond eds.) IRL Press, Oxford. pp. 57–81.
- Dunstan G.A., H.J. Baillie, S.M. Barrett & J.K. Volkman. 1996. Effect of diet on the lipid composition of wild and cultured abalone. *Aquaculture*, 140: 115–127.
- Durazo-Beltrán E., L.R. D’Abramo, J.F. Toro-Vásquez, C. Vasquez-Peláez & M.T. Viana. 2003. Effect of triacylglycerols in formulated diets on growth and fatty acid composition in tissue of green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture*, 224: 257-270.
- Estadísticas Pesqueras (Diciembre, 2008). En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/>
- Estadísticas Pesqueras (Abril, 2013). En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/>

- Estadísticas Pesqueras (Noviembre, 2013). En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/>
- Estadísticas Pesqueras (Abril, 2015). En: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/>
- Estefanell J., J. Socorro, F.J. Roo, R. Guirao, H. Fernández-Palacios & M. Izquierdo. 2010. Gonad maturation in *Octopus vulgaris* during on-growing, under different conditions of sex ratio. *ICES Journal of Marine Science*, 67: 1487–1493.
- Estefanell J., J. Roo, R. Guirao, J.M. Afonso, H. Fernandez-Palacios, M. Izquierdo & J. Socorro. 2012. Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) fed fresh and agglutinated moist diets based on aquaculture by-products and low price trash species. *Aquaculture Research*, 44(1): 93–105.
- Estefanell J., J. Socorro, M. Izquierdo & J. Roo. 2013. Growth, food intake, protein retention and fatty acid profile in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed agglutinated moist diets containing fresh and dry raw materials based on aquaculture by-products. *Aquaculture Research*, 45(1): 54–67.
- Estefanell J., J. Roo, R. Guirao, M. Izquierdo & J. Socorro. 2014. Biological performance of *Octopus vulgaris* in integrated aquaculture models: effect of two potential fresh diets, sex and sexual maturation during the grow-out phase. *Aquaculture Research*, 45: 1470–1480.
- Estefanell J., J. Socorro, M. Izquierdo & J. Roo. 2015. Effect of two fresh diets and sexual maturation on the proximate and fatty acid profile of several tissues in *Octopus vulgaris*: specific retention of arachidonic acid in the gonads. *Aquaculture Nutrition*, 21(3): 274–285.
- Ezquerria J.M., N.F. Haard, R. Ramirez-Olivas, H. Olivas-Burrola, C.J. Velázquez-Sánchez. 2002. Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissue from jumbo squid (*Dosidiscus gigas*). *Journal of Food Biochemistry*, 26: 459–475.
- Fahy E., D. Cotter, M. Sud & S. Subramaniam. 2011. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637–647.
- FAO. 2001. *Fish and fisheries products*. En: FAO/ GIEWS (Ed.) Rome, Italy, 344 p.
- FAO. 2002. *The state of the world fisheries and aquaculture*. En: FAO/ GIEWS (Ed.) Rome, Italy.
- FAO. 2003. *FAO Globefish Cephalopods commodity update*. En: [www.globefish.org](http://www.globefish.org)
- FAO. 2008. *The state of the world fisheries, aquaculture 2008*. SOFIA, Rome, Italy. 176 pp.
- FAO. 2010. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*. SOFIA, Rome, Italy, 218 pp.
- Ferguson G.P. & J.B. Messenger. 1991. A countershading reflex in cephalopods. *Proc. Royal Soc. Lond. B* 243: 63–67.
- Fernández-Pérez J. 2005. Consideraciones sobre la pesca romana en Hispania. En: *Artifex: Ingeniería romana en España*, 456 pp (Fundación Juanelo Turriano & Ministerio de Cultura eds.) Ministerio de Fomento, Centro de Publicaciones, Madrid, España. ISBN 84-369-3567-5.
- Ferreira A., L. Márquez, E. Almansa, J. Andrade, A. Lorenzo & P. Domingues. 2010. The use of alternative diets to culture juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*: effects on growth and lipid composition. *Aquaculture Nutrition*, 16: 262–275.

- Fields J.H.A. & P.W. Hochachka. 1982. Glucose and proline metabolism in Nautilus. *Pacific Science*, 36: 337-341.
- Finn R.N. & H.J. Fyhn. 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquaculture Research*, 41: 684-716.
- Fluckiger M., G.D. Jackson, P. Nichols, P. Virtue, A. Daw & S. Wotherspoon. 2008. An experimental study of the effect of diet on the fatty acid profiles of the European Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Marine Biology*, 154: 363-372.
- Forsythe, J., P. Lee, L. Walsh & T. Clark. 2002. The effects of crowding on growth of the European cuttlefish, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 reared at two temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269: 173-185.
- Fowler J., L. Cohen & P. Jarvis. 1998. *Practical statistics for field biology*, 2<sup>nd</sup> edition. West Sussex, England: John Wiley & Sons. 259 p.
- Fraga F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. *Inv. Pesq.*, 3: 69-74.
- Fu X.Y., C.H. Xue, B.C. Miao, Z.J. Li, X. Gao & W.G. Yang. 2005. Characterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): High alkaline protease activity. *Aquaculture*, 246(1): 321-329.
- Gabaudan J. 1987. *Studies of nutrients ADC in Sea Bass (Dicentrarchus labrax). II. Effects of sodium alginate on protein and lipid*. Nutrition Series. Ifremer publication, Plouzané, France. 8 p.
- García-Cabrera C. 1968. Biología y pesca del pulpo (*Octopus vulgaris*) y choco (*Sepia officinalis*) en aguas del Sáhara español. *Publicación Técnica de la Junta Estatal de Pesca*, 7, 98-141.
- García-Carreño F. L. 1996. Proteinase inhibitors. *Trends in Food Science & Technology*, 7(6): 197-204.
- García-Carreño F.L., L.E. Dimes N.F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.*, 214: 65-69.
- García-Esquivel Z. & H. Felbeck. 2006. Activity of digestive enzymes along the gut of juvenile red abalone, *Haliotis rufescens*, fed natural and balanced diets. *Aquaculture*, 261(2): 615-625.
- García-García, B. & F. Aguado-Giménez. 2002. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 211: 171-182.
- García-García, B. & J. Cerezo-Valverde. 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on-growing. *Aquaculture*, 253: 502-511.
- García-García J., L.M. Rodríguez-González & B. García-García. 2004. Cost analysis of octopus on-growing installation in Galicia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 531-537.
- García-Garrido S., I. Hachero-Cruzado, D. Garrido, C. Rosas & P. Domingues. 2010. Lipid composition of the mantle and digestive gland of *Octopus vulgaris* juveniles (Cuvier, 1797) exposed to prolonged starvation. *Aquaculture International*, 18: 1223-1241.
- García S., P. Domingues, J.C. Navarro, I. Hachero-Cruzado, D. Garrido & C. Rosas. 2011. Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquaculture Nutrition*, 17: e174-e187.



- Gatellier, P. & V. Santé-Lhoutellier. 2009. Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor. *Meat Science*, 81, 405-409.
- George-Zamora A., M.T. Viana, S. Rodríguez, G. Espinoza & C. Rosas. 2011. Amino acid mobilization and growth of juvenile *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) under inanition and re-feeding. *Aquaculture*, 314: 215-220.
- Gestal C., M. Páez de la Cadena & S. Pascual. 2002. Malabsorption syndrome observed in the common octopus *Octopus vulgaris* infected with *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa). *Dis. Aquat. Org.*, 51: 61-65.
- Gilbert S.E. 2006. *Developmental Biology*. Sinauer Associates Sunderland, MA, USA, 750pp.
- Globefish. 2006. En: <http://www.globefish.org/homepage.html>. Septiembre, 2006.
- Globefish. 2009. En: <http://www.globefish.org/cephalopods-november-2009.html>
- Globefish. 2011. En: <http://www.globefish.org/octopus-august-2011.html>
- Globefish. 2012. En: <http://www.globefish.org/cephalopods-may-2012.html>
- Globefish. 2013. En: <http://www.globefish.org/cephalopods-june-2013.html>
- Globefish. 2015. En: <http://www.globefish.org/octopus-june-2015.html>
- Grigoriou P. & C.A. Richardson. 2009. Effect of body mass, temperature and food deprivation on oxygen consumption rate of common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Marine Biology*, 156: 2473-2481.
- Grimpe G. 1916. Chunioteuthis.- Eine neue Cephalopoden-gattung. *Zoologische Anzeiger*, 46(12):349-359.
- Grimpe G. 1921a. Teuthologische Mitteilungen. VII. Systematische Übersicht der Nordsee-cephalopoden. *Zoologische Anzeiger*, 52(12/13):297-305.
- Guerra A. 1978. Sobre la alimentación y el comportamiento alimentario de *Octopus vulgaris*. *Inv. Pesq.*, 42(2): 351-364.
- Guerra A. 1982. Reflexiones sobre la distribución geográfica de *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). En: *Actas del IV Congreso Nacional de Malacología*. Gijón (Vol. 11).
- Guerra A. 1992. *Mollusca: Cephalopoda*. En: Ramos M.A. J. Alba, X. Bellés, J. Gosálbez, A. Guerra, E. Macpherson, F. Martín, J. Serrano & J. Templado (eds.), Fauna Ibérica. Vol. 1. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) Madrid. 327 p.
- Guerra A. & M. Nixon. 1987. Crab and mollusc shell drilling by *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) in the Ria de Vigo (north-west Spain). *Journal of Zoology*, 211(3), 515-523.
- Guerrero G., A. Di Finizio & G. Ciarcia. 2003. Oxidative defenses in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 530: 681-688.
- Hall T.E. 2008. Pattern formation. In: *Fish Larval Physiology* (ed. by Finn R.N. & B.G. Kapoor), pp. 3-25. Science Publishers, Enfield, NH, USA.

- Hamazaki H., K. Fukunaga, Y. Yoshida, & K. Maruyama. 1991. Effects of marine microalgae *Nannochloropsis* sp. on survival and growth on rearing pelagic paralarvae of *Octopus vulgaris*, and results of mass culture in the tank of 20 metric tons. *Saibai-giken*, 19, 75-84.
- Hamdan M., A. Tomás-Vidal, S. Martínez, J. Cerezo-Valverde & F.J. Moyano. 2014. Development of an in vitro model to assess protein bioavailability in diets for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquacult. Res.*, 45: 2048-2056.
- Hanlon, R.T. & J. Messenger. 1996. *Cephalopod behaviour*. University Press, Cambridge, 278 p.
- Harpaz S. 2005. L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition: a review. *Aquaculture*, 249: 3-21.
- Heras H. & R.J. Pollero. 1989. Blood lipids of the small octopus *Octopus tehuacanus* (Mollusca: Cephalopoda) at different stages of sexual maturation. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 92 A: 571-575.
- Heras H. & R.J. Pollero. 1990. Occurrence of plasma lipoproteins in octopods. Partial characterization and interorgan transport of lipids. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 140: 29-38.
- Hernández-López J.L. 2000. Biología, ecología y pesca del pulpo común (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en aguas de Gran Canaria (Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).
- Hess H.H., M.B. Lees & J.E. Derr. 1978. A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Analytical Biochemistry*, 85: 295-300.
- Hochachka P.W. & J.H.A. Fields. 1982. Arginine, Glutamate, and Proline as substrates for oxidation and for glycogenesis in cephalopod tissues. *Pacific Science*, 36: 325-335.
- Hochachka P.W. & G.N. Somero. 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, New York, USA, 466pp.
- Hoeger U., T.P. Mommsen, R.K. O'Dor & D.M. Webber. 1987. Oxygen uptake and nitrogen in two cephalopods, octopus and squid. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87: 63-67.
- Horrocks L.A. & A.A. Farooqui. 2004. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70: 361-372.
- Horwitz W. 1980. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 13<sup>th</sup> edition. Washington DC, USA.
- Houlihan D.F., D.N. McMillan, C. Agnisola, T.L. Genoino & L. Foti. 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 106: 251-259.
- Iglesias J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1996. The octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier): a candidate for aquaculture? *International Council for the Exploration of the Sea*. Council Meeting. ICES 1996/ F: 10. Mariculture Committee.
- Iglesias J., F.J. Sánchez & J.J. Otero. 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier) en el IEO. En: Costa J., E. Abellán, B. García, A. Ortega & S. Zamora (eds.), *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*. Cartagena, 1997. ISBN: 84-491-0323-1, 221-226 pp.



- Iglesias J., F.J. Sánchez, J.J. Otero & C. Moxica. 2000. Culture of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier): Present knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47: 313-321.
- Iglesias J., J.J. Otero, C. Moxica, L. Fuentes & F.J. Sánchez. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12: 481-487.
- Iglesias J., L. Fuentes, J. Sánchez, J.J. Otero, C. Moxica & M.J. Lago. 2006. First feeding of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) paralarvae using *Artemia*: effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261: 817-822.
- Iglesias J., F.J. Sánchez, J.G.F. Bersano, J.F. Carrasco, J. Dhont, L. Fuentes, F. Linares, J.L. Muñoz, S. Okumura, J. Roo, T. van der Meeren, E.A.G. Vidal & R. Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266: 1-15.
- Imamura S., 1990. Larval rearing of Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier). The progress of technological development and some problems remained. *Collect. Breed* 52, 339-343 (en japonés).
- Itami K., Y. Izawa, S. Maeda & K. Nakai. 1963. Notes on the laboratory culture of the octopus larvae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 29: 514-520.
- Iwasaki M. & R. Harada. 1985. Proximate and amino acid composition of the roe and muscle of selected marine species. *Journal of Food Science*, 50: 1585-1587.
- Kim E., P. Goraksha-Hick, L. Li, T.P. Neufeld & K.L. Guan. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature Cell Biology*, 10: 935-945.
- Komai T., C. Kawabata, C. Amano, B. Rho Lee & E. Ichishima. 2004. Todarepsin, a new cathepsin D from hepatopancreas of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*). *Comp Bioch Physiol. Part B*, 137: 373-382.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *J. Gen. Physiol.*, 20: 291-310.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lape R., D. Colquhoun & L.G. Sivilotti. 2008. On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature*, 454: 722-727.
- Leach W.E. 1817. Synopsis of the Orders, Families, and Genera of the Class Cephalopoda. The Zoological Miscellany; being Descriptions of New or Interesting Animals, 3(30):137-141.
- Le Bihan E., C. Zatylny, A. Perrin & K. Koueta. 2006. Post-mortem changes in viscera of cuttlefish *Sepia officinalis* L. during storage at two different temperatures. *Food Chem.*, 98: 39-51.
- Lee, P.G. 1994. Nutrition of cephalopods: fuelling the system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 25: 35-51.
- Lee, P.G., J.W. Forsythe, F.P. DiMarco, R. DeRusha & R.T. Hanlon. 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 49: 362-372.

- Lee P.G., P.E. Turk, W.T. Yang & R.T. Hanlon. 1994. Biological characteristics and biomedical applications of the squid *Sepioteuthis lessoniana* cultured through multiple generations. *The Biological Bulletin*, 186(3), 328-341.
- Lehninger A.L., M. Cox & D.L. Nelson. 2008. Principles of Biochemistry, W.H. Freeman, New York, USA.
- Lindsey S.M. & J. Rutter. 2008. Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139 B: 543-559.
- Linnaeus C. 1758. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Holmiae, 1758, Leipzig 1894, (Ed. 10), 824 pp.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Luaces-Canosa, M. & M. Rey-Méndez. 2001. El engorde industrial de pulpo (*Octopus vulgaris*) en jaulas: análisis de dos años de cultivo en la Ría de Camariñas (Galicia). *Monografías Instituto Canario Ciencias Marinas*, 4: 184-189.
- Lucas, A. 1993. *Bioénergétique Des Animaux Aquatiques*. Masson, Paris.
- Mangold, K. 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44: 81-93.
- Mangold, K. & S.v. Boletzky. 1973. New dates on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19: 7-12.
- Mangold K. 1997. *Octopus vulgaris*: review of the biology. In: Lang M.A. & F.G. Hochberg (eds) Proceeding of the Workshop on The Fishery and Market Potential of Octopus in California. Washington, D.C.: Smithsonian Institution, pp. 85-90.
- Mangold K. 1998. The Octopodinae from the Eastern Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. In: Voss N.A., M. Vecchione, R.B. Toll & M.J. Sweeney (editors) Systematics and Biogeography of Cephalopods. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 586(2): 521-528.
- Mangold K. & R.E. Young. 1998. The Systematic value of the digestive organs. In: Voss N.A., M. Vecchione, *et al.* eds. *Systematic and biogeography of Cephalopods*. Washington, Smithsonian Institution. v. 1, p. 21-29.
- Martínez R., R. Santos, A. Álvarez, G. Cuzon, L. Arena, M. Mascaró, C. Pascual & C. Rosas. 2011a. Partial characterization of hepatopancreatic and extracellular digestive proteinases of wild and cultivated *Octopus maya*. *Aquaculture International*, 19: 445-457.
- Martínez R., E. López-Ripoll, O. Ávila-Poveda, R. Santos-Ricalde, M. Mascaró & C. Rosas. 2011b. Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus maya*, and cytological background of digestion in juveniles. *Aquatic Biology*, 11: 249-261.
- Martínez R., R. Santos, M. Mascaró, L. Canseco, C. Caamal-Monsreal & C. Rosas. 2012. Digestive dynamics during chyme formation of *Octopus maya* (Mollusca, Cephalopoda). *Aquaculture Research*, 43(8): 1119-1126.
- Martínez R., P. Gallardo, C. Pascual, J. Navarro, A. Sánchez, C. Caamal-Monsreal & C. Rosas. 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, 426: 310-317.

- Mather J.A. & R.K. O'Dor. 1991. Foraging strategies and predation risk shape the natural history of juvenile *Octopus vulgaris*. *Bulletin of Marine Science*, 49(1-2), 1-2.
- Mathews C.K. & K.E. Van Holde. 1998. Bioquímica (2ª edición). McGraw-Hill/ Interamericana. Madrid.
- Mayzaud, P. & R.J. Conover. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 45: 289-302.
- Miliou, H., M. Fintikaki, T. Kountouris & G. Verriopoulos. 2005. Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 249: 245-256.
- Miliou H., M. Fintikaki, M. Tzitzinakis, T. Kountouris & G. Verriopoulos. 2006. Fatty acid composition of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to rearing temperature and body weight. *Aquaculture*, 256: 311-322.
- Moltschaniwskyj N.A. & G.D. Jackson. 2000. Growth and tissue composition as a function of feeding history in juvenile cephalopods. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 253 (2): 229-241.
- Moltschaniwskyj N. & D. Johnston. 2006. Evidence that lipid can be digested by the dumpling squid *Euprymna tasmanica*, but is not stored in the digestive gland. *Marine Biology*, 149: 565-572.
- Mommsen T.P. & P.W. Hochachka. 1981. Respiratory and enzymatic properties of squid heart mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 120: 345-350.
- Mommsen T.P., C.J. French, B. Emmett & P.W. Hochachka. 1982. The fate of arginine and proline carbon in squid tissues. *Pacific Science*, 36: 343-348.
- Mommsen T.P., P.W. Hochachka & C.J. French. 1983. Metabolism of arginine, proline and ornithine in tissues of the squid, *Illex Illecebrosus*. *Canadian Journal of Zoology*, 61: 1835-1846.
- Montolio-Fernández M.A. & Serrano-Jerez M.A. 2006. Conozcamos el mar: Suplemento Especial, (Garrido-Rodríguez N. ed.) Editorial Academia. La Habana, Cuba. 32 pp.
- Morales A., G. Cardenete, A. Sanz, H. Akharbach & M. de la Higuera. 1993. Influence of different binders on dietary availability of nutrients in Rainbow Trout. *Fish Nutrition in Practise (Les Colloques)* INRA Editions. Paris, France. 449-452 pp.
- Moreno J.E.A., V.J. Moreno, L. Ricci, M. Roldán & M. Gerpe. 1998. Variations in the biochemical composition of the squid *Illex argentinus* from the South Atlantic Ocean. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 119 B: 631-637.
- Morillo-Velarde P., J. Cerezo-Valverde, R.M. Serra-Llinares & B. García-García. 2011. Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Molluscan Studies*, 77: 318-320.
- Morillo-Velarde P.D., J. Cerezo-Valverde, M.D. Hernández, F. Aguado-Gimenez & B. García-García. 2012. Growth and digestibility of formulated diets based on dry and freeze-dried ingredients in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 368: 139-144.
- Morishita T. 1972. Studies on the distribution of proteolytic enzymes in the internal organs of Octopus. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 38: 839-843.

- Murray R.K., P.A. Mayes, D.K. Granner V.W. Rodwell. 2001. *Bioquímica de Harper. Manual Moderno* (15ª ed.) pp. 747-772.
- Navarrete del Toro M.D.L.A., F. García-Carreño, M.D. López, L. Celis-Guerrero & R. Saborowski. 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305(8): 645-654.
- Navarro, J.C. & R. Villanueva. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture*, 183: 161-177.
- Navarro, J.C. & R. Villanueva. 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, 219: 613-631.
- Nigmatulin C.M. & A.A. Ostapenko. 1976. Feeding of *Octopus vulgaris* Lam. from the northwest African coasts. ICES Committee Meet (Shellfish Benthos Committee), K6: 1-13.
- O'Dor R.K., R. Boucher-Rodoni, M.J. Wells & J. Wells. 1984. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine Behavior & Physiology*, 11: 239-258.
- O'Dor, R.K. & M.J. Wells. 1987. Energy and nutrient flow. En: Boyle, P.R. (Ed.) *Cephalopod life cycles*, vol 2., 109-133 pp. Academic Press, New York.
- Okumura, K., A. Kurihara, A. Iwamoto & T. Takeuchi. 2005. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture*, 244: 147-157.
- Okutani T., Tagawa M. & H. Horikawa. 1987. Cephalopods from continental shelf and slope around Japan. Japanese Fisheries Resource Conservation Association. Tokyo. 194 pp.
- Olsen R.E. & R.J. Henderson. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129: 189-197.
- Orbigny A.d'. 1840. Mollusques. Voyage dans l'Amerique Méridionale, 5(3):1-758. Atlas of 85 plates.
- Otero, J.J., C. Moxica, F. J. Sánchez & J. Iglesias. 2001. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier) a diferentes densidades de estabulación. En: *Convergencia entre Investigación y Empresa: Un reto para el siglo XXI*. H. Fernández-Palacios & M. Izquierdo (eds.). *Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas*, 4: 180-183.
- Otero-Villar J. 2006. Ecología del pulpo común (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) en un área de afloramiento costero (Galicia, NE atlántico). Tesis Doctoral. Universidad de Vigo (España). 187 pp.
- Packard A. & G.D. Sanders. 1969. What the octopus shows to the world? *Endeavor* 28(104): 92-99.
- Perera E., F. Moyano, M. Díaz, R. Perdomo-Morales, V. Montero-Alejo, E. Alonso, O. Carrillo & G. Galich. 2008. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comp Biochem Physiol*, 150: 247-254.
- Perrin A. 2004. Etude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode): Impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. Université de Caen.

- Perrin A., E. Le Bihan & N. Koueta. 2004. Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 311: 267-285.
- Petza, D., S. Katsanevakis & G. Verriopoulos. 2006. Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed *ad libitum* on a high-lipid diet. *Marine Biology (Berl.)*, 148: 827–832.
- Portner, H.O. & R.K. O'Dor. 1994. Physiology of cephalopod molluscs. En: Macmillan D.L. (Ed.) *Lifestyle and performance adaptations*, 214 p. Gordon & Breach Publishers, Basilea, Suiza.
- Querol P., I. Gairin, G. Guerao, M. Jover & A. Tomas. 2013. Growth and feed efficiency of *Octopus vulgaris* fed on dry pelleted. *Aquaculture Research*, 1–7. DOI: 10.1111/are.12269.
- Querol P., I. Gairín, G. Guerao, R. Monge, M. Jover & A. Tomás. 2014. Effect of two extruded diets with different fish and squid meal ratio on growth, digestibility and body composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Aquaculture Research*, 1-9. DOI: 10.1111/are.12407.
- Quetglas A., F. Alemany, A. Carbonell, P. Merella & P. Sanchez. 1998. Biology and fishery of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, caught by trawlers in Mallorca (Balearic Sea, western Mediterranean). *Fisheries Research* 36, 237-249.
- Quintana D., P. Domingues & S. García. 2008. Effects of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*, 280: 161-164.
- Rama-Villar, A., V. Faya-Angueira, C. Moxica & M. Rey-Méndez. 1997. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) en batea. En: Costa J., E. Abellán, B. García, A. Ortega & S. Zamora (Eds.). *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*, 245-250 pp, Cartagena, 1997. ISBN: 84-491-0323-1.
- Ribeiro L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu & M.T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179(1): 465-473.
- Rocca E. & F. Ghiretti. 1958. Purification and properties of D-glutamic acid oxidase from *Octopus vulgaris* Lam. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 77: 336-349.
- Rocha F. 2003. Biología, Ecología, Cultivo y Pesquerías de Cefalópodos. Curso de Postgrado. Universidad Austral de Chile. Valdivia, 9 al 27 de junio de 2003. 235 pp.
- Rodríguez, C., J.E. Carrasco & M. Rodríguez. 2003. Engorde de juveniles de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en jaulas. En: *IX Congreso Nacional de Acuicultura*, 268-269 pp, Cádiz, 11-16 May 1993.
- Rodríguez C., J.F. Carrasco, J.C. Arronte & M. Rodríguez. 2006. Common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile ongrowing in floating cages. *Aquaculture*, 254(1): 293-300.
- Rodríguez-González T., J. Cerezo-Valverde, AV. Sykes, B. García-García. 2015. Performance of raw material thermal treatment on formulated feeds for common octopus (*Octopus vulgaris*) ongrowing. *Aquaculture*, 442: 37-43
- Rosa, R., J. Pereira & M.L. Nunes. 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to giant squid, *Architeuthis* sp. *Marine Biology*, 146: 739-751.



- Rosas, C., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, D. Chay, N. López, T. Maldonado & P.M. Domingues. 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, 152: 371-381.
- Rosas C., J. Tut, J. Baeza, A. Sánchez, V. Sosa, C. Pascual, L. Arena, P. Domingues & G. Cuzon. 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, 275: 291-297.
- Rosas C., A. Valero, C. Caamal-Monsreal, I. Uriarte, A. Farias, P. Gallardo, A. Sánchez & P. Domingues. 2013. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research*, 44: 1029-1044.
- Roper C.F.E., M.J. Sweeney & C.E. Nauen. 1984. FAO species catalogue. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. Rome: FAO, 277 pp.
- Ruiz-Capillas C., A. Moral, J. Morales & P. Montero. 2002. Characterisation of non-protein nitrogen in the cephalopods volador (*Illex coindetii*), pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrhosa*). *Food Chemistry*, 76: 165-172.
- Sánchez, F.J., J. Iglesias, C. Moxica & J.J. Otero. 1998. Growth of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier), males and females under culture conditions. *Aquaculture and Water, European Aquaculture Society (Spec. Publ.)*, 26: 244-245.
- Santé-Lhoutellier V., T. Astruct, P. Marinova, E. Greve & P. Gatellier. 2008. Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *J. Agric. Food. Chem.*, 56: 1488-1494.
- Sargent J.R., R.J. Henderson & D.R. Tocher. 1989. The lipids. In: *Fish Nutrition, 2<sup>nd</sup> edition* (Halver J.E. ed.) Academic Press, San Diego, 153-218 pp.
- Sargent J.R., J.G. Bell, R.J. Henderson & D.R. Tocher. 1995. Origins and functions of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. In: *Phospholipids: Characterization, Metabolism and Novel Biochemical applications* (Ceve G. & F. Paltauf eds.) Champaign, IL: American Oil Chemical Society Press. 248-259 pp.
- Seixas P.F. 2009. Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797), alimentadas con juveniles de *Artemia* enriquecidos con microalgas y otros suplementos nutricionales. Tesis Doctoral. Universidad Santiago de Compostela. 289 pp.
- Segawa S. & T.R. Hanlon. 1988. Oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Octopus maya*, *Loligo forbesi* and *Lolliguncula brevis* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Behavior & Physiology*, 13: 389-400.
- Semmens J.M., N.A. Moltschanivskyj & C.G. Alexander. 1995. Effect of feeding on the digestive gland of the tropical sepioid *Idiosepius pygmaeus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 75: 885-897.
- Semmens J.M. 2002. Changes in the digestive gland of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1830) associated with feeding. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.*, 274: 19-39.
- Sendao, J.C., V. Carvalho & T.C. Borges. 1998. Rearing octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) with three different diets. En: *Livro de resumos, VI Congresso Nacional de Aquacultura*. Viana do Castelo, Portugal, 15–16 October.

- Shukla A. & B.T. Mossman. 2008. Cell signaling by oxidants: pathway leading to activation of mitogenactivated protein kinase (MAPK) and activator protein-1 (AP-1). *Current Topics in Membranes*, 61: 191-209.
- Sinanoglou, V.J. & S. Miniadis-Meimaroglou. 1998. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Research International*, 31: 467-473.
- Sinanoglou V.J. & S. Miniadis-Meimaroglou. 2000. Phospholipids in Mediterranean cephalopods. *Z. Naturforsch*, 55 C: 245-255.
- Smale, M.J. & P.R. Buchan. 1981. Biology of *Octopus vulgaris* off the East coast of South Africa. *Marine Biology (Berlin)*, 65: 1-12.
- Smith M.R. & Caron J.B. 2010. Primitive soft-bodied cephalopods from the Cambrian. *Nature*, 465: 427-428.
- Solorzano Y., M.T. Viana, L.M. López, J.G. Correa, C.C. True & C. Rosas. 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. *Aquaculture*, 289: 84-90.
- Stauffer C. 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists*. Van Nostand Reinhold/AVI, New York. 552 pp.
- Storey K.B., J.H.A. Fields & P.W. Hochachka. 1978. Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, *Loligo pealeii*: role of the enzyme in energy production from amino acids. *Journal of Experimental Zoology*, 205: 111-118.
- Stryer L. 1995. Degradación de aminoácidos y ciclo de la urea. In: Bioquímica, 4<sup>th</sup> edition (ed. by Freeman W.H. & Co., J.M. Macarulla), pp. 629-652, 1009. Editorial Reverté SA, Barcelona, Spain.
- Stryer L., J.M. Berg & J.L. Tymoczko. 2002. Biochemistry, Freeman W.H. & Co., New York, USA.
- Stuart J.A. & J.S. Ballantyne. 1996. Correlation of environment and phylogeny with the expression of  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase in the mollusca. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 114: 153-160.
- Stuart J.A., E.L. Ooi, J. McLeod, A.E. Bourns & J.S. Ballantyne. 1998. D- and L- $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase and the evolution of ketone body metabolism in gastropod mollusks. *The Biological Bulletin*, 195: 12-16.
- Sweeney M.J. & C.F.E. Roper. 2001. Current classification of recent cephalopoda. 1-59.
- Tait R.W. 1986. Aspects physiologiques de la sénescence post reproductive chez *Octopus vulgaris*. Ph. D. Thèse L'Université Paris VI.
- The LIPID MAPS Lipidomics Gateway, <http://www.lipidmaps.org/>
- Tocher D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11: 107-184.
- Uki N., M. Sugiura & T. Watanabe. 1986. Requirement of essential fatty acids in the abalone, *Haliotis discus hannai*. *Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52: 1013-1023.
- Van Heukelem, W.F. 1976. Growth, bioenergetics and life span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. Ph.D. thesis, University of Hawaii, 224 p.

- Vaz-Pires P., P. Seixas & A. Barbosa. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797): a review. *Aquaculture*, 238(1-4): 221-238.
- Vidal E.A.G., F.P. DiMarco, J.H. Wormuth & P.G. Lee. 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bulletin of Marine Science*, 71: 915-931.
- Vidal E.A.G., F.P. DiMarco & P.G. Lee. 2006. Effects of starvation and recovery on the survival, growth and RNA/DNA ratio in loliginid squid paralarvae. *Aquaculture*, 260: 94-105.
- Vidal, E.A.G. 2014. Advances in marine biology. Advances in Cephalopod Science: Biology, Ecology, Cultivation and Fisheries. Vol 67. Academic Press. 452 p
- Villanueva R., C. Nozais & S.v. Boletzky. 1995. The planktonic life of octopuses. *Nature*, 377, 107.
- Villanueva R., N. Koueta, J. Riba & E. Boucaud-Camou. 2002. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia nauplii* and compound diets. *Aquaculture*, 205: 269-286.
- Villanueva, R., J. Riba, C. Ruíz-Capillas, A.V. González & M. Baeta. 2004. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effects of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*, 242: 455-478.
- Walter H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. Ed. , *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270-277.
- Warnke K., R. Söller, D. Blohm & U. Saint-Paul. 2004. A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 42(4): 306-312.
- Wells M.J. 1978. Octopus. *Physiology and behaviour of an advanced invertebrate*. Chapman & Hall, London. 417 p.
- Wells M.J. 1990. Oxygen extraction and jet propulsion in cephalopods. *Canadian Journal of Zoology*, 68: 815-824.
- Wells M.J. & J. Wells. 1982. Ventilatory currents in the mantle of cephalopods. *J. Exp. Biol.*, 99: 315-330.
- Yamamoto T. & T. Akiyama. 1995. Effect of carboxymethylcellulose, alpha-starch, and wheat gluten incorporated in diets as binders on growth, feed efficiency, and digestive enzyme activity of fingerling Japanese flounder. *Fish Science*, 61: 309-313.
- Young R.E. & R.F. Harman. 1988. "Larva", "paralarvae" and "subadult" in cephalopod terminology. *Malacologia*, 29: 201-207.
- Young R.E., M. Vecchione & D.T. Donovan. 1998. The evolution of coleoid cephalopods and their present biodiversity and ecology, pp. 393-420. In: A.I.L. Payne, L. Lipinski, M.R. Clarke & M.A.C. Roeleveld (Eds.). *Cephalopod Biodiversity, Ecology and Evolution*. South African Journal of Marine Science, volume 20, 469 pp.
- Young R.E., E. Richard, M. Vecchione & K.M. Mangold (1922-2003). 2010. Cephalopoda Cuvier 1797. Octopods, squids, nautilus, etc. In:



- <http://tolweb.org/Cephalopoda/19386/2010.05.03> in The Tree of Life Web Project (<http://tolweb.org/>) Version 03 May 2010 (under construction).
- Zar J.H. 1984. Multisample hypotheses: the analysis of variance. In: *Biostatistical Analysis*, 2<sup>nd</sup> edn (ed. by Kurtz B.), pp. 718. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, NJ.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical analysis, 4<sup>th</sup> ed. Ryu T. (ed.). Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ. 663 p.
- Zlatanos S., K. Laskaridis, C. Feist, A. Sagredos. 2006. Proximate composition, fatty acid analysis and protein digestibility-corrected amino acid score of three Mediterranean cephalopods. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50: 967-970.

# ANEXOS

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura I.1** Captura por buques españoles de calamares, jibias y pulpos. Peso vivo (t, toneladas) para uso en fresco y congelado desde 2004 a 2013. Fuente: [www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/](http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/) .....4
- Figura I.2** Acuicultura en España de *Octopus vulgaris* (Cultivo en jaulas) desde 2006 a 2013. A. Cantidad total en euros (€) al año por la producción de pulpo común. B. Engorde de pulpo común a talla comercial en toneladas (t) al año .....6
- Figura I.3** Distribución mundial del pulpo común *Octopus vulgaris* .....9
- Figura I.4** A: Visión lateral de un octópodo incirrado. B: Región distal del hectocotilo de un octópodo incirrado .....11
- Figura I.5** Órganos del sistema digestivo de *Octopus vulgaris*. .....14
- Figura I.6** a. Proyección de Fischer de un triacil-sn-glicerol. b. Triacilglicerol 1,2,3-trihexadecanoyl-sn-glycerol. c. 1,2-/2,3-Diacilglicerol. d. 2-Monoacilglicerol. Fuente a: Christie & Han (2010). Fuente b: <http://www.lipidmaps.org>. Fuente c y d: <http://www.lipidlibrary.aocs.org> .....22
- Figura I.7** Proyección de Fischer del Colesterol (a) y del Ergosterol (b). Fuente a y b: <http://www.lipidmaps.org> .....23
- Figura I.8** a. Ésteres de Cera: Heptadecil-hexadecanoato (Heptadecil-Palmitato). b.  $\alpha$ -Tocoferol o Vitamina E. Fuente: <http://www.lipidmaps.org> .....23
- Figura I.9** a. Ácido Fosfatídico (1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfato). b. Ácido Lisofosfatídico (1-acil-sn-glicero-3-fosfato). Fuente: <http://www.lipidmaps.org> .....24
- Figura I.10** a. Fosfatidilglicerol (1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosforil-1'-sn-glicerol). b. Cardiolipina (1,3-bis(sn-3'-fosfatidil)-sn-glicerol). c. Ácido Lisobifosfatídico (Bis-2-eicosanoil)-3-liso-sn-glicero-1-fosfato). d. Fosfatidilcolina (1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosforilcolina). Fuente: <http://www.lipidmaps.org> .....26
- Figura I.11** a. Lisofosfatidilcolina (1-acil-sn-glicero-3-fosfocolina). b. Fosfatidiletanolamina (1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina). c. Fosfatidilserina (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoserina). d. Fosfatidilinositol (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-mioinositol)). Fuente: <http://www.lipidmaps.org> .....28
- Figura I.12** a. 1,2 di-octadecatrienoil-3- $\beta$ -galactosil-sn-glicerol. b. sulfoquinovosylmonoacylglycerol. Fuente: <http://www.lipidmaps.org> .....29
- Figura I.13** a. Ceramida. b. Esfingomielina. Fuente: <http://www.lipidmaps.org> .....32
- Figura I.14** Ácido eicosatetraenoico. Fuente: <http://www.lipidmaps.org> .....33
- Figura 1.1** Crecimiento en peso (kg) de juveniles del pulpo común *O. vulgaris* cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m<sup>-3</sup>) durante 70 días .....57
- Figura 1.2** Densidad de cultivo por tanque (kg m<sup>-3</sup>) de juveniles del pulpo común *O. vulgaris* cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m<sup>-3</sup>) durante 70 días .....58

<b>Figura 1.3</b> Supervivencia (%) de juveniles del pulpo común <i>O. vulgaris</i> cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m <sup>-3</sup> ) durante 70 días .....	59
<b>Figura 1.4</b> Tasas de crecimiento (GR; porcentaje del peso corporal por día, % pc d <sup>-1</sup> ) para cada periodo de muestreo de juveniles del pulpo común <i>O. vulgaris</i> cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m <sup>-3</sup> ), durante 70 días .....	59
<b>Figura 1.5</b> Tasas de ingestión (FR; porcentaje del peso corporal por día, % pc d <sup>-1</sup> ) para cada periodo de muestreo de juveniles del pulpo común <i>O. vulgaris</i> cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m <sup>-3</sup> ), durante 70 días .....	60
<b>Figura 1.6</b> Eficiencias de conversión (FC; %) para cada periodo de muestreo de juveniles del pulpo común <i>O. vulgaris</i> cultivado a tres densidades diferentes (15, 8 y 4 kg m <sup>-3</sup> ), durante 70 días .....	61
<b>Figura 2.1</b> Pesos de <i>O. vulgaris</i> alimentado con calamar ( <i>L. gahi</i> ) como dieta control y cangrejo de río ( <i>P. clarkii</i> ) durante el experimento I .....	78
<b>Figura 2.2</b> Pesos de <i>O. vulgaris</i> alimentado con una dieta control (calamar, <i>L. gahi</i> ) y dos presas alternativas (cangrejo de río, <i>P. clarkii</i> , y merluza, <i>M. gayi</i> ) durante el experimento II .....	79
<b>Figura 3.1</b> Peso medio (g) de los pulpos alimentados con la dieta SQUID y las dos dietas artificiales (GEL20 y GEL40) en los diferentes periodos de muestreo del Experimento I .....	100
<b>Figura 3.2</b> Peso medio (g) de los pulpos alimentados con la dieta SQUID y las dos dietas artificiales (ALG10 y ALG20) en los diferentes periodos de muestreo del Experimento II .....	100
<b>Figura 3.3</b> Análisis de Componentes Principales para la composición en ácidos grasos de la glándula digestiva de pulpos alimentados con cada dieta (dietas control (ALG-SQUID y GEL-SQUID), ALG10, ALG20, GEL20, GEL40) .....	113
<b>Figura 3.4</b> Análisis de Componentes Principales para la composición en clases lipídicas de la glándula digestiva de pulpos alimentados con cada dieta (dietas control (ALG-SQUID y GEL-SQUID), ALG10, ALG20, GEL20, GEL40) .....	113
<b>Figura 4.1</b> Peso medio (g) de pulpo común alimentado con calamar (CON) y dos dietas artificiales (GEL y ALG) para los diferentes periodos de muestreo .....	138
<b>Figura 4.2</b> Consumo de oxígeno (mg O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) y excreción de amonio (mg NH <sub>4</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) de juveniles de <i>O. vulgaris</i> alimentados con las dietas experimentales CON, GEL y ALG, y medidos en intervalos de una hora (h) .....	140
<b>Figura 4.3</b> Balance energético de juveniles de <i>O. vulgaris</i> alimentados con dietas experimentales (ALG, GEL, CON). Los valores en columnas se presentan como kJ kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> .....	142
<b>Figura 4.4</b> Efecto del tipo de dieta según la energía suministrada a partir del alimento como una función de la masa corporal, E(B), para pulpos alimentados con las dietas CON, GEL y ALG .....	142

**Figura 4.5** Resultados obtenidos mediante Análisis de Componentes Principales para la composición en ácidos grasos (% ps) de la glándula digestiva y manto de los pulpos utilizados en el experimento .....149

**Figura 4.6** Resultados obtenidos mediante Análisis de Componentes Principales para la composición en ácidos grasos (% ps) de los pulpos alimentados con las tres dietas experimentales (CONTROL (CON), GEL, ALG) .....150

**Figura 5.1** Cambios en el peso total de *Octopus vulgaris* durante el periodo de ayuno (días). El peso final viene dado como porcentaje del peso inicial del animal (% Peso Inicial) .....167

**Figura 5.2** Cambios en el índice de la glándula digestiva (IGD, %) durante el periodo de ayuno (días) de *Octopus vulgaris* .....167

**Figura 5.3** Variación del contenido de humedad en la glándula digestiva (GD) y el manto de *Octopus vulgaris* durante el periodo de ayuno (días) .....169

**Figura 6.1** Contenido en Aminoácidos (AA g Kg<sup>-1</sup> Proteína) Esenciales (AAE) y No Esenciales (AANE) en el manto de *Octopus vulgaris* durante el periodo de ayuno (27 días) .....193

**Figura 6.2** Resultados del Análisis de Componentes Principales para la composición en aminoácidos del manto de *Octopus vulgaris* durante el periodo de ayuno (27 días) .....194

**Figura 7.1** Efecto del pH sobre la actividad de proteasas (%) en muestras de Jugo gástrico (a) y Glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media ± D.E. (n=3) .....220

**Figura 7.2** Efecto del pH sobre la actividad de Tripsina y Quimotripsina (%) en muestras de Jugo gástrico de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media ± D.E. (n=3) .....220

**Figura 7.3** Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática de proteasas totales (Actividad Residual, %) en jugo gástrico (a) y glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris* durante 120 minutos. Valores expresados como media ± D.E. (n=3) .....221

**Figura 7.4** Efecto de la temperatura (°C) sobre la actividad de Proteasas Ácidas y Alcalinas (%) en muestras de Jugo gástrico (a) y Glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media ± D.E. (n=3) .....224

**Figura 7.5** Termoestabilidad (Actividad Residual, %) de Proteasas Ácidas (1) y Alcalinas (2) a diferentes temperaturas (°C) y tiempos de preincubación (minutos, min) en extractos enzimáticos de Jugo gástrico (a) y Glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media ± D.E. (n=3) .....226

**Figura 7.6** Efecto (% de Inhibición) de diferentes tipos de inhibidores de proteasas sobre la actividad enzimática de Jugo gástrico (a) y Glándula digestiva (b) de *Octopus vulgaris*. Valores expresados como media ± D.E. (n=3) .....227

**Figura 7.7** Zimogramas de proteasas alcalinas (A, C, D) y ácidas (B) presentes en el jugo gástrico (A, B, D) y la glándula digestiva (C) de *Octopus vulgaris* .....230

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.1</b> Identidad taxonómica de <i>Octopus vulgaris</i> (Cuvier, 1797) .....	8
<b>Tabla I.2</b> Ácidos grasos más comunes de origen animal y vegetal. Fuente: <a href="http://www.lipidlibrary.aocs.org">www.lipidlibrary.aocs.org</a> .....	34
<b>Tabla I.3</b> Aminoácidos y sus abreviaturas. Fuente: Berg <i>et al.</i> (2008) .....	36
<b>Tabla 2.1</b> Efecto del tipo de dieta sobre el balance energético de <i>O. vulgaris</i> bajo condiciones controladas.....	80
<b>Tabla 2.2</b> Contenido en Ácidos grasos ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ tejido ps) de la dieta control Calamar ( <i>L. gahi</i> ), y de dos presas alternativas (Merluza, <i>M. gayi</i> , y Cangrejo de río, <i>P. clarkii</i> ) .....	82
<b>Tabla 3.1</b> Composición proximal de las dietas elaboradas para los Experimentos I y I .....	101
<b>Tabla 3.2</b> Contenido en Ácidos Grasos del total de lípidos (g AG $\text{kg}^{-1}$ ps) de las dietas elaboradas para los Experimentos I y II .....	103
<b>Tabla 3.3</b> Clases lipídicas de las dietas elaboradas para los Experimentos I y II .....	104
<b>Tabla 3.4</b> Humedad de la glándula digestiva, Lípidos totales y Ácidos grasos del total de lípidos de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y dos dietas elaboradas (GEL20, GEL40) durante el Experimento I .....	106
<b>Tabla 3.5</b> Humedad de la glándula digestiva, Lípidos totales y Ácidos grasos del total de lípidos de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y dos dietas elaboradas (ALG10, ALG20) durante el Experimento II .....	108
<b>Tabla 3.6</b> Clases lipídicas de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y dos dietas elaboradas (GEL20, GEL40) durante el Experimento I .....	110
<b>Tabla 3.7</b> Clases lipídicas de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con la dieta control (SQUID) y dos dietas elaboradas (ALG10, ALG20) durante el Experimento II .....	111
<b>Tabla 4.1</b> Composición proximal de las dietas experimentales .....	129
<b>Tabla 4.2</b> Tasas de ingestión ( $\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) y energía ingerida, absorbida y producida por <i>O. vulgaris</i> alimentado con calamar aglutinado con alginato (ALG) y gelatina (GEL). El calamar fresco se usó como dieta control (CON) .....	139
<b>Tabla 4.3</b> Consumo de oxígeno y excreción de amonio de <i>O. vulgaris</i> alimentado con calamar aglutinado con alginato (ALG) y gelatina (GEL). El calamar fresco se usó como dieta control (CON) .....	141
<b>Tabla 4.4</b> Humedad de las dietas y del manto ( $\text{g kg}^{-1}$ ph), Lípidos totales ( $\text{g kg}^{-1}$ ps) del manto de pulpo y Perfil de ácidos grasos (% ps de los Ácidos Grasos Totales del manto de pulpo alimentado con calamar (CON) y las dos dietas artificiales (GEL, ALG) .....	144

<b>Tabla 4.5</b> Contenido en Ácidos grasos ( $\text{g kg}^{-1}$ ps) del manto de pulpos alimentados con calamar (CON) y con dos dietas artificiales (GEL, ALG) .....	145
<b>Tabla 4.6</b> Humedad de la GD ( $\text{g kg}^{-1}$ ph), Lípidos totales ( $\text{g kg}^{-1}$ ps) de la GD del pulpo y Perfil de ácidos grasos (% ps de los Ácidos Grasos Totales) de la GD de pulpos alimentados con calamar (CON) y con dos dietas artificiales (GEL, ALG) .....	147
<b>Tabla 4.7</b> Contenido en Ácidos grasos ( $\text{g kg}^{-1}$ ps) de la glándula digestiva del pulpo alimentado con calamar (CON) y con dos dietas artificiales (GEL, ALG) .....	148
<b>Tabla 5.1</b> Peso total de los pulpos (P Pulpo, gr), Peso de la glándula digestiva (P GD, gr), Peso perdido por los pulpos (PP Pulpo, %) y por la GD (PP GD, %), y el Índice de la Glándula digestiva (IGD, %) durante los 27 días de ayuno a los que se sometió <i>O. vulgaris</i> en el experimento .....	168
<b>Tabla 5.2</b> Humedad, Lípidos totales, Lípidos neutros, Lípidos polares y Clases lipídicas del manto de <i>O. vulgaris</i> durante 27 días en ayuno .....	170
<b>Tabla 5.3</b> Humedad, Lípidos totales, Lípidos neutros, Lípidos polares y Clases lipídicas de la glándula digestiva de <i>O. vulgaris</i> durante 27 días en ayuno .....	171
<b>Tabla 5.4</b> Contenido en Ácidos Grasos ( $\mu\text{g AG mg}^{-1}$ ps) del manto de <i>O. vulgaris</i> durante 27 días en ayuno .....	173
<b>Tabla 5.5</b> Contenido en Ácidos Grasos ( $\mu\text{g AG mg}^{-1}$ ps) de la glándula digestiva de <i>O. vulgaris</i> durante 27 días en ayuno .....	175
<b>Tabla 6.1</b> Contenido en Proteínas ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) y Contenido en Aminoácidos Totales ( $\text{g Kg}^{-1}$ Proteína) del manto de <i>Octopus vulgaris</i> durante el tiempo de inanición (días) .....	195
<b>Tabla 7.1.</b> Reactivos y protocolo de preparación para geles de electroforesis .....	217
<b>Tabla 7.2</b> Efecto del pH sobre la actividad enzimática de proteasas totales, tripsina y quimotripsina en jugo gástrico y proteasas totales de glándula digestiva de <i>Octopus vulgaris</i> .....	219
<b>Tabla 7.3</b> Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática de proteasas totales en jugo gástrico y glándula digestiva de <i>Octopus vulgaris</i> durante 120 minutos .....	222
<b>Tabla 7.4</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de proteasas ácidas y alcalinas en jugo gástrico y glándula digestiva de <i>Octopus vulgaris</i> .....	223
<b>Tabla 7.5</b> Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de proteasas ácidas y alcalinas en jugo gástrico y glándula digestiva de <i>Octopus vulgaris</i> .....	225
<b>Tabla 7.6</b> Efecto de diferentes tipos de inhibidores de proteasas sobre la actividad enzimática de Jugo gástrico y Glándula digestiva de <i>Octopus vulgaris</i> . Valores expresados como media $\pm$ D.E. (n=3) en UI $\text{mg proteína}^{-1}$ y como % de Inhibición .....	228

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Durante la elaboración de esta Tesis Doctoral se ha obtenido la siguiente producción científica:

### PUBLICACIONES

- García-Garrido S**, Hachero-Cruzado I, Rosas C, Domingues P (2013) Protein and amino acid composition from the mantle of juvenile *Octopus vulgaris* exposed to prolonged starvation. *Aquaculture Research*, 44: 1741-1751. DOI 10.1111/j.1365-2109.2012.03180.x
- Cerezo-Valverde J, Hernández MD, **García-Garrido S**, Rodríguez C, Estefanell J, Gairín JJ, Rodríguez CJ, Tomás A, García-García B (2012) Lipid classes from marine species and meals intended for cephalopod feeding. *Aquaculture International*, 20: 71–89. DOI 10.1007/s10499-011-9442-z
- Domingues P, Alaminos J, **García-Garrido S**, Hachero-Cruzado I, Rosas C (2012) *Growth and survival of juvenile spider crabs, Maja brachydactyla (Bals, 1922) fed with fresh or frozen mussels.* *Aquaculture Research*, 43: 167-177. DOI 10.1111/j.1365-2109.2011.02813.x
- García-Garrido S**, Hachero-Cruzado I, Domingues P, López N, Rosas C (2011) *Effects of fish hydrolysate (CPSP®) on growth and digestive gland lipid composition of Octopus vulgaris (Cuvier, 1797) juveniles.* *Aquaculture Nutrition*, 17: e825–e839. DOI 10.1111/j.1365-2095.2010.00839.x
- García S**, Domingues P, Navarro JC, Hachero-Cruzado I, Garrido D, Rosas C (2011) *Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of Octopus vulgaris (Cuvier, 1797) fed with to artificial diets.* *Aquaculture Nutrition*, 17: e174-e187. DOI 10.1111/j.1365-2095.2009.00746.x
- Herrera M, Hachero-Cruzado I, **García S**, Mancera JM, Navas JI (2011) *Reproduction of the wedge sole (Dicologlossa cuneata Moreau) in captivity: spawning parameters and influence of the natural temperature.* *Rev Fish Biol Fisheries*, 21: 517-526. DOI 10.1007/s11160-010-9172-8.
- Baeza-Rojano E, **García S**, Garrido D, Guerra-García JM, Domingues P (2010) *Use of Amphipods as alternative prey to culture cuttlefish (Sepia officinalis) hatchlings.* *Aquaculture* 300 : 243-246. DOI 10.1016/j.aquaculture.2009.12.029.
- García-Garrido S**, Hachero-Cruzado I, Garrido D, Rosas C, Domingues P (2010) *Lipid composition of the mantle and digestive gland of Octopus vulgaris juveniles (Cuvier, 1797) exposed to prolonged starvation.* *Aquaculture International* 18: 1223-1241. DOI 10.1007/s10499-010-9335-6.
- Domingues P, **García S**, Hachero I, López N, Rosas C (2010) *The use of alternative prey (crayfish, Procambarus clarkii, and hake, Merluccius gayi) to culture Octopus vulgaris (Cuvier, 1797).* *Aquaculture International* 18: 487-499. DOI 10.1007/s10499-009-9259-1.



Domingues P, **García S**, Garrido D (2010) *Effects of three culture densities on growth and survival of Octopus vulgaris (Cuvier, 1797)*. Aquaculture International 18: 165-174. DOI 10.1007/s10499-008-9233-3.

Quintana D, Domingues P, **García S** (2008) *Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatine on feed and growth performance of common octopus (Octopus vulgaris) sub-adults*. Aquaculture 280 (1-4): 161-164. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.04017.

## **COMUNICACIONES**

### **CARTEL**

López-Sanmartín M, **García-Garrido S**, Domingues P, Cordero M.L. (2012) *Preliminary enzymatic characterization of the gastric juice of Octopus vulgaris*. En: Aquaculture Europe 2012 (AQUA 2012. 1-5 Septiembre 2012. Praga, República Checa). <https://www.was.org/WASMeetings/Meetings/ShowAbstract.aspx?Id=26023>

**García-Garrido S**, Domingues P, Rosas C, Hachero-Cruzado I, Garrido D, Cordero ML. (2011) *Efectos de un ayuno prolongado sobre la composición en aminoácidos del manto de Octopus vulgaris*. En: Libro de Actas XIII Congreso Nacional de Acuicultura. En equilibrio con el medio ambiente (XIII Congreso Nacional de Acuicultura. 21-24 Noviembre 2011. Castelldefels, Barcelona, España): 96.

**García S**, Garrido D, Rosas C, Sykes A, Domingues P. (2010) *Characterization of the enzymatic activity in the gastric juice and digestive gland of octopus Octopus vulgaris and cuttlefish Sepia officinalis at different pH and temperatures*. En: Libro de Actas Aquaculture Europe 2010 (Aquaculture Europe 2010. 5-8 Octubre 2010. Oporto, Portugal): 388-389.

Baeza-Rojano E, Domingues P, Rosas C, **García S**, Garrido D, Guerra-García J.M. (2010) *Use of Amphipods as alternative prey in cephalopods aquaculture*. En: XIV<sup>th</sup> International Colloquium on Amphipoda I (13-18 Septiembre 2010. Sevilla, España)

**García S**, Garrido D, Rosas C, Rodríguez C.J., Pascual C, Sykes A, Domingues P. (2010) *Caracterización de la actividad enzimática del jugo gástrico de pulpo, Octopus vulgaris y de choco, Sepia officinalis a distintos pH. Digestibilidad in vitro de distintas dietas, con jugo gástrico de pulpo*. En: XII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas (8-9 Octubre 2009. Isla de La Toja, O Grove, España). Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal., 12: 255-262.

Cerezo-Valverde J, Tomás A, Martínez-Llorens S, Jover M, **García S**, Rodríguez C, Gairín I, Estefanell J, Pascual C, García-García B. (2009) *Composición en aminoácidos e índices de calidad proteica de dietas naturales e ingredientes alternativos para el desarrollo de piensos en el pulpo común (Octopus vulgaris)*. En: Actas del XII Congreso Nacional de Acuicultura (XII Congreso Nacional de Acuicultura. 24-26 de noviembre, 2009. Madrid, España): 40-41.

Cerezo-Valverde J, Hernández M.D., Aguado-Giménez F, **García S**, Rodríguez C, Gairín I, Estefanell J, Pascual C, Tomás A, García-García B. (2009) *Composición en minerales de dietas naturales y harinas para el desarrollo de piensos para el pulpo común (Octopus vulgaris)*. En: Actas del XII Congreso Nacional de Acuicultura (XII Congreso Nacional de Acuicultura. 24-26 de noviembre, 2009. Madrid, España): 86-87.

- García S.**, Hachero-Cruzado I., Garrido D., Rosas C., Domingues P. (2009) *Efecto del ayuno sobre el contenido en lípidos totales, clases lipídicas y ácidos grasos del manto y glándula digestiva de Octopus vulgaris*. En: Actas del XII Congreso Nacional de Acuicultura (XII Congreso Nacional de Acuicultura. 24-26 de noviembre, 2009. Madrid, España): 132-133.
- García S.**, Domingues P., Hachero I., Garrido D., Rosas C. (2009) *Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of Octopus vulgaris (Cuvier, 1797) fed artificial diets with two different binders*. En: CIAC Cephalopod International Advisory Council Symposium (CIAC'09. 3-11 de septiembre, 2009. Vigo, España): p. 69.
- García S.**, Domingues P., Hachero I., López N., Rosas C. (2009) *Effects of artificial diets prepared with two types of binder and different concentrations of fish hydrolyse (CPSP 90®) on growth and lipid composition of digestive gland in Octopus vulgaris*. En: CIAC Cephalopod International Advisory Council Symposium (CIAC'09. 3-11 de septiembre, 2009. Vigo, España): p. 70.
- García S.**, Márquez L., Quintana D., Domingues P. (2007) *Aceptación de diferentes formas de presentación de la dieta para choco, Sepia officinalis, y su efecto en el crecimiento*. En: Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura (XI Congreso Nacional de Acuicultura. 25-28 Septiembre 2007. Vigo, España): 687-690.
- Quintana D., Domingues P., **García S.** (2007) *Experimento preliminar al diseño de dietas artificiales para juveniles de pulpo común (Octopus vulgaris)*. En: Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura (XI Congreso Nacional de Acuicultura. 25-28 Septiembre 2007. Vigo, España): 667-670.

## COMUNICACIÓN ORAL

- García-Garrido S.** (2010) *Plan Nacional Jacumar Optimización del engorde de pulpo. Informe final. Subproyecto 1: Desarrollo de piensos compuestos*. En: Reunión Anual de Seguimiento JACUMAR, Plan Nacional Optimización del engorde del pulpo Octopus vulgaris. Informe final (8-10 Marzo 2010. IFAPA Centro Agua del Pino, Cartaya, Huelva, España).
- García S.**, Domingues P., Garrido D., Rodríguez C.J., Pascual C. (2009) *Efecto de dietas artificiales, con y sin atrayente, sobre el crecimiento del pulpo común, Octopus vulgaris*. En: Actas del XII Congreso Nacional de Acuicultura (XII Congreso Nacional de Acuicultura. 24-26 de noviembre, 2009. Madrid, España): 38-39.
- García S.** (2008) *Estudio de la fisiología digestiva en el pulpo Octopus maya: Caracterización de enzimas y digestibilidad in vitro*. En: I Seminario de Actualización Científica (11 Diciembre 2008. IFAPA Centro Agua del Pino, Cartaya, Huelva, España).
- García S.** (2008) *Experimentos llevados a cabo con el pulpo común (Octopus vulgaris) en 2007, dentro del Plan Nacional JACUMAR, en el IFAPA Centro Agua del Pino*. En: Reunión Anual de Seguimiento JACUMAR, Plan Nacional Optimización del engorde del pulpo Octopus vulgaris (1 Febrero 2008. Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), Gran Canaria, España).

## **BECAS Y PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

### **BECAS**

Beca Predoctoral *Desarrollo de dietas artificiales para dos especies de moluscos cefalópodos: Choco (Sepia officinalis) y Pulpo (Octopus vulgaris)*

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

Centro IFAPA *Agua del Pino*, Cartaya, Huelva.

Enero 2007 – Enero 2011

### **PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

Proyecto Nacional JACUMAR *Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos de pulpo de roca Octopus vulgaris L.*

Centro IFAPA *Agua del Pino*, Cartaya, Huelva.

Enero 2010 – Diciembre 2012

Proyecto Nacional JACUMAR *Optimización del engorde de pulpo Octopus vulgaris.*

Centro IFAPA *Agua del Pino*, Cartaya, Huelva.

Enero 2007 – Diciembre 2009

Proyecto *Cultivo preliminar extensivo de choco Sepia officinalis, en esteros.* INIA TRT2006-00010-00-00

Centro IFAPA *Agua del Pino*, Cartaya, Huelva.

Enero 2007 – Diciembre 2009

Proyecto *Estudios preliminares sobre la viabilidad de cultivo a gran escala del choco, Sepia officinalis.* INIA

RTA2005-00070-00-00

Enero 2007 – Octubre 2008

Proyecto Nacional JACUMAR *Cultivo de centolla, Maja sp.*

Centro IFAPA *Agua del Pino*, Cartaya, Huelva.

Enero 2006 – Octubre 2008

Proyecto DAP *Instalación piloto para el acondicionamiento y cultivo de peces planos en el CICEM Agua del Pino.*

Centro IFAPA *Agua del Pino*, Cartaya, Huelva.

Enero 2006 – Enero 2007

## **ASISTENCIA A REUNIONES Y ESTANCIAS REALIZADAS**

### **ASISTENCIA A JORNADAS Y REUNIONES CIENTÍFICAS**

Reunión Anual JACUMAR – Plan Nacional del Pulpo 2010. Centro IFAPA Agua del Pino, Cartaya, Huelva. Del 8 al 10 de Marzo de 2010.

Reunión Anual JACUMAR – Plan Nacional del Pulpo 2008. Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), Gran Canaria. Día 1 de Febrero de 2008.

I Seminario de Actualización Científica. Centro IFAPA Agua del Pino, Cartaya, Huelva. Día 11 de Diciembre de 2008.

Seminario sobre Grupos de Acción Costera. Centro IFAPA Huelva, Huelva. Día 29 de Junio de 2006.

VI Jornadas de Acuicultura en el litoral suratlántico. Centro Cultural de “La Villa”, Cartaya, Huelva. Del 9 al 10 de Mayo de 2012

Jornadas de Puertas Abiertas 2010. Centro IFAPA Agua del Pino, Huelva. Día 11 de Noviembre de 2010.

Jornadas de Puertas Abiertas 2009. Centro IFAPA Agua del Pino, Huelva. Día 19 de Noviembre de 2009.

Jornadas Técnicas sobre las implicaciones de la nueva normativa sanitaria en la producción acuícola andaluza. Hotel AC Ciudad de Sevilla, Sevilla. Día 16 de Diciembre de 2008.

IV Jornadas de Acuicultura en el litoral suratlántico. Centro Cultural de “La Villa”, Cartaya, Huelva. Día 16 de Abril de 2008.

Jornadas de Puertas Abiertas 2007. Centro IFAPA Agua del Pino, Huelva. Día 15 de Noviembre de 2007.

III Jornadas de Acuicultura en el litoral suratlántico. Innovación en acuicultura: producción y comercialización. Centro Cultural de “La Villa”, Cartaya, Huelva. Del 21 al 22 de Marzo de 2006.

XIV International Colloquium on Amphipoda I. Facultad de Biología, Sevilla. Del 13 al 18 de Septiembre de 2010.

XII Foro dos recursos mariños e da acuicultura das Rias Galegas. Isla de La Toja (O Grove). Del 8 al 9 de Octubre de 2009 (30 horas).

Aquaculture Europe 2012 (AQUA 2012). Praga (República Checa). Del 1 al 5 de Septiembre de 2012.

XIII Congreso Nacional de Acuicultura (XIII CNA). Castelldefels, Barcelona. Del 21 al 24 de Noviembre de 2011.

Aquaculture Europe 2010. Oporto (Portugal). Del 5 al 8 de Octubre de 2010.

XII Congreso Nacional de Acuicultura (XII CNA). Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, Madrid. Del 24 al 26 de Noviembre de 2009.

Cephalopod International Advisory Council (CIAC Symposium). Vigo. Del 3 al 11 de Septiembre de 2009.

III Congreso CLANA. Hotel Hilton, Cancún, Quinata Roo (México). Del 18 al 21 de Noviembre de 2008.

XI Congreso Nacional de Acuicultura (XI CNA) Centro Cultural Caixanova, Vigo (Pontevedra). Del 24 al 28 de Septiembre de 2007.

## **ESTANCIAS EN CENTROS DE INVESTIGACIÓN**

### **Estancia nacional Sevilla**

Estancia nacional realizada en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla (España). Bajo la supervisión del Dr. D. Juan D. Bautista Palomas (catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla). Del 4 de Octubre al 3 de Noviembre de 2010 (1 mes).

### **Estancia internacional Alemania**

Estancia internacional realizada en el Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, en Bremerhaven (Alemania). Bajo supervisión del profesor-investigador el Dr. D. Reinhard Saborowski. Del 7 de Abril al 5 de Julio de 2010 (3 meses).

### **Estancia internacional México**

Estancia internacional realizada en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Sisal, Yucatán (México). Bajo supervisión del profesor-investigador el Dr. D. Carlos Rosas Vázquez. Del 1 de Septiembre al 30 de Noviembre de 2008 (3 meses).

