

TESIS DEFENDIDA POR
GLORIA EDITH VILLARREAL RODARTE
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Director del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Miembro del Comité

Dra. Sharon Zinah Herzka Llona.

Miembro del Comité

Dra. María Teresa Viana Castrillón

Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias en
Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

25 de Febrero de 2011

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE HUFAs n-3 EN LA DIETA SOBRE EL
CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA, EFICIENCIA ALIMENTICIA E ÍNDICE DE
CONDICIÓN EN JUVENILES DE *Totoaba macdonaldi***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

GLORIA EDITH VILLARREAL RODARTE

Ensenada, Baja California, México, febrero de 2011

RESUMEN de la tesis de **Gloria Edith Villarreal Rodarte**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Febrero de 2011.

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE HUFAs n-3 EN LA DIETA SOBRE EL CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA, EFICIENCIA ALIMENTICIA E ÍNDICE DE CONDICIÓN EN JUVENILES DE *Totoaba macdonaldi*

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Director de Tesis

Con el objeto de incrementar nuestro conocimiento en cuanto a los requerimientos nutricionales de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, se evaluó el efecto de cuatro concentraciones de HUFAs n-3 adicionadas a la dieta (0%, 0.5%, 1% y 1.5% de la dieta) sobre el crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia e índice de condición. Se realizó un bioensayo durante 56 días en juveniles de totoaba con un peso inicial de 1.5 gr y una longitud inicial de 47 mm. Cada tratamiento fue evaluado por triplicado, así como los análisis proximales y la composición de ácidos grasos tanto en dietas como en organismos. El crecimiento en peso (gr) y longitud (mm) de los peces alimentados con dietas que contenían 1.0% de HUFAs n-3 resultaron en valores significativamente mayores (16.11 ± 0.38 gr y 119.62 ± 1.81 mm respectivamente) en comparación a los otros tratamientos. Sin embargo, los peces alimentados con dietas adicionadas con 1.5% de HUFAs n-3 resultaron con los pesos y tallas menores (12.34 ± 0.49 gr y 110.13 ± 0.92 mm, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia (100%) e índices de condición. Se estimó por medio de una regresión polinomial de segundo orden que el mayor crecimiento en longitud y peso se podría alcanzar adicionando a la dieta el 0.90% de HUFAs n-3. Así mismo, la mejor utilización del alimento en términos de eficiencia alimenticia se obtuvo con el tratamiento adicionado con 1.0% HUFAs n-3. Las concentraciones de ácidos grasos encontradas en los organismos reflejaron directamente el porcentaje del contenido de ácidos grasos en la dieta, en particular en los ácidos grasos esenciales. Por ejemplo, el aumento de la concentración de HUFAs n-3 en la dieta, resultó en un incremento en la concentración de HUFAs n-3 en los organismos ($r^2 = 0.96$). Los ácidos grasos más abundantes cuantificados en los juveniles de totoaba fueron el 18:2n-6, 18:1n-9, 16:0, 22:6n-3 y 18:0. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se recomienda adicionar de 0.9% a un 1.0% HUFAs n-3 a las

dietas de juveniles tempranos de totoaba para obtener un buen crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia.

Palabras clave: *Totoaba macdonaldi*, ácidos grasos en la dieta, HUFAs n-3.

ABSTRACT of the thesis presented by **Gloria Edith Villarreal Rodarte** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Aquaculture. Ensenada, Baja California, México. February 2011

EFFECT OF THE CONCENTRATION OF N-3 HUFA IN THE DIET ON THE GROWTH, SURVIVAL, FEED EFFICIENCY AND CONDITION INDEX OF JUVENILE *Totoaba macdonaldi*.

In order to increase our knowledge on the nutritional requirements of juvenile *Totoaba macdonaldi*, a 56-day feeding trial was conducted with juvenile totoaba (1.5 g initial weight and 47 mm initial total length) to evaluate the effect of four dietary levels of n-3 HUFAs (0%, 0.5%, 1% and 1.5% of the diet) on growth, survival, feed efficiency and condition index. Each treatment was evaluated in triplicate, and the proximate composition and fatty acid profiles determined in the diets and organisms. Growth in terms of weight and length of fish fed diets containing 1.0% n-3 HUFAs resulted in significantly higher values (16.11 ± 0.38 gr and 119.62 ± 1.81 mm, respectively) compared to other treatments. However, fish fed diets supplemented with 1.5% n-3 HUFAs resulted in the lowest final weight and length (12.34 ± 0.49 gr and 110.13 ± 0.92 mm respectively). There were no significant differences in survival (100%) and condition indexes among treatments. Based on a second order polynomial regression analysis the recommended n-3 HUFA level in the diet of juvenile totoaba to attain adequate growth, and survival as estimated here for 1 g fish was 0.90% n-3 HUFAs of the diet. Additionally, better-feed utilization in terms of feed efficiency was obtained with fish fed the diet containing 1.0% n-3 HUFAs. Fatty acid profiles found in whole-body carcass directly reflected the fatty acids profiles found in the diet, particularly for the essential fatty acids. For example, increasing the concentration of n-3 HUFAs in the diet resulted in an increase n-3 HUFAs levels in the organism ($r^2 = 0.96$). The most abundant fatty acids quantified in juvenile totoaba were 18:2 n-6, 18:1 n-9, 16:0, 22:6 n-3 and 18:0. Based on the results from this study we recommend formulating diets containing 0.9% to 1.0% n-3 HUFAs to obtain adequate growth, survival and feed efficiency.

Keywords: *Totoaba macdonaldi*, dietary fatty acids, n-3 HUFAs,

DEDICATORIAS

A mi Madre Eloísa Rodarte Garibaldi por su apoyo comprensión, amor, paciencia y dedicación que siempre me ha dado.

A mis hermanos José Luis, Osvaldo y Jorge de quienes he recibido siempre su invaluable apoyo y cariño

A mi padre José Luis Villarreal por su motivación.

A Efraín Arias por estar siempre a mi lado, por todo el cariño, paciencia y dedicación.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero expresar mi más profundo agradecimiento al **Dr. Juan Pablo Lazo Corvera**, director de este trabajo. Siempre aprecié su apoyo y paciencia. Gracias por su disposición permanente para aclarar mis dudas.

A los integrantes del comité **Dra. Beatriz Cordero, Dra. Sharon Herzka y Dra. María Teresa Viana** por sus observaciones, correcciones y sugerencias que ayudaron a darle más claridad al trabajo.

Al **Dr. Eduardo Durazo**, por compartir su experiencia y asesorar parte de este trabajo muchas gracias.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada**, por haberme permitido realizar mis estudios de maestría en esta institución, así como todas las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

Al **M. en C. Conal David True** por la donación de los organismos para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Benjamín Barón** por su disposición en todo momento para compartir su experiencia y conocimientos.

A la **Dra. Beatriz Cordero** por formar parte de mi comité evaluador, así como por su apoyo e interés en la realización de este trabajo y sobre todo por su amistad.

A la **M. en C. Yanet Guerrero Rentería**, por su ayuda en el laboratorio y por su amistad.

Al Técnico **Biol. Mar. Adrián Celaya Ortega**, por su ayuda para en el buen funcionamiento del sistema de cultivo.

Miembros del laboratorio de peces marinos Tec. **Oc. Jesús Mariscal, Biol. Uvina Salgado**, por su ayuda en las biometrías y mantenimiento del sistema. Gracias por su amistad.

Al grupo de trabajo del **laboratorio de Nutrición Acuícola del CICESE** Fernando García, Verónica Vizcaíno, José Antonio Mata Sergio Castillo y Fernando Girón por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS (continuación)

Al equipo de trabajo del **laboratorio de Nutrición y Fisiología del IIO (UABC)** por brindarme las instalaciones y apoyo en este trabajo, especialmente a **Marco Ponce**, gracias por tu amistad, asesorías, consejos y apoyo durante este trabajo.

Al todo el personal del Departamento de Acuicultura: Investigadores, técnicos secretarías y administrativos quienes directa e indirectamente participaron en la realización de este trabajo.

A **Varuní Arredondo** por su esmero y dedicación que mostró por las necesidades del laboratorio, pero sin lugar a duda por su amistad.

A **mi familia** por todo el apoyo brindado, con especial cariño agradezco a mis tías Norma, Delia, Leticia y Ana por su infinito apoyo.

A **José Luis** gracias hermano por todos los sacrificios que haz realizado para brindarme tu constante apoyo, sin el cual no me hubiese sido fácil este camino de formación profesional.

A mi amigo **José Antonio Mata** por su amistad y apoyo en los momentos difíciles en este recorrido por la ciencia.

A todos mis compañeros que siempre me brindaron su amistad, gracias por todos esos momentos que pasamos juntos durante la Maestría. Especialmente a la banda de acuí.

A mis amigos que a pesar del tiempo y la distancia siempre estuvieron pendientes de mí.

A **Dios y a la vida** por darme el don de vivir y ser feliz.

CONTENIDO

CONTENIDO		vii
LISTA DE FIGURAS		ix
LISTA DE TABLAS		xi
LISTA DE TABLAS (continuación)		xii
I. INTRODUCCIÓN		2
II. ANTECEDENTES		5
II.1. <i>Totoaba macdonaldi</i>		5
II.2. Importancia del estudio de lípidos y ácidos grasos		7
II.3. Funciones de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) en los vertebrados		8
II.4. Requerimientos de ácidos grasos en peces y vertebrados		10
II.5. Influencia de la dieta en la composición corporal de ácidos grasos		13
II.6. Patologías y síndromes asociados a la carencia de HUFAs		14
III. HIPÓTESIS		17
IV. OBJETIVOS		18
IV.1. Objetivo general		18
V. MATERIALES Y MÉTODOS		19
V.1. Formulación y elaboración de la dieta		19
V.2. Condiciones de cultivo		21
V.3. Muestreos y toma de datos		23
V.4. Crecimiento y supervivencia		23
V.5. Tasa de Conversión Alimenticia		24
V.6. Eficiencia proteica		24
V.7. Índice Hepatosomático		24

V.8.	Índice de condición.....	25
V.9.	Análisis químico proximal	25
V.10.	Análisis de ácidos grasos.	25
V.11.	Análisis estadístico.....	26
VI.	RESULTADOS	27
VI.1.	Crecimiento	27
VI.2.	Supervivencia.....	29
VI.3.	Tasa de Conversión Alimenticia	29
VI.4.	Eficiencia proteica	30
VI.5.	Índice hepatosomático.	30
VI.6.	Índice de condición.....	31
VI.7.	Composición proximal de pez completo	32
VI.8.	Análisis de ácidos grasos	33
VI.8.1.	Composición de ácidos grasos en dietas	33
VI.8.2.	Composición de ácidos grasos en los organismos	38
VII.	DISCUSIÓN	43
VII.1.	Crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia e índice de condición ...	43
VII.2.	Perfil de ácidos grasos en dietas.....	50
VII.3.	Perfil de ácidos grasos en las dietas y organismos	50
VIII.	CONCLUSIONES	53
IX.	RECOMENDACIONES	54
X.	LITERATURA CITADA.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Adulto (a) y juvenil (b) de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	5
2	Rutas de biosíntesis de los ácidos grasos altamente insaturados de C20 y C22 a partir de los precursores n-3, n-6 y n-9. Las flechas grises indican las enzimas elongasas y desaturasas que tienen una limitada capacidad de sintetizar el ARA, EPA y DHA (Tocher, 2003).	12
3	Sistema de cultivo en el laboratorio de peces marinos del departamento de Acuicultura del CICESE.	22
4	Imagen que muestra el proceso de las biometrías realizadas a los juveniles de totoaba, donde se tomaron datos como talla (mm) y peso (gr).	23
5	Peso (gr) de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> por tratamiento registrado al final del experimento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3)	27
6	Longitud (mm) de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> por tratamiento registrado al final del experimento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3)	28
7	Peso (gr) de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> a través de las semanas de bioensayo. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).	28
8	Regresión polinomial de segundo orden respecto a la ganancia en peso (gr) en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> y la concentración (%) de HUFAs n-3 en la dieta.	29

LISTA DE FIGURAS (continuación)

9	Valores de la Tasa de Conversión Alimenticia (TCA) de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> durante el bioensayo. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).	30
10	Índice hepatosomático (IHS) de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> registrado al final del experimento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3)	31
11	Porcentaje de los ácidos grasos identificados individualmente, en las dietas con diferentes concentraciones de HUFAs n-3	38
12	Porcentaje de los ácidos grasos por grupos identificados, en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> bajo el régimen alimenticio de cuatro diferentes concentraciones de HUFAs n-3 en la dieta.	41
13	Porcentaje de los ácidos grasos identificados individualmente, en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> bajo el régimen alimenticio de cuatro diferentes concentraciones de HUFAs n-3 en la dieta.	42

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Principales funciones de los HUFAs: Araquidónico (ARA, 20:4n-6), Eicosapentanoico (EPA, 20:5 n-3) y Docohexaenoico (DHA, 22:6 n-3) en vertebrados.	9
II	Formulación y composición proximal de las cuatro dietas experimentales con concentraciones de 0%, 0.5%, 1.0% y 1.5% de HUFAs n-3.	20
III	Valores biológicos de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con dietas formuladas a partir de cuatro concentraciones de HUFAs n-3. TCA= Tasa de Conversión Alimenticia. TEP= Tasa de Eficiencia Proteica. IHS= Índice Hepatosomático. K= Índice de Condición de Fulton. Los valores presentados son la media \pm error estándar de n=3. Los superíndices indican las diferencias significativas entre los tratamientos.	32
IV	Composición proximal de pez entero, en base seca de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con dietas formuladas a base de cuatro concentraciones de HUFAs n-3. (0%,0.5%, 1.0% y 1.5%) Los valores son la media \pm error estándar de (n=3). Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos.	33
V	Composición de ácidos grasos (en porcentaje del total de ácidos grasos identificados) en las cuatro dietas (n=3) Media \pm la desviación estándar. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos.0%, 0.5%, 1.0% y 1.5%= concentraciones de HUFAs n-3.	36
VI	Composición de ácidos grasos en peso seco (mg/100g de dieta) en las dietas experimentales (n=2) Media \pm la desviación estándar. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos.	37

LISTA DE TABLAS (continuación)

- VII Composición de ácidos grasos (en porcentaje del total de ácidos grasos identificados) en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes concentraciones de HUFAs n-3. (n=3) Media \pm indica la desviación estándar. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos. 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5% = concentraciones de HUFAs n-3. 40

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la acuicultura ha sido el área con mayor crecimiento en el campo de la producción alimenticia. Su contribución al suministro de organismos acuáticos a nivel mundial ha pasado de un 3.9% en 1970 a un 36% en 2006. El crecimiento de la producción acuícola fue tal que, en el mismo período, se observó un aumento en el consumo *per cápita* de 0.7kg a 7.8kg, respectivamente. En el 2006 la actividad alcanzó una producción total de 51.7 millones de toneladas¹ y un valor de 78,800 millones de dólares, lo que representó el 47% del suministro de pescado para la alimentación de la población humana (FAO 2009).

Entre los principales grupos de organismos cultivados están los moluscos, crustáceos y peces. Los peces dulceacuícolas son el principal grupo de organismos cultivados, alcanzando una producción de 27.8 millones de toneladas en 2006 con un valor de 29,500 millones de dólares, lo que representó el 54% del volumen total de la producción mundial acuícola y el 37% del valor total. El cultivo de peces marinos contribuye solo el 3% del volumen; no obstante, su valor es del 8% del total. La mayor parte de las especies de esta categoría, poseen un valor comercial relativamente elevado, (como los peces planos y los meros). Por otro lado, en algunos casos las poblaciones naturales son reducidas o están disminuyendo, como es el caso de la perca japonesa (*Lateolabrax japonicus*), la dorada (*Sparus aurata*), la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) y el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), lo que ha llevado a que las cantidades producidas en la actualidad por la acuicultura sean notablemente superiores a las capturas registradas por la pesca (FAO 2009).

¹ No se contabilizan las plantas acuáticas. Si se incluyen este grupo, la producción acuícola mundial en el 2006 fue de 66.7 millones de toneladas, con un valor de 85,900 millones de dólares (FAO 2009).

En la última década, el cultivo de peces marinos en nivel mundial experimentó un crecimiento anual promedio de 11.9%, pasando de un 0.53 millones de toneladas en 1995 a 1.65 millones de toneladas² en 2005. Este crecimiento fue mayor al alcanzado por el grupo de los peces dulceacuícolas (7.2%), peces diádromos (6.6%) y moluscos (5.1%) durante el mismo período (FAO 2009). Esto se debió principalmente al desarrollo y optimización de tecnologías de cultivo en jaulas, así como al mejoramiento de las técnicas de producción de juveniles, lo cual ha permitido incrementar el número de especies sobre las cuales es factible una producción a nivel industrial (Martínez-Lagos y Gracia-López 2009). Además el cultivo de peces marinos se ha convertido en una buena opción para el aprovechamiento y repoblación de algunas especies, ya que las poblaciones naturales han disminuido por diferentes causas. Las principales causas son la pesca excesiva, la degradación y la calidad del hábitat por lo que su potencial de explotación es limitada. El cultivo de peces marinos es una alternativa para el suministro de productos pesqueros.

Para el desarrollo de la acuicultura es necesario suministrar alimento para la producción de organismos. La nutrición de peces se ha convertido en un área de investigación muy importante, ya que los costos de alimentación generalmente constituyen un porcentaje sustancial (i.e., hasta un 60%) de los costos de operación de una empresa acuícola.

Para llevar a cabo el cultivo de peces marinos, y en general de cualquier tipo de peces y crustáceos, uno de los aspectos más importantes es caracterizar los requerimientos nutricionales de cada especie, así como el desarrollo de la

² Excluyendo los salmónidos Salmonidae. Estos peces corresponden a uno de los grupos de organismos de mayor producción en la acuicultura mundial. En 2006 la producción del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) alcanzó un poco más de 1.3 millones de toneladas. Las principales regiones productoras son el norte del Atlántico y el norte y sur oriental del Pacífico. Noruega, Chile, Gran Bretaña y Canadá son los principales países productores (FAO 2009).

formulación y elaboración de dietas que cubran sus necesidades metabólicas y fisiológicas básicas al menor costo.

Los lípidos son uno de los principales componentes de la dieta de los peces ya que tienen un importante papel en la generación de la energía metabólica, por ser los nutrientes con mayor cantidad de energía total por unidad de peso (9.5 Kcal/g), además son fuente de ácidos grasos esenciales, vitaminas y determinados micronutrientes de carácter liposoluble.

Un ácido graso esencial es todo aquel que el animal es incapaz de sintetizar de *novo* (síntesis endógena) en las cantidades requeridas. Por lo tanto, su presencia es necesaria para el mantenimiento de funciones celulares vitales (Sargent *et al.*, 1989). El ambiente en el que evolucionaron los peces ha condicionado el tipo de alimento y la disponibilidad de este, lo que ha llevado a determinar las necesidades esenciales por ciertos nutrientes en estos organismos, en particular la de los ácidos grasos (Sargent *et al.*, 2002). En los peces marinos hay un aporte de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs por sus siglas en inglés) asociado al consumo de fito y zooplacton de este medio. Estos ácidos grasos son del tipo HUFA n-3 y n-6 (que indica la posición del carbono con un doble enlace a partir del grupo metilo del ácido graso). Se ha logrado comprobar la incapacidad que tienen la mayoría de peces marinos para sintetizarlos de *novo* estos ácidos grasos en cantidades suficientes y se ha observado una serie de efectos negativos asociados a su deficiencia en la dieta, particularmente en el caso del 20:5 n-3 (ácido eicosapentanoico, EPA), del 22:6 n-3 (ácido docosahexanoico, DHA) y 20:4 n-6 (ácido araquidónico, ARA) (Watanabe, 1987; Webster y Lowell, 1990). Es por esto que es de suma importancia formular dietas que contengan las cantidades y proporciones adecuadas de HUFAs n-3 requeridas por los peces.

El presente estudio tuvo por objeto conocer el efecto de la concentración de HUFAs n-3 en la dieta sobre los indicadores de crecimiento, supervivencia,

eficiencia alimenticia e índice de condición en juveniles de *Totoaba macdonaldi*, con la finalidad de generar conocimiento que ayude en elaboración de dietas exitosas adecuadas para esta especie.

II. ANTECEDENTES

II.1. *Totoaba macdonaldi*.

Totoaba macdonaldi (Figura 1) descrita por Gilbert 1891, es la especie más grande de la familia Sciaenidae (Flanagan y Hendrickson, 1976). La totoaba es un pez carnívoro que en sus primeras etapas de desarrollo se alimenta de pequeños crustáceos como anfípodos, misidáceos, y algunos decápodos (camarones) (Rosales y Ramírez, 1987), y en su etapa adulta se alimenta de peces, como sardinas, cangrejos y pequeños calamares (Román Rodríguez, 1990). Esta especie es endémica del Golfo de California, y se distribuye desde el Delta del Río Colorado hasta Bahía Concepción en Baja California (costa oeste del golfo) y desde el Delta del Río Colorado hasta la desembocadura del Río Fuerte en la costa del estado de Sinaloa (costa este del golfo) (Rosales y Ramírez, 1987).

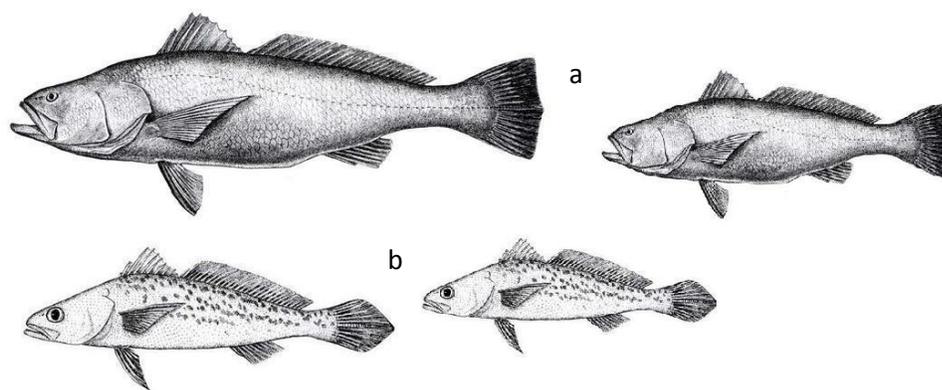


Figura 1. Adulto (a) y juvenil (b) de *Totoaba macdonaldi*.

Durante la primera mitad del siglo XX, sus capturas fueron de gran importancia comercial y deportiva en la producción pesquera del alto Golfo de California (Flanagan y Hendrickson, 1976). Sin embargo, el inadecuado manejo de su pesquería y las alteraciones ecológicas ocurridas en la zona del Delta del Río

Colorado provocaron un fuerte decremento de su población (Flanagan y Hendrickson, 1976).

Como una medida de conservación de la población de totoaba, el gobierno mexicano decretó una veda total indefinida en 1975, la cual aún está vigente (Diario Oficial de la Federación, 1975), y en 1991 *T. macdonaldi* fue declarada una especie en peligro de extinción.

Actualmente la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California participa en programas de repoblamiento con juveniles obtenidos mediante el desove de organismos mantenidos en cautiverio (True *et al.*, 1997, 2001). Además, se encuentra en proceso la obtención de permisos para lograr la comercialización de juveniles de totoaba procedentes de cultivo.

Los requerimientos nutricionales y hábitos alimenticios de la especie han sido poco estudiados. Se han realizado estudios evaluando el efecto de dietas isoproteicas formuladas con distintos niveles de energía sobre crecimiento, consumo, supervivencia y composición proximal de los juveniles, (Vizcaíno-Pérez, 2008). Así mismo, se ha realizado investigación para evaluar el efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición proximal de estos organismos (Solórzano-Salazar, 2006) y también se ha evaluado la absorción *in vitro* de aminoácidos utilizando la técnica del intestino invertido (Rosas-Servin, 2006).

Con respecto a la investigación específica sobre ácidos grasos, se realizó un estudio caracterizando la composición proximal y contenido de ácidos grasos en juveniles silvestres de totoaba (Rodríguez-Gómez, 2003) y otro más comparando la composición proximal y perfil de ácidos grasos entre juveniles silvestres y cultivados (López *et al.*, 2006).

II.2. Importancia del estudio de lípidos y ácidos grasos

En las dos décadas pasadas hubo un gran ímpetu en estudiar los lípidos en organismos marinos debido al interés de la industria de la acuicultura por entender los requerimientos nutricionales de peces cultivados para optimizar su producción (Tocher, 2003). Sargent *et al.*, (2002) hicieron una evaluación acerca de la importancia de los diferentes nutrientes que componen las dietas formuladas (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales), concluyendo que para los peces no existe nutriente ni más, ni menos importante.

Actualmente se tiene poca información en lo que respecta a los requerimientos nutricionales de lípidos en comparación con otros nutrientes, ya que los lípidos presentan cierta complejidad química y metabólica. Sargent *et al.*, (2002) mencionan que para el año 2000 ya se contaba con el conocimiento detallado de la bioquímica de los aminoácidos y carbohidratos, así como el conocimiento de sus rutas biosintéticas y catabólicas, actividad enzimática, biología molecular y genética, y de su papel como nutrientes. Por el contrario, el conocimiento generado para los lípidos es menor, se encuentra en desarrollo y aún se investigan las rutas anabólicas y catabólicas de los ácidos grasos más importantes, los ácidos grasos poliinsaturados.

Para carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos se ha logrado establecer que las interacciones enzima-sustrato son altamente específicas (especificidad de sustrato y acción por interacciones iónicas y enlaces hidrógeno). En contraste, estas interacciones para lípidos y ácidos grasos son menos específicas (i.e., interacciones por fuerzas hidrofóbicas "Van de Waals"). Es por esto que en el perfil proteico la composición de aminoácidos es menos variable, debido a la alta especificidad en la síntesis de proteínas. Sin embargo, en el caso de la síntesis de lípidos, los ácidos grasos que pueden ser incorporados en triglicéridos y fosfolípidos son mucho más variables debido a la poca especificidad de incorporación de estos ácidos grasos a los lípidos. La funcionalidad de estos

depende de los ácidos grasos presentes en el momento de la síntesis de lípidos (Sargent *et al.*, 2002).

II.3. Funciones de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) en los vertebrados

Las funciones de los HUFAs en los peces marinos, coinciden con su función en la mayoría de los vertebrados, las cuales se han catalogado en dos áreas principales: en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento de las membranas celulares y como precursores de eicosanoides, que son un grupo heterogéneo de sustancias de alta actividad biológica (i.e., como las hormonas pero en nivel local), las cuales se especifican en la Tabla 1. (Gurr y Harwood 1991; Sargent *et al.*, 1995).

Tabla I. Principales funciones de los HUFAs: Araquidónico (ARA, 20:4n-6), Eicosapentanoico (EPA, 20:5 n-3) y Docohexaenoico (DHA, 22:6 n-3) en vertebrados.

Ácido graso	Función
	Precursor de eicosanoides
ARA 20:4 n-6	<p>Funciones específicas de los eicosanoides derivados del ARA</p> <p>Intervienen en varias reacciones en respuesta al estrés ^{1,2,3,4,5}</p> <p>Coagulación de la sangre</p> <p>Reacciones inflamatorias</p> <p>Regulación de la respuesta inmune</p>
	Precursor de eicosanoides
EPA 20:5 n-3	<p>Funciones específicas de los eicosanoides derivados del EPA ^{1,4}</p> <p>Intervienen en la regulación de la respuesta inmune y reacciones en respuesta al estrés.</p>
	Funciones específicas del DHA
DHA 22:6 n-3	<p>Es el componente mayoritario en las membranas celulares ¹</p> <p>Mantiene la integridad de las membranas celulares ^{1,3}</p> <p>Se encuentra presente en gran cantidad en la membrana de los bastoncillos de la retina, por lo que se asocia al funcionamiento de la visión ^{1,3}</p> <p>Se encuentra presente en gran cantidad en las membranas neurales o del sistema nervioso central de los peces ^{1,3}</p>

¹ Sargent *et al.* (1995); ² Izquierdo, (1996); ³ Mourente *et al.* (1999); ⁴ Evans *et al.* (2000); ⁵ Bell y Sargent, (2003).

Se ha observado que un aumento en el número de dobles enlaces y de carbonos en los ácidos grasos favorece la fluidez de las membranas, lo que explicaría el aumento del contenido de HUFAs en peces que habitan en aguas más frías (Sargent *et al.*, 1989; Delgado *et al.*, 1994). De hecho, se ha observado experimentalmente que al disminuir la temperatura del agua de cultivo los organismos responden incorporando más HUFAs a sus membranas celulares, incluso en animales alimentados con dietas pobres en HUFAs (Olsen *et al.*, 1999).

Al respecto, se podría entender el porqué se muestra en mayor cantidad los n-3 en especies de aguas frías ya que el 20:5 n-3 (EPA) y 22:6 n-3 (DHA) presentan mayor número de enlaces dobles con respecto a los n-6 (como el 20:4 n-6 ARA), lo cual otorga a los n-3 un punto de fusión más bajo, que les confiere mayor fluidez a las membranas ante temperaturas menores (Takama *et al.*, 1999).

II.4. Requerimientos de ácidos grasos en peces y vertebrados

Todas las especies de vertebrados requieren de ciertos ácidos grasos poliinsaturados que deben ser suministrados en la dieta (Sargent *et al.*, 1995). Por lo general, cuando un organismo es sujeto a una dieta deficiente en uno o varios ácidos grasos, y como consecuencia experimenta una disminución en el crecimiento, alteraciones en la reproducción y patologías diversas, se considera que es un ácido graso esencial.

Con base en investigación que se ha llevado a cabo durante las últimas dos décadas se han logrado identificar a los ácidos grasos de la serie n-6 (derivados del ácido linoléico 18:2 n-6) y de la serie n-3 (derivados del ácido linolénico 18:3 n-3) como ácidos grasos esenciales para los peces (Sargent *et al.*, 1995; Sargent *et al.*, 2002).

Está bien establecido que existe la inhabilidad o limitada capacidad de los peces marinos de convertir el 18:3 n-3 a 20:5 n-3 y 22:6 n-3 y el 18:2 n-6 a 20:4 n-6 (Watanabe, 1993; Sargent *et al.*, 2002; Bell y Sargent, 2003).

Esta incapacidad se debe a la relativa deficiencia de una o dos enzimas en la vía de conversión del 18:3 n-3 a 22:6 n-3. En particular, en el complejo de las elongasas o de las desaturasas que son enzimas clave capaces de añadir dos o cuatro átomos de carbono (elongasas) a los ácidos grasos esenciales C18, linoleico o linolénico, (transformándolos en C20 y C22) y las desaturasas, que son enzimas capaces de introducir dobles enlaces. La nomenclatura de estas enzimas radica en su área de acción siendo que la Δ -6- desaturasa introduce dobles enlaces sobre el carbono seis a partir del carboxilo terminal, y la Δ -5-desaturasa introduce doble enlaces sobre el carbono cinco a partir del carboxilo terminal.

La enzima Δ -6-desaturasa introduce un doble enlace en los C18 y la Δ -5- introduce otro doble enlace en los C20, sin embargo, la de la Δ 4-desaturasa que involucra la desaturación de 20:5 n-3 a 22:6n-3 no ha sido identificada en peces. De la misma manera, estas enzimas están involucradas en la elongación y desaturación de los ácidos grasos de la serie n-6 por lo que limitan la conversión de 18:2 n-6 al 20:4 n-6 (Figura.2) (Bell y Sargent, 2003).

Los requerimientos de ácidos grasos esenciales (AGE) entre especies de peces de agua dulce y marinos, varían cualitativamente y cuantitativamente. En peces de agua dulce, los requerimientos de AGE pueden ser provistos principalmente por el ácido linolénico y linoléico. En peces marinos los requerimientos de la serie n-3 son provistos por el ácido eicosapentaenoico EPA (20:5 n-3) y el ácido docosahexaenoico DHA (22:6 n-3) y de la serie n-6 por el ácido araquidónico ARA (20:4 n-6) (Watanabe, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 2002; Bell y Sargent, 2003).

Esta situación es el resultado de una combinación de adaptaciones evolutivas, a la predominancia de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) en la cadena alimenticia marina y al hábito zooplantóforo y carnívoro de las especies de peces marinos investigadas. Debido a que el fitoplancton y zooplancton marino son capaces de sintetizar HUFAs, particularmente abundantes en EPA y DHA con relación al 18:3 n-3 y 18:2 n-6, cuando los peces se alimentan de estos organismos, no tienen la necesidad de sintetizar estos ácidos grasos que incorporan y acumulan a través de la cadena trófica. Esto al parecer ha provocado que los peces reduzcan y/o pierdan su capacidad de síntesis de HUFAs durante su evolución sin causarles deficiencias metabólicas principalmente en los carnívoros estrictos (Sargent *et al.*, 2002).

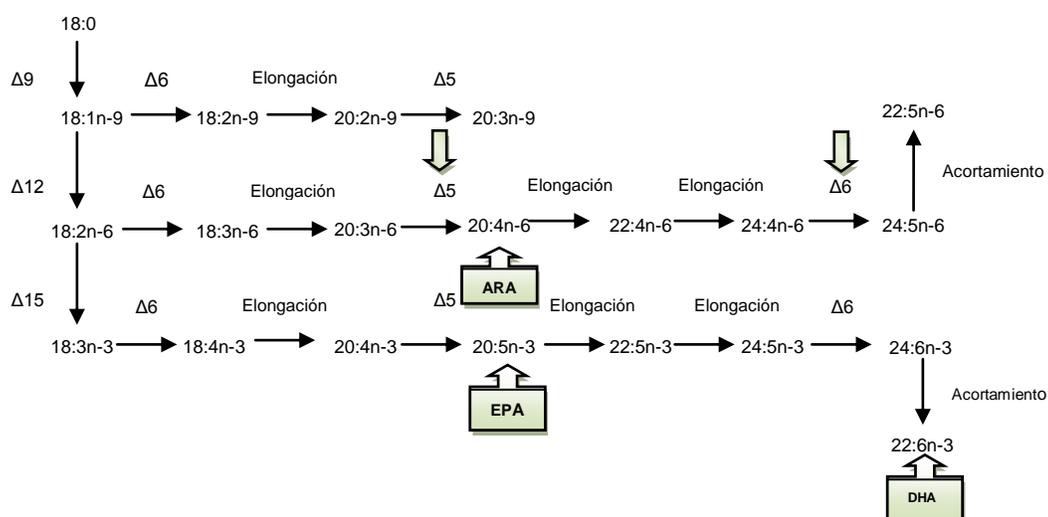


Figura 2 Rutas de biosíntesis de los ácidos grasos altamente insaturados de C20 y C22 a partir de los precursores n-3, n-6 y n-9. Las flechas grises indican las enzimas elongasas y desaturasas que tienen una limitada capacidad de sintetizar el ARA, EPA y DHA (Tocher, 2003).

La enzima $\Delta 9$ se encuentra presente tanto en plantas como en animales, mientras que la $\Delta 12$ y $\Delta 15$ sólo se encuentra en plantas. Por lo tanto, el 18:2 n-6 y el 18:3 n-3 son esenciales para los animales, principalmente en peces de agua dulce. Los animales carnívoros, como la mayoría de los peces marinos, tienen una limitada capacidad de sintetizar el ARA, EPA y DHA, por una deficiencia en las enzimas elongasas y desaturasas que pueden ser la $\Delta 5$ o $\Delta 6$ (flechas grises). Esta

limitación puede variar entre especies, en algunos peces la $\Delta 5$ está presente y pueden sintetizar EPA, sin embargo, la síntesis se interrumpe y sólo pueden elongar hasta el 22:5 n-3 y no pueden continuar la síntesis hasta DHA (Tocher, 2003).

II.5. Influencia de la dieta en la composición corporal de ácidos grasos

Al igual que en mamíferos la composición en ácidos grasos de la dieta de los peces se ve reflejada en sus tejidos corporales (Ruíz-Gutiérrez *et al.*, 1999; Luostarinen *et al.*, 2001). Por ejemplo, Agrandi *et al.* (1995) llevaron a cabo un experimento donde, tras la administración de dietas ricas en HUFAs n-3 en anguila europea (*Anguilla anguilla*), observaron un depósito de estos, en los tejidos corporales, indicando que los niveles de ácidos grasos acumulados en los tejidos del cuerpo están estrechamente relacionados con la composición de lípidos presentes en la dieta.

Así mismo, Olsen y Henderson (1997) estudiaron la composición de ácidos grasos en músculo de trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) en relación con dietas con diferentes niveles de ácidos grasos poliinsaturados y encontraron que la composición de ácidos grasos en músculo fue influenciado directamente por el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en las dietas.

Estudios de Huang *et al.*, (1998) demostraron el efecto de la dieta con diferentes fuentes lipídicas sobre la composición de ácidos grasos presentes en el músculo de tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) y reportaron que los peces alimentados con una dieta a base de aceite de soya presentaban un alto porcentaje de ácido linoleico, mientras que los peces alimentados con una dieta a base de aceite de pescado y suplementadas con HUFAs n-3 se observó en los peces un mayor contenido de DHA en sus membranas. Estos efectos de la dieta explicarían la presencia de 18:2 n-6 y 18:3 n-3 así como de 20:5 n-3 y 22:6 n-3 en

peces de agua dulce, mientras que los peces marinos son ricos particularmente en 22:6 n-3 y 20:5 n-3 (Henderson y Sargent, 1985).

II.6. Patologías y síndromes asociados a la carencia de HUFAs

Es un hecho bien documentado la importancia de los ácidos grasos esenciales para el desarrollo normal de un organismo. Como se mencionó anteriormente, los peces marinos son incapaces de sintetizar *de novo*, los ácidos grasos poliinsaturados (HUFAs: DHA, EPA, ArA), por lo que es necesario incorporarlos en la dieta para lograr un desarrollo y crecimiento normal (Webster y Lovell, 1990).

Los efectos asociados a la deficiencia de ácidos grasos esenciales, ya sea por oxidación de éstos o por una reducción en la disponibilidad en la dieta, son amplios y, básicamente, se asocian al deterioro y pérdida de funcionalidad de las membranas celulares. (Roberts y Bullock, 1989; Sargent *et al.*, 1989; García-Gallego, 1992)

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la deficiencia de HUFAs provoca un descenso en la calidad de la puesta, ya que diferentes experimentos con ácidos grasos han mostrado que la incorporación en la dieta de DHA y EPA, tiene efectos en la calidad de los ovocitos y en el desarrollo embrionario (Navas *et al.*, 1997, Bromage, 1998; Blanchard *et al.*, 2005).

Se puede generalizar que bajos contenidos de HUFAs n-3 en la dieta de los reproductores de peces, disminuye la calidad de los huevos producidos (Furuita *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos autores han identificado algunos efectos negativos sobre la cantidad de huevos producidos ocasionados por el suministro excesivo de HUFAs n-3, como el caso de la dorada (*Sparus aurata*), en donde los peces alimentados con 1.13% de HUFAs n-3 en la dieta produjeron menos huevos que los alimentados con 1.6% de HUFAs n-3 y observaron que niveles superiores a este 1.6% produce menor número de huevos. (Fernández-Palacios *et al.*, 1995).

Se ha podido comprobar la importancia de los HUFAs n-3 para un buen crecimiento en los peces marinos (Gapasin *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 1998). Su deficiencia en la dieta provoca un descenso en el crecimiento reflejado en valores bajos de Tasa de Crecimiento Instantáneo (TCI) e Índice de Conversión Alimenticia (ICA). Sin embargo este efecto no fue tan claro en el caso de los PUFAs n-6 (Cai y Curtis, 1990; Ruyter *et al.*, 2000 a, b). Por el contrario, se ha determinado que altos niveles de HUFAs n-3 en la dieta, puede causar problemas metabólicos en particular en los sistemas de generación de energía celular, ya que los ácidos grasos altamente insaturados son sustratos relativamente malos para la generación de energía vía β - oxidación celular de ácidos grasos (Sargent *et al.*, 1999).

Adicionalmente, Sargent *et al.* (1989) mencionan que la carencia de HUFAs n-3 provoca variaciones en la composición corporal del pez reflejadas en un aumento de la humedad corporal y un descenso en lípidos y proteínas corporales, anemia asociada a un descenso en los niveles de hemoglobina por un posible deterioro de la membrana de los glóbulos rojos.

La deficiencia de HUFAs n-3 provoca alteraciones en tejidos como el epitelio branquial, aletas y mandíbula inferior, así como alteraciones hepáticas reflejadas en una inflamación con aumento del índice hepatosomático (IHS) y palidez del tejido con depósitos grasos, posiblemente asociadas a un deterioro en la síntesis de lipoproteínas lo que provocaría una inhibición del transporte de lípidos desde el hígado a otros órganos. Estas alteraciones pueden desembocar en el “Síndrome de degradación lipídica del hígado” donde infiltraciones de grasas oxidadas pueden generar, en último extremo, un depósito de lipopigmentos ceroides que le confieren un aspecto amarillento al hígado, existiendo infiltraciones extremas de lípidos en los hepatocitos. (Roberts y Bullock, 1989; Sargent *et al.*, 1989; Hamre *et al.*, 1994).

Hasta la fecha se desconoce la relación y el efecto que tienen los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) de la serie n-3 en la dieta sobre el desarrollo y utilización del alimento en juveniles de *Totoaba macdonaldi*, por lo que en el presente trabajo se pretende evaluar el efecto de cuatro niveles de HUFAs n-3 en la dieta (0%, 0.5%, 1.0%, 1.5% del total de la dieta) sobre el crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia e índice de condición. Dada la importancia de los HUFAs n-3 en la nutrición de peces marinos es importante establecer el requerimiento de estos ácidos grasos en juveniles de totoaba y de esta manera contribuir con información necesaria para la formulación de un alimento adecuado para esta especie.

III. HIPÓTESIS

El requerimiento mínimo de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) de la serie n-3 para juveniles tempranos (1 gr) de *Totoaba macdonaldi* es del 1.0% del peso seco de la dieta.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) de la serie n-3 en la dieta sobre el desarrollo y la utilización del alimento en juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de HUFAs n-3 en la dieta (0%, 0.5%, 1.0% y 1.5% del peso seco de la dieta) sobre el crecimiento, porcentaje de supervivencia, utilización del alimento, índice hepatosomático y el índice de condición de juveniles de totoaba.
- Estimar el requerimiento mínimo de HUFAs n-3 en la dieta, con el cual se logre el mayor crecimiento, eficiencia alimenticia y supervivencia de juveniles de totoaba.
- Evaluar el efecto de los ácidos grasos en la dieta sobre los ácidos grasos asimilados por los juveniles de totoaba.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Formulación y elaboración de la dieta

Se formularon cuatro dietas isoproteicas (58% proteína) e isolípidicas (8.9% lípidos) adicionando cuatro concentraciones de HUFAs n-3 (0%, 0.5%, 1%, 1.5% del peso seco de la dieta). Como principal fuente de proteína se eligió una fuente proteica con base en su perfil nutrimental, disponibilidad y que ésta fuera relativamente magra (baja en lípidos), por lo que se seleccionó músculo de tiburón azul (*Prionace glauca*). El músculo de tiburón fue conseguido localmente y cocido a vapor por un lapso de dos horas. Así mismo, para eliminar en lo posible el contenido de lípidos en la fuente proteica, se realizó una extracción de la fracción lipídica soluble que consistió en un lavado (por cuatro horas) con alcohol etílico (96° puro de caña). Finalmente, se seco en estufa a una temperatura de 64°C por 24 horas para su posterior molienda y obtención de la harina.

Tabla II. Formulación y composición proximal de las cuatro dietas experimentales con concentraciones de 0%, 0.5%, 1.0% y 1.5% de HUFAs n-3.

INGREDIENTE	HUFAs	Dieta 1 (0%)	Dieta 2 (0.5%)	Dieta 3 (1%)	Dieta 4 (1.5%)
Harina de Tiburón, baja en grasa		60	60	60	60
Hidrolizado de pescado		2.5	2.5	2.5	2.5
Gelatina		3	3	3	3
Aceite de maíz		7.7	6.5	5	3
Aquagrow-DHA		0	1.8	3.1	4.8
Aquagrow-AA		0.1	0.1	0.1	0.1
Cod oil		0	0.5	2	3.2
Almidón		12	12	12	12
Celulosa		9.7	8.6	7.3	6.4
Vitaminas		3	3	3	3
Minerales		2	2	2	2
α - tocoferol		0.01	0.01	0.01	0.01
Composición proximal (% en base seca)					
Proteína		58.54	58.47	58.48	58.50
Lípidos		8.93	8.63	8.96	8.95
Cenizas		6.40	6.41	6.67	7.28
ELN (%)*		26.13	26.49	25.89	25.27

*Extracto Libre de Nitrógeno (%)

Las dietas fueron elaboradas en el laboratorio de fabricación de alimentos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Los ingredientes secos fueron pesados en una balanza (Sartorius, Alemania, modelo BP6100) y mezclados en una mezcladora (Robot-coupe, USA, modelo R10) por diez minutos. Una vez mezclados se agregaron los aceites de hígado de bacalao, aceite de maíz y el α -tocoferol, por último se agregó almidón y gretina mezclados con agua caliente, por separado y se mezcló todo nuevamente por cinco minutos.

Una vez mezclados todos los ingredientes se pasaron por un peletizador con un diámetro de orificio de 1/8" (Tor-Rey, México, modelo M32 5), se colocaron sobre

mallas-charolas de 55x25cm y se secaron a 65°C en un horno con aire forzado por 24 horas. Las dietas secas se trituraron de forma manual hasta obtener un tamaño de partícula uniforme de aproximadamente 2mm y se empaquetaron en bolsas de plástico y almacenaron a -17°C hasta su utilización.

V.2. Condiciones de cultivo

Se obtuvieron huevos de *Totoaba macdonaldi* de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, campus Ensenada, y se transportaron al laboratorio de cultivo de peces marinos del Departamento de Acuicultura (CICESE). Se cultivaron hasta su estadio juvenil (peso de 1.5gr y longitud total de 4.7cm). Se seleccionaron 240 juveniles que se distribuyeron aleatoriamente en 12 estanques experimentales de fibra de vidrio con capacidad de 250 litros conectados a un sistema de recirculación. (n=3 tanques por cada dieta experimental).

El experimento se realizó bajo condiciones controladas; a temperatura de $24.00 \pm 0.5^\circ\text{C}$, concentración de oxígeno disuelto de $6.4 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ y salinidad de $36.0 \pm 0.1 \text{ ppm}$. El agua de cultivo pasó por un sistema de recirculación interno compuesto de un biofiltro expandible de cuentas de plástico (PolyGeysler, USA) y un filtro de lámpara UV. (Pentair aquatics, USA modelo QL-25). La tasa de recambio del agua de cultivo fue de 1.56 L min^{-1} . Se usó un intercambiador de calor (Delta Star USA. modelo DSHP-6) para mantener el sistema cerca a una temperatura constante.



Figura 3. Sistema de cultivo en el laboratorio de peces marinos del departamento de Acuicultura del CICESE.

Los peces de los cuatro tratamientos fueron sometidos a un periodo de acondicionamiento por siete días. Durante este periodo, se suministró alimento comercial japonés Otohime C2 Marine Larval Diet. Después de este periodo, se realizó una transición gradual a las dietas experimentales suministrando una mezcla de Otohime y la dieta experimental durante cuatro días. Se inicio con una proporción de 25% dieta experimental y 75% Otohime, al día dos se alimento con 50% Otohime y 50% dieta experimental, el día tres 75% dieta experimental y 25 % Otohime, y el día cuatro 100% dieta experimental, dando inicio al bioensayo.

El bioensayo tuvo una duración de 56 días durante el cual los organismos fueron alimentados a una tasa de alimentación predeterminada con base a experimentos previos con peces marinos en el laboratorio. Se utilizó una tasa de alimentación del 7% al día de su peso corporal durante las primeras cuatro semanas de experimento. Posteriormente, la tasa de alimentación se redujo al 5% por dos semanas y 3% hasta el final del periodo experimental. Los peces fueron alimentados dos veces al día (9:00a.m y 15:00 p.m.) donde la ración diaria (i.e. 7%) fue dividida en raciones iguales.

Durante el experimento los estanques fueron sifoneados una vez al día (entre el primer y segundo periodo de alimentación), para retirar las heces producidas y el

alimento remanente. El oxígeno disuelto, salinidad y temperatura fueron registrados una vez al día.

V.3. Muestreos y toma de datos

Se realizaron biometrías cada 8 días para evaluar el crecimiento en peso húmedo y la supervivencia y poder ajustar la ración alimenticia semanalmente. Al final del bioensayo, se registró el número total de organismos y se pesaron individualmente. Se colectaron aleatoriamente seis organismos por estanque y se almacenaron a -17°C para su posterior análisis químico proximal y de ácidos grasos. Así mismo, se registraron algunas características asociadas a patologías con el fin de evaluar la condición de salud de los juveniles de totoaba.

V.4. Crecimiento y supervivencia

Para obtener el crecimiento en longitud (mm), se midieron los peces individualmente ($n=20$) al inicio y final de experimento utilizando un ictiómetro (Figura 4). Semanalmente se pesaron en grupo todos los organismos, intentando minimizar el posible estrés y daño físico por manejo, con una balanza portátil (AND, Japón, modelo SK-2000WP). Para la biometría inicial y final, se utilizó una balanza portátil (Ohus Scout pro, USA, modelo SP202).



Figura 4. Imagen que muestra el proceso de las biometrías realizadas a los juveniles de totoaba, donde se tomaron datos como talla (mm) y peso (gr).

V.5. Tasa de Conversión Alimenticia

Para estimar la cantidad de alimento consumido por estanque durante el experimento, se asumió que todo el alimento ofrecido fue consumido por los peces. Por lo general el alimento no consumido fue mínimo, pero no se cuantificó.

La Tasa de Conversión Alimenticia (TCA) se calculó para cada tratamiento, por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{TCA} = \text{alimento consumido (gr)} / \text{ganancia de peso (gr)} \quad (1)$$

V.6. Eficiencia proteica

La eficiencia de la utilización de la proteína, se estimó con la Tasa de Eficiencia Proteica (TEP). Esta relación compara la ganancia en peso corporal por gramo de proteína consumida en el alimento (Watanabe, 1998).

$$\text{TEP} = \frac{\text{Pg}}{\text{Psp}} \quad (2)$$

Donde:

Pg= Peso húmedo ganado por el pez (gr)

Psp= Peso seco de la proteína en el alimento consumido (gr)

V.7. Índice Hepatosomático

Al final del experimento se disectaron los organismos, se les extrajeron los hígados obtener su peso húmedo y estimar el índice hepatosomático (IHS):

$$\text{IHS} = \text{peso húmedo de hígado (g)} / \text{peso húmedo del pez} \quad (3)$$

V.8. Índice de condición

Para calcular el índice de condición (K) se utilizó el factor de condición de Fulton (Bagenal y Tesch, 1978) que relaciona la longitud y el peso del organismo. Este índice se expresa matemáticamente por la fórmula:

$$K = \frac{100 \times \text{peso}}{(\text{Longitud})^3} \quad (4)$$

Si los valores de este índice de condición son cercanos a 1, indica que el pez está en una condición óptima entre su peso y longitud.

V.9. Análisis químico proximal

Se analizó la composición química proximal de las dietas experimentales y de los organismos enteros de cada estanque en los diferentes tratamientos.

La estimación del porcentaje de la proteína en la dieta y peces se realizó mediante el método micro-Kjeldahl (Ma y Zuazago, 1942). El contenido de humedad se calculó tras secar dietas y organismos a 70°C por 24hrs. Después del secado (y pesado), de dietas y organismos, las muestras se incineraron en una mufla a 480°C por seis horas para cuantificar el contenido de cenizas (A.O.A.C. 1990) La extracción de grasa cruda se realizó siguiendo la metodología propuesta por Folch *et al.*, (1957), pero utilizando diclorometano:metanol como solvente en una proporción de 2:1 en lugar de cloroformo:metanol (Cequier *et al.*, 2008).

V.10. Análisis de ácidos grasos

Después de la extracción de los lípidos totales, las muestras se sometieron a una saponificación adicionando una solución 0.3N de KOH metanólica al 90% a 80°C a baño maría por 60 minutos después se eliminó la capa de hexano y se acidificó con 0.6N HCL. La metilación se realizó adicionando el reactivo de esterificación trifluoruro de boro en metanol (BF₃/ CH₃ OH) al 14% en baño maría por 15 min a

60°C y se lavó con hexano (Morris, 1986). Las muestras fueron secadas bajo N₂ y almacenadas a -17°C.

Los esteres metilados obtenidos de la reacción de metanólisis se disolvieron con hexano grado HPLC y se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) equipado con una columna capilar (J&W123-3232 30m x 320µm grosor de película de 0.25µm, Agilent J&W GC columns) y un detector de flamas ionizado. Como gas transportador se utilizó nitrógeno a un flujo de 3 ml/min. Se utilizó 1 µl de volumen de inyección, con un Split de 50:1. La temperatura inicial fue de 120°C para después elevarla a 190°C (9°C/min) y mantenerla por 7 minutos. Posteriormente, la temperatura se incrementó a los 230°C a una tasa de 3°C/min.

Los ácidos grasos se identificaron comparando con los tiempos de retención de tres estándares (37 component FAME Mix, Supelco Inc., PUFA -3; Menhaden Oil Supelco Inc y PUFA-1, Marine source Supelco Inc.). Para el cálculo de la concentración de ácidos grasos presentes en las muestras se utilizó el programa ChemStation versión B.04.01 (Agilent, USA). Para estimar el contenido en peso de cada ácido graso identificado en la dieta, se estimó el porcentaje de ácidos grasos totales que tenían los lípidos de cada dieta utilizando el proceso de saponificación descrito anteriormente y cuantificando la fracción saponificable del total del lípido.

V.11. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía ANOVA con un nivel de significancia $p < 0.05$. Las diferencias entre medias por tratamiento fueron evaluadas mediante una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey. Se utilizaron regresiones lineales y polinomiales con el fin de identificar la relación de la concentración de HUFAs y el crecimiento, así como las relaciones entre los ácidos grasos de la dieta y los peces. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico STATISTICA 8.0™ (StatSoft, Inc. USA).

VI. RESULTADOS

VI.1. Crecimiento

En las figuras 5 y 6 se muestran el peso final (gr) y la longitud total final (mm), respectivamente, alcanzadas por los organismos alimentados con las diferentes dietas. En la figura 7, se muestra el crecimiento en peso de los organismos durante el bioensayo. Se encontraron valores significativamente mayores para los peces alimentados con (1.0% HUFAs n-3 en la dieta) con un peso final de $(16.11 \pm 0.45 \text{ gr})$ con respecto a los otros tres tratamientos. Así mismos los peces alimentados con la dieta que contenía 1.0% HUFAs n-3 alcanzaron una longitud final $(119.62 \pm 1.81 \text{ mm})$ significativamente mayor que los otros tratamientos. (Tabla III).

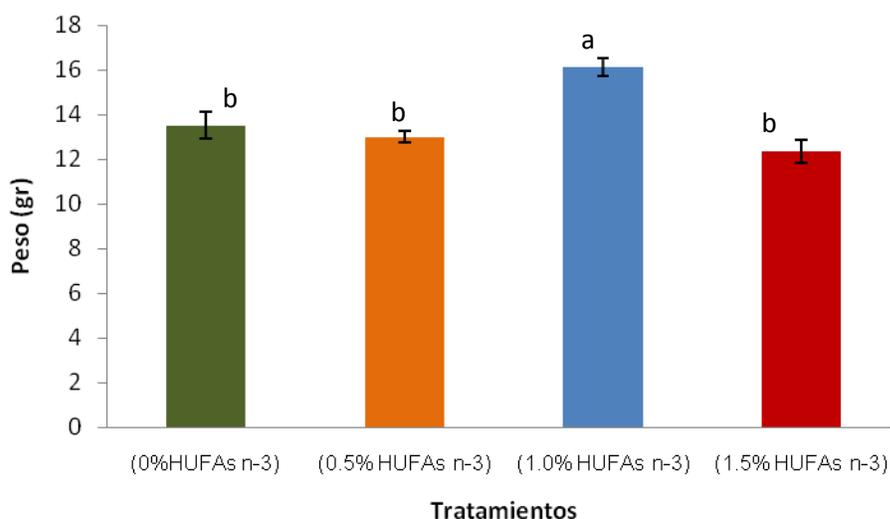


Figura5. Peso (gr) de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* por tratamiento registrado al final del experimento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

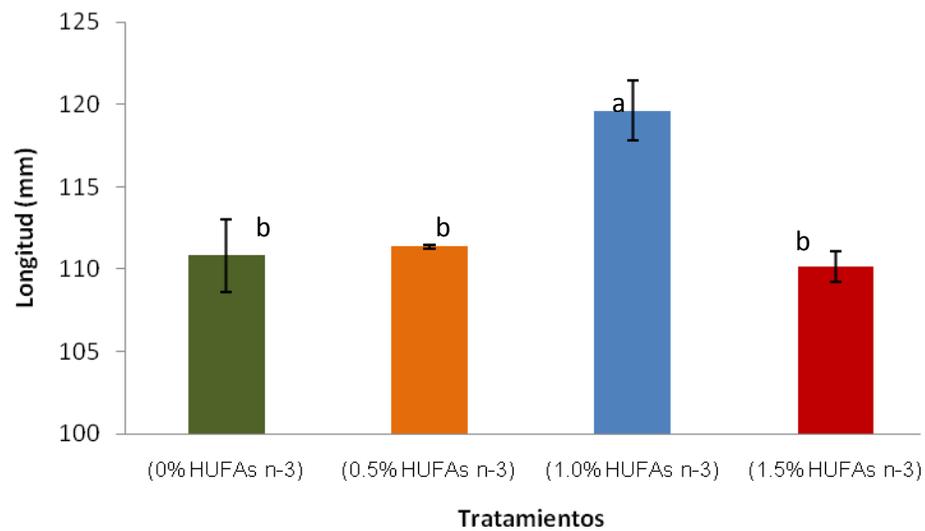


Figura 6. Longitud (mm) de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* por tratamiento registrado al final del experimento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

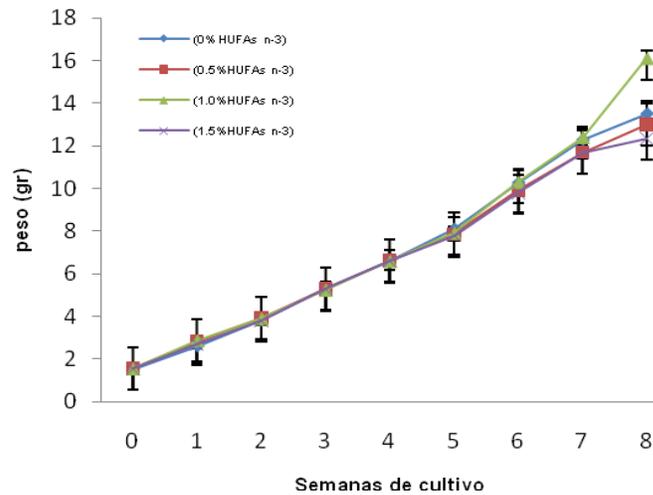


Figura 7. Peso (gr) de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* a través de las semanas de bioensayo. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

Por medio de una regresión polinomial de segundo orden ($y = 8.8657 + 12.8542x - 7.1729x^2$ $r^2 = 0.30$) se estimó utilizando las ecuaciones descritas por Foster (2000) que el máximo crecimiento en peso se podría alcanzar con un nivel de 0.90% de HUFAs n-3 en la dieta (Figura 8).

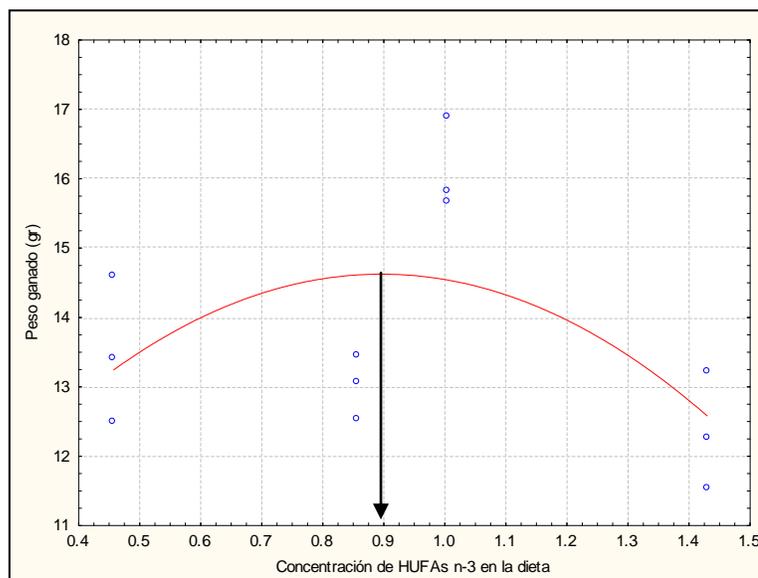


Figura.8. Regresión polinomial de segundo orden respecto a la ganancia en peso (gr) en juveniles de *Totoaba macdonaldi* y la concentración (%) de HUFAs n-3 en la dieta.

VI.2. Supervivencia

No se registraron muertes durante el periodo experimental, por lo cual la supervivencia fue del 100% en los cuatro tratamientos.

VI.3. Tasa de Conversión Alimenticia

En la Tabla III, se reportan los valores de Tasa de Conversión alimenticia (TCA). La TCA de los peces alimentados con 1.0% HUFAs n-3 en la dieta resultó significativamente menor (1.76 ± 0.01) que los otros tratamientos (Figura 9).

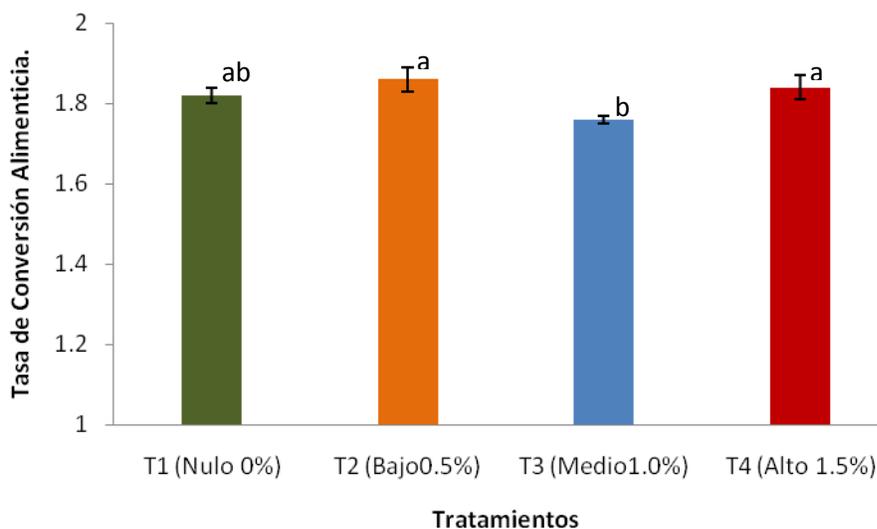


Figura 9. Valores de la Tasa de Conversión Alimenticia (TCA) de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* durante el bioensayo. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

VI.4. Eficiencia proteica

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en la eficiencia de utilización de proteína expresada en valores de la Tasa de Eficiencia Proteica (TEP) (Tabla III).

VI.5. Índice hepatosomático

En la Tabla III se muestran los valores estimados para Índice Hepatosomático (IHS) de cada uno de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas en los valores de IHS entre los diferentes tratamientos (Figura 10)

Estos valores indican que los organismos alimentados con la dieta que contenía 1.5% HUFAs n-3 resultaron con el valor más bajo (2.92 ± 0.41) con respecto a los peces de los otros tratamientos. No se encontraron diferencias significativas en los valores del IHS entre los diferentes tratamientos (Figura 10).

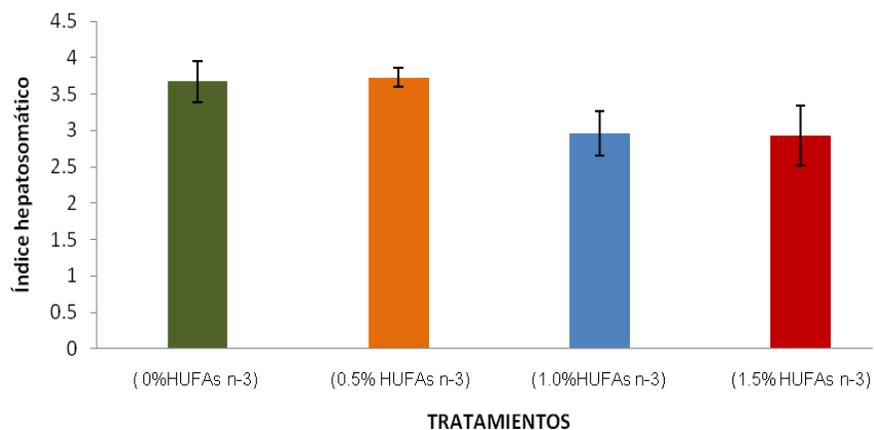


Figura 10. Índice hepatosomático (IHS) de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* registrado al final del experimento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3)

VI.6. Índice de condición

En la Tabla III se presentan los valores correspondientes al índice de Condición de Fulton (K) de cada uno de los tratamientos.

Tabla III. Valores biológicos de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas formuladas a partir de cuatro concentraciones de HUFAs n-3. TCA= Tasa de Conversión Alimenticia. TEP= Tasa de Eficiencia Proteica. IHS= Índice Hepatosomático. K= Índice de Condición de Fulton. Los valores presentados son la media \pm error estándar de n=3. Los superíndices indican las diferencias significativas entre los tratamientos

Variable	Dietas experimentales			
	(0% HUFAs n-3)	(0.5%HUFAs n-3)	(1.0%HUFAs n-3)	(1.5%HUFAs n-3)
Peso inicial (g)	1.55 \pm 0.02	1.56 \pm 0.03	1.56 \pm 0.01	1.55 \pm 0.02
Peso final (g)	13.50 \pm 0.61 ^b	13.00 \pm 0.26 ^b	16.11 \pm 0.38 ^a	12.34 \pm 0.49 ^b
Peso ganado (gr)	11.95 \pm 0.61 ^b	11.43 \pm 0.26 ^b	14.54 \pm 0.38 ^a	10.79 \pm 0.49 ^b
Peso ganado (%)	771.21 \pm 39.36 ^b	730.19 \pm 16.76 ^b	928.71 \pm 24.44 ^a	696.43 \pm 31.84 ^b
Talla inicial (mm)	47 \pm 0.51	46 \pm 0.73	47 \pm 0.58	47 \pm 0.67
Talla final (mm)	110.83 \pm 2.21 ^b	111.35 \pm 0.09 ^b	119.62 \pm 1.81 ^a	110.13 \pm 0.92 ^b
TCA	1.82 \pm 0.01 ^{ab}	1.86 \pm 0.02 ^a	1.76 \pm 0.01 ^b	1.84 \pm 0.02 ^a
TEP	0.20 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02
IHS	3.67 \pm 0.28	3.72 \pm 0.13	2.95 \pm 0.30	2.92 \pm 0.41
K	0.96 \pm 0.01	0.93 \pm 0.03	0.93 \pm 0.02	0.91 \pm 0.01
Supervivencia (%)	100	100	100	100

VI.7. Composición proximal de pez completo

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en el contenido de proteína, humedad y cenizas en las muestras de pez entero (Tabla IV). Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de lípidos. (Tabla IV). Los peces alimentados con 1.5%HUFAs n-3 en la dieta resultaron con los valores más altos en porcentaje de lípidos con un valor de 8.41 \pm 0.04%, mientras que el valor más bajo fue para los peces alimentados con la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con un valor de 6.41 \pm 0.13%.

Tabla IV. Composición proximal de pez entero, en base seca de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas formuladas a base de cuatro concentraciones de HUFAs n-3. (0%,0.5%, 1.0% y 1.5%) Los valores son la media \pm error estándar de (n=3). Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos.

	Dietas experimentales (%HUFA n-3)			
	(0% HUFAs n-3)	(0.5%HUFAs n-3)	(1.0%HUFAs n-3)	(1.5% HUFAs n-3)
Proteína	74.69 \pm 0.91	74.52 \pm 0.71	75.99 \pm 0.11	75.89 \pm 0.54
Lípidos	6.41 \pm 0.13 ^c	7.61 \pm 0.09 ^b	7.93 \pm 0.01 ^b	8.41 \pm 0.04 ^a
Cenizas	9.22 \pm 0.59	9.08 \pm 0.04	8.96 \pm 0.02	9.32 \pm 0.31
Humedad	77.40 \pm 0.14	77.15 \pm 0.16	77.34 \pm 0.07	76.80 \pm 0.27
ELN (%)*	9.68	8.79	7.12	6.38

*Extracto Libre de Nitrógeno (%) Peso seco.

VI.8. Análisis de ácidos grasos

VI.8.1. Composición de ácidos grasos en dietas

En la Tabla V se presentan los perfiles de ácidos grasos (% de ácidos grasos identificados) en las cuatro dietas formuladas con diferentes concentraciones de HUFAs n-3. Mientras que en la Tabla VI se presentan los perfiles de ácidos grasos en peso seco (mg/100gr de dieta).

Al agrupar y comparar los ácidos grasos por su grado de saturación, el contenido total de los ácidos grasos saturados indicó diferencias significativas, obteniéndose el mayor porcentaje en la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con 31.59 \pm 1.35% y el menor porcentaje en la dieta formulada con 0%HUFAs n-3 con un valor de 17.87 \pm 0.15%.En los ácidos grasos monoinsaturados no se encontraron diferencias significativas entre las dietas.

Con respecto a los PUFAs n-6, la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 resultó con concentraciones significativamente mayores (35.66 \pm 0.35%) que en las otras dietas, siendo el más bajo en la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un

valor de $9.34 \pm 0.38\%$. Al considerar los HUFAs n-3, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 la que presentó el mayor porcentaje ($36.54 \pm 2.75\%$), mientras que el porcentaje menor se encontró en la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con un valor de $15.18 \pm 0.12\%$ (Tabla V). De manera general el porcentaje de los ácidos grasos saturados y los HUFAs n-3 tuvieron un incremento gradual positivo conforme se incrementó el nivel de HUFAs n-3 en la formulación de las dietas, mientras que en los mono-insaturados y los PUFAS n-6 ocurrió lo opuesto.

Se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de los ácidos grasos saturados. El porcentaje de 16:0 en la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 mostró valores significativamente menores ($14.22 \pm 0.09\%$) con respecto a las otras tres dietas. Para el ácido graso 18:0, el porcentaje más bajo fue el de la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 $3.31 \pm 0.05\%$, encontrándose diferencias significativas con el porcentaje encontrado en la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un valor de $7.37 \pm 0.22\%$ (Figura 11).

Así mismo, los porcentajes del ácido graso 16:1n-7 resultaron valores significativamente más altos en la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 en comparación en las otras dietas con valores de $3.73 \pm 0.28\%$ y el valor más bajo se encontró en la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con valores de $1.66 \pm 0.06\%$. Para el ácido graso 18:1 n-9 se encontraron porcentajes significativamente más altos en la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con valores de $27.61 \pm 0.40\%$ y el porcentaje más bajo se encontró en la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con valores de $16.29 \pm 4.58\%$.

Para los PUFAs n-6, el 18:2 n-6 resultó en porcentajes significativamente más altos en la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con valores de $33.43\% \pm 0.38$ y el porcentaje menor se obtuvo en la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un valor porcentual de $6.06 \pm 0.28\%$. (Figura 11)

Para el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) se encontraron valores significativamente menores en la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con valores de $2.23 \pm 0.03\%$. No se encontraron diferencias significativas, entre las otras dietas (Tabla V).

En el caso de los HUFAs n-3, el contenido de EPA (20:5 n-3) resultó en diferencias significativas entre las dietas. Los mayores contenidos se encontraron en las dietas formuladas con 1.5% HUFAs n-3 y 1.0% de HUFAs n-3 con valores de $6.31 \pm 0.39\%$ y $5.91 \pm 0.44\%$ respectivamente. El menor contenido se obtuvo en la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con un valor de $3.11 \pm 0.01\%$.

El aumento en la concentración del ácido docohexaenoico (DHA, 20:6n-3), fue directamente proporcional al porcentaje de HUFAs en las dietas, obteniéndose el porcentaje significativamente más bajo de DHA en la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con un valor de 9.54 ± 0.12 y el porcentaje más alto para la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un valor de $26.19 \pm 1.95\%$ (Tabla V).

Tabla V. Composición de ácidos grasos (en porcentaje del total de ácidos grasos identificados) en las cuatro dietas (n=3) Media \pm la desviación estándar. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos. 0%, 0.5%, 1.0% y 1.5%= concentraciones de HUFAs n-3.

Ácido graso	DIETAS			
	(0% HUFAs n-3)	(0.5% HUFAs n-3)	(1.0% HUFAs n-3)	(1.5% HUFAs n-3)
	Porcentaje Identificado			
C14:0	0.33 \pm 0.01 ^d	1.22 \pm 1.14 ^c	2.17 \pm 0.16 ^b	3.72 \pm 0.37 ^a
C16:0	14.22 \pm 0.09 ^c	16.95 \pm 0.71 ^b	18.81 \pm 0.17 ^{ab}	20.49 \pm 1.20 ^a
C18:0	3.31 \pm 0.05 ^b	5.46 \pm 0.62 ^{ab}	4.53 \pm 0.87 ^b	7.37 \pm 0.22 ^a
Total saturados	17.87 \pm 0.15 ^c	23.64 \pm 0.23 ^b	25.53 \pm 0.64 ^b	31.59 \pm 1.35 ^a
C16:1 n-7	1.66 \pm 0.06 ^c	2.48 \pm 0.14 ^b	3.45 \pm 0.07 ^a	3.73 \pm 0.28 ^a
C18:1n-9	27.61 \pm 0.40 ^a	23.78 \pm 1.74 ^{ab}	24.58 \pm 2.10 ^{ab}	16.29 \pm 4.58 ^b
C20:1 n-9	1.32 \pm 0.01	1.36 \pm 0.15	1.53 \pm 0.26	1.77 \pm 0.19
Total monoinsaturados	30.60 \pm 0.32	27.63 \pm 1.44	29.57 \pm 2.11	21.80 \pm 4.48
C18:2 n-6	33.43 \pm 0.38 ^a	21.01 \pm 0.59 ^b	9.91 \pm 2.90 ^c	6.06 \pm 0.28 ^c
C20:4 n-6 (ARA)	2.23 \pm 0.03 ^b	3.11 \pm 0.15 ^a	3.36 \pm 0.25 ^a	3.27 \pm 0.09 ^a
Total PUFAS n-6	35.66 \pm 0.35 ^a	24.13 \pm 0.43 ^b	13.28 \pm 2.68 ^c	9.34 \pm 0.38 ^c
C18:3 n-3	0.67 \pm 0.01	0.58 \pm 0.03	0.74 \pm 0.27	0.71 \pm 0.01
C20:5 n-3 (EPA)	3.11 \pm 0.01 ^c	4.70 \pm 0.33 ^b	5.91 \pm 0.44 ^{ab}	6.31 \pm 0.39 ^a
C22:5 n-3 (DPA)	2.51 \pm 0.01 ^b	3.62 \pm 0.21 ^a	4.16 \pm 0.29 ^a	4.03 \pm 0.40 ^a
C22:6 n-3 (DHA)	9.54 \pm 0.12 ^d	15.67 \pm 1.06 ^c	20.78 \pm 1.43 ^b	26.19 \pm 1.95 ^a
HUFAs n-3	15.18 \pm 0.12 ^c	24.00 \pm 1.61 ^b	30.86 \pm 1.65 ^a	36.54 \pm 2.75 ^a
n-3/n-6	0.44 \pm 0.01	1.01 \pm 0.08	2.45 \pm 0.59	3.98 \pm 0.12

Tabla VI. Composición de ácidos grasos en peso seco (mg/100g de dieta) en las dietas experimentales (n=2) Media \pm la desviación estándar. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Dietas experimentales				
Ácido graso	(0% HUFAs n-3)	(0.5% HUFAs n-3)	(1.0% HUFAs n-3)	(1.5% HUFAs n-3)
C14	10.13 \pm 0.13 ^c	43.73 \pm 5.20 ^{bc}	70.93 \pm 5.23 ^b	145.86 \pm 14.71 ^a
C16	428.43 \pm 2.76 ^c	603.81 \pm 25.31 ^b	613.50 \pm 5.59 ^b	801.93 \pm 47.28 ^a
C18:0	99.77 \pm 1.69 ^c	194.70 \pm 22.12 ^b	147.85 \pm 28.61 ^b	288.71 \pm 8.99 ^a
Total saturados	538.34 \pm 4.59 ^c	842.24 \pm 8.39 ^b	832.29 \pm 21.14 ^b	1236 \pm 52.99 ^a
C16:1 n-7	50.05 \pm 2.00 ^c	88.64 \pm 5.20 ^b	112.73 \pm 2.41 ^b	146.33 \pm 11.22 ^a
C18:1n-9	831.48 \pm 12.12	847.00 \pm 62.27	801.30 \pm 68.76	637.54 \pm 179.26
C20:1 n-9	39.94 \pm 0.29	48.57 \pm 5.50	50.09 \pm 8.66	69.33 \pm 7.63
Total monoinsaturados	921.48 \pm 9.82	984.23 \pm 51.56	964.14 \pm 68.94	853.21 \pm 175.68
C18:2 n-6	1006.65 \pm 11.71 ^a	748.66 \pm 21.24 ^b	323.23 \pm 94.73 ^c	237.21 \pm 11.31 ^c
C20:4 n-6 (ARA)	67.14 \pm 1.16 ^b	110.97 \pm 5.57 ^a	109.72 \pm 8.37 ^a	128.30 \pm 3.90 ^a
Total PUFAS n-6	1073.79 \pm 10.55 ^a	859.63 \pm 15.66 ^b	432.95 \pm 87.57 ^c	365.52 \pm 15.21 ^c
C18:3 n-3	20.26 \pm 0.02	20.75 \pm 1.17	24.18 \pm 8.97	27.91 \pm 0.48
C20:5 n-3 (EPA)	93.90 \pm 0.20 ^c	167.45 \pm 11.88 ^b	192.78 \pm 14.66 ^b	247.20 \pm 15.42 ^a
C22:5 n-3 (DPA)	75.82 \pm 0.19 ^b	129.13 \pm 7.83 ^a	135.90 \pm 9.60 ^a	157.80 \pm 15.89 ^a
C22:6 n-3 (DHA)	287.37 \pm 3.85 ^c	558.38 \pm 37.95 ^b	677.60 \pm 46.64 ^b	1025.08 \pm 76.62 ^a
HUFAs n-3	457.10 \pm 3.84 ^c	854.96 \pm 57.67 ^b	1006.29 \pm 53.93 ^b	1430.10 \pm 107.94 ^a
n-3/n-6	0.42 \pm 0.01	0.99 \pm 0.08	2.10 \pm 0.42	3.90 \pm 0.13

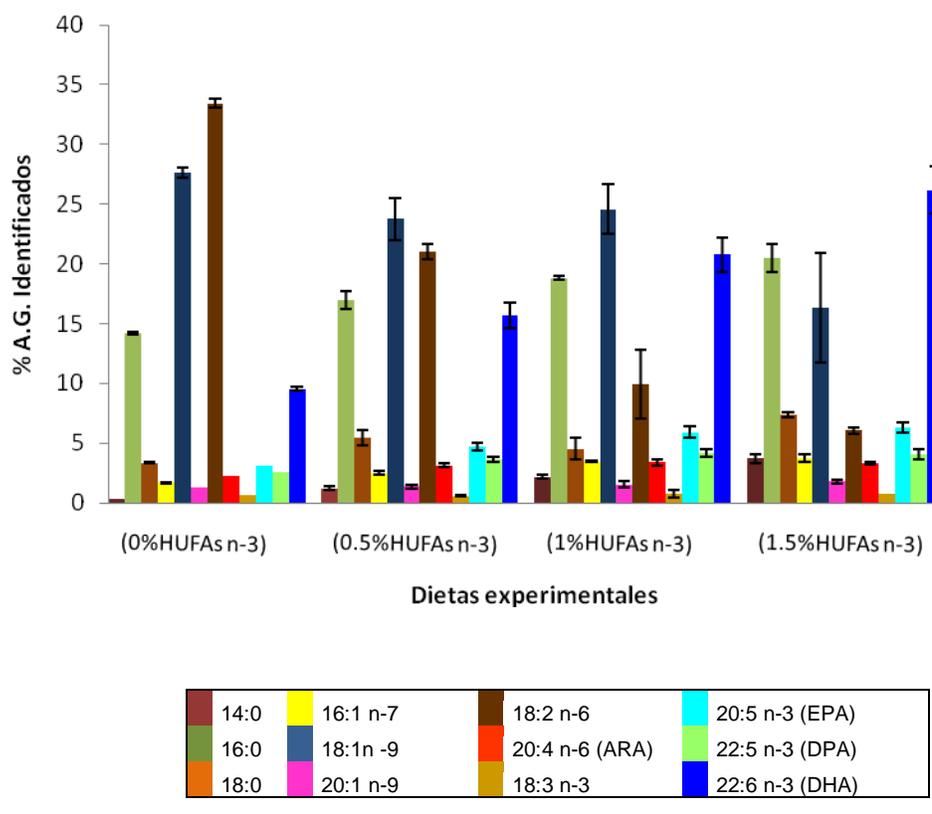


Figura 11. Porcentaje de los ácidos grasos identificados individualmente, en las dietas con diferentes concentraciones de HUFAs n-3.

VI.8.2. Composición de ácidos grasos en los organismos

El porcentaje de ácidos grasos en juveniles de totoaba fue diferente para cada grupo experimental (Tabla VII). Al agrupar y comparar los ácidos grasos por su grado de saturación, el contenido total de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados resultaron sin diferencias significativas entre tratamientos.

Con respecto a los PUFAs n-6 se encontraron valores significativamente menores en los organismos alimentados con la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un valor de $19.46 \pm 2.10\%$. En los otros tres tratamientos se encontraron diferencias significativas entre sí, con valores que oscilaron entre el 28.0 a 34.0%.

Al considerar los HUFAs n-3, se encontraron porcentajes significativamente más altos, en los organismos alimentados con la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un valor de $18.97 \pm 0.78\%$, mientras que el porcentaje menor se encontró en los organismos alimentados con la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con un valor de $8.36 \pm 1.03\%$ (Figura 12).

De manera general la concentración de los HUFAs n-3 en los organismos, tuvieron un incremento gradual positivo conforme se incrementó el nivel de HUFAs n-3 en las dietas suministradas, mientras que en los PUFAS n-6 ocurrió lo opuesto.

De manera individual se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de los ácidos grasos saturados. El porcentaje de 14:0 en organismos alimentados con la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 mostró valores significativamente mayores $4.14 \pm 1.14\%$ con respecto a los otros tres tratamientos en los cuales no hubo diferencias entre si.

Así mismo, individualmente el ácido graso 16:1n-7 resultó en valores significativamente más altos en los organismos alimentados con la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un valor de $4.05 \pm 0.81\%$ que en los otros tres tratamientos.

Para los ácidos grasos PUFAs n-6, el 18:2 n-6 resultó con valores significativamente mayores para los organismos alimentados con la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con un valor de $33.25 \pm 4.42\%$ y el valor más bajo se encontró en organismos alimentados con la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un valor de $18.02 \pm 2.09\%$ (Figura 13).

Para el ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6) se encontraron valores significativamente menores en los organismos alimentados con la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con un valor de $0.80 \pm 0.00\%$.

En los HUFAs n-3, el contenido de EPA (20:5 n-3) fue significativamente mayor en los organismos alimentados con la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un

valor de $2.45 \pm 0.42\%$. No se encontraron diferencias significativas entre los otros tres tratamientos.

Para la concentración de ácido docohexaenoico (DHA, 20:6n-3), se encontraron valores significativamente mayores en organismos alimentados con la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un valor de $14.90 \pm 0.02\%$ y el valor más bajo resultó en los organismos alimentados con la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con un valor de $6.10 \pm 1.04\%$ (Figura 13).

Tabla VII. Composición de ácidos grasos (en porcentaje del total de ácidos grasos identificados) en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes concentraciones de HUFAs n-3. (n=3) Media \pm indica la desviación estándar. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos. 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5% = concentraciones de HUFAs n-3.

Ácido graso	Tratamientos			
	(0% HUFAs n-3)	(0.5% HUFAs n-3)	(1.0% HUFAs n-3)	(1.5% HUFAs n-3)
	Porcentaje de A.G. identificados			
C14:0	0.72 \pm 0.23 ^b	1.07 \pm 0.02 ^b	1.96 \pm 0.67 ^b	4.14 \pm 1.14 ^a
C16:0	16.24 \pm 4.22	16.21 \pm 0.55	19.50 \pm 2.07	21.74 \pm 2.57
C18:0	8.36 \pm 1.32	6.65 \pm 1.15	5.60 \pm 0.80	4.70 \pm 1.37
Total saturados	25.33 \pm 5.78	23.95 \pm 1.61	27.08 \pm 3.20	30.58 \pm 2.80
C16:1 n-7	2.12 \pm 0.38 ^b	2.29 \pm 0.38 ^b	2.94 \pm 0.23 ^{ab}	4.05 \pm 0.81 ^a
C18:1n-9	27.96 \pm 2.43	25.22 \pm 1.49	25.79 \pm 0.31	24.30 \pm 1.18
C20:1 n-9	1.67 \pm 0.27	1.77 \pm 0.52	1.34 \pm 0.39	1.93 \pm 0.05
Total monoinsaturados	31.76 \pm 2.32	29.30 \pm 2.16	30.08 \pm 0.14	30.29 \pm 0.31
C18:2 n-6	33.25 \pm 4.42 ^a	32.45 \pm 1.69 ^a	26.69 \pm 2.30 ^{ab}	18.02 \pm 2.09 ^b
C20:4 n-6 (ARA)	0.80 \pm 0.00 ^b	1.15 \pm 0.14 ^{ab}	1.26 \pm 0.27 ^a	1.44 \pm 0.01 ^a
Total PUFAS n-6	34.06 \pm 4.42 ^a	33.60 \pm 1.84 ^a	27.96 \pm 2.58 ^{ab}	19.46 \pm 2.10 ^b
C18:3 n-3	0.46 \pm 0.06	0.55 \pm 0.14	0.59 \pm 0.06	0.66 \pm 0.22
C20:5 n-3 (EPA)	1.13 \pm 0.14 ^b	1.30 \pm 0.08 ^b	1.70 \pm 0.13 ^b	2.45 \pm 0.42 ^a
C22:5 n-3 (DPA)	1.12 \pm 0.15	1.63 \pm 0.35	1.53 \pm 0.23	1.60 \pm 0.33
C22:6 n-3 (DHA)	6.10 \pm 1.04 ^c	9.64 \pm 0.63 ^b	11.03 \pm 0.38 ^b	14.90 \pm 0.02 ^a
HUFAs n-3	8.36 \pm 1.03 ^c	12.58 \pm 1.03 ^b	14.27 \pm 0.66 ^b	18.97 \pm 0.78 ^a
n-3/n-6	0.26 \pm 0.06	0.39 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02	1.01 \pm 0.05

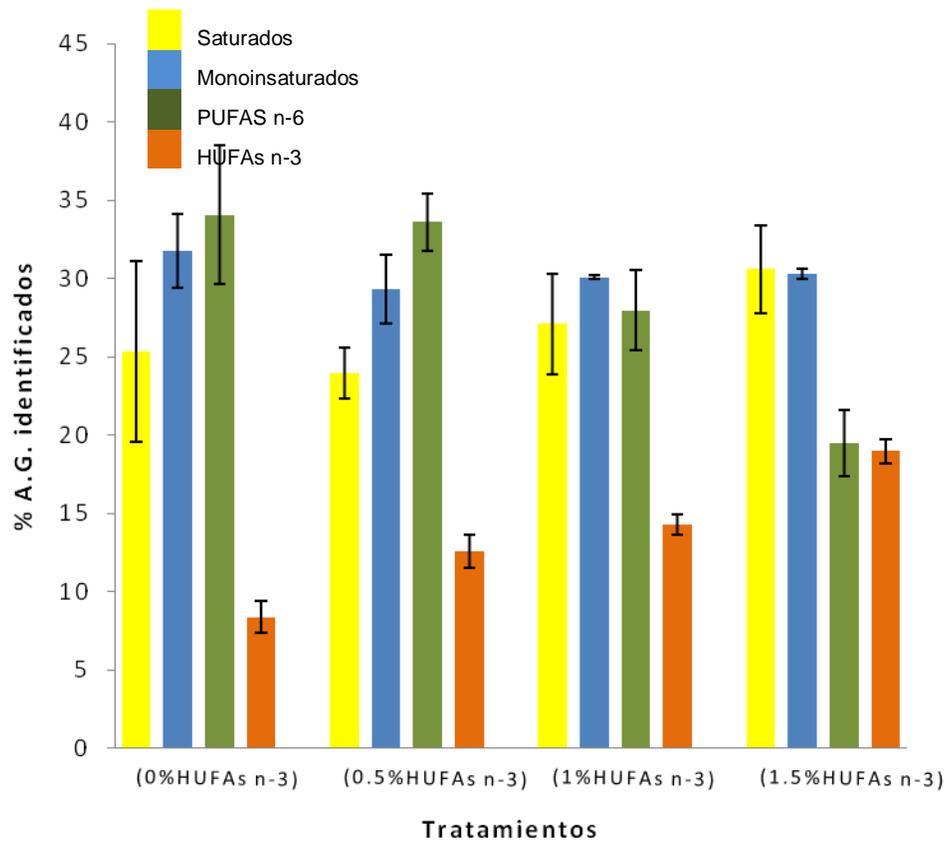


Figura 12. Porcentaje de los ácidos grasos por grupos identificados, en juveniles de *Totoaba macdonaldi* bajo el régimen alimenticio de cuatro diferentes concentraciones de HUFAs n-3 en la dieta.

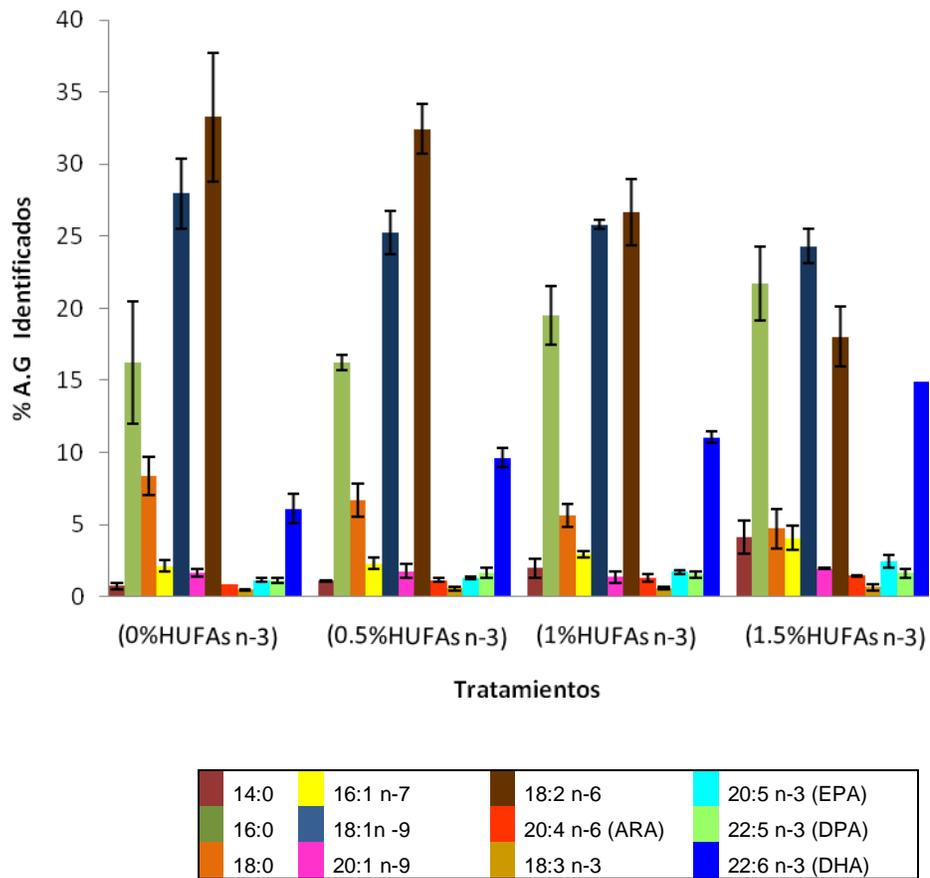


Figura 13. Porcentaje de los ácidos grasos identificados individualmente, en juveniles de *Totoaba macdonaldi* bajo el régimen alimenticio de cuatro diferentes concentraciones de HUFAs n-3 en la dieta.

VII. DISCUSION

VII.1. Crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia e índice de condición

La supervivencia fue del 100% en todos los tratamientos. Las distintas dietas fueron aceptadas por los peces y éstos no presentaron características de alguna patología. Resultados similares fueron observados por Ibeas *et al.* (1994), quienes evaluaron el efecto de diferentes niveles de HUFAs n-3 (0.76% al 2.94% en la dieta), sobre el crecimiento y composición de ácidos grasos en juveniles de dorada *Sparus aurata*. No se obtuvieron diferencias significativas en la mortalidad y no observaron anormalidades morfológicas externas entre los grupos experimentales durante el experimento. Kim y Lee (2004) efectuaron un experimento en juveniles de lenguado japonés, *Paralichthys olivaceus*, evaluando el requerimiento de HUFAs n-3 utilizando concentraciones de HUFAs n-3 de 0%, 0.4% 0.8% 1.2% 1.6% 2.0% 2.4% y una dieta que solamente contenía 1.2% de EPA, y reportan que la supervivencia no fue afectada por el nivel de HUFAs n-3 en la dieta, en un periodo experimental de 8 semanas.

Sin embargo, estos resultados difieren de los reportados para *Pagrus major* por Takeuchi *et al.* (1990). Peces de 3.1 gr fueron alimentados con una dieta que solo contenía el 0.03% de HUFAs n-3, y hubo una alta mortalidad y falta de apetito después de la primera semana de alimentación.

En el presente estudio, se observó una diferencia significativa en el peso final (gr) de los organismos, donde el mayor crecimiento en peso (gr) se registró en los juveniles de totoaba alimentados con la dieta formulada con 1.0% de HUFAs n-3 (15.56 ± 0.30 gr). Así mismo, se encontraron diferencias significativas en la talla final de los organismos, registrándose longitudes finales significativamente

mayores en los organismos alimentados con la dieta formulada con el 1.0% HUFAs n-3) con valores de 119.62 ± 1.81 mm.

Con base en la cuantificación de los ácidos grasos contenidos en la dieta en peso seco y la regresión polinomial de segundo grado resultante entre la relación del contenido de HUFAs n-3 en la dieta y el peso ganado se estimó que el requerimiento mínimo de HUFAs n-3 en la dieta para juveniles tempranos de totoaba es alrededor del 0.90%.

Estos resultados concuerdan con Kim y Lee (2004) quienes investigaron los requerimientos de HUFAs n-3 en juveniles de lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) y observaron que el aumento en peso, la eficiencia alimenticia y la relación de la eficiencia proteica aumentó significativamente con el aumento de HUFAs n-3 en las dietas hasta un nivel de inclusión del 0.8% de la dieta. Sin embargo, el peso, la eficiencia alimenticia y la relación de la eficiencia proteica fueron disminuyendo gradualmente al incluir más del 1.6% de HUFAs n-3 y hasta un 2.4%, que resultó en la ganancia de peso más baja. Utilizando la misma metodología que se usó para el presente estudio, los resultados de Kim y Lee (2004) demostraron que el aumento de peso máximo se podría alcanzar con el 1.0% de HUFAs n-3 en la dieta.

Por su parte, Lochmann y Gatlin (1993) estudiaron el requerimiento de ácidos grasos esenciales en juveniles de corvina roja *Sciaenops ocellatus* donde utilizaron dietas semi-purificadas con diferentes fuentes lipídicas y los niveles de HUFAs fueron de 0.5%, 1.5% y 2.5% de la dieta. En su trabajo, determinaron que los juveniles de corvina roja requieren aproximadamente el 0.5% de HUFAs n-3 para un crecimiento y supervivencia adecuado. Así mismo, observaron que niveles mayores a 1.5% HUFAs n-3 resultaron en menor ganancia en peso, haciéndose más evidente con la inclusión de 2.5% de HUFAs n-3, por lo que estos niveles de HUFAs se consideraron excesivos. También reportan que las dietas deficientes en

ácidos grasos esenciales (que sólo contenían palmitina C16 o oleato 18:1n-9) redujeron el crecimiento y la eficiencia alimenticia y aumentó la mortalidad, así como erosión en las aletas de los peces.

Leu *et al.*, (1994) evaluaron el efecto de la dieta con HUFAs n-3, con niveles de 0.61%, 0.91%, 1.31%, 1.64% y 2.19% (total de HUFAs n-3 en la dieta) sobre el crecimiento, eficiencia alimenticia y composición de ácidos grasos en la fracción polar de los lípidos en organismos de juveniles de sargo dorado *Rhabdosargus sarba*. Reportan que no encontraron diferencias significativas en la ganancia en peso con niveles de 1.3, 1.64 y 2.19% de HUFAs n-3 en la dieta. Al analizar todos sus datos concluyeron que para el crecimiento máximo, los juveniles de sargo dorado requieren aproximadamente 1.31% HUFAs n-3 en la dieta. De manera similar Cowey *et al.* (1976) y Kanazawa (1988) reportan un requerimiento de HUFAs n-3 del 1.0% de la dieta para el rodaballo *Scophthalmus maximus* y el lenguado japonés *Paralichthys olivaceus*.

Con respecto al crecimiento en peso, hay estudios en los cuales no se encontró una relación significativa entre el nivel de HUFAs en la dieta sobre el crecimiento. Olsen y Henderson (1997) evaluaron alimentos con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en la trucha ártica *Salvelinus alpinus*. Las dietas para el estudio fueron formuladas con un incremento gradual de ácidos grasos poliinsaturados. En las primeras dos dietas se utilizaron aceites de peces marinos alcanzando un nivel de PUFAs de 250g Kg⁻¹ y 500g Kg⁻¹ del total de los lípidos y otras dos dietas que contenían aceites vegetales 18:2 n-3 o 18:3 n-3, dando un nivel de PUFAs de más de 500 g Kg⁻¹ del total de los lípidos (las dietas contenían 100g Kg⁻¹ de lípidos en peso seco). Reportaron que la mortalidad y el crecimiento en el periodo experimental fueron similares en todos los grupos.

Logue *et al.*, (2000) emplearon cuatro dietas con artemia emulsificada obteniendo niveles de PUFAs n-3 de 6.6%±0.1, 18.9%± 0.8, 31.3%±2.0 y 26.3%±0.9 del total

de lípidos de la artemia emulsificada. Evaluaron la composición de lípidos en tejido, la producción de prostaglandinas y tolerancia al estrés en juveniles de lenguado *Solea solea*, reportaron que en estadios larvales y juveniles tempranos las tasas de crecimiento no fueron significativamente diferentes entre los grupos. Sin embargo, sí demostraron que para esta especie una alimentación deficiente en ácidos grasos altamente insaturados (20:5n-3 y 22:6n-3) causa una pérdida de la resistencia a factores de estrés en las larvas como temperaturas altas y bajas, hipoxia y baja salinidad. También reportan que esta deficiencia fue reversible al alimentar a los organismos con la dieta que contenía el 18.9%± 0.8 de PUFAs n-3 observándose mayor resistencia con respecto a la dieta control.

Las necesidades de ácidos grasos esenciales para un buen crecimiento varían entre las especies y entre las diferentes etapas de desarrollo (Gatesoupe y Le Millinaire, 1985). Los resultados de este trabajo son similares a lo reportado para otras especies, ya que Sargent *et al.* (1989) concluyen que para estadios juveniles de peces marinos el requerimiento es del 1% al 2% de HUFAs n-3 de la dieta en peso seco, mientras que para los primeros estadios de desarrollo esta cantidad es del 5 al 10% de HUFAs n-3.

Adicionalmente en este experimento se observó una disminución en el peso y talla final en los organismos alimentados con el nivel más alto de HUFAs n-3 (1.43% de la dieta) registrando los valores más bajos de todos los tratamientos con valores de 12.34± 0.49gr y 110.13±0.92mm, respectivamente. Esto es similar a lo reportado por Takeuchi y Watanabe (1979) quienes realizaron un experimento para evaluar el efecto de cantidades excesivas de ácidos grasos esenciales en el crecimiento de la trucha arcoíris *Salmo gairdneri*, utilizando niveles cuatro veces mayores al requerimiento establecido para este pez indujeron efectos adversos en la tasa de crecimiento. Resultados similares han sido reportados para el besugo *Pagrus major* por Takeuchi *et al.* (1992a) y para la palometa *Pseudocaranx dentex* por Takeuchi *et al.* (1992b) y el lenguado Japonés por Kim y Lee (2004).

Aunque los ácidos grasos de las series n-3, n-6 y n-9 cumplen distintas funciones dentro del organismo, está claramente demostrado que es necesario incorporar proporciones equilibradas de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, y poliinsaturados para así definir el balance óptimo entre estos. La complejidad de la nutrición lipídica reside en el hecho de que los cambios en las cantidades de los ácidos grasos de una serie alteran las proporciones de los otros. Por eso, una dieta muy rica en ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados corre el riesgo de ser parcialmente deficiente en ácidos grasos esenciales, mientras que una dieta que contenga una cantidad excesiva de ácidos grasos esenciales (i.e., 22:6 n-3), es probable que sea mala como fuente de energía metabólica para la B-oxidación (Sargent *et al.* 1999).

Los HUFAs n-3 en especial el DHA tiene un alto grado de insaturación, por lo que son más susceptible a la oxidación por la alta afinidad que tiene el oxígeno por los enlaces dobles. Esto puede ser perjudicial, ya que niveles excesivos de HUFAs n-3 en dietas sin antioxidantes adecuados, pueden dar lugar una alta oxidación, provocando variaciones en las proporciones de los distintos tipos de ácidos grasos y a la producción de peróxidos y aldehídos altamente tóxicos (Tacon, 1995).

La Tasa de Conversión Alimenticia (TCA) es una medida de qué tan eficientemente un pez está utilizando el alimento ingerido y transformándolo en biomasa ganada (en términos de peso ganado) donde una menor TCA implica una mayor eficiencia de alimento. Es importante mencionar que para un cálculo preciso del alimento total consumido es necesario cuantificar el alimento no consumido retirando el alimento sobrante después de unas 2 horas y por diferencia obtener el valor real del alimento ingerido. Se recomienda realizar este procedimiento por lo menos en un 30% de los días del período experimental y así obtener una cuantificación más precisa de la eficiencia de la utilización del alimento. En este trabajo la mejor TCA fue obtenida en los peces alimentados con la dieta formulada con un 1.0% HUFAs n-3, (Tabla 3). Este resultado está dentro

del intervalo reportado por Kim y Lee (2004) quienes encontraron que la mejor eficiencia alimenticia del lenguado japonés resultó en los organismos alimentados con 0.8 y 1.2% de HUFAs n-3 y los valores más bajos se observaron en los organismos que fueron alimentados a partir de una dieta que contenía 1.6% de HUFAs n-3, y aún menos en los organismos alimentados con 2.4% de HUFAs n-3 en la dieta.

En contraste, Leu *et al.* (1994) evaluaron el efecto del nivel de HUFAs n-3 en la dieta de juveniles de sargo dorado *Rhabdosargus sarba*, y no encontraron diferencias significativas en la eficiencia alimenticia con 1.31, 1.64 y 2.19% de HUFAs n-3. Sin embargo, en la dieta con 2.19% de HUFAs n-3, se observó una ligera reducción en el Tasa de Conversión Alimenticia y una ligera mejoría en las dietas con 1.31 y 1.64% de HUFAs n-3 comparadas con la dieta de 0.6% de HUFAs n-3.

Algunos estudios utilizan el índice hepatosomático para evaluar el efecto de los componentes de la dieta (i.e. lípidos y carbohidratos) en el tejido hepático. Por lo general, en condiciones normales cada órgano de un organismo representa un porcentaje más o menos fijo del peso total del pez, independientemente de su tamaño. Sin embargo, dependiendo de la especie y de las características nutricionales del alimento, los altos niveles tanto de carbohidratos como de lípidos pueden tener un efecto sobre el peso y tamaño del hígado (Shearer, 1994). Estos cambios se dan por la acumulación o reducción en el contenido de glícogeno y lípidos en el órgano.

En el presente trabajo, las dietas con diferentes concentraciones de HUFAs n-3 no tuvieron un efecto significativo sobre el IHS de los organismos. Aunque no se realizaron análisis proximales en el hígado para determinar con exactitud que nutriente causó las diferencias en peso, es posible considerar que en las dietas con bajos niveles de HUFAs, el aumento en peso puede ser debido a la

acumulación de lípidos por la falta de fosfolípidos adecuados que faciliten el transporte de estos del hígado a otras regiones del cuerpo (Sargent *et al.* 1989).

Montero *et al.* (2001) investigaron el efecto combinado del estrés y las deficiencias en ácidos grasos esenciales en juveniles de dorada (*Sparus aurata*) sobre diversos parámetros biológicos y bioquímicos. Una de las dietas fue formulada en base a los requerimientos de HUFAs n-3 (1.5% del total de la dieta) para la dorada y la otra con tan solo 0.42%. Cada dieta se evaluó en densidades de cultivo altas y bajas (10 y 3.2 Kg m³, respectivamente). Los resultados indicaron que a pesar de la densidad de población, se registró un aumento significativo en peso del hígado y del IHS en los peces alimentados con la dieta deficiente en HUFAs n-3. Los autores relacionan que este aumento en IHS con el aumento de lípidos totales en el hígado. Así mismo, se observó que los hepatocitos de los peces alimentados con dietas deficientes HUFAs n-3 presentaron síntomas de esteatosis hepática (hígado graso) y migración de núcleos hacia la periferia celular debido a la acumulación de lípidos.

El Factor de Condición de Fulton (K) (Bagenal y Tesch, 1978) es un índice de la condición, robustez o estado de bienestar de los peces. Los resultados del factor de condición están influenciados por la disponibilidad, cantidad y calidad del alimento, cambios fisiológicos de la especie y factores abióticos de cada sistema (Wootton, 1990). En este estudio, el valor del K poblacional fue cercano a 1 (con un intervalo de 0.91 a 0.96), indicando una buena condición en los organismos sometidos a los diferentes tratamientos.

Los resultados del presente estudio coinciden con lo reportado por Leu *et al.* (1994) quienes no encontraron efectos significativos en el índice de condición para juveniles de sargo dorado alimentados con dietas suplementadas con niveles de 0.61%, 0.91%, 1.31%, 1.64% y 2.19% de HUFAs n-3. Así mismo, en el trabajo de Ibeas *et al.* (1994) no se encontraron diferencias significativas en el factor de

condición utilizando dietas con niveles de 0.19, 1.10 y 1.50% de HUFAs n-3 en juveniles de dorada.

VII.2. Perfil de ácidos grasos en dietas

El análisis de ácidos grasos de las dietas demostró que la formulación y manufactura de las dietas fueron relativamente exitosas, ya que se logró obtener un incremento gradual positivo (i.e., correlación de $r^2 = 0.97$) del contenido de HUFAs n-3 en las dietas, en particular del DHA. Así mismo, como era de esperarse el contenido de 18:1 n-9 y 18:2 n-6 en las dietas que contenían más aceite de maíz fue significativamente mayor y se observó una reducción gradual negativa conforme aumentó el contenido de aceite de hígado de bacalao y Aqua-Grow en las dietas (i.e., correlación de $r^2 = -0.95$).

Sin embargo, aunque se realizó un gran esfuerzo por conseguir una fuente proteica magra (músculo de tiburón bajo en lípidos) y en eliminar el contenido de lípidos de ésta, lavándola con etanol (i.e., se logró reducir a menos de 3% los lípidos), aparentemente no fue lo suficiente para eliminar todos los HUFAs n-3, ya que la dieta formulada con 0% de HUFAs n-3 y solo aceite de maíz (rico en 18:1 n-9 y 18:2 n-6) contenía el 0.45% de HUFAs n-3 del peso seco de la dieta. No obstante el objetivo de lograr concentraciones incrementales de HUFAs n-3 en las dietas fue exitoso, logrando obtener resultados dosis- respuesta.

VII.3. Perfil de ácidos grasos en las dietas y organismos

La dieta es el factor más importante que influye sobre la composición de ácidos grasos de los peces (Cowey y Sargent, 1972). El perfil de ácidos grasos en juveniles de totoaba muestra muchas características que ya se han observado en estudios realizados para determinar el requerimiento y perfil de ácidos grasos esenciales de otras especies. Por lo general el perfil de ácidos grasos en la dieta

tiene un efecto importante en el perfil de ácidos grasos de organismos, en particular en el de los ácidos grasos esenciales. El contenido de HUFAs n-3 en los organismos aumentó conforme incrementó el nivel de HUFAs n-3 en la dieta (i.e., correlación del $r^2 = 0.96$), por lo que se demuestra la influencia del porcentaje contenido en la dieta sobre la proporción de estos en los organismos.

Los juveniles de totoaba mostraron un nivel bastante uniforme de ácidos grasos saturados, independientemente de su nivel de inclusión en la dieta. Por ejemplo, aunque había una diferencia de casi el doble de la concentración de ácidos grasos saturados en la dietas experimentales (i.e., la dieta formulada con 0% HUFAs n-3 con un valor de 17% vs. la dieta formulada con 1.5% HUFAs n-3 con un valor de 32% la diferencias en la concentración de estos ácidos grasos en el tejido de los organismos solo varió en un 7%. Esta característica también se ha observado en el bagre de canal, *Ictalurus punctatus*, (Stickney y Andrews 1971), la trucha arco iris (Yu *et al.* 1977) y el salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Mugrditchian *et al.* 1981).

Los ácidos grasos más abundantes detectados en los juveniles de totoaba fueron en primer lugar (por orden de abundancia, aunque varió según la dieta): el 18:2n-6 y 18:1n-9 y en segundo lugar 16:0, 22:6n-3 y 18:0 (Figura 13). Estos resultados concuerdan con lo reportado por López *et al.* (2006), quienes caracterizaron el perfil de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdonaldi*. En organismos cultivados reportaron como los más abundantes al 18:1 n-9 y 18:2 n-6 y en segundo lugar al 22:6 n-3, 18:0 y 16:0.

De manera similar, García y Pacheco (2003) trabajaron con dos especies de Sciaenidos (*Cynoscion reticulatus* y *Cynoscion xanthulus*), y encontraron que el 16:0, 18:0 y 18:1n-9 estuvieron presentes en mayor concentración en *C. reticulatus*, mientras que en *C. xanthulus* los ácidos grasos con mayor porcentaje fueron el 16:0, 18:1n-9 y 22:6n-3.

Con base en los resultados presentes en este trabajo, podríamos asumir que los juveniles de totoaba alimentados con dietas ricas en aceite de maíz y deficientes en HUFAs n-6, no fueron capaces de transformar el ácido linoleico (18:2 n-6) en un ácido graso más esencial de cadena más larga y más insaturado, el 20:4 n-6. Es bien conocido que los peces marinos son incapaces de producir ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) a partir de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) a una tasa fisiológicamente significativa debido a una capacidad enzimática limitada de elongación y desaturación (Δ -5-desaturasa) y de la síntesis de DHA a partir de otros PUFAs, siendo por lo tanto esenciales los ácidos grasos de 20 y 22 carbonos, 20:4 n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3 (Kanazawa, 1997). Por ejemplo, se ha determinado que existe una insuficiencia metabólica en las vías de conversión del complejo multienzimático de elongasas y desaturasas por lo que existe una incapacidad para convertir el 18:2 n-6 a 20:4 n-6. (Bell y Sargent 2003) (Zheng *et al.* 2004).

El ácido docohexaenoico (DHA, 22:6n-3), fue el HUFAs n-3 que se encontró en mayor proporción en los tejidos de los organismos, con valores que oscilaron entre el 6 y el 15% de los ácidos grasos identificados. Como es bien conocido, el DHA tiene mayor función y valor biológico como ácido graso esencial en comparación con el EPA (Watanabe, 1993) y por lo tanto presenta un mayor requerimiento, ya que el DHA es el componente mayoritario en las membranas celulares dando estructura y funcionalidad (fluidez) a éstas. Este ácido graso esencial es particularmente importante en el desarrollo del tejido nervioso y de la retina, siendo el principal ácido graso presente en los fotorreceptores (conos y bastones) Sargent *et al.*, (1995).

VIII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontraron diferencias significativas en crecimiento y la eficiencia de la utilización del alimento en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de HUFAs n-3. De acuerdo a las condiciones experimentales utilizadas, los juveniles tempranos de *T. macdonaldi* requieren aproximadamente de 0.9% al 1.0% de HUFAs n-3 en la dieta para lograr un crecimiento y desarrollo adecuado.

De manera similar hubo una clara diferenciación en los perfiles de ácidos grasos encontrados en las dietas y los organismos, se observó claramente la influencia de la dieta en la acumulación de ácidos grasos en los organismos en particular en los ácidos grasos esenciales.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son de especial importancia por tratarse de una especie poco conocida y con un alto potencial acuícola, por lo que el requerimiento de información nutricional para su cultivo exitoso es de suma importancia.

IX. RECOMENDACIONES

Con base a los resultados de este trabajo y dada la escasa información sobre la nutrición de *T. macdonaldi*, se sugiere profundizar en el conocimiento de los requerimientos nutricionales de esta especie y el uso de dietas formuladas tomando en consideración las concentraciones óptimas de HUFAs de la serie n-3 y n-6, así como las relaciones óptimas de DHA/EPA/ARA, para estadios juveniles de totoaba.

Realizar experimentos donde se mantengan en cultivo experimental los juveniles por un periodo más prolongado, de tal forma que permita evaluar por más tiempo el crecimiento, la supervivencia e índices de condición.

Llevar a cabo el retiro de alimento no consumido por los organismos después de 2 horas, por lo menos en un 30% de los días del periodo experimental, con el fin de hacer un cálculo más preciso del alimento total consumido y así obtener una cuantificación exacta de la eficiencia de la utilización del alimento.

Realizar estudios para caracterizar los efectos fisiológicos en juveniles de totoaba causados por una deficiencia o exceso de HUFAs n-3 en la dieta.

X. LITERATURA CITADA

- Agrandi, E., L. Bonomi, E. Rigamonti, M. Liguori y P. Bronzi. 1995. The effect of dietary lipids on tissue lipids and ammonia excretion in European eels (*Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A: 445-451p.
- A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C. 1094 p.
- Bagenal, T.B. y F.W. Tesch. 1978. Age and growth, p.101-136. En: T. Bagenal (ed.). *Methods for assessment of fish production in fresh waters*. Blackwell, Oxford.
- Bell, J.G. y J.R. Sargent. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*. 218: 491-499p.
- Blanchard, G., X. Druart, y P. Kestemont. 2005. Lipid content and fatty acid composition of target tissues in wild *Perca fluviatilis* females in relation to hepatic status and gonad maturation. *Journal of Fish Biology*. 66: 73-85p.
- Bromage, N., 1998. Broodstock management and the optimisation of seed supplies. *Suisan Zoshoku*. 46: 395-401p.
- Cai, Z. y L.R. Curtis. 1990. Effects of diet and temperature on food consumption, growth rate and tissue fatty acid composition of triploid grass carp. *Aquaculture*, 88: 313-327p.
- Cequier-Sánchez, E.C. Rodríguez, A.G. Ravelo y R. Zarate. 2008. Dichloromethane as solvent for lipid extraction, lipid classes and fatty acid assessment from samples of different nature. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 56:4297-4303p.
- Cowey, C.B., J.M. Owen, J.W. Andron y C. Middleton. 1976. Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of different dietary fatty acids on the growth and fatty acid composition of turbot (*Scophthalmus maximus*). *British Journal of Nutrition* 36(3): 479-486p.
- Cowey, C.B. y J.R. Sargent. 1972. Fish nutrition. *Mar. Biol.* 10: 383-492p.
- Delgado, A., A. Estévez, P. Hortelano y M.J. Alejandro. 1994. Analyses of fatty acids from different lipids in liver and muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Influence of temperature and fasting. *Comparative Biochemistry. Physiology.*, 108(4): 673-680p.

- Diario Oficial de la Federación. 1975. Acuerdo que establece veda total para la totoaba. 1o. de agosto de 1975
- Evans, R.P., P. Zhu, C.C. Parrish y J.A. Brown. 2000. Lipid and amino acid metabolism during early development of marine fish. In Shahidi, F. (Ed.), *Seafood in Health and Nutrition - Transformation in Fisheries and Aquaculture: Global Perspectives* (pp. 477-493) St. John's, Newfoundland: Science Tech Publishing Co.
- FAO. 2009. Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2004 - 2006. www.fao.org. Septiembre 2009.
- Flanagan, C.A. y J.R. Hendrickson. 1976. Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cyncoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*, V. (74):531-544p.
- Fernández-Palacios, H., M.S. Izquierdo, L. Robaina, A. Valencia, M. Salhi y J.M. Vergara. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 132: 325-337p.
- Folch, J., M. Lees y G.H.S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509p.
- Foster, I. 2000. Nutrient requirements En: *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley and Sons, Inc. New York. 1063p.
- Furuita, H., H. Tanaka, T. Yamamoto, N. Susuki y T. Takeuchi. 2002. Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 210: 323-333p.
- Gapasin, R.S., J. Bombeo, R. Lavens, P. Sorgeloos y H. Nelis. 1998. Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture*, 162: 269-286p.
- García-Gallego, M. 1992. Alimentación lipídica en peces. *Aulas del mar. Acuicultura: cultivo y alimentación de peces*, pp: 161-182. Eds. Zamora, S., Pérez Llamas, F. y García Riera, M.P. Univ. Murcia.
- García, G y R. Pacheco. 2003. *Catálogo electrónico para la identificación taxonómica y bioquímica de los peces del Golfo de California*, CIAD, Hermosillo, Sonora.

- Gatesoupe, F.J. y C. Le-Milinaire. 1985. Adaptation de la qualité alimentaire des filtreurs-proies aux besoins nutritifs des larves de poissons marins. *Coll. fr.-japon. Océanogr.*, Marseille 16-21 Sept. 85. 8:51-63p.
- Gurr, M.I y J.L. Harwood. 1991. *Lipid Biochemistry*. Chapman and Hall. 4ta ed. Londres 406pp.
- Hamre, K., B. Hjeltnes, H. Kryvi, S. Sandberg, M. Lorentzen y O. Lie. 1994. Decreased concentration of hemoglobin, accumulation of lipid oxidation products and unchanged skeletal muscle in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed low dietary vitamin E. *Fish Physiol. Biochem.*, 12:421-429p.
- Henderson, R.J. y J.R. Sargent. 1985. Fatty acid metabolism in fish. En: *Nutrition and feeding in fish*, pp: 349-364. Eds. Cowey, C.B., Mackie, A.M. y Bell, J.G. Academic Press. London.
- Huang, C.H., M.C. Huang y P.C. Hou. 1998. Effect of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus x O. aureus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120B: 331-336p.
- Ibeas, C., M.S. Izquierdo y A. Lorenzo. 1994. Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 127:177-188p.
- Izquierdo, M.S. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition Vol. 2*:183-191p.
- Kanazawa, A. 1988. Nutritional requirements and formulated diets for flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Yoshoku* 25(8):116-119p.
- Kanazawa, A. 1997. Effects of docosahexanoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture* 155:129-134p.
- Kim, K.-D. y S.-M. Lee. 2004. Requirement of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids for juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 229:315-323p.
- Leu, M.-Y., S.-D. Yang, C.-H. Wu y C.-H. Liou. 1994. Effect of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, feed efficiency and fatty acid composition of juvenile silver bream *Rhabdosargus sarba* (Sparidae). *Asian Fish. Sci.*, 7: 233-240p.
- Lochmann, R.T. y D.M.III. Gatlin. 1993. Essential fatty acid requirement of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiol. Biochem.* 12:221-235p.

- Logue, J. A., B.R. Howell, J.G. Bell y A.R. Cossins. 2000. Dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid deprivation, tissue lipid composition, *ex vivo* prostaglandin production, and stress tolerance in juvenile dover sole (*Solea solea* L.). *Lipids*, 35:745-755p.
- López, L.M., E. Durazo, A. Rodríguez-Gómez, C.D. True y M.T. Viana. 2006, Perfil de Ácidos Grasos de Juveniles Silvestres y Cultivados de *Totoaba macdonaldi*; *Ciencias Marinas*, 32 (2):303-309p.
- Luostarinen, R.L., K. Laasonen, y P.C. Calder. 2001. α -tocopherol concentrations, lipid peroxidation and superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in rat heart and liver after feeding stabilized and unstabilized fish oil. *Nut. Res.*, 21:1529-1544p.
- Ma, T.S. y G. Zuazago. 1942. Micro-Kjeldahl determination of nitrogen. A new indicator and an improved rapid method. *Ind. Eng. Chem.* 14:280-282p.
- Martínez-Lagos, R. y V. Gracia-López. 2009. Morphological development and growth patterns of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* during larval development. *Aquaculture Research*, 1-9p.
- Montero, D., L. Robaina, J. Socorro, J.M. Vergara, L. Tort, y M.S. Izquierdo. 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiol. Biochem.*, 24:63-72p
- Montero, D., L. Tort, M.S. Izquierdo, L. Robaina y J.M. Vergara. 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by α -tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.*, 18:399-407p.
- Morris, K. 1986 *Techniques of lipidology: isolation, analysis, and identification of lipids*. American Elsevier Pub. Co, Inc. N. Y. 345p.
- Mourente, G., A. Rodríguez, E. Grau y Pastor. 1999. Utilization of lipids by *Dentex dentex* L. (Osteichthyes, Sparidae) larvae during lecithotrophia and subsequent starvation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21:45-58p.
- Mugrditchian, D.S., R.W. Hardy, y W.T. Iwaoka. 1981. Linseed oil and animal fat as alternative lipid sources in dry diets for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 25:161-172p.
- Navas, J.M., M. Bruce, M. Thrush, B.M. Farndale, N. Bromage, S. Zanuy, M. Carrillo, J.G. Bell y J. Ramos. 1997. The impact of seasonal alternation in

the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *J. Fish Biol.* 51:760-763p.

- Olsen, Y.A. y R.J. Henderson. 1997. Muscle fatty acid composition and oxidative stress indices of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid levels and temperature. *Aquaculture Nutrition*, 3: 227-238p.
- Olsen, R.E., E. Lovaas, y O. Lie. 1999. The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids, α -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L). *Fish Physiol. Biochem.*, 20:13-29p.
- Rainuzzo, J.R., K.I. Reitan, y E Olsen. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 115:103-115p.
- Roberts, R.J y A.M. Bullock. 1989. Nutritional Pathology. En: *Fish Nutrition*, 2da ed., pp: 424-469. Ed. Halver, J.E. Academic Press. London.
- Rodríguez-Gómez, M.A. 2003. Composición proximal y contenido de ácidos grasos en juveniles de *Totoaba macdonaldi* del alto Golfo de California. Tesis. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas.
- Román-Rodríguez, M. 1990. Alimentación de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert) (Pisces: Sciaenidae) en la parte norte del alto golfo de California. *Ecológica* vol.1 (2) 1-9p.
- Rosales-Juárez, F., y E. Ramírez-González, 1987. Estado actual sobre el conocimiento de la Totoaba (*Cynoscion macdonaldi* Gilbert 1980). Secretaria de Pesca, México.
- Rosas-Servin, A. 2006. Absorción in vitro de aminoácidos en el intestino proximal de peces carnívoros de agua dulce: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y agua salada: atún aleta azul (*Thunnus orientalis*) y totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas.
- Ruiz-Gutiérrez, V., A. Pérez-Espinosa, C.M. Vázquez y C. Santa-María. 1999. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br. J. Nutr.*, 82:233-241p.
- Ruyter, B., O. Rosjo, Einen y M.S. Thomassen. 2000a. Essential fatty acids in Atlantic salmon: time course of changes in fatty acid composition of liver,

- blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquaculture Nutrition*, 6:109-117p.
- Ruyter, B., O.Rosjo, Einen y M.S. Thomassen. 2000b. Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquaculture Nutrition*, 6:119-127p.
- Sargent, J.R., J. Henderson y D.R. Tocher. 1989. The Lipids. 154-209 En: *Fish Nutrition*, 2da ed. Ed. Halver, J.E. Academic Press. London.
- Sargent, J.R., J.G. Bell, M.V. Bell, R.J. Henderson y D.R. Tocher. 1995. Requirements criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11:183-198p.
- Sargent, J.,L. McEvoy, A. Estevez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson y D. Tocher.1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*. 179:217-229p.
- Sargent, J.R., T.R. Tocher y J.G. Bell 2002. The lipids, 181-257. En: Halver, J.E. y R.W. Hardy (Eds.) *Fish Nutrition* 3era ed. Academic Press. 500p.
- Shearer, K. 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture* 119:63-88p.
- Solórzano-Salazar, Y. 2006. Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Maestría .Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas.
- Tacon, A. 1995. Ictiopatología nutricional. Signos morfológicos de la carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces cultivados. FAO. Documento Técnico de Pesca No. 330. Roma, Italia. 77p.
- Stickney, R.R. y J.W. Andrews. 1971. Combined effects of dietary lipids and environmental temperature on growth, metabolism and body composition of channel catfish. *J. Nutr.*, 101:1703-1710p.
- Takama, K., T. Suzuki, K. Toshida, H. Arai, y T. Mitsui. 1999. Phosphatidylcholine levels and their fatty acid compositions in teleost tissues and squid muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 124B:109-116p.
- Takeuchi, T. y T. Watanabe. 1979. Effect of excess amount of essential fatty acids on growth of rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 45:1517-1519p.

- Takeuchi, T., M. Toyota, S. Satoh y T. Watanabe. 1990. Requirement of juvenile red seabream *Pagrus major* for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56:1263-1269p.
- Takeuchi, T., T Arakawa, S. Satoh, y T. Watanabe. 1992b. Supplemental effect of phospholipids and requirement of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid of juvenile *Striped jack*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 58: 707-713p.
- Takeuchi, T., Y. Shiina y T. Watanabe, 1992a. Suitable levels of n-3 highly unsaturated fatty acids in diet for fingerlings of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58:509-514p.
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science.*, 11(2):107-184 p.
- Tocher, D.R. y J.R. Sargent.1984. Analysis of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. *Lipids*, 19:492-499.
- True, C.D., A. Silva Loera y N. Castro Castro. 1997. Acquisition of *Totoaba macdonaldi* (*Sciaenidae*) broodstock: field handling, decompression and prophylaxis of an endangered species. *Progressive Fish-Culturist*. 59(3).
- True, C.D., N. Castro-Castro, G. Sandoval-Garibaldi y C. Morales-Ortiz. 2001. Reproducción Controlada de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert). Resumen de ponencia oral del VII Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés. Pag. 82
- Vizcaíno-Pérez, E. 2008. Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, alimentados con dietas isoproteicas formuladas con distintos niveles de energía. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas
- Watanabe, T. 1987. Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en peces. En: *Nutrición en Acuicultura II*, pp: 99-149. Eds. Espinosa de los Monteros, J y Labarta, U. Madrid.
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24:152-16p.
- Webster, C.D. y T. Lowell. 1990. Response of stripes bass larvae fed brine shrimp from different sources containing different fatty acid compositions. *Aquaculture*, 90:49-6p.

- Wootton, R.J. 1990. Ecology of teleost fishes. Chapman & Hall, Londres. 404p.
- Yu, T.C., R.O. Sinnhuber y G.B. Putnam. 1977. Effect of dietary lipids on fatty acid composition of body lipid in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids* 12, 495-499p.
- Zheng, X., I. Seilliez, N. Hastings, D.R. Tocher, S. Panserat, C.A. Dickson, P. Bergot, A.J. Teale. 2004 Characterization and comparison of fatty acyl D6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem Physiol.* 139(B):269-279p.