

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Crecimiento y supervivencia de juveniles de *Octopus  
bimaculoides* alimentados con dietas naturales**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Ana Lillian Gómez Fierro**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por

**Ana Lillian Gómez Fierro**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Mónica Hernández Rodríguez**

Director de tesis

Miembros del comité

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**

**Dra. Ma. Elena Solana Arellano**



---

**Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez**

Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**

Directora de Estudios de Posgrado

*Ana Lillian Gómez Fierro © 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Ana Lillian Gómez Fierro** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

### **Crecimiento y supervivencia en juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con dietas naturales**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Mónica Hernández Rodríguez  
**Directora de tesis**

Los pulpos son especies con potencial acuícola gracias a su rápido crecimiento y adaptación al cultivo. La nutrición durante las primeras etapas de desarrollo de estos organismos, es uno de los principales cuellos de botella para desarrollar su cultivo. Las especies de pulpo con desarrollo directo (sin etapa de paralarva) tienen mayor potencial, gracias a que los juveniles tienen la capacidad de alimentarse como un organismo adulto. No obstante, a pesar de la obtención de resultados prometedores con el uso de dietas que contienen proteína de crustáceos, aún se tienen mortalidades considerables y los organismos que sobreviven alcanzan tallas más pequeñas comparadas con los pulpos silvestres. La dieta que permita desarrollar el cultivo de pulpo con tasas de crecimiento similares a la del medio natural y mejor supervivencia, son el reto en la investigación con estos organismos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el crecimiento, la presencia de los ocelos, la supervivencia y los ácidos grasos altamente insaturados en los juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con dietas naturales. Las dietas fueron elaboradas con jaiba (*Callinectes sapidus*) y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) en diferentes proporciones, con grenetina como aglutinante. Los juveniles de pulpo fueron alimentados con tres dietas (D) cada una con cuatro replicas: D1, con 60% de carne de jaiba, 36% de mejillón y 4% de grenetina; D2, con 80% de carne de jaiba, 16% de mejillón y 4% de grenetina, D3, con 80% de carne de jaiba, 11% de mejillón, 5% de aceite de ojo de atún y 4% de grenetina. Los pulpos (n= 48 por tratamiento) se mantuvieron en tanques de 60 L, cada uno en un refugio individual (n= 144) durante 28 días, en ese momento se realizó un muestreo al azar; posteriormente, se siguió el cultivo hasta los 42 días (Dieta 1: n=20, Dieta 2: n=23 y Dieta 3: n=22). A los 42 días de cultivo el peso ganado con respecto al inicial en el grupo de la D2 (105%) fue mayor que en los grupos de la D1 (11%) y la D3 (51%) ( $p < 0.05$ ). La presencia de ocelos en los juveniles se registró a partir de los 14 días de cultivo, a los 21 días el 49.3% de 142 individuos presentaron los ocelos y a los 28 días se observó en el 90% de los organismos. La mejor supervivencia se obtuvo en los organismos de la D2, con 97.92% a los 28 días y 95.65%, mientras que a los 42 días de cultivo se obtuvo la supervivencia más baja (80%) en los pulpos de la D1. La composición de los ácidos grasos altamente insaturados araquidónico (ARA, 20:4 n6), eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6 n3) disminuye entre los juveniles recién eclosionados y los pulpos de 28 y 42 días de cultivo, sin embargo, se encontraron más diferencias significativas entre los juveniles recién eclosionados y los individuos en D2 Y D3 ( $p < 0.05$ ). Los organismos que recibieron la D3 no presentaron diferencias significativas con los organismos recién eclosionados en el contenido de DHA. A los 28 días de cultivo, la relación DHA:EPA de los organismos alimentados con la D3 ( $2.48 \pm 0.21$ ) y la encontrada en los pulpos recién eclosionados ( $2.01 \pm 0.06$ ) no presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ), mientras que a los 42 días de cultivo, la relación DHA:EPA presente en las dietas D1 ( $1.81 \pm 0.22$ ) y D2 ( $1.59 \pm 0.12$ ) no tuvo diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) con los juveniles recién eclosionados.

**Palabras clave:** *Octopus bimaculoides*, crecimiento, supervivencia, desarrollo de ocelos, PUFAs.

Abstract of the thesis presented by **Ana Lillian Gómez Fierro** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

### **Growth and survival of *Octopus bimaculoides* juveniles fed with natural diets**

Abstract approved by:

---

Dr. Mónica Hernández Rodríguez  
Thesis Director

Octopus are species with high aquaculture potential due to their rapid growth and adaptation to captivity. Nutrition during first development stages is the principle cause of octopus's mortalities. Octopus species with direct development (no paralarvae stage) have more potential, because juveniles have the capacity to feed like an adult octopus. Nevertheless, despite of the promising results obtained with crustacean based diets, mortalities and small sizes in comparison against wild organisms are still obtained. The goal of researches upon these species is to formulate diets that allow to develop octopus culture with growth rates similar to those on wild animals and better survival than that observed on animals in captivity. For this reason, the aim of the present study was to assess the growth, survival and highly unsaturated fatty acids on *Octopus bimaculoides* juveniles. Diets were formulated with blue crab (*Callinectes sapidus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) on different proportions using grenetin as a binder. Octopus juveniles were fed with three diets (D): D1, 60% blue crab, 36% mussel and 4% grenetin; D2, 80% blue crab, 16% mussel and 4% grenetin and D3, 80% blue crab, 11% mussel, 5% tuna eye oil and 4% grenetin; each treatment with four replicates. Individuals were maintained on 60 L tanks, each organism was placed in an individual refuge (n = 144) during 28 days, after this period, a random sample (N = 71) was made, to continue until 42 days of culture (Diet 1: n = 20, Diet 2: n = 23 y Diet 3: n = 22). The octopuses that gained more weight (mg) were the group fed with D2 (105%) compared to D1 (11%) and D3 (51%) (p < 0.05). Development of ocelli on juveniles was registered for the first time on day 14 of culture, after 21 days 49 % of 142 individuals presented ocellus, and at 28 days 90% of the juveniles presented ocelli. Best survival was obtained in organisms fed with Diet 2, with 97.92% of survival at 28 days of culture and 95.65% at 42 days of culture, while at 42 days of culture 80% was the less survival, obtained in organisms fed with Diet 1. Composition of highly unsaturated fatty acids arachidonic (ARA, 20:4n6), eicosapentaenoic (EPA, 20:5n3) and docosahexaenoic (DHA, 22:6n3) decreased from newly-hatched juveniles to 28 days and 42 days of culture, nevertheless, more significant differences were found between newly-hatched juveniles and individuals on D2 and D3 (p < 0.05). DHA content in organisms fed with Diet 3, did not revealed statistically significant differences with newly-hatched juveniles. On 28 days of culture, DHA:EPA relation in individuals fed with Diet 3 ( $2.48 \pm 0.21$ ) and that observed on newly-hatched juveniles ( $2.01 \pm 0.06$ ) did not revealed statistically significant differences (p  $\geq$  0.05), at 42 days of culture, DHA:EPA relation observed on diets D1 ( $1.81 \pm 0.22$ ) and D2 ( $1.59 \pm 0.12$ ) did not revealed statistically significant differences (p  $\geq$  0.05) in comparison with newly-hatched juveniles.

**Keywords: Palabras clave: *Octopus bimaculoides*, growth, survival, ocellus development, PUFAs**

## Dedicatoria

*A Dios, a mi papá, a mi mamá, a Armando y a mi abuelita Severina, quienes fueron mi principal apoyo, mi motivación y la razón por la que me esfuerzo. Son mi pilar, mi soporte y mi fortaleza.*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios, por permitirme conocer a CICESE y sobre todo porque conocí las oportunidades brindadas por CONACYT y abrirme los ojos para ingresar al ámbito de la Acuicultura.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico que me permitió realizar los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por permitirme el ingreso al posgrado en Acuicultura.

A mi directora de tesis, la Dra. Mónica Hernández por su apoyo, por compartirme sus conocimientos y sobre todo por su incansable paciencia para revisar mi trabajo escrito y mis exposiciones.

A mis sinodales, la Dra. Beatriz Cordero por permitirme la entrada y disposición completa de su laboratorio, a la Dra. Elena Solana por su importante apoyo sobre la estadística, y a ambas, gracias por sus acertadas aportaciones durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Rafael Vázquez, por su apoyo en el análisis de mis muestras, por sus consejos y por permitirme utilizar el cromatógrafo del laboratorio de Bionanotecnología en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN), UNAM.

A la Dra. Bertha O. Arredondo Vega por apoyarme con el análisis de ácidos grasos de mis dietas en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR-La Paz, Baja California Sur).

A la empresa Aqualap S.A. de C.V., por la donación de los mejillones con los que alimenté a los pulpos.

Al personal técnico, a Luis Murillo por su ayuda constante, esfuerzo, y desveladas para sacar adelante cualquier imprevisto durante el mantenimiento y cultivo de los pulpos, a Jesús Mariscal por siempre estar ahí para buscar cosas o lo que fuera necesario y a ambos por responder siempre, aunque estuvieran ocupados. A la M. en C. Yanet Guerrero, por ayudarme a ver que no había problemas con *Vibrio* en mi

cultivo. A Abelardo Campos por compartir consejos sobre mi trabajo. A la Dra. Ceres Molina, por ayudarme en la liofilización de mis muestras, por llevarlas y traerlas.

A mis compañeros de generación, Beatriz Nava por todas esas charlas útiles e inútiles, de reflexión, de ocio (bien poquitas... ey!), por todos los consejos y por escuchar los míos (aunque diera mucha lata), y por reírse conmigo sin explicaciónnnnn, “AL” Benito Niebla por siempre enfadar a todos y caerme mal (sólo por pelear contigo), y por darnos motivos para burlarnos a gusto... lo siento, a Enrique Zepeda por esos largos silencios de paz para trabajar (aunque hablaras, igual había tranquilidad) y a César Rodríguez por nunca NUNCA dejar pasar un momento para criticar, y a todos ustedes, por haber compartido conmigo conocimientos, alegrías, quejas y cosas de “gamers” en esos “últimos” (muy largos) momentos de desesperación y crisis antes de “terminar la tesis”, uff, al fin. A Eduardo Martínez, por acompañarme en esos últimos viajes a Mexicali y de regreso a Ensenada, aguantando la platicadera y también a mis perritos chillones; a Erik González, por esas pocas, pero divertidas pláticas (a gritos, a veces ni me escuchabas) mientras cada quien hacía sus labores con sus animales; a mi colega, compañero de carrera y de maestría, Jonathan Pinto, por transmitirme sus conocimientos sobre ácidos grasos y cualquier cosa relacionada, sus consejos para realizar ayudarme con mi trabajo y sobre todo, por siempre tener tiempo para atenderme cuando yo no sabía qué hacer; a Laura Rangel y Noemí Cota por haber compartido conmigo su amistad y tantos momentos agradables e inolvidable (se me vienen a la mente las compras de zapatos y que Laura siempre traía nuevos); a Gabriel Vaca, por aguantar todo el pleito sobre el trabajo de Acuicultura, como los valientes, nos desesperamos tantito jaja; a Josué Escárcega, por hacer más amenas las estadías en el laboratorio de microalgas y por no contagiarme nunca sus gripes; a Juan Benavides, por compartir tanto chiste, aunque a veces no los entendía; a Liliana Cifuentes, aunque convivimos poco, por los agradables momentos; a Omar García por su amistad, por compartir sus lonches!! y también sus ideas tan creativas sobre sistemas acuícolas; y a Sergio Luna, no le agradezco tanto... se fue mucho tiempo, jaja, pero sí le agradezco por compartir su amistad incondicional aunque estuviera lejos y por todos los momentos en que hizo a todos unirse y reír por cosas muy “nerd”.

A mi familia: mamá, papá, abuela, por siempre apoyarme y alentarme para echarle ganas, por motivarme cuando me sentí lejos (aunque fuera corta la distancia) y por siempre mostrarme tanto amor, a pesar de que en los momentos de crisis no era tan agradable convivir conmigo. También a todos mis tíos y primos, que me respetaron y me aguantaron todas las faltas a sus cumpleaños, celebraciones, salidas, etc.

A Armando, por esperarme, por apoyarme, por alentarme y aguantar la distancia. Por siempre estar ahí y mantenerse cerca con mucho amor.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	lii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Pesquería mundial de los cefalópodos.....	1
1.2 Captura de pulpo en México.....	3
1.3 Antecedentes.....	4
1.3.1 Lípidos y ácidos grasos.....	4
1.3.2 Biología de <i>Octopus bimaculoides</i> .....	6
1.3.3 Avances en el cultivo de pulpo.....	8
1.4 Justificación.....	12
1.5 Hipótesis.....	13
1.6 Objetivos.....	13
1.6.1 Objetivo general .....	13
1.6.2 Objetivos específicos.....	14
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>15</b>
2.1 Recolecta de hembras grávidas.....	15
2.2 Mantenimiento de las hembras .....	15
2.3 Diseño experimental y calidad del agua.....	16
2.4 Elaboración de las dietas.....	17
2.5 Obtención y cultivo de juveniles.....	19
2.6 Crecimiento en peso y supervivencia de los juveniles.....	20
2.7 Conteo de ventosas.....	21
2.8 Aparición de los ocelos.....	21
2.9 Extracción de ácidos grasos de juveniles y dietas.....	22
2.10 Perfil de ácidos grasos en dietas.....	23

2.11 Ácidos grasos en los juveniles de pulpo.....	24
2.12 Análisis estadístico.....	25
<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>27</b>
3.1 Crecimiento en peso de los juveniles de <i>O. bimaculoides</i> .....	27
3.2 Conteo de ventosas.....	30
3.3 Presencia de los ocelos en los juveniles de pulpo.....	31
3.4 Supervivencia de los juveniles.....	32
3.5 Ácidos grasos altamente insaturados (ARA, EPA y DHA) en las dietas.....	33
3.6 Ácidos grasos en los juveniles de pulpo.....	35
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>38</b>
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>49</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>50</b>
<b>Literatura citada.....</b>	<b>51</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Distribución de <i>O. bimaculoides</i> desde el Noroeste de Simeon, California hasta Guerrero Negro, Baja California .....	5
2	Ocelos de <i>O. bimaculatus</i> y <i>O. bimaculoides</i> .....	6
3	Sistema utilizado para el cultivo de juveniles de <i>O. bimaculoides</i> .....	17
4	Ganancia en peso del total de los juveniles <i>O. bimaculoides</i> .....	28
5	Crecimiento en peso a través del tiempo de los juveniles de <i>O. bimaculoides</i> .....	29
6	Número de ventosas en los juveniles recién eclosionados (JRE) y los pulpos alimentados con cada una de las dietas a los 28 días de cultivo.....	31
7	Ocelos en juveniles de pulpo. ....	32
8	Comparación visual entre dos organismos de 28 días de cultivo .....	33

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Formulación de las dietas por porcentaje de cada ingrediente.....	18
2	Peso (mg) de los juveniles alimentados con las diferentes dietas.....	30
3	Supervivencia de los organismos alimentados con las diferentes dietas.....	32
4	Concentraciones de ácidos grasos ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en las dietas.....	34
5	Contenido de ácidos grasos ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de los juveniles de pulpo.....	36

# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1. Pesquería mundial de los cefalópodos

Las últimas décadas se han convertido en el segundo periodo histórico de mayor producción pesquera (93.7 millones de toneladas), como consecuencia de factores económicos asociados al aumento demográfico que ejercen presión sobre la obtención de estos recursos (FAO, 2014). Actualmente hay gran dependencia sobre el sector pesquero y acuícola, siendo el pescado el 17% de la proteína animal contenida en la dieta de toda la población del mundo. El consumo mundial de pescado per cápita fue de 15.4 kg durante el 2010, mientras que, en China, que es el mayor productor, tuvo un consumo de 35.1 kg per cápita. En el 2012, la captura marina a nivel mundial estuvo sostenida por 18 países con el 76%, en donde México ocupó el lugar número 16 con 1, 467, 790 t, lo que representó alrededor del 2% de la producción total (FAO, 2014).

Algunas poblaciones marinas han sido sobreexplotadas como consecuencia de la pesquería mal administrada; la FAO (2014) indica que 28.8% de las poblaciones de peces que fueron capturadas, enfrentan un desequilibrio ecológico ocasionado por el mal manejo de las capturas. Por lo tanto, es importante restaurar las poblaciones sobreexplotadas deteniendo su consumo, pesca y comercio, y al mismo tiempo concentrando la pesca en otras especies y sobre todo incorporando técnicas alternativas de producción de bajo impacto, como la acuicultura sustentable, la cual reducirá cada vez más la carga que hay sobre la pesca (FAO, 2014).

La disponibilidad anual de los moluscos, incluidos algunos cefalópodos como pulpos, calamares y sepias incrementó gracias a la contribución de la acuicultura de 0.8 kg a 2.9 kg per cápita en el periodo 1992-2010, de los cuales 0.5 kg per cápita provenían de los cefalópodos (FAO, 2014). Los cultivos pioneros de pulpos fueron realizados en los países mediterráneos con la especie *Octopus vulgaris* (Berger, 2010). Sin embargo, la acuicultura comercial dirigida a este grupo de especies, aun depende de la captura de organismos del medio silvestre y la engorda se realiza principalmente mediante la utilización de jaulas en la costa. Esta dependencia del medio silvestre evidencia la falta de conocimientos sobre los factores que afectan el desarrollo de estos individuos fuera de su medio natural, primordialmente durante sus etapas larvales. De tal modo que, hasta el día de hoy, la mayor parte de los cultivos en tanques han sido implementados solamente con fines de investigación, lo cual impide la viabilidad comercial de estos

productos (Berger, 2010; García-García *et al.*, 2014; Pierce y Portela, 2014; Globefish, 2014; Pierce y Portela, 2014).

Los cefalópodos tienen gran potencial acuícola por su rápido crecimiento y su periodo corto de vida (Villanueva *et al.*, 2014). Hanlon y Forsythe (1985) seleccionaron a *Octopus joubini*, *Octopus briareus*, *Octopus maya*, *Octopus bimaculoides* y a *Octopus digueti* para realizar estudios que permitan cultivar pulpos para su utilización en investigación biomédica. Estos autores mencionan que existe más ventaja en cultivar estos pulpos con desarrollo directo (sin etapa de paralarva), debido a que se encuentran completamente desarrollados para ingerir alimento como un pulpo adulto, por sus hábitos bentónicos, buscan refugio inmediatamente después de eclosionar, tienen un rápido crecimiento y se adaptan fácilmente al laboratorio. No obstante, a pesar de su gran potencial, aún no se ha alcanzado el pleno conocimiento sobre muchos aspectos como la nutrición, que al ser deficiente se manifiesta en baja supervivencia y crecimiento reducido de paralarvas (*Octopus vulgaris*) y juveniles, siendo el principal cuello de botella para estas etapas (Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Seixas *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2014). Al igual que otras especies sobreexplotadas y con base en las capturas mundiales, la demanda de cefalópodos como *O. vulgaris*, *Dosidicus gigas*, *Sepia officinalis*, *Todarodes pacificus*, entre otros, también enfrentan la disminución de sus poblaciones (FAO, 2014; Pierce y Portela, 2014), aunado al mal manejo y la falta de establecimiento de tallas para pesca, lo que dificulta satisfacer la demanda en el mercado (Pierce *et al.*, 2010).

En los años 2014 y 2015, los principales proveedores de pulpo fueron Marruecos y Mauritania, por su parte España e Indonesia incrementaron su exportación hacia Italia, y Portugal en tercer lugar después de Marruecos y Mauritania hacia España (Globefish, 2015). En el primer trimestre del año 2014, los principales importadores de pulpo fueron Italia con 10, 100 t, España con 9, 100 t y Japón con 10, 200 t. Estos países aumentaron sus importaciones durante el mismo periodo del año 2015, Italia con 13, 400 t, España con 13, 900 t y Japón con 13, 400 t. Para el segundo trimestre de ese mismo año, Japón incrementó sus importaciones hasta 21, 000 t (Globefish, 2015).

El precio del pulpo ha sido establecido por Japón y hasta el 2012 se encontraba alrededor de los 10 dólares por 0.3 kg o media pieza y 13 dólares por 2 kg o tres piezas, sin embargo, para el año 2014 las importaciones se habían reducido y para el tercer cuarto del 2015 el precio disminuyó alrededor de 2 dólares por kg, pero las importaciones aumentaron 31% respecto al año anterior con 13, 400 t (FAO, 2012; Globefish, 2015). Durante el 2015, se registró una disminución de desembarques pesqueros en España, Portugal y República de Corea, pero éstas aumentaron en Marruecos, Mauritania y México (Globefish,

2017). En Galicia, España, el valor del pulpo rebasó los 2.6 millones de euros, mientras que Japón aumentó la importación por 38.5% hasta 28, 800 t. Durante el primer semestre del año 2016, Marruecos y Mauritania redujeron sus exportaciones hacia Japón, pero Marruecos aumentó sus exportaciones hacia España en un 17%, por lo que Japón importó 24, 500 t, un 15% menos en relación al primer semestre del año 2015 y España se mantuvo estable con 27, 200 t, mientras que China aumentó sus embarcaciones hacia Japón en un 23% (Globefish, 2017).

## 1.2 Captura de pulpo en México

Actualmente, México se encuentra en el tercer lugar de producción mundial con 38, 885 toneladas, las cuales fueron registradas en el año 2016, habiendo incrementado en un 56% desde el año 2013 y con un aumento en su valor económico durante el mismo periodo de 648 millones de pesos a 1, 236 millones (CONAPESCA, 2017). La captura de pulpo está dirigida mayormente a las especies *O. vulgaris* (pulpo común) y *Octopus maya* (pulpo rojo), provenientes de los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, así como del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano para el pulpo común (CONAPESCA, 2014).

La pesquería de pulpo es una de las más importantes en México, ésta se encuentra regulada por SAGARPA para las especies *O. maya* y *O. vulgaris* (SEGOB, 2014). En el año 2013 a nivel nacional, el pulpo ocupó el onceavo lugar en volumen de captura de especies marinas, el cuarto lugar en valor económico y en séptimo lugar en exportaciones pesqueras, las cuales fueron principalmente absorbidas por Italia y España (CONAPESCA, 2013). En el año 2015, gracias a la producción procedente del estado de Yucatán, el pulpo llegó a cubrir 0.14 kg per cápita en consumo nacional (Mentado, 2015) y colocó a México en el cuarto lugar en producción de pulpo a nivel mundial con 14 mil t capturadas y un valor económico de 700 millones de pesos (SAGARPA, 2013; 2015). Cabe mencionar que para el año 2011, el producto ocupó el segundo lugar en exportaciones nacionales, abasteciendo principalmente a Italia, España y Estados Unidos (CONAPESCA, 2011). Aunque las posiciones fluctúan, para el año 2013 la posición del pulpo en volumen de pesca descendió al lugar 11 y en exportaciones al séptimo (CONAPESCA, 2013); en el año 2015, España y Japón importaron el 70% de la producción de Yucatán (SAGARPA, 2015).

En el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, en México (año 2013), se reportó que la captura de pulpo fue de 24, 847 t, de las cuales 1, 264 t provenían de los estados de Jalisco, Sonora, Baja California y Baja California Sur con las especies *Octopus macropus*, *Octopus bimaculatus* (se capturan en invierno), *Octopus*

*rubescens* (captura en verano) y *Octopus hubbsorum* (captura en verano), esta última sostiene la pesca de pulpo en el pacífico mexicano por su distribución extensa en la región (CONAPESCA, 2008b; 2013). Esta producción ha fluctuado a través de los años; en el 2012 fueron capturadas 30, 958 t, es decir, la captura aumentó en un 11% con respecto al año anterior cuando se habían producido 27, 541 t, después esta producción disminuyó en un 20% para el año 2013. Cabe señalar que la mayor producción de pulpo en el año 2013 provino en un 93% de los estados de Yucatán y Campeche y el resto (7%) de los otros 14 estados, entre ellos Baja California que contribuyó con 155 t, es decir, con el 0.6% de la producción nacional de pulpo. Yucatán se ha posicionado como el mayor productor de pulpo en México, para septiembre de 2014, produjo 10, 000 t siendo la especie *O. maya* la que aporta el mayor porcentaje a esta pesquería con un valor monetario de 38.7 millones de dólares (Globefish, 2014). Datos del año 2015 (del 1 de agosto al 11 de diciembre) indican que los estados de Campeche y Yucatán llegaron a capturar 30, 826 t de pulpo común y pulpo rojo, de las cuales, el 81% le correspondió al pulpo rojo con 24, 843 t, siendo esta especie la que contribuye a la mayor producción de pulpo en el país (CONAPESCA, 2015).

La importancia del pulpo dentro de la producción pesquera mundial, hace de sumo interés el obtener conocimientos sobre la biología básica de estas especies, y así contribuir en el desarrollo de sus cultivos. Los estudios de diferentes disciplinas que colaboren para conocer acerca del correcto acondicionamiento de las instalaciones, manejo de la temperatura, calidad del agua y sobre el requerimiento nutricional de estas especies, como el tipo de nutrientes, su contenido, la calidad (Lee *et al.*, 1995; Domingues *et al.*, 2007) y el balance entre los mismos (Aguado-Giménez y García-García, 2002; Miliou *et al.*, 2005 Okumura *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2010), podrán favorecer el desempeño de estos organismos en cautiverio.

## **1.3 Antecedentes**

### **1.3.1 Biología de *Octopus bimaculoides***

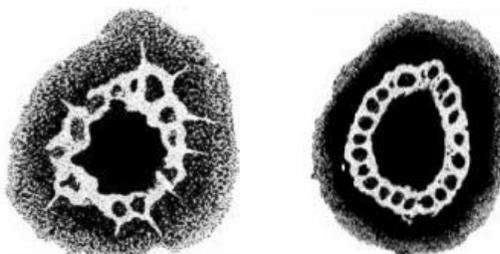
El pulpo *O. bimaculoides* tiene una distribución mediterránea desde Simeon, California hasta Guerrero Negro, Baja California (Figura 1) (Jereb *et al.*, 2014), habita en el intermareal y se resguarda bajo rocas las cuales utiliza como cuevas (Stoskopf y Oppenheim, 1996). En el medio natural, estos organismos tienen un peso promedio de 800 g y puede alcanzar tallas similares en cautiverio; su ciclo de vida es de hasta 1.5 años, con crecimiento rápido (hasta 0.88 mg d<sup>-1</sup>) y produce huevos grandes de aproximadamente (13 mm) (Solorzano *et al.*, 2009) en comparación con otras especies como *O. vulgaris* (2.7 mm) y *O. mimus* (3 mm)

que tienen etapa de paralarva (Villanueva y Norman, 2008), lo cual es importante para considerar su producción (Boletzky y Villanueva, 2014).



**Figura 1.** Distribución de *O. bimaculoides* desde el Noroeste de Simeon, California hasta Guerrero Negro, Baja California (Tomado de Jereb *et al.*, 2014) (izquierda) y puntos de distribución tomada de gbif.org (derecha).

La distribución de *O. bimaculoides* coincide con la de *Octopus bimaculatus*, ambas especies poseen fisiología similar incluyendo el par de ocelos (manchas de ojos falsos), los cuales son pigmentaciones que se encuentran en los laterales de la cabeza y son utilizados por estos organismos para mimetizar a un animal más grande y protegerse de sus depredadores (Jereb *et al.*, 2014). A pesar de las similitudes, el patrón de coloración de los ocelos es distinto (Figura 2). El organismo adulto tiene los brazos laterales más largos, es decir, el tercer brazo más largo, después el segundo, cuarto y primer brazo de cada lado ( $3 > 2 > 4 > 1$ ) con dos líneas de ventosas, teniendo entre 140 y 190 ventosas por los ocho brazos (Jereb *et al.*, 2014).



**Figura 2. Ocelos de *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides*.** En *O. bimaculatus*, una mancha oscura con un anillo de color azul iridiscente semejante a una cadena rota con rayos saliendo del círculo azul (izquierda) y en *O. bimaculoides*, una mancha oscura y un anillo en forma de cadena de color azul iridiscente (derecha). Imágenes tomadas de Jereb *et al.* (2014).

La descendencia de cada hembra proviene por lo general de distintos padres y la puesta de huevos ocurre durante varios días, esto puede ser de gran utilidad para su manejo en estanques de laboratorio, ya que es posible controlar el momento de la eclosión de la puesta por medio de cambios de temperatura (Boletzky y Villanueva, 2014). La hembra desova y coloca sus huevos sobre un sustrato rocoso y durante el periodo de incubación los protege con sus brazos, los limpia de suciedad y favorece la ventilación entre los mismos utilizando chorros de agua (Boletzky y Villanueva, 2014). Directamente del huevo, eclosionan juveniles de hábitos bentónicos como un pulpo adulto (Forsythe y Hanlon, 1988); del mismo modo estos individuos están preparados tanto en su comportamiento como en su conformación anatómica para alimentarse de presas vivas como un organismo adulto (Forsythe y Hanlon, 1988; Uriarte *et al.*, 2011). Debido a que la especie es semelpara como otros cefalópodos, a los pocos días después de la eclosión de los juveniles la hembra muere (Sakurai *et al.*, 1996; Boletzky y Villanueva, 2014), lo que puede deberse a la falta de alimentación seguido de un proceso degenerativo que impide su supervivencia (Boletzky y Villanueva, 2014).

### **1.3.2 Lípidos y ácidos grasos**

Las proteínas son la fuente principal del metabolismo en especies carnívoras como los pulpos (O' Dor y Wells, 1987; Lee *et al.*, 1995; Villanueva *et al.*, 2004), sin embargo, los lípidos cumplen un papel importante como fuente de energía, reserva energética, formación de membranas celulares (fosfolípidos) y como precursores de otras moléculas (quilomicrones) (Webster y Lim, 2002).

Los ácidos grasos son la principal molécula que conforma a los lípidos, tienen dos clasificaciones: 1) el grado de saturación y 2) la longitud. Entre mayor es la cantidad de átomos de hidrógeno en esta molécula, el ácido graso tendrá mayor saturación, es decir, los átomos de carbono estarán ocupados en sus cuatro electrones. Cuando un ácido graso tiene uno o más pares de carbonos unidos por dos o tres enlaces, éste se llamará ácido graso insaturado, si tiene tres o más pares, se llamará ácido graso poliinsaturado, cuando contiene más de tres pares, se llamará ácido graso altamente insaturado (HUFA) (Webster y Lim, 2002). La longitud del ácido graso la determina el número de carbonos contenidos en la cadena, los más importantes para los peces y otros organismos marinos como los pulpos son aquellos de 16 y 22 carbonos (Webster y Lim, 2002).

Las proteínas y los ácidos grasos tienen cierta esencialidad, y las cantidades y proporciones difieren entre organismos, por ejemplo, algunos animales pueden sintetizar ácidos grasos tan esenciales para otros organismos como son el ácido docosahexanoico (DHA) y el ácido eicosapentanoico (EPA) a partir de otros ácidos grasos como linolénico y linoleico (Webster y Lim, 2002). Existen ácidos grasos que pueden ser sintetizados por la mayoría de las especies marinas, como los saturados 16:0 y 18:0, sin embargo, existen otros ácidos grasos que al igual que las vitaminas esenciales, no pueden ser sintetizados *de novo* y deben de estar presentes en la dieta; esto no es un problema cuando los organismos se encuentran en su hábitat natural, pero lo es cuando se desea alimentarlos adecuadamente en cautiverio (Sargent *et al.*, 2002).

En ciertos organismos como los pulpos, no pueden elongar y desaturar cadenas de otros ácidos grasos para la formación de los ácidos grasos esenciales, entre ellos los poliinsaturados y altamente insaturados, los cuales son necesarios para las membranas celulares y otras moléculas, esto debido a que carecen de las enzimas desaturasas  $\Delta^{12}$  y  $\Delta^{15}$  y otras enzimas (i.e.  $\Delta^6$ ,  $\Delta^5$  y  $\Delta^4$  desaturasas) (Sargent *et al.*, 2002). Por este motivo, en organismos en cultivo, se deben suministrar dietas que contengan la mejor proporción de ácidos grasos, prestando más atención a los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), los cuales se encuentran más que nada en especies que habitan en agua fría, por esta razón pueden funcionar como suministro de ácidos grasos esenciales para otras especies que los requieran (Webster y Lim, 2002).

Los HUFAs como el ácido docosahexanoico (DHA), eicosapentanoico (EPA) y araquidónico (ARA), han sido incorporados en la dieta de especies marinas, debido a su importancia en los estadios larvales y juveniles, ya que al ser incorporados directamente en sus membranas celulares favorecen su crecimiento (Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Seixas *et al.*, 2010). La calidad del alimento ha resultado ser el cuello de botella en el desarrollo de las primeras etapas del ciclo de vida de los cefalópodos, debido a que se han encontrado deficiencias en el contenido de ácidos grasos lo que trae como consecuencia una baja supervivencia y poco crecimiento (Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Seixas *et al.*, 2010). Por lo anterior, en la actualidad los esfuerzos se concentran en el estudio de cada uno de los elementos que conforman la dieta y en la cantidad de los mismos para cumplir con los requerimientos de este grupo de organismos (Solorzano *et al.*, 2009).

### 13.3 Avances en el cultivo de pulpo

Para la transición a la acuicultura, los estudios de Forsythe y Hanlon (1988), Sakurai *et al.* (1996), Noyola *et al.* (2013a, 2013b), entre otros, consideran a la temperatura como un factor ambiental controlador del desarrollo de especies como *O. bimaculoides*, *O. maya* y *T. pacificus*. Sin embargo, el conocimiento en diferentes disciplinas como la nutrición y la fisiología de los cefalópodos, podrá contribuir al desarrollo de los cultivos piloto experimentales que actualmente se realizan y que aún no proveen los mejores resultados (Navarro y Villanueva, 2003).

Las observaciones realizadas sobre *O. vulgaris*, han llamado la atención de diversos investigadores, de tal modo que han unido sus esfuerzos con la finalidad de plantear algunas recomendaciones, enfocadas en futuras líneas de investigación, tales como: reproducción, engorda, desarrollo, nutrición y calidad del agua, entre otras, cuyos resultados ayudarán al desarrollo de los cultivos de las especies de pulpo (Iglesias *et al.*, 2007).

Navarro y Villanueva (2003), estudiaron el crecimiento de *O. vulgaris* utilizando *Artemia* y microdietas encapsuladas; Seixas *et al.* (2010), utilizaron *Artemia* enriquecida, microalgas y una dieta inerte con alto valor proteico; en ambos estudios se concluye que el bajo crecimiento se debe al desbalance en el contenido de los ácidos grasos EPA y DHA. Okumura *et al.* (2005), alimentaron a las paralarvas de esta especie con *Artemia* en distintas etapas de desarrollo y con el pescado *Ammodytes personatus*, sus observaciones demostraron la aceptación de este pescado como alimento por el comportamiento de caza al suministrarlo congelado en forma de hojuelas. Los autores mencionan que considerando la baja aportación de la *Artemia*, la inclusión del pescado mejoró el crecimiento de las paralarvas desde el día de la eclosión hasta el día 32, debido a que éste tenía una relación similar de DHA:EPA ( $\approx 1.5$ ) a aquella presente en los organismos recién eclosionados (Okumura *et al.*, 2005) y en los juveniles silvestres estudiados por Navarro y Villanueva (2003). Prato *et al.* (2010), observaron durante 30 días el efecto de cinco dietas (conformadas por cangrejos, pescados y mejillón) sobre el crecimiento, composición de lípidos y ácidos grasos en juveniles de *O. vulgaris*. Los autores realizaron una comparación de la composición proximal entre organismos cultivados y organismos silvestres; sus resultados demostraron un mejor crecimiento conforme se incrementó el DHA y EPA en la dieta suministrada, además encontraron una proporción de DHA:EPA mayor a 1 para organismos silvestres y cultivados.

Mangold y Boletzky (1973), Berger (2010) y otros autores mencionados por Iglesias *et al.* (2007), aluden a las características que diferencian a *O. vulgaris* de otros cefalópodos y que lo hacen propicio para su uso en la acuicultura, particularidades que también se han observado en especies de distribución nacional como *O. maya* y *O. bimaculoides*. Entre estas características se encuentran la adaptabilidad al cautiverio, uso mínimo de la columna de agua para nadar, la posibilidad de acelerar o retrasar el desarrollo de los embriones en función del incremento o disminución de la temperatura, y sus tasas de crecimiento hasta de 4.1% para *O. vulgaris*, 8% para *O. maya* y 7% para *O. bimaculoides*. Asimismo, se ha documentado una tasa de conversión alimenticia de hasta 50% en *O. vulgaris*, 45% en *O. maya* y 50% para *O. bimaculoides* (Van Heukelem, 1976; Forsythe y Hanlon, 1988; Iglesias *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007; Solorzano *et al.*, 2009; Uriarte *et al.*, 2011).

Existen especies que pueden ser buenos candidatos para la acuicultura, como la especie con distribución chilena y peruana *Octopus mimus*. Zuñiga *et al.* (2011), evaluaron la respuesta de esta especie a tres dietas trituradas y aglutinadas con grenetina en forma de embutido; el grupo control, el cuál consistía sólo en almeja congelada (*Protothaca thaca*), dieta regularmente utilizada en la engorda de esta especie, en las otras dos dietas también se utilizó almeja congelada, a la primera de estas dietas se le adicionó pescado (*Cheilodactylus variegatus*) y a la segunda pescado y pellet de salmón. La mayor mortalidad (33%) se obtuvo en los organismos alimentados con la dieta que contenía los pellets de salmón, la cual tuvo menor aceptación por los animales y provocó una tasa de crecimiento negativa de  $-1.70 \pm 0.37 \text{ gd}^{-1}$ , por otro lado, los organismo a los que se les proporcionó la dieta con almeja y pescado no presentaron mortalidad mientras que la dieta control presentó un 16.7% de mortalidad, además, su tasa de crecimiento fue similar ( $7.0 \pm 0.39 \text{ gd}^{-1}$ ) a la dieta control ( $6.66 \pm 1.10 \text{ gd}^{-1}$ ). No obstante, el cultivo de *Octopus mimus* sólo existe a nivel experimental, con la utilización de juveniles silvestres (Uriarte *et al.*, 2011).

Existe una diferencia importante entre *O. vulgaris* con *O. bimaculoides* (pulpo de dos manchas) y *O. maya* (pulpo mexicano), y esta radica en su ciclo de desarrollo; los organismos recién eclosionados de *O. vulgaris* (paralarva), son de hábitos planctónicos y su morfología presenta desproporción de brazos y manto hasta que se desarrollan en un pulpo juvenil de hábitos bentónicos que comienza a alimentarse del mismo modo que un individuo adulto. Por otro lado, el pulpo de dos manchas, el pulpo mexicano y el pulpo pálido (*Octopus pallidus*), los organismos recién eclosionados son pulpos juveniles, a esto se le llama desarrollo directo (Hanlon y Forsythe, 1985; Uriarte *et al.*, 2011).

Noyola *et al.* (2013b), documentaron la tolerancia de *O. maya* a temperaturas de 18, 22, 26 y 30 °C, un mayor crecimiento en 18 y 22 °C con 58% y 84% de supervivencia respectivamente. En 26 °C obtuvieron el

100% de supervivencia y 98% con la temperatura de 30 °C, en esta última, la tasa de crecimiento se redujo un 56%, la ingesta aumentó, así como el consumo de oxígeno (3.26 veces más en comparación con las temperaturas de 18 y 22 °C) y la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados n-6 estuvieron en menor cantidad que en 18 y 22 °C. Los autores mencionan que las temperaturas de 18 °C y 22 °C favorecieron que los organismos utilizaran la energía en la producción de biomasa, probablemente debido a la disminución del metabolismo basal y baja actividad causadas por estas temperaturas, así como a la utilización eficiente de los nutrientes gracias a un proceso digestivo más prolongado, mientras que en los juveniles cultivados a una temperatura de 30 °C, el metabolismo basal y la actividad aumentaron, con mínima producción de biomasa, demostrando que las condiciones térmicas del medio influyen directamente sobre los mecanismos adaptativos de esta especie (Noyola *et al.*, 2013b).

Por ser el pulpo más explotado en México y debido a su desarrollo directo, *O. maya* ha sido considerado por algunos investigadores para llevar a cabo su mantenimiento en cultivos de laboratorio y evaluar su desempeño bajo estas condiciones. Exitosamente se ha obtenido una buena adaptabilidad hasta cuatro generaciones, una buena tasa de crecimiento (Rosas *et al.*, 2007; 1976; Briceño *et al.*, 2010) y una alta supervivencia de los juveniles recién eclosionados (Domingues *et al.*, 2007). Los primeros ensayos con *O. maya* empezaron en el año 2004 (Rosas *et al.*, 2014) y a partir del año 2007 se pudieron obtener juveniles entre 40 y 100 g durante los 120 y 150 días de cultivo, alimentados con una dieta de pellets de camarón y pasta de calamar (Rosas *et al.*, 2007).

Rosas *et al.* (2011; 2013), han demostrado que las dietas con las que han obtenido los mejores resultados en crecimiento, son aquellas que son frescas o liofilizadas, con base en estos resultados concluyen que el requerimiento proteico de *O. maya* se encuentra entre 80 y 86%, el cual favorece la digestión y por lo tanto el crecimiento. El cangrejo ha resultado ser el mejor alimento para esta especie, se ha suministrado en pasta, solo y mezclado con calamar, ambas dietas proporcionan el porcentaje de proteína adecuado y una proporción proteína:energía de 38.9 (Rosas *et al.*, 2013); con una dieta de calamar y cangrejo (1:1) se logró una tasa de crecimiento específico de 3.04% $d^{-1}$  y 100% de supervivencia en 55 días de cultivo (Martínez *et al.*, 2014).

Quintana *et al.* (2011), cultivaron individualmente y en grupo juveniles de *O. maya* de 7 – 10 días después de la eclosión, los cuales alimentaron con dos proporciones de pasta de cangrejo aglutinada con grenetina (10% y 30% de su peso), y otro grupo de pulpos alimentados *ad libitum* con pasta de cangrejo sin aglutinar; en el caso de los organismos cultivados en grupo, también se consideró evaluar el canibalismo. Los autores mencionan que en los resultados de crecimiento no hubo diferencias entre las dietas en aislamiento y en

grupo; en cuanto a la supervivencia, en el cultivo con organismos aislados no hubo mortalidad y en los cultivos en grupo, no se encontraron diferencias estadísticas; los pulpos alimentados con 30% de su peso lograron un 20% de supervivencia al día 31 de cultivo, en los organismos alimentados *ad libitum* y con 10% de alimento, la supervivencia fue 12% y 10%, respectivamente.

Entre otras especies con desarrollo directo, como *O. pallidus*, se ha estimado la madurez de hembras y machos adultos capturados del medio natural para conocer la relación entre el desarrollo reproductivo y la edad de los individuos; estos resultados indicaron que los factores que rigen la madurez son el tamaño del organismo, la temperatura y la dieta (Leporati *et al.*, 2008).

André *et al.* (2008), expusieron a los juveniles de esta misma especie al incremento y disminución de la temperatura, después de aclimatarlos durante 24 h, los dividieron en dos grupos (16 °C a 18 °C y 16 °C a 14 °C) cambiando 1 °C cada 18 días en ambos casos (36 días en total). Los juveniles comenzaron a alimentarse justo después de su eclosión y obtuvieron tasas de conversión alimenticia desde 0 hasta 23.9% por día en las temperaturas bajas y hasta 70.4% por día entre 16° y 18 °C. El crecimiento fue exponencial en ambos grupos, con medias de 1.67% por día para el incremento térmico y 1.38% por día para el descenso térmico. En este experimento los autores observaron una evidente variabilidad entre individuos, es por esto que es posible que existan otros efectos o relaciones que no quedaron claras en su estudio; también observaron que el efecto de la temperatura no se correlacionó con la tasa de alimentación, la tasa de crecimiento o la tasa de conversión alimenticia. Además, concluyen que existe una relación compleja entre todas estas variables donde la tasa de conversión alimenticia se correlacionó negativamente con la tasa de alimentación y positivamente con la tasa de crecimiento, lo cual contribuye al conocimiento de que los pulpos crecen con gran eficiencia aún durante cortos periodos con poco o nada de alimento. Algunos autores mencionan que es necesario considerar la variabilidad en cada organismo e interpretar los efectos de los elementos artificiales utilizados durante los cultivos para poder comprender la complejidad del comportamiento de los pulpos (André *et al.*, 2008; Boletzky y Villanueva, 2014).

La producción actual de la acuicultura de comercio está remitida a la engorda de *O. vulgaris* mediante jaulas ubicadas en la zona costera principalmente en España (García-García *et al.*, 2014), mientras que la producción de *O. maya*, hasta hoy, se mantiene en un cultivo piloto que se lleva a cabo en Yucatán en el instituto de SISAL, UNAM (Rosas *et al.*, 2014). En un estudio realizado por Hanlon y Forsythe (1985) donde mantuvieron en cautiverio a cinco especies de pulpo, *O. bimaculoides* mostró gran adaptabilidad aún en grandes densidades con poco canibalismo, resultando en el mejor candidato para el cultivo en comparación con *O. maya*, *Octopus briareus*, *Octopus joubini* y *Octopus digueti*.

Entre los pocos resultados que se han obtenido con *O. bimaculoides* se encuentran: su tolerancia a temperaturas de 18 y 23 °C, el crecimiento de juveniles con un peso de 0.07 g hasta alcanzar los 800 g en algunos individuos, los cuales fueron mantenidos en tanques circulares de 2,000 L, a temperaturas de 18 °C y 23 °C, sin embargo, las medias de los tratamientos estuvieron entre 597 y 619 g (Forsythe y Hanlon, 1988), lo cual indica un peso reducido en comparación a los 800 gramos que alcanzan en el medio natural (Solorzano *et al.*, 2009; Uriarte *et al.*, 2011).

En los estudios de Solorzano *et al.* (2009) con *O. bimaculoides*, se obtuvo una tasa de crecimiento entre 0.74 y 0.88 mg por día, en organismos alimentados con *Artemia salina* y cultivados a  $21 \pm 2$  °C. Los autores obtuvieron bajo estas condiciones un crecimiento exponencial (224% en 20 días) con *Artemia* enriquecida y un 100% de supervivencia con *Artemia* no enriquecida. Lecuanda-Ontiveros (2014), utilizó el método gravitacional para encontrar la temperatura preferencial de juveniles recién eclosionados y adultos de *O. bimaculoides*, con un fotoperiodo luz:oscuridad 12:12; sus resultados demostraron que el preferendum térmico fue de 16 °C en dos estadios del ciclo de vida (juveniles recién eclosionados y adultos) con intervalos de 17.2 a 18.3 °C durante el día y de 14.7 a 16.7 °C en la noche.

A pesar de estos logros, aún no se ha conseguido cultivar a esta especie a escala comercial debido a que hace falta ampliar el conocimiento relacionado con el contenido de ácidos grasos en la dieta, además de encontrar un alimento que cubra sus requerimientos nutricionales (Solorzano *et al.*, 2009) para que favorezca el desarrollo, el crecimiento y la supervivencia, aunado al desarrollo de la tecnología de cultivo que permita, en un futuro, su comercialización.

## 1.4 Justificación

Los pulpos tienen un alto valor comercial, hasta el día de hoy, la mayor producción de estos organismos solamente es por captura y el cultivo aún no se ha podido incentivar a tal grado de proveer la demanda mundial (FAO, 2014; Pierce y Portela, 2014). En conjunto con los estudios actuales dirigidos a las especies *O. maya* y *O. vulgaris*, es necesario incorporar otras especies con potencial para ampliar el conocimiento sobre la alimentación y desarrollo de los pulpos como es el caso de *O. bimaculoides*, éste no representa un mercado o captura anual establecidos; esta información podría abrir la posibilidad de producir esta especie por medio del cultivo.

En el Laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, desde hace varios años ha estado trabajando con *O. bimaculoides* y se ha logrado mantener desoves en cautiverio y el control del proceso de incubación de los huevos hasta su eclosión (Hernández com. pers.). El poder formular una dieta que satisfaga los requerimientos de *O. bimaculoides*, conllevaría al desarrollo de su cultivo, como hasta hoy se hace con *O. maya*.

La adaptabilidad de *O. bimaculoides* al cautiverio es evidente en: (1) la capacidad de soportar cambios de temperatura, (2) el crecimiento en cautiverio es similar con respecto a aquel que presenta en el medio natural, con alta tasa de crecimiento, capaz de duplicarlo, incluso con dietas deficientes en aminoácidos esenciales, (3) su tamaño pequeño y fácil manejo en cautiverio y (4) su ciclo directo a juveniles que inmediatamente pueden alimentarse (búsqueda de alimento entre 10 a 12 h después de la eclosión) (Solorzano *et al.*, 2009).

El aprovechamiento de estas características antes mencionadas, pueden ser útiles para la producción de la especie, sin embargo, las investigaciones previas relacionadas con el efecto de la dieta sobre el desempeño de *O. bimaculoides* son escasas, por ello es necesario ampliar el conocimiento en el tema de la nutrición para conocer como inciden en el crecimiento, la supervivencia y el perfil de ácidos grasos; dicha información contribuirá al futuro desarrollo del cultivo experimental de los juveniles de pulpo de esta especie, la cual es considerada con potencial acuícola.

## **1.5 Hipótesis**

El crecimiento y la supervivencia de los juveniles de *Octopus bimaculoides* será mayor con la dieta mixta (jaiba – mejillón – aceite de ojo de atún) por mantener un alto contenido de ácidos grasos altamente insaturados similar al que poseen los organismos al momento de la eclosión.

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Objetivo General**

Evaluar el crecimiento, la supervivencia y los ácidos grasos altamente insaturados en los juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con dietas naturales a base de crustáceos, moluscos y aceite de ojo de atún.

### 1.6.2 Objetivos específicos

- Evaluar el contenido de los ácidos grasos araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico de los juveniles de pulpos recién eclosionados y de los alimentados con cada una de las dietas.
- Comparar el perfil de ácidos grasos de las dietas (crustáceos – moluscos y crustáceos - moluscos - aceite de ojo de atún) proporcionadas a los pulpos.
- Evaluar el crecimiento de los juveniles con base en el peso y número de ventosas.
- Evaluar la supervivencia de los juveniles de pulpo alimentados con las diferentes dietas.
- Estimar el tiempo de aparición de los ocelos como un indicador del desarrollo de los juveniles de pulpo.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Recolección de hembras grávidas

La recolección de hembras ovígeras se llevó a cabo durante la primera temporada reproductiva (febrero – abril, CONAPESCA, 2008a); cinco hembras fueron recolectadas en Bahía Falsa, San Quintín localizada entre 30°27'11.94"N y 116° 0'24.36"O y otra hembra fue recolectada en playa Punta Morro, localizada en 31°51'42.49"N y 116°40'8.01"W, en Ensenada, Baja California. Para la recolección, se realizó un recorrido sobre la costa de la bahía durante marea baja buscando en las rocas expuestas la presencia de pulpos hembra. Para la revisión de las rocas se tomaron en cuenta las siguientes características: 1) limpieza de las conchas incrustadas, 2) presencia de un orificio entre la roca y el sustrato, y 3) observación de un flujo de agua ascendente producido por el pulpo a través del sifón (Rosales com. pers. 2015).

Posteriormente con la ayuda de una botella de plástico se procedió a inyectar hacia las cavidades de la roca varios chorros de agua de mar mezclada con sal de grano, esto con el propósito de que el pulpo saliera de su refugio, capturarlo y observarlo para descartar que fuese un macho, identificándolos por poseer ventosas más grandes alrededor de la boca y el tercer brazo derecho modificado en una estructura llamada hectocótilo (Stoskopf y Oppenheim, 1996); si el organismo era hembra se colocaba en una cubeta con agua de mar.

Para el transporte de las hembras, se colocaron individualmente en un refugio que consiste en un tubo negro de ABS de 6 pulgadas de diámetro dentro de un saco hecho de malla sardinera color negro amarrada fuertemente con una piola de nylon. Todos los refugios con hembras se colocaron en dos bolsas de plástico con agua de la bahía, las cuales posteriormente se llenaron con oxígeno a saturación y colocadas dentro de una hielera de 100 litros para su traslado al Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.

### 2.2 Mantenimiento de las hembras

Los tanques de 500 L donde se colocaron las hembras forman parte de un sistema de recirculación de agua de mar diseñado para mantener a los reproductores de pulpo (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2015). Este sistema consta de 14 unidades distribuidas en dos hileras las cuales están acopladas independientemente

a un biofiltro que, a su vez, está conectado a una bomba de calor marca AquaLogics Systems de 1HP para mantener la temperatura deseada. La operación de este sistema se realiza con elevadores de aire (air-lift) que se encargan de distribuir el agua a cada tanque de cultivo. Además, en la parte central interna de cada tanque se encuentra un tubo que mantiene el nivel del agua constante y por medio del cual se drena hasta un tubo de desagüe común que conduce el agua hacia los biofiltros.

Las hembras grávidas se mantuvieron individualmente dentro de un tanque al cual se le colocó una olla de barro que fungía como refugio. La temperatura del sistema osciló entre 18 y 21 °C durante el mantenimiento e incubación de los huevos, según la variación térmica del ambiente. La incubación de las puestas se mantuvo en estas condiciones hasta el día de eclosión de los juveniles. Es importante mencionar que la temperatura media durante el muestreo fue de  $19.8 \pm 0.15$  °C.

Antes del periodo de desove, a las hembras se les proporcionó diariamente como alimento de 2 a 4 mejillones frescos (*Mytilus galloprovincialis*). Los mejillones fueron proporcionados por la empresa Aqualap y transportados en una cubeta hasta un tanque de 400 L dentro del laboratorio húmedo de ecofisiología y fueron alimentados diariamente con un concentrado de microalgas Instant Algae *Isochrysis* 1800 (Reed Mariculture Inc., EUA). El tanque se adaptó a un flujo abierto de 552 ml/min con agua de mar, enviando el agua de desagüe a través de la canaleta hacia el agua residual del Departamento de Acuicultura. El fondo del tanque fue limpiado mediante sifoneo una vez por semana.

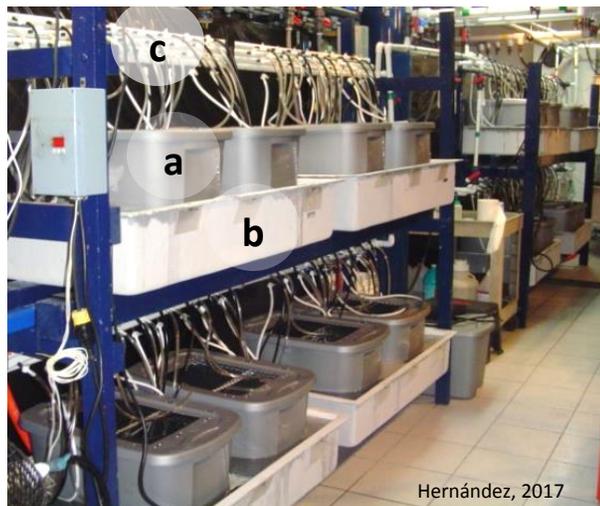
### **2.3 Diseño experimental y calidad del agua**

Se utilizaron 12 tanques de 56 L, a los cuales se les asignó un tratamiento con un diseño completamente aleatorizado, utilizando cuatro tanques para cada una de las dietas (tres dietas con cuatro replicas por tratamiento). El sistema de cultivo utilizado en el presente estudio, se encuentra en el laboratorio húmedo de ecofisiología y está compuesto por dos estantes con dos niveles (inferior y superior) y ocho tanques de 56 L en cada estante (Figura 3). El agua de recambio salía a través de dos orificios en la parte superior de cada tanque cayendo sobre una tina, para posteriormente ser transferida, por el tubo de desagüe, hacia el sistema de circulación cerrada del Departamento de Acuicultura del CICESE.

En cada tanque fueron colocados 12 tubos ABS de 4 pulgadas, con una longitud de 11 cm y dos ventanas de 1.5 pulgadas de diámetro abiertas en lados opuestos de la pared del tubo, ambos orificios y la base

fueron cubiertos por una malla de 650  $\mu\text{m}$  de luz con el propósito de favorecer la circulación del agua y al mismo tiempo evitar que los organismos escaparan. Cada tubo fue etiquetado con un número del 1 al 12. Dentro del tubo se colocó una valva de mejillón limpia a manera de refugio para cada organismo.

Durante el cultivo, diariamente se registró: la concentración de oxígeno y la temperatura con un multiparámetro YSI Pro 2030 (Yellow Springs Instruments Co., Professional Plus), el pH cada tercer día con un potenciómetro HANNA checker y, semanalmente se evaluó la concentración de nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal total (NAT) con los kits de reactivos PermaChem Reagents<sup>®</sup> de Hach: método de Silicilato (Silicilato y Cianurato) para amoniacado, método de diazotación (NitriVer<sup>®</sup>) para nitritos y método de reducción de Cadmio (NitraVer<sup>®</sup>) para nitratos, leídos en el colorímetro Hach<sup>®</sup> DR/890. La supervivencia fue registrada diariamente.



**Figura 3. Sistema utilizado para el cultivo de juveniles de *O. bimaculoides*.** a) tanques de 56L, b) tanques para el desagüe, c) líneas de agua proveniente del sistema cerrado y líneas de aire.

## 2.4 Elaboración de las dietas

Las dietas fueron elaboradas a partir de diferentes concentraciones de jaiba (*Callinectes sapidus*) congelada, mejillón y aceite de ojo de atún Omegamex<sup>®</sup>. Dieta 1: carne de jaiba (60%) + gónada y manto de mejillón (36%), dieta 2: carne de jaiba (80%) + gónada y manto de mejillón (16%) y dieta 3: carne de jaiba (80%) + gónada y manto de mejillón (11%) + aceite de ojo de atún (5%). El 4% restante en cada dieta estuvo constituido por grenetina, utilizada como aglutinante (Tabla 1).

**Tabla 1. Formulación de las dietas por porcentaje de cada ingrediente.**

Dieta	Jaiba	Mejillón	Omegamex	Grenetina
1	60%	36%	0%	4%
2	80%	16%	0%	4%
3	80%	11%	5%	4%

Se optó por la jaiba y el mejillón ya que son presas que los pulpos consumen en el medio natural y por su precio en el mercado, resulta una dieta económicamente accesible, con un precio alrededor de los 90 pesos por kg, y sólo se requiere un mínimo de 30% del peso del organismo por día (se utilizaron entre 127 y 147 g de alimento en un periodo de 42 días). Además, la jaiba dentro de su contenido de ácidos grasos posee un porcentaje considerable de ácidos poliinsaturados como ácido araquidónico (5.02-7.48%), eicosapentaenoico (7.78-10.6%) y docosahexanoico (5.92-8.41%), aunado a un buen porcentaje de proteínas (alrededor del 19%), por la carne de las tenazas y tórax (Çelik *et al.*, 2004), razón por la cual favorece una mejor digestión del alimento (Rosas *et al.*, 2011). El mejillón fue seleccionado por ser un bivalvo de distribución común con *O. bimaculoides* y porque juveniles de esta especie se han encontrado en los cultivos de mejillón (Buzos de Aqualap com. pers.), además, es un alimento bien aceptado para adultos y juveniles bajo condiciones de cautiverio. El aceite de ojo de atún fue incluido por su calidad en el perfil de ácidos grasos, pretendiendo aumentar la cantidad de estos en la dieta. Estas dietas fueron previamente probadas con organismos adultos, los cuales aceptaron perfectamente la pasta suministrada sobre conchas de mejillón.

Los porcentajes de los ingredientes en cada dieta se eligieron con base en los resultados encontrados en otras especies, como *O. maya*, la cual requiere una mayor cantidad de proteína y ha tenido buen crecimiento con pasta de cangrejo (Quintana *et al.*, 2011, Rosas *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2014) y con *O. mimus*, al ser alimentados con una pasta compuesta de una mezcla de almeja (*Protothaca thaca*) y pescado (*Cheilodactylus variegatus*) (Uriarte *et al.*, 2011).

Previamente se realizaron pruebas de estabilidad en las dietas evaluando dos porcentajes de grenetina, 7% y 4%, los cuales se eligieron por entrar en el intervalo de aceptación como aglutinante de dietas para especies marinas y por favorecer el crecimiento con una buena supervivencia (Rosas *et al.* 2008; Quintana *et al.*, 2011). Las pruebas consistieron en colocar el alimento sobre los trozos de concha y dentro de los

tubos en los mismos tanques donde se colocarían a los pulpos, con flujo de agua y aireación, después de 24 horas se revisaron, considerando que el alimento sería reemplazado al día siguiente.

Ambos porcentajes de grenetina adicionados en las dietas, tuvieron una estabilidad mínima de 24 horas, suficiente para asegurar que los organismos se alimentaran de un día a otro, hasta que el alimento fuera sustituido. Al finalizar el ensayo de estabilidad de la dieta, se seleccionó la inclusión del 4% de grenetina por su estabilidad a las 24 h.

Para asegurar que la calidad de la dieta fuera la misma, se compró en el mercado un lote de jaibas y los mejillones se obtuvieron de una sola extracción en la temporada de cultivo. Los ingredientes fueron triturados individualmente y mezclados mediante una batidora manual marca Oster, posteriormente, cada dieta fue racionalizada a las cantidades equivalentes que se utilizaron por semana; después todo el alimento fue almacenado a  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador Revco ExF marca Thermo Scientific®.

## **2.5 Obtención y cultivo de juveniles**

La incubación duró 84 días a una temperatura media de  $18.68 \pm 0.20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; el desove de los huevos es asincrónico al igual que la fecundación de los óvulos (Boletzky y Villanueva, 2014) y, por este motivo, la eclosión de los organismos tuvo el mismo comportamiento. En el experimento se utilizaron un total de 144 juveniles recién eclosionados de la puesta de una de las hembras. Durante este periodo, diariamente se recolectaron los organismos, los cuales fueron pesados y colocados al azar e individualmente dentro de cada tubo flotante hasta completar 12 pulpos por tanque.

Los juveniles recién eclosionados se ubicaron en los 12 tanques de 56 L, con un sistema en flujo abierto y agua de mar del sistema cerrado del Departamento de Acuicultura de CICESE, se utilizó u recambio de 6 ml/s, es decir, nueve veces al día para mantener la temperatura del agua entre 18 y 20  $^{\circ}\text{C}$  ( $19.04 \pm 0.04\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Se eligió esta temperatura en función de la registrada en el medio natural (18-21  $^{\circ}\text{C}$ ) y con base en las temperaturas de preferencia térmica de la especie (18  $^{\circ}\text{C}$ ) (Forsythe y Hanlon, 1988). Cuando fue necesario, el flujo fue reajustado en función del cambio en la temperatura del laboratorio.

El cultivo de cada organismo se inició conforme al día de su eclosión (día cero), de tal modo que cada juvenil fuese alimentado durante el mismo periodo de tiempo de 28 o 42 días. El alimento fue

proporcionado diariamente entre la 13:00 y 16:00 h, en un porcentaje entre 30% y 50% del peso de los organismos, de acuerdo a Quintana *et al.* (2011) y fue modificado proporcionalmente al peso de los juveniles a través de las semanas.

Cada tres días se tomaba alimento ultracongelado, se colocaba en una jeringa eppendorf® de 12.5 ml y el sobrante se conservó nuevamente en congelación (-80 °C) para mantener su calidad. La pasta descongelada se colocó sobre las piezas de concha de mejillón con una jeringa de tal manera que quedara pegado y que estuviera en el fondo del tubo y accesible para cada organismo.

La limpieza del tanque se realizó por sifoneo cada semana, para retirar la materia orgánica que se acumulaba en el fondo. Por otro lado, la limpieza de los tubos fue realizada semanalmente, mientras los pulpos permanecían en un vaso de precipitado para ser pesados; los tubos fueron lavados con agua dulce hasta retirar todos los restos de alimento y cualquier partícula de desecho.

## **2.6 Crecimiento en peso y supervivencia de los juveniles**

Debido a que los organismos tenían diferentes tiempos de eclosión, cada individuo fue etiquetado en el tubo donde se le colocó, pesado el mismo día de su eclosión y, cada siete días de manera consecutiva, hasta finalizar los días de cultivo. Para obtener el peso de los organismos, se extraían los pulpos de los tubos y se colocaban en vasos de precipitado (con agua del mismo tanque de cultivo), para ser transportados al laboratorio analítico, posteriormente se colocaban sobre un papel secante para quitar el excedente de agua. Cada pulpo juvenil era colocado sobre una navecilla en una balanza analítica A&D y consecutivamente se volvía a colocar en su tubo y tanque correspondiente.

El peso fue tomado semanalmente durante 42 días después de la eclosión (dde) y la supervivencia fue registrada diariamente. Para realizar el análisis de ácidos grasos, así como para el conteo de las ventosas, fue necesario realizar el primer muestreo de los organismos el día 28 de cultivo, en cada una de las dietas, ya que para este día algunos pulpos alimentados con la Dieta 1 tenían una apariencia desfavorable, como oscurecimiento del cuerpo y con poca reacción al estímulo, y otros ya estaban muertos.

Por la razón mencionada anteriormente, el análisis estadístico de las diferencias en crecimiento entre el día 0 y el día 28 fue realizado con el 100% de los organismos, mientras que para la continuación del cultivo

y los consecutivos pesos semanales, se consideró a partir del día 28 hasta el día 42 de cultivo, por lo que la muestra estuvo representada solamente por el 40% de los organismos restantes dentro de los cuales se encontraban 16 organismos provenientes de la dieta 1, 21 pulpos de la dieta 2 y 22 organismos de la dieta 3. Debido a lo anterior, las diferencias en crecimiento semanal dentro de cada una de las dietas a partir del día 28 hasta el día 42 dde fueron comparadas solamente con este porcentaje de la muestra, es decir, con un total de 59 organismos sobrevivientes al muestreo del día 28 dde.

## **2.7 conteo de ventosas**

El número de ventosas se cuantificó en 18 organismos recién eclosionados de una puesta que había sido incubada a 20 °C y en 10 organismos de cada una de las dietas a los 28 días de cultivo, es decir, 30 organismos en total.

Cada organismo fue puesto sobre una caja Petri con un poco de agua de mar y en ella se colocó una gota de disolución de aceite de clavo en agua de mar (0.025 ml por litro) para anestesiarlo y después gradualmente se le añadió solución fijadora para larvas y huevos (formol, fosfato disódico y fosfato monosódico). Cada uno de los brazos del pulpo fue estirado antes de fijarlo para facilitar el posterior conteo de las ventosas. Una vez que el organismo murió, fue fijado individualmente en un tubo eppendorf con la misma solución fijadora y puesto en refrigeración. Antes de contar las ventosas, la cabeza de cada individuo fue retirada para facilitar la observación. Las ventosas fueron contadas en cada uno de los brazos utilizando un estereomicroscopio (ZEISS Discovery V8), posteriormente se obtuvo un promedio por brazo para cada organismo.

## **2.8 Aparición de los ocelos**

La aparición de los ocelos también fue considerada para evaluar el desarrollo de los organismos, ésta fue valorada conjuntamente con el peso, procurando estimular a cada organismo a que cambiara de coloración colocando la mano sobre el vaso de precipitado, de esta manera era más sencillo registrar la primera vez en que se observaron los ocelos y documentar el momento de su aparición. Se consideró como presencia de ocelos cuando se observó al menos una mancha circular de color café a los laterales de la cabeza. Esto fue registrado como un porcentaje semanal de organismos con presencia de ocelos a partir

de la primera observación y hasta el día en que el 100% de los organismos había desarrollado esta característica.

## 2.9 Extracción de ácidos grasos de juveniles y dietas

Para obtener el perfil de ácidos grasos de los juveniles, alimentados con las diferentes dietas, se recolectaron al azar 16 organismos de cada una de las dietas al día 28 de cultivo y 16 organismos al día 42 de cultivo, de estos organismos sólo se utilizaron 9 de cada dieta. Además, para obtener el perfil de los juveniles recién eclosionados, se analizaron nueve juveniles de pulpo de una puesta diferente, la cual permaneció en incubación por 78 días a una temperatura promedio similar a la que se incubaron los huevos de la primera puesta ( $18.63 \pm 0.18$  °C).

Las muestras de las dietas (tres repeticiones por muestra) y cada uno de los organismos muestreados fueron colocados en viales de peso conocido con capacidad de 2.5 ml para ser pesados. Los individuos fueron sacrificados en frío (-20 °C) y posteriormente a cada muestra se le adicionó BHT (butilhidroxitolueno) como antioxidante, 1  $\mu$ l por 10 mg de peso seco (Suárez-Salcido, 2016), es decir, entre 1  $\mu$ l y 2  $\mu$ l dependiendo del peso húmedo del organismo, mientras que a las dietas se les colocó alrededor de 22  $\mu$ l de BHT. Los viales con la muestra fueron tapados y colocados en el ultracongelador (-85 °C) hasta el día en que fueron liofilizados en un liofilizador marca FreeZone 4.5 de Labconco.

Previo a liofilizar las muestras, cada vial fue destapado y se le colocó un trozo de papel de parafina como tapadera al cual se le hicieron varios orificios con una aguja delgada para favorecer la salida de humedad. Las muestras fueron liofilizadas por 24 horas, posteriormente fueron pesadas y colocadas en un tubo de ensaye con rosca para inmediatamente proceder a la extracción de los ácidos grasos por derivatización directa por el método de Sato y Murata (1988), por medio de hidrólisis ácida con 3 ml de una solución HCl:CH<sub>3</sub>OH (5:95 v/v). Cada tubo de ensaye se colocó por 2.5 horas dentro de un baño maría a 85 °C, tiempo dentro del cual se tenía la precaución de no perder volumen agregando más solución HCl:CH<sub>3</sub>OH en caso de haber evaporación.

Posteriormente, las muestras cubiertas con papel aluminio se dejaron enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad, dentro de una campana de extracción. Una vez a temperatura ambiente, se agregó a cada tubo de ensaye 1 ml de hexano para extraer los ácidos grasos metil esterificados, después fue mezclado

en un agitador tipo vórtex por 12 segundos y se retiró el sobrenadante hasta tomar por completo la capa superficial. Este proceso se realizó dos veces y todo el sobrenadante fue colocado en un tubo de ensayo limpio. Las muestras (sobrenadante de hexano) fueron evaporadas por medio de un desecador Visidry™ Supelco utilizando gas nitrógeno, después cada muestra fue resuspendida en 250 µl de hexano y trasladada a un vial color ámbar, de 1.5 ml de capacidad, con una jeringa de vidrio de 250 µl. Enseguida las muestras fueron evaporadas manualmente con nitrógeno gaseoso, con ayuda de una pipeta Pasteur conectada directamente a la manguera del tanque de gas. Antes de taponar la muestra, se les inyectó una capa de gas nitrógeno y luego se cubrió con tapón de rosca perforable. Todas las muestras fueron almacenadas en congelación a una temperatura de -20 °C hasta el momento del análisis en un cromatógrafo de gases.

Para la identificación de los ácidos grasos, se utilizó un estándar comercial con una mezcla de 37 ácidos grasos metil esterificados (Supelco 47885-U), en diferentes concentraciones, con las que se realizó una curva de calibración y se obtuvieron los tiempos de retención de cada uno de los picos de los ácidos grasos.

## **2.10 Perfil de ácidos grasos en dietas**

El perfil de ácidos grasos de las dietas fue realizado en la UNAM con la técnica antes mencionada y también fueron identificados en un cromatógrafo de gases, espectrómetro de masas (GCD1800B), en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur. Se inyectó 1 µl de muestra resuspendida en hexano grado HPLC y para el transporte de la muestra se utilizó Helio alta pureza a través de la columna de sílica (Omegawax, 30 m longitud, 0.25 mm diámetro, 0.25 µm de espesor). Para la identificación de los ácidos grasos, se realizaron tres curvas de calibración por medio de 15 diluciones entre 3.42 µg/mL y 266 µg/mL, con la mezcla de 37 ácidos grasos metil esterificados, posteriormente se obtuvo un factor de corrección para cada uno de los ácidos grasos contenidos en esta mezcla.

El cromatograma del estándar fue comparado con el cromatograma de cada muestra mediante el programa Wsearch32 para localizar los tiempos de retención de cada uno de los picos e identificando iones característicos contenidos en cada ácido graso (DHA, EPA y ARA) e integrando los valores de cada pico, posteriormente estos valores fueron interpolados en la curva de calibración por medio del factor de

corrección de cada uno de los tres ácidos obteniendo un valor en  $\mu\text{g}$  de ácido graso por  $\text{mg}$  de peso seco de la dieta utilizando la siguiente fórmula (Carreón-Palau *et al.*, 2007):

$$C(\mu\text{g}/\text{mg}) = ((A/FC) \times V) / PM \quad (1)$$

donde:

C =  $\mu\text{g}$  del ácido graso por  $\text{mg}$  de peso seco de muestra

A = Área de integración del pico del ácido graso

FC = Factor de corrección obtenido de la curva de calibración para dicho ácido graso

V = Volumen de resuspensión de la muestra antes de realizar la inyección

PM = Peso seco de la muestra ( $\text{mg}$ )

## 2.11 Ácidos grasos en juveniles de pulpo

El análisis de ácidos grasos de los organismos recién eclosionados y cultivados fue procesado por medio de cromatografía de gases en un equipo Agilent 7820A en el laboratorio de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN) de la UNAM, Campus Ensenada, Baja California.

Antes de inyectar las muestras en el cromatógrafo, cada una fue resuspendida en  $500 \mu\text{l}$  de hexano grado HPLC. El volumen de inyección fue de  $1 \mu\text{l}$  de muestra y se utilizó gas helio de alta pureza para el transporte de la muestra a través de la columna de Agilent J&W DB-23 ( $60 \text{ m}$  de largo,  $0.250 \text{ mm}$  de diámetro y película de espesor de  $0.25 \mu\text{m}$ ).

Los ácidos grasos araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico, obtenidos de la mezcla de 37 ácidos grasos metil esterificados, fueron diluidos en un rango entre  $3.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  a  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Por medio de esta curva se obtuvo un factor de corrección para la absorbancia en cada pico obtenido de estos ácidos grasos. Debido a que el contenido total de ARA, EPA y DHA en estas diluciones era conocido, su contenido en las muestras fue obtenido por medio de la siguiente fórmula (modificado de: Carreón-Palau *et al.*, 2007):

$$C(\mu g/mg) = (A/FC)/PM \quad (2)$$

donde:

C =  $\mu g$  del ácido graso por mg de peso seco de muestra

A = Área de integración del pico del ácido graso

FC = Factor de corrección obtenido de la curva de calibración para dicho ácido graso

PM = Peso seco de la muestra (mg)

## 2.12 Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas y las gráficas fueron procesadas en el programa *Statistica 10*.

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk como prueba de normalidad para los datos con los que se comparó el crecimiento en peso de los organismos alimentados con cada una de las dietas a lo largo del cultivo. La prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (corrección de Lilliefors) para los datos independientes con los que se evaluó el efecto de los tratamientos sobre el peso, el contenido de ácidos grasos y el número de ventosas. La prueba de Levene fue usada para comprobar la homogeneidad de varianzas.

Ya que todos los pulpos en cada uno de los tratamientos eran pesados cada siete días, se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para la comparación entre grupo dependientes para la medición semanal (Dieta – día de medición) y la ganancia en peso (Dieta – periodo de ganancia), para distinguir las diferencias entre cada medición consecutiva, considerando que el peso de un mismo pulpo dependía de su peso en la medición anterior.

Para conocer las diferencias entre tratamientos en cada uno de los días de medición de peso, se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de una vía ( $\alpha = 0.05$ ) para los 21 días de cultivo ya que cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas y para el resto de los días que no cumplieron con los supuestos mencionados aún después de ser transformados, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0.05$ ).

Para evaluar las diferencias en el contenido de cada ácido graso entre las dietas formuladas, se realizaron comparaciones por medio de pruebas t-student.

Para los datos de ácidos grasos en los juveniles que cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de una vía, tal fue el caso del contenido de ácido araquidónico en los organismos recién eclosionados, dietas y organismos alimentados por 28 días. La prueba de Kruskal-Wallis fue usada para el resto de los datos no paramétricos que no se normalizaban aún después de realizar la transformación. Así mismo para el número de ventosas fue realizada la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ya que estos datos no cumplieron con los supuestos correspondientes.

Posterior a las pruebas ANOVA y Kruskal-Wallis se realizaron las pruebas post-hoc de Tukey y comparaciones múltiples de los rangos de las medias, en los análisis de mediciones del peso y los datos de ácidos grasos en los juveniles.

## Capítulo 3. Resultados

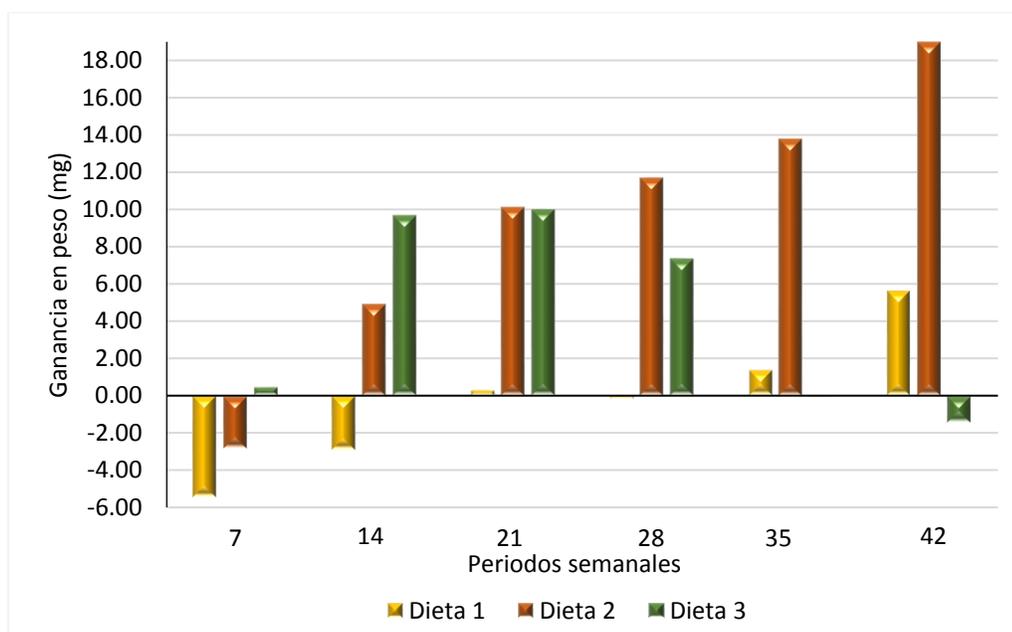
---

### 3.1 Crecimiento en peso de los juveniles de *O. bimaculoides*

El análisis de los resultados primero aborda el comportamiento de los pesos de los pulpos entre los días de cultivo con una misma dieta y posteriormente la comparación entre los tratamientos.

El análisis de los datos para evaluar el crecimiento en peso de los pulpos de cada tratamiento, se realizó en dos intervalos de tiempo, en el primero se incluyó el total de los organismos desde el día 0 hasta los 28 días de cultivo, momento en el cual se tomó una muestra al azar de 78 organismos, de esa muestra se tomaron individuos para el conteo de ventosas (10 por tratamiento) y el análisis de ácidos grasos (16 por tratamiento). En el segundo intervalo, se consideraron solamente los pulpos que continuaron hasta finalizar el cultivo, es decir, a partir de los 28 días hasta los 42 días de cultivo, los cuales se distinguieron en la descripción de este apartado como sobrevivientes.

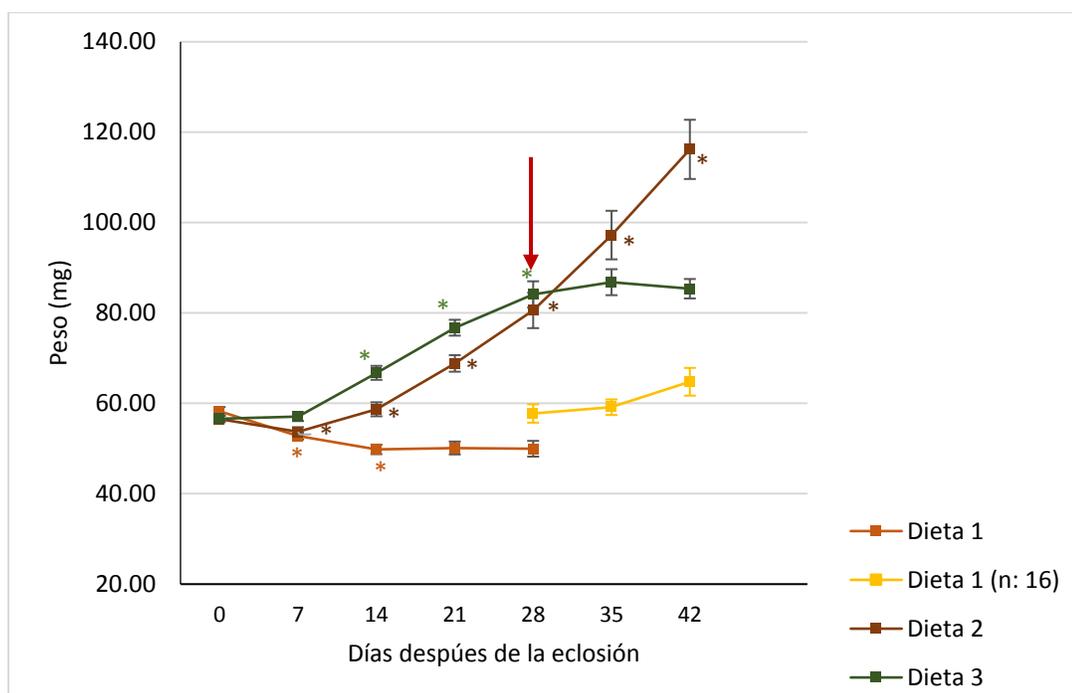
Los organismos que fueron alimentados con la Dieta 1 no presentaron crecimiento durante los primeros 28 días del cultivo. El decremento en peso al día 7 fue de 9.41% (-5.48 mg) con relación al peso inicial ( $58.24 \pm 0.93$  mg) y al día 14, la pérdida fue del 5.57% (-2.94 mg) con respecto a la biometría anterior. Para la biometría del día 21, se cuantificó una ganancia en peso de 0.62% (0.31 mg), sin embargo, al día 28 perdieron el 0.34% (-0.17 mg) (Figura 4). Las diferencias en los pesos de los pulpos fueron altamente significativas ( $p = 0.0001$ ) a partir del día 0 hasta los 14 días del cultivo (Figura 5). El peso de los organismos se mantuvo a partir de los 14 días hasta los 28 días de cultivo con un promedio de  $49.96 \pm 1.41$ mg, sin mostrar diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 5). El decremento en peso por día fue de  $-0.29 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$  desde el inicio del cultivo hasta los 28 días.



**Figura 4.** Ganancia en peso de los juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con las diferentes dietas a partir del día 0 (día de la eclosión) (n = 144) hasta los 42 días de cultivo (n = 59).  $\pm$  = Error estándar

Previo al muestreo a los 28 días de cultivo, se registró el peso de cada organismo (137 individuos) correspondiente a cada uno de los tratamientos, de los cuales las medias fueron de  $49.96 \pm 1.74$  mg,  $80.55 \pm 2.66$  mg y  $84.11 \pm 2.19$  mg para los juveniles alimentados con la Dieta 1, 2 y 3, respectivamente (Figura 5). Los organismos muestreados presentaron un peso promedio de  $45.15 \pm 2.03$  mg,  $77.89 \pm 3.63$  mg y  $81.36 \pm 3.24$  mg en las Dietas 1, 2 y 3 respectivamente, mientras que los organismos que permanecieron en cultivo a partir de los 28 días (59 individuos) pesaron  $57.76 \pm 2.03$  mg (Dieta 1),  $83.45 \pm 3.91$  mg (Dieta 2) y  $86.85 \pm 2.90$  mg (Dieta 3). Las diferencias significativas (Kruskal Wallis;  $\alpha = 0.05$ ) solamente se encontraron entre el peso de los organismos muestreados provenientes de la Dieta 1 y los que permanecieron en cultivo ( $p = 0.0002$ ), por lo anterior, es evidente que el muestreo al azar estuvo sesgado hacia los pulpos más pequeños (Figura 5).

A los 35 días de cultivo, los pulpos sobrevivientes que fueron alimentados con la Dieta 1, tuvieron un peso de  $59.15 \pm 1.72$  mg y no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.6$ ) con el peso al día 28 ( $57.76 \pm 2.03$  mg), pero a los 42 días de cultivo, estos organismos incrementaron su peso en 9.52% (5.63 mg) en relación con la biometría anterior, habiendo ganado por día  $0.50 \pm 0.21$  mg·d<sup>-1</sup> entre los 28 y 42 días de cultivo.



**Figura 5. Crecimiento en peso (mg) de los juveniles de *O. bimaculoides* a partir del día 0 (día de la eclosión) hasta el día 42 del cultivo, alimentados con las tres dietas.** (Wilcoxon;  $\alpha = 0.05$ ). La flecha roja indica el tiempo del primer muestreo (28 días de cultivo). Dieta 1 (n: 16) son los organismos sobrevivientes después del muestreo. Los asteriscos indican diferencias significativas con la biometría anterior ( $p \leq 0.001^*$ ) ( $\square$  = Error estándar).

Los organismos que recibieron la Dieta 2 perdieron el 5% ( $2.83 \pm 0.89$  mg) de su peso inicial ( $56.54 \pm 0.69$  mg) a los 7 días de cultivo, pero a partir del día 14 presentaron una ganancia del 9.27% (4.98 mg) del peso con respecto a la biometría anterior, a los 21 días el incremento fue del 18.25% (10.14 mg) y a los 28 días de cultivo, los pulpos ganaron el 17.02% (11.72 mg) de su peso con respecto a la biometría anterior ( $68.83 \pm 1.83$  mg) (Figura 4). El aumento en peso de los pulpos durante el cultivo, mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.001$ ) (Figura 5), con una ganancia por día de  $0.86 \pm 0.09$  mg·d<sup>-1</sup>. A los 35 días de cultivo, los organismos pesaron  $97.23 \pm 5.37$  mg y al término del cultivo (día 42) alcanzaron un peso máximo de  $116.19 \pm 6.55$  mg, lo que representó una ganancia del 105% con respecto a su peso inicial. La tendencia en el incremento en peso a partir del día 28 y hasta los 42 días de cultivo, mostró diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.0001$ ) con un crecimiento de  $2.54$  mg·d<sup>-1</sup>.

El grupo de juveniles alimentados con la Dieta 3 ganaron peso rápidamente (Figura 4), con un incremento del 35.5% (20.14 mg) de su peso inicial ( $56.60 \pm 0.73$  mg) entre los 0 y los 21 días de cultivo, llegando a pesar  $76.74 \pm 1.75$  mg (Figura 5). El peso de los pulpos en este intervalo de tiempo del cultivo, mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.0001$ ) (Figura 5). A los 28 días de cultivo, los pulpos habían ganado el 9.60% (7.37 mg) en peso con respecto a la biometría anterior (Figura 5) y un total de

48.60% (27.51 mg) de su peso inicial, con un crecimiento por día de  $0.98 \pm 0.07 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ . Posteriormente, los organismos que continuaron en el cultivo a partir del día 28 y hasta el día 42, tuvieron un peso promedio de  $85.42 \pm 2.40 \text{ mg}$  (Figura 5) y no fueron diferentes significativamente ( $p > 0.05$ ) entre biometrías.

Debido a que los organismos alimentados con la Dieta 1 habían perdido el 14.22% de su peso hasta los 28 días del cultivo, a partir de los primeros 14 días, y hasta el término del experimento, éstos presentaron el menor peso, los cuales fueron significativamente diferentes ( $p \leq 0.02$ ) a los pesos obtenidos en los organismos alimentados con las otras dos dietas (Tabla 2). El peso de los pulpos de la Dieta 2 y 3 presentaron diferencias significativas a los 7 ( $p = 0.02$ ), 14 ( $p = 0.006$ ) y 21 días de cultivo ( $p = 0.003$ ). A los 28 días, los juveniles de pulpo alimentados con la Dieta 2 presentaron un peso de  $80.55 \pm 2.66 \text{ mg}$  y los que recibieron la Dieta 3 de  $84.11 \pm 2.19 \text{ mg}$ , sin diferencias significativas entre sí ( $p = 1.0$ ), al igual que a los 35 días de cultivo ( $p \geq 0.05$ ), no obstante, se observa una diferencia de 10.42 mg entre una dieta y otra (Tabla 2). El peso de los pulpos al finalizar el cultivo (día 42), fue significativamente diferente ( $p \leq 0.001$ ) entre la dieta 2 y 3, con una diferencia de 30.83 mg.

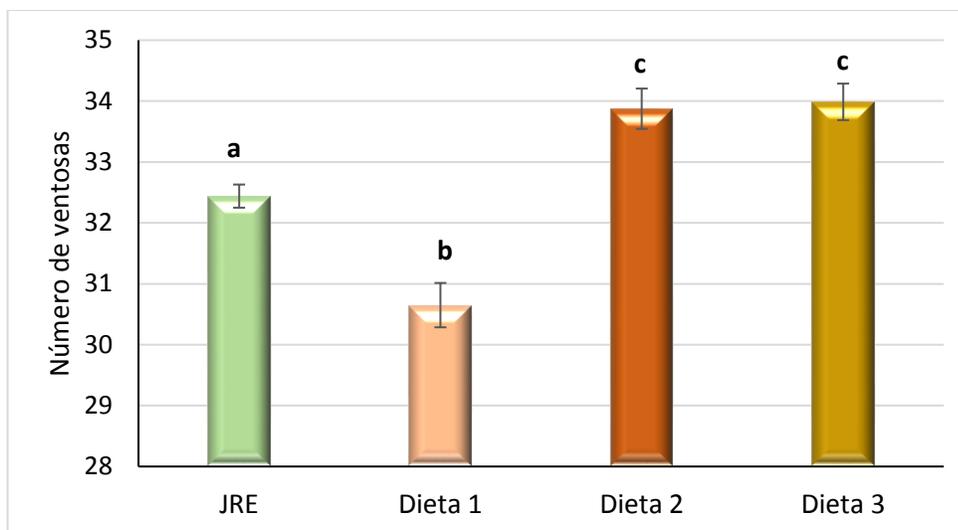
**Tabla 2. Peso (mg) de los juveniles alimentados con las diferentes dietas** (ANOVA\* y Kruskal-Wallis;  $\alpha = 0.05$ ). Las letras indican diferencias entre tratamientos dentro de cada día de medición ( $p < 0.05$ ). El número en negritas indica el día del primer muestreo.

dde	p	n	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
0	0.2	144	$58.24 \pm 0.93^a$	$56.54 \pm 0.69^a$	$56.60 \pm 0.73^a$
7	0.002	144	$52.75 \pm 0.74^a$	$53.71 \pm 1.01^a$	$57.07 \pm 1.07^b$
14	0.000	143	$49.81 \pm 1.06^a$	$58.69 \pm 1.55^b$	$66.74 \pm 1.55^c$
21*	0.000	142	$50.13 \pm 1.43^a$	$68.83 \pm 1.83^b$	$76.74 \pm 1.75^c$
<b>28</b>	0.000	130	$49.96 \pm 1.74^a$	$80.55 \pm 2.66^b$	$84.10 \pm 2.19^b$
35	0.000	59	$59.15 \pm 1.72^a$	$97.23 \pm 5.37^b$	$86.80 \pm 2.87^b$
42	0.000	59	$64.78 \pm 3.07^a$	$116.19 \pm 6.55^b$	$85.36 \pm 2.15^c$

### 3.2 Conteo de ventosas

Los 19 organismos recién eclosionados presentaron una media de  $32 \pm 0.19$  ventosas por brazo. En los juveniles que recibieron la Dieta 3, el número de ventosas por brazo incremento a  $34 \pm 0.30$  ventosas y en los pulpos alimentados con la Dieta 2 fue de  $34 \pm 0.33$  ventosas. En los organismos alimentados con la

Dieta 1 se cuantificaron  $31 \pm 0.36$  ventosas (Figura 6). El número de ventosas en la Dieta 2 y la Dieta 3 no presentaron diferencias significativas entre sí ( $p = 1.0$ ), mientras que la Dieta 1 y los juveniles recién eclosionados presentaron diferencias significativas con todos los grupos ( $p \leq 0.002$ ).



**Figura 6. Número de ventosas en los juveniles recién eclosionados (JRE) y los pulpos alimentados con cada una de las dietas a los 28 días de cultivo** (Kruskal-Wallis;  $\alpha = 0.05$ ) ( $p \leq 0.0001$ ). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 3.3 Presencia de los ocelos en los juveniles de pulpo

La mayoría de los organismos reaccionaron al estímulo inducido por la presencia de la mano colocada sobre el vaso de precipitado. Los ocelos observados aún no mostraban color azul o verde iridiscentes, sin embargo, mostraban la forma redonda de un ocelo con pigmentación café oscuro y café claro (Figura 7).

A los 14 días de haber eclosionado, se logró observar al menos la presencia de uno de los ocelos en 11.9% de los juveniles ( $n = 17$ ) de los 143 organismos; 3 en Dieta 1, 7 en Dieta 2 y 7 en Dieta 3. A los 21 días el porcentaje de organismos con ocelos aumentó a 49.3% (70 juveniles) (incluyendo a los que ya habían mostrado ocelos a los 14 días de cultivo), 22 en Dieta 1, 26 en Dieta 2 y 22 en Dieta 3. A los 28 días de cultivo, no fue posible detectar la presencia de los ocelos en 10% de los organismos (13 de 137 juveniles), éstos provenían de la Dieta 1, los cuales se encontraban débiles, permanecían inmóviles y no reaccionaban al estímulo.



**Figura 7. Ocelos en juveniles de pulpo.** Organismo vivo (izquierda) (14 días de cultivo) y conservado en la solución fijadora para larvas y huevos (derecha) (21 días de cultivo). Los círculos rojos indican la ubicación de los ocelos.

### 3.4 Supervivencia de los juveniles

Los juveniles que recibieron la Dieta 1 presentaron la menor supervivencia (91.66%) a los 28 días, en los sobrevivientes que continuaron en cultivo hasta los 42 días, la supervivencia fue del 80%, mientras que, en estos mismos periodos, se observó una supervivencia del 97.92% y 95.65% en la Dieta 2 y del 95.83% y 95.45% en la Dieta 3 (Tabla 3). Cabe mencionar que algunos organismos alimentados con la Dieta 1 estaban débiles, pálidos y con un tamaño reducido (Figura 8) en comparación con los pulpos de las otras dos dietas, por lo que se decidió realizar el muestreo a los 28 días en lugar de esperar hasta que transcurrieran los 42 días de cultivo.

**Tabla 3. Supervivencia de los organismos alimentados con las diferentes dietas.**

	Supervivencia antes del primer muestreo (28 dde)	Porcentaje de supervivencia	Supervivencia antes del segundo muestreo (42 dde)	Porcentaje de supervivencia
<b>Dieta 1</b>	44/48	91.66%	16/20	80%
<b>Dieta 2</b>	47/48	97.92%	22/23	95.65%
<b>Dieta 3</b>	46/48	95.83%	21/22	95.45%



**Figura 8. Comparación visual entre dos organismos de 28 días de cultivo.** (A) pulpos alimentados con la Dieta 1 y (B) Dieta 2.

### 3.5 Ácidos grasos altamente insaturados (ARA, EPA y DHA) en las dietas

El análisis de los ácidos grasos ARA, EPA y DHA en las dietas formuladas, indica que la Dieta 3 tuvo la mayor concentración de estos ácidos grasos, con  $8.12 \pm 1.09 \mu\text{mg}^{-1}$  de ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3),  $3.77 \pm 0.51$  de ácido araquidónico (ARA, 20:4n6) y  $31.46 \pm 5.30 \mu\text{mg}^{-1}$  de ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n3). Entre las Dietas 1 y 2 no se encontraron diferencias significativas (ARA:  $p = 0.7$ , EPA:  $p = 0.9$  y DHA:  $p = 0.8$ ) en el contenido de estos ácidos grasos, sin embargo, ambas difieren con la Dieta 3 (ARA, Dieta 1:  $p = 0.01$  y Dieta 2:  $p = 0.0004$ ; EPA, Dieta 1:  $p = 0.02$  y Dieta 2:  $p = 0.006$ ; DHA, Dieta 1:  $p = 0.007$  y Dieta 2:  $p = 0.006$ ) (Tabla 4). La relación DHA:EPA en las Dietas 1 y 2 fue de 1.45 y 1.46 respectivamente (Tabla 4), mientras que para la dieta 3 la relación fue mayor en un 164% ( $p = 0.0006$  y  $p = 0.00005$ , respectivamente).

**Tabla 4. Concentraciones de ácidos grasos ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en las dietas.** Las letras indican diferencias significativas (*t student*) ( $p < 0.05$ ). Los ácidos grasos altamente insaturados (en negritas) fueron utilizados para la discusión de los resultados. ND: No detectado.

Ácido graso	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
C14:0	1.11 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	3.36 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup>
C15:0	0.39 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.21 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>
Ci15:0	6.88 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	3.03 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	18.63 $\pm$ 3.01 <sup>c</sup>
C16:1 n11	0.13 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
C16:1 n9	0.54 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
C16:1 n7	1.79 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	5.77 $\pm$ 0.87 <sup>c</sup>
Ci16:0	0.39 $\pm$ 0.05 <sup>ac</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>
Cai16:0	0.26 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.13 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
C16:2n6	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
C17:0	0.52 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.50 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup>
C17:1 n7	0.64 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.34 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>
C16:3n3	0.28 $\pm$ 0.05 <sup>ac</sup>	0.05 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.40 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
C16:4n3	1.13 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.42 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
C18:0	2.18 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	1.40 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	6.08 $\pm$ 1.01 <sup>c</sup>
C18:1 n11	1.43 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	2.08 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	13.38 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>
C18:1 n9 c	1.81 $\pm$ 0.51 <sup>ab</sup>	0.43 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	2.56 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>
C18:2 n6 c	0.60 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.65 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup>
C18:2 n6 t	0.90 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
C18:3 n6	0.07 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
C18:3 n3	0.41 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.60 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
C18:4n3	0.54 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	0.25 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
C19:0	0.09 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
C20:0	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
C20:1 n9	0.67 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	1.47 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>
C20:2 n6	0.25 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
<b>C20:4 n6</b>	<b>1.19 <math>\pm</math> 0.27<sup>a</sup></b>	<b>1.30 <math>\pm</math> 0.02<sup>a</sup></b>	<b>3.77 <math>\pm</math> 0.51<sup>b</sup></b>
<b>C20:5 n3</b>	<b>2.37 <math>\pm</math> 0.71<sup>a</sup></b>	<b>2.33 <math>\pm</math> 0.03<sup>a</sup></b>	<b>8.12 <math>\pm</math> 1.09<sup>b</sup></b>
C22:3 n3	0.23 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.13 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
C22:3n6	0.10 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.60 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
C22:5n6	0.16 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.19 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>
C22:5n3	0.31 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.33 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>
<b>C22:6 n3</b>	<b>3.73 <math>\pm</math> 1.39<sup>a</sup></b>	<b>3.39 <math>\pm</math> 0.13<sup>a</sup></b>	<b>31.46 <math>\pm</math> 5.30<sup>b</sup></b>
C20:3 n6	ND	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
C21:0	ND	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
C20:4 n3	ND	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
C22:0	ND	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
C22:2 n6	ND	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
C23:0	ND	0.03 $\pm$ 0.00	ND
C24:1 n9	ND	ND	0.72 $\pm$ 0.05
DHA:EPA	1.45 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.46 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.84 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>

### 3.6 Ácidos grasos en los juveniles de pulpo

Los juveniles alimentados con la Dieta 1, Dieta 2 y Dieta 3 no presentaron diferencias significativas entre sí con respecto al contenido de ARA (20:4 n6) a los 28 días de cultivo ( $p \geq 0.9$ ) y se encontraron en concentraciones de entre  $1.54 \pm 0.29$  y  $1.65 \pm 0.15 \mu\text{mg}^{-1}$ , sin embargo, cuando se realizó la comparación de este ácido graso con la concentración de los juveniles recién eclosionados, las diferencias fueron significativas con cada uno de los grupos de juveniles alimentados con las diferentes dietas (Dieta 1,  $p = 0.01$ ; Dieta 2,  $p = 0.004$ ; Dieta 3,  $p = 0.004$ ), debido a que este grupo presentó la concentración más alta de este ácido graso ( $2.62 \pm 0.20 \mu\text{mg}^{-1}$ ) (Tabla 5).

El grupo de los juveniles recién eclosionados presentó una concentración de  $14.77 \pm 1.28 \mu\text{mg}^{-1}$  de EPA (20:5 n3) con diferencias significativas con los pulpos alimentados con la Dieta 2 ( $p = 0.005$ ) con  $9.05 \pm 0.70 \mu\text{mg}^{-1}$  y la Dieta 3 ( $p = 0.002$ ) con  $8.31 \pm 1.47 \mu\text{mg}^{-1}$  a los 28 días de cultivo (Tabla 5). Los organismos que recibieron la Dieta 1 presentaron una concentración de EPA menor ( $10.64 \pm 0.98 \mu\text{mg}^{-1}$ ) a la contenida en los juveniles recién eclosionados, sin embargo, no presentaron diferencias significativas ( $p = 0.07$ ) entre sí (Tabla 5).

El contenido de DHA (22:6 n3) solamente mostró diferencias significativas entre los juveniles recién eclosionados y los pulpos que recibieron la Dieta 2 ( $p = 0.001$ ) a los 28 días de cultivo, debido a que estos últimos presentaron la menor concentración de DHA con  $12.79 \pm 1.04 \mu\text{mg}^{-1}$ , en contraste con los  $29.82 \pm 2.89 \mu\text{mg}^{-1}$  presente en los juveniles recién eclosionados. A pesar de no encontrar diferencias ( $p = 0.06$ ), el contenido de este mismo ácido graso en los organismos alimentados con la Dieta 1 fue bajo ( $15.62 \pm 1.40 \mu\text{mg}^{-1}$ ). La concentración de DHA en los pulpos de la Dieta 3 fue el valor más cercano a la concentración observada en los juveniles recién eclosionados ( $p = 0.7$ ), encontrándose  $7 \mu\text{mg}^{-1}$  ( $22.82 \pm 5.17 \mu\text{mg}^{-1}$ ) por debajo de la concentración de éstos últimos (Tabla 5). También se observó que los organismos alimentados con las Dietas 1 y 2 presentaron una concentración de EPA y DHA mayor que la contenida en la dieta (Tabla 4), y a pesar de que la Dieta 3 contenía los más altos niveles de EPA y DHA, los organismos que recibieron este alimento, presentaron concentraciones menores al proporcionado por la dieta.

La relación DHA:EPA a los 28 días de cultivo fue más alta en los pulpos alimentados con la Dieta 3 ( $2.48 \pm 0.21$ ) en comparación con el  $2.01 \pm 0.06$  presente en los juveniles recién eclosionados, no obstante, la comparación múltiple realizada *a posteriori* no mostró diferencias significativas entre estos dos grupos de

organismos ( $p = 1.0$ ), sin embargo, estos si difieren con la relación encontrada en los pulpos de la Dieta 1 ( $p \leq 0.03$ ) y la Dieta 2 ( $p \leq 0.004$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5. Contenido de ácidos grasos ( $\mu\text{gmg}^{-1}$ ) de los juveniles de pulpo.** Recién eclosionados (JRE) y los alimentados con cada una de las dietas a los 28 y 42 días de cultivo. (ANOVA y Kruskal Wallis\*;  $\alpha = 0.05$ ). Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). D1: 60% jaiba – 36% mejillón; D2: 80% jaiba – 16% mejillón; D3: 80% jaiba – 11% mejillón – 5% aceite de ojo de atún.

28 días de cultivo					
Ácido graso	$p$	JRE	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
ARA	0.001	$2.62 \pm 0.20^a$	$1.65 \pm 0.15^b$	$1.56 \pm 0.15^b$	$1.54 \pm 0.29^b$
EPA	0.002	$14.77 \pm 1.28^a$	$10.64 \pm 0.98^{ab}$	$9.05 \pm 0.70^b$	$8.31 \pm 1.47^b$
DHA*	0.002	$29.82 \pm 2.89^a$	$15.62 \pm 1.40^{ab}$	$12.79 \pm 1.04^b$	$22.82 \pm 5.17^{ab}$
DHA:EPA*	0.000	$2.01 \pm 0.06^a$	$1.48 \pm 0.04^b$	$1.41 \pm 0.05^b$	$2.48 \pm 0.21^a$
42 días de cultivo					
Ácido graso	$p$	JRE	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
ARA*	0.02	$2.62 \pm 0.20^a$	$1.77 \pm 0.19^{ab}$	$1.92 \pm 0.54^{ab}$	$1.70 \pm 0.18^b$
EPA	0.004	$14.77 \pm 1.28^a$	$10.36 \pm 1.08^{ab}$	$8.65 \pm 1.49^b$	$9.04 \pm 0.83^b$
DHA	0.02	$29.82 \pm 2.89^a$	$19.04 \pm 3.79^{ab}$	$14.76 \pm 2.95^b$	$21.11 \pm 2.97^{ab}$
DHA:EPA	0.02	$2.01 \pm 0.06^{ab}$	$1.81 \pm 0.22^{ab}$	$1.59 \pm 0.12^a$	$2.26 \pm 0.16^b$

En relación al contenido de ARA en los pulpos, se cuantificó un aumento desde el día 28 hasta los 42 días de cultivo, en los organismos que recibieron la Dieta 1 de  $1.65 \pm 0.15 \mu\text{gmg}^{-1}$  a  $1.77 \pm 0.19 \mu\text{gmg}^{-1}$ , en la Dieta 2 de  $1.56 \pm 0.15 \mu\text{gmg}^{-1}$  a  $1.92 \pm 0.54 \mu\text{gmg}^{-1}$  y los pulpos que recibieron la Dieta 3 de  $1.54 \pm 0.29 \mu\text{gmg}^{-1}$  a  $1.70 \pm 0.18 \mu\text{gmg}^{-1}$  (Tabla 5). Estos organismos alimentados con las diferentes dietas tuvieron una concentración de ARA menor a la encontrada en los juveniles recién eclosionados ( $2.62 \pm 0.20 \mu\text{gmg}^{-1}$ ) (Tabla 5). El contenido de ARA en los juveniles que recibieron la Dieta 3 ( $1.70 \pm 0.18 \mu\text{gmg}^{-1}$ ) mostró diferencias significativas ( $p = 0.044$ ) con los juveniles recién eclosionados, mientras que en el resto de las comparaciones no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.06$ ) (Tabla 5).

El contenido de EPA en los pulpos se mantuvo alrededor de los mismos valores entre los 28 y los 42 días de cultivo en cada una de las dietas. El análisis mostró diferencias entre el grupo de los juveniles recién eclosionados y aquellos alimentados con las Dietas 2 ( $p = 0.005$ ) y Dieta 3 ( $p = 0.01$ ) (Tabla 5). Mientras

que los organismos alimentados con la Dieta 1 no presentaron diferencias con ninguno de los grupos, encontrándose en una concentración media de  $10.36 \pm 1.08 \mu\text{gmg}^{-1}$ .

El contenido de DHA de los pulpos que recibieron las Dietas 1 y 2, aumentó en 22% ( $3.42 \mu\text{gmg}^{-1}$ ) y 15% ( $1.97 \mu\text{gmg}^{-1}$ ) respectivamente, desde los 28 días hasta que finalizó el cultivo (día 42), siendo de  $19.04 \pm 3.79 \mu\text{gmg}^{-1}$  y  $14.76 \pm 2.95 \mu\text{gmg}^{-1}$  respectivamente (Tabla 5). En los organismos alimentados con la Dieta 3, la concentración de DHA a los 42 días de cultivo fue de  $21.11 \pm 2.97 \mu\text{gmg}^{-1}$ , con una diferencia de  $1.71 \mu\text{gmg}^{-1}$  en comparación con los pulpos de esta misma dieta a los 28 días de cultivo (Tabla 5). Aún después de las modificaciones en el contenido de DHA en los organismos alimentados con la Dieta 1 y la Dieta 2 a los 42 días de cultivo, las comparaciones estadísticas revelaron diferencias significativas solamente entre los juveniles recién eclosionados y los que recibieron la Dieta 2 ( $p = 0.01$ ) (Tabla 5).

Las pequeñas diferencias en el contenido de DHA en la Dieta 1 y Dieta 2 a los 42 días de cultivo, modificaron la relación DHA:EPA en cada una de estas dietas (Dieta 1:  $1.81 \pm 0.22$  y Dieta 2:  $1.59 \pm 0.12$ ), sin embargo, con base en la prueba *a posteriori* de Tukey, no existieron diferencias significativas entre cada uno de estos grupos (Dieta 1:  $p = 0.79$ ; Dieta:  $p = 0.22$ ) y el grupo de los organismos recién eclosionados. En la relación DHA:EPA en los pulpos que recibieron la Dieta 3, tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.62$ ) con los recién eclosionados (Tabla 5). Las diferencias significativas solamente se encontraron entre los organismos alimentados con la Dieta 3 ( $2.26 \pm 0.16$ ) y la Dieta 2 ( $1.59 \pm 0.12$ ) ( $p = 0.02$ ), con ésta última, los juveniles de pulpo tuvieron la relación DHA:EPA más pequeña (Tabla 5).

## Capítulo 4. Discusión

---

El interés sobre el manejo técnico de los cultivos de cefalópodos se ha mantenido tanto para investigaciones en neurología como para cumplir con la demanda de consumo (Uriarte *et al.*, 2011). Específicamente en el grupo de los pulpos del género *Octopus* spp. de interés gastronómico, los estudios se han enfocado en la especie *O. vulgaris* (pulpo común), en gran parte sobre sus requerimientos nutricionales (Iglesias *et al.*, 2000; Moxica *et al.*, 2002; Navarro y Villanueva, 2003; Iglesias *et al.*, 2004, 2007; Okumura *et al.*, 2005; Prato *et al.*, 2010; Seixas *et al.*, 2010). Las observaciones realizadas sobre esta especie han llamado la atención de diversos investigadores, de tal modo que han unido sus esfuerzos con la finalidad de plantear algunas recomendaciones, enfocadas en futuras líneas de investigación, tales como: reproducción, engorda, desarrollo, nutrición y calidad del agua, entre otras, cuyos resultados ayudarán al desarrollo de los cultivos de las especies de pulpo (Iglesias *et al.*, 2007). Lo anterior evidencia que, aun cuando hay especies de pulpo que han sido más estudiadas que otras en su etapa temprana de desarrollo (paralarva), existen otras en donde las investigaciones son escasas en diversos temas, tal es el caso de *O. bimaculoides*, cuyo potencial de cultivo podría ser prometedor.

Las investigaciones sobre las dietas suministradas en las primeras etapas del ciclo de vida de los pulpos, destacan que, para lograr un buen desarrollo de éstos, existe la necesidad de encontrar un alimento que cubra con sus requerimientos nutricionales (principalmente en relación al contenido de ácidos grasos y aminoácidos esenciales), que sea fácil de manejar, con una palatabilidad adecuada, un aglutinante apropiado, y que sea llamativo, ya que los pulpos manipulan el alimento con sus brazos (Navarro *et al.*, 2000; Navarro y Villanueva, 2003; Villanueva *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2008; Solorzano *et al.*, 2009; Quintana *et al.*, 2008, 2011; García *et al.*, 2011 y Viciano *et al.*, 2011).

Algunos autores mencionan que los cambios en el contenido de lípidos y en el perfil de ácidos grasos en los pulpos pueden ser por el efecto de la dieta parental (Caamal-Monsreal *et al.*, 2015; Tercero *et al.*, 2015) o por la dieta que consumen las paralarvas y juveniles, lo que se refleja directamente en el desarrollo, crecimiento, y supervivencia de estos organismos. Resultados favorables en estos aspectos se han obtenido al probar dietas con inclusión de grenetina, la adición de aminoácidos esenciales y algunos aceites ricos en ácidos grasos altamente insaturados (Navarro *et al.*, 2000; Navarro y Villanueva, 2003; Villanueva *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2008; Solorzano *et al.*, 2009; García *et al.*, 2011; Quintana *et al.*, 2008, 2011; Viciano *et al.*, 2011). No obstante, si no se tiene una cantidad adecuada

de cada nutriente, así como un balance de estos en la dieta, se pueden obtener resultados poco favorables en crecimiento y supervivencia.

Actualmente, sigue habiendo una brecha entre el tipo de dietas que podrían ser utilizadas y las que generarán un crecimiento, desarrollo y supervivencia adecuados para la permanencia de estos cultivos. Por lo pronto, las dietas artificiales no son bien aceptadas por los pulpos y provocan tasas de crecimiento bajas (Domingues *et al.*, 2007). El alimento más utilizado en la etapa de paralarva y juvenil de *O. vulgaris*, ha sido la *Artemia* enriquecida y sin enriquecer, sin embargo, los resultados son, un pobre crecimiento y baja supervivencia ocasionados por perfiles nutricionales inadecuados, sobre todo de ácidos grasos (Navarro y Villanueva, 2000; Navarro y Villanueva, 2003; Villanueva *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2010; Viciano *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha observado que juveniles de la especie *O. bimaculoides* poseen la capacidad de crecer 3.7, 4.4 y 5.6 mg·d<sup>-1</sup>, siendo alimentados con *Artemia* enriquecidas con *Spirulina maxima*, con Alga-Mac-3050 y sin enriquecer, respectivamente (Solorzano *et al.*, 2009). Tomando en cuenta que una de sus presas preferidas son los crustáceos, se recomienda que este grupo de organismos se incluyan como base en cualquier dieta para pulpos (Domingues *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2011; Viciano *et al.*, 2011).

En la presente investigación, los organismos alimentados con las tres dietas, consumieron el alimento desde el primer momento en que se les proporcionó, lo cual sugiere que las dietas suministradas estimularon a los organismos a alimentarse y fueron bien aceptadas (Domingues *et al.*, 2005, 2007) y que al igual que en *O. maya* (Quintana *et al.*, 2011), el alimento en forma de pasta también es bien aceptado por *O. bimaculoides*. La cantidad de alimento suministrado, entre 30 y 50 % del peso corporal cada 24 horas, permitió que éste se mantuviera compactado dentro del agua y los organismos lo consumieran casi en su totalidad. En *O. maya* se ha observado un crecimiento similar cuando el alimento es suministrado *ad libitum* o en una proporción de 30% del peso de los organismos, además de que se obtuvo una mejor supervivencia cuando los pulpos fueron colocados en grupo (Quintana *et al.*, 2011).

El crecimiento de los pulpos que recibieron las dos dietas (Dieta 2 y 3), formuladas con mayor proporción de jaiba (80%) apoya lo que se ha encontrado en *O. maya* y *O. vulgaris*, donde la dieta que contenía carne de cangrejo fue mejor aceptada (Van Heukelem, 1976) en comparación con dietas como *Artemia*, pescado (*Abudefduf abdominalis*), larvas de camarón, larvas de poliquetos, copépodos y calamar, entre otros, ya que produce el mejor crecimiento en comparación con alimentos como pescado (*Boops boops*), mejillón (*Mytilus chilensis*) o calamar fresco congelado (O' Dor *et al.*, 1984; Aguado-Giménez y García-García, 2002; Pérez *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2014). Tomando en cuenta la ganancia en peso de los pulpos, se puede

decir que *O. bimaculoides* presenta requerimientos similares a *O. maya* y *O. vulgaris* en relación con la calidad de los nutrientes, ya que al igual que el resto de los cefalópodos, su principal fuente de energía proviene de las proteínas (O'Dor y Wells, 1987; Lee *et al.*, 1995; Villanueva *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2014).

Los pulpos que recibieron la Dieta 1, compuesta por la menor proporción de jaiba (60%), no tuvieron una ganancia en peso favorable, perdiendo el 14.19% de su peso inicial hasta los 28 días de cultivo, con un crecimiento negativo de  $-0.29 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ , lo que produjo adelgazamiento de los brazos y manto reducido. Es evidente que esta dieta no cumplió con los requerimientos de *O. bimaculoides* para favorecer su crecimiento, pero posiblemente el contenido proteico de la jaiba, incluida en el alimento, les permitió a estos organismos sobrevivir y encontrarse al límite de su mantenimiento, ya que mantuvieron un peso alrededor de los 50 mg hasta el día 28 del cultivo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Domingues *et al.* (2007) en *O. maya*, el cual fue alimentado con una dieta artificial que contenía calamar fresco (*Loliguncula brevis*), aunque el organismo no creció, conservó su peso y logró mantenerse durante un periodo de 40 días; los autores mencionan que posiblemente fue debido al aporte de las proteínas presentes en el calamar.

Rosas *et al.* (2011), formularon tres dietas con diferentes proporciones de proteína para alimentar a juveniles de *O. maya* de 450 g de peso que fueron capturados del medio natural, dos de las dietas con 40% y 60% de proteína fueron formuladas artificialmente con harina de pescado, suero, aceite de pescado, vitaminas, y otros ingredientes, la tercera dieta estuvo conformada solamente con carne de jaiba congelada que aportaba el 58% de proteína. Los autores reportaron que la dieta con el 40% de proteína, ocasionó una tasa de crecimiento negativa de  $-0.43\% \text{d}^{-1}$ , mientras que la dieta con el 58% de proteína produjo la mejor tasa de crecimiento con  $1.77\% \text{d}^{-1}$  ( $11.8 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$ ). La escasez de proteína en el alimento de los cefalópodos ocasiona pérdida de biomasa, lo que se ve reflejado en un tamaño reducido, además, los organismos limitan su movimiento, pero cuando hay disponibilidad de alimento con alto contenido de proteínas pueden recuperarse (O'Dor *et al.*, 1984).

Los lípidos son un nutriente limitante en la dieta de los pulpos y pueden ser utilizados a corto plazo para poder canalizar las proteínas como reserva energética y utilizarlas también para el crecimiento (O'Dor *et al.*, 1984). Sin embargo, con una dieta alta en lípidos, el pulpo produce heces aceitosas, lo que indica una baja eficiencia digestiva de estos nutrientes, producto de su baja capacidad para oxidarlos aunado a que estos organismos tienen pocos sitios para el depósito de los mismos (Mommensen y Hochachka, 1982; O'Dor *et al.*, 1984).

En el pulpo *Enteroctopus megalocyathus*, alimentado con una dieta conformada solamente por el mejillón (*Mytilus chilensis*), el cual contiene un alto contenido de lípidos y de energía, ocasionó una pérdida del 14.5% de su peso inicial (200 mg), una alta mortalidad (74%) de los organismos, así como una reducción de la masa corporal y una eficiencia de asimilación alimenticia negativa (-42.8%), en comparación con el 99.2% de eficiencia de asimilación encontrada en los organismos alimentados con crustáceos (Pérez *et al.*, 2006). Para la alimentación de los juveniles *O. bimaculoides* del presente trabajo, fue utilizado el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, el cual posee un bajo contenido proteico (aprox. 9.85%) (Orban *et al.*, 2002) y un contenido de lípidos de 2.6% de su peso húmedo (Pirini *et al.*, 2007), siendo más alto que el porcentaje de lípidos presente en la jaiba (*C. sapidus*) (0.95%) (Küçükgülmez *et al.*, 2006) y sobrepasando el contenido de lípidos (1.1%) reportado para el pulpo *O. vulgaris* (O'Dor *et al.*, 1984).

Reforzando lo mencionado anteriormente, es posible que, en el presente estudio, la pérdida de peso de los juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con el mayor porcentaje de mejillón (36%) se haya debido a un mayor contenido de lípidos del que los pulpos pudieron digerir y asimilar. De este modo, el efecto negativo de la Dieta 1 puede deberse principalmente a un desbalance de nutrientes, un alto contenido lipídico, consecuencia de la adición de la gónada de mejillón, aunado a la baja proporción de proteínas requeridas como energía y reserva para el crecimiento (O'Dor *et al.*, 1984). En un experimento previo al desarrollo del cultivo, se mantuvieron 40 juveniles de *O. bimaculoides* durante un periodo de 30 días, los cuales fueron alimentados solamente con mejillón fresco completo (*Mytilus galloprovincialis*), en estos organismos se observó una ganancia de más del 50% de su peso inicial (56 mg), es decir  $0.93 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ , por lo que estos resultados sugieren que la utilización del mejillón completo como dieta fue más eficiente para el crecimiento de esta especie que la Dieta 1 durante los primeros 28 días de cultivo ( $-0.29 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a la cual se le adicionó sólo la gónada del mejillón (Gómez-Fierro, no publicado).

El grupo de organismos que continuo en cultivo hasta el día 42, consumiendo la Dieta 1, resalto que el crecimiento fue diferente, ya que el peso final de estos pulpos fue de 64.78 mg. Estos resultados demuestran que algunos organismos perdieron peso (día 28) y un 40.5 % del total de 42 individuos respondieron positivamente; ante este escenario es importante profundizar en los efectos de esta dieta sobre los pulpos.

Por otra parte, los organismos alimentados con la Dieta 2 comenzaron a incrementar su peso a partir de los 14 días de cultivo, hasta obtener una ganancia en peso de 42.46% hasta el día 28. Al finalizar el cultivo, los individuos alcanzaron un peso de 116.19 mg (105%) con una tasa de crecimiento de  $0.86 \pm 0.09 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ .

<sup>1</sup> hasta los 28 días de cultivo y de  $2.54 \pm 0.25 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$  entre los 35 y 42 días de cultivo, mientras que los organismos que recibieron la Dieta 3 obtuvieron en promedio 85.4 mg de los días 28 al 42. Esto sugiere que la Dieta 2 fue más eficiente en producir crecimiento entre los 35 y 42 días de cultivo. Solorzano *et al.* (2009), por otro lado, mantuvieron juveniles recién eclosionados de esta misma especie (89 mg) durante un cultivo de 20 días a una temperatura de  $21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , sus resultados fueron un peso de 200 mg, una ganancia de 124% del peso inicial y una tasa de crecimiento de  $5.6 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ , cuando utilizaron *Artemia salina* enriquecida con AlgaMac-3050 como dieta, mientras que con Artemia sin enriquecer los organismos llegaron a pesar 188 mg, con una supervivencia de 83%. Forsythe y Hanlon (1988), cultivaron juveniles de la misma especie con un peso inicial de 70 mg en dos temperaturas, reportaron un crecimiento de 6190 mg a los 404 días de cultivo con una temperatura de  $18^\circ\text{C}$  y de 5970 mg en 307 días a  $23^\circ\text{C}$ . Los pulpos *O. bimaculoides* del presente trabajo, fueron mantenidos a una temperatura de  $19.04 \pm 0.04 \text{ }^\circ\text{C}$ ; con base en estos resultados y los de otros autores, es posible que las diferencias estén también asociadas a la condición inicial de los organismos tomando en cuenta el peso de los pulpos recién eclosionados, así como las temperaturas y calidad de las dietas utilizadas.

La dieta que produjo el mejor crecimiento en los organismos durante los primeros 28 días de cultivo fue la Dieta 3, la cual contenía 80% de jaiba, 11% de mejillón e inclusión de aceite de ojo de atún (con mayor contenido de ARA, DHA y EPA), ya que los pulpos ganaron el 48.60% de su peso inicial, sin pérdida de peso durante todo el periodo de cultivo. Lo anterior podría indicar que la Dieta 3 tenía un mejor perfil de ácidos grasos para los pulpos durante los primeros 28 días del cultivo, que de acuerdo con lo documentado, las primeras etapas de desarrollo tienen un alto requerimiento de ácidos grasos poliinsaturados (Navarro y Villanueva, 2000; Quintana *et al.*, 2011), además, probablemente esta dieta también contenía un nivel de proteínas adecuado para favorecer el crecimiento gracias al porcentaje de jaiba (80%). Los escasos estudios del efecto de la dieta sobre el crecimiento de *O. bimaculoides*, y tomando en cuenta los resultados reportados por algunos autores en la misma especie, deja en evidencia la necesidad de profundizar en los aspectos nutricionales para encontrar la mejor dieta que favorezca el desempeño de esta especie en cultivo.

En el presente estudio, se procuró añadir en todas las dietas un mayor porcentaje de jaiba, y en la Dieta 3 se adicionó el aceite de ojo de atún, con el objetivo de enriquecerla mediante la incorporación de ácidos grasos altamente insaturados para favorecer el crecimiento y la supervivencia. El desempeño de los pulpos medido a través del crecimiento fue mejor con la dieta 3 durante los primeros 28 días del cultivo en comparación con la Dieta 2, posteriormente, el peso se mantuvo entre 84.11 y 86.81 mg, mientras que los pulpos de la Dieta 2, continuaron ganando peso hasta el último día del cultivo. Los resultados obtenidos

con la Dieta 3 al finalizar el cultivo, probablemente se deban a un desbalance de nutrientes, principalmente en proteínas y lípidos (P:L), ya que como lo mencionan Lee *et al.* (1995) y Seixas *et al.* (2010), en diferentes especies de cefalópodos la utilización de los lípidos es menor y la fuente de carbohidratos es insignificante para la reserva y obtención de energía.

En los estudios sobre el desarrollo de cefalópodos alimentados con dietas enriquecidas, se ha observado que una proporción inadecuada de lípidos en la dieta, con niveles bajos en P:L, ocasionan menores crecimientos (Seixas *et al.*, 2010), en el estadio larval interfieren con el proceso de la digestión y absorción (Øie *et al.*, 1997; Olsen *et al.*, 2000; Morais *et al.*, 2005), y también afectan la tendencia observada en estos organismos de reducir progresivamente la cantidad de lípidos conforme los organismos crecen, ocasionando que el contenido de éstos sea más alto que el observado en los organismos recién eclosionados a causa del exceso de lípidos suministrados (Navarro y Villanueva, 2003; Seixas *et al.*, 2010). Lo anterior podría explicar porque la Dieta 1 no cumple con este requerimiento, debido a que contiene 20% menos jaiba que las otras dos dietas, reemplazando este porcentaje por manto y gónada de mejillón. En el caso de la Dieta 3, por el hecho de tener 5% de aceite de ojo de atún, el cual no sólo contiene DHA y EPA, sino también otros lípidos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados; es probable que este alimento fuera rico en lípidos, lo que posiblemente influyó en la proporción de proteína proveniente del crustáceo en la segunda etapa del cultivo.

Es necesario continuar explorando la inclusión de *Artemia* en las dietas, principalmente para pulpos de desarrollo directo como *O. pallidus*, *O. maya* y *O. bimaculoides*, considerando los resultados obtenidos por Solorzano *et al.* (2009), ya que el mejor crecimiento en juveniles de *O. bimaculoides* lo obtuvieron con *Artemia* enriquecida con AlgaMac-3050. Además, resaltaron la importancia de la arginina y la lisina (aminoácidos esenciales), los cuales fueron similares entre los organismos recién eclosionados y los alimentados con esta dieta.

En el presente trabajo, también se evaluó el número de ventosas como un estimador del crecimiento de los organismos. Los juveniles recién eclosionados tuvieron 32 ventosas y al día 28 de cultivo se cuantificaron 34 ventosas en los organismos alimentados con la Dieta 2 y 3. Un pulpo adulto de *O. bimaculoides* tiene entre 140 y 190 ventosas en total, presenta asimetría en el número de ventosas de cada uno de los brazos y cada par de brazos tiene un tamaño distinto (Jereb *et al.*, 2014), esta asimetría entre brazos, también fue observada en los juveniles de *O. bimaculoides*, por lo que es posible que la variabilidad en el número de ventosas entre cada uno de los brazos enmascaró el efecto de los tratamientos. Los organismos alimentados con la Dieta 1 presentaron un menor número de ventosas (31)

que los organismos recién eclosionados, a causa de la pérdida de biomasa reflejada también en el adelgazamiento de los brazos, lo que dificultó la observación y cuantificación de las ventosas ubicadas en las puntas de los brazos.

El pulpo *O. bimaculoides* en etapa adulta presenta dos ocelos (manchas de ojos falsos) conformados por cromatóforos llamados iridóforos, los cuales están formados por capas apiladas de quitina que producen los colores espectrales azul y verde brillantes en esta especie y en *O. bimaculatus* (Messenger, 2001). Estas pigmentaciones se encuentran a cada lado de la cabeza y le sirven para mimetizarse y adquirir la apariencia de un animal más grande en presencia de sus depredadores (Jereb *et al.*, 2014). En los juveniles recién eclosionados, estas manchas no se distinguen aun cuando son expuestos a un estímulo (Dra. Hernández com. pers.), por lo que en el presente estudio se estimó el tiempo de aparición de los ocelos como un indicador del desarrollo de los juveniles.

La presencia de los ocelos fue distinguible por primera vez a los 14 días de cultivo en el 11.8% del total de organismos (143 pulpos), el mayor porcentaje de individuos donde se observaron los ocelos fueron aquellos alimentados con la Dieta 2 y la Dieta 3 con el 4.9% en cada dieta, mientras que en los pulpos que recibieron la Dieta 1, solamente se observaron en tres organismos (2%). A los 21 días del cultivo, la presencia de los ocelos se observó en el 49.3% de los organismos (n = 70), de los cuales el 18.3% (26 pulpos) provenían de la Dieta 2, 15.5% (n = 22) de la Dietas 1 y 15.5% (n = 22) de la Dieta 3. A los 28 días de cultivo, el 90% de los juveniles presentaban ocelos. Es importante mencionar que la observación es subjetiva, debido a que no fue posible observar los ocelos en todos los organismos, tal fue el caso del tratamiento con la Dieta 1 donde el 10% de los pulpos no reaccionaron al estímulo y permanecieron inactivos. En la interpretación de la aparición de los ocelos, es recomendable complementar con descripciones histológicas que permitan establecer con precisión su presencia en los juveniles de *O. bimaculoides*.

Los cromatóforos de los pulpos son estructuras complejas formadas por fibras musculares, células gliales y nervios, entre otros, las cuales son reguladas por los lóbulos cerebrales (Messenger, 2001), durante las primeras etapas de desarrollo, la piel de los pulpos (*O. vulgaris*) es más pálida, pero conforme crecen y se desarrollan, estos cromatóforos quedan en lo profundo de la piel y la nueva formación de cromatóforos con pigmentos oscuros toma su lugar en la superficie de la piel (Froesch y Packard, 1979). De este modo, la ausencia de ocelos y la pigmentación más pálida que se observó en los organismos alimentados con la Dieta 1, además de la coloración café en todos los ocelos observados (aún sin color azul o verde), puede indicar que la alimentación tuvo un efecto importante para el desarrollo de las fibras musculares y nervios

que conforman los cromatóforos, incluyendo a los iridóforos, que después darán lugar a la pigmentación en la etapa adulta.

La mayor supervivencia fue observada en los organismos alimentados con la Dieta 2 con 97.92% a los 28 días y 95.65% a los 42 días de cultivo, lo cual pudo haber sido favorecido por la utilización de grenetina como aglutinante debido a que ésta es casi 100% proteína cruda. Además, en estudios con *O. maya* se ha mencionado que la inclusión del 2 al 10% de grenetina, como aglutinante en la dieta, favorece la digestión y absorción de los nutrientes por parte de los organismos, ya que la glándula salivar posterior y la glándula digestiva requieren menor actividad de las proteasas para digerir el alimento (Rosas *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2011). La grenetina también contiene dos aminoácidos importantes para los cefalópodos; prolina en un 12% (Rosas *et al.*, 2008) el cual está relacionado con el metabolismo oxidativo en *O. vulgaris* (Villanueva *et al.*, 2004) y arginina en un 8% (Rosas *et al.*, 2008). Este último aminoácido es precursor de la octopina y está involucrado en el metabolismo anaeróbico como el producto final de la glicólisis en lugar de lactato deshidrogenasa (Hochachka, 1977; Fujisawa *et al.*, 2005). También contiene otros aminoácidos que no son esenciales pero que proveen energía (Rosas *et al.*, 2008). Se han utilizado otros aglutinantes como el alginato, sin embargo, éste no facilita la digestión en *O. maya*, incluso después de haber sido hidrolizado, además produjo pérdida de peso y los juveniles murieron (Rosas *et al.*, 2008).

Los juveniles requieren grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, como por ejemplo DHA para la formación de las membranas lipídicas de las células que forman los tejidos como el neuronal (Navarro y Villanueva, 2000; Salem *et al.*, 2001; Seixas *et al.*, 2010; Tocher *et al.*, 2010; Quintana *et al.*, 2011). Por esta razón, la dieta que contenía la mayor concentración de ARA, EPA y DHA (Dieta 3), parecía ser la más indicada para la alimentación de los juveniles recién eclosionados. Esto se confirmó durante las primeras cuatro semanas de cultivo (28 días) gracias al peso ganado (49.3% del peso inicial) en los organismos alimentados con esta dieta, lo que podría indicar que durante este periodo, dicha dieta tenía el mejor perfil nutricional, pero en la segunda etapa del cultivo (día 28 al 42), el peso se mantuvo prácticamente constante (85.42 mg), a pesar de que la relación DHA:EPA se encontraba por encima del valor de  $2.01 \pm 0.06$  presente en los organismos recién eclosionados. Posiblemente al día 28 de cultivo, los pulpos asimilaban de mejor manera los lípidos, debido a su gran requerimiento de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente de DHA (Navarro y Villanueva, 2000). Los resultados encontrados con la Dieta 3, la cual contenía aceite de ojo de atún, podría indicar que se requiere un cambio en la dieta para la segunda etapa del cultivo, debido a que probablemente haya un desbalance de nutrientes, pues en diferentes especies de cefalópodos, se ha reportado que la utilización de los lípidos disminuye conforme éstos se desarrollan (Lee *et al.*, 1995; Seixas *et al.*, 2010).

En los organismos de la Dieta 2, la relación DHA:EPA (1.59) fue más cercana a la recomendada para las especies marinas (1.5) (Okumura *et al.*, 2005), lo cual sugiere que la relación DHA:EPA en la dieta, favoreció que los organismos mantuvieran esta proporción y presentaran una tasa de crecimiento constante ( $1.42 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ) y un mayor porcentaje de supervivencia. En la Dieta 3, las cantidades de ARA ( $3.77 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y DHA ( $31.46 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), fueron más altas que en la Dieta 1 y Dieta 2, por lo que se podría asumir que la Dieta 3 era la más indicada para alimentar a los juveniles, porque estos valores se acercaban a los encontrados en los juveniles recién eclosionados (ARA:  $2.62 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  y DHA:  $29.82 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ , a los 42 días de cultivo). Sin embargo, los organismos alimentados con esta dieta, tanto a los 28 como a los 42 días de cultivo presentaron una disminución de estos ácidos grasos y no reflejaron el alto contenido de ARA y DHA presentes en la dieta, ya que las concentraciones estaban por debajo de los valores encontrados en los organismos recién eclosionados. El contenido de EPA reflejó el contenido de este ácido graso en la dieta, pero la concentración se mantuvo por debajo de aquel presente en los juveniles recién eclosionados.

Los organismos alimentados con la Dieta 1 y Dieta 2, tanto a los 28 como a los 42 días de cultivo reflejaron un contenido de ARA cercano al encontrado en las dietas. La concentración de EPA y DHA en estos pulpos en ambos periodos fueron más altos que el contenido presente en las dietas formuladas. En relación a la concentración de DHA, los organismos de estos tratamientos, tuvieron una concentración más alta de este ácido graso que la encontrada en las dietas, con una diferencia promedio en ambos periodos de  $13 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Dieta 1) y  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Dieta 2) con respecto a la dieta.

Las concentraciones de los ácidos grasos presentes en los juveniles recién eclosionados marcaron más similitudes con los organismos alimentados con la Dieta 1, a pesar de esto, no se observó beneficio por parte de esta dieta. La reducción del contenido de DHA en los organismos que recibieron la Dieta 3 ocasionó que la relación DHA:EPA en los organismos fuera menor que en la dieta suministrada ( $2.48 \pm 0.21$ , 28 días y  $2.26 \pm 0.16$ , 42 días) en comparación a la que se ofreció en el alimento ( $3.84 \pm 0.12$ ), acercándose más a la relación DHA:EPA presente en los organismos recién eclosionados ( $2.01 \pm 0.06$ ).

Se ha encontrado que los organismos marinos poseen menor capacidad para producir ácidos grasos de cadena larga y altamente insaturados (Monroig *et al.*, 2011), sin embargo, algunos peces marinos como *Solea senegalensis* (Li *et al.*, 2010) y *Sinagus canaliculatus* (Morais *et al.*, 2012) poseen la capacidad de producir ARA, EPA y DHA a partir de los ácidos grasos linolénico ( $18:3n-3$ ) y linoleico ( $18:2n-6$ ) por medio de las enzimas desaturadas  $\Delta 6$  y  $\Delta 4$ . En *O. vulgaris*, se ha observado la presencia de DHA a pesar de que éste no sea suministrado por la dieta, posiblemente como una adaptación de los juveniles recién

eclosionados para retener los lípidos esenciales o cierta capacidad de biosíntesis (Navarro y Villanueva, 2000; Seixas *et al.*, 2010; Viciano *et al.*, 2011). Seixas *et al.* (2010), reportaron en paralarvas de *O. vulgaris* de 10 y 15 dde y que fueron alimentadas con *Artemia* enriquecida con DHA-Selco, contenidos de DHA más bajos que las paralarvas recién eclosionadas, además observaron que estos mismos organismos conservaron el contenido de EPA inicial. En el presente trabajo, con juveniles de *O. bimaculoides*, se documenta que a pesar de que las dietas contenían un perfil bajo de ciertos ácidos grasos, los pulpos alimentados con dichas dietas presentaron un contenido de esos mismos ácidos grasos similar o más alto al que poseían al día de su eclosión. Resultados similares han sido reportados por Navarro y Villanueva (2003), Seixas *et al.* (2010) y Viciano *et al.* (2011) en paralarvas de *O. vulgaris*. El tipo y calidad de la dieta ha sido muy estudiado en especies de pulpo que tienen etapa de paralarva, en los organismos con desarrollo directo (sin etapa larvaria), los trabajos son escasos, por lo que es importante profundizar en el conocimiento de la biología básica de estas especies como *O. bimaculoides* ya que se considera con potencial para desarrollar su cultivo.

Los resultados del presente trabajo, indican que es posible que los juveniles de *O. bimaculoides* posean la capacidad de producir de novo ácidos grasos como ARA, EPA y DHA, ya que resultados similares se han documentado en *O. vulgaris*, debido a que los organismos pueden presentar un mayor contenido de estos ácidos grasos del que les fue suministrado. En algunos cefalópodos como *Sepia officinalis* y *O. vulgaris*, aun no se ha confirmado la presencia o funcionalidad de enzimas desaturasas y elongasas como las que se han encontrado en peces diádromos o teleósteos como las desaturasas  $\Delta 4$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 8$  y enzimas de la familia de las elongasas Elovl (por sus siglas en inglés, Elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga); Elovl4, Elovl5, Elovl2 (Buzzi *et al.*, 1996, 1997; Sprecher, 2000; Tocher *et al.*, 2003; Cook y McMaster, 2004; Morais *et al.*, 2009; Monroig *et al.*, 2011, 2013b), solamente se ha documentado una enzima similar a la desaturasa  $\Delta 5$ , la cual está encargada de la síntesis de ARA y EPA a partir de 20:3n-6 y 20:4n-3 respectivamente, sin embargo, estos dos ácidos grasos son raros en la dieta de estos cefalópodos. Además de la enzima  $\Delta 5$ , también se ha encontrado la elongasa Elovl5/2 en *S. officinalis* y *O. vulgaris*, la cual posee una actividad similar a las elongasas Elovl5 y Elovl2, con capacidad de elongar ácidos grasos C18 a C20 (Monroig *et al.*, 2012a, 2012b, 2013a). Con base en los resultados de la presente investigación, se requiere continuar probando diferentes dietas en los juveniles de *O. bimaculoides* y obtener los perfiles tanto de las dietas como de los organismos para comprender con mayor detalle el comportamiento de los ácidos grasos altamente insaturados.

A pesar de la influencia que el alimento pueda tener sobre el contenido de ácidos grasos en los organismos, al proveer una dieta enriquecida, no siempre se obtienen los resultados esperados, como mejor

supervivencia o crecimiento (Morais *et al.*, 2004; Villalta *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2010). Lo anterior puede indicar que la absorción de los ácidos grasos altamente insaturados, no depende únicamente de su adición en la dieta, sino también de su presentación (Seixas *et al.*, 2010). Los resultados de la presente investigación, sugieren que el tipo de nutrientes y el balance en que estos se encontraron presentes en la dieta, influyeron sobre el desempeño biológico de los juveniles de *O. bimaculoides*.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

- El crecimiento con la dieta de mayor proporción de jaiba (80%) y sin inclusión de aceite de ojo de atún, favoreció un mejor crecimiento, con una ganancia de 105% del peso inicial (56.54 mg) hasta los 42 días de cultivo, además, esta dieta mantuvo la mejor supervivencia con 97.92% a los 28 días de cultivo y 95.65 % a los 42 días de cultivo.
- El desarrollo de los organismos, estimado con base en el número de ventosas hasta el día 28 de cultivo, mostró que las dietas tuvieron un efecto significativo. Los pulpos que recibieron las dietas 2 y 3 incrementaron a 34 el número de ventosas.
- El tiempo de desarrollo de los ocelos utilizado como un indicador de la mejor dieta proporcionada a los juveniles de pulpo, indicó que, a los 21 días de cultivo el 55% de los organismos que recibieron la dieta con mayor cantidad de jaiba (80%) y sin aceite de ojo de atún presentaron los ocelos.
- Las concentraciones de ARA, EPA y DHA, sugieren que los organismos recién eclosionados de la especie *O. bimaculoides* requieren una mayor cantidad de ácidos grasos durante los primeros 28 días de cultivo, pero después de este periodo, los organismos pueden alimentarse con una dieta sin inclusión de aceite de ojo de atún (Dieta 2), la cual generó los mejores resultados entre los 28 y 42 días de cultivo.
- Los resultados de esta investigación, sugieren que el tipo de nutrientes y el balance en que estos se encontraron presentes en la dieta influyeron sobre el desempeño biológico de los juveniles de *O. bimaculoides*.

## Recomendaciones

---

- Realizar pruebas con dietas con porcentajes distintos de los mismos ingredientes utilizados en este trabajo y obtener la composición de proteínas, lípidos, carbohidratos, perfil de aminoácidos y energía, tanto de las dietas como de los individuos recién eclosionados y en cultivo, para establecer una dieta de mejor calidad que pueda utilizarse durante todo el cultivo o en cierto periodo de éste.
- Es necesario estandarizar una técnica para el conteo de las ventosas que permita llevar a cabo el conteo en los brazos que han perdido volumen, además de realizar estudios histológicos para precisar el momento de aparición de los ocelos.
- Realizar el perfil de ácidos grasos de los organismos recién eclosionados, con pulpos en periodo de inanición y los organismos alimentados con diferentes dietas en periodos consecutivos, de tal modo que se genere información sobre el comportamiento de los ácidos grasos en el tiempo bajo cada condición establecida.
- Es necesario realizar pruebas moleculares en búsqueda de enzimas desaturasas y elongasas que pudieran participar en la síntesis de ácidos grasos altamente insaturados, así como extenuar la búsqueda de posibles ácidos grasos contenidos en la dieta que pudieran ser los sustratos para la formación *de novo* de los ácidos grasos esenciales.

## Literatura citada

---

- André, J., Pecl, G. T., Semmens, J. M., y Grist, E. P. M. (2008). Early life-history processes in benthic octopus: Relationships between temperature, feeding, food conversion, and growth in juvenile *Octopus pallidus*, 354, 81–92. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.10.008>
- Aguado-Giménez, F. y García-García, B. (2002). Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10(5), 361-377.
- Berger, E. (2010). Aquaculture of *Octopus* species: present status, problems and perspectives. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1), 384–399.
- Boletzky, S. V., y Villanueva, R. (2014). Cephalopod Biology. En *Cephalopod Culture* (pp. 3–16). Springer Netherlands.
- Briceño, F., Mascaró, M., y Rosas, C. (2010). GLMM-based modelling of growth in juvenile *Octopus maya* siblings: does growth depend on initial size? *ICES Journal of Marine Science*.
- Buzzi, M., Henderson, R.J. y Sargent, J.R. (1996). The desaturation and elongation of linolenic acid and eicosapentaenoic acid by hepatocytes and liver microsomes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. *Biochim. Biophys. Acta* 1299, 235-244.
- Buzzi, M., Henderson, R.J. y Sargent, J.R. (1997). Biosynthesis of docosahexaenoic acid in trout hepatocytes proceeds via 24-carbon intermediates. *Comp. Biochem. Physiol.* 116B, 263–267.
- Çelik, M., Türeli, C., Çelik, M., Yanar, Y., Erdem, Ü. y Küçükgülmez, A. (2004). Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in the north-eastern Mediterranean. *Food Chemistry*, 88(2), 271-273.
- Caamal-Monsreal, C., Mascaró, M., Gallardo, P., Rodríguez, S., Noreña-Barroso, E., Domingues, P., y Rosas, C. (2015). Effects of maternal diet on reproductive performance of *Octopus maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchling quality. *Aquaculture*, 441, 84-94.
- Carreón-Palau, L., Del Ángel-Rodríguez, J. y Arjona-López, Ma. O. (2007). Evaluación de la biomasa microalgal. Ix: determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases-espectrometría de masas. En: *Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases-espectrometría de masas*.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). (2008a). Diagnóstico y Planificación Regional de la Pesca y Acuacultura en México. Región I: Pacífico Norte. Recuperado el 10 de junio del 2015 de: <http://www.gob.mx/conapesca/documentos/programa-rector-nacional-de-pesca-y-acuacultura-sustentables>.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). (2008b). Pulpo. Región I: Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit. Recuperado el 10 de junio del 2015 de: <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/documentos/moluscos/pulpo/Pulpo%20Region%20I.pdf>.

- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). (2011). Anuario estadístico de acuacultura y pesca. 311 p. Recuperado el 10 de junio del 2015 de: <http://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca>
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). (2012). Anuario estadístico de acuacultura y pesca. 385 p. Recuperado el 28 de enero del 2016 de: <http://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca>.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). (2013). Anuario estadístico de acuacultura y pesca. 299 p. Recuperado el 28 de enero del 2016 de: <http://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca>
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). (2014). Seguimiento oportuno de la temporada de pulpo en los estados de Campeche y Yucatán 2014. Recuperado el 05 de agosto del 2015: <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx>.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). (2015). Seguimiento oportuno de la temporada de pulpo en los estados de Campeche y Yucatán 2015. Recuperado el 26 de junio del 2017 de: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/89174/SO\\_PULPO\\_SEMANA\\_19\\_2015.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/89174/SO_PULPO_SEMANA_19_2015.pdf)
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA) (2017, 11 de mayo). México, tercer productor mundial de pulpo, “un manjar de los mares”. Recuperado el 14 de junio del 2017 de: <http://www.gob.mx/conapesca/articulos/mexico-tercer-productor-mundial-de-pulpo-un-manjar-de-los-mares>
- Cook, H.W. (1996). Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. En *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier Science. Recuperado el 11 de abril del 2017 <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=yid=EGMuwXqDbkcCyoI=fndypg=PA129ydq=Fatty+acid+desaturation+and+chain+elongation+in+eukaryotesyots>
- Cortez, T., Castro, B. G., y Guerra, A. (1995). Reproduction and condition of female *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Biology*, 123(3), 505-510.
- Domingues, P. M., López, N., Muñoz, J. A., Maldonado, T., Gaxiola, G., y Rosas, C. (2007). Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13(4), 273-280.
- FAO. (2012). SOFIA: El Estado Mundial de la Pesca. Rome Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. (2014). SOFIA: El Estado Mundial de la Pesca. Rome Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Forsythe, J. W., y Hanlon, R. T. (1988). Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Marine Biology*, 98, 369–379.
- Froesch, D., y Packard, A. (1979). Octopus chromatophores accumulate nickel. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 35(6), 828-830.

- Fujisawa, T., Akagi, S., Kawase, M., Yamamoto, M., y Ohmori, S. (2005). D-Lactate metabolism in starved *Octopus ocellatus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 303(6), 489-496.
- García, S., Domínguez, P., Navarro, J. C., Hachero, I., Garrido, D., y Rosas, C. (2011). Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), e174-e187.
- García-García, J., Luaces, M., Veiga, C., y Rey-Méndez, M. (2014). Farming Costs and Benefits, Marketing Details, Investment Risks: The Case of *Octopus vulgaris* in Spain. En *Cephalopod Culture* (pp. 149–161). Springer Netherlands.
- GBIF Secretariat: GBIF Backbone Taxonomy. doi:10.15468/39omei. Recuperado el 25 de julio del 2016 de: <http://www.gbif.org/species/2289644> on
- Globefish, 2014. Octopus - September 2014. Recuperado el 01 de agosto del 2016 de: <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/337024/>.
- Globefish, 2015. Octopus - September 2014. Recuperado el 01 de agosto del 2016 de: <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/337011/>.
- Globefish, 2017. Global octopus landings appear to be on an increasing trend. Recuperado el 17 de mayo del 2017 de: <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/463165/>.
- Hanlon, R. T., y Forsythe, J. W. (1985). Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*, 35(1), 33.
- Hockachka, P. W., Hartline, P. H., y Fields, J. H. (1977). Octopine as an end product of anaerobic glycolysis in the chambered nautilus. *Science*, 195(4273), 72-74.
- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Otero, J. J., y Moxica, C. (2000). Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): present knowledge, problems and perspectives. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47, 313-321.
- Iglesias, J., Otero, J. J., Moxica, C., Fuentes, L., y Sánchez, F. J. (2004). The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12(4), 481-487.
- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Bersano, J. G. F., Carrasco, J. F., Dhont, J., Fuentes, L. y Villanueva, R. (2007). Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266, 15. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.019>
- IICA-COFUPRO. (2010). Programas de documentación de casos de éxito. Recuperado el 06 de mayo del 2015 de: <http://www.redinnovagro.in/casosexito/18dfamaranto.pdf>
- Jereb, P., Roper, C. F. E., Norman, M. D., y Finn, J. K. (2014). *Cephalopods of the world: an annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date, volume 1. Chambered nautilus and Sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae)*. (FAO). Roma.

- Küçükgülmez, A., Çelik, M., Yanar, Y., Ersoy, B. y Çikrikçi, M. (2006). Proximate composition and mineral contents of the blue crab (*Callinectes sapidus*) breast meat, claw meat and hepatopancreas. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1053. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01159.x.
- Lecuanda-Ontiveros, M. (2014). Preferencia térmica de pulpo *Octopus bimaculoides*. Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y Estudio Superior de Ensenada.
- Lee, P. G. (1995). Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 25(1-3), 35-51.
- Leporati, S. C., Pecl, G. T., y Semmens, J. M. (2008). Reproductive status of *Octopus pallidus*, and its relationship to age and size. *Marine Biology*, 155, 375–385. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s00227-008-1033-9>
- Li, Y.; Monroig, Ó.; Zhang, L.; Wang, S.; Zheng, X.; Dick, J.R.; You, C.; Tocher, D.R. (2010). Vertebrate fatty acyl desaturase with  $\Delta 4$  activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 107, 16840–16845.
- Mangold, K., y Boletzky, S. (1973). New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19, 7–12. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/BF00355414>
- Martínez, R., Gallardo, P., Pascual, C., Navarro, J., Sánchez, A., Caamal-Monsreal, C., y Rosas, C. (2014). Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, 426, 310-317.
- Mentado, P. (2015, 11 de marzo). Pulpo de Yucatán, suficiente para la cuaresma. Recuperado el 20 de agosto del 2015 de <http://www.unionyucatan.mx/articulo/2015/03/11/economia/pulpo-de-yucatan-suficiente-para-la-cuaresma>.
- Messenger, J. B. (2001). Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biological Reviews*, 76(4), 473-528.
- Miliou, H., Fintikaki, M., Kountouris, T., y Verriopoulos, G. (2005). Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 249(1), 245-256.
- Mommsen, T. P., French, C. J., Emmett, B., y Hochachka, P. W. (1982). The fate of arginine and proline carbon in squid tissues. *Pacific Science*. 36, 343-348.
- Monroig, Ó., Navarro, J. C., y Tocher, D. R. (2011). Long-chain polyunsaturated fatty acids in fish: recent advances on desaturases and elongases involved in their biosynthesis. En *Proceedings of the XI International Symposium on Aquaculture Nutrition* (pp. 257-282). Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, Nuevo León, México.
- Monroig, Ó.; Guinot, D.; Hontoria, F.; Tocher, D.R.; Navarro, J.C. (2012a). Biosynthesis of essential fatty acids in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): Molecular cloning, functional characterisation and tissue distribution of a fatty acyl elongase. *Aquaculture*. 360–361, 45–53.
- Monroig, Ó.; Navarro, J.C.; Dick, J.R.; Alemany, F.; Tocher, D.R. (2012b). Identification of a  $\Delta 5$ -like fatty acyl desaturase from the cephalopod *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) involved in the biosynthesis of essential fatty acids. *Mar. Biotechnol.* 14, 411–422.

- Monroig, Ó.; Hontoria, F.; Varó, I.; Tocher, D.R.; Navarro, J.C. (2013a). Investigating the essential fatty acid requirements of the cephalopod *Sepia officinalis*: A molecular approach. En *Proceedings of Larvi. 6th Fish and Shellfish Symposium*, Ghent, Belgium, 2–5 September 2013; pp. 286–289.
- Monroig, Ó., Tocher, D. R., y Navarro, J. C. (2013b). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms. *Marine drugs*, 11(10), 3998-4018.
- Morais, S., Koven, W., Rønnestad, I., Dinis, M. T., y Conceição, L. E. (2005). Dietary protein: lipid ratio and lipid nature affects fatty acid absorption and metabolism in a teleost larva. *British Journal of Nutrition*, 93(06), 813-820.
- Morais, S., Monroig, Ó., Zheng, X., Leaver, M.J. y Tocher, D.R. (2009) Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of Elovl5- and Elovl2-like elongases. *Mar. Biotechnol.* 11, 627–639.
- Morais, S.; Castanheira, F.; Martínez-Rubio, L.; Conceição, L.E.C.; Tocher, D.R. (2012). Long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: Ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with  $\Delta 4$  activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1821, 660–671.
- Moxica, C., Linares, F., Otero, J. J., Iglesias, J., y Sánchez, F. J. (2002). Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo, *Octopus vulgaris*, Cuvier, 1797, en tanques de 9 m<sup>3</sup>. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18(1-4), 31-36.
- Navarro, J. C., y Villanueva, R. (2000). Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: An approach to their lipid requirements. *Aquaculture*, 183(1-2), 161–177. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00290-2](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00290-2)
- Navarro, J. C., y Villanueva, R. (2003). The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: Deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, 219, 613–631. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00311-3](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00311-3)
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., y Rosas, C. (2013a). Thermopreference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile *Octopus maya* acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 38, 14–19. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.09.001>
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-barroso, E., Díaz, F., Re, D., Rosas, C. (2013b). Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 445, 156–165. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.04.008>
- O'Dor, R. K., Mangold, K., Boucher-Rodoni, R., Wells, M. J., y Wells, J. (1984). Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine y Freshwater Behaviour y Physiology*, 11(3), 239-258.
- O'Dor, R. K., y Wells, M. J. (1987). Energy and nutrient flow (cephalopods). En *Cephalopod life cycles*. Academic Press.
- Øie, G., Makridis, P., Reitan, K. I., y Olsen, Y. (1997). Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 153(1), 103-122.
- Olsen, A. I., Attramadal, Y., Reitan, K. I., y Olsen, Y. (2000). Food selection and digestion

- characteristics of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae fed cultivated prey organisms. *Aquaculture*, 181(3), 293-310.
- Orban, E., Di Lena, G., Navigato, T., Casini, I., Marzetti, A., y Caproni, R. (2002). Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry*, 77(1), 57-65.
- Okumura, S., Kurihara, A., Iwamoto, A., y Takeuchi, T. (2005). Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*: Improved survival and growth of common octopus paralarvae. *Aquaculture*, 244, 147-157. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.044>
- Pérez, M. C., López, D. A., Aguila, K., y González, M. L. (2006). Feeding and growth in captivity of the octopus *Enteroctopus megalocyathus* Gould, 1852. *Aquaculture Research*, 37(6), 550-555.
- Petza, D., Katsanevakis, S., y Verriopoulos, G. (2006). Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed ad libitum on a high-lipid diet. *Marine Biology*, 148(4), 827-832.
- Pierce, G. J., Allcock, L., Bruno, I., Jereb, P., Lefkaditou, E., Malham, S. y Villanueva, R. (2010). Cephalopod biology and fisheries in Europe. ICES.
- Pierce, G. J., y Portela, J. (2014). Fisheries Production and Market Demand. En Villanueva, R., Sykes, A. V., Vidal, E. A., Rosas, C., Nabhitabhata, J., Fuentes, L., y Iglesias, J. (Ed.), *Cephalopod Culture* (pp. 41-58). Springer Netherlands.
- Pirini, M., Manuzzi, M. P., Pagliarani, A., Trombetti, F., Borgatti, A. R., y Ventrella, V. (2007). Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147(4), 616-626.
- Prato, E., Portacci, G., y Biandolino, F. (2010). Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 309, 203-211. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.036>
- Quintana, D., Domingues, P., y García, S. (2008). Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*, 280 (1), 161-164.
- Quintana D., Rosas C., Moreno-Villegas E. (2011) Relationship between nutritional and rearing parameters of *Octopus maya* juveniles fed different rations of crab paste. *Aquac. Nutr.* 17e:379-388
- Rosas, C., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Chay, D., López, N., Domingues, P. M. (2007). Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, 152, 371-381. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s00227-007-0692-2>
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., y Cuzon, G. (2008). Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, 275(1), 291-297.
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., y Pascual, C. (2014). *Octopus maya*. En *Cephalopod Culture* (pp. 383-396). Springer Netherlands.

- Rosas, C., Sánchez, A., Pascual, C., Aguila, J., Maldonado, T., y Domingues, P. (2011). Effects of two dietary protein levels on energy balance and digestive capacity of *Octopus maya*. *Aquaculture international*, 19(1), 165-180.
- Rosas C., Valero A., Caamal-Monsreal C., Uriarte I., Farias A., Gallardo P., Sánchez A., Domingues P. (2013) Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research* 44: 1059–1044
- SAGARPA. (2013). Comunicado de prensa. Recuperado el 17 de julio del 2015 de: <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx>
- SAGARPA. (2015). Comunicado de prensa. Recuperado el 10 de agosto del 2016 de: <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx>
- Sakurai, Y., Bower, J. R., Nakamura, Y., Yamamoto, S., y Watanabe, K. (1996). Effect of temperature on development and survival of *Todarodes pacificus* embryos and paralarvae. *American Malacological Bulletin*, 13, 89–95.
- Salem Jr, N., Litman, B., Kim, H-Y. y Gawrisch K. (2001) Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36, 945-949.
- Sargent, J. R., Tocher, D. R., y Bell, G. (2002). The lipids. En J. E. Halver y R. W. Hardy (Eds.), *Fish nutrition* (Tercera ed, pp. 181–253).
- Sato N, y Murata N. (1988) Membrane lipids. *Methods Enzymol* 167: 251-259
- Secretaría de Gobierno (SEGOB). (2014). Diario Oficial de la Federación. Recuperado el 28 de junio del 2015 de: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5352214yfecha=14/07/2014](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5352214yfecha=14/07/2014)
- Seixas, P., Otero, A., Valente, L. M. P., Dias, J., y Rey-Méndez, M. (2010). Growth and fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae fed with enriched *Artemia* or co-fed with an inert diet. *Aquaculture International*. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10499-010-9328-5>
- Solorzano, Y., Viana, M. T., López, L. M., Correa, J. G., True, C. C., y Rosas, C. (2009). Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: Growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. *Aquaculture*, 289(1-2), 84–90. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.036>
- Sprecher, H. (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*. 1486, 219-231.
- Stoskopf, M. K., y Oppenheim, B. S. (1996). Anatomic Features of *Octopus bimaculoides* and *Octopus digueti*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 27(1), 1–18.
- Suarez-Salcido, A. L. (2016) Efecto de la temperatura de incubación sobre la tolerancia térmica y composición de ácidos grasos de juveniles recién eclosionados de *Octopus bimaculoides*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 51 p.
- Sykes, A. V., Koueta, N., y Rosas, C. (2014). Historical Review of Cephalopods Culture. En *Cephalopod Culture* (pp. 59–75). Springer Netherlands.

- Tercero, J. F., Rosas, C., Mascaro, M., Poot, G., Domingues, P., Noreña, E., Camaal-Monsreal, C., Pascual, C., Estefanell, J. y Gallardo, P. (2015). Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture*, 448, 234-242.
- Tocher, D. R., Agaba, M. K., Hastings, N., y Teale, A. J. (2003). Biochemical and molecular studies of the polyunsaturated fatty acid desaturation pathway in fish. Tocher, D.R. (2010) Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Res.* 41, 717-732.
- Uriarte, I., Rosas, C., Viana, M., Navarro, J. C., Seixas, P., Vidal, E. y Zuñiga, O. (2011). Current Status and Bottle Neck of Octopod Aquaculture: The Case of American Species. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(6), 735–752.
- Van Heukelem, W. F. (1976). Growth, bioenergetics and life-span of *Octopus cynea* and *Octopus maya*, 232.
- Viciano, E., Iglesias, J., Lago, M. J., Sánchez, F. J., Otero, J. J., y Navarro, J. C. (2011). Fatty acid composition of polar and neutral lipid fractions of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae reared with enriched on-grown *Artemia*. *Aquaculture Research*, 42(5), 704-709.
- Villalta, M., Estévez, A., y Bransden, M. P. (2005). Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 245(1), 193-209.
- Villanueva, R., Riba, J., Ruiz-Capillas, C., González, A. V., y Baeta, M. (2004). Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*, 242(1), 455-478.
- Villanueva, R., y Norman, M. D. (2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. En *Oceanography and Marine Biology*. Taylor y Francis. 46, 105–202.
- Villanueva, R., Sykes, A. V., Vidal, E. A., Rosas, C., Nabhitabhata, J., Fuentes, L., y Iglesias, J. (2014). *Cephalopod Culture*. Springer Netherlands.
- Webster, C. D., y Lim, C. (Eds.). (2002). *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture*. Cabi. Recuperado el 20 de agosto del 2015 de: <https://books.google.com.mx/books?hl=esylr=yid=9Vohcd0ISJQCyoI=fndyypg=PR9yots=NrGsxe2W16ysig=iodfiocnWzHR8WHGI4BZfA5rpzl#v=onepageyqyf=false>
- Wells, M. J., O'Dor, R. K., Mangold, K., y Wells, J. (1983). Diurnal changes in activity and metabolic rate in *Octopus vulgaris*. *Marine y Freshwater Behaviour y Phy*, 9(4), 275-287.
- Zuñiga, O., Olivares, A., y Torres, I. (2011). Evaluación del crecimiento del pulpo común *Octopus mimus* del norte de Chile alimentado con dietas formuladas. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(3), 584–592. Recuperado de: <http://doi.org/10.3856/vol39-issue3-fulltext-18>