



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Desarrollo de Piensos Formulados y
Requerimientos Nutritivos del Pulpo
de Roca (*Octopus vulgaris*).

D^a. María Piedad Sánchez Morillo-Velarde

2013



Universidad de Murcia.

Facultad de Biología.

Departamento Fisiología Animal.

Desarrollo de piensos formulados y requerimientos nutritivos del pulpo de roca (*Octopus vulgaris*).

**Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Biología**

María Piedad Sánchez Morillo-Velarde

Murcia, 2013



Directores:

Dr. Jesús Cerezo Valverde

Dr. Benjamín García García

**“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir”**

(T.S. Elliot)

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han participado en la realización de este trabajo:

- En especial al Dr. Jesús Cerezo Valverde, director de esta tesis, por su orientación, seguimiento y supervisión continua pero, sobre todo, por su gran paciencia y entrega a lo largo de estos años; y al Dr. Benjamín por la dirección de este trabajo, y por tenderme la mano y una sonrisa en todo momento.

- A todos mis compañeros del IMIDA: a Pepe, Pedro, Jorge, Ángel P., Irene, Mari Carmen y Cristino, con los que he compartido muy buenos ratos de laboratorio y almuerzos, y a los que echaré mucho de menos; a mis compañeros de despacho Carmelo, Ángel y Mateo, que han sido como mi familia y han sabido hacer de mis peores días, los mejores; a Felipe, por saber escucharme y orientarme cuando me encontraba perdida; a Lola por sus consejos y agradable compañía; y a mis ex-compañeras María, Susi, Ana y Mar, por el granito de arena que han aportado, cada una de ellas, para hacer de mi alguien mejor.

- A mis amigos de la Facultad de Biología, por los buenos ratos que hemos vivido juntos y los que seguimos viviendo: a Jorge por sus cafés mañaneros, a José por sus conversaciones y consejos, a Domingo y Manu por su ayuda en el IMIDA, a Galián y Ramón por sus intensos debates, a Manu Mira por poder seguir disfrutando de su compañía, y, en especial, a María y Laura por estar a mi lado siempre que las necesito.

- A mis antiguos compañeros del Departamento de Ecología de la Universidad de Murcia, que, aun en la distancia, siempre han contado conmigo: Pedro, David S., Javi, Félix, Tano, Paula, María Dolores, David C., Dani, José Antonio, Simone, Carlos, Pancho, y al resto de compañeros y profesores del Departamento, porque sin todos ellos mi estancia allí no guardaría tan buenos recuerdos.

- A mis amigas Eva y Paqui por haberme apoyado todos estos años y animado a continuar con mis objetivos, así como por su infinita e incondicional amistad. También al resto de amigos y amigas que han sabido disculpar mis ausencias y siempre han tenido palabras de ánimo.

- A todos los miembros de mi gran familia que, sin entender muy bien a qué me dedicaba, siempre me han arropado y animado a luchar por mis propósitos. En especial quería agradecerse a mis padres, por una vida llena de esfuerzo y dedicación a sus hijos, por el apoyo incondicional, y confianza plena que han depositado en mí, para lograr mis objetivos en todos los ámbitos de la vida. A mis hermanos José Antonio y Rosalía, por ser grandes amigos y estar siempre a mi lado, y por sentirse orgullosos de mis logros y ayudarme a levantarme en mis derrotas.

- Y por último, le dedico este trabajo a Jesús, mi novio, al que agradezco toda la fuerza que me ha transmitido, todo el cariño y el amor que me ha entregado, y toda la comprensión que ha mostrado durante estos años; sin él no habría llegado a donde he llegado, por lo que a él le debo cada una de estas palabras de agradecimiento.

Si de algo puedo presumir es de las grandes personas que he conocido, que siguen a mi lado y que me apoyan en todas las decisiones importantes de mi vida. Ellos son los que me hacen afortunada.

A todos, muchas gracias.

La realización de esta Tesis ha sido llevada a cabo gracias a una beca predoctoral (2009-2013) del Instituto Murciano de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIDA), en el Marco del Plan de Ciencia y Tecnología para el período 2007-2010 en la Región de Murcia, y cofinanciado por los Fondos Sociales Europeos. Los proyectos de los que forma parte esta Tesis han sido financiados por JACUMAR, a través de los Planes Nacionales de Cultivos Marinos, y por la Consejería de Agricultura y Agua de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia cofinanciado por los Fondos FEDER, a través del proyecto PO-07-001.

Publicaciones

Publicaciones Científico-Técnicas derivadas de esta Tesis Doctoral.

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García, B., 2011. Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Molluscan Studies* 77, 318–320.

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García, B., 2012. Changes in lipid composition of different tissues of common octopus (*Octopus vulgaris*) during short-term starvation. *Aquaculture Research*, doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03131.x

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F., García García, B., 2012. Growth and digestibility of formulated diets based on dry and freeze-dried ingredients in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 368-369, 139–144.

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2013. A simple format feed to test the acceptability of ingredients for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture Research* (Enviado).

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2013. Lipid requirements of common octopus (*Octopus vulgaris*) obtained from formulated diets with different fish oil content. *Aquaculture International* (Enviado).

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Aguado-Giménez, F., Hernández, M.D., García García, B., 2013. Effective use of glucose rather than starch in formulated semi-moist diets of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture Nutrition* (Enviado).

Publicaciones Científico-Técnicas no derivadas de esta Tesis Doctoral.

Cerezo Valverde, J., Hernández M.D., Aguado-Giménez, F., Morillo-Velarde, P.S., García García B., 2012. Performance of formulated diets with different level of lipids and glutamate supplementation in *Octopus vulgaris*. Aquaculture Research, doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03201.x

Querol, P., Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Martínez Llorens, S., Moñino, A.V., Jover, M., Tomás, A., 2012. First assessment of acceptance of dry extruded diets for *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) Aquaculture Research, doi:10.1111/are.12006.

Querol, P., Morillo-Velarde, P S, Cerezo Valverde, J., Martínez Llorens, S., Moñino, A.V., Jover, M., Tomás, A., 2012. Inclusion of fish and krill meal in extruded diets for *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): assessment of acceptance. Aquaculture Research, doi:10.1111/are.12093.

Abreviaturas

CHO	Colesterol
CPV	Valor Productivo de los Carbohidratos
DG	Diglicéridos
FFA	Ácidos Grasos Libres
IC	Índice de Conversión
IEA	Índice de Eficacia Alimentaria
IGD	Índice de la Glándula Digestiva
IP	Incremento de Peso
IPE	Índice del Peso Eviscerado
LNT	Lípidos Neutros Totales
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
LPT	Lípidos Polares Totales
LPV	Valor Productivo de los Lípidos
MG	Monoglicéridos
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
Pe	Peso Eviscerado
PE	Fosfatidiletanolamina
Pf	Peso final
PGD	Peso de la Glándula Digestiva
Pi	Peso Inicial
PI	Fosfatidilinositol
PIG	Pigmentos
Pm	Peso Medio
PPV	Valor Productivo de la Proteína
PS	Fosfatidilserina
TAA	Tasa de Alimentación Absoluta
TAAC	Tasa de Alimentación Absoluta de Carbohidratos
TAAL	Tasa de Alimentación Absoluta de Lípidos
TAAP	Tasa de Alimentación Absoluta de Proteína
TAR	Tasa de Alimentación Relativa
TCA	Tasa de Crecimiento Absoluta
TEC	Tasa Específica de Crecimiento
TG	Triglicéridos
SE	Ésteres de Esterol
SL	Sulfolípidos
SM	Esfingomielina

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	3
1.2. Problemas actuales del cultivo del pulpo.....	4
1.2.1. <i>Cultivo de paralarvas de pulpo</i>	5
1.2.2. <i>Engorde el subadultos de pulpo</i>	5
1.3. Parámetros.....	6
1.3.1 <i>Parámetros ambientales</i>	6
<i>Salinidad</i>	6
<i>Temperatura</i>	7
<i>Oxígeno disuelto</i>	7
<i>Productos nitrogenados</i>	8
1.3.2. <i>Parámetros de cultivo</i>	8
<i>Consumo de oxígeno y caudales de agua</i>	8
<i>Generación de residuos sólidos y productos nitrogenados</i>	9
<i>Carga de cultivo</i>	9
<i>Maduración gonadal de las hembras</i>	10
<i>Crecimiento y supervivencia</i>	11
1.4. Mecanismos de alimentación.....	12
1.5. Desarrollo de dietas para el engorde del pulpo.	12
1.6. Requerimientos nutricionales del pulpo.....	14
1.6.1. <i>Proteínas</i>	15
1.6.2. <i>Lípidos</i>	15
1.6.3. <i>Carbohidratos</i>	15
1.6.4. <i>Metales pesados y minerales</i>	16
1.6.5. <i>Vitaminas</i>	17
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	19
SECCIÓN AYUNO	25
3. CAPITULO I: Variación en la composición lipídica durante el ayuno a corto plazo en distintos tejidos del pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>)	27

3.1. Introducción.....	29
3.2. Material y métodos.....	31
3.2.1. Animales de experimentación: captura y aclimatación.....	31
3.2.2. Diseño experimental.....	31
3.2.3. Métodos analíticos y determinación de las clases lipídica.....	34
3.2.4. Identificación y calibración para la cuantificación de las clases lipídica.....	34
3.2.5. Parámetros obtenidos y análisis de los datos.....	38
3.3. Resultados.....	38
3.4. Discusión.....	46
3.4.1. Variaciones en la composición y el contenido lipídico del tejido muscular.....	46
3.4.2. Variaciones en la composición y el contenido lipídico de la glándula digestiva.	47
3.4.3. Contribución energética de los lípidos en <i>O. vulgaris</i>	49
4. CAPITULO II: Contribución energética de los carbohidratos durante el ayuno en el pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>).....	51
4.1. Introducción.....	53
4.2. Materiales y métodos.....	54
4.3. Resultados y discusión.....	54
SECCIÓN ACEPTABILIDAD.....	61
5. CAPITULO III: Formato sencillo de alimentación para comprobar la aceptabilidad de ingredientes en el pulpo de roca (<i>Octopus vulgaris</i>).	63
5.1. Introducción.....	65
5.2. Materiales y métodos.....	66
5.3. Resultados y discusión.....	70
SECCIÓN ENGORDE.....	77
6. CAPITULO IV: Crecimiento y digestibilidad de dietas formuladas a base de ingredientes secos y liofilizados en el pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>).....	79
6.1. Introducción.....	81
6.2. Material y métodos.....	83

6.2.1. Captura y aclimatación de los animales.....	83
6.2.2. Elaboración y estabilidad de las dietas formuladas.....	84
6.2.3. Diseño experimental.....	85
6.2.4. Recogida y conservación de las muestras.....	85
6.2.5. Método analítico.....	86
6.2.6. Determinación de la digestibilidad.....	86
6.2.7. Parámetros calculados y análisis de los datos.....	87
6.3. Resultados.....	88
6.4. Discusión.....	91
7. CAPITULO V: Requerimientos lipídicos de pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>) obtenidos a partir de dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado....	97
7.1. Introducción.....	99
7.2. Material y métodos.....	101
7.2.1. Captura y aclimatación de los animales.....	101
7.2.2. Elaboración y estabilidad de las dietas formuladas.....	101
7.2.3. Diseño experimental.....	103
7.2.4. Recogida y conservación de las muestras.....	103
7.2.5. Método analítico.....	104
7.2.6. Determinación e identificación de las clases lipídicas.....	104
7.2.7. Determinación de la digestibilidad.....	105
7.2.8. Parámetros calculados y análisis de los datos.....	105
7.3. Resultados.....	106
7.4. Discusión.....	113
8. CAPITULO VI: Utilización eficaz de la glucosa frente al almidón en dietas formuladas semihúmedas para el pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>).....	121
8.1. Introducción.....	123
8.2. Material y métodos.....	125
8.2.1. Captura y aclimatación de los animales.....	125
8.2.2. Elaboración y estabilidad de las dietas formuladas.....	126
8.2.3. Diseño experimental.....	127
8.2.4. Recogida y conservación de las muestras.....	128
8.2.5. Método analítico.....	128

8.2.6. <i>Determinación de la digestibilidad</i>	129
8.2.7. <i>Parámetros calculados y análisis de los datos</i>	129
8.3. Resultados.....	130
8.4. Discusión.....	134
9. DISCUSIÓN GENERAL	139
9.1. Requerimientos nutritivos del pulpo derivados del ayuno.....	141
9.2. Aceptabilidad de nuevos ingredientes para los piensos.....	141
9.3. Desarrollo de piensos formulados y requerimientos nutritivos.....	147
10. CONCLUSIONES	157
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
12. ANEXO	183

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes.

En los últimos años el pulpo de roca (*Octopus vulgaris*) ha despertado un gran interés en el campo de la acuicultura por ser un excelente candidato para el desarrollo de su producción a escala comercial (Vaz-Pires et al., 2004; García García y García García, 2011), presentando una serie de ventajas: se adapta fácilmente a vivir en cautividad, tiene altas tasas de crecimiento, superiores al 5% del peso corporal al día (Nixon, 1969; Mangold, 1983) con una elevada conversión del alimento, incorporando a su propio peso el 30-60% del alimento ingerido (Mangold y Boletzky, 1973; Mangold, 1983; Aguado-Giménez y García García, 2002); elevada fecundidad, produciendo de 100 a 500 mil huevos por hembra (Mangold, 1983; Iglesias et al., 1997), alto contenido proteico en su composición corporal, representando del 70 al 90% del peso seco (Lee, 1994), acepta como alimento todo tipo de animales marinos (peces, moluscos y crustáceos), además de un elevado precio y alta demanda en el mercado (Vaz-Pires et al., 2004).

Los primeros ensayos llevados a cabo con el pulpo en España se remontan a los años 90, debido al interés de la búsqueda de nuevas especies marinas cultivables comercialmente. Estos ensayos fueron llevados a cabo por el equipo de investigación del Centro Costero de Vigo del I.E.O. en las bateas de mejillones de Galicia, obteniendo resultados muy prometedores. La demanda creciente en el mercado de esta especie llevó a los investigadores, durante 1995 y 1999, a plantearse la posibilidad de su cultivo en cautividad llevando a cabo una serie de ensayos. Los resultados obtenidos por los distintos grupos de investigación en relación al crecimiento, índice de conversión y supervivencia fueron muy dispares. Entre los factores que afectaban a la variabilidad de los resultados se encontraban la temperatura, la carga del cultivo y el tipo de alimento. En 1997, el cultivo de pulpo adquiere interés a nivel nacional en las diferentes comunidades a partir de los resultados obtenidos por los equipos de investigación de Ciencias Marinas del Mar de Barcelona del CSIC (Villanueva, 1995), Centro Costero de Vigo del IEO (Iglesias et al., 1997) y del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago (Rama-Villar et al., 1997), siendo básicas las

contribuciones anteriores del equipo del Instituto de Ciencias Marinas de Vigo del CSIC (Guerra, 1978; Guerra y Nixon, 1987).

Durante el periodo 1997 y 2000 se intensificaron los esfuerzos con otras instituciones nacionales (Universidades, CSIC, SGPM, JACUMAR, CYTMAR y Xunta de Galicia). Entre 2000 y 2004 la investigación sobre esta especie se repartió entre numerosos equipos de investigación de las distintas CCAA (Galicia, Asturias, Cataluña, Valencia, Murcia, Andalucía, Baleares y Canarias) dentro del Plan Nacional de JACUMAR de “Cultivo de Pulpo”. Este proyecto iba dirigido principalmente a desarrollar tecnología de cultivo larvario que permitiera cerrar el ciclo de cultivo de la especie y a optimizar el proceso de engorde de los juveniles en relación a las estructuras utilizadas y al desarrollo de los piensos. A pesar de que se avanzó y que se generó mucha información sobre el desarrollo industrial del pulpo, no se pudo conseguir una producción masiva de subadultos en criaderos ni un pienso seco comercial para el engorde.

En estos últimos años se han realizado distintos proyectos con distintas fuentes de financiación (INIA, proyectos regionales, etc.). El más destacado fue el proyecto “Optimización del engorde de pulpo (*O. vulgaris*)” financiado por el Pan Nacional de JACUMAR (2007-2009), cuyo objetivo fue desarrollar dietas artificiales, optimizar las técnicas de engorde en tanques y jaulas, engorde industrial del pulpo y sostenibilidad de la actividad. Recientemente en España se ha finalizado un proyecto JACUMAR, “Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos del pulpo de roca (*O. vulgaris*)”, con el que se pretendía determinar un sistema de cultivo óptimo para las paralarvas de pulpo y definir los requerimientos nutricionales para el desarrollo de piensos que puedan ser elaborados comercialmente y con rendimientos satisfactorios.

1.2. Problemas actuales del cultivo del pulpo.

Hoy en día, el desarrollo industrial de cefalópodos esta limitado al engorde de subadultos capturados de su medio natural (Chapela et al., 2006; Rodríguez et al., 2006; García García et al., 2009), debido a la elevada mortalidad durante la cría larvaria (Navarro y Villanueva, 2003; Iglesias et al., 2007) y al escaso desarrollo de los piensos formulados (Lee et al., 1991; Castro y Lee, 1994; Cerezo Valverde et al., 2008).

1.2.1. Cultivo de paralarvas de pulpo.

A pesar de los continuos esfuerzos por parte de varios grupos de investigación en cultivar paralarvas de pulpo hasta la fase del asentamiento (Villanueva, 1995; Iglesias et al., 2004; Carrasco et al., 2003), la obtención de juveniles bentónicos en cautividad sigue siendo una tarea difícil de lograr.

El Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía (IEO) ha venido desarrollando en los últimos años diversos trabajos de investigación centrados en la fase de cultivo larvario, con el objetivo de resolver los problemas que impiden completar el ciclo de cultivo de esta especie (Iglesias et al., 2004, 2007). El principal problema es la alta mortalidad larvaria debido a la no disponibilidad de una dieta viva adecuada, la falta de estandarización de la técnica de cultivo y el escaso conocimiento de la biología de esta especie en estas fases tempranas, con el consiguiente desconocimiento de sus necesidades nutritivas básicas (Moxica et al., 2002). Un inconveniente adicional que dificulta la consecución de mayores progresos podría ser la escasez de equipos, tanto humanos como técnicos, que se dediquen a la investigación en el cultivo del pulpo y, más concretamente, en sus fases iniciales, que son las que presentan una mayor complejidad.

1.2.2. Engorde de subadultos de pulpo.

Actualmente el engorde de pulpo se basa en la captura de juveniles en el medio natural (700-800 g); estabulación en distintos tipos de jaulas, unas suspendidas de bateas y otras autoflotantes; alimentación con distintas especies de bajo valor comercial, fundamentalmente descartes del arrastre; y comercialización de ejemplares de 3-3,5 kg tras unos 3-4 meses de engorde. Durante los años 90 se han llegado a crear en Galicia hasta 5 empresas en concesiones experimentales con resultados dispares, pero que en general pusieron de manifiesto el gran potencial que podría tener el cultivo de esta especie. Paralelamente se han desarrollado distintos ensayos de engorde, algunos de ellos en colaboración con estas empresas, en los cuales se observan algunos parámetros que permiten optimizar el sistema productivo, y en los que se identifican algunos factores de interés para el desarrollo de este tipo de explotaciones (Rama Villar et al., 1997; Luaces-Canosa y Rey-Méndez, 1999; Tuñón et al., 2002; Rodríguez et al., 2006).

Otros ensayos se han llevado a cabo en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) en mar abierto para evaluar el efecto del peso, la temperatura, la carga de cultivo y el hidrodinamismo sobre el crecimiento y la mortalidad de *O. vulgaris* (García García et al., 2009; García García y García García, 2011). Aunque ha habido muchos avances en los últimos años, se necesita mejorar las técnicas de engorde para optimizar la rentabilidad que, por el momento, es baja (García García et al., 2004). Igualmente se necesitan desarrollar sistemas adecuados para las zonas semiprotegidas y mar abierto, ya que las jaulas diseñadas para áreas protegidas no resisten los temporales. También es interesante evaluar más detalladamente la posibilidad de las instalaciones en tierra y en sistemas de recirculación. Actualmente tampoco existe una dieta comercial y, aunque experimentalmente se ha avanzado mucho estos últimos años en el desarrollo de dietas formuladas para pulpo, los resultados no han sido todavía tan satisfactorios como los obtenidos con dietas naturales (Quintana et al., 2008; Cerezo Valverde et al., 2008; Estefanell et al., 2011a).

1.3. Parámetros.

1.3.1 Parámetros ambientales.

Salinidad.

Los cefalópodos que son objeto de estudio para su cultivo son especies estenohalinas, sobreviviendo en un rango estrecho de salinidad de 27-38 ppm. (Boletzky y Hanlon, 1983). En un ensayo de engorde de pulpo en jaulas en las Rías Gallegas, Chapela et al. (2006) registraron mortalidades importantes cuando la salinidad descendió de 32 ppm, como consecuencia de una disminución de la salinidad superficial provocada por fenómenos de escorrentía superficial tras lluvias copiosas. En tanques, Delgado et al. (2011) no encontraron diferencias significativas de crecimiento y supervivencia para un rango de salinidad de 29 a 34 ppm.

Temperatura.

Aguado-Giménez y García García (2002) desarrollaron unos modelos de crecimiento y tasa de alimentación en función del peso, temperatura y tipo de alimento (boga y cangrejo), a partir de 236 observaciones tomadas en tanques con ejemplares aislados, variando el peso corporal entre 0,18 y 3,50 kg, y la temperatura entre 13 y 28°C. El valor máximo de crecimiento se obtiene a 17,5°C, después desciende, incluso haciéndose negativo para valores superiores a 24°C. La máxima tasa de alimentación se alcanza a una temperatura ligeramente superior (20°C), al igual que se ha encontrado en la mayoría de peces estudiados, y como consecuencia de estos dos hechos la máxima eficacia de alimentación se sitúa a 16,5°C. Por otro lado, la mortalidad se dispara para temperaturas superiores a los 22°C. En base a ello los autores establecen que el rango más óptimo para el engorde del pulpo se situaría entre los 16 y 22°C.

Posteriormente, Miliou et al. (2005) encontraron resultados similares pero identificando una interacción significativa entre peso y temperatura, probablemente debido a que utilizaron también ejemplares más pequeños que los autores anteriores. Esta interacción implica que la temperatura a la cual se observa el máximo crecimiento varía con el peso de tal forma que en ejemplares de 50-150 g esta temperatura es de 25°C.

Oxígeno disuelto.

Cerezo Valverde y García García (2005) estudiaron el comportamiento respiratorio del pulpo frente a una disminución del nivel de saturación, midiendo el consumo de oxígeno y la frecuencia de ventilación para un rango amplio de pesos corporales y temperatura. A partir de los resultados establecieron tres niveles de concentración de oxígeno. En el rango “óptimo” no se modifican ni la frecuencia de ventilación ni el consumo de oxígeno, en el rango “precaución” se modifica la frecuencia de ventilación y en el rango “peligroso” se modifican ambos. Estos rangos dependen de la temperatura, así para 16°C el nivel de saturación mínimo en el rango óptimo es del 55% de saturación, mientras que a 25°C es del 85%. También se determinó que la concentración de oxígeno letal se sitúa por debajo del 10% de

saturación y depende directamente del peso corporal y de la temperatura, variando desde el 3% de saturación (15°C y 0,2 kg) hasta el 9% (27°C y 2 kg).

Productos nitrogenados.

El efecto tóxico de los productos nitrogenados (amonio, nitratos y nitritos) en sistemas de cultivo de cefalópodos está muy poco estudiado por lo que los niveles máximos que se asumen son los establecidos con carácter general para peces (Tucker, 1998). No obstante, resultados obtenidos por Gómez et al. (2005) revelan una disminución de la tasa de excreción de amoniaco por encima de 1,2 mg TAN/l a 19°C, sugiriendo que valores mayores podría considerarse tóxicos.

1.3.2. Parámetros de cultivo.

Consumo de oxígeno y caudales de agua.

El flujo de agua a través de un sistema de cultivo (un tanque por ejemplo) tiene que garantizar el aporte de oxígeno para los requerimientos metabólicos de los ejemplares, pero también mantener unos niveles de concentración de oxígeno óptimo y no limitante de la producción. Por otro lado, este flujo de agua tiene que garantizar la eliminación de los productos nitrogenados. No obstante, por lo general, son los requerimientos de oxígeno los que realmente deciden el caudal necesario en cada momento. En este sentido, es de gran utilidad los modelos de consumo de oxígeno (rutina, medio diario con alimentación, valor máximo debido a la alimentación, etc.) de pulpo desarrollados por Cerezo Valverde y García García (2004) en función del peso y la temperatura a partir de los cuales, y teniendo en cuenta también los rangos óptimos de oxígeno disuelto descritos anteriormente, podemos estimar el caudal de agua en cada momento. Es importante destacar que al aumentar la temperatura, manteniendo la salinidad constante, disminuye la solubilidad del oxígeno, por lo que cada litro de agua que entra al tanque proporciona una menor cantidad de oxígeno y, por otro lado, los niveles de oxígeno a la salida del tanque deben incrementarse para mantenerlos en los niveles óptimos. Consiguientemente, el oxígeno disponible por litro de agua para los

pulpos en cultivo disminuye con la temperatura requiriendo, por tanto, un mayor caudal, particularmente en incrementos de temperatura para 21 y 24°C.

Generación de residuos sólidos y productos nitrogenados.

En general, las dietas naturales generan una gran cantidad de residuos y particularmente en el caso de cefalópodos. El pulpo de roca sólo aprovecha el 77% de la boga completa que se le suministra, quedando como residuos sólidos cabeza, espina y cola, y del cangrejo aprovecha aproximadamente el 50%, dejando fundamentalmente el caparazón (Mazón et al., 2007). El nitrógeno y fósforo ingerido tiene como destino incorporarse al cuerpo (crecimiento) o eliminarse de forma particulada en las heces o de forma disuelta por excreción. Este último es el que más puede preocupar en sistemas de engorde de tierra, particularmente en sistemas de recirculación, ya que los productos nitrogenados pueden actuar como factor limitante. En cefalópodos el mayor producto final del catabolismo de las proteínas es el amonio (Boucher-Rodoni y Mangold, 1989). La urea representa un porcentaje bajo (Hoeger et al., 1987) y es rápidamente hidrolizado a amonio y dióxido de carbono. La tasa absoluta de excreción de amoniaco en el pulpo depende del peso y de la cantidad de proteína ingerida y se puede expresar mediante una ecuación (García García et al., 2011): en términos relativos (en relación al peso corporal) tiene un valor de 84 mg TAN/kg de peso/día cuando el pulpo no es alimentado y de 265 mg TAN/kg de peso/día cuando el nivel de ingesta de proteína es de 9 g/día. La tasa de excreción expresada en función de la cantidad de alimento suministrado cuando el nivel de ingesta de proteína no es limitante varía linealmente en función del peso corporal de 10 a 57 g TAN/kg de alimento en peso seco/día cuando la tasa de ingesta de proteína es de 9 g/día.

Carga de cultivo.

En el engorde de juveniles y adultos de pulpo la carga inicial en los tanques o jaulas es de extrema importancia. Al ser tan alta la tasa de crecimiento, la biomasa inicial se puede triplicar en pocas semanas, generando con ello una serie de problemas relacionados con el consumo de oxígeno, emisión de detritus y también los que se derivan de la dispersión de tamaños, con la consiguiente creación de jerarquías y

problemas de estrés que deriven en canibalismo y autofagia. Ensayando con juveniles de pulpo cultivados en tanques a diferente densidad inicial (10 kg/m^3 y 20 kg/m^3), Iglesias et al. (2000) observaron mejor crecimiento e índice de conversión, así como menor mortalidad, en el grupo de menor densidad. Otros autores también analizaron este factor: Domingues et al. (2010), trabajando con densidades de 4, 8 y 15 kg/m^3 , no encontraron diferencias de crecimiento entre los grupos después de 56 días de engorde, pero sí registraron mayor supervivencia en el grupo de menor densidad inicial. En jaulas flotantes, Chapela et al (2006) recomiendan estabular tamaños similares, iniciando el engorde a una carga de 8 a 14 kg/m^3 . Respecto a la dieta, los mismos autores utilizan alimento de bajo valor comercial o procedentes de descartes, compuesto por pescado, crustáceos y mejillón. En estas condiciones, juveniles de 700-1000 g alcanzan un tamaño de 3 kg en tres o cuatro meses, pudiendo hacer dos o tres ciclos de engorde por año, evitando los meses de invierno cuando el crecimiento es más bajo. Iglesias et al. (2007), trabajando con pulpos cultivados en las mismas jaulas que el autor anterior, registraron también mayor crecimiento en verano. Rodríguez et al. (2006), trabajando a nivel experimental en una jaula flotante de 4 m^3 , engordaron pulpo a diferentes cargas y en distintas épocas del año, obteniendo los mejores resultados de crecimiento y supervivencia a cargas iniciales de 10-12 kg/m^3 y temperaturas de 15 a 21°C , correspondientes a primavera-verano en el norte de España. En el Mediterráneo, García García et al. (2009) no encontraron una influencia de la carga de cultivo entre 7 y 35 kg/m^3 sobre el crecimiento ni la mortalidad, lo que atribuyeron a una apropiada circulación del agua en el interior de la jaula.

Maduración gonadal de las hembras.

Sánchez et al. (1988) encontraron en tanques que los ejemplares macho crecían ligeramente más rápido que las hembras, aunque en ensayos en jaulas de engorde no se registraron diferencias en los pesos finales de ejemplares criados por separado. En estudios específicos de crecimiento, consumo de oxígeno y producción de amonio realizados fuera de la época de maduración gonadal de las hembras, no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras (Aguado-Giménez y García García, 2002; Cerezo Valverde y García García, 2004; García García et al., 2011). Las diferencias de crecimiento se producen cuando durante el ciclo de engorde existe

maduración sexual de las hembras o incluso la puesta. En este sentido, Estefanell et al. (2012a, b) obtuvieron los mejores resultados en ensayos de engorde cuando no hay maduración de las gónadas o el nivel es muy bajo. El problema surge, pues, cuando las épocas de maduración coinciden con el ciclo de engorde. En relación a esto, Chapela et al. (2006) sugieren la separación previa de machos y hembras, aunque las empresas en Galicia no lo consideran un procedimiento práctico.

Crecimiento y supervivencia.

Los resultados de crecimiento y supervivencia obtenidos en los distintos ensayos de engorde que se han realizado en jaulas flotantes y tanques son dispares (Rama-Villar et al., 1997; Tuñón et al., 2001; Rodríguez et al., 2006; Chapela et al., 2006; Domingues et al., 2010; Estefanell et al., 2012a), y la variabilidad de los resultados se ha relacionado, como hemos visto en los apartados anteriores, con factores tales como la temperatura del agua, la densidad de cultivo, la dispersión de tamaños, la época de reproducción y el tipo de alimento suministrado. No obstante, utilizando valores conservativos, se puede concluir que en las condiciones óptimas de cultivo un ciclo de producción, en el que los ejemplares pasen de 750 a 3.500 kg, puede tener una duración de 90 a 120 días con una supervivencia de entre el 80 y el 90%.

Por tanto, se podrían realizar hasta tres ciclos de producción al año, dependiendo de las condiciones del área donde se desarrolle el cultivo y, particularmente, de la temperatura. En el Mediterráneo durante el verano se alcanzan temperaturas muy altas para esta especie (superiores a los 22-24°C) por lo que, como se ha demostrado experimentalmente (García García et al., 2009), sólo se pueden realizar dos ciclos de producción, entre mediados de octubre a mediados de junio del año siguiente. En el Norte (Galicia o Asturias), por el contrario, son las bajas temperaturas del invierno en las aguas de las rías las que limitan el cultivo, pudiendo realizarse también un máximo de dos ciclos (Chapela et al., 2006; Rodríguez et al., 2006). En áreas como Canarias, donde la temperatura del agua varía muy poco a lo largo del año, en torno a los 18-20°C, se podrían realizar tres ciclos de cultivo, pero esto aún no ha sido demostrado experimentalmente. En tanques con sistemas de recirculación y control de la temperatura también se podrían realizar tres ciclos.

1.4. Mecanismo de alimentación de *O. vulgaris*.

Los cefalópodos son carnívoros voraces que se alimentan de día o de noche de una amplia variedad de presas vivas que detectan principalmente con la vista o el tacto. Algunos cefalópodos se alimentan de peces o de otros cefalópodos, mientras otros se alimentan de criaturas diminutas suspendidas en el agua y usan diversas técnicas para cazar, las cuales pueden ser modificadas según el tipo de presa. A partir de los contenidos estomacales se ha comprobado que el 60-80% de la dieta del pulpo son crustáceos, 12-30% peces y el 8% restante otros cefalópodos (Guerra, 1978).

O. vulgaris identifica y detecta sus presas de forma visual (Maldonado, 1964) o a través de los quimiorreceptores de las ventosas (Graziadei, 1964a). En *Octopus* hay alrededor de 10.000 receptores primarios en cada ventosa y unas 200 ventosas en cada tentáculo por lo que hay cerca de 16 millones de células quimiorreceptores en un animal adulto (Graziadei, 1964b). La musculación de sus ventosas permite una fuerte adhesión, y hay un pequeño ganglio debajo de cada ventosa que sirve para coordinar la información motora y sensorial (Graziadei, 1964b). *O. vulgaris* lleva el alimento hasta la zona bucal donde se encuentra un pico quitinoso (pico de loro) asociado a una fuerte musculación, una rádula que utiliza para raspar y las glándulas salivares (Nixon, 1979, 1980). La saliva contiene sustancias que descomponen los minerales y la matriz orgánica de las conchas de los moluscos y el esqueleto de los crustáceos (Nixon et al., 1980; Nixon y Maconnachie, 1988) en una primera digestión externa. Una vez digerido el alimento es succionado y pasa al esófago, y de ahí al estómago.

1.5. Desarrollo de dietas para el engorde del pulpo.

Las dietas basadas exclusivamente en peces y crustáceos no son una propuesta comercialmente viable debido al precio de éstos en el mercado y a su variable disponibilidad (García García et al., 2004). En determinadas regiones, la escasa disponibilidad de descartes y los altos precios de los crustáceos como fuente de alimentación hacen que se reduzca la rentabilidad de esta actividad. Además, con dietas naturales, el crecimiento y el índice de conversión en el pulpo pueden variar ampliamente dependiendo de las especies que se utilicen como alimento (Cagnetta y Sublimi, 1999; García García y Aguado-Giménez, 2002; Aguado-Giménez y García

García, 2002). Los mejores crecimientos se obtienen cuando la dieta está compuesta exclusivamente por crustáceos (Aguado-Giménez y García García, 2002) o éstos forman una parte importante en dietas mixtas (Cagnetta y Sublimi, 1999). En todo caso, el desarrollo industrial de una especie necesita de una dieta formulada, tal y como ocurre con dorada y lubina (Cho y Bureau, 2001; Davies et al., 2009).

El primer problema con el que nos enfrentamos para diseñar un pienso para el pulpo es la “presentación” adecuada para que sea aceptado e ingerido completamente (Cerezo Valverde et al., 2008). Para ello, el alimento debe tener unas características físicas concretas y adecuadas a su forma de alimentación. El pienso tiene que ser: **atractivo**, para que el pulpo lo capture con facilidad; **consistente**, para que las partículas de las materias primas que lo formen estén bien cohesionadas, ya que el pulpo manipula el pienso y lo disgrega antes de ser ingerido; **estable** y de una **textura firme**, puesto que, el alimento no es siempre ingerido inmediatamente cuando se le suministra, pudiendo permanecer largo tiempo sumergido en el agua.

Hasta la fecha, los mejores resultados en cefalópodos se han obtenido con mezclas de pasta de pescado, crustáceos o moluscos, que suelen formar parte de las dietas naturales que los pulpos consumen habitualmente, aglomerados con gelatina o alginatos para evitar su disgregación (Quintana et al., 2008; Rosas et al., 2008; Cerezo Valverde et al., 2008; Estefanell et al., 2011a). Peores resultados se han obtenido con piensos secos o formulados con ingredientes puros (Castro y Lee, 1994; Domingues et al., 2005, 2007). La gelatina, en la elaboración de dietas artificiales ha proporcionado una adecuada palatabilidad en pulpos subadultos, generando además un crecimiento significativo y elevada digestibilidad (Rosas et al., 2008). No obstante, las tasas de disgregación de estos piensos son elevadas, sobre todo cuando no se aplica calor a la mezcla. Por el contrario, la elaboración de piensos con alginatos origina mayor estabilidad en el agua, aunque este tipo de piensos presenta peor aceptabilidad y digestibilidad (Rosas et al., 2008), sin embargo, presentan la ventaja de poder elaborarse en frío. Al respecto, Cerezo Valverde et al. (2008) y Domingues et al. (2009) comprobaron una influencia negativa del tratamiento térmico sobre el crecimiento en *O. vulgaris* y *Sepia officinalis*. Estos resultados se atribuyeron a la posible desnaturalización de proteínas y pérdida de aminoácidos y vitaminas, mostrando mejores resultados con los alimentos frescos, descongelados o liofilizados. La principal ventaja de los alimentos liofilizados radica en que el agua se les ha extraído sin

tratamiento térmico, pasando directamente de la fase congelada o sólida al estado gaseoso, ayudando a conservar intactas sus propiedades nutritivas y estructura molecular.

Los piensos secos o extrusionados que se utilizan para pulpo (Gairin et al., 2011; Querol et al., 2012a, b) puede abrir grandes expectativas, pues se trata del sistema más adecuado para la fabricación de piensos acuícolas, ya que debido a la presión y temperatura de trabajo, se consigue una aglomeración interna que permite la estabilidad del gránulo en el agua. Además, se conservan y almacenan mejor que los semihúmedos o húmedos al tener un porcentaje menor de agua, normalmente poseen un menor coste por kg de animal producido, presentan mayor regularidad en el suministro y composición, son más fáciles de almacenar y distribuir, su manipulación es mínima en las instalaciones de acuicultura, reducen el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y poseen una mejor estabilidad en agua y mejor digestibilidad. Asimismo, es posible conseguir gránulos con diferente contenido en humedad, lo que puede facilitar la adaptación progresiva del pulpo al alimento seco.

1.6. Requerimientos nutricionales del pulpo.

El conocimiento de los requerimientos nutricionales en cefalópodos ha estado limitado por la escasa disponibilidad de dietas formuladas de apropiada aceptabilidad y/o composición nutritiva (Domingues et al., 2007; Cerezo Valverde et al., 2008). La mayoría de las hipótesis sobre estos requerimientos se han generado al suministrar dietas naturales, a partir de sus análisis bioquímicos y de los propios cefalópodos (García García y Cerezo Valverde, 2006), mediante la utilización de sustratos energéticos marcados (O'Dor et al., 1984) o en experimentos de ayuno (Castro et al., 1992). De ellos se deduce que los cefalópodos son especies exclusivamente carnívoras, y a diferencia de lo ocurrido con las proteínas, raramente utilizan carbohidratos o lípidos como fuente de energía (Lee, 1994). Sin embargo, los nuevos formatos de pienso que están siendo desarrollados y aceptados por el pulpo común están permitiendo elaborar dietas formuladas de composición conocida para avanzar en el conocimiento de sus requerimientos nutricionales (Quintana et al., 2008; Cerezo Valverde et al., 2008, 2012a; García et al., 2010; Estefanell et al., 2011a).

1.6.1. Proteínas.

Los cefalópodos utilizan las proteínas para la locomoción (actina y miosina), estructuras de soporte (colágeno), energía (catabolismo de aminoácidos), transporte de oxígeno (hemocianina) y osmorregulación (aminoácidos y proteínas libres en la hemolinfa) (Lee, 1994). Los aminoácidos libres que predominan en los tejidos de cefalópodos (>100 mg/100g de tejido) son: octopina, prolina y arginina. Los aminoácidos predominantes en las proteínas de los tejidos (<0,1g/100g de tejido) son el glutamato, aspartato, leucina, alanina, lisina e isoleucina (Suyama y Kobayaski, 1980; Iwasaki y Harada, 1985; Jhaveri et al., 1984; Cerezo Valverde et al., 2012b).

1.6.2. Lípidos.

Los cefalópodos presentan en su composición corporal menos de un 2% en peso húmedo de lípidos, mostrando altos niveles de fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de la serie n-3 (Sinanoglou y Miniadis-Meimaroglou, 1998; Navarro y Villanueva, 2000, 2003), por lo que se ha sugerido un predominio del papel estructural sobre el energético (O'Dor et al., 1984; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006). No obstante, los cefalópodos presentan enzimas lipasas a lo largo del tracto digestivo (Boucher-Rodoni, 1982; Caruso et al., 2004; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006) y son capaces de almacenar los lípidos en forma de triglicéridos en cantidades importantes en la glándula digestiva (Sieiro et al., 2006; Cerezo Valverde et al., 2012a). Algunos grupos de investigación han obtenido recientemente buenos crecimientos y altos índices de eficacia alimentaria al utilizar dietas con alto contenido en grasa (Estefanell et al., 2011a; Cerezo Valverde et al., 2012c).

1.6.3. Carbohidratos.

Se ha demostrado que los cefalópodos tienen la capacidad de digerir, almacenar y utilizar carbohidratos, proporcionando energía preferentemente para las actividades explosivas de carácter anaeróbico (Wells y Clarke, 1996), como podrían ser la captura de presas o la huida de depredadores, pero también en períodos de inanición. Según O'Dor et al. (1984), los carbohidratos después de una comida son rápidamente

catabolizados y sólo una pequeña cantidad sería acumulada como glucógeno muscular, siendo prácticamente inmune a su movilización en situaciones de ayuno. En contraste, se han encontrado cantidades variables y significativas en todos los tejidos de numerosas especies de cefalópodos, incluyendo la gónada (1-9% materia seca), la glándula digestiva (3-13% materia seca) y el músculo (1-8% materia seca) (Rosa et al., 2005). A pesar de ello, los estudios sobre la contribución de estos sustratos al metabolismo energético en cefalópodos son escasos en comparación con los dedicados a proteínas o lípidos.

1.6.4. Metales pesados y minerales.

La concentración de metales en cefalópodos está bien documentada (Smith et al., 1984; Miramand y Bentley, 1992; Bustamante et al., 2000; Raimundo et al., 2005; Villanueva y Bustamante, 2006). La mayoría de estos estudios han destacado la gran capacidad que poseen para concentrar un número grande de elementos esenciales y no esenciales en sus tejidos (Rocca, 1969; Nardi et al., 1971; Schipp y Hevert, 1978; Miramand y Guary, 1980; Smith et al., 1984; Bustamante et al., 1998a, 1998b, 2000; Miramand et al., 2006), así como la importancia de la glándula digestiva en los procesos de bioacumulación (Miramand y Guary, 1980; Soldevilla, 1987; Raimundo et al., 2004, 2005).

Los minerales en cefalópodos juegan un papel muy importante, fundamentalmente en la formación de estructuras esqueléticas, mantenimiento del equilibrio osmótico, múltiples procesos metabólicos e incluso como componentes de proteínas estructurales y funcionales, como enzimas, hormonas y transportadores de oxígeno. El calcio se ha resaltado como elemento importante para la formación de la concha en la sepia (Boletzky, 1974; Villanueva y Bustamante, 2006), el estroncio como esencial en la formación de estatolitos (Hanlon et al., 1989) y el cobre como componente de hemocianina o pigmentos transportadores de oxígeno (Miller et al., 1994).

La mayoría de los estudios han enfatizado la capacidad de estos organismos de concentrar zinc, cobre y cadmio en la glándula digestiva, aun en ambientes de baja contaminación por metales (Smith et al., 1984; Miramand y Bentley, 1992; Bustamante et al., 2000; Raimundo et al., 2005; Villanueva y Bustamante, 2006).

1.6.5. Vitaminas.

Actualmente, hay pocos estudios sobre los niveles de vitaminas en cefalópodos. Seguramente, los requerimientos vitamínicos deberían obtenerlos fácilmente de la mayoría de sus presas. Esta situación cambia cuando son alimentados con dietas formuladas, donde las vitaminas pueden pasar a ser limitantes. Las vitaminas medidas en los tejidos de los cefalópodos según Sidwell (1981) son: Vitamina A 5-30 IU/100g de tejido, Vitamina B₁₂ 1,5-15 µg/100g de tejido, Vitamina C ≈5 mg/100g de tejido, Tiamina 10-150 µg/100g de tejido, Riboflavina 50-350 µg/100g de tejido, Ácido Fólico 50-350 µg/100g de tejido y Niacina 1,5-4 mg/100g de tejido.

Villanueva et al. (2009) determinaron el contenido de vitaminas A y E en las primeras fases de desarrollo de varias especies de cefalópodos. El contenido en vitamina A fue similar respecto del encontrado en otros moluscos marinos y larvas de peces. Una cantidad relativamente alta de vitamina E se encontró en los ovarios, huevos y juveniles de pulpo, sepia y calamar, probablemente relacionado con el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en las primeras fases de desarrollo de estas especies.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cultivo del pulpo se encuentra aún en fase de desarrollo. *Octopus vulgaris* ha aparecido en los últimos años como una de las especie con mayor futuro en el campo de la acuicultura por una serie de ventajas: se adapta fácilmente a la cautividad, acepta el alimento congelado, tiene tasas de crecimiento y reproducción muy alta y un alto precio en el mercado. Ello ha llevado a los investigadores españoles a mostrar un gran interés por esta especie, fundamentalmente en el sector acuicola, tanto en Galicia como en el Mediterráneo y Canarias.

En el Mar Mediterráneo, el rango de temperatura es de 10 a 14°C en invierno y de 25 a 27°C en verano, el cual limita el engorde de pulpo y al uso de las instalaciones a 7-8 meses por año, de octubre a junio. Una manera de disminuir los costes sería utilizar las instalaciones destinadas en la acuicultura para el cultivo de peces. La actividad en las instalaciones de dorada y lubina disminuye considerablemente en los meses de invierno cuando la temperatura disminuye. El cultivo conjunto de pulpo y peces, entonces, podría reducir los costes de producción considerablemente de ambas actividades en el Mediterráneo, haciendo esta actividad comercial más rentable.

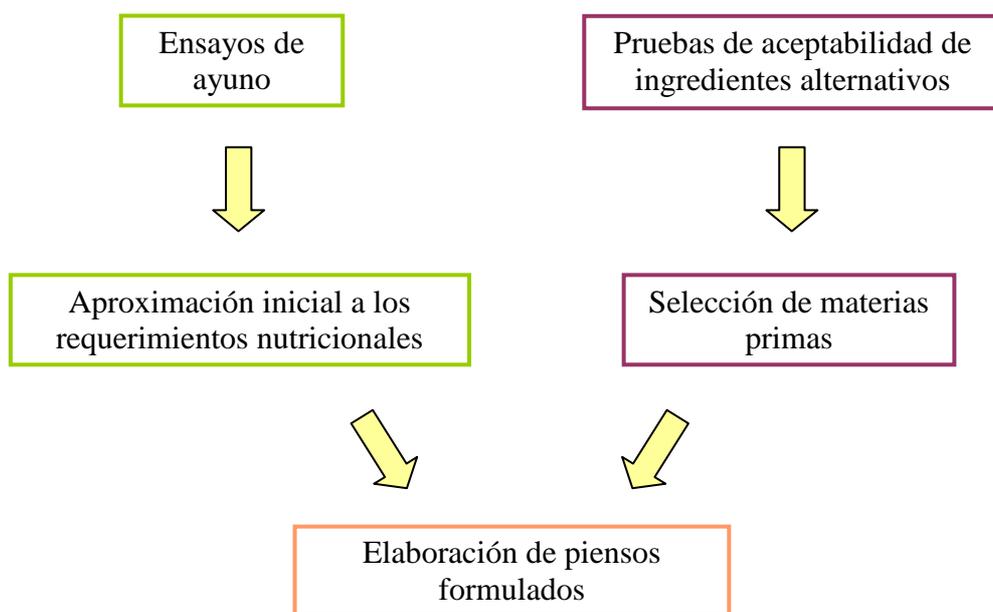
Aunque el cultivo del pulpo es viable desde la fase de engorde hasta su reproducción, para desarrollar esta actividad a escala comercial habría que solucionar dos problemas: la producción masiva de juveniles en las hatcheries y el desarrollo de un pienso comercial que ofrezca altos crecimientos e índices de conversión. Durante los últimos años, la investigación se ha centrado en el estudio de los requerimientos nutricionales del pulpo, con el fin de desarrollar dietas apropiadas y económicamente rentables. Actualmente, los piensos utilizados para diversas especies de peces no son válidos para el pulpo, en cuanto a su forma de alimentación y a su capacidad para capturarlo e ingerirlo, destacando como principal problema su aceptación. En este sentido, hay una necesidad clara de realizar experimentos preliminares con ingredientes que mejoren la aceptabilidad antes de incorporar cualquier ingrediente nuevo en dietas formuladas.

Por otro lado, es necesario conocer la composición nutricional adecuada de los piensos para obtener un buen crecimiento y aprovechamiento nutritivo. El pulpo es una especie exclusivamente carnívora y raramente utiliza carbohidratos y lípidos como fuente de energía, por lo que son los macronutrientes menos estudiados en pulpo. No

obstante, el alimento a base de cangrejo, que es la dieta natural que mejores resultados ofrece, aporta, además de un 60% en proteínas, un 10-15% de carbohidratos y un 8 % de lípidos en sustancia seca. Probablemente, la sustitución de proteína por grasa o carbohidratos podría ser un buen método en la formulación de las dietas para los pulpos, al igual que ocurre en peces.

Es por ello que la presente Tesis, pretende dar un gran impulso al cultivo de esta especie, que tanto interés despierta en el sector productivo.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue desarrollar piensos de apropiada composición nutritiva que presenten rendimientos satisfactorios en subadultos de pulpo (*Octopus vulgaris*) y que sirvan posteriormente de base para su elaboración comercial, según el siguiente esquema:



Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar las variaciones en la composición lipídica del músculo y de la glándula digestiva de *O. vulgaris* durante un periodo corto de ayuno, como aproximación a sus requerimientos nutricionales de lípidos.

2. Estimar la contribución energética diaria de los lípidos presentes en *O. vulgaris* durante el ayuno.

3. Determinar el contenido en carbohidratos en el músculo, la glándula digestiva y la gónada de *O. vulgaris* alimentados con una dieta natural mixta de boga y cangrejo.

4. Analizar las variaciones en el contenido de carbohidratos en el músculo, la glándula digestiva y la gónada de *O. vulgaris* durante un periodo corto de ayuno, como aproximación a sus requerimientos nutricionales en carbohidratos.

5. Estimar la contribución energética diaria de los carbohidratos presentes en *O. vulgaris* durante el ayuno.

6. Conocer la aceptabilidad y crecimiento de *O. vulgaris* alimentado con dietas formuladas con diferentes ingredientes de origen vegetal o animal.

7. Elaborar piensos formulados en base a los resultados previos de aceptabilidad y comprobar su rendimiento en *O. vulgaris* mediante ensayos de engorde y digestibilidad.

8. Conocer los requerimientos lipídicos de *O. vulgaris* comprobando los cambios que se producen en el crecimiento y aprovechamiento nutritivo de la dieta después de suministrarles dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado.

9. Determinar la composición nutricional de *O. vulgaris* después de suministrar dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado.

10. Estudiar los cambios que se producen en el crecimiento, aprovechamiento nutritivo y digestibilidad de la dieta de *O. vulgaris* después de suministrarles dietas formuladas con carbohidratos simples o complejos.

11. Determinar la composición nutricional de *O. vulgaris* después de suministrarles dietas formuladas con carbohidratos simples o complejos.

12. Aclarar si los bajos niveles de carbohidratos en los tejidos de *O. vulgaris* se deben a su bajo contenido e ingesta en sus dietas naturales o son consecuencia de la baja capacidad para su almacenamiento.

SECCIÓN AYUNO

3. **CAPÍTULO I: Variación en la composición lipídica durante el ayuno a corto plazo en distintos tejidos del pulpo común (*Octopus vulgaris*).**

4. **CAPÍTULO II: Contribución energética de los carbohidratos durante el ayuno en el pulpo común (*Octopus vulgaris*).**

3. CAPÍTULO I:

Variación en la composición lipídica durante el ayuno a corto plazo en distintos tejidos del pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Publicado:

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García, B., 2012. Changes in lipid composition of different tissues of common octopus (*Octopus vulgaris*) during short-term starvation. Aquaculture Research. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03131.x.

Congreso:

Autores: Morillo-Velarde, PS., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García, B.

Título: Variación en la composición lipídica durante el ayuno a corto plazo en distintos tejidos del pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Tipo de participación: Póster

Congreso: XIV Foro de los recursos marinos de la acuicultura de las rías gallegas

Publicación: Libro del XIV Foro de los recursos marinos de la acuicultura de las rías gallegas.

Lugar celebración: O Grove (Galicia)

Fecha: Noviembre 2011

3. CAPÍTULO I: Variación en la composición lipídica durante el ayuno a corto plazo en distintos tejidos del pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Resumen.

En este trabajo se ha estudiado la variación en la concentración (mg/100g peso seco) y el contenido total (mg/individuo) de las distintas clases de lípidos en el músculo y en la glándula digestiva de *Octopus vulgaris* a lo largo de ocho días de ayuno. En el músculo predominaron los lípidos polares (LP; 267,3-337,2 mg/100g) frente a los lípidos neutros (LN; 66,9-104,7 mg/100g). Se observó una tendencia positiva y significativa en el contenido y la concentración de monoglicéridos como consecuencia del ayuno ($P < 0,05$). Además, se detectó un alto contenido de colesterol (CHO) en este tejido a partir del cuarto día de ayuno respecto de animales alimentados ($P < 0,05$). En la glándula digestiva predominaron los LN (12.958-14.151 mg/100g) frente a los LP (3.157-6.517 mg/100g), siendo los triglicéridos, ácidos grasos libres y monoglicéridos las clases mayoritarias. Se detectó una tendencia positiva en la concentración de los LP y monoglicéridos, y negativa para los triglicéridos con los días de ayuno ($P < 0,05$). Los resultados sugieren que los triglicéridos y el CHO son transportados simultáneamente desde la glándula digestiva hacia el tejido muscular durante el ayuno, y un uso preferente de LP y CHO durante las fases de crecimiento. Se estimó que los lípidos contribuyeron con el 26 % del gasto energético diario de los animales durante el ayuno, principalmente en forma de triglicéridos procedentes de la glándula digestiva.

3.1. Introducción.

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) ha despertado en los últimos años un gran interés como posible especie para el desarrollo de su producción a escala comercial (Vaz-Pires et al., 2004; Iglesias et al., 2007; García García et al., 2009). No obstante, a diferencia de lo ocurrido en el sector de la acuicultura destinado al cultivo de peces, el conocimiento de los requerimientos nutricionales en cefalópodos se encuentra aún poco desarrollado y limitado por la ausencia de dietas formuladas de apropiada aceptabilidad o composición nutritiva (Lee et al., 1991; Castro y Lee, 1994; Domingues et al., 2007). Por este motivo, varios grupos de

investigación están trabajando en la consecución de estos objetivos con resultados prometedores (Cerezo Valverde et al., 2008; Quintana et al., 2008; Rosas et al., 2008).

Actualmente se admite que los cefalópodos son exclusivamente carnívoros, y a diferencia de lo ocurrido con las proteínas, raramente utilizan carbohidratos o lípidos como fuente de energía (Lee, 1994). No obstante, todavía existe cierta controversia generada en estudios previos sobre la capacidad y forma de utilización energética de los lípidos. Los cefalópodos presentan en su composición corporal menos de un 2% en peso húmedo de lípidos, mostrando altos niveles de fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de la serie n-3, (Sinanoglou y Miniadis-Meimaroglou, 1998; Navarro y Villanueva, 2000, 2003), por lo que se ha sugerido un predominio del papel estructural sobre el energético (O'Dor et al., 1984; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006). Apoyando esta hipótesis, se han detectado bajos niveles de actividad enzimática y una capacidad limitada para la oxidación de sustratos lipídicos en el músculo (Ballantyne et al., 1981; Mommsen y Hochachka, 1981). En el otro lado de la balanza, existen evidencias sobre su utilización energética, tal y como se deriva de la relación O/N observada en varias especies de cefalópodos (Segawa y Hanlon, 1988; Katsanevakis et al., 2005), especialmente elevada en situaciones de ayuno (Boucher-Rodoni y Mangold, 1985, 1988), o la liberación gradual de carbono marcado procedente de ácidos grasos previamente suministrados (O'Dor et al., 1984). Además, los cefalópodos presentan enzimas lipasas a lo largo del tracto digestivo (Boucher-Rodoni y Mangold, 1985; Caruso et al., 2004; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006), y aunque la digestibilidad de los lípidos no es alta en comparación con la proteínas (Petza et al., 2006; Mazón et al., 2007), son capaces de almacenarlos como triglicéridos en cantidades importantes en la glándula digestiva (Sieiro et al., 2006; Cerezo Valverde et al., 2012a, c) y de movilizarlos durante el ayuno (O'Dor y Wells, 1987; Castro et al., 1992). Según Rosa et al. (2005), la amplia variabilidad observada en este órgano tanto en el contenido lipídico como en la distribución de sus clases sugieren papeles distintos según el estilo de vida y la estrategia alimentaria de la especie. En el manto los triglicéridos son escasos, aunque pueden estar representados en cantidades variables según la especie (Sinanoglou et al., 2008).

Puesto que el fin de la acuicultura es alcanzar un óptimo rendimiento alimentario es poco habitual que los animales estén sometidos a largos periodos de ayuno en una instalación, pudiendo ser más útil estudiar los cambios bioquímicos que se producen en los primeros días de inanición. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar la variación en el

contenido lipídico y de sus distintas clases, así como su contribución energética en distintos tejidos de *O. vulgaris* durante el ayuno a corto plazo.

3.2. Material y métodos.

3.2.1. Animales de experimentación: captura y aclimatación.

Los pulpos se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) mediante arte de arrastre y se mantuvieron en tanques de 2000 l en el laboratorio. Los ensayos comenzaron cuando los animales se aclimataron, después de dos semanas, comprobándose que se alimentaban de forma regular con la ración calculada según García García y Cerezo Valverde (2006). Durante este período los animales fueron alimentados con boga (*Boops boops*) y cangrejo (*Carcinus mediterranus*) en días alternativos. Posteriormente, los animales se trasladaron y se mantuvieron individualmente en tanques circulares de 216 l donde se llevarían a cabo los ensayos. Éstos contenían tubos de PVC como refugio y una red externa para evitar que se escaparan. Estaban mantenidos en un sistema de recirculación de agua con control de la temperatura, lámpara UV y sistemas de filtración mecánica y biológica. El fotoperiodo fue de 12L: 12D, la temperatura entre 17 y 20°C ($18,19 \pm 1,13$) dentro del rango óptimo para esta especie (Aguado-Giménez y García García, 2002), oxígeno superior al 80% de saturación para que este factor no fuera limitante (Cerezo Valverde y García García, 2005), salinidad 37‰, pH entre 7,8 y 8 y nitrógeno amoniacal total (TAN) inferior a 0,2 mg/l.

3.2.2. Diseño experimental.

Finalizado el periodo de aclimatación en tanques individuales (2 semanas), los animales se pesaron y sexaron con el fin de formar grupos experimentales con un peso medio inicial similar. En total se emplearon 20 ejemplares macho (1034 ± 148 g) para configurar un total de 5 grupos experimentales de 4 individuos cada uno (ver Tabla 1). Cuatro grupos se sacrificaron a los días 1, 2, 4 y 8 después de suministrar la última comida. Además, se dispuso de un grupo control que fue alimentado durante los 8 días de duración del experimento. El día del sacrificio los animales se pesaron y se anestesiaron en agua de mar helada, procediendo posteriormente a su disección separando el tejido muscular (animal completo sin vísceras) y

la glándula digestiva. Cada una de estas partes se trituro y mezclo repetidamente hasta obtener una mezcla homogénea, se envaso al vacío y se congelo a -20°C antes de proceder a los análisis bioquímicos.

Tabla 1. Peso inicial (PI), peso final (PF), incremento de peso (IP), peso eviscerado (PE) y de la glándula digestiva (PGD), índices del peso eviscerado (IPE) y la glándula digestiva (IGD) y contenidos en agua y lípidos en el músculo y la glándula digestiva de *O. vulgaris* sometido a distintos periodos de ayuno.

GRUPO	Alimentados	1 día de ayuno	2 días de ayuno	4 días de ayuno	8 días de ayuno	y = a+b*días ayuno	
	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	a	b
Pi (g)	998 ± 157	974 ± 116	1034 ± 166	1050 ± 163	1099 ± 182	981,56	15,44
Pf (g)	1066 ± 154	918 ± 121	968 ± 164 ¹	959 ± 169 ¹	979 ± 177 ¹	932,54	6,36
IP (g)	68 ± 62	-56 ± 11 ^{\$}	-66 ± 28 ^{\$}	-91 ± 14 ^{\$}	-120 ± 31 ^{\$}	-49,03	-9,08*
Pe (g)	921 ± 117	819 ± 111	879 ± 150	882 ± 148	912 ± 150	832,93	9,32
PGD (g)	44,0 ± 6,5	36,5 ± 8,1	31,9 ± 7,9	24,1 ± 6,4 ^{\$}	19,6 ± 3,0 ^{\$}	36,72	-2,32*
IPE (%)	86,6 ± 3,4	89,0 ± 0,5	89,8 ± 0,3	92,0 ± 1,1 ^{\$}	92,0 ± 1,4 ^{\$}	89,16	0,42*
IGD (%)	4,2 ± 0,9	3,9 ± 0,4	3,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3 ^{\$}	2,0 ± 0,1 ^{\$}	3,87	-0,25*
Músculo							
Humedad (g/100 g peso fresco)	80,2 ± 0,4	79,4 ± 0,5	79,2 ± 0,4 ^{\$}	79,3 ± 0,6 ^{\$}	79,6 ± 0,2 ^{\$}	79,25	0,03
Lípidos (g/100 g peso seco)	0,41 ± 0,22	0,51 ± 0,09	0,43 ± 0,17	0,48 ± 0,12	0,39 ± 0,10	0,50	-0,01
Lípidos (g/individuo)	0,76 ± 0,43	0,87 ± 0,28	0,81 ± 0,43	0,89 ± 0,30	0,73 ± 0,30	0,89	-0,02
Glándula digestiva							
Humedad (g/100 g peso fresco)	62,3 ± 1,9	60,6 ± 2,3	65,3 ± 4,7	66,3 ± 5,5	70,2 ± 3,3 ^{\$}	61,13	1,19*
Lípidos (g/100 g peso seco)	21,6 ± 5,4	21,0 ± 3,2	22,4 ± 9,2	20,9 ± 12,4	20,7 ± 12,6	21,75	-0,13
Lípidos (g/individuo)	3,6 ± 0,9	3,1 ± 1,0	2,6 ± 1,3	2,0 ± 1,7	1,4 ± 1,1 ^{\$}	3,12	-0,23*

*P<0,05 para la pendiente de la recta de regresión; ¹P<0,05 respecto del peso inicial; ^{\$}P<0,05 respecto de los animales alimentados.

3.2.3. Métodos analíticos y determinación de las clases lipídicas.

La humedad de las muestras se determinó por desecación en una estufa KOWELL D2 NOVA durante 24 h a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta peso constante (AOAC, 1997; Método n°. 930.15). El contenido total de lípidos (LT) se obtuvo a partir de 2 g de muestra mediante eter etílico en un extractor SOXTEC AVANTI 2058 (AOAC, 1997; Método n° 920.39) y por triplicado. A partir de LT se estimó la cantidad de muestra necesaria para extraer 10 mg de lípidos según Folch et al. (1957). Los lípidos se conservaron disueltos en hexano en ultracongelador a -80°C , reajustándose la concentración a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con cloroformo:metanol (2:1 v/v) antes de los análisis.

La separación de las clases lipídicas se realizó mediante cromatografía de alta resolución en capa fina (HPTLC) siguiendo el método de Olsen y Henderson (1989). Se usaron placas de gel de sílice de HPTLC 20 x 10 cm (Merck) sometidas a un pre-tratamiento con cloroformo:metanol (2:1 v/v), donde se aplicaron 15 μg de lípidos con un autoinyector Linomat 5 (CAMAG) de acuerdo con Cerezo Valverde et al., 2012a, c.

3.2.4. Identificación y calibración para la cuantificación de las clases lipídicas.

En primer lugar se determinó el orden de aparición y la posición de referencia de cada una de las clases lipídicas aplicando cada una de ellas por separado y a partir de disoluciones elaboradas con patrones puros (Larodan Fine Chemicals, Malmo, Sweden). Se incluyeron lípidos polares (LP): lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiélna (SM), fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidiletanolamina (PE); y lípidos neutros (LN): monoglicéridos (MG; monoleína), diglicéridos (DG; dioleína), colesterol (CHO), ácidos grasos libres (FFA; ácido oleico), triglicéridos (TG; trioleína) y ésteres de esteroles (SE; Colesterol oleato). Posteriormente, se obtuvo el área expresada en unidades arbitrarias (U.A.) correspondiente a la aplicación de entre 0,1 y 15 μg de cada clase lipídica y por triplicado. Con estos datos se elaboró una recta patrón compuesta de 6 a 12 puntos, dependiendo de los límites de detección de la sustancia. Los valores obtenidos se ajustaron a la ecuación de una recta ($y = a + bx$) o a una función no lineal del tipo saturación ($y = y_0 + ax/(b+x)$) según la clase lipídica (ver Figs 1 y 2). Todas las ecuaciones se ajustaron de forma muy significativa a los valores obtenidos ($P < 0,001$) y

explicaron más del 99% de la variabilidad observada. Puesto que en el caso de los sulfolípidos (SL) no se dispuso de patrón puro, el contenido se estimó como el producto del porcentaje del área detectada por la cantidad total de lípido aplicada (15 ug).

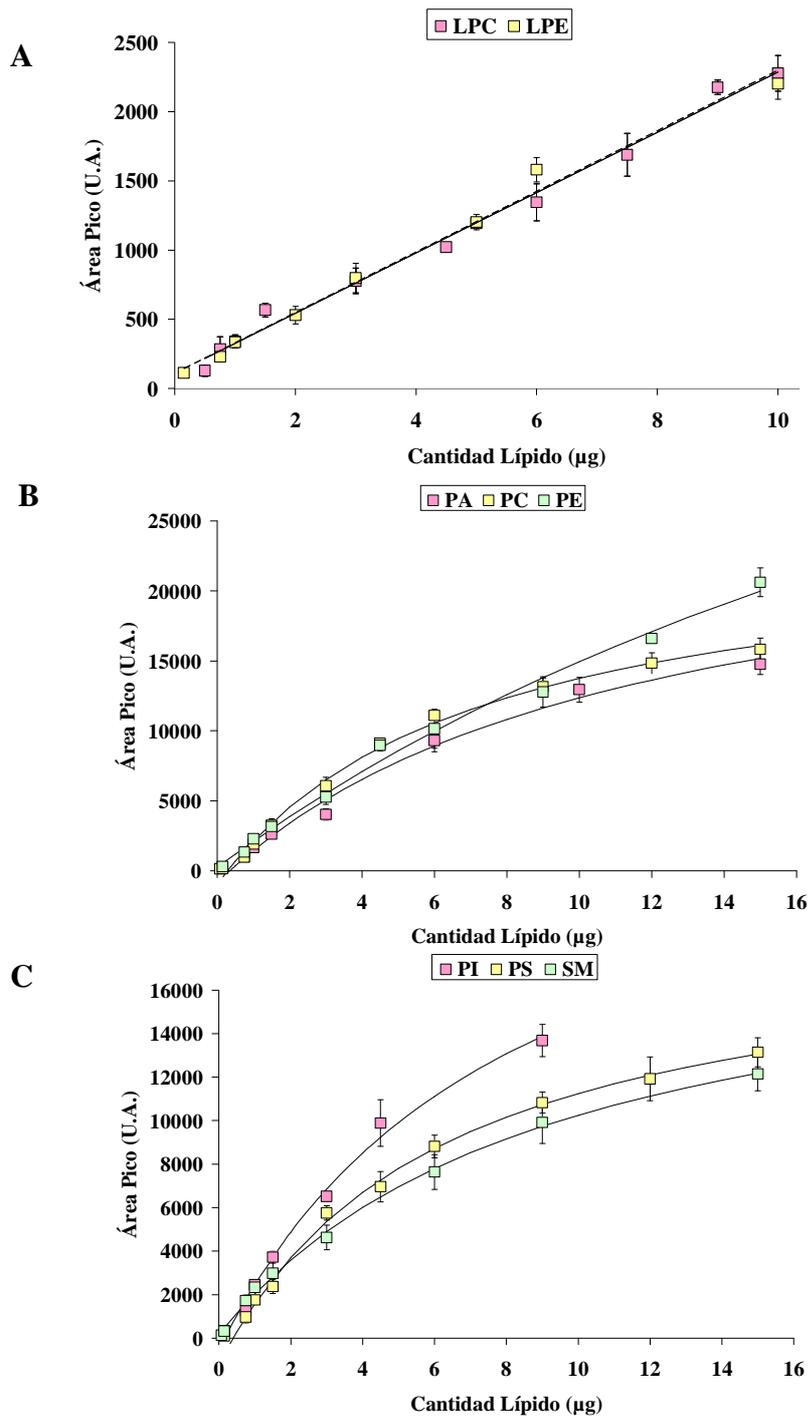


Figura 1. Curvas de calibración para los lípidos polares. **(A)** LPC (Lisofosfatidilcolina): $y = 106,5 + 217,9x$; LPE (Lisofosfatidiletanolamina): $y = 110,2 + 218,9x$ **(B)** PA (Ácido fosfatídico): $y = -844,1 + (27968,5x)/(11,2 + x)$; PC (Fosfatidilcolina): $y = -982,8 + (25156,0x) / (7,1 + x)$; PE (Fosfatidiletanolamina): $y = 237,8 + (62514,2x)/(32,5 + x)$; **(C)** PI (Fosfatidilinositol): $y = -560,4 + (27426,0x)/(8,1 + x)$; PS (Fosfatidilserina): $y = -1230,9 + (20161,3x)/(6,2 + x)$; SM (Esfingomielina): $y = 137,5 + (19488,1x)/(9,3 + x)$, donde “y” es el área del pico en unidades arbitrarias y “x” la cantidad de lípido en ug.

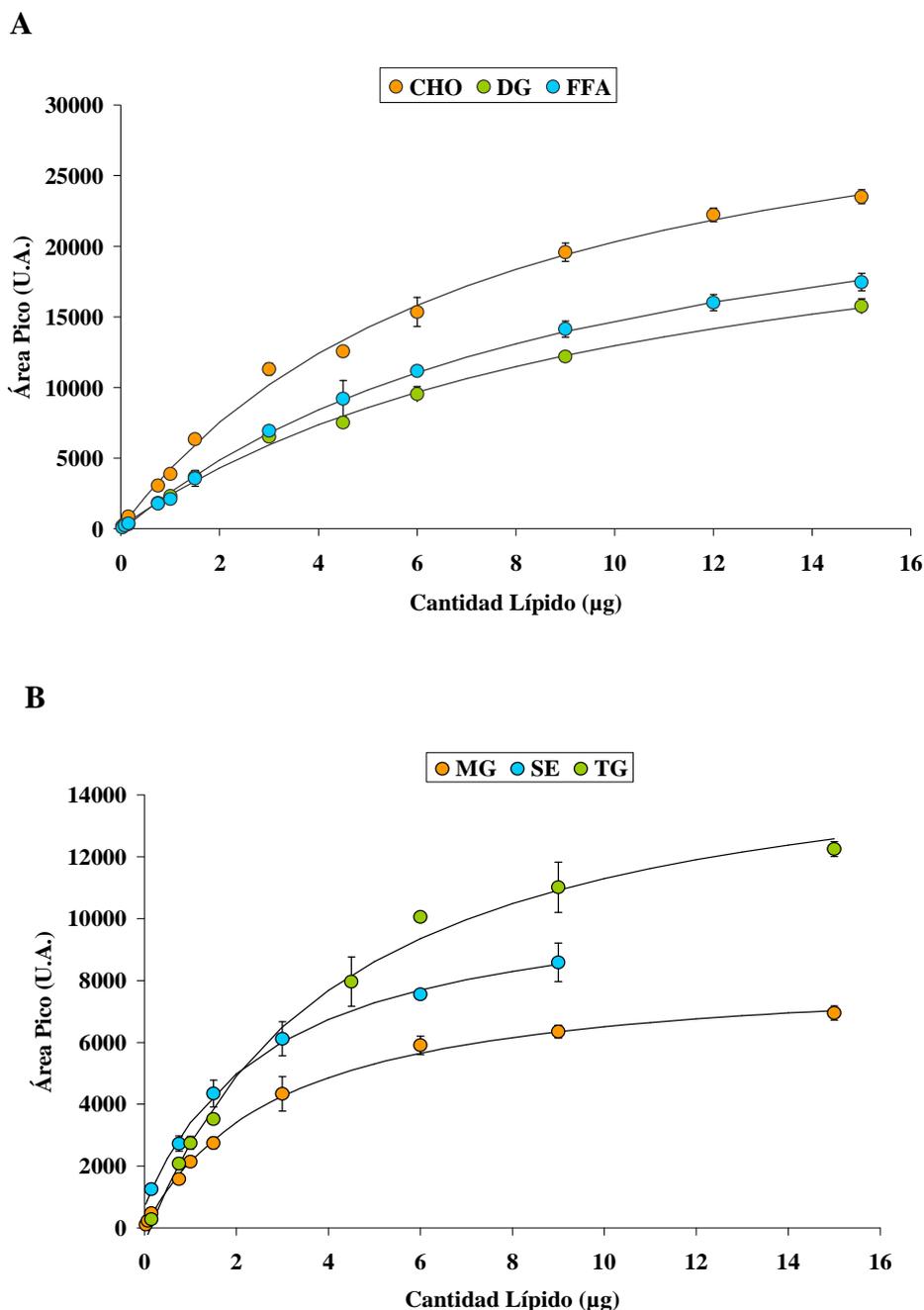


Figura 2. Curvas de calibración para los lípidos neutros. **(A)** CHO (Colesterol) : $y = 46,9 + (35297,6x) / (7,4 + x)$; DG (Diglicéridos): $y = 134,6 + (26607,9x) / (10,8 + x)$; FFA (Ácidos grasos libres): $y = -179,9 + (29138,6x) / (9,6 + x)$; **(B)** MG (Monoglicéridos): $y = 1,6 + (8401,0x) / (2,9 + x)$; SE (Ésteres de esteroles -incluye Ceras-): $y = 684,1 + (10246,5x) / (2,8 + x)$; TG (Triglicéridos): $y = -481,5 + (16700,7x) / (4,2 + x)$; donde “y” es el área del pico en unidades arbitrarias y “x” la cantidad de lípido en μg .

3.2.5. Parámetros obtenidos y análisis de los datos.

De cada grupo experimental se obtuvo la media y la desviación estándar correspondiente al peso inicial (PI), peso final (PF), incremento de peso (IP), peso eviscerado (PE) y de la glándula digestiva (PGD), índice del peso eviscerado ($IPE = PE/PF \cdot 100$) e índice de la glándula digestiva ($IGD = PGD/PF \cdot 100$). La concentración total de lípidos se expresó en g y la de cada clase lipídica en mg, en ambos casos por cada 100 g de muestra en peso seco. El contenido total de LP y LN se obtuvo como la suma de las clases lipídicas correspondientes a cada grupo. Además, se calculó el contenido en lípidos acumulado en el tejido muscular y en la glándula digestiva de cada ejemplar por separado con el fin de evitar interpretaciones erróneas en las concentraciones debido a cambios en el tamaño de estas fracciones, y según la fórmula:

Contenido en lípidos (g/individuo) = (Peso seco de tejido muscular o de glándula digestiva (g) * Concentración en lípidos (g/100 g peso seco) / 100).

Para comparar las medias de los pesos inicial y final correspondientes a cada período de ayuno se utilizó el test de la t - Student para muestras apareadas. Para conocer si había una tendencia significativa en la concentración o en el contenido lipídico en función de los días de ayuno se llevó a cabo un análisis de regresión simple, comprobando el nivel de significación de la pendiente de la recta. La comparación entre la concentración o contenido en lípidos entre los grupos de animales que ayunaron y los alimentados se llevó a cabo mediante el test de la t - Student para muestras independientes. Para todos los análisis se estableció un nivel de significación $P < 0,05$.

3.3. Resultados.

No existieron diferencias significativas entre los pesos medios de los distintos grupos al inicio del experimento. Posteriormente, se observaron diferencias entre el PI y PF a partir del segundo día de ayuno, detectándose una disminución significativa en el peso de los ejemplares a razón de -9 g/día de ayuno ($P < 0,05$; Tabla 1). Igualmente, PGD e IGD disminuyeron a razón de -2,32 g/día y -0,25%/día, respectivamente, aunque el IPE aumentó con el ayuno a razón del 0,42%/día. Por el contrario, los animales que fueron alimentados ganaron una media de 68 g de peso, mostrando un PGD e IGD mayores y un menor IPE

respecto de los animales que ayunaron 4 u 8 días ($P < 0,05$). Tanto la concentración como el contenido en lípidos fueron menores en el músculo (0,39-0,51 g/100g peso seco; 0,73-0,89 g/ind.) en comparación con la glándula digestiva (20,7-22,4 g/100g; 1,4-3,6 g/ind.). No se detectó una tendencia significativa en los contenidos de agua o lípidos como consecuencia del ayuno en el tejido muscular. En la glándula digestiva el porcentaje de agua aumentó de forma significativa con los días de ayuno ($P < 0,05$). No obstante, el contenido lipídico total mostró una tendencia negativa y significativa con el ayuno (-0,23 g/ind./día de ayuno; $P < 0,05$; Tabla 1).

En referencia a las clases lipídicas, se identificaron hasta 15 bandas distintas en los cromatogramas realizados, 9 correspondientes a lípidos polares y 6 a lípidos neutros (ver Fig. 3). En el músculo predominaron los LP (267,3 -337,2 mg/100g) frente a los LN (66,9-104,7 mg/100g), siendo PC (100,2-120,6 mg/100g), PE (68,7-94,5 mg/100g) y CHO (31,6-62,2 mg/100g) las clases lipídicas mayoritarias, representando conjuntamente más del 60% del total de lípidos detectados. La composición lipídica en el músculo se mantuvo constante durante los días de ayuno, a excepción de una tendencia positiva y significativa en la concentración de SM y MG ($P < 0,05$; Tabla 2). Las concentraciones de MG el octavo día de ayuno y de CHO el cuarto día de ayuno fueron superiores respecto de los animales alimentados ($P < 0,05$). Al considerar el contenido total de lípidos, solamente se detectó una tendencia positiva y significativa en los MG (2,96 mg/ind./día), presentándose constante el resto de clases lipídicas (Tabla 3). El contenido de CHO fue significativamente más elevado en los ejemplares que ayunaron 4 (115,1 mg/ind.) u 8 días (101,1 mg/ind.) respecto de los alimentados (58,0 mg/ind.).

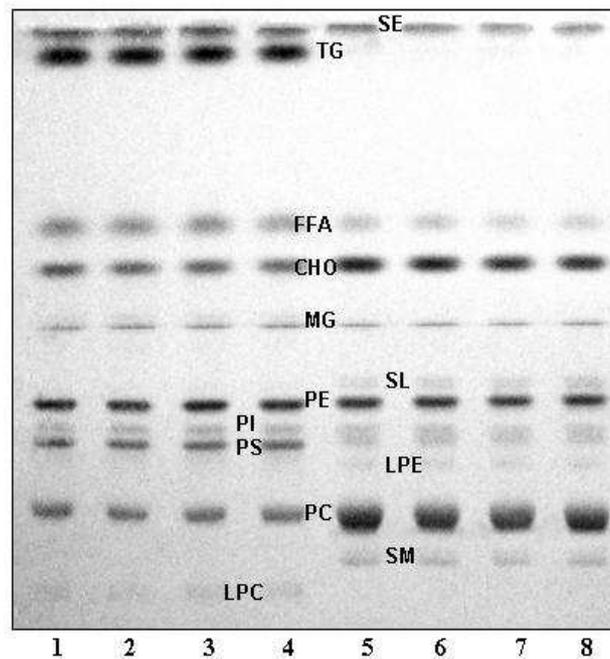


Figura 3. Cromatograma-HPTLC donde se visualizan las clases lipídicas detectadas y su orden de aparición (Pistas 1-4 glándula digestiva y 5-8 tejido muscular del mismo ejemplar de *O. vulgaris*.). **Lípidos polares:** LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA: Ácido fosfatídico (incluye Cardiolipina. y Fosfatidilglicerol); PE: Fosfatidiletanolamina; SL: Sulfolípidos; PIG: Pigmentos. **Lípidos neutros:** MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Ésteres de esterol (incluye Ceras).

Tabla 2. Concentración de las distintas clases de lípidos (mg/100g en peso seco) en el músculo de *O. vulgaris* sometido a distintos periodos de ayuno.

GRUPO	Alimentados	1 día de ayuno	2 días de ayuno	4 días de ayuno	8 días de ayuno	y = a+b*días ayuno	
	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	a	b
Lípidos polares (LP)							
LPC	N.d.	14,4 ± 20,4	7,2 ± 6,1	10,3 ± 20,6	N.d.	14,46	-1,73
SM	4,4 ± 3,6	4,9 ± 1,9	6,5 ± 2,0	6,7 ± 2,9	9,2 ± 3,0	4,74	0,55*
PC	106,9 ± 58,8	120,6 ± 21,0	102,6 ± 33,6	104,0 ± 27,3	100,2 ± 29,3	114,58	-2,06
LPE	10,8 ± 10,9	16,5 ± 8,1	17,2 ± 17,5	23,9 ± 12,8	17,8 ± 0,4	18,21	0,19
PS	22,3 ± 12,1	29,3 ± 3,7	28,4 ± 1,7	33,1 ± 8,9	31,7 ± 6,4	28,96	0,44
PI	18,4 ± 10,0	29,4 ± 4,3	41,5 ± 19,9	40,4 ± 17,4	32,7 ± 6,9	36,61	-0,15
PA	18,6 ± 6,2	23,3 ± 6,4	21,1 ± 6,0	24,2 ± 8,4	16,8 ± 4,1	24,44	-0,82
PE	82,0 ± 44,3	88,9 ± 7,9	94,2 ± 32,9	94,5 ± 26,1	68,7 ± 14,5	98,83	-3,27
SL	3,8 ± 3,1	6,9 ± 4,9	1,9 ± 3,8	N.d.	2,1 ± 2,3	4,48	-0,46
Lípidos neutros (LN)							
MG	10,1 ± 7,9	11,7 ± 0,8	12,0 ± 3,2	17,2 ± 2,4	21,4 ± 4,1 ^{\$}	10,14	1,45*
DG	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.		
CHO	31,6 ± 11,8	58,6 ± 20,2	49,9 ± 12,9	62,2 ± 13,3 ^{\$}	45,1 ± 19,8	59,34	-1,43
FFA	16,4 ± 21,4	13,5 ± 1,5	14,4 ± 4,9	17,4 ± 10,6	15,6 ± 9,5	14,13	0,29
TG	4,5 ± 2,6	3,8 ± 2,7	1,8 ± 2,0	6,1 ± 8,9	5,2 ± 4,1	2,89	0,35
SE	3,4 ± 6,8	2,3 ± 1,6	3,8 ± 3,0	1,8 ± 3,7	7,9 ± 5,6	1,21	0,73
LP (Total)	267,3 ± 138,6	334,2 ± 29,5	316,4 ± 95,0	337,2 ± 100,0	280,8 ± 61,4	342,62	-6,79
LN (Total)	66,9 ± 48,8	89,9 ± 22,1	81,9 ± 15,1	104,7 ± 22,8	95,1 ± 41,6	87,76	1,38

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA: Ácido fosfatídico (incluye Cardiolipina. y Fosfatidilglicerol); PE: Fosfatidiletanolamina; SL: Sulfolípidos; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Ésteres de esteroles (incluye Ceras). N.d. = No detectado; *P<0,05 para la pendiente de la recta de regresión; ^{\$}P<0,05 respecto de los animales alimentados.

Tabla 3. Contenido medio de las distintas clases de lípidos (mg/individuo) en el tejido muscular de un ejemplar de *O. vulgaris* sometido a distintos periodos de ayuno.

GRUPO	Alimentados	1 día de ayuno	2 días de ayuno	4 días de ayuno	8 días de ayuno	y = a+b*días ayuno	
	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	a	b
Lípidos polares (LP)							
LPC	N.d.	21,0 ± 29,6	14,1 ± 13,8	19,8 ± 39,6	N.d.	23,81	-2,69
SM	8,3 ± 6,7	8,7 ± 4,6	11,9 ± 5,2	12,2 ± 5,6	17,6 ± 8,6	8,26	1,16
PC	196,4 ± 112,2	208,5 ± 65,7	192,6 ± 96,5	192,3 ± 65,0	191,7 ± 90,8	202,52	-1,65
LPE	20,0 ± 20,2	27,2 ± 11,8	30,8 ± 28,9	41,7 ± 19,1	32,3 ± 5,2	30,66	0,64
PS	41,9 ± 23,4	50,4 ± 14,0	51,3 ± 9,2	60,6 ± 20,1	59,7 ± 23,0	50,22	1,41
PI	34,1 ± 19,7	50,1 ± 11,6	79,3 ± 54,0	73,7 ± 33,6	61,5 ± 23,9	65,75	0,11
PA	34,6 ± 13,2	39,4 ± 11,5	39,4 ± 17,3	45,1 ± 19,5	31,8 ± 13,2	42,95	-1,07
PE	151,2 ± 84,8	151,7 ± 33,8	177,3 ± 93,7	175, ± 65,5	129,5 ± 49,3	175,91	-4,62
SL	7,0 ± 6,0	12,4 ± 8,9	4,4 ± 8,8	N.d.	3,8 ± 4,1	8,49	-0,88
Lípidos neutros (LN)							
MG	18,7 ± 14,7	20,0 ± 3,9	22,0 ± 7,5	31,0 ± 3,0	40,2 ± 15,1	17,19	2,96*
DG	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.		
CHO	58,0 ± 23,3	96,7 ± 28,2	92,9 ± 38,8	115,1 ± 35,4 ^{\$}	101,1 ± 30,2 ^{\$}	97,54	1,04
FFA	30,4 ± 39,3	23,1 ± 5,9	26,4 ± 10,4	30,1 ± 14,4	31,4 ± 22,9	23,65	1,09
TG	8,3 ± 4,9	5,8 ± 4,2	2,9 ± 3,3	12,1 ± 17,0	10,8 ± 9,1	4,24	0,97
SE	6,3 ± 12,5	5,2 ± 1,0	9,1 ± 2,7	2,7 ± 5,4	17,9 ± 12,7	1,95	1,71
LP (Total)	493,6 ± 266,7	569,4 ± 122,4	593,4 ± 288,8	621,5 ± 227,3	530,8 ± 211,2	603,93	-6,71
LN (Total)	123,5 ± 90,9	149,0 ± 29,0	151,0 ± 51,0	191,0 ± 51,2	185,5 ± 104,7	147,93	5,65

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA: Ácido fosfatídico (incluye Cardiolipina. y Fosfatidilglicerol); PE: Fosfatidiletanolamina; SL: Sulfolípidos; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Ésteres de esteroles (incluye Ceras). N.d. = No detectado; *P<0,05 para la pendiente de la recta de regresión; ^{\$}P<0,05 respecto d los animales alimentados.

En la glándula digestiva predominaron los LN (12.958-14.151 mg/100g) frente a los LP (3.157-6.517 mg/100g), siendo los TG (1.799-7.952 mg/100g), FFA (2.862-5.376 mg/100g) y MG (595-2.469 mg/100g) las clases lipídicas mayoritarias (Tabla 4). Se detectó una tendencia positiva en la concentración total de LP (428 mg/100g/día), siendo significativa para SM, PC, PS y PE ($P < 0,05$). No se detectó una tendencia en la concentración total de LN, aunque sí una tendencia positiva en los MG (190 mg/100g/día) y negativa para los TG (-595 mg/100 g/día), significativa en ambos casos ($P < 0,05$). La concentración de TG en los animales que ayunaron 8 días fue menor y la de MG mayor respecto de los animales alimentados ($P < 0,05$; Tabla 4).

Al considerar el contenido total de lípidos en la glándula digestiva, se detectó una tendencia negativa tanto para los LP como los LN, aunque sólo fue significativa en este último caso (-133,31 mg/ind./día; $P < 0,05$; Tabla 5). Principalmente esta disminución se atribuyó al descenso significativo en los TG (-103,67 mg/ind./día). Generalmente, los individuos que ayunaron durante 8 días mostraron menor contenido para todas las clases lipídicas respecto de los alimentados, siendo significativas para el contenido total de LN, LPE, PA y TG ($P < 0,05$; Tabla 5).

Tabla 4. Concentración de las distintas clases de lípidos (mg/100g en peso seco) en la glándula digestiva de *O. vulgaris* sometido a distintos periodos de ayuno.

GRUPO	Alimentados	1 día de ayuno	2 días de ayuno	4 días de ayuno	8 días de ayuno	y = a+b*días ayuno	
	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	a	b
Lípidos polares (LP)							
LPC	282,5±114,8	306,9±37,9	218,4±173,1	298,1±178,1	367,1±185,8	244,37	14,21
SM	14,5±29,1	N.d.	N.d.	25,0±29,1	40,2±54,8	-6,80	6,16*
PC	1567,0±794,8	819,7±154,8	960,1±268,1	1623,2±668,2	1940,6±580,8	720,37	164,14*
LPE	292,6±71,1	186,3±70,6	263,0±99,5	241,8±147,7	265,6±128,6	210,96	7,53
PS	807,3±286,6	673,4±101,2	856,9±278,9	969,9±515,1	1207,2±473,4	663,16	70,32*
PI	439,3±160,5	399,0±45,3	629,2±362,9	558,8±275,7	683,9±174,1	457,14	29,49
PA	265,2±37,4	161,9±25,9 ^s	194,1±62,7	109,5±43,3 ^s	200,4±149,3	154,24	3,27
PE	965,7±465,5	383,5±178,3	591,5±177,1	700,9±212,9	1357,4±834,7	255,60	134,07*
SL	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.		
Lípidos neutros (LN)							
MG	595,6±204,8	1184,2±281,8 ^s	1250,5±631,8	1684,1±621,6 ^s	2469,4±1579,9 ^s	933,43	190,29*
DG	405,9±141,8	690,9±258,4	562,0±355,8	740,2±216,3	1102,9±1469,3	520,95	69,43
CHO	529,6±227,4	666,1±19,2	1186,4±967,4	934,6±426,8	1901,9±1477,5	597,21	153,3
FFA	2862,9±980,2	3635,0±366,9	4813,5±1920,0	3621,7±2471,5	5376,3±5149,5	3665,79	185,56
TG	7952,4±1924,3	5949,8±1252,0	5680,6±927,3	6157,6±5151,1	1799,1±1130,4 ^s	7129,48	-595,39*
SE	645,3±104,9	1068,1±338,8	686,2±283,2	968,3±959,9	919,2±920,8	935,55	-3,42
LP (Total)	5116,4±2702,1	3157,7±531,6	4534,7±1270,8	4949,5±2132,1	6516,7±2032,7	3181,6	428,22*
LN (Total)	12958,6±2316,6	13492,5±1249,7	14151,4±3896,8	13239,2±8962,4	13864,1±10921,9	13639,49	12,62

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomiélin; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA: Ácido fosfatídico (incluye Cardiolipina. y Fosfatidilglicerol); PE: Fosfatidiletanolamina; SL: Sulfolípidos; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Ésteres de estero (incluye Ceras). N.d. = No detectado; *P<0,05 para la pendiente de la recta de regresión; ^sP<0,05 respecto de los animales alimentados.

Tabla 5. Contenido medio de las distintas clases de lípidos (mg/individuo) en la glándula digestiva de un ejemplar de *O. vulgaris* sometido a distintos periodos de ayuno.

GRUPO	Alimentados	1 día de ayuno	2 días de ayuno	4 días de ayuno	8 días de ayuno	y = a+b*días ayuno	
	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	a	b
Lípidos polares (LP)							
LPC	44,5 ± 9,6	43,6 ± 8,7	25,1 ± 20,4	28,8 ± 25,1	24,3 ± 18,1	37,41	-1,85
SM	2,8 ± 0,9	n.d.	n.d.	1,4 ± 1,7	3,1 ± 1,9	-0,64	0,48*
PC	259,8 ± 130,6	113,3 ± 8,1	108,5 ± 51,2	149,6 ± 113,1	115,9 ± 42,2	118,13	0,99
LPE	48,4 ± 12,6	27,2 ± 11,6 [§]	29,6 ± 14,1	23,4 ± 20,6	15,6 ± 6,9 [§]	31,04	-1,89
PS	131,8 ± 44,0	96,3 ± 22,7	98,5 ± 55,0	92,6 ± 78,8	76,9 ± 44,9	102,43	-3,03
PI	72,3 ± 27,9	58,6 ± 17,9	71,8 ± 46,3	53,3 ± 45,6	42,1 ± 18,5	68,86	-3,30
PA	120,5 ± 4,3	58,3 ± 5,9 [§]	68,4 ± 40,5	26,4 ± 11,9 [§]	45,5 ± 37,0 [§]	60,10	-2,78
PE	169,3 ± 99,8	50,8 ± 12,6	66,8 ± 31,5	63,7 ± 46,5	75,1 ± 39,4	53,87	2,73
SL	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.		
Lípidos neutros (LN)							
MG	95,3 ± 24,2	164,0 ± 23,4 [§]	165,1 ± 116,2	118,1 ± 74,3	168,6 ± 145,2	153,13	0,22
DG	68,4 ± 31,2	108,8 ± 64,2	57,5 ± 29,5	84,2 ± 46,4	85,9 ± 119,8	85,85	-0,47
CHO	84,1 ± 27,8	96,4 ± 23,6	144,8 ± 130,8	83,4 ± 55,1	133,7 ± 131,2	105,41	2,45
FFA	456,5 ± 101,9	536,1 ± 180,7	558,6 ± 321,0	331,3 ± 259,9	391,3 ± 441,9	546,34	-24,53
TG	1341,6 ± 460,8	903,7 ± 402,3	627,8 ± 194,4 [§]	642,2 ± 698,9	104,2 ± 56,7 [§]	958,22	-103,67*
SE	109,4 ± 13,3	143,4 ± 8,4 [§]	80,2 ± 56,01	116,8 ± 159,8	71,5 ± 99,5	132,97	-7,61
LP (Total)	843,8 ± 353,2	439,8 ± 42,9	517,7 ± 246,9	460,6 ± 371,4	402,4 ± 187,5	492,94	-10,08
LN (Total)	2146,9 ± 480,2	1994,6 ± 668,6	1613,9 ± 762,2	1304,8 ± 905,1	976,6 ± 765,3 [§]	1972,42	-133,31*

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomieline; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA: Ácido fosfatídico (incluye Cardiolipina. y Fosfatidilglicerol); PE: Fosfatidiletanolamina; SL: Sulfolípidos; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Ésteres de esteroles (incluye Ceras). N.d. = No detectado.; *P<0,05 para la pendiente de la recta de regresión; [§]P<0,05 respecto de los animales alimentados.

3.4. Discusión.

En este trabajo, el método del HPTLC descrito previamente por Olsen y Henderson (1989) ha demostrado ser efectivo para cuantificar las distintas clases lipídicas cuando se acompañan de curvas de calibración elaboradas con estándares puros. Como se observa en las Figs. 1 y 2, este método tiene la ventaja de tener en cuenta las diferentes respuestas de las clases lipídicas a pesar de aplicar cantidades similares de lípidos. Por lo tanto, éste método podría aportar resultados más precisos para las estimaciones cuantitativas de clases lipídicas comparadas con otros estudios donde se muestran los porcentajes de las áreas detectadas en densitometría (Almansa et al., 2006; García-Garrido et al., 2010). Igualmente, en otros estudios, las curvas de calibración realizadas para análisis cuantitativos mediante HPTLC se han aplicado con buenos resultados para lípidos del tejido nervioso, incluyendo SM, PC, PE, PI, PS, cerebrosidos y SL (Macala et al., 1983) o TG de cadena larga y media, y sus productos derivados de la digestión (Sek et al., 2001).

La pérdida de peso en *O. vulgaris* como consecuencia del ayuno se pudo atribuir en mayor medida a la disminución del peso de la glándula digestiva más que a la fracción del peso eviscerado, sugiriendo también una mayor contribución energética de la glándula digestiva durante los primeros días de ayuno. De forma similar, O'Dor et al. (1984) en *O. vulgaris*, Tait (1986) en *Todarodes japonicus* y Castro et al. (1992) en *Sepia officinalis* describieron una disminución del peso de la glándula digestiva con tasas más rápidas que el peso corporal durante el ayuno.

3.4.1. Variaciones en la composición y el contenido lipídico del tejido muscular.

Según nuestros resultados, los lípidos presentes en el tejido muscular no contribuyeron de forma significativa al mantenimiento del metabolismo energético durante el ayuno en *O. vulgaris*. En primer lugar, tanto las concentraciones como el contenido total en lípidos fueron extraordinariamente bajos (<0,51 mg/100g peso seco y <0,89 g/ind.), además de mantenerse constantes durante un período de 8 días de ayuno. Estos resultados coinciden con los bajos niveles de lípidos encontrados en la musculatura de otros octópodos (Rosa et al., 2005). En segundo lugar, la composición lipídica del músculo apenas mostró variaciones a lo largo del periodo experimental, conservándose el predominio de los lípidos polares sobre los neutros.

Al igual que en los trabajos de Navarro y Villanueva (2000), Almansa et al. (2006) o Cerezo et al. (2012b), PC, PE, PS y PI fueron los LP mejor representados. Aparte de sus funciones meramente estructurales, estos lípidos intervienen en la regulación de la fluidez de las membranas, procesos de transporte, metabolismo y producción de energía (Tocher et al., 2008).

A nivel muscular, fueron interesantes los cambios detectados en MG y CHO durante el ayuno. Los MG pueden considerarse productos intermediarios en el proceso de degradación de los TG para la obtención de energía aumentando de forma progresiva con los días de ayuno. Sin embargo, no se detectaron cantidades significativas ni variaciones en el contenido de TG en el músculo, sugiriendo que estos MG procederían de un lugar distinto. Simultáneamente, también se detectó un mayor contenido de CHO en los ejemplares que ayunaron respecto de los alimentados regularmente, sugiriendo que éste también podría ser transportado desde otros tejidos u órganos. Estos resultados hacen plantearnos la hipótesis de un transporte simultáneo de TG y CHO durante el ayuno a través de la hemolinfa hacia las células musculares. Previamente, Heras y Pollero (1990, 1992) describieron la presencia de tres lipoproteínas de distinta densidad (LP-I, LP-II y LP-III) y composición lipídica que podrían actuar como medio transportador de lípidos entre órganos en *Octopus tehuelchus*. La mayoría del CHO y fosfolípidos son transportados por LP-I y LP-II y los FFA, SE y TG por LP-III. No obstante, el hecho de que las concentraciones de MG y TG sigan siendo bajas en el músculo hace pensar que éstos serían inmediatamente metabolizados.

3.4.2. Variaciones en la composición y el contenido lipídico de la glándula digestiva.

La hipótesis propuesta anteriormente explicaría también la disminución progresiva de los niveles de TG en la glándula digestiva, así como parte de los resultados obtenidos por otros autores en cuanto al metabolismo lipídico de los cefalópodos, y entre los que se incluyen: a) un mejor aprovechamiento nutritivo de la dieta y retención de la proteína cuando se suministran dietas mixtas a base de pescado y crustáceos – moderada en grasa-, que cuando están basadas exclusivamente por crustáceos – muy baja en grasa- (García García y Cerezo Valverde, 2006; Prato et al., 2010); b) la controversia surgida en algunas especies cuyos lípidos digeridos no acaban siendo almacenados en la glándula digestiva (Semmens, 1998; Moltschaniwsky y Johnston, 2006); c) los excelentes resultados del engorde de *O. vulgaris*

con *B. boops* procedente del descarte de jaulas marinas a pesar de su elevado contenido en LN y CHO (Estefanell et al., 2010); d) la presencia generalizada de CHO en el tejido muscular de los cefalópodos así como mejores crecimientos cuando sus presas contienen mayores niveles de este nutriente (Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Domínguez et al., 2004; Almansa et al., 2006). El CHO se muestra como nutriente importante a nivel estructural y está implicado en las propiedades fisiológicas de las membranas celulares, pero también actúa como precursor de hormonas esteroideas, sales biliares y vitamina D (Crockett y Hazle, 1997; Kanazawa, 2001). No obstante, la disminución de CHO en el tejido muscular en los ejemplares alimentados sugiere su participación en procesos metabólicos asociados al crecimiento de los animales.

A nivel de la glándula digestiva se detectó la tendencia a concentrarse de la mayoría de LP, seguramente provocada por la disminución en el tamaño de este órgano. No obstante, el contenido total almacenado de estos lípidos se mantendría constante por lo que estas clases lipídicas no parecen movilizarse durante el ayuno a corto plazo. También en *Sepia officinalis* se detectó un aumento en la concentración de fosfolípidos conforme avanzaba el estado de ayuno (Castro et al., 1992) por lo que su uso podría estar limitado a las fases de crecimiento. Por otro lado, los ejemplares alimentados sí presentaron la capacidad de almacenar estas clases de lípidos, con valores que duplicaron los observados en los ejemplares que ayunaron, aunque la alta variabilidad de los datos no permitió detectar diferencias para la mayoría de ellas y podría ser el resultado de variaciones del estado previo de alimentación. (Castro et al., 1992; Moltschaniwsky y Johnston, 2006).

Las variaciones también fueron evidentes en el total de LN, FFA, SE y TG, cuyos contenidos tendieron a disminuir como consecuencia del ayuno. La movilización de lípidos, TG y SE de este órgano también ha sido demostrada en otros trabajos (O'Dor y Wells, 1987; Castro et al., 1992; Moltschaniwsky y Johnston, 2006; García-Garrido et al., 2010). Moltschaniwsky y Johnston (2006) no detectaron aumentos en el contenido de lípidos de reserva en la glándula digestiva a pesar del incremento en la ración de alimentación. Por esta razón, sugirieron la existencia de otras localizaciones para el almacenamiento de estos lípidos, la posibilidad de su excreción o la inmediata metabolización, siendo ésta última la hipótesis más plausible en base a los resultados obtenidos en el presente estudio. Más recientemente, García-Garrido et al. (2010) observaron un descenso de SE y TG en la glándula digestiva de *O. vulgaris* después de 10 y 21 días de ayuno, respectivamente. Estos autores sólo tienen en

cuenta los valores de concentración pero no el cambio importante en el tamaño. En este sentido, para una concentración constante, el contenido total de SE y TG será menor en una glándula digestiva más pequeña, así que se debería esperar una respuesta en la disminución de estas clases lipídicas más prematura.

3.4.3. Contribución energética de los lípidos en *O. vulgaris*.

Desde un punto de vista bioenergético, los resultados obtenidos demuestran una contribución significativa de los lípidos al metabolismo energético del pulpo. Concretamente, los lípidos almacenados en la glándula digestiva disminuyeron a razón de 0,23g/día de ayuno en un ejemplar de 1 kg. A partir de los coeficientes oxicalóricos propuestos por Miglavs y Jobling (1989) 1 g de lípidos proporcionaría 38,9 kJ, lo que supondría un aporte calórico de unos 9 kJ por día, en su mayor parte procedente de los TG de la glándula digestiva. En el caso de un ejemplar de 1 kg a 18°C –condiciones experimentales similares a las del presente estudio-, Cerezo Valverde y García García (2004) estimaron un consumo de oxígeno de 2,6 g de O₂/día y un gasto energético de 34,7 kJ/día en situación de rutina. En este caso, se puede estimar que los lípidos contribuirían con el 26% del gasto energético diario de los animales durante el ayuno a corto plazo y el resto debería de ser suministrado por otras fuentes como las proteínas (Lee, 1994) o los hidratos de carbono (Morillo-Velarde et al., 2011a). En *Sepia officinalis* los lípidos aportaron el 39,8% de la energía procedente de la glándula digestiva durante un ayuno prolongado (Castro et al., 1992), observándose valores de hasta el 57% durante el ayuno reproductivo en *Octopus minus* (Zamora y Olivares, 2004).

Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que tanto los TG como el CHO podrían ser transportados simultáneamente a través de la hemolinfa durante el ayuno hacia las células musculares y por tanto, los niveles de TG en la glándula digestiva irán disminuyendo gradualmente, aunque esta interesante hipótesis deberían ser comprobada mediante estudios del metabolismo lipídico. Igualmente, el empleo de dietas formuladas y suplementadas con distintas clases de lípidos, especialmente fosfolípidos, triglicéridos o colesterol, podría ser una herramienta eficaz para aclarar su papel y comprobar su utilización en periodos de crecimiento.

4. CAPÍTULO II:

Contribución energética de los carbohidratos durante el ayuno en el pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Publicado: Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García, B., 2011. Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Molluscan Studies*, 77, 318–320.

Congreso:

Autores: Piedad S. Morillo-Velarde, Jesús Cerezo Valverde, Rosa M. Serra Llinares, Benjamín García García.

Título: Contribución energética de los carbohidratos durante el ayuno en el pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Tipo de participación: Póster

Congreso: XIII Congreso Nacional de Acuicultura

Publicación: Libro de Actas XIII Congreso Nacional de Acuicultura, pp.116-117

Lugar celebración: Castelldefels (Barcelona) Fecha: Noviembre 2011

4. CAPÍTULO II: Contribución energética de los carbohidratos durante el ayuno en el pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Resumen.

La concentración de los carbohidratos (CH) fue analizada en la glándula digestiva, en la gónada y en el músculo de *Octopus vulgaris* a lo largo de 8 días de ayuno. La concentración de CH estuvo comprendida entre 2,42-4,23 g/100g SS en la glándula digestiva, 2,14-3,20 g/100g SS en la gónada y 1,78-3,16 g/100g SS en el músculo. La concentración de CH permaneció constante durante los 8 días de ayuno en la glándula digestiva y en la gónada. Los cambios más evidentes se produjeron a nivel del tejido muscular. El descenso en la concentración de CH en el músculo a razón de 0,02 g/100g de peso húmedo para un ejemplar de 1 kg representaría un consumo total de 0,18 g de CH. Como conclusión se puede asumir una contribución de los CH del 9,9 % al gasto energético diario en situación de ayuno (8,6 % del músculo y 1,3 % de la glándula digestiva). Por lo tanto, aunque se haya demostrado un papel secundario de los CH en *O. vulgaris*, éstos contribuirían al metabolismo energético en situaciones concretas y no deberían menospreciarse en el contexto de sus requerimientos nutritivos ni en la formulación futura de dietas para cefalópodos.

4.1. Introducción.

El conocimiento de los requerimientos nutricionales en cefalópodos se encuentra aún en su fase incipiente y ha estado limitado por la escasa disponibilidad de dietas formuladas de apropiada aceptabilidad y/o composición nutritiva (Domingues et al., 2007; Cerezo Valverde et al., 2008). La mayoría de las hipótesis sobre estos requerimientos se han generado al suministrar dietas naturales, a partir de sus análisis bioquímicos y de los propios cefalópodos (García García y Cerezo Valverde, 2006), mediante la utilización de sustratos energéticos marcados (O'Dor et al., 1984) o en experimentos de ayuno (Castro et al., 1992). De ellos, se deduce que los cefalópodos son especies exclusivamente carnívoras y, a diferencia de lo ocurrido con las proteínas, raramente utilizan carbohidratos (CH) o lípidos como fuente de energía (Lee, 1994). No obstante, se ha demostrado que tienen la capacidad de digerir, almacenar y utilizar CH, proporcionando energía preferentemente para las actividades

explosivas de carácter anaeróbico (Wells y Clarke, 1996). Según O'Dor et al. (1984), los CH después de una comida son rápidamente catabolizados y sólo una pequeña cantidad sería acumulada como glucógeno muscular, siendo prácticamente inmune a su movilización en situaciones de ayuno. Según Hochachka y Fields (1982) el glucógeno también puede ser rápidamente recuperado directamente de la glucosa en circulación o de aminoácidos gluconeogénicos. En contraste, se han encontrado cantidades variables y significativas en todos los tejidos de numerosas especies de cefalópodos, incluyendo la gónada (1-9% materia seca), la glándula digestiva (3-13% materia seca) y el músculo (1-8% materia seca) (Rosa et al., 2005). A pesar de ello, los estudios sobre la contribución de estos sustratos al metabolismo energético en cefalópodos son escasos en comparación con los dedicados a proteínas o lípidos. El objetivo de este estudio fue conocer la variación en el contenido de CH en el tejido muscular, glándula digestiva y gónada de *Octopus vulgaris*, así como su contribución al gasto energético total durante el ayuno.

4.2. Materiales y métodos.

Los ejemplares de *O. vulgaris* se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) y fueron transferidos a tanques circulares individuales de 262 l en el laboratorio. Los animales se aclimataron durante 2 semanas, durante este periodo se alimentaron con alacha (*Sardinella aurita*) y cangrejo (*Carcinus mediterraneus*) en días alternativos. Los tanques fueron equipados con un sistema de recirculación de agua con control de la temperatura (Air Energy, Heat Pump Inc., Model 400 Ti) y filtración mecánica y biológica; la temperatura se mantuvo constante ($18,19 \pm 1,13^{\circ}\text{C}$). Después del periodo de aclimatación, los animales se pesaron y sexaron, formando 5 grupos experimentales de 4 individuos macho cada uno con un peso medio inicial similar (957-1099 g; $1022,75 \pm 163,96$ g). Cuatro de estos grupos se sacrificaron a los días 1, 2, 4 y 8 después de suministrar la última comida. Se dispuso además de un grupo control final que fue alimentado durante los 8 días del experimento. Todos los animales fueron anestesiados por inmersión en agua de mar helada antes del sacrificio (Rodríguez-Domínguez et al., 2006). Posteriormente a su disección se pesó el tejido muscular (animal completo sin vísceras), la glándula digestiva y la gónada. El contenido de humedad de cada tejido fue determinado por desecación a 105°C hasta peso constante durante 24 h. Los CH totales fueron determinados por triplicado, siguiendo el método descrito por Dubois et al.

(1956), y expresado como g/100g de tejido en peso húmedo (SH) y en peso seco (SS). Se utilizó un análisis de regresión simple para determinar la variación en la concentración de CH en función de los días de ayuno. Se usó el test de la t- Student para comparar la concentración de CH entre los grupos de animales que ayunaron y el control (animales alimentados), con nivel de significación de $P < 0,05$.

4.3. Resultados y Discusión.

Los animales mostraron una pérdida significativa en el peso total y en el peso de la glándula digestiva a partir del 4º día de ayuno ($P < 0,05$), aunque no se detectaron ni en el peso eviscerado ni en la gónada. Considerando todos los ejemplares analizados, la concentración de CH estuvo comprendida entre 2,42-4,23 g/100g SS en la glándula digestiva (Fig. 1A), 2,14-3,20 g/100g SS en la gónada (Fig. 1B) y 1,78-3,16 g/100g SS en el músculo (Fig. 1C). Ni en la glándula digestiva (Fig. 1A) ni en la gónada (Fig. 1B) se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos, manteniéndose una concentración de CH constante a lo largo de los 8 días de ayuno (en peso seco y húmedo, $P > 0,05$). Igualmente, no existieron diferencias en estos tejidos entre los animales que ayunaron y los alimentados ($P > 0,05$). Sin embargo, a pesar de las concentraciones de CH similares en la glándula digestiva de los animales que ayunaron 8 días y los controles, el mayor tamaño de la glándula digestiva en estos últimos se tradujo en un mayor contenido de CH almacenado en este órgano ($0,59 \pm 0,20$ g vs. $0,20 \pm 0,09$ g/glándula digestiva/ind.; $P < 0,05$), con una disminución en CH a razón de $0,028$ g/glándula digestiva/día de ayuno/ind. Además, fue detectada una correlación positiva entre el contenido de agua y CH, contribuyendo a una concentración de CH constante en la glándula digestiva (Fig. 3). Una tendencia negativa y significativa fue observada para la concentración de CH en el músculo ($-0,02$ g/100g SH y $-0,08$ g/100g SS de CH por día de ayuno; $P < 0,05$; Fig. 1C). Además, los animales mostraron concentraciones significativamente más bajas de CH en el músculo después de 4 u 8 días de ayuno ($1,78 \pm 0,16$ y $1,78 \pm 0,54$ g/100g SS, respectivamente) respecto de los ejemplares alimentados ($3,16 \pm 0,90$ g/100g SS). En base a los resultados obtenidos se ha comprobado la capacidad de almacenamiento de CH a nivel de la glándula digestiva cuando los animales se alimentan con una dieta mixta de crustáceos y pescado.

En el presente estudio, las reservas de los CH de las gónadas no fueron movilizadas, contrariamente a las observaciones hechas en la glándula digestiva y músculo. Quizás el glucógeno gonadal está preservado para la maduración o síntesis del tejido reproductivo. Rosa et al. (2005) detectó un aumento en los niveles de glucógeno en las gónadas de ambos sexos de cefalópodos maduros. En nuestro estudio, los análisis bioquímicos fueron realizados sólo en machos en la misma etapa de madurez para evitar la influencia de procesos reproductivos.

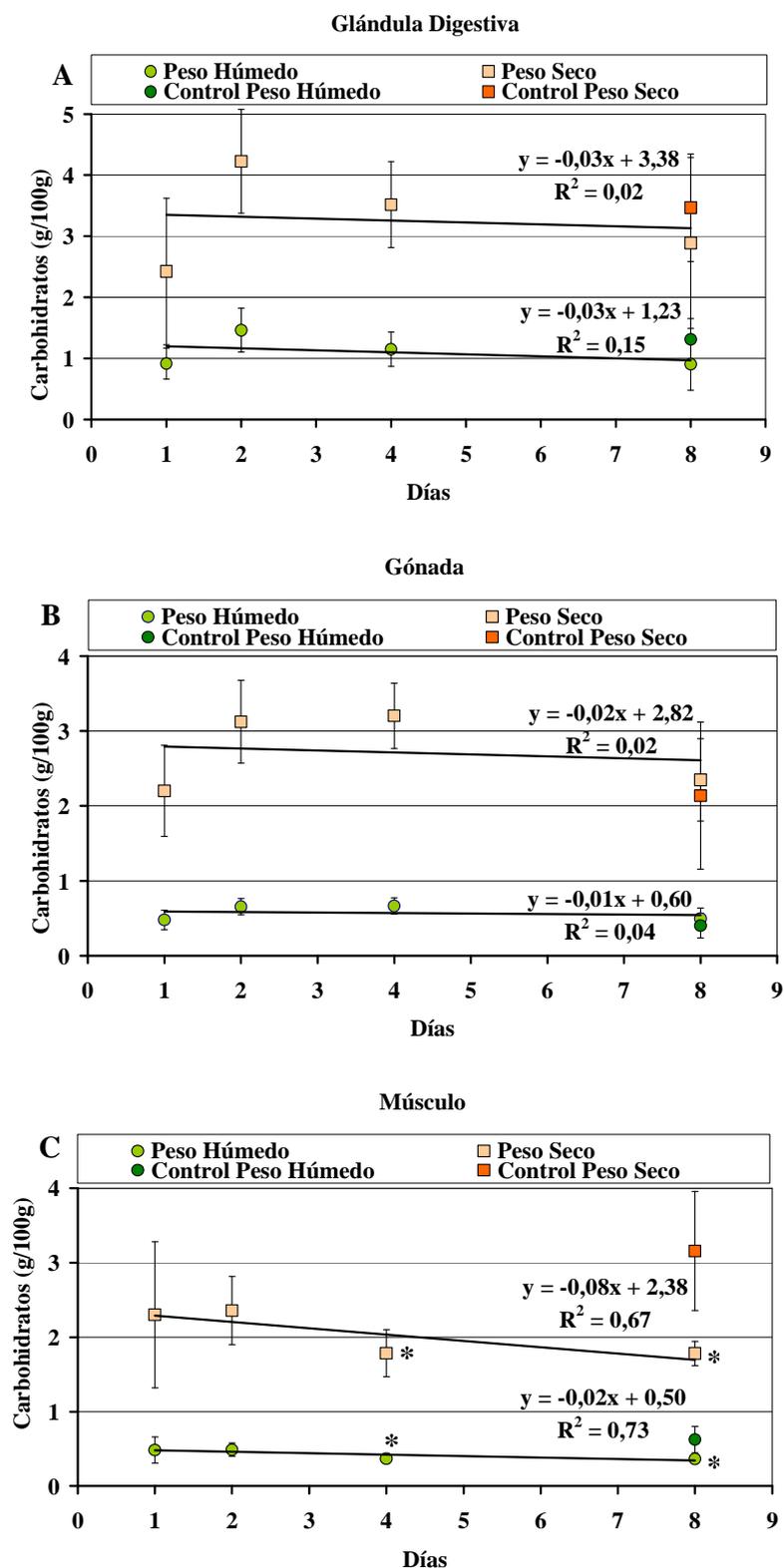


Figura 1. Variación en la concentración de carbohidratos en peso húmedo y peso seco (g/100g), en la glándula digestiva (A), gónada (B) y músculo (C) de *Octopus vulgaris* durante 8 días de ayuno. Los valores indican la media \pm desviación estándar (n=4); *P<0,05 entre los animales que ayunan y los alimentados.

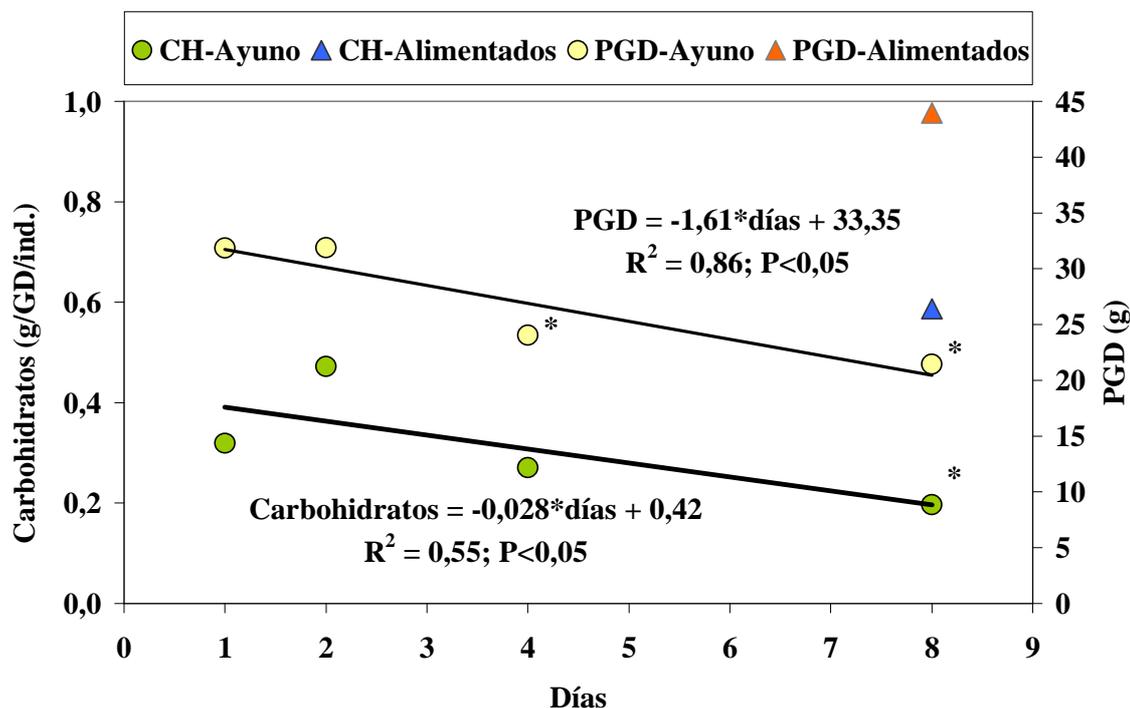


Figura 2. Contenido de carbohidratos en la glándula digestiva (g/GD/ind.) y peso de la glándula digestiva (PGD) en ejemplares de *O. vulgaris* alimentados y en ayunas. Cada punto representa el valor medio de 4 animales. * $P < 0,05$ entre los animales que ayunan y los alimentados.

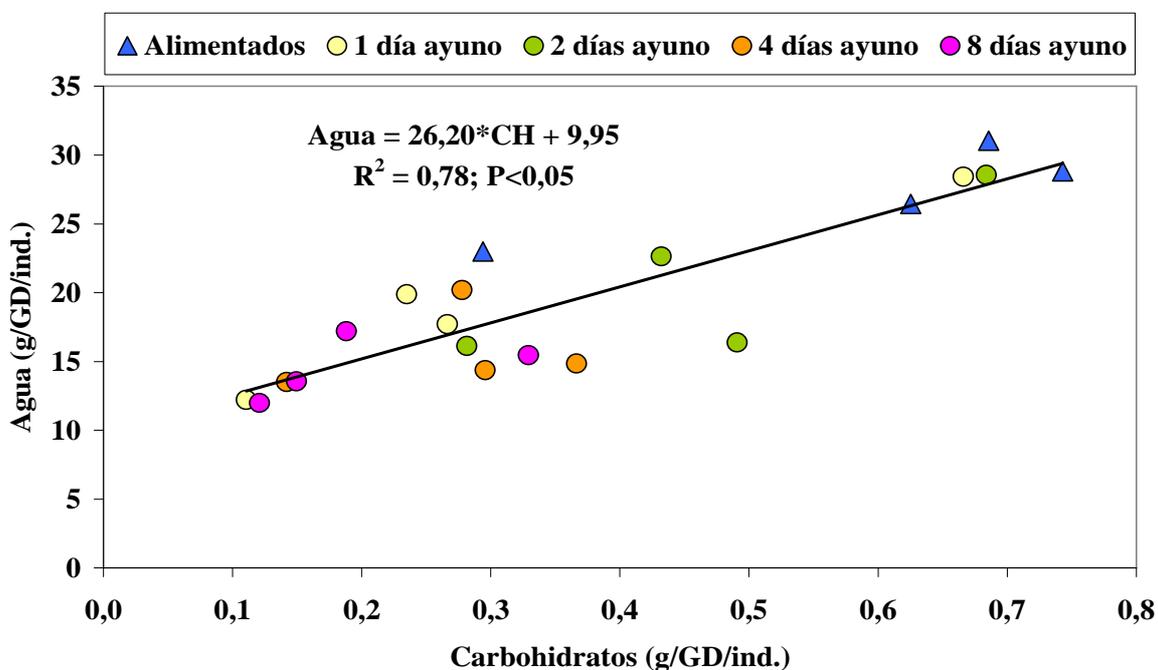


Figura 3. Contenido de agua (g/DG/individuo) en función al contenido de CH en la glándula digestiva (g/GD/individuo) en *O. vulgaris* en ayunas y alimentados.

Los cambios más evidentes se produjeron a nivel del tejido muscular. El descenso en la concentración de CH en el músculo a razón de 0,02 g/100g/día para un ejemplar de 1 kg (85-90% es tejido muscular) representaría un consumo total de 0,18 g de CH. Considerando un coeficiente calórico de 16,7 kJ/g de CH, éstos 0,18 g representarían un aporte energético de 3 kJ/día. Una menor contribución fue detectada en la glándula digestiva (0,028 g/glándula digestiva/ind./día o 0,47kJ). Estudios más específicos son necesarios para discernir si las reservas de CH son usadas para cubrir los propios requerimientos de la glándula digestiva o como parte de la demanda muscular. Para un ejemplar de 1 kg a 18°C –condiciones experimentales similares a las del presente estudio-, Cerezo Valverde y García García (2004) estimaron un consumo de oxígeno de 2,6 g de O₂/día en situación de rutina y un gasto metabólico de 35 kJ/día. Como conclusión se puede asumir una contribución de los CH del 9,9% al gasto energético diario en situación de ayuno (8,6% y 1,3% procedentes del músculo y de la glándula digestiva, respectivamente). Igualmente, Castro et al. (1992) observaron una baja contribución de los CH, inferior al 3% del total de energía movilizada por la glándula digestiva en *Sepia officinalis* durante el ayuno. *O. vulgaris* sería por lo tanto reacio a consumir las reservas de CH, las cuales serían economizadas para disponer de ellas en situaciones más explosivas, como podrían ser la captura de presas o la huida de depredadores, pero también en períodos de inanición de más de 3 días. Una alimentación regular también permite aumentar el contenido de CH en la glándula digestiva y mantener su concentración en el músculo. Por lo tanto, aunque se haya demostrado un papel secundario de los CH en *O. vulgaris*, éstos contribuirían al metabolismo energético en situaciones concretas y no deberían menospreciarse en el contexto de sus requerimientos nutritivos ni en la formulación futura de dietas para cefalópodos. Las pequeñas cantidades de CH acumuladas en el músculo puede ser una consecuencia de una capacidad limitada para la glucogénesis o como consecuencia de una dieta baja en CH. Estudios adicionales son necesarios para determinar el efecto de dietas formuladas con diferentes niveles de CH.

SECCIÓN ACEPTABILIDAD

5. CAPÍTULO III. Formato sencillo de pienso para comprobar la aceptabilidad de ingredientes en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris*).

5. CAPÍTULO III:

Formato sencillo de pienso para comprobar la aceptabilidad de ingredientes en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris*).

Enviado (18/01/2013):

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2013. A simple format feed to test the acceptability of ingredients for common octopus (*Octopus vulgaris*). Aquaculture Research.

Congreso:

Autores: Piedad S. Morillo-Velarde, Jesús Cerezo Valverde, María Dolores Hernández, Felipe Aguado-Giménez, Benjamín García García.

Título: Aceptabilidad de distintos ingredientes para la formulación de piensos para el pulpo común (*O. vulgaris*).

Tipo de participación: Póster

Congreso: XIII Congreso Nacional de Acuicultura

Publicación: Libro de Actas XIII Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 109-111.

Lugar celebración: Castelldefels (Barcelona) Fecha: Noviembre 2011

5. CAPÍTULO III: Formato sencillo de pienso para comprobar la aceptabilidad de ingredientes en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris*).

Resumen.

En este trabajo hemos estudiado la aceptabilidad y el crecimiento en subadultos de *Octopus vulgaris* alimentados con diecinueve dietas formuladas semihúmedas únicamente diferenciadas en el ingrediente a testar (30%), gelatina como aglomerante (20%) y agua destilada (50%). Entre los ingredientes a probar se incluyeron harinas vegetales y animales, liofilizados y productos en polvo. Las mayores tasas absolutas de alimentación (10,5-16,1 g/día), crecimiento (5,0-8,9 g/día; 0,5-0,7 %P/día) e índice de eficacia alimentaria (44,4-65,8%) fueron obtenidos con las dietas que contenían pescado liofilizado (*Boops boops* o *Sarinella aurita*) o yema de huevo en polvo, mientras que las harinas vegetales y animales ofrecieron los peores resultados. Todos los grupos de dietas fueron bien separados por el análisis de los componentes principales y, teniendo en cuenta las variables bioquímicas e índices calculados, los tres componentes principales seleccionados (CP) explicaron el 80,2% del total de la varianza. Algunos de estos ingredientes podrían servir de atrayentes o agente enmascarador para que los animales ingieran otros ingredientes que, aislados, presentan una mala aceptabilidad, pero que nutricionalmente pueden ser apropiados.

5.1. Introducción.

Una de las principales razones para el escaso desarrollo de los cefalópodos en la acuicultura es que no hay una dieta disponible que sea aceptada con una composición nutritiva equilibrada para todas las etapas de su vida (Vaz-Pires et al., 2004; Cerezo Valverde et al., 2008). En la actualidad, los trabajos van encaminados hacia la elaboración de piensos semihúmedos o extrusionados a partir de ingredientes secos (Morillo-Velarde et al., 2012a; Querol et al., 2012a, b) por su mejor conservación, estabilidad y menor impacto ambiental en las granjas marinas (Mazón et al., 2007) y, aunque los resultados han sido satisfactorios, todavía no se han alcanzado las elevadas tasas de ingesta y crecimiento que cuando se emplean dietas naturales a base de crustáceos. Tanto el contenido en humedad como los agentes químicos que se utilizan para hacer la dieta atractiva podrían realmente influir en el grado de aceptación e ingesta

(Lee et al., 1991; Domínguez et al., 2007). De hecho, la capacidad de los quimiorreceptores del pulpo están bien desarrollados, siendo sensibles a ácidos, azúcares, sales, extractos de cangrejo, aminoácidos y nucleótidos (Wells et al., 1983; Lee, 1992). Algunas de estas sustancias pueden ser las responsables de que el grado de aceptabilidad y crecimiento tanto con dietas formuladas como naturales, hayan sido tan dispares en cefalópodos (García García y Aguado-Giménez, 2002; Cerezo Valverde et al., 2008; Quintana et al., 2008; García-Garrido et al., 2010; Estefanell, 2011a, b).

Al respecto, hay que destacar que la composición nutritiva ideal de una dieta no implica necesariamente mejor aceptabilidad. Por ejemplo, experimentos de crecimiento con las dietas que contenían *Mytilus galloprovincialis* estuvieron asociados con índices de alimentación y crecimiento bajos (Petza et al., 2010; Prato et al., 2010), a pesar de su excelente composición nutritiva en clases lipídicas y aminoácidos para cefalópodos (Cerezo Valverde et al., 2012a, b). Por tanto, hay una necesidad clara de realizar experimentos preliminares con ingredientes que mejoren la aceptabilidad, antes de incorporar cualquier ingrediente nuevo en dietas formuladas. En este trabajo, se pretende conocer la aceptabilidad y crecimiento de *O. vulgaris* empleando dietas formuladas diferenciadas exclusivamente en un ingrediente prueba y utilizando gelatina como aglomerante debido a su elevada digestibilidad y aceptabilidad en ensayos previos (Rosas et al., 2008; García-Garrido et al., 2010, Morillo-Velarde et al., 2012a).

2. Material y métodos.

Los ejemplares de *O. vulgaris* se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) y trasladados individualmente a tanques circulares de 216 l en el laboratorio. Los animales se aclimataron durante dos semanas, alimentándose con boga (*Boops boops*) y cangrejo (*Carcinus mediterraneus*) en días alternativos (García García y Cerezo Valverde et al., 2006). Los tanques fueron equipados con un sistema de recirculación de agua y filtración mecánica y biológica; la temperatura se mantuvo constante ($18,2 \pm 1,1^\circ\text{C}$) y oxígeno superior al 80% de saturación (Cerezo Valverde y García García, 2005). Se probaron 19 dietas, únicamente diferenciadas en el ingrediente a probar (30%), gelatina como aglomerante (20%) y agua destilada (50%). Entre los ingredientes de prueba se incluyeron 8 harinas vegetales (arroz, avena, garbanzo, garrofín, gluten de trigo, maíz, soja, trigo), 2 harinas animales (cangrejo y pescado), 6

Capítulo III

liofilizados (alacha, boga de descarte, boga salvaje, guisante, mejillón y sangre de pollo) y tres ovoproductos en su forma atomizada (huevo entero, clara de huevo y yema de huevo) (Tabla 1).

Tabla 1. Ingredientes testados en la elaboración de dietas para *O. vulgaris*.

Ingredientes	Compañía
Harinas Vegetales	
<i>Arroz</i>	Arrocería Pons S.A., Massanassa, Valencia, España
<i>Avena</i>	Agricultura de Conreu Ecológic, Maresme, Barcelona, España
<i>Garbanzo</i>	Panadería Rincón del Segura S.L., Elche de la Sierra, Albacete, España
<i>Garrofín</i>	Piensos y Cereales Desco S.L., Valencia, España
<i>Gluten</i>	Piensos y Cereales Desco S.L., Valencia, España
<i>Maíz</i>	Harina de maíz blanco, Alimentos Polar Colombia S.A. Colombia.
<i>Soja</i>	COCERVA, Náquera, Valencia, España.
<i>Trigo</i>	Marinera del Mar S.L., Almenara, Castellón, España.
Harinas Animales	
<i>Cangrejo</i>	<i>Polybius henslowii</i> , procedente de pesquerías artesanales, Galicia, España
<i>Pescado</i>	Skretting S.A., Burgos, España
Liofilizados	
<i>Alacha</i>	<i>Sardinella aurita</i> , procedente de la pesca artesanal, Alicante, España
<i>Boga Salvaje</i>	<i>Boops boops</i> , procedente de la pesca artesanal, Alicante, España
<i>Boga Cultivo</i>	<i>Boops boops</i> , procedente del descarte de la acuicultura, Murcia, España
<i>Guisante</i>	Ultracongelados Virto S.A, Azagra, Navarra, España.
<i>Mejillón</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i> , procedente de la acuicultura, Galicia, España.
<i>Sangre</i>	Sangre de pollo congelada y liofilizada. Hijos de Pujante S.A., Beniel, Murcia. España
Atomizados	
<i>Clara de huevo</i>	Clara de huevo atomizada, Avícola San Isidro S.L. Los Belones, Cartagena, Murcia, España.
<i>Huevo Entero</i>	Huevo entero atomizada, Avícola San Isidro S.L. Los Belones, Cartagena, Murcia, España.
<i>Yema Huevo</i>	Yema de huevo atomizada, Avícola San Isidro S.L. Los Belones, Cartagena, Murcia, España.

Para preparar las dietas se disolvió la gelatina en agua y, posteriormente, se fueron añadiendo los ingredientes restantes hasta su completa homogenización a 45°C con un robot de cocina (Mycook® 1.8, Taurus, S.L. Lleida, España). La mezcla obtenida se dejó enfriar a 4°C en bandejas de aluminio durante 24 h y, posteriormente, se congeló a -4°C hasta su uso.

La estabilidad en agua se determinó a partir de la pérdida de la materia seca del pienso después de la inmersión en agua durante 4 y 24 horas. Cada dieta se probó en grupos experimentales de entre 6 y 14 individuos macho (501-1329 g) durante un período entre 3 - en caso de no ser aceptada desde el inicio en ningún ejemplar- y 15 días. Los pulpos fueron alimentados a las 09:00 h seis días a la semana. El alimento no ingerido se recogió 4 h más tarde, fue pesado diariamente y multiplicado por un factor de corrección para descontar el agua absorbida o la disgregación del pienso subsanando los cambios de peso. Se calcularon los siguientes índices:

- Tasa de Alimentación Absoluta en peso húmedo: **TAA** (g/día) = (Alimento consumido en peso húmedo/nº días)

-Tasa de Alimentación Relativa: **TAR** (%P/día) = (TAA/Peso medio)*100.

-Tasa de Crecimiento Absoluta: **TCA** (g/día) = Incremento Peso/nº días.

-Tasa Específica de Crecimiento: **TEC** (%P/día) = [(ln Peso final-Ln Peso inicial/nº días)]*100.

-Índice de Eficacia Alimentaria: **IEA** (%) = (Incremento Peso/Alimento consumido)*100.

Para poder seleccionar los ingredientes que mejores resultados ofrecieron, los valores de ingesta y crecimiento de las dietas formuladas se compararon con los obtenidos con dietas naturales a base de pescado (*B. boops*) o cangrejo (*C. mediterraneus*), estimados para las mismas condiciones de peso y temperatura según Aguado y García García (2002), obteniéndose los siguientes índices:

-Tasa de Alimentación Absoluta en peso seco con la dieta formulada: **TAAss** (g/día) = Alimento consumido en peso seco/nº días.

-Tasa de Alimentación Absoluta en peso seco cuando se suministra cangrejo o boga: **TAAssc** (g/día) y **TAAssb** (g/día), respectivamente.

-Tasa de Crecimiento Absoluta cuando se suministra cangrejo o boga: **TCAc** (g/día) y **TCAb** (g/día), respectivamente.

Las dietas formuladas fueron analizadas por triplicado. Se usó 1 g de muestra para obtener las cenizas, humedad y la proteína, y 2 g de muestra para el contenido de

lípidos. La humedad fue obtenida por desecación a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h hasta peso constante (AOAC 1997; Método n° 930.15) y las cenizas por incineración a $450 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h en un horno Mufla (HOBERSAL, HD-230). El contenido proteico fue determinado por el método Kjeldhal usando un factor de conversión de acuerdo con Mariotti et al. (2008), y el material extraíble libre de nitrógeno (MELN) por diferencia.

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm la desviación estándar (D.E.). El análisis de componentes principales (ACP) fue llevado a cabo para obtener una interpretación conjunta de todas las variables, incluyendo la composición bioquímica e índices obtenidos de las distintas dietas formuladas y grupos de ingredientes (harinas vegetales, harinas animales, ingredientes liofilizados y en polvo).

3. Resultados y Discusión.

Todas las dietas tuvieron una textura firme antes y después de sumergirlas en agua, sin evidencias de desintegración al ser manipuladas por los pulpos. Esto demuestra la estabilidad de las dietas que contienen gelatina como aglomerante haciéndolas más aceptables para los pulpos. La supervivencia fue del 100% en todos los experimentos.

La composición en macronutrientes de las dietas utilizadas en este estudio se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición en macronutrientes (% peso seco) de las dietas suministradas.

Dietas	Humedad	Cenizas	Proteínas	Lípidos	MELN
H. Arroz	51,32 ± 2,99	1,00 ± 0,03	43,42 ± 0,47	0,45 ± 0,11	55,13 ± 0,48
H. Avena	55,67 ± 0,65	1,30 ± 0,06	42,28 ± 2,57	2,26 ± 0,64	54,15 ± 2,79
H. Garbanzo	53,46 ± 0,05	2,57 ± 0,13	49,75 ± 0,92	1,52 ± 0,14	46,17 ± 1,11
H. Garrofín	51,30 ± 2,04	4,60 ± 0,17	62,03 ± 1,60	0,49 ± 0,08	32,89 ± 1,62
H. Gluten	52,22 ± 2,06	0,86 ± 0,04	79,70 ± 0,81	0,39 ± 0,06	19,05 ± 0,83
H. Maíz	51,28 ± 1,45	0,77 ± 0,06	42,28 ± 0,48	0,40 ± 0,11	56,56 ± 0,54
H. Soja	53,58 ± 1,28	4,01 ± 0,14	61,12 ± 2,38	2,76 ± 0,43	32,07 ± 2,13
H. Trigo	51,81 ± 1,62	0,89 ± 0,06	40,20 ± 0,63	0,25 ± 0,16	57,18 ± 2,74
H. Cangrejo	51,73 ± 0,85	12,61 ± 0,40	54,91 ± 0,08	4,20 ± 0,52	28,24 ± 0,45
H. Pescado	56,40 ± 2,70	12,11 ± 1,52	84,02 ± 1,30	4,20 ± 0,37	0,00 ± 0,00
L. Alacha	48,93 ± 1,76	5,61 ± 0,61	73,32 ± 2,06	8,82 ± 0,24	14,96 ± 2,35
L. Boga Salvaje	49,93 ± 0,78	4,54 ± 0,62	79,12 ± 1,11	4,22 ± 0,32	12,13 ± 0,90
L. Boga Cultivada	51,37 ± 0,88	2,40 ± 0,20	59,80 ± 2,24	27,33 ± 1,09	10,48 ± 2,04
L. Guisante	53,94 ± 1,98	2,44 ± 0,02	51,57 ± 0,40	0,86 ± 0,09	46,97 ± 3,21
L. Mejillón	51,47 ± 1,75	6,93 ± 0,26	70,08 ± 3,26	1,15 ± 0,18	21,84 ± 2,84
L. Sangre	49,35 ± 1,06	4,09 ± 0,07	94,47 ± 0,46	0,38 ± 0,12	1,06 ± 0,61
P. Clara Huevo	50,20 ± 1,47	2,74 ± 0,08	83,60 ± 1,09	0,63 ± 0,08	13,03 ± 1,14
P. Huevo Entero	51,82 ± 0,93	2,91 ± 0,07	64,49 ± 0,71	21,48 ± 0,71	11,12 ± 0,96
P. Yema Huevo	51,79 ± 1,47	2,93 ± 0,06	63,14 ± 1,73	26,81 ± 1,04	7,32 ± 1,27

En la Figura 1A se observa como el grado de aceptación de las dietas con ingredientes liofilizados (LA, LBC, LBS y LS) y yema de huevo en polvo (PYH) fueron similares a las estimadas al utilizar *B. boops* (5,4–7,2 gSS/día), aunque las dietas a base de *C. mediterranus* duplicaron los valores de dichas dietas (10,6-14,1 gSS/día; Aguado-Giménez y García García, 2002). En general, los índices de crecimiento (TCA y TEC) de las dietas probadas fueron bajas (Tabla 3) comparadas con las estimadas para dietas naturales, a excepción de LBC ($5,1 \pm 2,6$ g/día), LBS ($5,0 \pm 3,9$ g/día) y PYH ($8,9 \pm 4,7$ g/día; Fig. 1B). Igualmente, los índices de aprovechamiento nutritivo (IEA) fueron mejores en las dietas PYH, HGL, LBC y LBS respecto de las otras dietas probadas, destacando el IEA de 65,8 % en la dieta PYH (Tabla 3). Recientemente, algunos autores han elaborado dietas artificiales semihúmedas (Morillo-Velarde et al., 2012a) y extrusionadas (Querol et al., 2012a, b) basadas exclusivamente en uno o varios de estos ingredientes, secos o liofilizados, obteniendo buenas tasas de alimentación y crecimiento en *O. vulgaris*.

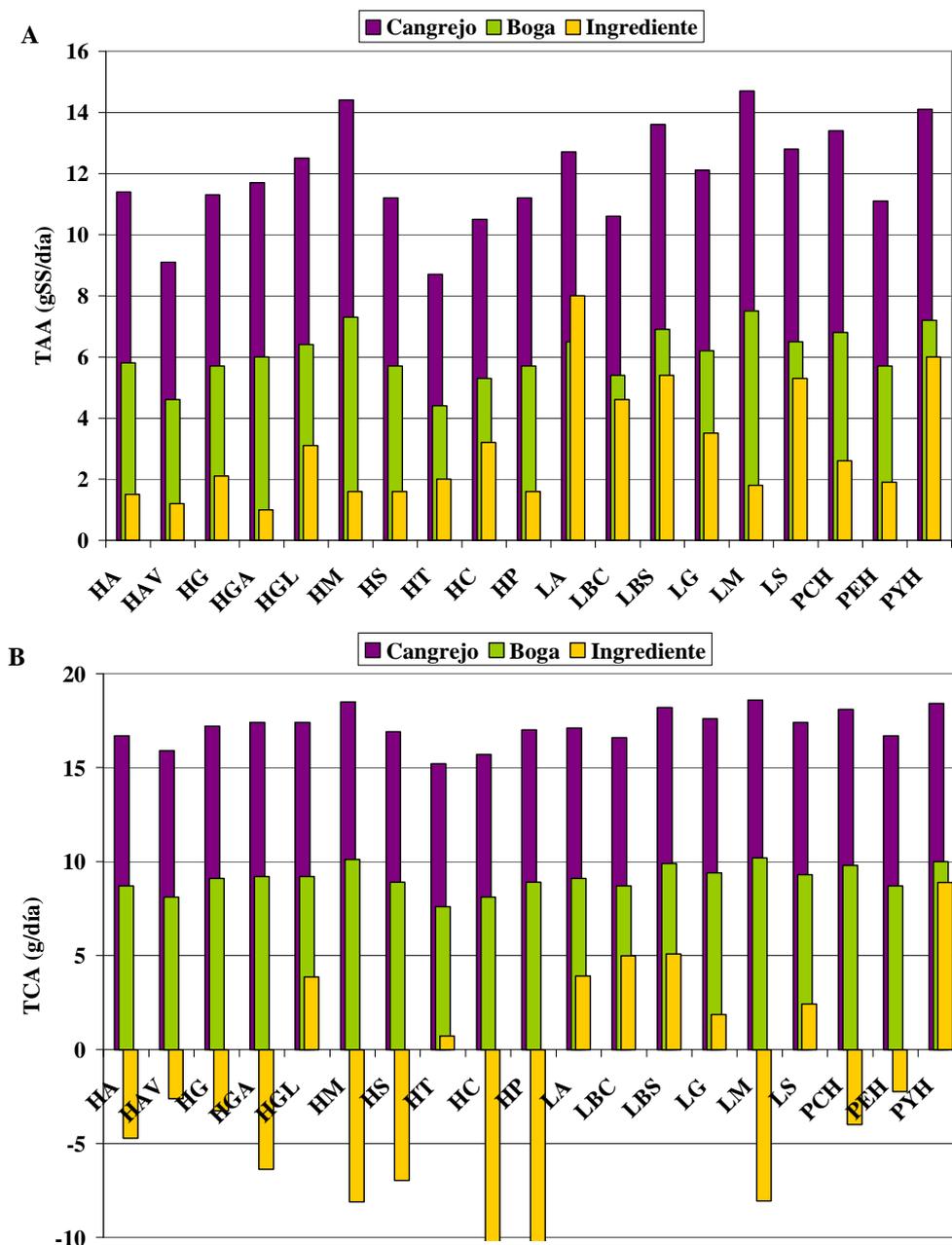


Figura. 1 (A-B). Valor medio de las dietas probadas y estimación de las dietas naturales de *B. boops* y *C. mediterranus* en condiciones experimentales similares. **(A)** Tasa de Alimentación Absoluta en sustancia seca (gSS/día); **(B)** Tasa de Crecimiento Absoluta (g/día). HA: Harina de arroz; HAV: Harina de avena; HG: Harina de garbanzo; HGA: Harina de garrofín; HGL: Harina de Gluten; HM: Harina de maíz; HS: Harina de soja; HT: Harina de trigo; HC: Harina de *C. mediterranus*; HP: Harina de pescado; LA: Liofilizado de *S. aurita*; LBC: Liofilizado de *B. boops* descarte; LBS: Liofilizado de *B. boops* salvaje; LG: Liofilizado de guisante; LM: Liofilizado de *Mytilus galloprovincialis*; LS: Liofilizado de sangre de pollo; PCH: Clara de huevo en polvo; PEH: Huevo entero en polvo; PYH: Yema de huevo en polvo.

Tabla 3. Tasas de alimentación, crecimiento y aprovechamiento nutritivo de los pulpos alimentados con las dietas suministradas.

Dietas	N	Peso inicial	TAA (g/día)	TAR (%P/día)	TCA (g/día)	TEC (%P/día)	IEA %
HA	7	755 ± 178	3,41 ± 3,20	0,50 ± 0,49	-4,73 ± 4,09	-0,64 ± 0,57	<0
HAV	14	501 ± 73	2,43 ± 1,19	0,49 ± 0,22	-2,63 ± 4,37	-0,52 ± 0,92	<0
HG	8	841 ± 142	2,10 ± 0,55	0,26 ± 0,07	-6,37 ± 2,90	-0,77 ± 0,26	<0
HGA	8	849 ± 146	4,49 ± 1,59	0,55 ± 0,17	-3,27 ± 2,66	-0,41 ± 0,34	<0
HGL	7	911 ± 142	6,89 ± 1,16	0,73 ± 0,11	3,87 ± 1,47	0,41 ± 0,13	56,85 ± 20,75
HM	8	1261 ± 320	3,23 ± 2,95	0,24 ± 0,16	-8,10 ± 3,70	-0,71 ± 0,32	<0
HS	7	742 ± 192	3,35 ± 0,29	0,49 ± 0,14	-6,96 ± 3,81	-0,96 ± 0,41	<0
HT	8	623 ± 146	4,37 ± 1,62	0,70 ± 0,21	0,71 ± 3,17	0,06 ± 0,65	3,02 ± 110,60
HC	6	976 ± 99	7,05 ± 2,13	0,74 ± 0,17	-12,67 ± 9,71	-1,33 ± 0,97	<0
HP	6	935 ± 107	3,43 ± 3,10	0,38 ± 0,32	-21,44 ± 6,73	-2,39 ± 0,70	<0
LA	6	833 ± 134	16,55 ± 1,87	1,99 ± 0,37	3,89 ± 2,49	0,44 ± 0,27	23,30 ± 15,16
LBC	5	839 ± 92	9,92 ± 2,63	1,12 ± 0,20	4,99 ± 3,88	0,54 ± 0,41	44,44 ± 30,92
LBS	6	1141 ± 142	10,52 ± 1,96	0,90 ± 0,17	5,09 ± 2,56	0,43 ± 0,21	47,38 ± 16,62
LG	7	792 ± 133	7,30 ± 1,53	0,91 ± 0,12	1,86 ± 1,55	0,22 ± 0,18	24,22 ± 19,00
LM	8	1329 ± 186	3,77 ± 1,27	0,29 ± 0,11	-8,06 ± 6,89	-0,66 ± 0,58	<0
LS	7	950 ± 164	10,49 ± 2,24	1,11 ± 0,26	2,42 ± 2,60	0,26 ± 0,29	24,55 ± 27,97
PCH	6	1102 ± 84	6,13 ± 3,77	0,54 ± 0,27	-3,98 ± 7,71	-0,43 ± 0,67	<0
PEH	8	728 ± 177	3,88 ± 2,62	0,56 ± 0,33	-2,23 ± 5,93	-0,29 ± 0,82	<0
PYH	6	1211 ± 161	12,62 ± 3,54	0,98 ± 0,22	8,89 ± 4,73	0,67 ± 0,30	65,77 ± 20,48

HA: Harina de arroz; HAV: Harina de avena; HG: Harina de garbanzo; HGA: Harina de garrofín; HGL: Harina de Gluten; HM: Harina de maíz; HS: Harina de soja; HT: Harina de trigo; HC: Harina de *C. mediterranus*; HP: Harina de pescado; LA: Liofilizado de *S. aurita*; LBC: Liofilizado de *B. boops* descarte; LBS: Liofilizado de *B. boops* salvaje; LG: Liofilizado de guisante; LM: Liofilizado de *Mytilus galloprovincialis*; LS: Liofilizado de sangre de pollo; PCH: Clara de huevo en polvo; PEH: Huevo entero en polvo; PYH: Yema de huevo en polvo.

En referencia al análisis de los componentes principales, los tres componentes principales seleccionados (CP) explicaron el 80,2% del total de la varianza. El primer CP explicó el 49,5% de la varianza y estuvo relacionado principalmente con las tasas de alimentación, crecimiento e índice de eficacia alimentaria, con factores de carga positivos altos (Tabla 4). El segundo CP explicó el 21,6% de la varianza y estuvo relacionado positivamente con el porcentaje de cenizas y proteínas, y negativamente con el porcentaje de MELN. El tercer componente principal explicó el 9,1% de la varianza y estuvo relacionado negativamente con el porcentaje de lípidos.

Tabla 4. Resultados obtenidos en el análisis de los componentes principales (ACP) teniendo en cuenta las variables bioquímicas e índices calculados.

	PC1	PC2	PC3
Autovalores	5,94	2,59	1,09
Porcentaje total de la varianza	49,48	21,62	9,12
TAA (g/día)	0,87	0,34	0,04
TAR (%P/día)	0,82	0,22	0,04
TCA (g/día)	0,92	-0,34	0,01
TEC (%P/día)	0,92	-0,33	0,08
IEA (%)	0,81	-0,37	0,16
Humedad	-0,60	-0,10	-0,58
Cenizas	-0,35	0,80	-0,04
Proteínas	0,28	0,79	0,31
Lípidos	0,51	0,19	-0,72
MELN	-0,39	-0,86	0,08

La Figura 2 muestra una separación clara entre los diferentes grupos de ingredientes según los dos primeros CP. Todas las harinas, tanto vegetales como animales, con excepción del gluten de trigo, se separan de los liofilizados y la yema de huevo en polvo principalmente en el primer CP, con puntuaciones factoriales relacionadas negativamente en harinas y positivamente en ingredientes liofilizados. En este sentido, las harinas vegetales se caracterizaron por una baja aceptabilidad y tasas de crecimiento según el primer CP (Fig. 2, Tabla 3) y bajos porcentajes de proteína y cenizas, y altos de MELN según el segundo CP (Fig. 2, Tabla 2). De igual forma sucedió con las harinas animales, a pesar de diferenciarse por sus mayores contenidos en proteína y cenizas. Los liofilizados de alacha y boga (salvaje y de descarte) y la yema de huevo en polvo están separados del resto de los ingredientes por altas tasas de

crecimiento y alimentación según el primer CP (Fig. 2, Tabla 3), y por contener mayor porcentaje de proteína y cenizas y menor MELN según el segundo PC(Fig. 2, Tabla 2).

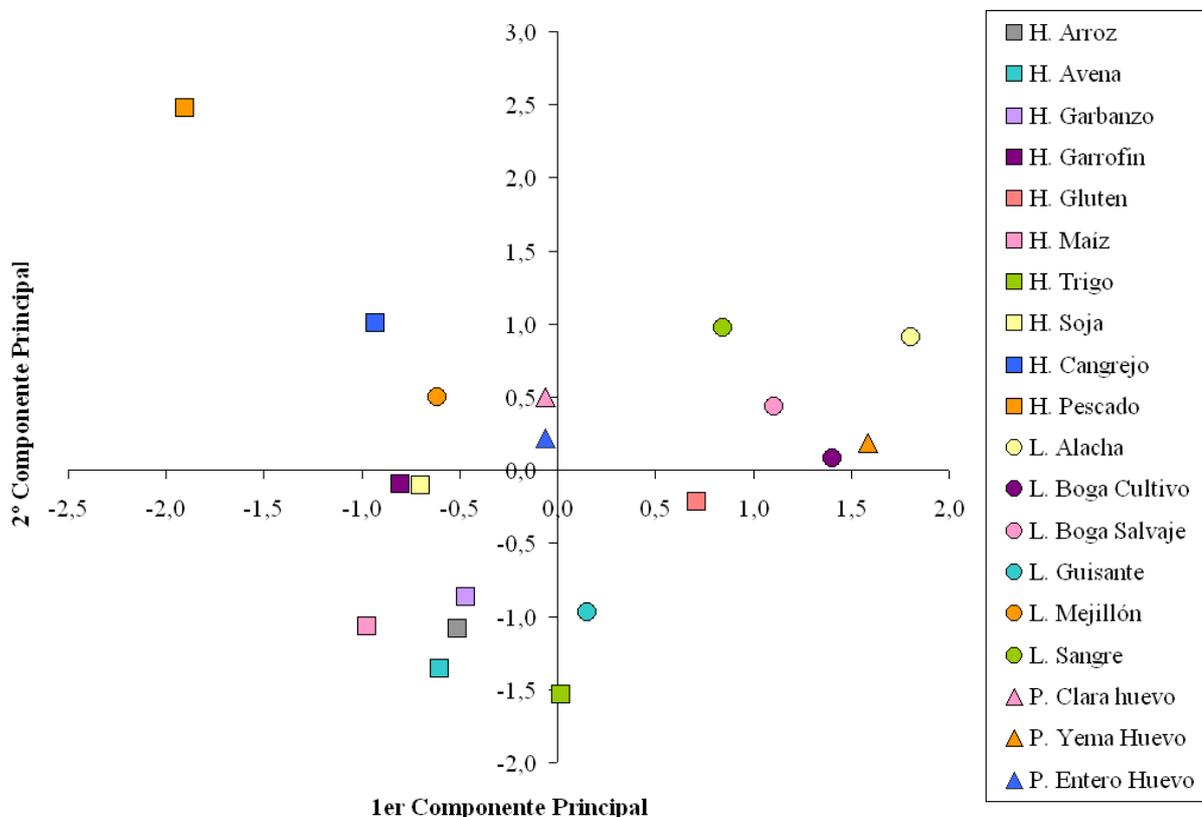


Figura 2. Separación de los diferentes grupos de ingredientes en base a los dos principales componentes de acuerdo con su composición bioquímica y sus índices analizados.

Estos resultados sugieren que futuros estudios con dietas artificiales podrían contener una base de yema de huevo y productos liofilizados, ya que podrían ayudar a incrementar la aceptabilidad de las dietas y el crecimiento de *O. vulgaris*. Además, tal y como demuestran los trabajos de Querol et al. (2012a, b), podrían servir de atrayentes o agentes enmascaradores para que los animales ingieran otros ingredientes que aislados presentan una mala aceptabilidad, como son las harinas de pescado (García et al., 2010) o de krill (López et al., 2009), y que nutricionalmente pueden ser apropiadas.

SECCIÓN ENGORDE

6. **CAPÍTULO IV:** Crecimiento y digestibilidad de dietas formuladas a base de ingredientes secos y liofilizados en el pulpo común (*Octopus vulgaris*).

7. **CAPÍTULO V:** Requerimientos lipídicos de pulpo común (*Octopus vulgaris*) obtenidos a partir de dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado.

8. **CAPÍTULO VI:** Eficaz utilización de la glucosa frente al almidón en dietas formuladas semihúmedas para el pulpo común (*Octopus vulgaris*).

6. CAPÍTULO IV

Crecimiento y digestibilidad de dietas formuladas a base de ingredientes secos y liofilizados en el pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Publicado:

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Hernández M.D., Aguado-Giménez, F., García García B., 2012. Growth and digestibility of formulated diets based on dry and freeze-dried ingredients in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*. 368-369, 139–144.

6. CAPÍTULO IV: Crecimiento y digestibilidad de dietas formuladas a base de ingredientes secos y liofilizados en el pulpo común (*Octopus vulgaris*)

Resumen.

En este trabajo se muestra el crecimiento y la digestibilidad de dos dietas semihúmedas (50% de agua) formuladas exclusivamente a base de ingredientes secos o liofilizados en *O. vulgaris* (Dieta P: 20% gelatina, 10% yema de huevo, 5% *Sardinella aurita* y 15% *Todarodes sagittatus*; Dieta G: Igual que la anterior pero sustituyendo *T. sagittatus* por guisante). Ambas dietas presentaron una textura firme al introducirlas en agua, una composición similar en macronutrientes (70-73% proteínas peso seco, 12-13% lípidos peso seco) y una buena aceptabilidad, con una supervivencia del 100%. Las tasas de alimentación relativas fueron similares para las dos dietas (0,96-1,04 %P/día; $P > 0,05$), sin embargo, los mejores resultados fueron obtenidos con la dieta P, mostrando una tasa absoluta de crecimiento e índice de conversión de 9,56 g/día y 1,04, respectivamente (2,16 g/día y 3,88 para la dieta G; $p < 0,05$). Los valores productivos de proteína y lípidos fueron significativamente superiores para la dieta P (43,58 y 13,28% vs. 20,16 y -0,49% para la dieta G, respectivamente). Los buenos resultados obtenidos para la dieta P pueden justificarse por la elevada digestibilidad de ésta (93,25% para la materia seca, 97,03% para proteínas y 87,89% para lípidos) en comparación con la dieta G (73,83%, 92,05% y 85,00%, respectivamente). Estos resultados demostraron que *O. vulgaris* puede alimentarse con ingredientes secos y liofilizados que han sufrido un tratamiento térmico suave con buenas tasas de crecimiento, aprovechamiento nutritivo y digestibilidad. Estudios futuros de engorde para pulpos podrían usar una base similar al formato propuesto en este trabajo para obtener dietas destinadas a fines comerciales.

6.1. Introducción.

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) es un excelente candidato para el desarrollo de su producción a escala comercial (Vaz-Pires et al., 2004; García García y García García, 2011). Sin embargo, hoy en día, el desarrollo industrial de cefalópodos está limitado al engorde de subadultos capturados de su medio natural (Chapela et al., 2006; Rodríguez et al., 2006; García García et al., 2009), debido a la elevada mortalidad durante la cría larvaria (Navarro y Villanueva, 2003; Iglesias et al., 2007) y al escaso

desarrollo de los piensos formulados (Lee et al., 1991; Cerezo Valverde et al., 2008). Las dietas basadas exclusivamente en peces y crustáceos no son una propuesta comercialmente viable debido al precio de éstos en el mercado y a su variable disponibilidad (García García et al., 2004), de ahí la necesidad de buscar una alimentación alternativa. En todo caso, el desarrollo industrial de una especie necesita de una dieta formulada, tal y como ocurre con dorada y lubina (Cho y Bureau, 2001; Davies et al., 2009). Los piensos secos que se utilizan para estas especies se conservan y almacenan mejor que los semihúmedos o húmedos al tener un porcentaje menor de agua, normalmente poseen un menor coste por kg de animal producido, presentan mayor regularidad en el suministro y composición, son más fáciles de almacenar y distribuir, su manipulación es mínima en las instalaciones de acuicultura, reducen el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, y poseen una mejor estabilidad en agua y mejor digestibilidad.

Hasta la fecha, los mejores resultados en cefalópodos se han obtenido con mezclas de pasta de pescado, crustáceos o moluscos, que suelen formar parte de las dietas naturales que los pulpos consumen habitualmente, aglomerados con gelatina o alginatos para evitar su disgregación (Quintana et al., 2008; Rosas et al., 2008). Sin embargo, peores resultados se han obtenido con piensos secos o formulados con ingredientes puros (Castro y Lee, 1994; Domingues et al., 2005, 2007). La gelatina en la elaboración de dietas artificiales ha proporcionado una adecuada palatabilidad en pulpos subadultos, generando además un crecimiento significativo y elevada digestibilidad (Rosas et al., 2008). No obstante, las tasas de disgregación de estos piensos son elevadas sobre todo cuando no se aplica calor a la mezcla. La elaboración de piensos con alginatos origina mayor estabilidad en el agua y puede ser preparado en frío, aunque este tipo de piensos presenta peor aceptabilidad y digestibilidad (Rosas et al., 2008). Al respecto, Cerezo Valverde et al. (2008) y Domingues et al. (2009) comprobaron una influencia negativa del tratamiento térmico sobre el crecimiento en *O. vulgaris* y *Sepia officinalis*. Estos resultados se atribuyeron a la posible desnaturalización de proteínas y pérdida de aminoácidos y vitaminas, mostrando mejores resultados con los alimentos frescos, descongelados o liofilizados.

Morillo-Velarde et al. (2011b) llevó a cabo estudios preliminares en *O. vulgaris* para comprobar la aceptabilidad correspondiente de ingredientes aislados, incluyendo harinas, liofilizados y atomizado en polvo. Los peores resultados fueron obtenidos con la incorporación de harinas, coincidiendo con los resultados previos obtenidos por

Estefanell et al. (2009). No obstante, obtuvimos muy buenos resultados al incluir en las dietas productos liofilizados y yema de huevo, sugiriendo que estos ingredientes podrían usarse para mejorar la textura y palatabilidad de las dietas para cefalópodos. La principal ventaja de los alimentos liofilizados radica en que el agua se les ha extraído sin tratamiento térmico, pasando directamente de la fase congelada o sólida al estado gaseoso, ayudando a conservar intactas sus propiedades nutritivas y estructura molecular. El uso de estos ingredientes podría presentar un paso previo a la elaboración de piensos con fines comerciales con menor humedad y mejor conservación.

En este trabajo se han utilizado dos dietas artificiales semihúmedas basadas exclusivamente en una mezcla de ingredientes secos o liofilizados, sin usar productos frescos y aplicándoles un tratamiento térmico suave para mejorar su estabilidad en agua. El objetivo de este estudio es comparar las tasas de alimentación y crecimiento del pulpo común alimentado con estas dietas, comprobando la digestibilidad de la dieta y los cambios que se producen en la composición nutricional de los animales.

6.2. Material y métodos.

6.2.1. Captura y aclimatación de los animales.

Los ejemplares de *O. vulgaris* se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) mediante arte de arrastre y se mantuvieron en tanques de 2000 l en el laboratorio. Los animales se aclimataron durante 2 semanas y se alimentaron con alacha (*Sardinella aurita*) y cangrejo (*Carcinus mediterraneus*) en días alternativos.

Posteriormente los animales se trasladaron y mantuvieron individualmente en tanques circulares de 262 l en un sistema de recirculación de agua con control de la temperatura (Air Energy, Heat Pump Inc., Model 400 Ti) y filtración mecánica y biológica. Éstos contenían tubos de PVC como refugio y una red externa para evitar que se escaparan. La temperatura se mantuvo constante ($18,75 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$) dentro del rango óptimo para esta especie (Aguado-Giménez y García García, 2002), oxígeno superior al 80% de saturación para que este factor no fuera limitante (Cerezo Valverde y García García, 2005), lámpara UV, fotoperiodo 12L: 12D, salinidad 37‰, pH entre 7 y 8 y nitrógeno amoniacal total (TAN) inferior a 0,2 mg/l.

6.2.2 Elaboración y estabilidad de las dietas formuladas.

Se prepararon dos dietas diferentes usando el liofilizado de guisante (dieta G) o de pota (*Todarodes sagittatus*; dieta P) como ingredientes a testar, representando cada uno de ellos el 15% en peso de la dieta (ver Tabla 1). El resto de ingredientes se mantuvo constante en ambas dietas y estuvo constituido por 50% de agua, un 20% de gelatina como aglomerante, 10% de yema de huevo en polvo y 5% de liofilizado de alacha (*S. aurita*). La pota y la alacha procedían de pesquerías artesanales de la misma zona que los pulpos y el guisante se compró congelado. La pota y la alacha fueron limpiados de espinas y vísceras, y posteriormente triturados. Todos estos ingredientes se liofilizaron y se trituraron en un molinillo hasta obtener una textura de polvo fino (<200µm), se envasaron al vacío y se conservaron en cámara frigorífica hasta su utilización. La yema de huevo y la gelatina se adquirieron en su forma comercial (Tabla 1).

Tabla 1. Composición en peso (%) de las dietas experimentales formuladas con guisante (G) o pota (P) como ingredientes a testar.

Dietas	Agua	Gelatina ^a	Yema de huevo ^b	Alacha ^c (<i>S. aurita</i>)	Pota ^c (<i>T. sagittatus</i>)	Guisante ^c	Total (%)
G	50	20	10	5	-	15	100
P	50	20	10	5	15	-	100

^a Gelatina granulada Bloom 220. Proporcionada por Productos Sur, S. A. (Polígono Industrial Oeste, San Ginés, Murcia, España).

^b Yema de huevo atomizada, proporcionada por Avícola San Isidro S.L. (Los Belones, Cartagena, Murcia, España).

^c Ingredientes liofilizados.

Para la elaboración de los piensos todos los ingredientes se mezclaron a 45°C. Primero se disolvió la gelatina en agua y posteriormente se fueron añadiendo los ingredientes restantes hasta su completa homogenización. La mezcla obtenida se dejó enfriar a 4°C en bandejas de aluminio durante 24 h, congelándose posteriormente hasta su uso.

La estabilidad en agua se determinó a partir de la pérdida de la materia seca del pienso después de la inmersión en agua durante 4 y 24 h. Para ello, se pesaron 3 replicas de cada dieta antes y después de introducirlas en agua. Con estos datos se obtuvo la media de los valores de los siguientes índices calculados:

$VP (\%) = (Pf - Pi)/Pi*100$, expresa la variación del peso seco de las dietas después de ser sumergidas en agua, donde Pi y Pf son el peso seco inicial y final, respectivamente.

$F = Pi/Pf$, representa un factor de corrección. El peso seco del alimento no ingerido de las dietas fue multiplicado por este valor de corrección para tener en cuenta la disgregación del pienso.

6.2.3. *Diseño experimental.*

Finalizado el periodo de aclimatación, los animales se pesaron y sexaron formando 2 grupos experimentales de 8 individuos macho cada uno, con el fin de evitar la influencia de los procesos reproductivos. A un grupo se le suministró la dieta G (guisante, n=8) y a otro la dieta P (pota, n=8) durante 42 días (abril – mayo, 2011). Los pesos medios iniciales fueron de 770 ± 101 g (634-902 g) para la dieta G y 742 ± 103 g (637-891 g) para la dieta P. La temperatura del agua osciló entre 18,2 y 19,8°C ($18,75 \pm 0,37^\circ\text{C}$). Los piensos se pesaron y administraron a saciedad, en un único trozo de forma cúbica, correspondiendo la primera toma al 5% del peso corporal de cada individuo, y posteriormente, reajustándose para que sobrepasase las demandas de cada ejemplar. Los pulpos eran alimentados a las 09:00 h, 6 días a la semana (García García y Cerezo Valverde, 2004, 2006), y el alimento sobrante se recogía a la 13:00 h con la ayuda de un pequeño salabre. El alimento sobrante fue secado con papel absorbente y pesado para calcular la ingesta diaria de cada individuo. El último día de experimentación todos los animales fueron pesados y anestesiados por inmersión en agua de mar helada antes del sacrificio conforme con los principios éticos de reducción, reemplazamiento y refinamiento, y evitando y minimizando cualquier sufrimiento, dolor y ansiedad de acuerdo con la Directiva 2010/63/EU.

6.2.4. *Recogida y conservación de las muestras.*

Una vez finalizado el experimento, se procedió a la disección de los 8 ejemplares de cada grupo. En 4 de ellos se obtuvo la glándula digestiva y la carcasa (resto del individuo menos la glándula digestiva), y de los 4 restantes la glándula digestiva y el tejido muscular (tres patas y parte del manto) con sus correspondientes pesos. Este procedimiento fue necesario para obtener las analíticas de la composición de

los animales completos, a partir de los resultados de la glándula digestiva y la carcasa. Cada una de estas partes se trituró y mezcló hasta obtener una mezcla homogénea, se envasó al vacío y se congeló a -20°C antes de proceder a los análisis bioquímicos.

Las heces de cada grupo experimental fueron recogidas diariamente con la ayuda de un pequeño salabre y se conservaron en el ultracongelador a -80°C. Posteriormente se liofilizaron, obteniendo un total de 11,8 g y 5,4 g de heces de los animales alimentados con las dietas G y P, respectivamente. Todas las heces de cada grupo fueron recogidas conjuntamente para conseguir la cantidad necesaria para su análisis.

6.2.5. Método analítico.

Se analizaron por triplicado tanto las dietas formuladas como las muestras de pulpo. Se utilizó 1 g de muestra para la ceniza, humedad y proteína, y 2 g de muestra para los lípidos. La humedad fue obtenida por desecación a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h hasta peso constante (AOAC 1997; Método n°. 930.15) y las cenizas por incineración a $450 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h en un horno Mufla (HOBERSAL, HD-230). El contenido de lípidos fue obtenido mediante éter etílico en un extractor SOXTEC AVANTI 2058 (AOAC, 1997; Método n° 920.39). El contenido proteico fue determinado por el método Kjeldhal usando un factor de conversión de 6,25 y el material extraíble libre de nitrógeno (MELN) por diferencia. La energía y la relación proteína energía (P/E en MJ) fueron estimados usando los coeficientes de energía de Miglavs y Jobling (1989): proteína 23,6 kJ/g, lípidos 38,9 kJ/g y carbohidratos 16,7 kJ/g.

Los macronutrientes en el animal completo se calcularon sumando el contenido del nutriente (N) en la glándula digestiva con el contenido en la carcasa:

$$N \text{ total (\%)} = [((\text{PGD} \times \% \text{NGD}) + (\text{PCA} \times \% \text{NCA})) \times 100] / \text{PT}$$
, donde N es el % de nutriente considerando el animal completo, PGD el peso de la glándula digestiva, PCA el peso de la carcasa, NGD el porcentaje del nutriente en la glándula digestiva, NCA el porcentaje del nutriente en la carcasa y PT el peso total del individuo.

6.2.6. Determinación de la digestibilidad.

El coeficiente de digestibilidad aparente fue calculado para la materia seca (CDAMS), la proteína (CDAPROT) y los lípidos (CDALIP) usando la ecuación estándar de Maynard y Loosli (1969):

$CDA = 100 - (100 * \%M_{dieta} / \%M_{heces}) \times (\%N_{heces} / \%N_{dieta})$, donde M es el marcador inerte y N los nutrientes. Como marcador inerte se emplearon las cenizas insolubles en ácido (CIA), según el método descrito por Atkinson et al. (1984). En el caso de las heces liofilizadas se utilizaron entre 2 y 3 g para obtener la humedad, cenizas y cenizas insolubles en ácido (CIA), 0,1 g para proteínas y 0,2 g para lípidos, realizando los análisis por duplicado. Las dietas liofilizadas se analizaron por triplicado, utilizando 5 g para la obtención de las CIA.

6.2.7. Parámetros calculados y análisis de los datos.

Todos los ejemplares fueron pesados al inicio (P_i es el peso inicial en g) y al final del experimento (P_f es el peso final en g). Los parámetros calculados fueron los siguientes: Peso medio: P_m (g) = $(P_i + P_f / 2)$; Incremento de peso: IP (g) = $P_f - P_i$; Tasa de alimentación absoluta: TAA (g/día) = $(AC / \text{días})$; Tasa de alimentación relativa: TAR (%P/día) = $(TAA / P_m) * 100$; Tasa de crecimiento diario: TCA (g/día) = $(IP / \text{días})$; Tasa específica de crecimiento: TEC (%P/día) = $[(\ln P_f - \ln P_i) / \text{días}] * 100$; Índice de eficacia alimentaria: IEA (%) = $(IP / AC) * 100$; Índice de conversión: $IC = AC / IP$; Tasa de alimentación absoluta de proteína: $TAAP$ (g/día) = $(TAA * \%Proteína\ dieta) / 100$; Tasa de alimentación absoluta de lípidos: $TAAL$ (g/día) = $(TAA * \%Lípidos\ dieta) / 100$; Valor productivo de la proteína: PPV (%) = $(Proteína\ retenida / Proteína\ ingerida) * 100$; Valor productivo de los lípidos: LPV (%) = $(Lípidos\ retenidos / Lípidos\ ingeridos) * 100$; Índice de la glándula digestiva: $IGD(\%) = PGD / P_f * 100$, donde PGD es el peso de la glándula digestiva en g y AC es el alimento consumido en g corregido teniendo en cuenta la tasa de disgregación en el agua y calculado según la fórmula:

$AC = (\text{Alimento suministrado ss} - \text{Alimento sobrante ss} * F) + (\text{Alimento ingerido ss} * (\%Humedad\ dieta / \%ss\ dieta))$, con valores de F de 1,02 y 1,22 para las dietas G y P, respectivamente.

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm la desviación estándar (D.E.). Para analizar las diferencias se llevó a cabo un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), estableciendo un nivel de significación $p < 0,05$. Los porcentajes y los índices fueron transformados aplicando el logaritmo neperiano antes de hacer el ANOVA.

6.3. Resultados.

Ambas dietas presentaron una textura firme antes de sumergirlas en agua. La dieta G perdió un 11,4% de su peso seco y la dieta P un 18,1% después de permanecer 4 h en agua. La dieta G presento una humedad del 52,77% y la dieta P del 48,63%, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$). No existieron diferencias significativas en los porcentajes de proteínas, lípidos, minerales o MELN de las dos dietas experimentales ($p > 0,05$). El contenido energético (2375-2396 kJ/100g) y la relación P/E (29,11-30,91 g/MJ) fueron similares en ambas dietas (Tabla 2).

Tabla 2. Composición en macronutrientes (% peso seco) de las dietas formuladas con guisante (G) o pota (P).

	G	P	p
Humedad	52,77 ± 0,43	48,63 ± 1,12	*
Proteínas	69,76 ± 2,58	73,39 ± 1,12	n.d.
Lípidos	13,02 ± 0,69	11,79 ± 0,75	n.d.
Cenizas	2,66 ± 0,06	3,80 ± 1,31	n.d.
MELN ^a	14,57 ± 2,57	11,02 ± 2,34	n.d.
CIA ^b	0,038 ± 0,009	0,078 ± 0,008	*
Energía (kJ/100g)	2.396	2.375	-
P/E (g/MJ) ^c	29,11	30,91	-

^aMELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculado por diferencia.

^bCIA = Cenizas insolubles en ácido.

^cP/E = Relación proteína/energía.

Datos expresados como la Media ± D. E.; n.s.= no significativo ($p > 0,05$); * $p < 0,05$

Al comienzo del experimento, no hubo diferencias significativas entre los pesos medios iniciales de los dos grupos. Ambos grupos aceptaron las dietas, con TAR similares ($p > 0,05$) y una supervivencia del 100%. No obstante, el grupo alimentado con dieta P mostró tasas absolutas de ingesta (TAA, TAAP, TAAL) significativamente mejores respecto del grupo alimentado con la dieta G ($p < 0,05$; Tabla 3). Los animales alimentados con la dieta P mostraron índices significativamente mejores de crecimiento (IP, TCA, TEC), siendo el IP cuatro veces mayor en éstos (401 ± 78 g) respecto de los alimentados con la dieta G (91 ± 27 g; Tabla 3). Igualmente, los índices de aprovechamiento nutritivo (IEA, IC, PPV y LPV) fueron significativamente mejores en la dieta P, destacando un IC próximo a 1 en esta dieta. Ambas dietas mostraron valores positivos en el PPV (20,16% dieta G y 43,58% dieta P), mientras que el LPV fue

negativo en animales alimentados con la dieta G (-0,49%) y positivo en los alimentados con la dieta P (13,28%; $p < 0,05$). El IGD fue significativamente superior para la dieta P (5,60%) respecto de la dieta G (4,16%; $p < 0,05$).

Tabla 3. Medias \pm D.E. de los parámetros medidos en cada grupo experimental para las dietas formuladas con guisante (G) o pota (P).

	G	P	p
n	8	8	
Pi (g)	770 \pm 110	742 \pm 103	n.s.
Pf (g)	861 \pm 102	1143 \pm 167	*
IP (g)	91 \pm 27	401 \pm 78	*
TAA (g/día)	7,70 \pm 0,54	9,72 \pm 0,93	*
TAAP (g/día)	2,55 \pm 0,18	3,71 \pm 0,35	*
TAAL (g/día)	0,47 \pm 0,03	1,08 \pm 0,23	*
TAR (%P/día)	0,96 \pm 0,13	1,04 \pm 0,10	n.s.
TCA (g/día)	2,16 \pm 0,64	9,56 \pm 1,88	*
TEC (%P/día)	0,27 \pm 0,10	1,03 \pm 0,13	*
IEA (%)	27,81 \pm 7,64	97,79 \pm 13,52	*
IC	3,88 \pm 1,27	1,04 \pm 0,14	*
PPV (%)	20,16 \pm 7,50	43,58 \pm 7,36	*
LPV (%)	-0,49 \pm 5,25	13,28 \pm 5,17	*
IGD (%)	4,16 \pm 1,12	5,60 \pm 0,92	*

Pi = peso inicial; Pf, = peso final; IP = incremento de peso; TAA = tasa de alimentación absoluta; TAR = tasa de alimentación relativa; TCA = tasa de crecimiento absoluta; TEC = tasa específica de crecimiento; IEA = índice de eficacia alimentaria; IC = índice de conversión; TAAP = tasa de alimentación absoluta de proteína; TAAL, tasa de alimentación absoluta de lípidos; PPV = valor productivo de la proteína; LPV = valor productivo de los lípidos; IGD = índice de la glándula digestiva.
n.s.=no significativo ($p > 0,05$); * $p < 0,05$.

Las diferencias en la composición de las heces de los dos grupos fueron significativas para todos los macronutrientes analizados ($p < 0,05$), destacando el elevado porcentaje de MELN en las heces de la dieta G (45,78%) frente a la dieta P (15,68%; Tabla 4). Los valores obtenidos de CDAMS, CDAPROT y CDALIP para la dieta P (93,25%, 97,03% y 87,89%, respectivamente) fueron superiores en comparación con los obtenidos para la dieta G (73,83%, 92,05% y 85,00%, respectivamente).

Tabla 4. Composición de las heces liofilizadas (% peso seco) y coeficientes de digestibilidad de las dietas formuladas con guisante (G) o pota (P).

	G	P	p
Humedad	4,37 ± 0,12	7,91 ± 0,39	*
Proteínas	21,20 ± 1,72	32,33 ± 1,00	*
Lípidos	7,46 ± 0,21	21,14 ± 0,19	*
Cenizas	27,82 ± 0,11	30,85 ± 0,11	*
MELN ^a	45,78	15,68	-
CIA ^b	0,052 ± 0,004	1,079 ± 0,367	*
CDAMS ^c	73,83	93,25	-
CDAPROT ^d	92,05	97,03	-
CDALIP ^e	85,00	87,89	-

^aMELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculado por diferencia; ^bCIA = Cenizas insolubles en ácido; ^cCDAMS = Coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca.; ^dCDAPROT = Coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína; ^eCDALIP = Coeficiente de digestibilidad aparente de los lípidos. Datos expresados como la Media ± D. E.; n.s.= no significativo (p>0,05); *p<0,05.

Las principales diferencias en cuanto a la composición nutricional de los animales se dieron en la glándula digestiva. En este órgano, el grupo alimentado con la dieta G mostró porcentajes significativamente mayores en humedad, proteínas, cenizas y MELN respecto del alimentado con la dieta P (p<0,05; Tabla 5). No obstante, el porcentaje de lípidos fue significativamente mayor en los animales alimentados con la dieta P (34,97%) respecto de los alimentados con la dieta G (5,51%; p<0,05). En el músculo se obtuvieron valores significativamente más altos de humedad y cenizas en los animales alimentados con la dieta G que con la dieta P (p<0,05). No se obtuvieron diferencias significativas en la composición nutricional de la carcasa (p>0,05). En el animal completo, solo se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de lípidos, siendo mayor en aquellos animales que se alimentaron con la dieta P (3,35%) que con la dieta G (1,43%; Tabla 5).

Tabla 5. Composición en macronutrientes (% peso seco) de las distintas fracciones del pulpo (% peso seco) alimentados con las dietas formuladas con guisante (G) o pota (P).

	G	P	p
Glándula Digestiva (n = 8)			
Humedad	71,39 ± 2,09	60,86 ± 2,66	*
Proteínas	63,48 ± 4,62	50,39 ± 8,98	*
Lípidos	5,51 ± 2,92	34,97 ± 10,86	*
Cenizas	6,62 ± 1,34	3,45 ± 0,56	*
MELN ^a	24,45 ± 4,41	13,14 ± 4,06	*
Músculo (n = 4)			
Humedad	81,46 ± 0,66	80,13 ± 0,43	*
Proteínas	79,57 ± 1,18	80,35 ± 1,64	n.s.
Lípidos	1,01 ± 0,43	1,47 ± 0,55	n.s.
Cenizas	11,76 ± 0,61	10,27 ± 0,47	*
MELN ^a	7,66 ± 1,83	7,19 ± 1,63	n.s.
Carcasa (n = 4)			
Humedad	80,60 ± 1,17	81,02 ± 0,57	n.s.
Proteínas	80,66 ± 1,80	80,04 ± 3,34	n.s.
Lípidos	1,14 ± 0,36	0,75 ± 0,07	n.s.
Cenizas	11,42 ± 1,00	11,20 ± 0,56	n.s.
MELN	6,78 ± 2,15	8,00 ± 3,45	n.s.
Animal Completo (n = 4)			
Humedad	80,25 ± 1,12	79,95 ± 0,55	n.s.
Proteínas	79,70 ± 1,90	77,46 ± 3,51	n.s.
Lípidos	1,43 ± 0,60	3,35 ± 0,83	*
Cenizas	11,13 ± 0,94	10,25 ± 0,47	n.s.
MELN ^a	7,75 ± 1,94	8,83 ± 3,30	n.s.

^aMELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculadas por diferencia.

Datos expresados como la Media ± D. E.; n.s.= no significativo (p>0,05); *p<0,05.

6.4. Discusión.

En este trabajo se describe el uso de las dos primeras dietas formuladas exclusivamente a base de ingredientes secos o liofilizados para la alimentación de *O. vulgaris*. Ambas dietas se formularon a partir de la misma base (Morillo-Velarde et al., 2011b) y se diferenciaron en un único ingrediente, por lo que las diferencias obtenidas entre ambas pueden atribuirse a este último. La pota (*T. sagittatus*) se seleccionó por ser una especie de calamar abundante en la zona de estudio y de poco valor comercial. Además, presenta un elevado contenido proteico (Rosa et al., 2005) y un buen perfil de clases lipídicas (Cerezo Valverde et al., 2012a). El guisante fue seleccionado por su elevado contenido proteico, pero también por su elevada aceptabilidad en el pulpo en ensayos preliminares (Morillo-Velarde et al., 2011b).

Ambas dietas mostraron una buena aceptabilidad y una composición similar en macronutrientes, aunque sólo la dieta que empleó pota como ingrediente principal ofreció un buen crecimiento y digestibilidad. Las mayores tasas absolutas de ingesta correspondientes a la dieta P se pueden atribuir al mayor tamaño y crecimiento de los animales de este grupo, pero no indican una mayor aceptabilidad respecto de la dieta G porque las tasas relativas al peso corporal fueron similares. Si transformamos las tasas absolutas de ingesta de la dieta P en peso seco (4,99 gSS/día) para poder compararlas con dietas naturales, observamos que los valores se aproximan a los estimados en condiciones experimentales similares de peso y temperatura al suministrar boga *B. boops* (Aguado-Giménez y García García, 2002), e inferiores respecto de la sardina *S. pilchardus* (García García y Aguado-Giménez, 2002) o el cangrejo *C. mediterraneus* (Aguado-Giménez y García García, 2002) (Tabla 6). Al comparar nuestros resultados con otras dietas experimentales aceptadas por *O. vulgaris*, observamos valores similares a los obtenidos por Cerezo Valverde et al. (2008), 3,24-6,97 gSS/día, y Estefanell et al. (2011a), e inferiores respecto de los obtenidos por Quintana et al. (2008), y García et al. (2010). En todo caso, parte de estas diferencias se pueden atribuir a las distintas formas de evaluar las tasas de disgregación de los piensos, lo que hace estos resultados difícilmente comparables. Según nuestros resultados, la ingesta de estos piensos es todavía un aspecto con amplio margen de mejora, y se debe seguir investigando en la línea de formulaciones y atrayentes que mejoren su palatabilidad.

Tabla 6. Tasa Absoluta de Alimentación en peso seco (TAAss), Tasa Absoluta de Crecimiento (TCA) e Índice de Eficacia Alimentaria (IEA) para dietas formuladas con liofilizado de pota (dieta P) y comparadas con dietas naturales –estimadas en condiciones experimentales similares de peso y temperatura- y otras dietas experimentales.

	TAAss (gSS/día)	TCA (g/día)	IEA (%)
Dieta P (presente estudio)	5,0	9,6	97,8
<i>Boops boops</i> ^a	5,8	9,3	40,6
<i>Sardina pilchardus</i> ^a	9,6	8,4	32,4
<i>Carcinus mediterraneus</i> ^b	16,0	16,2	33,8
<i>B. boops</i> y gamba aglutinadas con gelatina ^c	7,0	6,3	22,5
<i>B. boops</i> de descarte aglutinada con gelatina ^d	6,8	17,0	56,5
Pasta de calamar aglutinada con gelatina ^e	16,1	9,1	14,9
Pasta de calamar y harina de pescado aglutinadas con gelatina ^f	30,0	-3,3	-5,5

^aGarcía García y Aguado-Giménez, 2002.

^bAguado-Giménez y García García, 2002.

^cCerezo Valverde et al., 2008.

^dEstefanell et al., 2011a.

^eQuintana et al., 2008.

^fGarcía et al., 2010.

En referencia a las tasas de crecimiento, los valores para los individuos alimentados con la dieta P (9-10 g/día; 1,03% P/día) no superaron a los estimados con *C. mediterraneus* (17 g/día), aunque fueron similares a los estimados con *B. boops*, (9 g/día; Aguado-Giménez y García García, 2002) y mejores que con *S. pilchardus* (7-8 g/día; García García y Aguado-Giménez, 2002) y otros estudios con dietas experimentales (Cerezo-Valverde et al., 2008; Quintana et al., 2008; García et al., 2010). Hasta la fecha, los mejores resultados con dietas experimentales han sido obtenidos por Estefanell et al. (2011a), suministrando *B. boops* de descarte de elevado contenido lipídico aglutinada con alginatos (17 g/día; 1,5%P/día). Estos resultados se atribuyeron a una eficaz utilización de los lípidos y un efecto de ahorro de la proteína. No obstante, otros ensayos han demostrado una pobre digestibilidad de los lípidos procedentes de la boga de descarte (Sánchez et al., 2009; Seíça Neves et al., 2010) y un efecto negativo sobre la absorción de proteínas (Sánchez et al., 2009) sugiriendo que tanto el contenido lipídico como el tipo de grasa (Cerezo Valverde et al., 2012a) de estas dietas debería establecerse en futuros estudios para optimizar el rendimiento de la dieta.

En nuestros resultados destacó el elevado aprovechamiento nutritivo de la dieta P respecto a todas las dietas naturales (García García y Cerezo Valverde et al., 2006; Biandolino et al., 2010; Prato et al., 2010; Estefanell et al., 2011b), así como experimentales (Cerezo Valverde et al., 2008; Quintana et al., 2008; García et al., 2010; Estefanell et al., 2011a), con índices de conversión próximos a 1, elevados valores de PPV y moderados de LPV (43,58% y 13,28%, respectivamente). Los valores de PPV para la dieta P fueron mejores que los obtenidos con dietas a base de cangrejo (28%), dietas mixtas de peces y cangrejo (33%) y peces (36%) (García García y Cerezo Valverde, 2006), sugiriendo un buen balance nutricional de la dieta P.

Estos resultados fueron acompañados de elevados coeficientes de digestibilidad en la dieta P, coincidiendo con los valores obtenidos para dietas naturales de boga, sardina y cangrejo (Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007), pero superiores respecto de otras dietas experimentales (Seiça Neves et al., 2010), donde usan la misma metodología que en este trabajo (ver Fig. 1). Sin embargo, cuando los pulpos se alimentaron con la dieta G, se obtuvo una fuerte reducción en el coeficiente de digestibilidad de la materia seca (93% al 74%), sugiriendo que el guisante interfiere en el proceso digestivo en *O. vulgaris*. Las leguminosas y el guisante entre ellas, presentan ciertos factores antinutricionales tales como los inhibidores de proteasas, amilasas, lectinas, fitatos y ciertos compuestos fenólicos (Carmona et al., 1991; Trago et al., 2000), que podrían haber afectado a las enzimas digestivas del pulpo.

Por otra parte, los menores CD para proteínas y lípidos no fueron suficientes para explicar la baja digestibilidad de la dieta G. Estos resultados apuntan a que la digestibilidad del resto de componentes de la dieta G, concretamente los hidratos de carbono, habría sido prácticamente nula. O'Dor et al. (1984) observaron una digestibilidad de la glucosa pura del 98% y, puesto que los carbohidratos incluidos en el guisante son mayoritariamente almidones, el grado de complejidad de los carbohidratos también podría ser un factor a tener en cuenta en el diseño de estas dietas experimentales.

La digestibilidad que observamos para la proteína de las dietas P y G, así como en dietas naturales y otras experimentales se mantiene por encima del 90% en todos los casos, indicando la elevada capacidad enzimática para la digestión de estos nutrientes (Boucher-Rodoni, 1982; Aguila et al., 2007; Hamdan et al., 2007). Por el contrario, los coeficientes de digestibilidad de los lípidos fueron variables. Aunque los coeficientes de las dietas G y P no superaron a los de dietas naturales a base de cangrejo y de boga,

ambos bajas en lípidos (<15% grasa peso seco; Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007), sí lo hicieron para la sardina, boga y otras dietas experimentales de mayor contenido lipídico (20-34% grasa peso seco; Hernández y García García, 2004; Seiça Neves et al., 2010; Fig. 1). Estas diferencias se pueden atribuir al distinto contenido en grasa de las dietas, habiéndose demostrado una disminución en la capacidad de digestión de éstas conforme aumenta su contenido en la dieta (Sánchez et al., 2009). Estos resultados coinciden con estudios previos que demostraron una capacidad limitada para la digestión y catabolización de lípidos en cefalópodos (Ballantyne et al., 1981; Mommsen y Hochachka, 1981; O'Dor et al., 1984; Lee, 1994).

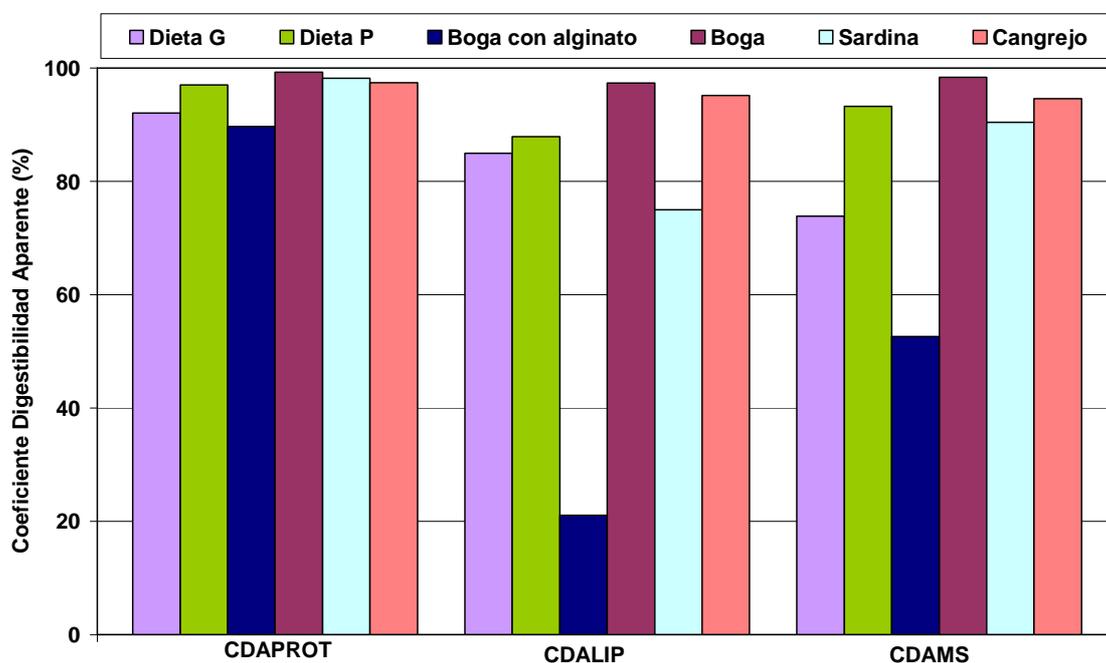


Figura 1. Comparación de los coeficientes de digestibilidad de los lípidos (CDALIP), proteínas (CDAPROT) y materia seca (CDAMS) obtenidos para las dietas experimentales formuladas con liofilizados de guisante (G) o pota (P), para una dieta experimental de boga aglutinada con alginato (Seiça Neves et al., 2010), y para dietas naturales (boga, sardina y cangrejo) en similares condiciones de experimentación (Hernández y García García., 2004).

En cuanto a la composición nutricional en *O. vulgaris*, y de acuerdo con Almansa et al. (2006) y Sierio et al. (2006), tampoco en este estudio encontramos diferencias significativas en el tejido muscular ni en la carcasa como consecuencia de la dieta suministrada. Sin embargo, el porcentaje lipídico de la glándula digestiva en animales alimentados con dieta P (34,97%) fue mucho mayor que en los animales alimentados con dieta G (5,51%), sugiriendo un peor balance nutricional en esta última

y una mayor contribución de los lípidos al metabolismo energético. Estos resultados también quedaron reflejados en los valores de LPV, con una retención de 13,18% de los lípidos ingeridos con la dieta P y de -0,49% para la dieta G. Estudios previos han demostrado que las reservas de lípidos en pulpos se encuentran principalmente en la glándula digestiva (Sieiro et al., 2006; Cerezo Valverde et al., 2012a, c), esencialmente triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol, los cuales pueden ser movilizadas en situaciones de ayuno (García-Garrido et al., 2010).

Esta es la primera vez que dietas semihúmedas elaboradas exclusivamente con ingredientes secos y liofilizados son aceptadas por *O. vulgaris* llevando consigo buenas tasas de crecimiento, aprovechamiento nutritivo y digestibilidad. Los resultados del presente estudio dan un gran paso en las investigaciones para conseguir una dieta formulada con fines comerciales para *O. vulgaris*. Estudios futuros de engorde en pulpos podrían usar una base similar al formato propuesto para obtener piensos con mayor aceptabilidad, estabilidad o composición nutricional con fines comerciales.

7. CAPÍTULO V:

Requerimientos lipídicos de pulpo común (*Octopus vulgaris*) obtenidos a partir de dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado.

Enviado (24/02/2013):

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2013. Lipid requirements of common octopus (*Octopus vulgaris*) obtained from formulated diets with different fish oil content. Aquaculture International.

7. CAPÍTULO V: Requerimientos lipídicos de pulpo común (*Octopus vulgaris*) obtenidos a partir de dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado.

Resumen.

El objetivo de este trabajo fue conocer los requerimientos lipídicos de *O. vulgaris* suministrando dietas semihúmedas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado y deducido del contenido en agua: 0% (A0, 13,8% lípidos SS), 10% (A10, 28,6% lípidos SS) y 20% (A20, 38,8% lípidos SS). El resto de ingredientes se mantuvo constante en las tres dietas: 20% de gelatina, 10% de yema de huevo, 15% de liofilizado de *Todarodes sagittatus* y 5% de liofilizado de *Sardinella aurita*). Las dietas presentaron una textura firme al introducirlas en agua y una buena aceptabilidad, observándose una supervivencia del 100%. La mayor tasa absoluta de ingesta ($15,8 \pm 1,2$ g/ día), crecimiento ($9,6 \pm 1,4$ g/día; 0,91 %P/día) y eficacia alimentaria (60,3%) se observó con la dieta A0. En ésta la tasa de ingesta de lípidos (1,0 g/día) fue menor respecto de las dietas A10 (2,1 g/día) y A20 (3,3 g/día; $P < 0,05$), mostrando además una mayor retención de lípidos y proteína. La digestibilidad de la proteína se mantuvo por encima del 95% en todas las dietas. Sólo la dieta A0 obtuvo un alto coeficiente de digestibilidad de lípidos (81,25%), disminuyendo drásticamente hasta el 12,3% en la A20. Fue destacable la elevada digestibilidad de los lípidos polares (83-89%) respecto de los neutros (2-87%) en todas las dietas. Estos resultados proponen tasas de ingesta de lípidos óptimas alrededor de 1 g/día y porcentajes de grasa apropiados del 13-14% SS en dietas formuladas para el engorde de *O. vulgaris*, aunque estos valores podrían variar en estudios futuros según la proporción de lípidos polares y neutros de la dieta.

7.1. Introducción.

Los nuevos formatos de pienso desarrollados que son aceptados por el pulpo común (*Octopus vulgaris*) permiten elaborar dietas formuladas de composición conocida para avanzar en el conocimiento de sus requerimientos nutricionales (Quintana et al., 2008; Cerezo Valverde et al., 2008, 2012c; García et al., 2010; Estefanell et al., 2011a; Morillo-Velarde et al., 2012b).

Actualmente se admite que los cefalópodos son exclusivamente carnívoros y, a diferencia de lo ocurrido con las proteínas, raramente utilizan carbohidratos o lípidos como fuente de energía (Lee, 1994). Los cefalópodos presentan en su composición corporal menos de un 2% en peso húmedo de lípidos, mostrando altos niveles de fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de la serie n-3 (Sinanoglou y Miniadis-Meimaroglou, 1998; Navarro y Villanueva, 2000, 2003), por lo que se ha sugerido un predominio del papel estructural sobre el energético (O'Dor et al., 1984; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006). No obstante, los cefalópodos presentan enzimas lipasas a lo largo del tracto digestivo (Boucher-Rodoni, 1982; Caruso et al., 2004; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006) y son capaces de almacenar los lípidos en forma de triglicéridos en cantidades importantes en la glándula digestiva (Sieiro et al., 2006; Cerezo Valverde et al., 2012a). Recientemente, Morillo-Velarde et al. (2012b) han estimado que los lípidos contribuyen con el 26% del gasto energético diario de *O. vulgaris* durante el ayuno a corto plazo y el resto debería de ser suministrado por otras fuentes como las proteínas (Lee, 1994; García-Garrido et al., 2012) o los hidratos de carbono (Morillo-Velarde et al., 2011a). Las reservas de lípidos en *O. vulgaris* durante el ayuno son movilizadas eficazmente, principalmente los lípidos neutros, incluyendo esteroides de esterol, triglicéridos, y ácidos grasos libres (García-Garrido et al., 2010; Morillo-Velarde et al., 2012b). El uso de lípidos como una potencial fuente de energía también ha sido sugerido en otras especies de cefalópodos (Semmens, 1998; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006).

Algunos grupos de investigación han obtenido recientemente buenos crecimientos y altos índices de eficacia alimentaria al utilizar dietas con alto contenido en grasa. Estefanell et al. (2011a) han obtenido excelentes resultados en *O. vulgaris* usando boga (*Boops boops*) fresca de descarte o incluida en dietas formuladas (18,7-26,3% de grasa peso seco), sugiriendo una eficaz utilización de los lípidos de la dieta. Estos mismos autores detectaron peores resultados al emplear boga de contenido lipídico muy alto (46,5%; Estefanell et al., 2011b), lo que parece confirmar la existencia de un rango óptimo en el contenido lipídico de la dieta. Cerezo Valverde et al. (2012c) obtuvieron mejor crecimiento, eficacia alimentaria y valor productivo de la proteína en dietas formuladas con un 30-33% de lípidos (peso seco) respecto de otras con un 4-5%. Previamente, García García y Aguado-Giménez (2002) también comprobaron en dietas naturales la influencia del contenido lipídico, observando mejor crecimiento e índice de conversión en pulpos alimentados con *B. boops* (20,1% lípidos, peso seco) que con

Sardina pilchardus (49,7% lípidos, peso seco). Posteriormente también en dietas naturales se sugería un contenido de lípidos para *O. vulgaris* entre el 7-10% en peso seco (García García y Cerezo Valverde, 2006).

El objetivo de este trabajo es conocer los requerimientos lipídicos de *O. vulgaris*, comprobando los cambios que se producen en el crecimiento, aprovechamiento nutritivo y digestibilidad de la dieta, así como en la composición nutricional de los animales después de suministrar dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado utilizando el formato de pienso propuesto por Morillo-Velarde et al. (2012a).

7.2. Material y métodos.

7.2.1. Captura y aclimatación de los animales.

Los ejemplares de *O. vulgaris* se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) mediante arte de arrastre y se mantuvieron en tanques de 2000 l en el laboratorio. Los animales se aclimataron durante 2 semanas y se alimentaron con alacha (*Sardinella aurita*) y cangrejo (*Carcinus mediterraneus*) en días alternativos, según el patrón descrito por García García y Cerezo Valverde (2006). Posteriormente los animales se trasladaron y mantuvieron individualmente en tanques circulares de 262 l donde se llevaría a cabo la experiencia, con un sistema de recirculación de agua con control de la temperatura (Air Energy, Heat Pump Inc., Model 400 Ti) y filtración mecánica y biológica. Éstos contenían tubos de PVC como refugio, una red externa para evitar que se escaparan y una tela de rafia para evitar la luz directa. La temperatura se mantuvo constante ($18,4 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$) dentro del rango óptimo para esta especie (Aguado-Giménez y García García, 2002), oxígeno superior al 80% de saturación para que este factor no fuera limitante (Cerezo Valverde y García García, 2005), lámpara UV, fotoperiodo 12L: 12D, salinidad 37‰, pH entre 7 y 8 y nitrógeno amoniacal total (TAN) inferior a 0,2 mg/l.

7.2.2. Elaboración y estabilidad de las dietas formuladas.

Se prepararon tres dietas diferentes con distinto contenido en aceite de pescado, representando en cada una de ellas el 0% (grupo A0), 10% (grupo A10) y 20% (grupo

A20) en peso de la dieta y reduciéndose del contenido en agua (Tabla 1). El resto de ingredientes se mantuvo constante en las tres dietas y estuvo constituido por 20% de gelatina como aglomerante, 10% de yema de huevo en polvo, 10% de liofilizado de pota (*Todarodes sagittatus*) y 5% de liofilizado de alacha (*S. aurita*). La pota y la alacha procedían de pesquerías artesanales de la misma zona que los pulpos. Ambas fueron limpiadas de espinas y vísceras, y posteriormente trituradas. Estos ingredientes se liofilizaron y se trituraron en un molinillo de café hasta obtener una textura de polvo fino (<200µm), se envasaron y conservaron al vacío. La yema de huevo, la gelatina y el aceite de pescado se adquirieron en su forma comercial (Tabla 1). Para la elaboración de los piensos todos los ingredientes se mezclaron en un robot de cocina (Mycook® 1.8, Electrodomésticos Taurus, S.L. Lleida, España). Primero se disolvió la gelatina en agua y aceite a 40° C, y posteriormente se fueron añadiendo los ingredientes restantes hasta su completa homogenización. La mezcla obtenida se dejó enfriar a 4°C en bandejas de aluminio durante 24 h, congelándose posteriormente hasta su uso.

Tabla 1. Composición en peso (%) de las dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado como ingrediente a testar.

Dietas	Agua	Gelatina ^a	Yema ^b (Huevina)	Alacha ^c (<i>S. aurita</i>)	Pota ^c (<i>T. sagittatus</i>)	Aceite ^d	Total (%)
A0	50	20	10	5	15	0	100
A10	40	20	10	5	15	10	100
A20	30	20	10	5	15	20	100

^aGelatina granulada Bloom 220. Productos Sur, S. A. (Polígono Industrial Oeste, San Ginés, Murcia, España).

^bYema de huevo atomizada, Avícola San Isidro S.L. (Los Belones, Cartagena, Murcia, España).

^cIngredientes liofilizados.

^dAceite de hígado de bacalao, Acofarma (Terrassa, Barcelona, España).

La estabilidad en agua de las dietas se determinó a partir de la pérdida de la materia seca del pienso después de la inmersión en agua durante 24 horas. Con estos datos se obtuvo la media de los valores de los siguientes índices calculados:

$VP (\%) = (Pf - Pi) / Pi * 100$, expresa la variación del peso seco de las dietas después de ser sumergidas en agua, donde Pi y Pf son el peso seco inicial y final, respectivamente.

$F = Pi / Pf$, representa un factor de corrección. El peso seco del alimento no ingerido de las dietas fue multiplicado por este valor de corrección para tener en cuenta la disgregación del pienso.

7.2.3. *Diseño experimental.*

Finalizado el periodo de aclimatación, los animales se pesaron y sexaron formando 4 grupos: CI o control inicial (3 individuos sacrificados al inicio del experimento), grupo A0 (4 individuos alimentados con dieta A0), grupo A10 (6 individuos con dieta A10) y grupo A20 (6 individuos con dieta A20). Todos los individuos fueron machos con el fin de evitar la influencia de los procesos reproductivos. Las dietas fueron suministradas durante 56 días (noviembre 2011-febrero 2012). Los pesos medios iniciales fueron de 803 ± 91 g (719-922 g) para la dieta A0, 817 ± 79 g (738-956 g) para la dieta A10 y 802 ± 88 g (714-946 g) para la dieta A20. La temperatura del agua osciló entre 17,0 y 20,8°C durante el periodo experimental ($18,4 \pm 0,7^\circ\text{C}$). Los piensos se pesaron y se administraron a saciedad, en un único trozo de forma cúbica, correspondiendo la primera toma al 5% del peso corporal de cada individuo, y posteriormente, reajustándose para que sobrepasase las demandas de cada ejemplar. Los pulpos eran alimentados a las 09:00 h, 6 días a la semana (García García y Cerezo Valverde, 2004, 2006), y el alimento sobrante se recogía a las 24 h con la ayuda de un pequeño salabre. El alimento sobrante fue desecado a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 h hasta peso constante (AOAC 1997; Método nº 930.15) para calcular la ingesta diaria de cada individuo. El último día de experimentación todos los animales fueron pesados y anestesiados por inmersión en agua de mar helada antes del sacrificio conforme con los principios éticos de reducción, reemplazamiento y refinamiento y para asegurarse de que el dolor, el sufrimiento y la angustia se reducen al mínimo en concordancia con Directiva 2010/63/EU.

7.2.4. *Recogida y conservación de las muestras.*

Una vez finalizado el experimento se procedió a la disección de los ejemplares de cada grupo, obteniendo la glándula digestiva y la carcasa (resto del individuo menos la glándula digestiva), con sus correspondientes pesos. Este procedimiento fue necesario para obtener las analíticas de la composición de los animales completos, a partir de los resultados de la glándula digestiva y la carcasa. Cada una de estas partes se trituró y mezcló hasta obtener una mezcla homogénea, se envasó al vacío y se congeló a -20°C antes de proceder a los análisis bioquímicos.

Las heces fueron recogidas diariamente con la ayuda de un pequeño salabre y se conservaron en el ultracongelador a -80°C . Posteriormente se liofilizaron (Heto, PowerDry LL3000, Allerød, Dinamarca). Las heces de cada grupo experimental fueron recogidas conjuntamente para conseguir la cantidad necesaria para su análisis.

7.2.5. Método analítico.

Se analizaron por triplicado tanto las dietas formuladas como las muestras de pulpo. Se utilizó 1 g de muestra para las cenizas, humedad y proteína y 2 g de muestra en el caso de los lípidos. La humedad fue obtenida por desecación a $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h hasta peso constante (AOAC 1997; Método n° 930.15) y las cenizas por incineración a $450 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h en un horno Mufla (HOBERSAL, HD-230). El contenido de lípidos fue obtenido mediante éter etílico en un extractor SOXTEC AVANTI 2058 (AOAC, 1997; Método n° 920.39). El contenido proteico fue determinado por el método Kjeldhal usando un factor de conversión de 6,25 y el material extraíble libre de nitrógeno (MELN) por diferencia. La energía y la relación proteína energía (P/E en MJ) fueron estimados usando los coeficientes de energía de Miglavs y Jobling (1989): proteína 23,6 kJ/g, lípidos 38,9 kJ/g y carbohidratos 16,7 kJ/g.

Los macronutrientes en el animal completo se calcularon sumando el contenido del nutriente (N) en la glándula digestiva con el contenido en la carcasa:

$$N \text{ total} = [((\text{PGD} * \% \text{NGD}) + (\text{PCA} * \% \text{NCA})) * 100] / \text{PT}$$
, donde N es el % de nutriente considerando el animal completo, PGD el peso de la glándula digestiva, PCA el peso de la carcasa, NGD el porcentaje del nutriente en la glándula digestiva, NCA el porcentaje del nutriente en la carcasa y PT el peso total del individuo.

7.2.6. Determinación e identificación de las clases lipídicas.

A partir del contenido en lípidos totales de las dietas, la carcasa y la glándula digestiva de *O. vulgaris* se estimó la cantidad de muestra necesaria para extraer 10 mg de lípidos según Folch et al. (1957). Los lípidos se conservaron disueltos en cloroformo:metanol (2:1 v/v) y butilhidroxitolueno (0,01%) como antioxidante en ultracongelador a -80°C (Christie, 1982), ajustando la concentración a $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de lípidos antes de los análisis. La separación de las clases lipídicas se realizó mediante

cromatografía de alta resolución en capa fina (HPTLC) siguiendo el método de Olsen y Henderson (1989). Los lípidos (15 µg) se aplicaron en placas de gel de sílice de HPTLC 20 x 10 cm (Merck, Darmstadt, Alemania) con un autoinyector (Linomat 5 CAMAG) de acuerdo con Cerezo Valverde et al. (2012c). Posteriormente, se obtuvo el porcentaje del área detectada correspondiente a cada clase lipídica. Se detectaron lípidos polares (LP): lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiélinea (SM), fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), fosfatidilserina y fosfatidilinositol (PS/PI) y fosfatidiletanolamina (PE); y lípidos neutros (LN): monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG), colesterol (CHO), ácidos grasos libres (FFA), triglicéridos (TG) y ésteres de esteroles y ceras (SE/WE).

7.2.7. Determinación de la digestibilidad.

El coeficiente de digestibilidad aparente fue calculado para la materia seca (CDAMS), la proteína (CDAPROT), los lípidos (CDALIP) y para cada clase lipídica usando la ecuación estándar de Maynard y Loosli (1969):

$$CDA = 100 - (100 * \%M_{dieta} / \%M_{heces}) \times (\%N_{heces} / \%N_{dieta})$$
, donde M es el marcador inerte y N los nutrientes. Como marcador inerte se emplearon las cenizas insolubles en ácido (CIA), determinadas según el método descrito por Atkinson et al. (1984). El porcentaje final de cada clase lipídica en la muestra se obtuvo como el producto entre el porcentaje de lípidos totales y el que representaba cada clase lipídica. Tanto para las heces como para las dietas liofilizadas se utilizaron 5 g para la obtención de las cenizas insolubles en ácido y 0,2 g para lípidos. Para las proteínas se utilizaron 0,2 y 0,5 g para la dieta y las heces, respectivamente, realizando los análisis por triplicado en todos los casos.

7.2.8. Parámetros calculados y análisis de los datos.

Todos los ejemplares fueron pesados al inicio (P_i es el peso inicial en g) y al final del experimento (P_f es el peso final en g). Los parámetros calculados fueron los siguientes: Peso medio: P_m (g) = $(P_i + P_f) / 2$; Incremento de peso: IP (g) = $P_f - P_i$; Tasa de alimentación absoluta: TAA (g/día) = $(AC / \text{días})$; Tasa de alimentación relativa: TAR (%P/día) = $(TAA / P_m) * 100$; Tasa de crecimiento absoluto: TCA (g/día) = $(IP / \text{días})$; Tasa específica de crecimiento: TEC (%P/día) = $[(\ln P_f - \ln P_i) / \text{días}] * 100$; Índice de

eficacia alimentaria: IEA (%) = $(IP/AC)*100$; Índice de conversión: IC = AC/IP ; Tasa de alimentación absoluta de proteína: TAAP (g/día) = $(TAA*\%Proteína\ dieta)/100$; Tasa de alimentación absoluta de lípidos: TAAL (g/día) = $(TAA*\%Lípidos\ dieta)/100$; Valor productivo de la proteína: PPV (%) = $(Proteína\ retenida/ Proteína\ ingerida)*100$; Valor productivo de los lípidos: LPV (%) = $(Lípidos\ retenidos/ Lípidos\ ingeridos)*100$; Índice de la glándula digestiva: IGD (%) = $PGD/Pf*100$, donde PGD es el peso de la glándula digestiva en g y AC es el alimento consumido en g corregido teniendo en cuenta la tasa de disgregación en el agua y calculado según la fórmula:

$AC = (Alimento\ suministrado\ ss - Alimento\ sobrante\ ss * F) + (Alimento\ ingerido\ ss * (\%Humedad\ dieta / \%ss\ dieta))$, con valores de F entorno a 1 (0,99-1,02) para todas las dietas formuladas.

Los resultados obtenidos de todos los análisis fueron expresados como la media \pm desviación estándar (D.E.). Para analizar las diferencias se llevó a cabo un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias significativas obtenidas entre los valores medios fueron analizadas por el test de Duncan que permite comparar grupos con distinto número de muestras, estableciendo un nivel de significación $P < 0,05$. Los porcentajes y los índices fueron transformados aplicando el logaritmo neperiano antes de hacer el ANOVA.

7.3. Resultados.

Las dietas presentaron una textura firme antes de sumergirlas en agua. La dieta A0 perdió un 1,75%, la dieta A10 perdió un 0,0% y la dieta A20 un 0,22% de su peso seco después de permanecer 24 h en agua, demostrando una gran estabilidad. Existieron diferencias significativas en los porcentajes de todos los macronutrientes analizados, con menores porcentajes de humedad, proteína y cenizas y mayor de lípidos conforme aumentó el contenido de aceite en la dieta ($P < 0,05$; Tabla 2). Al analizar la composición en clases lipídicas no hubo diferencias significativas ni en la proporción de LN totales ni en la de LP totales, aunque se observó un aumento en el porcentaje de DG, TG, SE/WE y una disminución en el porcentaje de SM, PE, CHO y FFA significativos, al incrementar el porcentaje de aceite en la dieta ($P < 0,05$). El contenido energético fue mayor en las dietas A10 y A20 respecto de la dieta A0, mientras que, la relación P/E (g/MJ) fue menor en las dietas A10 y A20 respecto a la dieta A0 (Tabla 2).

Tabla 2. Composición en macronutrientes (% peso seco) y clases lipídicas (% del total de lípidos detectados) de las dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	A0	A10	A20	P
Humedad	53,66 ± 0,80 ^a	44,47 ± 0,33 ^b	34,80 ± 0,09 ^c	*
Proteínas	81,57 ± 0,61 ^a	66,73 ± 8,77 ^b	56,83 ± 0,23 ^c	*
Lípidos	13,77 ± 0,62 ^a	28,64 ± 8,15 ^b	38,83 ± 0,18 ^c	*
Lípidos Polares (Totales)	13,89 ± 0,27	14,73 ± 2,43	11,70 ± 0,91	n.s.
LPC	2,25 ± 0,12	1,73 ± 0,87	1,20 ± 0,21	n.s.
SM	1,15 ± 0,38 ^a	1,93 ± 0,40 ^{ab}	0,55 ± 0,11 ^b	*
PC	5,49 ± 0,06	6,81 ± 1,12	6,26 ± 0,92	n.s.
LPE	1,31 ± 0,21	1,00 ± 0,01	0,89 ± 0,29	n.s.
PS/PI	1,15 ± 0,11	0,93 ± 0,16	0,61 ± 0,17	n.s.
PE	3,22 ± 0,42 ^a	2,27 ± 0,18 ^b	2,15 ± 0,02 ^b	*
Lípidos Neutros (Totales)	86,12 ± 0,26	85,27 ± 2,45	88,32 ± 0,90	n.s.
MG	4,88 ± 0,83	4,03 ± 0,07	4,28 ± 0,18	n.s.
DG	2,37 ± 0,09 ^a	4,30 ± 0,48 ^b	5,03 ± 0,51 ^b	*
CHO	12,32 ± 0,11 ^a	9,50 ± 0,72 ^b	8,54 ± 0,59 ^b	*
FFA	24,84 ± 0,44 ^a	15,63 ± 0,54 ^b	13,44 ± 0,62 ^c	*
TG	37,48 ± 0,52 ^a	45,07 ± 2,01 ^b	49,07 ± 0,96 ^b	*
SE/WE	4,76 ± 0,02 ^a	7,23 ± 0,16 ^b	7,96 ± 0,04 ^c	*
Cenizas	4,38 ± 0,09 ^a	3,43 ± 0,09 ^b	2,97 ± 0,03 ^c	*
MELN ^a	0,63 ± 0,41	1,21 ± 1,18	1,36 ± 0,04	n.s.
CIA ^b	0,14 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,00 ^b	*
Energía(kJ/100g)	2471	2709	2874	-
P/E (g/MJ) ^c	33,00	24,63	19,77	-

LPC: Lisofofatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofofatidiletanolamina; PS/PI: Fosfatidilserina y Fosfatidilinositol PE: Fosfatidiletanolamina; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE/ WE: Esteroles de colesterol y Ceras.

^aMELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculadas por diferencia.

^bCIA = Cenizas insolubles en ácido.

^cP/E = Relación proteína/energía.

Datos expresados como la media ± D.E.; valores en la misma línea con superíndices distintos son significativamente diferentes (n.s.= no significativo (P>0,05)).

Al comienzo del experimento no hubo diferencias significativas entre los pesos medios iniciales de los 3 grupos y la supervivencia fue del 100% en todos los grupos. Durante el primer mes (días 1-28) la dieta mejor aceptada fue la dieta A0, con una TAR de 1,78 ± 0,15% P/día (P<0,05). No obstante, no llegaron a detectarse diferencias significativas en el crecimiento (10-11 g/día) ni en el aprovechamiento de la dieta entre grupos. El grupo alimentado con dieta A0 mostró una TAAL significativamente menor

respecto de los grupos alimentados con la dietas A10 y A20 ($P < 0,05$; Tabla 3). Durante el segundo mes (días 29-56) no hubo diferencias significativas en la aceptabilidad de las dietas, con TAR similares ($P > 0,05$). Sin embargo, los animales alimentados con la dieta A0 mostraron índices significativamente mejores de crecimiento, con una TCA de $8,11 \pm 1,32$ g/día, dos y cuatro veces mayor respecto de los grupos alimentados con la dieta A10 y A20 ($4,38 \pm 1,56$ g/día y $2,65 \pm 1,88$ g/día, respectivamente; Tabla 3). Igualmente, los índices de aprovechamiento nutritivo (IEA, IC) fueron significativamente mejores con la dieta A0 al compararlos con la dieta A10 ($P < 0,05$). Los valores medios de IEA e IC para la dieta A20 en este 2º mes no se calcularon por aparecer un ejemplar con valor negativo. Al comparar el periodo completo (días 1-56), los animales alimentados con la dieta A0 mostraron índices significativamente mejores de crecimiento (IP, TCA, TEC), destacando un mayor IP (535 ± 77 g) respecto de los alimentados con las dietas A10 y A20 (408 ± 95 g y 361 ± 63 g, respectivamente; $P < 0,05$). La TAAL fue significativamente menor en la dieta A0 (1,01 g/día), siendo el doble con A10 y el triple con A20. El mejor aprovechamiento de la dieta se detectó en el grupo A0, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas ($P > 0,05$ para IEA, IC y PPV). Tampoco hubo diferencias en el IGD. El valor productivo de los lípidos (LPV) fue significativamente mayor en el grupo A0 ($P < 0,05$; Tabla 3).

Tabla 3. Índices de crecimiento y aprovechamiento nutritivo de los pulpos alimentados con las dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	Días 1 - 28				Días 29 - 56				Periodo Total (Días 1- 56)			
	Dieta A0 (n=4)	Dieta A10 (n=6)	Dieta A20 (n=6)	P	Dieta A0 (n=4)	Dieta A10 (n=6)	Dieta A20 (n=6)	P	Dieta A0 (n=4)	Dieta A10 (n=6)	Dieta A20 (n=6)	P
Pi (g)	803 ± 91	817 ± 79	802 ± 88	n.s.	1111 ± 173	1102 ± 117	1089 ± 152	n.s.	802 ± 91	817 ± 79	802 ± 88	n.s.
Pf (g)	1111 ± 173	1102 ± 117	1089 ± 152	n.s.	1338 ± 140	1225 ± 152	1163 ± 132	n.s.	1338 ± 140	1225 ± 152	1163 ± 132	n.s.
IP (g)	308 ± 105	285 ± 59	287 ± 67	n.s.	227 ± 37	123 ± 44	74 ± 53	n.s.	535 ± 77 ^a	408 ± 95 ^b	361 ± 63 ^b	*
TAA (g/día)	16,97 ± 2,13	13,96 ± 1,52	14,03 ± 3,85	n.s.	14,60 ± 0,90	12,33 ± 1,16	12,13 ± 3,17	n.s.	15,79 ± 1,19	13,14 ± 1,32	13,08 ± 3,15	n.s.
TAAP (g/día)	6,42 ± 0,80	5,17 ± 0,56	5,20 ± 1,43	n.s.	5,52 ± 0,34	4,57 ± 0,43	4,49 ± 1,18	n.s.	5,97 ± 0,45	4,87 ± 0,49	4,85 ± 1,17	n.s.
TAAL (g/día)	1,08 ± 0,14 ^a	2,22 ± 0,24 ^b	3,55 ± 0,97 ^c	*	0,93 ± 0,06 ^a	1,96 ± 0,18 ^b	3,07 ± 0,80 ^c	*	1,01 ± 0,08 ^a	2,09 ± 0,21 ^b	3,31 ± 0,80 ^c	*
TAR (%P/día)	1,78 ± 0,15 ^a	1,46 ± 0,16 ^b	1,47 ± 0,25 ^b	*	1,20 ± 0,15	1,07 ± 0,10	1,08 ± 0,29	n.s.	1,48 ± 0,09	1,29 ± 0,13	1,32 ± 0,24	n.s.
TCA (g/día)	11,01 ± 3,73	10,19 ± 2,10	10,26 ± 2,40	n.s.	8,11 ± 1,32 ^a	4,38 ± 1,56 ^b	2,65 ± 1,88 ^b	*	9,56 ± 1,37 ^a	7,29 ± 1,70 ^b	6,45 ± 1,12 ^b	*
TEC (%P/día)	1,15 ± 0,29	1,07 ± 0,18	1,08 ± 0,12	n.s.	0,68 ± 0,18 ^a	0,37 ± 0,10 ^b	0,24 ± 0,19 ^b	*	0,91 ± 0,11 ^a	0,72 ± 0,12 ^b	0,66 ± 0,09 ^b	*
IEA (%)	63,58 ± 13,81	72,57 ± 9,65	74,24 ± 10,16	n.s.	55,65 ± 0,80 ^a	35,12 ± 10,10 ^b	n.c. ¹	*	60,34 ± 4,68	54,99 ± 8,52	50,29 ± 7,59	n.s.
IC	1,63 ± 0,35	1,40 ± 0,21	1,37 ± 0,19	n.s.	1,84 ± 0,33 ^a	3,05 ± 0,87 ^b	n.c. ¹	*	1,67 ± 0,14	1,86 ± 0,31	2,02 ± 0,28	n.s.
PPV(%)	-	-	-		-	-	-		27,39 ± 3,29	23,39 ± 6,56	21,81 ± 4,16	n.s.
LPV(%)	-	-	-		-	-	-		14,09 ± 3,62 ^a	9,83 ± 5,06 ^{ab}	6,48 ± 4,01 ^b	*
IGD(%)	-	-	-		-	-	-		5,57 ± 0,93	5,11 ± 1,08	5,23 ± 0,68	n.s.

Pi = peso inicial; Pf, = peso final; IP = incremento de peso; TAA = tasa de alimentación absoluta; TAR = tasa de alimentación relativa; TCA = tasa de crecimiento absoluta; TEC = tasa específica de crecimiento; IEA = índice de eficacia alimentaria; IC = índice de conversión absoluta; TAAP = tasa de alimentación absoluta de proteínas; TAAL = tasa de alimentación absoluta de lípidos; PPV = valor productivo de la proteína; LPV = valor productivo de los lípidos; IGD = índice de la glándula digestiva.

¹N.c.: no calculado por detectar valores negativos en 1 ejemplar. Valores en la misma línea con superíndices diferentes son significativamente diferentes (n.s.= no significativo (P>0,05), *P<0,05).

Los valores de CDAMS y CDALIP para la dieta A0 fueron superiores respecto de las dietas A10 y A20, detectándose en esta última los valores más bajos. Los CDAPROT fueron similares en las tres dietas (95-98%; Tabla 4). Los lípidos polares presentaron coeficientes de digestibilidad mayores (>83% en las tres dietas) respecto de los lípidos neutros (2-87%), cuya digestibilidad fue disminuyendo conforme aumentó el porcentaje de grasa en la dieta, llegando a ser del 0% en MG y FFA en las dietas con aceite. Este patrón se observó en todos los lípidos neutros analizados (Fig. 1). Por el contrario, no se detectó una disminución de la digestibilidad en ninguno de los lípidos polares al aumentar el contenido de grasa en la dieta (Fig. 1).

Tabla 4. Coeficientes de digestibilidad de las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	A0	A10	A20
CDAPROT ^a	95,16	97,48	96,22
CDALIP ^b	81,25	26,78	12,27
CDAMS ^c	87,78	70,98	57,44

^aCDAPROT= Coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína.

^bCDALIP= Coeficiente de digestibilidad aparente de los lípidos.

^cCDAMS= coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca.

Datos expresados como la Media \pm D. E.; n.s.= no diferencias significativas ($P>0,05$); * $P<0,05$.

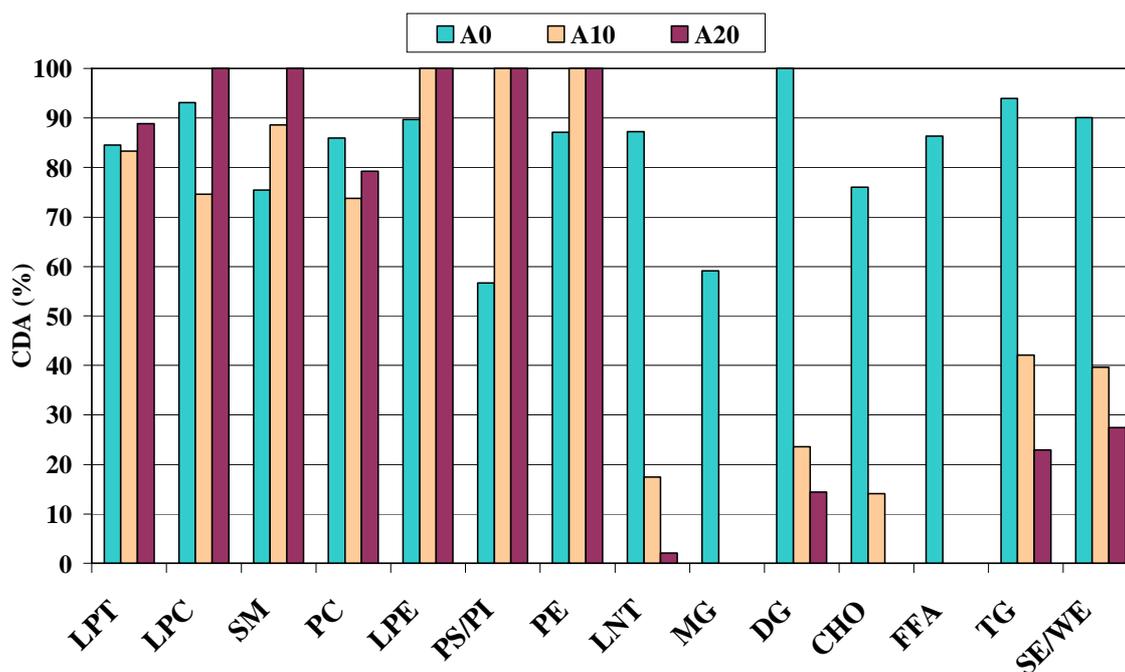


Figura 1. Comparación de los coeficientes de digestibilidad (CDA) aparente de las distintas clases lipídicas obtenidas para las dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20). LPT: Lípidos Polares Totales; LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomiélin; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS/PI: Fosfatidilserina y Fosfatidilinositol; PE: Fosfatidiletanolamina; LNT: Lípidos Neutros Totales; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE/WE: Esteroles de colesterol y Ceras.

Las principales diferencias en cuanto a la composición nutricional de los animales se dieron en la glándula digestiva. En este órgano, todos los grupos experimentales presentaron porcentajes mayores en lípidos y menores en proteína y cenizas respecto del CI ($P < 0,05$). Los grupos alimentados con las dietas A10 y A20 mostraron porcentajes significativamente mayores en lípidos y menores en proteínas respecto del alimentado con la dieta A0 ($P < 0,05$; Tabla 5). No se obtuvieron diferencias significativas en la composición nutricional de la carcasa ($P > 0,05$). En el animal completo el porcentaje de proteínas fue menor en los grupos alimentados con la dieta A10 (73,02%) y A20 (74,04%) respecto del grupo CI (77,28%). El contenido lipídico fue mayor en aquellos animales que se alimentaron con dietas experimentales respecto del grupo CI (Tabla 5).

En la glándula digestiva predominaron los LN (87,7-91,9%) frente a los LP (8,1-13,3%), siendo los TG, FFA y SE/WE las clases lipídicas mayoritarias. En la carcasa predominaron los LP frente a los LN, destacando la PC, PE y CHO como las clases lipídicas mayoritarias (Tabla 6). Tanto en la glándula digestiva como en la carcasa se

detectó un aumento en el porcentaje de LN y un descenso en el de LP conforme aumentó el porcentaje de aceite en la dieta ($P < 0,05$). Principalmente estos cambios se atribuyeron a un mayor porcentaje de TG en la glándula digestiva y en CHO, FFA y TG en la carcasa ($P < 0,05$).

Tabla 5. Composición en macronutrientes (% peso seco) de las distintas fracciones del pulpo alimentados con dietas naturales (CI) y con dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	CI (n=3)	A0 (n=4)	A10 (n=6)	A20 (n=6)	P
Glándula Digestiva					
Humedad	65,82 ± 4,02	62,25 ± 3,67	58,49 ± 4,76	59,54 ± 5,64	n.s.
Cenizas	5,75 ± 1,60	^{\$} 3,50 ± 0,17	^{\$} 3,33 ± 0,73	^{\$} 2,96 ± 0,57	n.s.
Proteínas	58,20 ± 7,86	49,11 ± 5,20 ^a	^{\$} 36,40 ± 4,74 ^b	^{\$} 38,02 ± 7,91 ^b	*
Lípidos	21,35 ± 6,46	^{\$} 36,69 ± 4,61 ^a	^{\$} 51,65 ± 5,14 ^b	^{\$} 51,26 ± 7,59 ^b	*
MELN ^a	14,70 ± 1,66	10,70 ± 1,24	8,80 ± 3,33	7,79 ± 3,32	n.s.
Carcasa					
Humedad	81,79 ± 1,21	80,59 ± 0,66	80,33 ± 1,09	80,82 ± 0,66	n.s.
Cenizas	11,79 ± 1,56	9,85 ± 0,89	10,76 ± 0,99	11,19 ± 0,70	n.s.
Proteínas	78,61 ± 2,04	79,72 ± 1,47	76,34 ± 1,84	78,40 ± 2,01	n.s.
Lípidos	0,70 ± 0,29	0,38 ± 0,27	0,41 ± 0,15	0,55 ± 0,43	n.s.
MELN ^a	8,90 ± 0,21	10,05 ± 0,89	12,49 ± 1,84	9,86 ± 2,50	n.s.
Animal completo					
Humedad	81,12 ± 0,94	79,59 ± 0,66	79,19 ± 1,29	79,678 ± 0,96	n.s.
Cenizas	11,29 ± 1,33	9,21 ± 0,88	9,99 ± 1,01	10,33 ± 0,86	n.s.
Proteínas	77,28 ± 1,83	76,59 ± 0,84	^{\$} 73,02 ± 2,36	^{\$} 74,04 ± 2,92	n.s.
Lípidos	2,11 ± 0,55	^{\$} 4,08 ± 0,69	^{\$} 5,72 ± 1,83	^{\$} 6,04 ± 2,15	n.s.
MELN ^a	9,31 ± 0,35	10,11 ± 0,75	12,11 ± 1,94	9,59 ± 2,19	n.s.

^a MELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculados por diferencia.

Datos expresados como la media ± D.E.; valores en la misma línea con superíndices diferentes son significativamente diferentes (n.s.= no significativo ($P > 0,05$), * $P < 0,05$); ^{\$} $P < 0,05$ con respecto a los animales control (CI).

Tabla 6. Porcentaje de las diferentes clases lipídicas en la carcasa y en la glándula digestiva de *O. vulgaris* alimentados con dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	A0 (n=4)	A10 (n=6)	A20 (n=6)	P
Glándula Digestiva				
Lípidos Polares (Totales)	12,30 ± 0,77 ^a	13,30 ± 2,93 ^a	8,14 ± 2,39 ^b	*
LPC	0,98 ± 0,14	0,87 ± 0,34	n.d.	n.s.
PC	4,44 ± 0,27	5,20 ± 1,43	4,23 ± 1,74	n.s.
LPE	0,82 ± 0,68	0,79 ± 0,40	0,81 ± 0,48	n.s.
PS/PI	3,34 ± 0,33 ^a	3,33 ± 0,90 ^a	1,62 ± 0,77 ^b	*
PE	3,57 ± 0,29	2,88 ± 0,99	2,73 ± 0,83	n.s.
Lípidos Neutros (Totales)	87,70 ± 0,77 ^a	87,79 ± 2,97 ^a	91,86 ± 2,39 ^b	*
MG	3,32 ± 0,42	3,81 ± 0,70	4,23 ± 1,16	n.s.
DG	4,51 ± 0,33	5,37 ± 1,01	4,43 ± 0,70	n.s.
CHO	5,28 ± 0,55 ^a	3,95 ± 1,15 ^b	4,26 ± 0,45 ^{ab}	*
FFA	15,50 ± 1,19	11,99 ± 2,40	15,16 ± 4,16	n.s.
TG	46,10 ± 3,04 ^a	52,23 ± 6,55 ^{ab}	58,87 ± 6,44 ^b	*
SE/WE	12,47 ± 1,24	12,47 ± 1,38	10,67 ± 2,12	n.s.
Carcasa				
Lípidos Polares (Totales)	67,10 ± 1,64 ^a	63,50 ± 1,16 ^b	61,64 ± 2,20 ^b	*
LPC	1,25 ± 0,47 ^a	0,94 ± 0,23 ^{ab}	0,75 ± 0,17 ^b	*
SM	2,11 ± 0,45	2,27 ± 0,20	2,52 ± 0,14	n.s.
PC	24,41 ± 1,03 ^a	22,40 ± 1,92 ^{ab}	21,32 ± 1,32 ^b	*
LPE	1,45 ± 0,53	1,39 ± 0,51	1,43 ± 0,16	n.s.
PS	8,30 ± 0,23	7,98 ± 0,72	8,46 ± 0,76	n.s.
PI	12,46 ± 0,71	12,50 ± 0,54	12,24 ± 0,81	n.s.
PE	17,13 ± 0,82	16,58 ± 0,80	16,25 ± 0,66	n.s.
Lípidos Neutros (Totales)	32,90 ± 1,64 ^a	36,50 ± 1,16 ^b	38,36 ± 2,19 ^b	*
MG	2,99 ± 0,42	3,37 ± 0,37	2,99 ± 0,25	n.s.
CHO	15,88 ± 0,46 ^a	15,79 ± 0,57 ^a	17,33 ± 0,22 ^b	*
FFA	5,22 ± 0,49 ^a	6,03 ± 0,87 ^a	7,50 ± 1,30 ^b	*
TG	1,10 ± 0,31 ^a	1,29 ± 0,40 ^a	2,92 ± 0,91 ^b	*
SE/WE	6,28 ± 0,87 ^a	9,60 ± 1,65 ^b	7,79 ± 0,66 ^{ab}	*

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PS/PI: Fosfatidilserina y Fosfatidilinositol PE: Fosfatidiletanolamina; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE/WE: Esteroles de colesterol y Ceras.

N.d. = no detectado; n.s. = no significativo; *P<0,05.

7.4. Discusión.

Se utilizaron tres dietas formuladas exclusivamente a base de ingredientes secos o liofilizados para la alimentación de *O. vulgaris*. Las dietas se formularon a partir de la

misma base (Morillo-Velarde et al., 2012a) y se diferenciaron en el porcentaje de aceite, por lo que las diferencias obtenidas en las tres dietas pueden atribuirse a este último. Se utilizó aceite de hígado de bacalao por ser una fuente rica en ácidos grasos esenciales de la serie omega 3 (EPA y DHA), componentes fundamentales de los peces y moluscos (Turchini et al., 2009).

Las tres dietas mostraron una buena aceptabilidad, a pesar de que su composición en macronutrientes fue diferente, correspondiéndose la mayor tasa absoluta de ingesta y crecimiento con la dieta A0. Los valores de ingesta en peso seco obtenidos para la dieta A0 también fueron superiores respecto de otras dietas experimentales (Cerezo Valverde et al., 2008; Estefanell et al. 2011a, Morillo-Velarde et al., 2012a) y a las estimadas en condiciones similares para dietas naturales a base de pescado (Aguado-Giménez y García García, 2002; García García y Aguado-Giménez, 2002), sugiriendo la utilidad del formato empleado para este tipo de experimentos. No obstante, fue destacable la importante disminución de la ingesta y crecimiento durante el segundo mes del experimento, hecho que se acentúa en las dos dietas con mayor contenido lipídico. Estos resultados pueden sugerir un mal balance nutritivo o bien un efecto progresivo de rechazo/aversión hacia el pienso. Este fenómeno ya se ha observado en otros trabajos que emplean dietas artificiales, donde los animales tienden a disminuir su tasa de ingesta después de varias semanas cuando son alimentados con un solo tipo de pienso (Domingues et al., 2007; Quintana et al., 2008) y sugiriendo la necesidad de alternar distintas dietas para obtener mejores resultados durante el engorde.

En referencia al efecto del distinto contenido de grasa sobre el crecimiento, se observaron peores resultados en individuos alimentados con las dietas formuladas con mayor contenido de grasa (28,6 y 38,6% lípidos SS y TAAL de 2,1 y 3,3 g/día para las dietas A10 y A20, respectivamente; ver Fig. 2) en comparación con la dieta A0 (13,8% lípidos SS; TAAL 1,0 g/día). Cerezo Valverde et al. (2012c) obtuvieron mejor crecimiento en dietas formuladas con un 30-33% de lípidos SS con TAAL similares (1,2-1,4 g/día) respecto de otras con un 4-5% lípidos SS (TAAL 0,2 g/día). Estefanell et al. (2011a) obtuvieron excelentes resultados usando *B. boops* de descarte de jaulas marinas aglutinada con alginatos (26,3% lípidos SS; TAAL de 1,5 g/día) en comparación con una dieta que empleaba *B. boops* de pesquerías artesanales (6,2% lípidos SS; TAAL de 0,2 g/día; Fig. 2) y sugiriendo una elevada eficacia en la utilización de los lípidos de la dieta. Por lo tanto, estos estudios coinciden en que

aunque los porcentajes de grasa de la dieta puedan variar, las TAAL finales donde se obtienen los mejores resultados están comprendidos entre 1 y 1,5 g/día para dietas formuladas, correspondiéndose con porcentajes del 13-27% lípidos SS. Igualmente, estos resultados sugieren la necesidad de tener en cuenta el grado de aceptabilidad de la dieta para fijar los porcentajes de grasa.

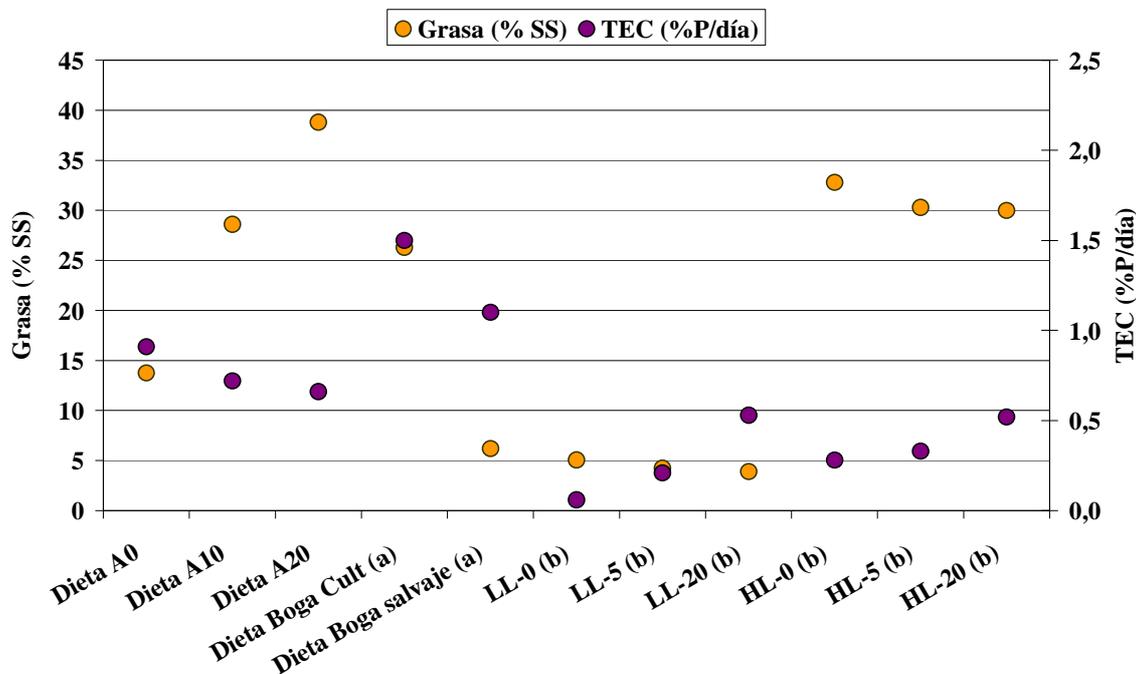


Figura 2. Contenido de grasa (% SS) y tasa específica de crecimiento (TEC, %P/día) en las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20) y otras dietas experimentales: (a) Estefanell et al., 2011a, (b) Cerezo Valverde et al., 2012c.

El efecto en dietas naturales fue variable. Los mejores crecimientos fueron obtenidos con dietas bajas o moderadas en grasa (2,4-18,7% SS; ver Fig. 3), pero que mostraron tasas de ingesta elevadas y, por lo tanto, TAAL moderadas (0,2-1,8 g/día). Los mejores resultados de crecimiento fueron obtenidos por García García y Cerezo Valverde et al., (2006) con dietas naturales de cangrejo (2,4% lípidos S; TAAL 0,5 g/día) y con dietas mixtas de pescado y cangrejo (4,1-11,7% lípidos SS; TAAL 0,7-1,3 g/día), coincidiendo con los parámetros descritos para dietas formuladas. Estefanell et al. (2011a) obtuvo también buenos resultados con boga salvaje (4,6% lípidos SS; TAAL 0,2 g/día) y boga de descarte (18,7% lípidos SS; 1,8 g/día), pero con peores valores al aumentar el contenido lipídico de la boga (46,5% lípidos SS; TAAL 5,4 g/día; Estefanell et al., 2011b). Estas diferencias podrían ser debidas a la distinta composición

lipídica y contenido en proteína que poseen las dietas naturales según su procedencia (Estefanell et al., 2010).

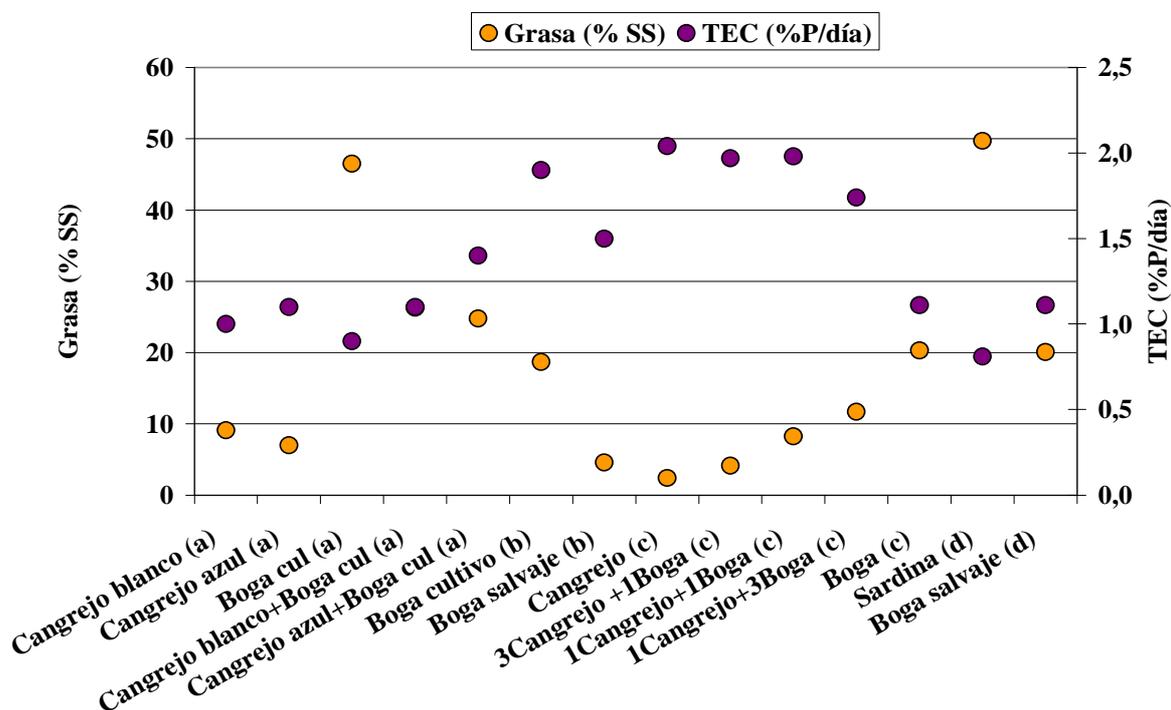


Figura 3. Contenido de grasa (% SS) y tasa específica de crecimiento (TEC, %P/día) en distintas dietas naturales: (a) Estefanell et al., 2011b, (b) Estefanell et al., 2011a, (c) García García y Cerezo Valverde, 2006, (d) García García y Aguado-Giménez, 2002.

En nuestros resultados destacó el elevado aprovechamiento nutritivo de la dieta A0 (IEA del 60,3%) respecto de otras dietas naturales y experimentales (<55% en dietas naturales; García García y Cerezo Valverde et al., 2006; Biandolino et al., 2010; Prato et al., 2010; Estefanell et al., 2011b; <28% en dietas experimentales; Cerezo Valverde et al., 2008; Quintana et al., 2008; Cerezo Valverde et al., 2012c). Los valores de PPV y de LPV para la dieta A0 fueron moderados (27,39% y 14,09%, respectivamente) con valores de PPV similares a los obtenidos con cangrejo (28%), pero inferiores a los de dietas mixtas de boga y cangrejo (33%) y boga (36%) (García García y Cerezo Valverde, 2006). Estos resultados pueden ser debidos a que la principal fuente proteica de nuestros piensos formulados fue la gelatina, cuya proteína es deficiente en la mayoría de aminoácidos esenciales y no esenciales (Karim y Rajeev Bhat et al., 2009) en comparación con el contenido de aminoácidos de *O. vulgaris* (Cerezo Valverde et al., 2012b). Por lo tanto, se podría continuar investigando en la línea de formulación de estos piensos suplementados con aminoácidos puros o materia primas concretas para mejorar el rendimiento de la proteína (Cerezo Valverde et al., 2012b).

La digestibilidad de la proteína de las dietas se mantuvo por encima del 95% en todos los casos, coincidiendo con los valores obtenidos para dietas naturales (Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007; Sánchez et al., 2009) y experimentales (Seiça Neves et al., 2010; Morillo-Velarde et al., 2012a), e indicando la elevada capacidad enzimática de *O. vulgaris* para la digestión de estos nutrientes (Boucher-Rodoni, 1982; Aguila et al., 2007; Hamdan et al., 2007). Estos resultados apuntan a que los CDAPROT no se vieron afectados de forma significativa por el porcentaje lipídico que contenía la dieta (Fig. 4). Por el contrario, los CD de los lípidos fueron variables. Sólo la dieta A0 con un contenido de 13,7% lípidos SS obtuvo altos CDALIP (81,25%), disminuyendo drásticamente hasta el 12,3% cuando la dieta contiene un 38,8% lípidos (Fig. 5) y provocando también la disminución de la CDAMS (Fig. 6). Estos resultados apuntan a que los pulpos tienen una capacidad limitada para la digestión y catabolización de lípidos, coincidiendo con otros estudios previos en cefalópodos (Ballantyne et al., 1981; Mommsen y Hochachka, 1981; O'Dor et al., 1984; Lee, 1994).

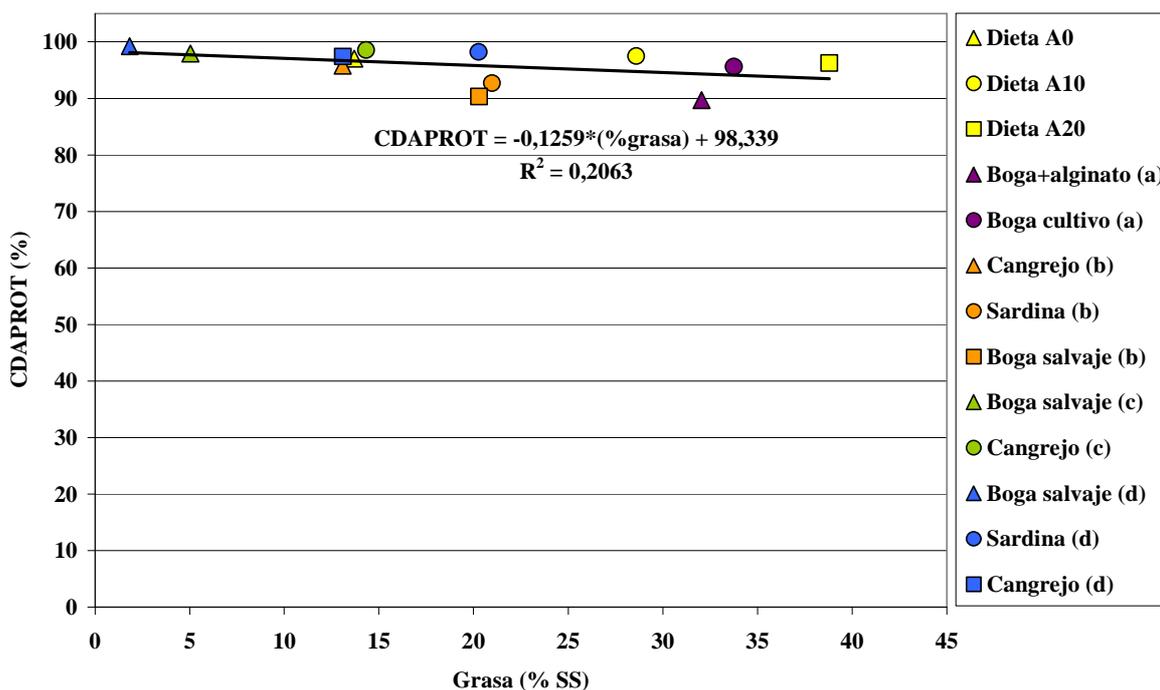


Figura 4. Coeficientes de digestibilidad de las proteínas (CDAPROT%) en función del porcentaje de grasa de la dieta (% SS) para las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20) y otras dietas experimentales: (a) Seiça Neves et al., 2010, (b) Sánchez et al., 2009 (c) Mazón et al., 2007, (d) Hernández y García García, 2004.

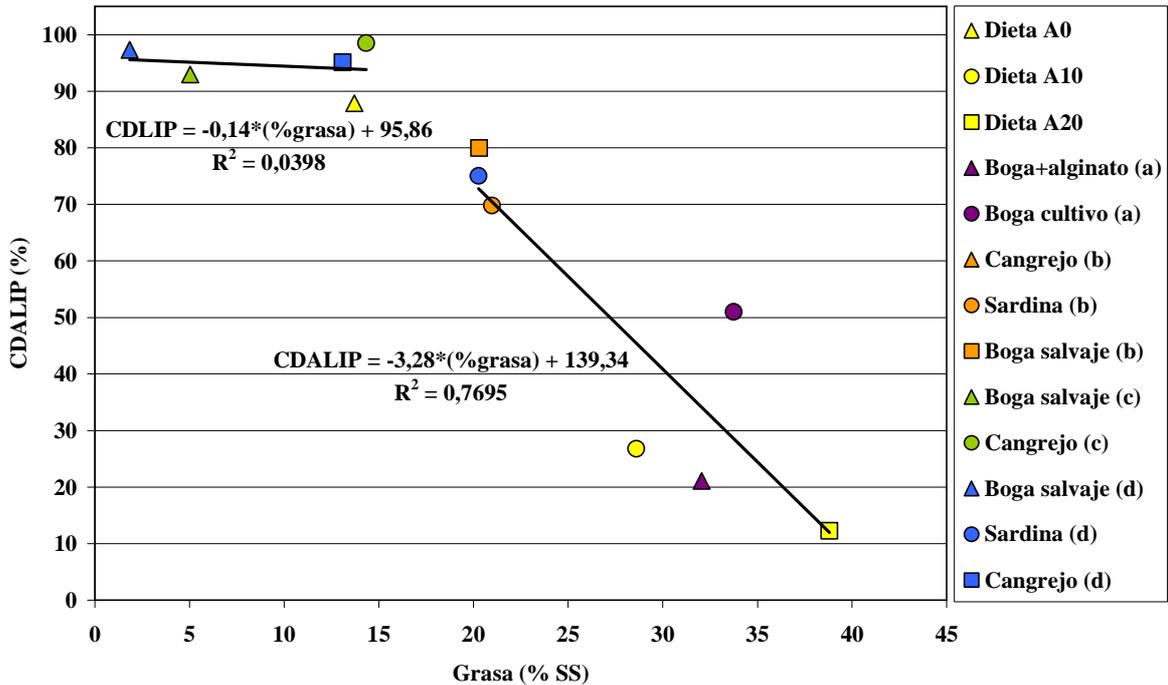


Figura 5. Coeficientes de digestibilidad de los lípidos (CDALIP%) en función del porcentaje de grasa de la dieta (%SS) para las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20) y otras dietas experimentales: (a) Seïça Neves et al., 2010, (b) Sánchez et al., 2009 (c) Mazón et al., 2007, (d) Hernández y García García, 2004.

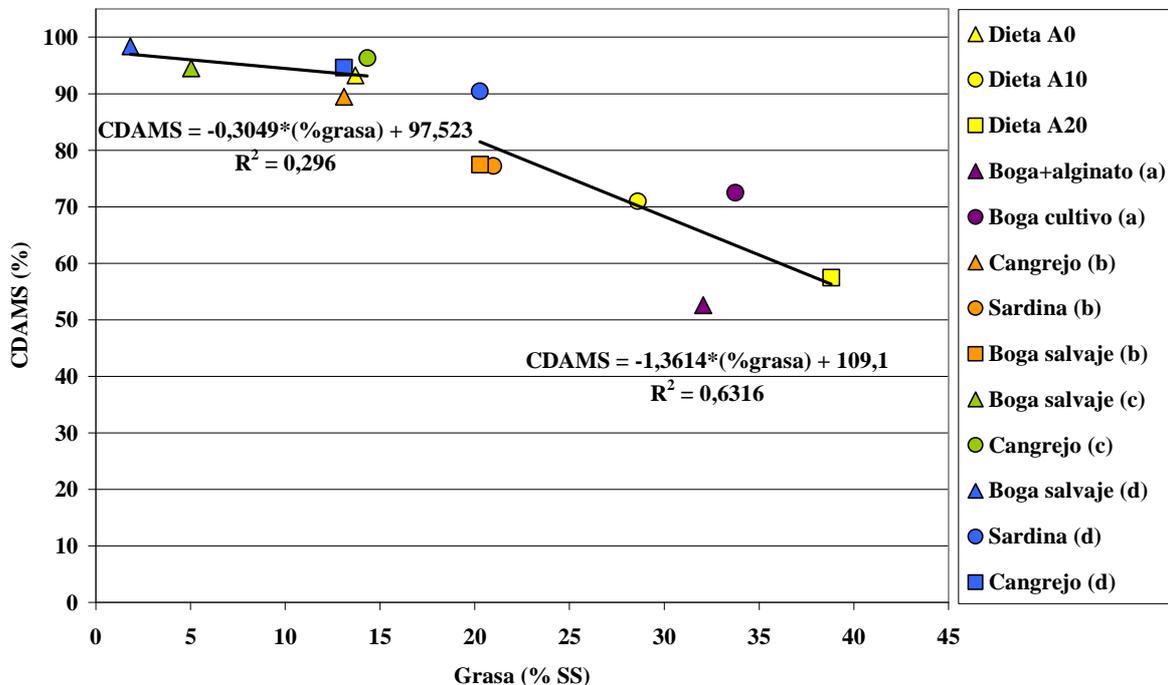


Figura 6. Coeficientes de digestibilidad de la materia seca (CDAMS%) en función del porcentaje de grasa de la dieta (% SS) para las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20) y otras dietas experimentales (a) Seïça Neves et al., 2010, (b) Sánchez et al., 2009 (c) Mazón et al., 2007, (d) Hernández y García García, 2004.

Además, fue destacable que conforme aumentó el contenido de grasa en la dieta disminuyó el coeficiente de digestibilidad de los lípidos neutros, llegando incluso a ser nula en MG y FFA en las dietas A10 y A20 (Fig. 1). Esta nula digestibilidad requiere una consideración más profunda y sugiere que la mayor parte de los triglicéridos de la dieta se habrían desdoblado en ácidos grasos libres y monoglicéridos, resultando su contenido en las heces superior al ingerido en las dietas. Por el contrario, los coeficientes de digestibilidad de los lípidos polares fueron elevados, pudiéndose atribuir a la presencia de los fosfolípidos en la dieta. Éstos podrían mejorar la emulsión lipídica e incrementar la eficacia del transporte de los ácidos grasos y lípidos del intestino al resto del organismo, aumentando la síntesis de lipoproteínas de *O. vulgaris*, como se ha sugerido en estudios con peces (Craig y Gatlin, 1997; Kasper y Brown, 2003; Tocher et al., 2008). Al respecto, la capacidad digestiva para estos nutrientes no se vio limitada. El papel predominante de los fosfolípidos en los tejidos de los cefalópodos (Sinanoglou y Miniadis-Meimaroglou, 1998; Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Cerezo Valverde et al., 2012a) y su movilización especialmente durante las fases de crecimiento (Morillo-Velarde et al., 2012b) sugiere que futuros estudios de engorde para *O. vulgaris* podrían usar dietas formuladas suplementadas con estas clases lipídicas.

Según nuestros resultados y comparándolos con los de otros autores (Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007; Sánchez et al., 2009; Seica Neves et al., 2010) los mejores CDALIP se obtienen con una dieta entre el 2-14% de grasa SS, ya que si aumentamos este porcentaje el CDALIP disminuye drásticamente. Estos resultados coinciden con los derivados del crecimiento observado en nuestro estudio, de donde se deduce que las dietas experimentales deberían contener menos del 14% lípidos SS para que el CDAMS no fuese menor del 90%, provocando la pérdida de gran cantidad de nutrientes por las heces (Figs. 5 y 6).

A diferencia de lo ocurrido en otros trabajos, donde la composición en la carcasa y en el animal completo de los pulpos fue más constante que en la glándula digestiva (Almansa et al., 2006; García-Garrido et al., 2010; Morillo-Velarde et al., 2012a), en este trabajo el porcentaje de las diferentes clases lipídicas en la carcasa sí se vio modificado con la dieta. En este estudio, aumentaron los LN de la carcasa, principalmente debido a la acumulación de colesterol, ácidos grasos libres y triglicéridos, y disminuyeron los LP como consecuencia de un aumento en la ingestión de lípidos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Morillo-Velarde et al. (2012b) donde se sugiere un transporte simultáneo de TG y CHO de la glándula

digestiva hacia las células musculares durante el ayuno, pero que según este estudio también podría verse incrementado con el aumento de la ingesta de lípidos. Estos resultados sugieren también que dietas con altos contenidos en lípidos pueden producir un trastorno metabólico y provocar modificaciones en la composición de los tejidos o una alteración en la forma de almacenamiento o transporte de los lípidos. El mayor contenido de grasa de las dietas A10 y A20 también quedó reflejado en el alto porcentaje de grasa en la glándula digestiva de los pulpos, resaltando el uso de este órgano como almacén de lípidos y energía (Sieiro et al., 2006; Cerezo Valverde et al., 2012c; Morillo-Velarde et al., 2012b).

Los resultados del presente estudio dan un gran paso en la elaboración de dietas formulada con fines comerciales para *O. vulgaris*. Por un lado, el formato empleado en este estudio ha tenido una alta aceptabilidad, correspondiéndose con altas tasa de ingesta y crecimiento. Por otro lado, se proponen tasas de ingesta de lípidos óptimas alrededor de 1 g/día y porcentajes apropiados de grasa alrededor del 13-14% SS en dietas formuladas. Un menor porcentaje de grasa en la dieta podría disminuir el rendimiento de la dieta y aumentar la utilización de proteína, mientras que un mayor porcentaje haría disminuir la digestibilidad de la dieta y podría ocasionar trastornos metabólicos asociados con un excesivo consumo de lípidos. Del presente estudio también se deriva el interés de llevar a cabo estudios futuros con dietas formuladas suplementadas con fosfolípidos, justificado por su elevada digestibilidad y su papel predominante en la composición de los tejidos de los cefalópodos. En este sentido, los porcentajes de grasa en la dieta de esta especie podrían variar en función de las clases lipídicas presentes en su composición.

8. CAPÍTULO VI:

Utilización eficaz de la glucosa frente al almidón en dietas formuladas semihúmedas para el pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Enviado (17/04/2003):

Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Aguado-Giménez, F., Hernández, M.D., García García, B., 2013. Effective use of glucose rather than starch in formulated semi-moist diets of common octopus (*Octopus vulgaris*). Aquaculture Nutrition.

8. CAPÍTULO VI: Utilización eficaz de la glucosa frente al almidón en dietas formuladas semihúmedas para el pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Resumen.

El objetivo de este trabajo fue comprobar la capacidad de utilización de carbohidratos simples (glucosa) o complejos (almidón) en *O. vulgaris*, suministrándole tres dietas semihúmedas. Una dieta sin carbohidratos añadidos (dieta C0: 50% de agua destilada, 20% de gelatina, 10% de yema de huevo en polvo, 5% *Sardinella aurita* liofilizada y 15% *Todarodes sagittatus* liofilizado) y otras dos dietas similares pero sustituyendo un 5% de *T. sagittatus* por glucosa (dieta GLU5) o por almidón (dieta ALM5). La dieta más estable y mejor aceptada fue la dieta ALM5 (TAR de 1,26% P/día) aunque no existieron diferencias en las tasas de crecimiento de las tres dietas (10,12 g/día, 9,37 g/día y 11,22 g día para las dietas C0, GLU5 y ALM5 respectivamente; $P > 0,05$). Los índices de aprovechamiento nutritivo fueron significativamente mejores en la dieta GLU5, destacando un valor productivo de proteína del 71,88% y un índice de conversión inferior a 1. La digestibilidad de la proteína y los lípidos fueron similares en las tres dietas (96-98% para las proteínas y 85-94 para los lípidos), sin embargo la digestibilidad de carbohidratos fue mayor en la dieta GLU5 (98%) respecto de las dietas C0 (84%) y ALM5 (0,33%). El porcentaje de carbohidratos aumentó en el músculo y la glándula digestiva como consecuencia del aumento en la ingestión de carbohidratos. Estos resultados demuestran la capacidad de utilización de la glucosa con fines energéticos en *O. vulgaris* permitiendo ahorrar y destinar mayor cantidad de proteína al crecimiento.

8.1. Introducción.

Los nuevos formatos de pienso desarrollados que son aceptados por el pulpo común (*Octopus vulgaris*) permiten elaborar dietas formuladas de composición conocida para avanzar en el conocimiento de sus requerimientos nutricionales (Quintana et al., 2008; Cerezo Valverde et al., 2008, 2012c; García et al., 2010; Estefanell et al., 2011; Morillo-Velarde et al., 2012b).

Los cefalópodos son exclusivamente carnívoros y utilizan preferentemente las proteínas como fuente de energía y para el crecimiento (Lee, 1994). No obstante, también se ha demostrado que tienen la capacidad de digerir, almacenar y utilizar carbohidratos (CH), proporcionando energía preferentemente para las actividades explosivas de carácter anaeróbico (Wells y Clarke, 1996), como podrían ser la captura de presas o la huida de depredadores, pero también en períodos de inanición (Morillo-Velarde et al., 2011a).

La glándula digestiva presenta fuerte actividad en la digestión de carbohidratos. En *Sepia*, las amilasas fueron detectadas en la lumina de los canales digestivos (Romijn, 1935; Boucaud-Camou, 1974) y, en pulpo y calamares, en las células de la glándula digestiva (Okutani y Kimata, 1964; D’Aniello y Scardi, 1971). Caruso et al. (2004) detectaron un gradiente descendente de amilasas desde las glándulas salivares hasta la glándula digestiva en *O. vulgaris* y *Sepia officinalis*.

En cuanto a su almacenamiento, los carbohidratos se han encontrado en cantidades variables y significativas en todos los tejidos de numerosas especies de cefalópodos y en particular en *O. vulgaris*, incluyendo la gónada (2,14% materia seca), el músculo (3,16% materia seca) y la glándula digestiva (3,47% materia seca) (Zamora y Olivares, 2004; Rosa et al., 2005; Morillo-Velarde et al., 2011a).

Recientemente, Morillo-Velarde et al. (2011a) han estimado que los carbohidratos contribuyen con el 9,9% del gasto energético diario de *O. vulgaris* durante el ayuno a corto plazo, de los cuales, el 8,6% proceden del músculo y el 1,3% de la glándula digestiva. El glucógeno podría ser recuperado rápido y directamente de la glucosa en circulación o de la glucogénesis de aminoácidos (Hochachka y Fields, 1982). Según O’Dor et al. (1984) los CH después de una comida son rápidamente catabolizados y sólo una pequeña cantidad sería acumulada como glucógeno muscular, siendo prácticamente inmune a su movilización en situaciones de ayuno.

El hecho de que los carbohidratos sean los constituyentes más baratos en la formulación de piensos para la acuicultura hace interesante estudiar la capacidad de utilización de estos nutrientes al incorporarlos en una dieta formulada. Este aspecto es especialmente relevante para una especie que basa su metabolismo en las proteínas. En este sentido, Morillo-Velarde et al. (2012a) demostraron una mala utilización de los carbohidratos procedentes del guisante en *O. vulgaris*, sugiriendo que los almidones presentaban una mala digestibilidad, aunque este hecho también podía deberse a la

presencia de inhibidores de las amilasas presentes en este ingrediente. Probablemente, la adición de almidones en su forma pura no presente este inconveniente siendo interesante comprobarlo.

El objetivo de este trabajo es comprobar la capacidad de utilización de los carbohidratos simples, en forma de glucosa, o complejos en forma de almidón, incorporándolos en dietas formuladas para el engorde de *O. vulgaris*, registrando los cambios que se producen en el crecimiento y composición nutricional de los animales y la digestibilidad de la dieta utilizando el formato de pienso propuesto por Morillo-Velarde et al. (2012a). Igualmente este estudio pretende responder a la pregunta si los bajos niveles de carbohidratos en los tejidos del pulpo se deben a su bajo contenido e ingesta en sus dietas naturales o son consecuencia de la baja capacidad para su almacenamiento.

8.2. Material y métodos.

8.2.1. Captura y aclimatación de los animales.

Los ejemplares de *O. vulgaris* se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) mediante arte de arrastre y se mantuvieron en tanques de 2000 l en el laboratorio. Los animales se aclimataron durante 2 semanas y se alimentaron con alacha (*Sardinella aurita*) y cangrejo (*Carcinus mediterraneus*) en días alternativos. Posteriormente los animales se trasladaron y mantuvieron individualmente en tanques circulares de 262 l en un sistema de recirculación de agua con control de la temperatura (Air Energy, Heat Pump Inc., Model 400 Ti) y filtración mecánica y biológica. Éstos contenían tubos de PVC como refugio, una red externa para evitar que se escaparan y una tela de rafia para evitar la luz directa. La temperatura se mantuvo constante ($19,11 \pm 0,74^{\circ}\text{C}$) dentro del rango óptimo para esta especie (Aguado-Giménez y García García, 2002), oxígeno superior al 80% de saturación para que este factor no fuera limitante (Cerezo Valverde y García García, 2005), fotoperiodo 12L:12D, salinidad 37‰, pH entre 7 y 8 y nitrógeno amoniacal total (TAN) inferior a 0,2 mg/l.

8.2.2. Elaboración y estabilidad de las dietas formuladas.

Se prepararon tres dietas diferentes. Una dieta control sin carbohidratos añadidos (dieta C0) y consistente en un 50% de agua destilada, 20% de gelatina como aglomerante, 10% de yema de huevo en polvo, 5% de liofilizado de alacha (*S. aurita*) y 15% de liofilizado de pota (*Todarodes sagittatus*). Las otras dos dietas eran similares pero sustituyendo un 5% de pota por glucosa (dieta GLU5) o por almidón (dieta ALM5).

Tabla 1. Composición en peso (%) de las dietas formuladas.

Dietas	Agua	Gelatina ^a	Yema ^b (Huevina)	Alacha ^c (<i>S. aurita</i>)	Pota ^c (<i>T. sagittatus</i>)	Glucosa ^d	Almidón de patata ^e	Total (%)
C0	50	20	10	5	15	0	0	100
GLU5	50	20	10	5	10	0	5	100
ALM5	50	20	10	5	10	5	0	100

^aGelatina granulada Bloom 220, Productos Sur, S.A. (Polígono Industrial Oeste, San Ginés, Murcia, España).

^bYema de huevo atomizada, Avícola San Isidro S.L. (Los Belones, Cartagena, Murcia, España).

^cIngredientes liofilizados.

^dGlucosa anhidra, Guinama S.L.U. (Alboraya, Valencia, España).

^eAlmidón de patata soluble, Panreac Química S.L.U. (Castellar del Vallés, Barcelona, España).

La pota y la alacha procedían de pesquerías artesanales de la misma zona que los pulpos. La pota y la alacha fueron limpiados de espinas y vísceras, y posteriormente triturados. Estos ingredientes se liofilizaron y se trituraron en un molinillo de café hasta obtener una textura de polvo fino (<200µm), se envasaron y conservaron al vacío. La yema de huevo, la gelatina, la glucosa y el almidón de patata se adquirieron en su forma comercial (Tabla 1). Para la elaboración de los piensos todos los ingredientes se mezclaron en un robot de cocina (Mycook® 1.8, Electrodomésticos Taurus, S.L. Lleida, España). Primero se disolvió la glucosa o el almidón y la gelatina en agua a 40°C, y posteriormente se fueron añadiendo los ingredientes restantes hasta su completa homogenización. La mezcla obtenida se dejó enfriar a 4°C en bandejas de aluminio durante 24 h, congelándose posteriormente hasta su uso.

La estabilidad en agua de ambas dietas se determinó a partir de la pérdida de la materia seca del pienso después de la inmersión en agua durante 24 horas. Con estos datos se obtuvo la media de los valores de los siguientes índices:

$VP (\%) = (Pf - Pi)/Pi*100$, expresa la variación del peso seco de las dietas después de ser sumergidas en agua, donde Pi y Pf son el peso seco inicial y final, respectivamente.

$F = Pi/Pf$, representa un factor de corrección. El peso seco del alimento no ingerido de las dietas fue multiplicado por este valor de corrección para tener en cuenta la disgregación del pienso.

8.2.3. *Diseño experimental.*

Finalizado el periodo de aclimatación, los animales se pesaron y sexaron formando 3 grupos experimentales de 7 individuos cada uno: grupo C0 (alimentado con dieta C0), grupo GLU5 (con dieta GLU5) y grupo ALM5 (con dieta ALM5). Se dispuso además de un grupo control (CI) formado por 3 individuos sacrificados al inicio del experimento. Todos los individuos fueron machos con el fin de evitar la influencia de los procesos reproductivos. Las dietas fueron suministradas durante 42 días (abril - junio 2012). Los pesos medios iniciales fueron de 751 ± 107 g (637-891 g) para el grupo C0, 883 ± 83 g (813-1013 g) para el grupo GLU5 y de 876 ± 64 g (753-953 g) para el grupo ALM5. La temperatura del agua osciló entre 17,7 y 21,0°C durante el periodo experimental ($19,1 \pm 0,7^\circ\text{C}$). Los piensos se pesaron y se administraron a saciedad, en un único trozo de forma cúbica, correspondiendo la primera toma al 5% del peso corporal de cada individuo y, posteriormente, reajustándose para que sobrepasase las demandas de cada ejemplar. Los pulpos eran alimentados a las 09:00 h, 6 días a la semana (García García y Cerezo Valverde, 2004, 2006), y el alimento sobrante se recogía a las 24 h con la ayuda de un pequeño salabre. El alimento sobrante fue desecado a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 h hasta peso constante (AOAC 1997; Método nº 930.15) para calcular la ingesta diaria de cada individuo. El último día de experimentación todos los animales fueron pesados y anestesiados por inmersión en agua de mar helada antes del sacrificio conforme con los principios de la Directiva 2010/63/EU.

8.2.4. *Recogida y conservación de las muestras.*

Una vez finalizado el experimento, se procedió a la disección de los ejemplares de cada grupo. En 3 de ellos se obtuvo la glándula digestiva y la carcasa (resto del individuo menos la glándula digestiva), y de los 4 restantes la glándula digestiva y el tejido muscular (tres patas y parte del manto) con sus correspondientes pesos. Este procedimiento fue necesario para obtener las analíticas de la composición de los animales completos, a partir de los resultados de la glándula digestiva y la carcasa. Cada una de estas partes se trituró y mezcló hasta obtener una mezcla homogénea, se envasó al vacío y se congeló a -20°C antes de proceder a los análisis bioquímicos.

Las heces fueron recogidas diariamente con la ayuda de un pequeño salabre y se conservaron en el ultracongelador a -80°C . Posteriormente se liofilizaron (Heto, PowerDry LL3000), obteniendo un total de 70 g, 87 g y 136 g de heces de los animales alimentados con las dietas C0, GLU5 y ALM5, respectivamente. Todas las heces de cada grupo fueron recogidas conjuntamente para conseguir la cantidad necesaria para su análisis.

8.2.5. *Método analítico.*

Se analizaron por duplicado tanto las dietas formuladas como las muestras de pulpo, obteniendo la humedad, cenizas, proteínas y lípidos. Se utilizó 1 g de muestra para la humedad, ceniza y proteína, 2 g de muestra para los lípidos y 0,05 g de muestra liofilizada en el caso de los carbohidratos. La humedad fue obtenida por desecación a $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h hasta peso constante (AOAC 1997; Método n° 930.15) y las cenizas por incineración a $450 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h en un horno Mufla (HOBERSAL, HD-230). El contenido proteico fue determinado por el método Kjeldhal usando un factor de conversión de 6,25. El contenido de lípidos fue obtenido mediante éter etílico en un extractor SOXTEC AVANTI 2058 (AOAC, 1997; Método n° 920.39) y los carbohidratos totales por el método de Dubois et al. (1956). La energía y la relación proteína energía (P/E en MJ) fueron estimados usando los coeficientes de energía de Miglavs y Jobling (1989): proteína 23,6 kJ/g, lípidos 38,9 kJ/g y carbohidratos 16,7 kJ/g.

Los macronutrientes en el animal completo se calcularon sumando el contenido del nutriente (N) en la glándula digestiva con el contenido en la carcasa:

$$N \text{ total} = [((PGD * \%NGD) + (PCA * \%NCA)) * 100] / PT$$
, donde N es el % de nutriente considerando el animal completo, PGD el peso de la glándula digestiva, PCA el peso de la carcasa, NGD el porcentaje del nutriente en la glándula digestiva, NCA el porcentaje del nutriente en la carcasa y PT el peso total del individuo.

8.2.6. Determinación de la digestibilidad.

El coeficiente de digestibilidad aparente fue calculado para la materia seca (CDAMS), la proteína (CDAPROT), los lípidos (CDALIP) y los carbohidratos (CDACH) usando la ecuación estándar de Maynard y Loosli (1969):

$$CDA = 100 - (100 * \%M_{dieta} / \%M_{heces}) * (\%N_{heces} / \%N_{dieta})$$
, donde M es el marcador inerte y N los nutrientes. Como marcador inerte se emplearon las cenizas insolubles en ácido (CIA), determinadas según el método descrito por Atkinson et al. (1984). Tanto para las heces como para las dietas liofilizadas se utilizaron 1 g para obtener la humedad, 3-5 g cenizas insolubles en ácido (CIA), 0,1 g para proteínas, 0,2 g para lípidos y 0,05 g para carbohidratos, realizando los análisis por triplicado.

8.2.7. Parámetros calculados y análisis de los datos.

Todos los ejemplares fueron pesados al inicio (P_i es el peso inicial en g) y al final del experimento (P_f es el peso final en g). Los parámetros calculados fueron los siguientes: Peso medio: $P_m (g) = (P_i + P_f) / 2$; Incremento de peso: $IP (g) = P_f - P_i$; Tasa de alimentación absoluta: $TAA (g/día) = AC / días$; Tasa de alimentación absoluta de proteína: $TAAP (g/día) = (TAA * \%Proteína \text{ dieta}) / 100$; Tasa de alimentación absoluta de lípidos: $TAAL (g/día) = (TAA * \%Lípidos \text{ dieta}) / 100$; Tasa de alimentación absoluta de carbohidratos: $TAAC (g/día) = (TAA * \%Carbohidratos \text{ dieta}) / 100$; Tasa de alimentación relativa: $TAR (\%P/día) = (TAA / P_m) * 100$; Tasa de crecimiento absoluto: $TCA (g/día) = IP / días$; Tasa específica de crecimiento: $TEC (\%P/día) = [(\ln P_f - \ln P_i) / días] * 100$; Índice de eficacia alimentaria: $IEA (\%) = (IP / AC) * 100$; Índice de conversión: $IC = AC / IP$; Valor productivo de la proteína: $PPV (\%) = (Proteína \text{ retenida} /$

Proteína ingerida)*100; Valor productivo de los lípidos: LPV (%) = (Lípidos retenidos/ Lípidos ingeridos)*100; Valor productivo de los carbohidratos: CPV (%) = (Carbohidratos retenidos/ Carbohidratos ingeridos)*100; Índice de la glándula digestiva: IGD (%) = PGD/Pf)*100, donde PGD es el peso de la glándula digestiva en g y AC es el alimento consumido en g corregido teniendo en cuenta la tasa de disgregación en el agua y calculado según la fórmula:

$$AC = (\text{Alimento suministrado ss} - \text{Alimento sobrante ss} * F) + (\text{Alimento ingerido ss} * (\% \text{ Humedad dieta} / \% \text{ ss dieta}))$$
, con valores de F de 1,02, 1,72 y 1,14 para las dietas C0, GLU5 y ALM5, respectivamente.

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm la desviación estándar (D.E.). Para analizar las diferencias se llevo a cabo un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias significativas obtenidas entre los valores medios fueron analizadas por el test de Tukey, estableciendo un nivel de significación de $P < 0,05$. Los porcentajes y los índices fueron transformados aplicando el logaritmo neperiano antes de hacer el ANOVA.

8.3. Resultados.

Las dietas presentaron una textura firme antes de sumergirlas en agua. La dieta C0 perdió un 1,75%, la dieta GLU5 perdió un 41,9% y la dieta ALM5 un 12,3% de su peso seco después de permanecer 24 h en agua, siendo la dieta C0 la más estable. Existieron diferencias significativas en los porcentajes de todos los macronutrientes analizados en las dietas, con porcentajes menores de proteína y cenizas y mayores de lípidos y carbohidratos en las dietas enriquecidas con carbohidratos (GLU5 y ALM5) respecto a la dieta C0 ($P < 0,05$; Tabla 2). El contenido energético fue similar en todas las dietas (2487-2551 kJ/100g), mientras que la relación P/E (g/MJ) fue menor en las dietas GLU5 y ALM5 respecto de la dieta C0 (Tabla 2).

Tabla 2. Composición en macronutrientes (% peso seco) de las dietas formuladas sin carbohidratos añadidos (C0), con un 5% de glucosa (GLU5) y con un 5% de almidón (ALM5).

	C0	GLU5	ALM5	P
Humedad	53,32 ± 0,73 ^a	56,00 ± 0,11 ^b	53,76 ± 1,17 ^a	*
Proteínas	81,57 ± 0,61 ^a	72,70 ± 0,23 ^b	71,11 ± 0,87 ^b	*
Lípidos	13,77 ± 0,62 ^a	16,99 ± 1,10 ^b	17,11 ± 1,12 ^b	*
Cenizas	4,38 ± 0,09 ^a	3,64 ± 0,04 ^b	3,70 ± 0,03 ^b	*
Carbohidratos	1,96 ± 0,94 ^a	10,43 ± 2,79 ^b	10,08 ± 3,93 ^b	*
CIA ^a	0,084 ± 0,004 ^a	0,051 ± 0,008 ^b	0,086 ± 0,006 ^a	*
Energía (kJ/100g)	2487	2551	2512	-
P/E (g/MJ) ^b	32,80	28,50	28,30	-

^aCIA = Cenizas insolubles en ácido.

^bP/E = Relación proteína/energía.

Datos expresados como la media ± D.E.; valores en la misma línea con distintos superíndices son significativamente diferentes (n.s.= no significativo (P>0,05), *P<0,05).

Todos los animales aceptaron las dietas con una supervivencia del 100%. No hubo diferencias significativas ni en los pesos medios iniciales ni finales de los 3 grupos, siendo el IP entre 393 g (GLU5) y 471 g (ALM5) en los 42 días que duró el experimento (P>0,05; Tabla 3). La dieta mejor aceptada fue la dieta ALM5, con TAR de 1,26 ± 0,15%P/día. Igualmente, la dieta ALM5 mostró tasas absolutas de ingesta (TAA, TAAP, TAAL, TAAC) significativamente superiores respecto de los grupos alimentados con las dietas C0 y GLU5 (P<0,05; Tabla 3). Los índices de aprovechamiento nutritivo (IEA, IC, PPV y CPV) fueron significativamente mejores en la dieta GLU5 respecto de ALM5, destacando un PPV del 71,88% e índices de conversión inferiores a 1. Por el contrario, no se obtuvieron diferencias significativas en el CPV de las dietas GLU5 y ALM5, aunque ambos grupos mostraron valores superiores respecto del grupo C0. Tampoco existieron diferencias en el IGD (P>0,05; Tabla 3).

Tabla 3. Índices de crecimiento y aprovechamiento nutritivo de los pulpos alimentados con las dietas formuladas sin carbohidratos añadidos (C0), con un 5% de glucosa (GLU5) y con un 5% de almidón (ALM5).

	n	C0	GLU5	ALM5	P
Pi (g)	7	797 ± 92	899 ± 65	876 ± 64	n.s.
Pf (g)	7	1222 ± 157	1293 ± 92	1347 ± 72	n.s.
IP (g)	7	425 ± 69	393 ± 61	471 ± 40	n.s.
TAA (g/día)	7	10,10 ± 0,85 ^a	8,10 ± 1,29 ^b	13,99 ± 2,14 ^c	*
TAAP (g/día)	7	3,85 ± 0,32 ^a	2,70 ± 0,43 ^b	4,82 ± 0,74 ^c	*
TAAL (g/día)	7	0,62 ± 0,05 ^a	0,61 ± 0,10 ^a	1,11 ± 0,17 ^b	*
TAAC (g/día)	7	0,08 ± 0,01 ^a	0,37 ± 0,06 ^b	0,65 ± 0,10 ^c	*
TAR (%P/día)	7	1,01 ± 0,12 ^a	0,74 ± 0,12 ^b	1,26 ± 0,15 ^c	*
TCA (g/día)	7	10,12 ± 1,63	9,37 ± 1,45	11,22 ± 0,96	n.s.
TEC (%P/día)	7	1,02 ± 0,07 ^a	0,86 ± 0,12 ^b	1,03 ± 0,08 ^a	*
IEA (%)	7	100,08 ± 13,38 ^{ab}	116,98 ± 18,25 ^a	81,93 ± 15,18 ^b	*
IC	7	1,01 ± 0,13 ^{ab}	0,87 ± 0,14 ^a	1,26 ± 0,23 ^b	*
PPV (%)	3	45,52 ± 8,44 ^a	71,88 ± 4,37 ^b	37,50 ± 6,07 ^a	*
LPV (%)	3	17,00 ± 13,38	12,45 ± 24,63	17,08 ± 7,78	n.s.
CPV (%)	3	6,45 ± 4,28 ^a	37,89 ± 5,16 ^b	17,10 ± 7,99 ^{ab}	*
IGD (%)	7	6,01 ± 0,81	6,45 ± 1,16	6,73 ± 1,01	n.s.

Pi = peso inicial; Pf = peso final; IP = incremento de peso; TAA = tasa de alimentación absoluta; TAAP = tasa de alimentación absoluta de proteínas; TAAL = tasa de alimentación absoluta de lípidos; TAAC = tasa de alimentación absoluta de carbohidratos; TAR = tasa de alimentación relativa; TCA = tasa de crecimiento absoluta; TEC = tasa específica de crecimiento; IEA = índice de eficacia alimentaria; IC = índice de conversión absoluta; PPV = valor productivo de la proteína; LPV = valor productivo de los lípidos; CPV = valor productivo de los carbohidratos; IGD = índice de la glándula digestiva.

Datos expresados como la media ± D.E.; valores en la misma línea con superíndices diferentes son significativamente diferentes (n.s.= no significativo (P>0,05), *P<0,05).

Las diferencias en la composición de las heces de los tres grupos fueron significativas para todos los macronutrientes analizados (P<0,05; Tabla 4), destacando el elevado porcentaje de carbohidratos en las heces de la dieta ALM5 (46,87%) frente a la dieta C0 (4,39%) y la dieta GLU5 (4,62%; P<0,05). Los valores de CDAMS y CDACH para la dieta GLU5 fueron superiores respecto de las dietas C0 y ALM5, detectándose en esta última el valor más bajo para CDACH (0,33%). Los CDAPROT y CDALIP fueron similares en las tres dietas (96-98% y 85-94%, respectivamente; Tabla 4).

Tabla 4. Composición de las heces liofilizadas (% peso seco) y coeficientes de digestibilidad de las distintas dietas formuladas sin carbohidratos añadidos (C0), con un 5% de glucosa (GLU5) y con un 5% de almidón (ALM5).

	C0	GLU5	ALM5	P
Humedad	7,91 ± 0,39 ^a	3,24 ± 0,29 ^b	8,03 ± 0,12 ^a	*
Proteínas	32,48 ± 1,01 ^a	27,33 ± 0,26 ^b	13,70 ± 0,93 ^c	*
Lípidos	21,14 ± 0,91 ^a	19,94 ± 0,24 ^a	7,42 ± 1,76 ^b	*
Cenizas	30,85 ± 0,11 ^a	40,08 ± 0,10 ^b	15,33 ± 0,12 ^c	*
Carbohidratos	4,39 ± 5,03 ^a	4,62 ± 4,16 ^a	46,87 ± 10,37 ^b	*
CIA ^a	1,173 ± 0,392 ^a	0,918 ± 0,067 ^a	0,401 ± 0,044 ^b	*
CDACH ^b	83,91	97,56	0,33	-
CDAPROT ^c	96,09	97,91	95,87	-
CDALIP ^d	84,57	93,48	90,71	-
CDAMS ^e	90,52	94,44	78,55	-

^aCIA = Cenizas insolubles en ácido.

^bCDACH= Coeficiente de digestibilidad aparente de los carbohidratos.

^cCDAPROT= Coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína.

^dCDALIP= Coeficiente de digestibilidad aparente de los lípidos.

^eCDAMS= Coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca.

Datos expresados como la media ± D.E.; valores en la misma línea con superíndices diferentes son significativamente diferentes (n.s.= no significativo (P>0,05), *P<0,05).

La composición nutricional de los animales se vio afectada por la dieta (Tabla 5). En la glándula digestiva, el grupo alimentado con la dieta GLU5 mostró porcentajes significativamente mayores en proteínas (55,09%) respecto de los alimentados la dieta ALM5 (41,30%; P<0,05). Además, los animales alimentados con las dietas GLU5 y ALM5 obtuvieron valores significativamente más altos de carbohidratos que con la dieta C0. Tanto en el músculo como en la carcasa los grupos alimentados con la dieta GLU5 y ALM5 mostraron un porcentaje significativamente menor en lípidos y mayor en carbohidratos respecto del alimentado con la dieta C0 (P<0,05; Tabla 5). Al comparar el animal completo, sólo se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos, siendo mayor en los animales alimentados con las dietas GLU5 (4,89%) y ALM5 (3,94%) que con la dieta C0 (1,69%) y en el contenido de cenizas siendo menor en animales alimentados con la dieta ALM5 respecto a las dietas GLU5 y C0 (P<0,05; Tabla 5).

Tabla 5. Composición en macronutrientes (% peso seco) de las distintas fracciones del pulpo alimentados con dietas formuladas sin carbohidratos añadidos (C0), con un 5% de glucosa (GLU5) y con un 5% de almidón (ALM5).

	C0	GLU5	ALM5	P
Glándula Digestiva (n=7)				
Humedad	60,57 ± 2,74	63,47 ± 3,26	62,54 ± 1,87	n.s.
Proteínas	50,68 ± 9,66 ^{ab}	55,09 ± 5,03 ^a	41,30 ± 2,69 ^b	*
Lípidos	35,07 ± 11,89	29,90 ± 4,95	37,92 ± 9,98	n.s.
Ceniza	3,37 ± 0,55 ^a	3,17 ± 0,63 ^a	5,02 ± 0,40 ^b	*
Carbohidratos	2,07 ± 0,52 ^a	3,85 ± 0,94 ^b	4,07 ± 1,04 ^b	*
Músculo (n=4)				
Humedad	80,13 ± 0,43 ^a	79,64 ± 0,65 ^a	81,55 ± 0,52 ^b	*
Proteínas	80,35 ± 1,64	77,9 ± 1,49	82,16 ± 4,60	n.s.
Lípidos	1,47 ± 0,55 ^a	0,19 ± 0,14 ^b	0,18 ± 0,08 ^b	*
Ceniza	10,27 ± 0,47 ^a	9,45 ± 0,52 ^a	5,76 ± 0,25 ^b	*
Carbohidratos	2,16 ± 0,44 ^a	4,31 ± 1,20 ^b	3,99 ± 0,51 ^b	*
Carcasa (n=3)				
Humedad	81,26 ± 0,38	79,55 ± 0,97	80,27 ± 1,37	n.s.
Proteínas	80,48 ± 3,95	75,04 ± 2,47	80,36 ± 3,98	n.s.
Lípidos	0,74 ± 0,08 ^a	0,26 ± 0,17 ^b	0,30 ± 0,13 ^b	*
Ceniza	11,43 ± 0,41 ^a	9,62 ± 0,38 ^b	4,87 ± 0,06 ^c	*
Carbohidratos	1,48 ± 0,46 ^a	5,38 ± 0,69 ^b	4,04 ± 1,33 ^b	*
Animal Completo (n=3)				
Humedad	80,08 ± 0,59	78,57 ± 1,13	78,99 ± 1,28	n.s.
Proteínas	77,83 ± 4,21	73,31 ± 2,18	75,42 ± 3,51	n.s.
Lípidos	3,34 ± 1,01	2,61 ± 1,77	4,58 ± 1,08	n.s.
Ceniza	10,46 ± 0,52 ^a	8,96 ± 0,51 ^a	5,50 ± 1,11 ^b	*
Carbohidratos	1,69 ± 0,37 ^a	4,92 ± 0,35 ^b	3,97 ± 1,24 ^b	*

Datos expresados como la media ± D.E.; valores en la misma línea con superíndices diferentes son significativamente diferentes (n.s.= no significativo (P>0,05), *P<0,05).

8.4. Discusión.

El interés de las sustitución de proteínas por carbohidratos en los piensos destinados a la acuicultura ha sido ampliamente estudiado en peces (Fernández et al., 2007; Árnason et al., 2009), aunque actualmente no existen datos en cefalópodos debido al reciente desarrollo de los piensos para estas especies. En diferentes estudios de peces se ha ido ajustando el porcentaje de proteína y carbohidratos para conseguir el máximo ahorro de la proteína y obtener el máximo crecimiento (Rao, 1987; Erfanullah et al., 1995). Al igual que en las dietas de peces, la proteína es el macronutriente más caro en

la dieta, por lo que es importante mantener el contenido de proteína en el valor mínimo que soporte máximo crecimiento para reducir el coste del alimento. Por lo tanto, el contenido de carbohidratos en la dieta debería establecerse en futuros estudios en el engorde de pulpo para optimizar el rendimiento de la dieta.

En el presente estudio las tres dietas formuladas se diferenciaron en la cantidad y complejidad de los carbohidratos añadidos, por lo que las diferencias obtenidas en las tres dietas pueden atribuirse a los carbohidratos. Las tres dietas mostraron una buena aceptabilidad, correspondiéndose las mayores tasas absolutas de ingesta a la dieta ALM5. Los valores de ingesta en peso seco obtenidos para la dieta ALM5 (6,47 g/día) fueron similares a las obtenidas con otras dietas con formato semejante (Morillo-Velarde et al., 2012a) y mejores a las obtenidas con dietas extrusionadas (Querol et al., 2012a, b). Este resultado podría deberse a que el almidón incrementa la viscosidad y el proceso de gelificación a baja temperatura (Thomas et al., 1998), proporcionando a la dieta una buena estabilidad y textura, mejorando así la palatabilidad de la dieta.

En referencia al efecto del contenido de carbohidratos de la dieta sobre el crecimiento, se observaron valores similares en los individuos alimentados con la dieta control (C0, 82:2 proteína/carbohidratos) y los alimentados con dietas enriquecidas con carbohidratos (GLU5, 73:10 proteína/carbohidratos; ALM5, 71:10 proteína/carbohidratos) a pesar de las mayores ingestas de la dieta ALM5, sugiriendo un mejor aprovechamiento nutritivo de las dietas C0 y GLU5.

En nuestros resultados destacó el elevado aprovechamiento nutritivo de la dieta con glucosa respecto de la dieta con almidón o sin carbohidratos añadidos. Los valores de PPV para la dieta GLU5 fueron elevados (71,88%) y superiores respecto de los obtenidos con dietas a base de cangrejo (28%), dietas mixtas de peces y cangrejo (33%) y peces (36%) (García García y Cerezo Valverde, 2006), sugiriendo un buen aprovechamiento de los carbohidratos y un ahorro de la proteína del 25-30% de la dieta. Estos resultados fueron acompañados de elevados coeficientes de digestibilidad en la dieta GLU5, coincidiendo con los valores obtenidos para dietas naturales de boga, sardina y cangrejo (Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007), pero superiores respecto de otras dietas experimentales (Seiça Neves et al., 2010; Morillo-Velarde et al., 2012a), donde usan la misma metodología que en este trabajo. Por el contrario, los pulpos no fueron capaces de digerir y absorber bien el almidón de la dieta ALM5, quedando reflejado en el elevado porcentaje de carbohidratos en las heces

(47%). O'Dor et al. (1984) observaron una digestibilidad de la glucosa pura del 98% en *O. vulgaris*. Sin embargo, según nuestros resultados, cuando los pulpos se alimentaron con la dieta ALM5 se obtuvo una fuerte reducción en el coeficiente de digestibilidad de la materia seca (94% al 79%) y carbohidratos (98% al 0,3%), sugiriendo que el almidón no es bien digerido por el sistema digestivo de *O. vulgaris*. En estudios anteriores se obtuvo una mala utilización de los carbohidratos procedentes del guisante en *O. vulgaris* (Morillo-Velarde et al., 2012a), lo que podía deberse a la presencia de ciertos factores antinutricionales e inhibidores de las amilasas (Carmona et al., 1991; Trago et al., 2000) o bien a la mala digestibilidad del almidón. Sin embargo, el almidón puro utilizado en este trabajo no presenta estos factores antinutricionales y la digestibilidad ha sido muy baja, sugiriendo que *O. vulgaris* no es capaz de digerir bien el almidón de patata en las cantidades utilizadas (5% peso de la dieta). Por lo tanto, el grado de complejidad de los carbohidratos es un factor a tener en cuenta en el diseño de estas dietas experimentales. En todo caso, a pesar de que los pulpos tienen una limitación para el metabolismo de carbohidratos (Bouche-Rodoni, 1973; Boucaud-Camou et al., 1976), podemos decir que la glucosa en proporciones bajas en la dieta ayuda al ahorro de proteínas.

En este trabajo el porcentaje de los carbohidratos en todos los órganos analizados se vio modificado como consecuencia de la dieta suministrada. En este estudio, aumentaron los carbohidratos de la glándula digestiva, músculo, carcasa y animal completo, como consecuencia de un aumento en la ingestión de carbohidratos, observándose valores máximos de retención de CH en la dieta GLU5 (38%). En la dieta ALM5 la retención de los CH fue menor (17%) aunque superiores respecto de la C0, sugiriendo que a pesar de la mala digestibilidad del almidón, incluso pequeñas cantidades de carbohidratos podrían ayudar a conservar su contenido en los tejidos. El carácter conservativo de los carbohidratos también se comprobó a nivel de la glándula digestiva y el músculo cuando los animales se alimentan con una dieta mixta de crustáceos y pescado respecto de animales que ayunaron durante 8 días (Morillo-Velarde et al., 2011a).

Este trabajo demuestra que *O. vulgaris* es capaz de almacenar carbohidratos en sus tejidos cuando aumenta el contenido y la ingesta de éstos en sus dietas, aunque los niveles en ningún caso superan el 6% del peso seco. Por otro lado, un 5% de glucosa en su dieta produce un ahorro importante de la proteína, por lo que un mayor conocimiento

de la relación carbohidratos/proteína óptima podría ser utilizado para reducir eficazmente los costes de la alimentación y optimizar el rendimiento de la dieta en *O. vulgaris*.

9. DISCUSIÓN GENERAL

9. DISCUSIÓN GENERAL.

9.1. Requerimientos nutritivos del pulpo derivados del ayuno.

Los cefalópodos presentan en su composición corporal menos de un 2% en peso húmedo de lípidos, mostrando altos niveles de fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos poliinsaturado, por lo que se había atribuido a los lípidos un papel meramente estructural (Sinanoglou y Miniadis-Meimaroglou, 1998; Navarro y Villanueva, 2000, 2003). No obstante, en base a los resultados del presente estudio, existen evidencias sobre su utilización energética y su almacenamiento en la glándula digestiva. Al exponer a los animales bajo un régimen de ayuno de 8 días, las concentraciones lipídicas presentes en el tejido muscular se mantuvieron prácticamente constantes, conservándose el predominio de los lípidos polares sobre los neutros, a excepción de los monoglicéridos y el colesterol que aumentaron de forma progresiva. Mientras, en la glándula digestiva, las concentraciones de lípidos polares y monoglicéridos mostraron un aumento con el ayuno y los contenidos de ácidos grasos libres, ésteres de esterol y triglicéridos tendieron a disminuir. La movilización de lípidos neutros de este órgano también ha sido demostrada en otros trabajos (Castro et al., 1992; Moltschaniwsky y Johnston, 2006; García-Garrido et al., 2010). Nuestros resultados hacen plantearnos la hipótesis de un transporte simultáneo de triglicéridos y colesterol durante el ayuno a través de la hemolinfa hacia las células musculares. Previamente, Heras y Pollero (1990, 1992) describieron en pulpo la presencia de lipoproteínas de distinta densidad y composición lipídica, que podrían actuar como medio transportador de lípidos entre órganos. No obstante, el hecho de que las concentraciones de monoglicéridos y triglicéridos sigan siendo bajas en el músculo hace pensar que éstos serían inmediatamente metabolizados. Esta hipótesis explicaría tanto la disminución progresiva de los niveles de triglicéridos en la glándula digestiva como la acumulación de colesterol en el músculo durante el ayuno, así como los resultados obtenidos por otros autores en cuanto al metabolismo lipídico de los cefalópodos (Semmens, 1998; Prato et al., 2010; Moltschaniwsky y Johnston, 2006; García García y Cerezo Valverde, 2006) y que han sido ampliamente discutidos en la sección de ayuno, capítulo I (Véase Fig. 1).

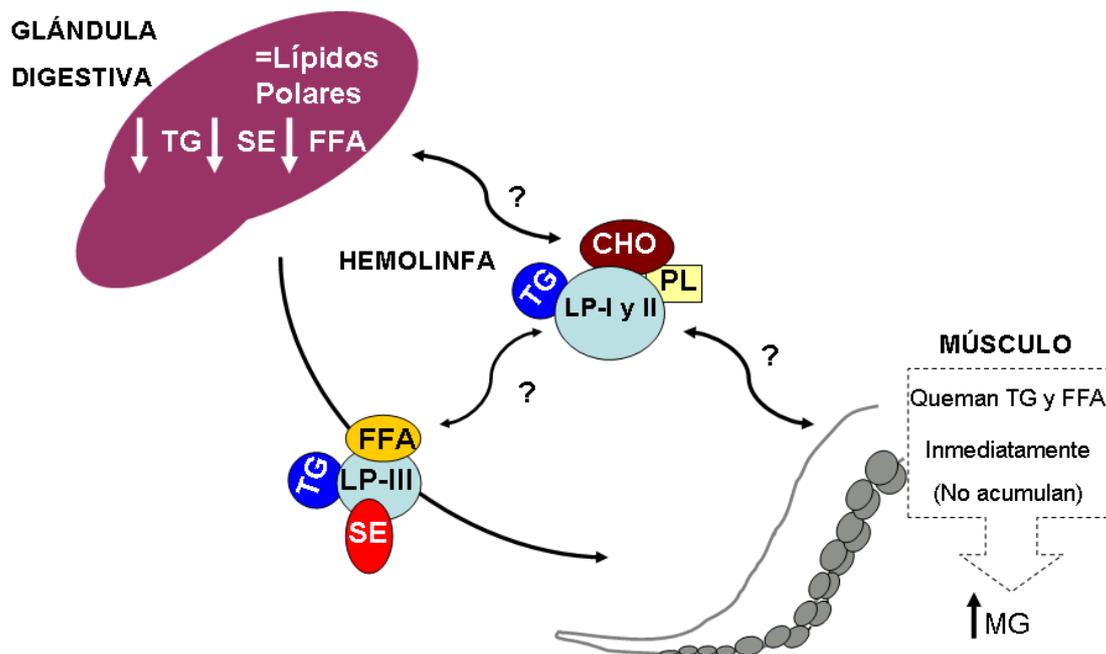


Figura 1. Hipótesis para la utilización de los lípidos durante el ayuno en *O. vulgaris*. MG: Monoglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Ésteres de esteroles (incluye Ceras); FL: Fosfolípidos; LP: Lipoproteínas

Desde un punto de vista bioenergético, los resultados obtenidos demuestran una contribución de los lípidos al metabolismo energético de *O. vulgaris*. Se ha estimado una contribución del 26% del gasto energético diario de los animales durante el ayuno a corto plazo, en su mayor parte procedente de los triglicéridos de la glándula digestiva. Por lo tanto, los resultados del presente estudio proponen interesantes hipótesis que deberían ser comprobadas mediante estudios del metabolismo lipídico. Igualmente, el empleo de dietas formuladas y suplementadas con distintas clases de lípidos, especialmente fosfolípidos, triglicéridos o colesterol, podría ser una herramienta eficaz para aclarar su papel y comprobar su utilización en periodos de crecimiento.

En cuanto a los carbohidratos, el contenido en los tejidos del pulpo es extremadamente bajo, siendo el glucógeno el carbohidrato más abundante (O'Dor et al., 1984). Una alimentación regular con una dieta mixta de crustáceos y pescado permite aumentar el contenido de carbohidratos en la glándula digestiva (3,5 g/100g) y mantener su concentración en el músculo (3,2 g/100g) respecto de ejemplares en ayuno. Cuando los animales fueron expuestos a 8 días de ayuno la concentración de carbohidratos se mantuvo inalterada en la glándula digestiva y en la gónada. No obstante, las glándula

digestiva de los animales que ayunaron fue de menor tamaño, lo que se tradujo en un menor contenido de carbohidratos en este órgano (Fig. 2). Este aspecto es de especial relevancia puesto que destaca como los cambios en el tamaño de la glándula digestiva pueden llevar a conclusiones erróneas cuando se interpretan los resultados únicamente en base a las concentraciones de nutrientes.

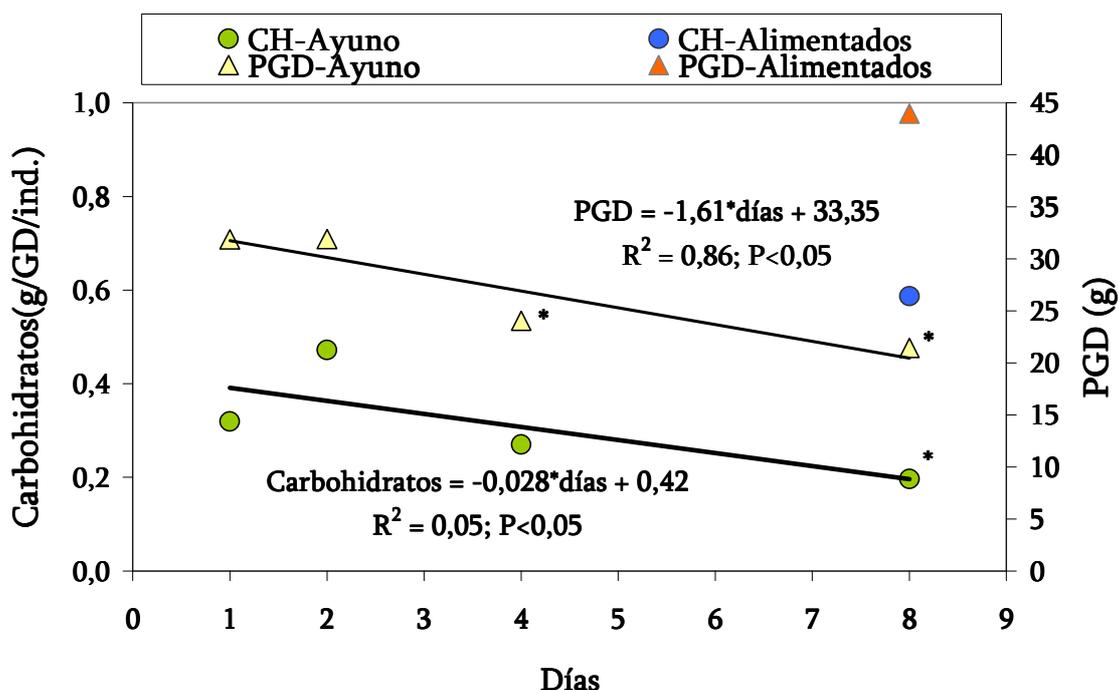


Figura 2. Contenido de CH de la glándula digestiva (g/DG/individuo) y el peso de la glándula digestiva (PGD) en ejemplares de *O. vulgaris* alimentados y en ayuno. Cada punto representa el valor medio de 4 animales *P< 0,05 entre animales alimentados y en ayuno

En nuestro estudio, los animales que ayunaron experimentaron un descenso de los carbohidratos en el músculo de 0,02g/100g peso húmedo para ejemplares de 1 kg, representando un aporte energético de 3 kJ/día. En este sentido, se puede asumir una contribución de los carbohidratos del 9,9% al gasto energético diario en situación de ayuno (8,6% y 1,3% del músculo y de la glándula digestiva, respectivamente). Igualmente, Castro et al. (1992) observaron una baja contribución de los carbohidratos, inferior al 3% del total de energía movilizada por la glándula digestiva en *Sepia officinalis* durante el ayuno. Por lo tanto, aunque en principio *O. vulgaris* presenta unas reservas limitadas de carbohidratos, éstos podrían contribuir al metabolismo energético en situaciones concretas (captura de presas, la huida de depredadores o en períodos de

inanición), por lo que no deberían menospreciarse en el contexto de sus requerimientos nutritivos ni en la formulación futura de dietas para cefalópodos.

En base a la contribución energética de los lípidos y los carbohidratos durante el ayuno, y la estimación del gasto energético para mantener el metabolismo de rutina en ejemplares de pulpo de 1 kg a 18°C (34 kJ/día; Cerezo Valverde y García García, 2004), se puede asumir una distribución del aporte de energía según el esquema de la Figura 3. Al respecto, las proteínas deberían proporcionar la mayor parte de la energía para el mantenimiento de las funciones vitales de los animales en concordancia por lo propuesto por otros autores (Suyama y Kobayashi, 1980; Jhaverim et al., 1984. Lee, 1994).

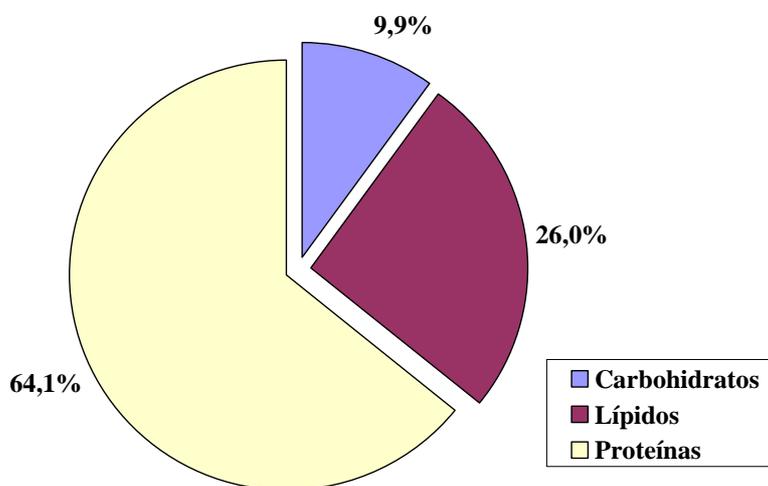


Figura 3. Contribución estimada de los carbohidratos, proteínas y lípidos al gasto energético diario en *O. vulgaris*.

9.2. Aceptabilidad de nuevos ingredientes para los piensos.

Una dificultad importante a considerar para la elaboración de dietas destinadas al engorde de *O. vulgaris* es su aceptación. A diferencia de lo que ocurre con los peces, el pienso tiene que ser “atractivo” y de un formato apropiado para que *O. vulgaris* lo acepte y lo pueda manipular e ingerir. Por ello, fue necesario conocer en experimentos preliminares que ingredientes son mejor aceptados por *O. vulgaris* antes de incorporarlos a las dietas. En esta tesis se probaron 19 ingredientes de distinto origen (animal, vegetal) y formato (harinas, liofilizados y en polvo) para formular 19 dietas únicamente distintas en el ingrediente de prueba (30%), aglomerados con gelatina (20%) y agua destilada (50%). Gracias a la gelatina todas las dietas tuvieron una textura

firme, antes y después de sumergirlas en agua, sin evidencias de desintegración al ser manipuladas por los pulpos. Esto demostró la gran estabilidad de las dietas que contienen gelatina haciéndolas más aceptables para los pulpos.

En general, las harinas vegetales se caracterizaron por una baja aceptabilidad y tasas de crecimiento, siendo el gluten de trigo la que ofreció mejores resultados. De igual forma ocurrió con las harinas animales, a pesar de contener mayor contenido en proteínas. Otros autores han utilizado harinas de diferente origen para la elaboración de dietas para pulpos obteniendo también malos resultados de aceptabilidad (García et al., 2010; Estefanell et al., 2011a). Los ingredientes liofilizados, sin embargo, mostraron una buena aceptabilidad en *O. vulgaris*, destacando el guisante y el pescado (alacha y boga), debido probablemente a que los liofilizados conservan prácticamente intactas sus propiedades nutritivas y estructura molecular, ya que el agua se les extrae sin tratamiento térmico, pasando directamente de la fase congelada o sólida al estado gaseoso. El resultado más sorprendente fue obtenido con la yema de huevo en polvo, con un alto grado de aceptación (6,1 g SS/día), comparado con los valores estimados para la dieta natural más adecuada desde el punto de vista económico, según García Garcia y Cerezo Valverde (2006) (Fig. 4).

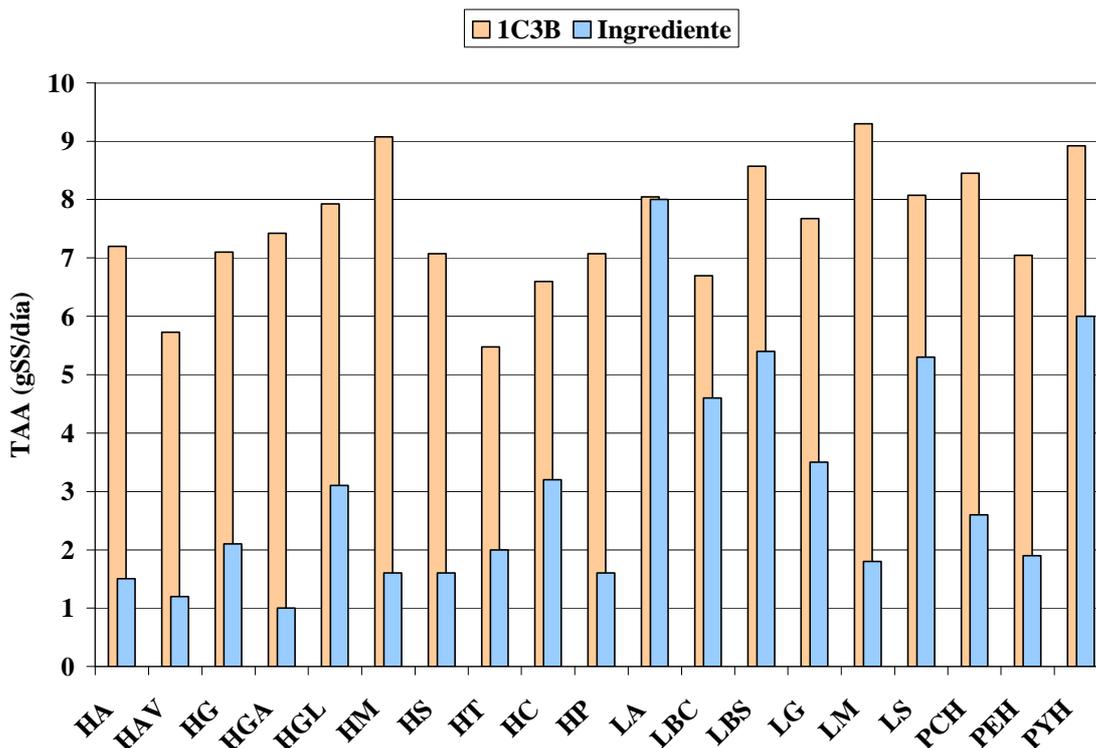


Figura 4: Valor medio de la Tasa de Alimentación Absoluta en sustancia seca (gSS/día) de las dietas testadas y estimación de una dieta natural de *C. mediterraneus* y *B. boops* en una proporción 1:3 (1C3B) en condiciones experimentales similares según García García y Cerezo Valverde (2006). HA: Harina de arroz; HAV: Harina de avena; HG: Harina de garbanzo; HGA: Harina de garrofín; HGL: Harina de Gluten; HM: Harina de maíz; HS: Harina de soja; HT: Harina de trigo; HC: Harina de *C. mediterraneus*; HP: Harina de pescado; LA: Liofilizado de *S. aurita*; LBC: Liofilizado de *B. boops* descarte; LBS: Liofilizado de *B. boops* salvaje; LG: Liofilizado de guisante; LM: Liofilizado de *Mytilus galloprovincialis*; LS: Liofilizado de sangre de pollo; PCH: Clara de huevo en polvo; PEH: Huevo entero en polvo; PYH: Yema de huevo en polvo.

Los resultados de este trabajo sugieren que futuros estudios con dietas artificiales para *O. vulgaris* podrían contener una base de yema de huevo en polvo, liofilizados de pescado y gelatina como aglomerante, entre otros. Además, estos ingredientes podrían ayudar a incrementar la aceptabilidad de las dietas y el crecimiento de *O. vulgaris*, así como a ingerir otros ingredientes que, aislados, presentan una mala aceptabilidad y que nutricionalmente pueden ser apropiados.

9.3. Desarrollo de piensos formulados y requerimientos nutritivos.

Las primeras dos dietas formuladas exclusivamente a base de ingredientes secos o liofilizados para la alimentación de *O. vulgaris* fueron probadas en este estudio. Las dietas se diferenciaron únicamente en el ingrediente de prueba, una contenía pota y la otra guisante. Ambas mostraron una buena aceptabilidad, aunque sólo la dieta que empleó pota como ingrediente principal ofreció un buen crecimiento y digestibilidad. Además, destacó por su elevado aprovechamiento nutritivo respecto de otras dietas experimentales (Cerezo Valverde et al., 2008; Quintana et al., 2008; García et al., 2010; Estefanell et al., 2011a) y naturales (Aguado-Giménez y García García, 2002; García García y Aguado-Giménez, 2002) con índices de eficacia alimentaria cerca del 100% (Fig. 5) y sugiriendo un buen balance nutricional.

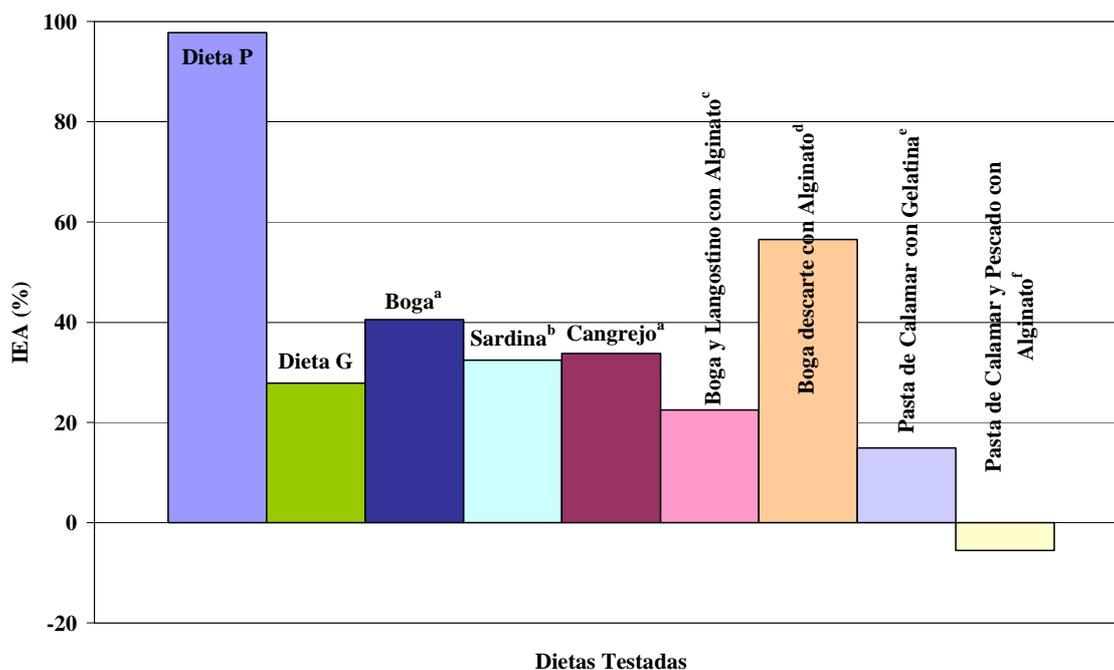


Figura 5. Índice de eficacia alimentaria (%) de las dietas formuladas que contenían pota (Dieta P) o guisante (Dieta G), de dietas naturales (a y b) y experimentales (c-f) aceptadas por *O. vulgaris*. ^aAguado-Giménez y García García, 2002; ^bGarcía García y Aguado-Giménez, 2002; ^cCerezo Valverde et al., 2008; ^dEstefanell et al., 2011; ^eQuintana et al., 2008; ^fGarcía et al., 2010.

Sin embargo, cuando los pulpos se alimentaron con la dieta que contenía guisante, se obtuvo una fuerte reducción en el coeficiente de digestibilidad de la materia seca (73,8%), sugiriendo en primera instancia que los factores antinutricionales que

presenta el guisante podrían haber afectado a las enzimas digestivas de *O. vulgaris*. Además, los carbohidratos incluidos en el guisante son mayoritariamente almidones y el grado de complejidad de los carbohidratos también podría ser un factor a tener en cuenta en el diseño de estas dietas experimentales. Posteriormente, la inclusión de almidón en un trabajo de esta Tesis corroboró que esta disminución en la digestibilidad se podía atribuir a la disminución de la capacidad de digestión de carbohidratos complejos (Ver Fig. 6).

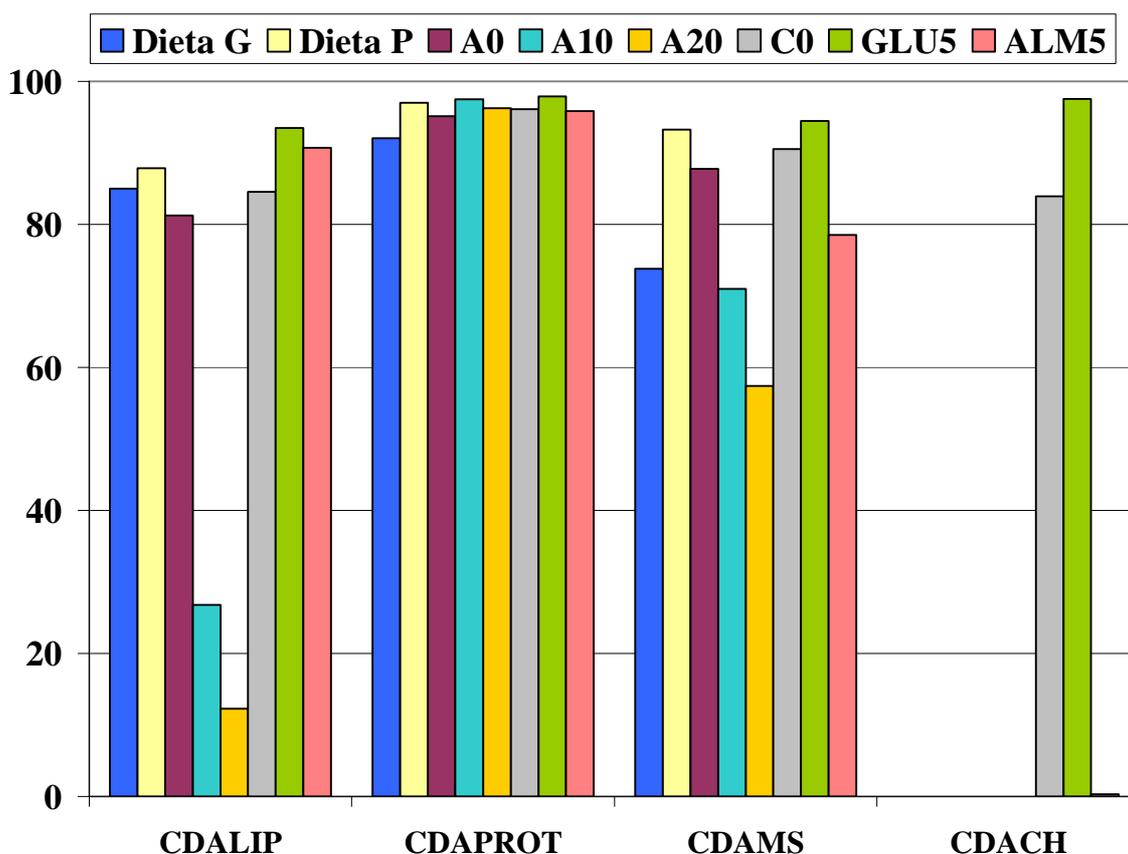


Figura 6. Comparación de los coeficientes de digestibilidad aparentes de los lípidos (CDALIP), proteínas (CDAPROT), materia seca (CDAMS) y carbohidratos (CDACH) obtenidos para las dietas formuladas en este trabajo. Liofilizado de guisante (Dieta G) y pota (Dieta P), sin aceite añadido (A0), con un 10 (A10) y con 20% (A20), y sin carbohidratos añadidos (C0), con un 5% de glucosa (GLU5) y con un 5% de Almidón (ALM5).

En este trabajo hay que destacar que, cuando los animales fueron alimentados con la dieta que contenía pota, el porcentaje lipídico de la glándula digestiva (35,0%) fue mucho mayor que en los animales alimentados con dieta que contenía guisante (5,5%), sugiriendo un peor balance nutricional en esta última y una mayor contribución

de los lípidos al metabolismo energético. Los resultados del presente estudio dan un gran paso en las investigaciones para conseguir una dieta formulada para *O. vulgaris* con fines comerciales, usando una base similar al formato propuesto para obtener piensos secos con mayor aceptabilidad y estabilidad.

En cuanto a los requerimientos lipídicos de *O. vulgaris* existe poca bibliografía (García García y Aguado-Giménez, 2002; García García y Cerezo Valverde et al., 2006; Estefanell et al., 2011a, b; Cerezo Valverde et al., 2012c), pero los pocos datos que hay parecen confirmar la existencia de un rango óptimo en el contenido lipídico de la dieta. En este trabajo se ha obtenido una aproximación a de la tasa absoluta de ingesta de lípidos y el porcentaje de grasa en la dieta. La mayor tasa absoluta de ingesta y de crecimiento se correspondió con la dieta que no llevaba aceites añadidos (13,8% lípidos SS) siendo menor para las dietas que contenían 28,6% y 38,6% lípidos SS. Al comparar nuestros datos con los de otras dietas formuladas (Estefanell et al., 2011; Cerezo Valverde et al., 2012c) comprobamos que, aunque los porcentajes de grasa de la dieta varíen, las tasas de alimentación absolutas de lípidos finales donde se obtienen los mejores resultados están comprendidas entre 1 y 1,5 g/día, correspondiéndose con porcentajes del 13-27% lípidos SS en dietas formuladas. Teniendo en cuenta nuestros coeficientes de digestibilidad de los lípidos y los de otros autores (Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007; Sánchez et al., 2009; Seïça Neves et al., 2010), los mejores resultados se obtienen con una dieta entre el 2-14% de grasa SS, ya que si aumentamos este porcentaje el coeficiente de digestibilidad de los lípidos disminuye drásticamente (Fig. 6 y 7), y el de la materia seca baja del 90%, provocando la pérdida de gran cantidad de nutrientes por las heces. Estos resultados coinciden con los derivados del crecimiento observado en este estudio, de donde se deduce que las dietas experimentales deberían contener entre el 13-14% lípidos SS como máximo. En cualquier caso, se sugiere la necesidad de tener en cuenta tanto el grado de aceptabilidad como la distinta composición lipídica de la dieta para fijar los porcentajes de grasa.

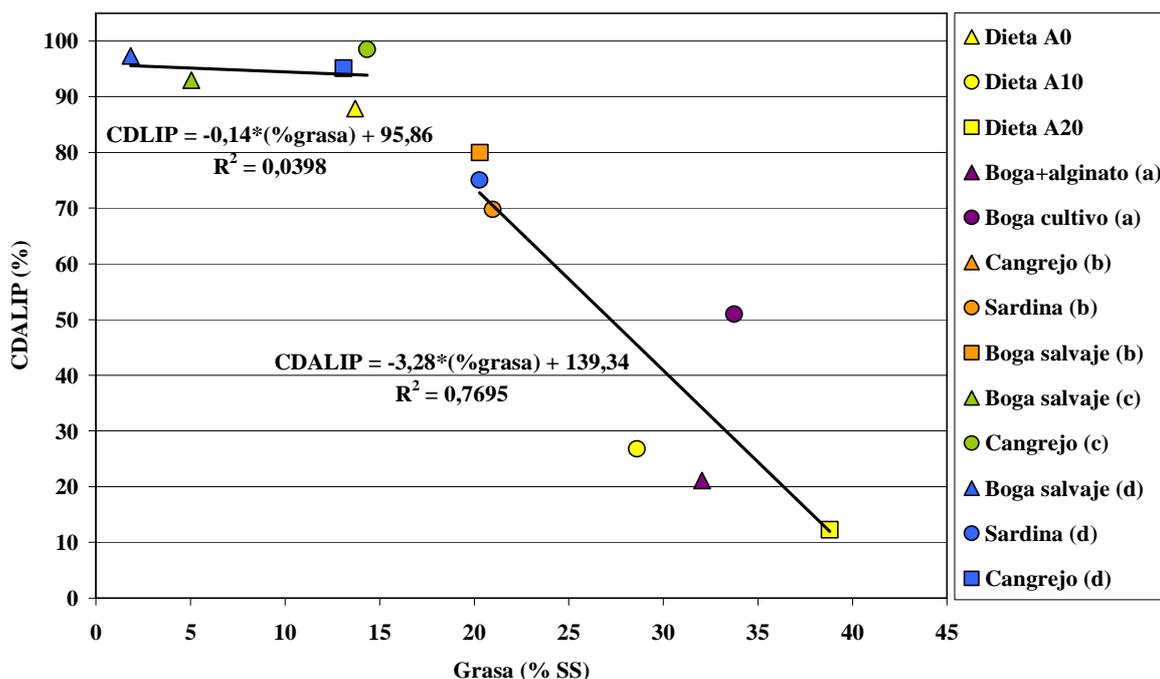


Figura 7. Coeficientes de digestibilidad aparente de la dieta (CDALIP%) en función del porcentaje de grasa de la dieta (%SS) para las distintas dietas formuladas; sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20) y otras dietas experimentales: (a) Seiča Neves et al., 2010, (b) Sánchez et al., 2009 (c) Mazón et al., 2007, (d) Hernández y García García, 2004.

Esto es debido a que conforme aumentó el contenido de grasa en la dieta disminuyó el coeficiente de digestibilidad, exclusivamente para el caso de los lípidos neutros, llegando incluso a ser nula o incluso con valores negativos en monoglicéridos y ácidos grasos libres (Fig. 8 y 9). Esta nula digestibilidad sugiere que la mayor parte de los triglicéridos de la dieta se habrían desdoblado en ácidos grasos libres y monoglicéridos, resultando su contenido en las heces superior al ingerido en las dietas. Por el contrario, los coeficientes de digestibilidad de los lípidos polares fueron elevados (Fig. 8 y 9), pudiéndose atribuir a que los fosfolípidos en la dieta podrían mejorar la emulsión lipídica e incrementar la eficacia del transporte de los ácidos grasos y lípidos del intestino al resto del organismo en *O. vulgaris* (Craig y Gatlin, 1997; Kasper y Brown, 2003; Tocher et al., 2008). De acuerdo con otros trabajos en cefalópodos (Ballantyne et al., 1981; O'Dor et al., 1984; Lee, 1994) éstos resultados apuntan a que los pulpos tienen una capacidad limitada para la digestión y catabolización de lípidos, pero especialmente, según nuestros resultados, para el caso de los lípidos neutros. También, hay que destacar que conforme aumentamos el porcentaje de grasa en la dieta los lípidos polares permanecieron prácticamente constantes, por lo que quizás, si

aumentáramos la concentración de estas clases lipídicas también podríamos encontrar una capacidad limitada para su digestión y catabolización por parte de *O. vulgaris* (Fig. 9).

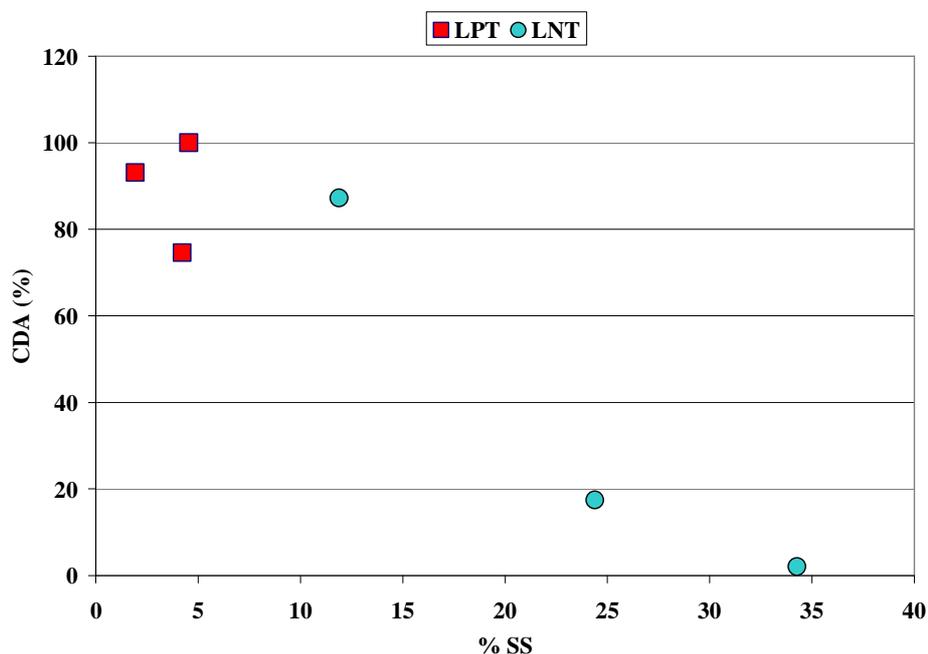


Figura 8. Coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de los lípidos polares totales (LPT) y los lípidos neutros totales (LNT) en función de su contenido en la dieta (%SS) para las dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

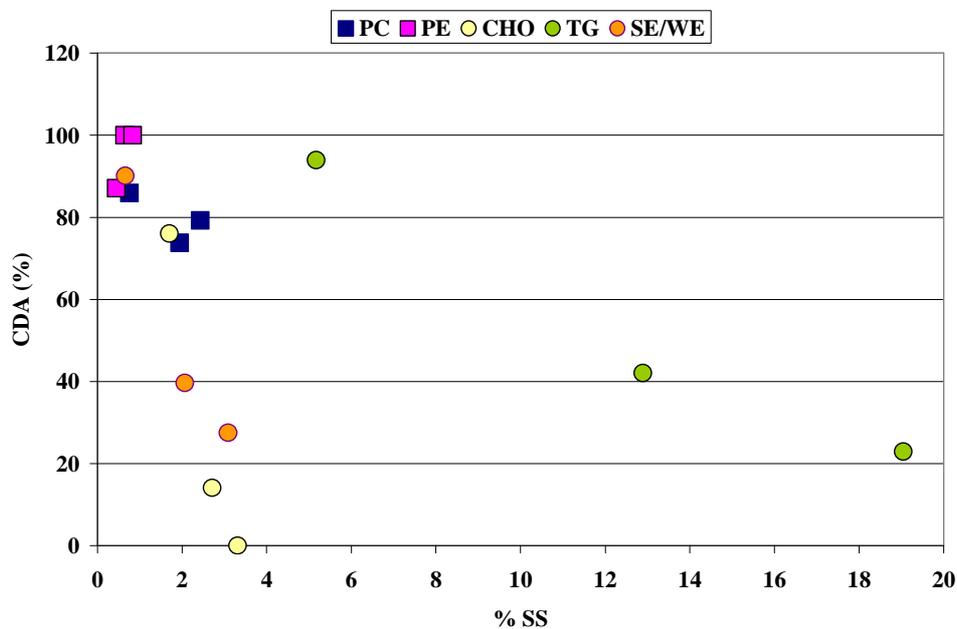


Figura 9. Coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) las principales clases lipídicas en función de su contenido en la dieta (%SS) para las dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20). PC: Fosfatidilcolina; PE: Fosfatidiletanolamina; CHO: Colesterol; TG: Triglicéridos; SE/WE: Esteroles de colesterol y Ceras.

Una mayor ingesta de lípidos por parte de *O. vulgaris* provoca un aumento de los porcentajes de los lípidos neutros en la carcasa, principalmente debido a la acumulación de colesterol, ácidos grasos libres y triglicéridos, y una disminución de los lípidos polares. Estos resultados concuerdan con datos obtenidos en un trabajo de esta tesis (Morillo-Velarde et al., 2012b), donde se sugiere un transporte simultáneo de triglicéridos y colesterol de la glándula digestiva hacia las células musculares durante el ayuno. El mayor contenido de grasa en la dieta también quedó reflejado en el alto porcentaje de grasa en la glándula digestiva de los pulpos, principalmente triglicéridos, resaltando el uso de este órgano como almacén de lípidos y energía (Sieiro et al., 2006; Cerezo Valverde et al., 2012c).

Otro aspecto abordado en este estudio ha sido el papel de los carbohidratos en las dietas formuladas para el pulpo. Desde un punto de vista económico, la proteína, al igual que en peces (Fernández et al., 2007; Árnason et al., 2009), es el macronutriente más caro en la dieta, por lo que es importante mantener su contenido en el valor mínimo que soporte el máximo crecimiento en *O. vulgaris* para reducir el coste del alimento. Para ello, en este trabajo se elaboraron tres dietas diferenciadas en la cantidad y complejidad de los carbohidratos añadidos, con un 0% de carbohidratos, un 5% de glucosa o un 5% de almidón. Las mayores tasas absolutas de ingesta correspondieron con la dieta que contenía almidón (6,47 g sustancia seca/día), debido probablemente a que el almidón incrementa la viscosidad y el proceso de gelificación (Thomas et al., 1998), proporcionando a la dieta una buena estabilidad y textura, mejorando así la palatabilidad de la dieta. Sin embargo, cuando se sustituyó glucosa por almidón, se obtuvo una fuerte reducción en el coeficiente de digestibilidad de la materia seca (94% al 79%) y carbohidratos (98% al 0,3%). En un trabajo previo de esta misma tesis (Morillo-Velarde et al., 2011a) se dedujo una mala utilización de los carbohidratos procedentes del guisante, atribuido a la presencia de factores antinutricionales, sin embargo, el hecho de que el almidón puro no los presente y que la digestibilidad haya sido también muy baja indica la incapacidad de *O. vulgaris* de digerir para almidón de la dieta.

Por otro lado, la dieta que contenía glucosa destacó por su elevado aprovechamiento nutritivo, con un valor productivo de la proteína (PPV del 72%) superior incluso al de dietas naturales (García García y Cerezo Valverde, 2006), y por sus elevados coeficientes de digestibilidad, superiores respecto de otras dietas

experimentales (Seiça Neves et al., 2010). En este sentido, a pesar de que se ha descrito una limitación en el metabolismo de carbohidratos de *O. vulgaris* (Bouche-Rodoni, 1973; Boucaud-Camou et al., 1976), podemos decir que la glucosa en proporciones bajas en la dieta (5% del peso de la dieta) ayuda al ahorro de proteínas hasta en un 25% respecto de una dieta similar sin carbohidratos añadidos.

En este estudio, aumentaron los porcentajes de carbohidratos en todos los tejidos analizados en *O. vulgaris* como consecuencia de una mayor ingesta de carbohidratos, observándose valores máximos de retención de carbohidratos en los individuos alimentados con la dieta que contenía glucosa. En todo caso, las bajas concentraciones alcanzadas en los tejidos hacen suponer que estos son inmediatamente metabolizados después de la ingesta, tal y como propuso anteriormente O'Dor et al. (1984). La capacidad de almacenar carbohidratos también la hemos observado en un trabajo de esta tesis (Morillo-Velarde et al., 2011a) cuando los animales fueron alimentados con una dieta mixta de pescado y cangrejo, tanto a nivel de la glándula digestiva como del músculo.

Este estudio también contribuye a un mayor conocimiento de la relación carbohidratos/proteína óptima que podría ser utilizada para reducir eficazmente los costes de la alimentación y optimizar el rendimiento de la dieta en *O. vulgaris*. Autores como Lee (1994) comentaron que no tenía sentido emplear la relación P/E en dietas para cefalópodos debido al uso conjunto de las proteínas para energía y crecimiento, y que debería prestarse más atención al balance apropiado de aminoácidos. No obstante, resultados de este estudio han comprobado que *O. vulgaris* es capaz de usar lípidos y carbohidratos como fuente de energía siendo la relación P/E puede ser una buena herramienta para establecer las necesidades nutritivas óptimas de crecimiento y la rentabilidad de la dieta.

A lo largo de este trabajo se han desarrollado 8 dietas formuladas a base de ingredientes secos y liofilizados con resultados muy prometedores. En cuanto al crecimiento, los mejores resultados se obtuvieron con las dietas que contenía almidón (ALM5), glucosa (GLU5) o pota (Dieta P), con tasas de crecimiento de 11,2 g/día, 9,4 g/día y 9,6 g/día, respectivamente (Fig. 10). Sin embargo, la dieta que contenía glucosa fue la que mostró mejor índice de conversión, siendo este menor de 1 (Fig. 10).

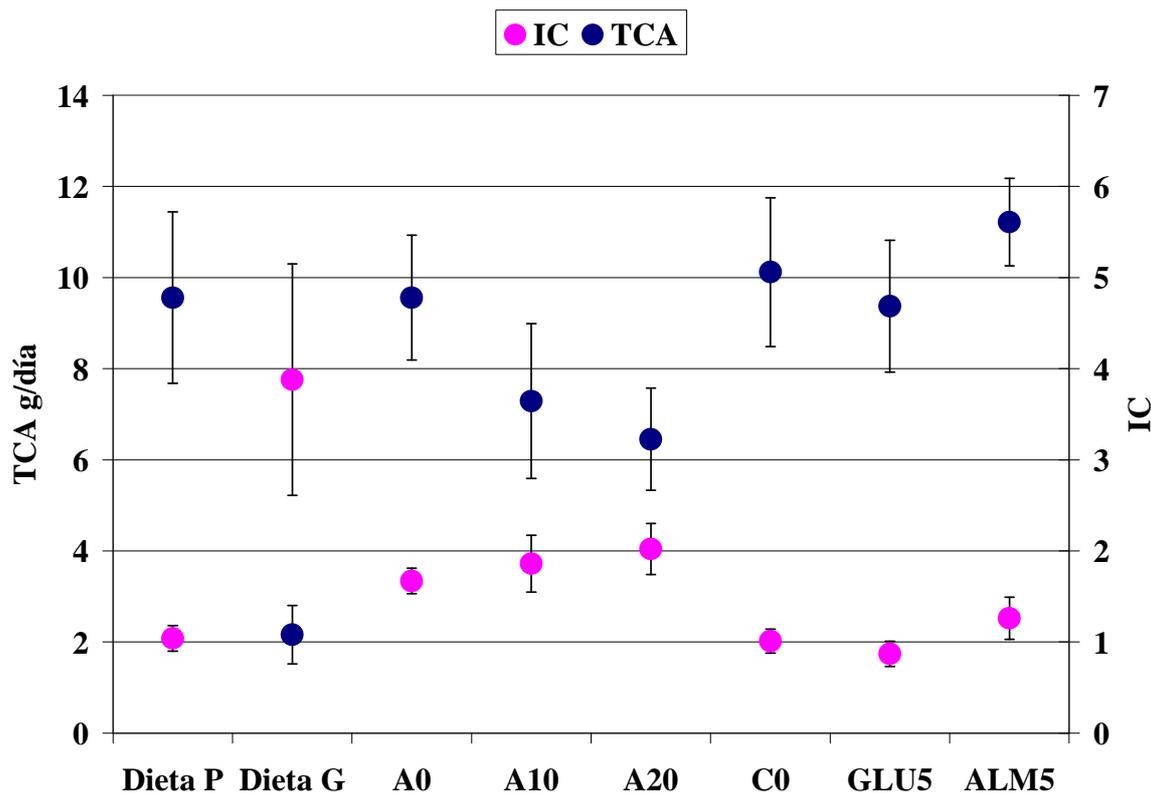


Figura 10: Valor medio de la Tasa de Crecimiento Absoluta (TCA) en g/día y el Índice de Conversión (IC) de las dietas testadas en este trabajo con liofilizado de guisante (Dieta G) y pota (Dieta P), sin aceite añadido (A0), con un 10% (A10) y con 20% (A20), y sin carbohidratos añadidos (C0), con un 5% de glucosa (GLU5) y con un 5% de almidón (ALM5).

Finalmente, un aspecto importante sería la disminución de residuos generados en las granjas de pulpo al sustituir las dietas naturales por pienso. Los residuos generados en las instalaciones para el engorde de pulpo provienen, principalmente, de la porción de alimento no ingerido, siendo la principal fuente de N y P liberada al medio. Entre ellos se puede incluir caparazones de crustáceos y restos de espinas y cabezas de pescado. La ventaja de las dietas elaboradas en este trabajo es que el 100% de la dieta es comestible por lo que se evitarían los residuos procedentes de la parte no comestible (Mazón et al., 2007). También, el N y P proceden de la porción del alimento ingerido, liberados al medio principalmente por la excreción y en forma particulada (heces). Con dietas naturales de boga y cangrejo se excreta un 66% y 62% del N ingerido, respectivamente (Mazoz et al., 2007), mientras que, con la dieta que mejores resultados se han obtenido en esta tesis (GLU5) solo se libera un 29% de N, incluyendo además el N perdido en heces. Por tanto, se puede reducir más de un 30% los residuos de N liberados por excreción al usar dietas formuladas. Estos resultados también sugieren

que la glucosa de la dieta GLU5 es usada como fuente de energía, por lo que *O. vulgaris* puede destinar mayor porcentaje de proteínas para su crecimiento (71%) que al ingerir boga (32%) o cangrejo (37%) (Mazón et al., 2007).

Los trabajos que componen esta tesis han aportado nuevos conocimientos en relación a los requerimientos nutricionales del pulpo de roca (*O. vulgaris*) y esta información puede ser útil para el desarrollo de futuras dietas para su engorde.

10. CONCLUSIONES

10. Conclusiones

Capítulo I: *Variación en la composición lipídica durante el ayuno a corto plazo en distintos tejidos del pulpo común (Octopus vulgaris).*

-La composición en lípidos polares del músculo no mostró variaciones a lo largo de un periodo de 8 días de ayuno. Sí se detectó un aumento en lípidos neutros como los monoglicéridos y el colesterol.

-El pulpo de roca movilizó un promedio de 0,23 g de lípidos por día de ayuno, principalmente ácidos grasos libres, ésteres de esterol y triglicéridos procedentes de la glándula digestiva.

-Los lípidos contribuyeron con un 26% al gasto energético diario durante el ayuno en el pulpo de roca.

Capítulo II: *Contribución energética de los carbohidratos durante el ayuno en el pulpo común (Octopus vulgaris).*

-Los pulpos alimentados con dieta mixta de cangrejo y pescado almacenaron bajas concentraciones de carbohidratos en la gónada, la glándula digestiva y el músculo, con valores comprendidos entre 2,2 g y 3,5 g/100g de peso seco.

-El contenido de carbohidratos disminuye en la glándula digestiva y en el músculo del pulpo a partir del cuarto día de ayuno respecto de animales alimentados. En la gónada permanecen inalterados.

-Los carbohidratos de la glándula digestiva y del músculo contribuyeron con un 1,3% y 8,6%, respectivamente, al gasto energético diario del pulpo durante el ayuno.

Capítulo III: *Formato sencillo de pienso para comprobar la aceptabilidad de ingredientes en el pulpo común (Octopus vulgaris).*

-Los piensos elaborados con harinas vegetales o animales mostraron una baja aceptabilidad en el pulpo, independientemente de su composición nutricional.

-Los piensos elaborados con liofilizados de pescado (alacha o boga) y la yema de huevo en polvo ofrecieron los mejores resultados, con tasas de alimentación y crecimiento similares a las obtenidas para dietas naturales a base de pescado.

Capítulo IV: *Crecimiento y digestibilidad de dietas formuladas a base de ingredientes secos y liofilizados en el pulpo común (Octopus vulgaris)*

-Las dietas artificiales semihúmedas basadas en una mezcla de ingredientes secos o liofilizados, que emplearon pota como ingrediente principal, mostraron buenas tasas de alimentación, crecimiento, aprovechamiento nutritivo y digestibilidad, igualando o superando las dietas naturales a base de pescado.

-La sustitución de pota por guisante como ingrediente principal generó peor crecimiento, índice de conversión y una fuerte reducción en el coeficiente de digestibilidad de la materia seca, atribuido a la baja digestibilidad del almidón de este ingrediente.

-La composición nutricional del músculo del pulpo de roca no se vio modificada con las dietas que contenían pota o guisante, sin embargo, el porcentaje lipídico fue mucho mayor en la glándula digestiva de animales alimentados con la dieta que contenía pota (35%) respecto de la de guisante (5%).

Capítulo V: *Requerimientos lipídicos de pulpo común (Octopus vulgaris) obtenidos a partir de dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado.*

-Las dietas formuladas con contenidos lipídicos entre el 13,8 y 38,8% en sustancia seca fueron aceptadas por el pulpo, aunque la mayor tasa absoluta de ingesta, crecimiento y eficacia alimentaria se observó con la dieta sin adición de aceite y menor contenido lipídico.

Conclusiones

-Un aumento en el porcentaje de aceite de la dieta produjo una disminución en los coeficientes de digestibilidad de la materia seca y de los lípidos, principalmente atribuido a la pérdida de lípidos neutros por las heces. Los lípidos polares presentaron una digestibilidad superior al 83% en todas las dietas.

-El distinto contenido lipídico de las dietas no afectó a la digestibilidad de la proteína, que se mantuvo por encima del 95% en todas ellas.

-Se sugieren tasas óptimas de ingesta de lípidos para el pulpo en torno a 1 g al día, con porcentajes apropiados de grasa para dietas formuladas entre el 13-14% en sustancia seca, aunque estos porcentajes pueden variar en futuros estudios según las proporciones de lípidos polares y neutros de la dieta.

-El uso de aceite de hígado de bacalao como fuente de lípidos en la dieta modificó el perfil de las clases lipídicas del pulpo, provocando en la carcasa un aumento en la proporción de lípidos neutros, principalmente colesterol, ácidos grasos libres y triglicéridos, y una disminución en los lípidos polares. En la glándula digestiva generó un aumento en triglicéridos y una disminución de lípidos polares.

Capítulo VI: *Utilización eficaz de la glucosa frente al almidón en dietas formuladas semihúmedas para el pulpo común (Octopus vulgaris).*

-El pulpo de roca es capaz de incrementar el contenido de carbohidratos en el músculo y en la glándula digestiva cuando aumenta la ingesta de carbohidratos en su dieta.

-Las tasas de crecimiento fueron similares para dietas sin carbohidratos añadidos (10,1 g/día) en comparación con dietas con un 5% de glucosa (9,4 g/día) o un 5% de almidón (11,2 g/día).

- La dieta mejor aceptada incluía almidón al 5%, aunque los mejores índices de aprovechamiento nutritivo se observaron en la dieta con glucosa al 5%, destacando un PPV del 72% e índices de conversión inferiores a 1.

Conclusiones

-La digestibilidad de la proteína y la grasa fue similar en las dietas con y sin carbohidratos añadidos (96-98 % y 85-94%, respectivamente).

-La digestibilidad de los carbohidratos fue mayor para las dietas sin carbohidratos añadidos (84%) y con glucosa al 5% (97%) respecto de la dieta con almidón al 5%, con valores próximos a 0.

-Un 5% de glucosa en la dieta produce un incremento del 25% en la retención de proteína destinada al crecimiento en el pulpo de roca.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. Referencias bibliográficas

A

- Aguado-Giménez, F., García García, B., 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquacult. Int.* 10, 361-377.
- Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domínguez, P.M., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., Rosas, C. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* 273, 641-655.
- Almansa, E., Dominguez, P.M., Sykes, A., Tejera, N., Lorenzo, A., Andrade, J.P., 2006. The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture* 256, 403-413.
- AOAC, 1997. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington.
- Árnason, J., Imsland, A.K., Gústavsson, A., Gunnarsson, S., Arnarson, I., Reynisson, H., Jónsson, A.F., Smáradóttir, H., Thorarensen H., 2009. Optimum feed formulation for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Minimum protein content in diet for maximum growth. *Aquaculture* 291, 188–191.
- Atkinson, J.L., Hilton, J.W., Slinger, S.J., 1984. Evaluation of acid insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 1384-1386.

B

- Ballantyne, J.S., Hochachka, P.W., Mommsen, T.P., 1981. Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Mar. Biol. Lett.* 2, 75-85.
- Biandolino, F., Portacci, G., Prato, E., 2010. Influence of natural diets on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris*, Cuvier 1797. *Aquacult. Int.* 18, 1163-1175.

- Boletzky, S.V., 1974. Effects de la sous-nutrition prolongée sur le développement de la coquille de *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda). Bull. Soc. Zool. Fr. 99, 667-673.
- Boletzky, S.V., Hanlon, R.T., 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. Mem. Natl. Mus. Victoria 44, 147- 187.
- Boucaud-Camou, E., 1974. Localization d'activités enzymatiques impliqués dans la digestion chez *Sepia officinalis*. L. Arch. Zool. Exp. Gen. 115, 5-27.
- Boucaud-Camou, E., Boucher-Rodoni, R., Mangold, K., 1976. Digestive absorption in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Octopoda). J. Zool. Lond. 179, 261–271.
- Boucher-Rodoni, R., 1973. Vitesse de digestion d' *Octopus cyanea* (Cephalopoda: Octopoda). Mar. Biol. 18, 237-242.
- Boucher-Rodoni, R., 1982. La glande digestive des céphalopodes, organe de synthèse et de sécrétion d'enzymes digestives. Cah. Biol. Mar. 23, 299-318.
- Boucher-Rodoni, R., Mangold K., 1985. Ammonia excretion during feeding and starvation in *Octopus vulgaris*. Mar. Biol. 86, 193-197.
- Boucher-Rodoni, R., Mangold K., 1988. Comparative aspects of ammonia excretion in cephalopods. Malacologia 29, 145-151.
- Boucher-Rodoni, R., Mangold, K., 1989. Respiration and excretion by the squid *L. forbesi*. Mar. Biol. 103, 333–338.
- Bustamante, P., Caurant, F., Fowler, S.W., Miramand, P., 1998a. Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the North East Atlantic Ocean. Sci. Total Environ. 220, 71–80.
- Bustamante, P., Cherel, Y., Caurant, F., Miramand, P., 1998b. Cadmium, copper and zinc in octopuses from Kerguelen Islands, Southern Indian Ocean. Polar Biol. 19, 264–271.
- Bustamante, P., Grigioni, S., Boucher-Rodoni, R., Caurant, F., Miramand, P., 2000. Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of the nautilus *Nautilus macromphalus* from New Caledonia. Mar.Pollut.Bull. 40, 688–96.

C

- Cagnetta, P., Sublimi A., 1999. Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C.) when fed on a monodiet. Seminar on the Mediterranean Marine Aquaculture Finfish Species Diversification. Zaragoza, Spain, 24–27 May

- Castro, B.G., Garrido, J.L., Sotelo, C.G., 1992. Changes in composition of digestive gland and mantle muscle of the cuttlefish *Sepia officinalis* during starvation. *Mar. Biol.* 114, 11-20.
- Castro B.G., Lee P.G. 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A (4), 1007- 1016.
- Carmona, A., Seidl, D.S., Jaffé, W.G., 1991. Comparison of extraction methods and assay procedures for the determination of the apparent tannin content of common beans. *J. Sci. Food Agric.* 56, 291-301.
- Carrasco, J.F., Rodríguez, C., Rodríguez, M., 2003. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier) utilizando como base de la alimentación zoeas vivas de crustáceos. *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cádiz, Spain, pp. 255-256.
- Caruso, G., Giordano, D., Mancuso, M., Genovese, L., 2004. Studio preliminare degli enzimi digestivi di *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 ed *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca:Cephalopoda). *Biol. Mar. Medit.* 11, 367-369.
- Cerezo Valverde, J., García García, B., 2004. Influence of body weight and temperature on post-prandial oxygen consumption of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 233, 599–613.
- Cerezo Valverde, J., García García, B., 2005. Suitable dissolved oxygen levels for common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) at different weights and temperatures: analysis of respiratory behaviour. *Aquaculture* 244, 303-314.
- Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F., García García, B., 2008. Growth, feed efficiency, and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture* 275, 266-273.
- Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., García-Garrido, S., Rodríguez, C., Estefanell, J., Gairín, J.I., Rodríguez, C.J., Tomás, A., García García, B., 2012a. Lipid classes from marine species and meals intended for cephalopod feeding. *Aquac. Int.* 20, 71-89.
- Cerezo Valverde, J., Martínez-Llorens, S., Tomás Vidal, A., Jover, M., Rodríguez, C., Estefanell, J., Gairín, J.I., Domingues, P.M., Rodríguez, C.J., García García, B., 2012b. Amino acids composition and protein quality evaluation of marine species and meals for feed formulations in cephalopods. *Aquacult Int.* doi: 10.1007/s10499-012-9569-6.

- Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Guiménez, F., Morillo-Velarde, P.S., García García, B., 2012c. Performance of formulated diets with different level of lipids and glutamate supplementation in *Octopus vulgaris*. *Aquacult. Res.* doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03201.x.
- Chapela, A., González, A.F., Dawe, E.G., Rocha, F., Guerra, A., 2006. Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. *Sci. Mar.* 70, 121-129.
- Cho, C.Y., Bureau, D.P., 2001. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquacult. Res.* 32, 349-360.
- Christie, W.W., 1982. *Lipid analysis*, 2nd edn. Pergamon Press, Oxford.
- Craig, S.R., Gatlin, D.M., 1997. Growth and body composition of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) fed diets containing lecithin and supplemental choline. *Aquaculture* 151,259-267.
- Crockett, E.L. Hazel, J.R., 1997. Cholesterol affects physical properties and (Na⁺, K⁺)-ATPase in basolateral membranes of renal and intestinal epithelia from thermally acclimated rainbow trout. *J. Comp. Physiol.* 167(B), 344-351.

D

- D'Aniello, A., Scardi, V., 1971. Attività cellulastica nel polipo (*Octopus vulgaris*). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 47, 481-483.
- Davies, S.J., Gouveia, A., Laporte, J., Woodgate, S.L., Nates, S., 2009. Nutrient digestibility profile of premium (category III grade) animal protein by-products for temperate marine fish species (European sea bass, gilthead sea bream and turbot). *Aquacult. Res.* 40, 1759-1769.
- Delgado, M., Gairín, J.I., Carbó, R., Aguilera, C. 2011. Growth of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) in tanks in the Ebro Delta (NE Spain): effects of temperature, salinity and culture density. *Sci. Mar.* 75(1), 53-59.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF>.
- Domingues, P., Sykes, A., Sommerfield, A., Almansa, E., Lorenzo, A., Andrade, P. 2004. Growth and survival of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) of

- different ages fed crustaceans and fish. Effects of frozen and live prey. *Aquaculture* 229, 239-254.
- Domingues, P.M., DiMarco, F.P., Andrade, J.P., Lee, P.G., 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquac. Int.* 13, 423–440.
- Domingues, P.M., López, N., Muñoz, J.A., Maldonado, T., Gaxiola, G., Rosas, C., 2007. Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquacult. Nutr.* 13(A), 273-280.
- Domingues, P.M., Marquez, L., López, N., Rosas, C., 2009. Effects of food thermal treatment on growth, absorption, and assimilation efficiency of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquacult. Int.* 17, 283–299
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.

E

- Erfanullah, A.K.J., 1995. Protein-sparing effect of dietary carbohydrate in diets for fingerling *Labeo rohita*. *Aquaculture* 136, 331-339.
- Estefanell, J., Socorro, J., Roo, J., Naranjo, D., Martín, A., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., 2009. Utilización de cangrejo y harina en el pienso para pulpo común *Octopus vulgaris*. XII Congreso Nacional de Acuicultura, Madrid, Spain, pp.106-107.
- Estefanell, J., Socorro, J., Guirao, R., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Roo, J., 2010. First data on *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) on-growing in benthic cages. In: EAS Aquaculture Europe 2010. Book of abstracts. Porto, Portugal, pp. 427-428.
- Estefanell, J., Roo, J., Guirao, R., Alfonso, J.M., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Socorro J., 2011a. Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed fresh and agglutinated moist diets based on aquaculture by-products and low price trash species. *Aquacult. Res.* doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03014.x.
- Estefanell, J., Socorro, J., Tuya, F., Izquierdo, M., Roo, J., 2011b. Growth, protein retention and biochemical composition in *Octopus vulgaris* fed on different diets based on crustaceans and aquaculture by-products. *Aquaculture* 322-323, 91-98.

Estefanell, J., Roo, J., Guirao, R., Izquierdo, M., Socorro, J., 2012a. Biological performance of *Octopus vulgaris* in integrated aquaculture models: effect of two potential fresh diets, sex and sexual maturation during the grow-out phase. *Aquac. Res.*, doi: 10.1111/are.12094.

Estefanell, J., Roo, J., Guirao, R., Izquierdo, M., Socorro, J., 2012b. Growth, mortality, and biochemical composition in *Octopus vulgaris* reared under different conditions of sex ratio. *J. World Aquacult. Soc.*, 44(1), 66-75.

F

Fernández, F., Miquel, A.G., Córdoba, M., Varas, M., Metón, I., Caseras, A., Baanante, I.V., 2007. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343, 1–10.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-507.

G

Gairin, I., Tomás, A., Rodríguez, C.J, Duncan, N., Querol, P., Pascual, M.C., 2011. Engorde del pulpo (*Octopus vulgaris*) con dos dietas artificiales, una semi-húmeda y otra seca extruida. In: Villarroya, M., Reig, L., Almansa, C. (Eds), XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Castelldefels, Barcelona, Spain, pp. 143-144.

García García, B., Aguado-Giménez, F., 2002. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 211, 171-182.

García García, B., Cerezo Valverde, J., 2004. Influencia del número de días de ayuno a la semana sobre el crecimiento, el índice de conversión y la supervivencia en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797). *Revista AquaTIC*, nº 21, Julio – Diciembre. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=177>].

García García, B., Cerezo Valverde, J., 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on-growing. *Aquaculture* 253, 502-511.

García García, B., Cerezo Valverde, J., Aguado-Giménez, F., García García, J., 2009. Growth and mortality of common octopus *Octopus vulgaris* reared at different

- stocking densities in Mediterranean offshore cages. *Aquacult. Res.* 40, 1202-1212.
- García García, B., Cerezo Valverde, J., Gómez, E., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F., 2011. Ammonia excretion of octopus (*Octopus vulgaris*) in relation to body weigh and protein intake. *Aquaculture* 319, 162–167.
- García García, J., Rodríguez González, L.M., García García, B., 2004. Cost analysis of octopus ongrowing installation in Galicia. Spain. *J. Agric. Res.* 2, 531-537.
- García García, J., García García, B., 2011. Econometric model of viability/profitability of octopus (*Octopus vulgaris*) ongrowing in sea cages. *Aquacult. Int.*, doi: 10.1007/s10499-011-9432-1.
- García-Garrido, S., Hachero-Cruzado, I., Garrido, D., Rosas, C., Domingues, P., 2010. Lipid composition of the mantle and digestive gland of *Octopus vulgaris* juveniles (Cuvier, 1797) exposed to prolonged starvation. *Aquaculture Int* 18,1223-1241.
- García-Garrido, S., Hachero-Cruzado, I., Rosas, C., Domingues, P., 2012. Protein and amino acid composition from the mantle of juvenile *Octopus vulgaris* exposed to prolonged starvation. *Aquaculture Res.* doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03180.x.
- García, S., Domingues, P., Navarro, J.C., Hachero, I., Garrido, D., Rosas, C., 2010. Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquacult. Nutr.* 17 (2), 174-187.
- Gómez, E., Mazón, M.J., Piedecausa, M.A., García García, B., 2005. Efecto de la concentración de amoníaco total sobre la tasa de excreción en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* L): resultados preliminares. In: Jover M, de la Gandara F (Eds.). *Book of Abstracts, X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía, Spain, pp. 386-387.
- Graziadei, P., 1964a. Electron microscopy of some primary receptors in the sucker of *Octopus vulgaris*. *Zeitschrift für Zellforschung.* 64, 510-522.
- Graziadei, P., 1964b. Receptors in the sucker of the cuttlefish. *Nature.* 203, 384-386.
- Guerra, A., 1978. Sobre la alimentación y el comportamiento alimentario de *Octopus vulgaris*. *Invest. Pesq.* 42(2), 351-364.
- Guerra, A., Nixon, M., 1987. Crab and mollusc shell drilling by *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) in the Ria de Vigo (north-west Spain). *J. Zool. Lond.* 211, 515-523.

H

- Hamdan, M., Cerezo Valverde, J., Moyano, F. J., García García, B., Jover, M. 2007. Estudio de la bioquímica digestiva del pulpo (*Octopus vulgaris*) como herramienta para la modelización in vitro de su digestión. In: Cerviño, A., Guerra, A., Pérez, C. (Eds.). Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura (Tomo I). Vigo, Spain. pp. 663-666.
- Hanlon, R.T., Bidwell, J.P., Tait, R., 1989. Strontium is required for statolith development and thus normal swimming behaviour of hatchling cephalopods. J. Exp. Biol. 141, 187-195.
- Heras, H., Pollero, R.J., 1990. Occurrence of plasma lipoproteins in octopods. Partial characterization and interorgan transport of lipids. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 140, 29-38.
- Heras H., Pollero., R.J., 1992. Hemocyanin as an apolipoprotein in the hemolymph of the cephalopod *Octopus tehuelchus*. Biochem. Biophys. Acta. 1125(3), 245-250.
- Hernández, M.D., García García, B., 2004. Digestibility of natural foods in common octopus (*Octopus vulgaris*). Biotechnologies for Quality. Aquaculture Europe 2004. Barcelona, Spain, pp. 414-415.
- Hochachka, P. W., Fields, J. H. A., 1982. Arginina, glutamate, and proline as substrates for oxidative and glycogenesis in cephalopod tissues. Pac. Sci. 36, 325-336.
- Hoeger, U., Mommsen, T.P., O'Dor, R.K., Webber, D., 1987. Oxygen uptake and nitrogen excretion in two cephalopods, octopus and squid. Comp. Biochem. Physiol. 87(A), 63-67.
- Iglesias, J., Sánchez, F.J., Otero, J.J., 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris*) en el Instituto Español de Oceanografía. In: Costa, J., Abellán, E., García García, B., Ortega, A., Zamora, S. (Eds.), Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena. MAPA, Madrid, pp. 221-226.
- Iglesias, J., Sánchez, F.J., Otero, J.J., 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., Sánchez, F.J., 2004. The complete life cycle of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier) under culture conditions: paralarvae

rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to eight months of age. *Aquac. Int.* 12, 481-487.

Iglesias, J., Sánchez, F.J., Bersano, J.G.F., Carrasco, J.F., Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J.L., Okumura, S., Roo, F.J., Van der Meeren, T., Vidal, E.A.G., Villanueva, R., 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture* 266, 1-15.

Iwasaki, M., Harada, R., 1985. Proximate amino acid composition of the roe and muscle of selected marine species. *J. Food Sci.* 50, 1585-1587.

J

Jhaveri, S.N., Karakoltsidis, P.A., Montecalvo, J., Constantidides, S.M., 1984. Chemical composition and protein quality of some southern New England marine species. *J. Food Sci.* 49, 110-113.

K

Kanazawa, A., 2001. Sterols in marine invertebrates. *Fish. Sci.* 67, 997-1107.

Karim, A.A., Rajeev Bhat., 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospect as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 23, 563-576.

Kasper, C.S., Brown, P.B., 2003. Growth improved in juvenile Nile tilapia fed phosphatidylcholine. *N. Am. J. Aquac.* 65, 39-43.

Katsanevakis, S., Stephanopoulou, S., Miliou, H., 2005. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda) in relation to body mass and temperature. *Mar. Biol.* 146, 725-732.

L

Lee, P.G., Forsythe, J.W., DiMarco, F.P., DeRusha, R., Hanlon, R.T., 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bull. Mar. Sci.* 49, 362-372.

Lee, P.G., 1992. Chemotaxis by *Octopus maya* Voss et Solis in a Y-maze. *J.Exp.Mar. Biol.Ecol.* 153, 53-57.

Lee, P.G., 1994. Metabolic substrates in cephalopods. In: Pörtner, H.O., O'Dor, R.K., MacMillan, D.L. (Eds.), *Physiology of Cephalopod Mollusc. Lifestyle and Performance Adaptations*. Gordon and Breach Publishers, Basel, Switzerland, pp. 35-51.

- López, M., Rodríguez, C., Carrasco, J.F., 2009. Engorde de juveniles de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) con distintas dietas naturales y artificiales. In: Beaz D, Villarroel M, Cárdenas S (Eds.). Book of abstracts. XII Congreso Nacional de Acuicultura, Madrid, Spain, pp. 170-171.
- Luaces-Canosa, M., Rey-Méndez, M., 1999. El engorde industrial del pulpo (*Octopus vulgaris*) en jaulas: análisis de dos años de cultivo en la Ría de Camariñas (Galicia). VII Congreso Nacional de Acuicultura (1999). In: Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M. (Eds.), Convergencia entre Investigación y Empresa: Un reto para el Siglo XXI, Monografías del ICCM, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, pp. 184-189.

M

- Macala, L.J., Yu, R.K., Ando, S., 1983. Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry. *J. Lipid Res.* 24, 1243-1250.
- Maldonado, 1964. The control attack by *Octopus*. *Z. vergl. Physiol.* 47, 656-674.
- Mangold, K.M., 1983. *Octopus vulgaris*. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*, vol.1. Academic Press, London, pp. 335-364.
- Mangold, K., Boletzky, S.V., 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.* 19, 7-12.
- Mariotti, F., Tomé, D., Mirand, P.P., 2008. Converting nitrogen into protein-beyond 6.25 and Jones' factors. *Crit. Rev. Food Sci.* 48(2), 177-84.
- Maynard, L.A., Loosli, L.K., 1969. *Animal Nutrition*, 7th Ed. MacGrawHill Book Company, New York, pp. 613.
- Mazón, M.J., Piedecausa, M.A., Hernández, M.D., García García, B., 2007. Evaluation of environmental nitrogen and phosphorus contributions as a result of intensive ongrowing of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 266, 226-235.
- Miglav, I., Jobling, M., 1989. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish. Biol.* 35, 1-11.
- Miliou, H., Fintikaki, M., Kountouris, T., Verriopoulos, G., 2005. Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Aquaculture* 249, 245-256.
- Miller, K.I. 1994. Cephalopod haemocyanins. A review of structure and function. In: Pörtner, H.O., O'Dor, R.K., MacMillan, D.L. (Eds), *Physiology of Cephalopod*

- Mollusc. Lyfestyle and Performance Adaptations. Gordon and Breach Publishers, Basel, Switzerland, pp. 101-120.
- Miramand, P., Guary, J.C., 1980. High concentrations of some heavy metals in tissues of the Mediterranean octopus. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 783–788.
- Miramand, P., Bentley, D., 1992. Concentration and distribution of heavy metals in tissues of two cephalopods, *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis*, from the French coast of English Channel. *Mar. Biol.* 114, 407-414.
- Miramand, P., Bustamante, P., Bentley, D., Kouéta, N., 2006. Variation of heavy metal concentrations (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V, Zn) during the life cycle of the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Sci. Total Environ.* 361, 132–143.
- Moltschaniwskyj, N.A., Johnston, D., 2006. Evidence that lipid can be digested by the dumpling squid *Euprymna tasmanica*, but is not stored in the digestive gland. *Mar. Biol.* 149, 565-572.
- Mommsen, T.P., Hochachka, P.W., 1981. Respiratory and enzymatic properties of squid heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 120, 345-350.
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García, B., 2011a. Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Molluscan. Stud.* 77, 318–320.
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F., García García, B., 2011b. Aceptabilidad de distintos ingredientes para la formulación de piensos para el pulpo común (*O. vulgaris*). In: Villarroel, M., Reig, L., Almansa, C. (Eds), XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Castelldefels, Barcelona, Spain, pp. 109-110.
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F., García García, B., 2012a. Growth and digestibility of formulated diets based on dry and freeze-dried ingredients in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 368-369, 139–144.
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García, B., 2012b. Changes in lipid composition of different tissues of common octopus (*Octopus vulgaris*) during short-term starvation. *Aquacult. Res.* doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03131.x.
- Moxica, C., Linares F., Otero J.J., Iglesias J., Sánchez F.J., 2002. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4), 31-36.

N

- Navarro, J.C., Villanueva, R., 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183, 161-177.
- Navarro, J.C., 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.
- Nardi, G., Muzii, E.O., Puca, M., 1971. Ferritin in the hepatopancreas of *Octopus vulgaris* Lam. *Comp. Biochem. Physiol.* 40(B), 199-205.
- Nixon, M., 1969. The time and frequency of responses by *Octopus vulgaris* to an automatic food dispenser. *J. Zool. Lond.* 158, 475-483.
- Nixon, M., 1979. Hole-boring in shells by *Octopus vulgaris* Cuvier in the Mediterranean. *Malacologia.* 18, 431-443.
- Nixon, M., 1980. The salivary papilla of *Octopus* as an accessory radula for drilling shells. *J. Zool. Lond.* 190, 53-57.
- Nixon, M., Maconnachie, E., 1988. Drilling by *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) in the Mediterranean. *J.Zool.Lond.* 216, 687-716.

O

- O'Dor, R.K., Mangold, K., Boucher-Rodoni, R., Wells, M.J., Wells, J., 1984. Nutrient Absorption, Storage and Remobilization in *Octopus vulgaris*. *Mar.Behav.Physiol.* 11, 239-258.
- O'Dor, R.K., Wells, M.J., 1987. Energy and nutrient flow. In: Boyle, P.R. (Ed.). *Comparative Reviews, Cephalopod Life Cycles, Vol II.* Academic Press, London, pp. 109-134.
- Olsen, R.E., Henderson, R.J., 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double- development HPTLC and scanning densitometry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 129, 189-197.
- Okutani, K., Kimata, M., 1964. Studies on chitinolytic enzymes present in aquatic animals. III. Distribution of chitinase digestive organs of a few kinds of aquatic animals. *Nippon Suisam Gakkaishi. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 30, 574-576.

P

- Petza, D., Katsanevakis, S., Verriopoulos, G., 2006. Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed ad libitum on a high-lipid diet. Mar. Biol. 148, 827-832.
- Petza, D., Katsanevakis, S., Lykouri, N., Spiliotis, V., Verriopoulos, G., 2010. Investigation of the potential effect of diet, body mass and maturity on growth and feed performance of common octopus *Octopus vulgaris*: an information theory approach. Aquacult. Nutr. doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00769.x.
- Prato, E., Portacci, G., Biandolino, F., 2010. Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. Aquaculture. 309, 203-211.

Q

- Querol, P., Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valeverde, J., Martinez Llorens, S., Moñino, A.V., Jover, M., Tomás A., 2012a. First assessment of acceptance of dry extruded diets for *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). Aquaculture Res. doi: 10.1111/are.12006.
- Querol, P., Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Martinez Llorens, S., Moñino A.V., Jover, M., Tomás A., 2012b. Inclusion of fish and krill meal in extruded diets for *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): assessment of acceptance. Aquaculture Res. doi: 10.1111/are.12093.
- Quintana, D., Domingues, P.M., 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, 161-164.

R

- Rama-Villar, A., Faya-Angueira, V., Moxica, C., Rey-Méndez, M., 1997. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) en batea. In: Costa, J., Abellán, E., García García, B., Ortega, A., And Zamora, S. (Eds.), Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena. MAPA, Madrid, pp. 245-250.
- Raimundo, J., Caetano, M., Vale, C., 2004. Geographical variation and partition of metals in tissues of *Octopus vulgaris* along the Portuguese coast. Sci. Total Environ. 325, 71-81.

- Raimundo, J., Pereira, P., Vale, C., Caetano, M., 2005. Fe, Zn, Cu and Cd in the digestive gland and muscle tissues of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* from coastal areas in Portugal. *Cienc. Mar.* 31, 243–251.
- Rao, N.G.S., 1987. Studies on the growth of fry and fingerlings of selected carps fed on formulated fish feeds. Ph.D. Thesis. Bangalore University, Bangalore, pp. 170.
- Rocca, E., 1969. Copper distribution in *Octopus vulgaris* Lam. hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 28, 67–82.
- Rodríguez, C., Carrasco, J.F., Arronte, J.C., Rodríguez, M., 2006. Common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile on-growing in floating cages. *Aquaculture* 254, 293-300.
- Rodríguez-Domínguez, H., Soto-Búa, M., Iglesias Blanco, R., Crespo-González, C., Arias-Fernández, C., García Estévez, J., 2006. Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro. *Aquaculture* 254, 563–570.
- Romjin, C., 1935. Die Verdauungsenzyme bei einigen ephalopoden. *Arch. Neerl. Zool.* 1, 373-431.
- Rosa, R., Pereira, J., Nunes, M.L., 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to a giant squid, *Architeuthis* sp. *Mar. Biol.* 146, 739-751.
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa V., Pascual, C., Arena L., Domingues, P.M., Cuzon, G., 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture* 275, 291-297.

S

- Sánchez, F.J., Iglesias, J., Moxica, C., Otero, J.J., 1988. Growth of Octopus (*Octopus vulgaris*) males and females under culture conditions. *ICES CM* 1998/M: 47.
- Sánchez, M., Hernández, M.D., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2009. Protein and lipid digestibility in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Cephalopod International Advisory Council*. Vigo, Spain, pp. 86.
- Schipp, R., Hevert, F., 1978. Distribution of copper and iron in some central organs of *Sepia officinalis* (Cephalopoda). A comparative study by flameless atomic absorption and electron microscopy. *Mar Biol.* 47, 391–9.

- Segawa, S., Hanlon, R.T., 1988. Oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Octopus maya*, *Loligo forbesi* and *Lolliguncula brevis* (Mollusca: Cephalopoda). *Mar. Behav. Physiol.* 13, 389-400.
- Seiça Neves, M.M., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2010. Digestibility of a formulated diet with alginate as binder in octopus. In: EAS Aquaculture Europe 2010. Book of abstracts. Porto, Portugal, pp. 500-501.
- Sek, L., Porter, C.J., Kaukonen, A.M., Charman, W.N., 2001. Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 29-41.
- Semmens, 1998. An examination of the role of the digestive gland of two loliginid squids, with respect to lipid: storage or excretion? *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265, 1685-1690.
- Sidwell, V.D., 1981. Chemical and nutritional composition of fishes, whales, crustaceans, mollusks and their products, NOAA Technical Memorandum NMFS F/SEC-11, U.S. Department of Commerce, Washington, DC, PP 432.
- Sieiro, M.P., Aubourg, S.P., Rocha, F., 2006. Seasonal study of the lipid composition in different tissues of the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 479-487.
- Sinanoglou, V.J., Miniadis-Meimaroglou, S., 1998. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Res. Int.* 31, 467-473.
- Sinanoglou, V.J., Meimaroglou, D., Miniadis-Meimaroglou, S., 2008. Triacylglycerols and their fatty acid composition in edible Mediterranean molluscs and crustacean. *Food Chem.* 110, 406-413.
- Smith, J.D., Plues, L., Heyraud, M., Cherry, R.D., 1984. Concentrations of the elements Ag, Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Pb and Zn, and the radionuclides ²¹⁰Pb and ²¹⁰Po in the digestive gland of the squid *Nototodarus gouldi*. *Mar. Environ. Res.* 13, 55-68.
- Soldevilla, F., 1987. Metales pesados en el pulpo común (*Octopus vulgaris*) del banco sahariano (costas NO de Africa). *Alimentaria* 33, 33-37.
- Suyama, M., Kobayashi, H., 1980. Free amino acids and quaternary ammonium bases in mantle muscle of squids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45, 1261-1264.

T

- Tait, R.W., 1986. Aspects physiologiques de la sénescence post reproductive chez *Octopus vulgaris*. Ph. D. Thèse. L'Université ParisVI.
- Thomas, M., van Vliet, T., van der Poel, A.F.B., 1998. Physical quality of pelleted animal feed 3. Contribution of feedstuff components. Anim. Feed Sci. Technol. 70, 59-78.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.Å., Campbell, P.J., Bell, J.G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. Aquaculture. 280, 21-34.
- Trago, L.C., Donangelo, C.M., Trago, N.M.F., Knudsen, K.E., 2000. Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. J. Agric. Food Chem. 48, 2082-2086.
- Tucker, J.W., 1998. Marine Fish Culture. Kluwer Academic Publishers, London.
- Tuñón E., Parada, A., Caeiro, C., Rey-Méndez, M., 2002. Estudio comparativo basado en la dieta diferenciada para el engorde de pulpo *Octopus vulgaris*, Cuvier 1797; en una explotación industrial. In: Rey-Méndez, M., Fernández Casal, J., Izquierdo Rodríguez, M. (Eds.), IV Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas. O Grove, Spain, pp. 255-269.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. Rev. Aquaculture 1, 10-57.

V

- Vaz-Pires, P., Seixas, P., Barbosa, A., 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. Aquaculture 238, 221-238.
- Villanueva, R., 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 2639-2650.
- Villanueva, R., Bustamante, P. 2006. Composition in essential and non-essential elements of early stages of cephalopods and dietary effects on the elemental profiles of *Octopus vulgaris* paralarvae. Aquaculture 261(1), 225-240.
- Villanueva, R., Escudero, J.M., Deulofeu, R., Bozzano, A., Casoliva, C., 2009. Vitamin A and E content in early stages of cephalopods and their dietary effects in *Octopus vulgaris* paralarvae. Aquaculture 286, 277-282.

W

Wells, M.J., O`Dor, R.K., Mangold, K., Well, J., 1983. Feeding and metabolic rate in *Octopus*. Mar. Behav. Physiol. 9, 305-317.

Wells, M.J., Clarke, A., 1996. Energetics: the cost of living and reproducing form an individual cephalopod. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 351, 1083-1104.

Z

Zamora, C.M., Olivares, P.A., 2004. Variaciones bioquímicas e histológicas asociadas al evento reproductivo de la hembra de *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda). Int. J. Morphol. 22(3), 207-216.

ANEXO

Anexo 1: Recetas de pulpo.

Pulpo con chirlas y setas.

Ingredientes para 4 personas:

- Un pulpo de 1 kg aproximadamente
- 200 g de chirlas
- 3 diente de ajo
- 1 cebolla
- 100g de setas de cardo
- aceite de oliva virgen extra
- 2 hojas de laurel,
- 1 cucharadita de pimentón picante,
- 1/2 vaso de vino blanco
- sal

Elaboración:

Limpiar y lavar el pulpo.

Poner una olla con agua, sal y las hojas de laurel a fuego fuerte, cuando rompa a hervir sumergir el pulpo, esperar a que vuelva a hervir fuerte y sacar el pulpo. Repetir este procedimiento tres o cuatro veces para evitar que la piel del pulpo se rompa. Cocer el pulpo durante 50-60 minutos aproximadamente (hasta que lo pinchemos con un palillo y esté blando) sacar y trocear.

En una cacerola con un chorro de aceite de oliva, pochar el ajo picado, después la cebolla picada y seguidamente las setas limpias y troceadas. Por último añadir las almejas, cuando se abran incorporar el pimentón y la sal. Añadir el vino blanco antes de que se queme el pimentón y dejar reducir a fuego lento.

A continuación poner el pulpo troceado y un vaso del agua de la cocción del mismo, dejar reducir durante 5 minutos.

Crema de borreta con pulpo.

Ingredientes para 4 personas:

- Un pulpo de 1 kg aproximadamente
- 4 huevos
- 400 g de espinacas frescas
- 6 patatas rojas medianas
- 1 cebolla
- 1 cucharadita de pimentón
- aceite de oliva virgen extra
- 1 cucharada de margarina
- 1 cucharada de piñones
- sal

Elaboración:

Limpiar y lavar el pulpo.

Poner una olla con agua y sal a fuego fuerte, cuando rompa a hervir sumergir el pulpo, esperar a que vuelva a hervir fuerte y sacar el pulpo. Repetir este procedimiento tres o cuatro veces para evitar que la piel del pulpo se rompa. Cocer el pulpo durante 50-60 minutos aproximadamente (hasta que lo pinchemos con un palillo y esté blando). Sacar el pulpo y separar las patas enteras de la cabeza.

Dorar los piñones con aceite de oliva a fuego muy lento, retirar los piñones, escurrirlos el aceite y dejarlos enfriar.

Escalfar los huevos y reservar.

Limpiar las espinacas, pelar y partir las patatas y la cebolla en cuatro trozos. Poner en una olla $\frac{3}{4}$ partes del agua de cocción del pulpo y $\frac{1}{4}$ parte de agua, introducir las patatas, la cebolla y las espinacas y cuando empiece a hervir, añadir el pimentón, la sal y el aceite utilizado previamente para dorar los piñones. Cocer a fuego lento durante 30 minutos. Después con la ayuda de una espumadera retirar las patatas, cebolla y espinacas, colocarlas en un recipiente junto a la margarina y con la ayuda de la batidora triturar los ingredientes, añadiendo agua de cocción o leche (según gusto) hasta conseguir una crema suave.

Montar el plato: en un plato hondo colocar la crema, sobre ella el huevo escalfado, el pulpo y los piñones.