

Mejora del valor nutricional del cangrejo rojo *Grapsus adscensionis* (Osbeck, 1765) como potencial alimento en la acuicultura del pulpo común *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797)

Improvement of the nutritional value of the rock crab *Grapsus adscensionis* (Osbeck, 1765) as a potential food for aquaculture of the common octopus *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797)

Rodrigo Pérez Enrech

Máster Universitario en Biología Marina: Biodiversidad
y Conservación

Septiembre, 2020

El **Dr. José Antonio Pérez Pérez**, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad de La Laguna y el **Dr. Eduardo Almansa Berro**, Investigador Titular del Instituto Español de Oceanografía, como Tutor Académico y Tutor Externo, respectivamente,

DECLARAN:

Que la memoria presentada por el Graduado en Biología, **D. Rodrigo Pérez Enrech** titulada “Mejora del valor nutricional del cangrejo rojo *Grapsus adscensionis* (Osbeck, 1765) como potencial alimento en la acuicultura del pulpo común *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797)”, ha sido realizada bajo su dirección y consideran que reúne todas las condiciones de calidad y rigor científico requeridas para optar a su presentación como Trabajo de Fin de Máster, en el Máster Oficial de Postgrado de Biología Marina: Biodiversidad y Conservación de la Universidad de La Laguna, curso 2019-2020.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente informe favorable en San Cristóbal de La Laguna a 07 de septiembre de 2020.



Fdo. Dr. José A. Pérez Pérez

Fdo. Dr. Eduardo Almansa Berro

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2775276 Código de verificación: fH2BqV5Y

Firmado por: José Antonio Pérez Pérez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 07/09/2020 01:20:23

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Estado del cultivo de pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>), Cuvier, 1797, en el mundo	2
1.2. Biología del pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>)	5
1.3. Dieta	7
1.4. Cangrejo rojo (<i>Grapsus adscensionis</i> ; Osbeck, 1765)	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1. Obtención de ejemplares de <i>G. adscensionis</i>	12
3.2. Cultivo de reproductores	12
3.3. Alimentación de los reproductores	13
3.4. Análisis bioquímicos de las zoeas	14
3.4.1. Extracción lipídica y determinación del contenido de humedad	14
3.4.2. Determinación del perfil de clases lipídicas	15
3.4.3. Determinación del perfil de ácidos grasos	17
3.4.4. Extracción y cuantificación de pigmentos	18
3.4.5. Determinación del nivel de peróxidos	19
3.5. Análisis estadísticos	20
4. RESULTADOS	22
4.1. Dietas experimentales para reproductores de <i>G. adscensionis</i>	22
4.1.1. Composición lipídica y contenido de humedad	22
4.1.2. Contenido de pigmentos e Índice de peróxidos	31
4.2. Zoeas de reproductores de <i>G. adscensionis</i> alimentados con las distintas dietas experimentales	33
4.2.1. Composición lipídica	33
4.2.2. Presencia de pigmentos carotenoides	38
5. DISCUSIÓN	39
5.1. Composición bioquímica de las dietas y las zoeas de <i>G. adscensionis</i>	39
5.2. Presencia y abundancia de pigmentos carotenoides en las dietas y zoeas de <i>G. adscensionis</i>	43
5.3. Diferencias en la oxidación en las dietas de reproductores de <i>G. adscensionis</i>	44
6. CONCLUSIONES	46
7. BIBLIOGRAFÍA	47

Resumen

Actualmente, el pulpo común (*Octopus vulgaris*) es una especie de gran interés para la diversificación de la acuicultura, si bien su cultivo se encuentra restringido por los altos índices de mortalidad y bajo crecimiento en la fase de paralarva, lo cual se debe principalmente a que no se dispone de una dieta que cubra sus requerimientos nutricionales. Las zoeas del cangrejo rojo (*Grapsus adscensionis*) han demostrado ser un alimento aceptado por las paralarvas de pulpo, aunque no logran un crecimiento óptimo, posiblemente debido a determinadas carencias nutricionales. El objetivo de este estudio fue mejorar el perfil nutricional de las zoeas de cangrejo rojo a través de la dieta de los reproductores. Para ello, se seleccionaron y analizaron tres dietas diferentes, una monodieta de caballa (*Scomber scomber*); una dieta multiespecífica de galera (*Squilla mantis*), chipirón (*Loligo opalescens*), langostino (*Penaeus vannamei*), almeja (*Meretrix lyrata*) y limanda (*Limanda limanda*); y una última dieta basada en galera y chipirón. Las zoeas obtenidas de cada grupo de reproductores fueron recolectadas y se analizó su contenido lipídico y de carotenoides.

Las diferentes dietas mostraron diferencias significativas en el perfil lipídico, contenido de carotenoides y en el nivel de peróxidos. Por su parte, las zoeas procedentes de la monodieta de caballa mostraron un menor nivel de lípido total y triacilglicéridos, así como menor contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga esenciales como el araquidónico (ARA), eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA). Los mayores niveles de carotenoides se encontraron en las zoeas procedentes de la dieta multiespecífica y los menores en el grupo de la monodieta. Las diferencias obtenidas en el perfil nutricional de dietas y zoeas son discutidas en base a su uso potencial como presa de paralarvas del pulpo común.

Palabras clave: Nutrición, *Grapsus adscensionis*, Dieta alternativa, *Octopus vulgaris*, Acuicultura.

Abstract

Currently, the common octopus (*Octopus vulgaris*) is a specie of great interest for the diversification of aquaculture, even though its culture is currently restricted by the high mortality and low growth obtained during the paralarvae phase, which is mainly due to lack of a diet that meets its nutritional requirements. Rock crab (*Grapsus adscensionis*) zoeae have been proved to be a suitable food for octopus paralarvae, although they do not promote optimal growth, probably due to some nutritional deficiencies. The goal of this study was to improve the nutritional profile of the rock crab zoeae through the broodstock feeding. To this purpose, three different diets were selected and analysed, a mackerel (*Scomber scomber*) monodiet; a multispecific diet containing mantis shrimp (*Squilla mantis*), squid (*Loligo opalescens*), shrimp (*Penaeus vannamei*), clam (*Meretrix lyrata*) and dab (*Limanda limanda*); and finally, a diet based on mantis shrimp and squid. Zoeae from each broodstock were collected and their lipid and carotenoid contents determined.

Diets showed significant changes in their lipid profile, carotenoid content and peroxide level. Zoeae from the mackerel monodiet, showed a lower lipid and triacylglycerols levels, but also lower contents of essential long-chain polyunsaturated fatty acids such as arachidonic (ARA), eicopentaenoic (EPA) and docosahexaneic (DHA). Higher levels of carotenoids were found in zoeae from the multispecific diet, while the lower content was obtained in those from the monodiet. Differences found in the nutritional profile of the diets and zoeae are discussed based on their potential use as prey for the common octopus paralarvae.

Keywords: Nutrition, *Grapsus adscensionis*, Alternative diet, *Octopus vulgaris*, Aquaculture.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estado del cultivo de pulpo común (*Octopus vulgaris*), Cuvier, 1797, en el mundo

Actualmente, debido principalmente al gran aumento demográfico que se está produciendo a nivel mundial, el cultivo de alimentos de origen acuático se ha convertido en una práctica esencial para la supervivencia de la población. Ante la estabilización de la pesca de captura en las últimas décadas, ha sido la producción acuícola la que ha experimentado un gran incremento, lo cual ha permitido el aumento del consumo anual medio de pescado comestible desde los años 60 hasta la actualidad (Figura 1). Según la FAO, en el año 2017 más de la mitad (54,75%) de toda la producción pesquera mundial provino de la acuicultura, alrededor de 111 millones de toneladas (mt).

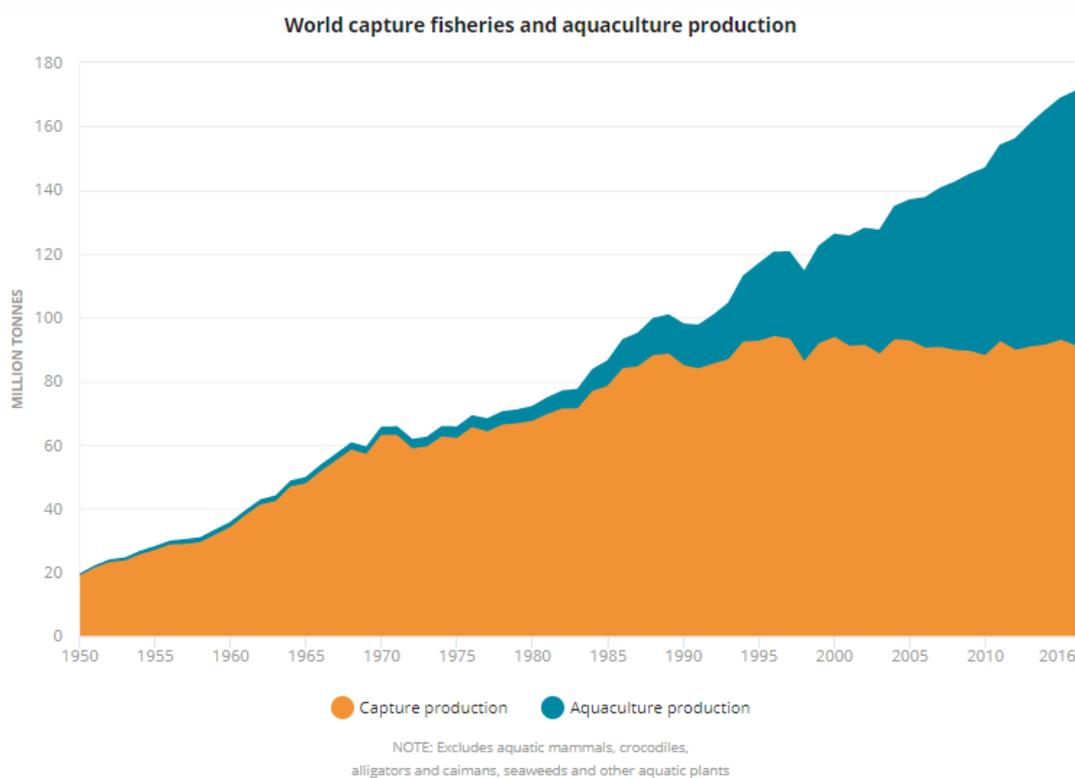


Figura 1. Capturas mundiales de pesquerías y producción de acuicultura. (FAO, 2018)

De acuerdo con las estimaciones de la FAO, en 2016 la producción mundial de la acuicultura alcanzó un valor de primera venta aproximado de 243.500 millones de dólares (USD). Si bien la velocidad de crecimiento de la acuicultura ha disminuido a lo largo del siglo XX, sigue aumentando a mayor ritmo que las otras actividades productivas principales de alimentos como la agricultura y la ganadería terrestre (FAO, 2018).

Entre los principales grupos de especies utilizadas en el comercio de productos pesqueros, los cefalópodos presentan una capacidad de crecimiento más alta que la mayoría. En la actualidad, apenas representan un 3,8% de este comercio, si bien su valor comercial aumenta hasta el 6,4% mundial (valor en USD). Con respecto a la especie de estudio del presente trabajo, el pulpo común (*Octopus vulgaris*), la producción global por captura en los últimos años se ha estabilizado en torno a las 35.000 t, si bien se puede observar una disminución general de estas capturas con respecto a las últimas dos décadas del siglo XX (Figura 2).

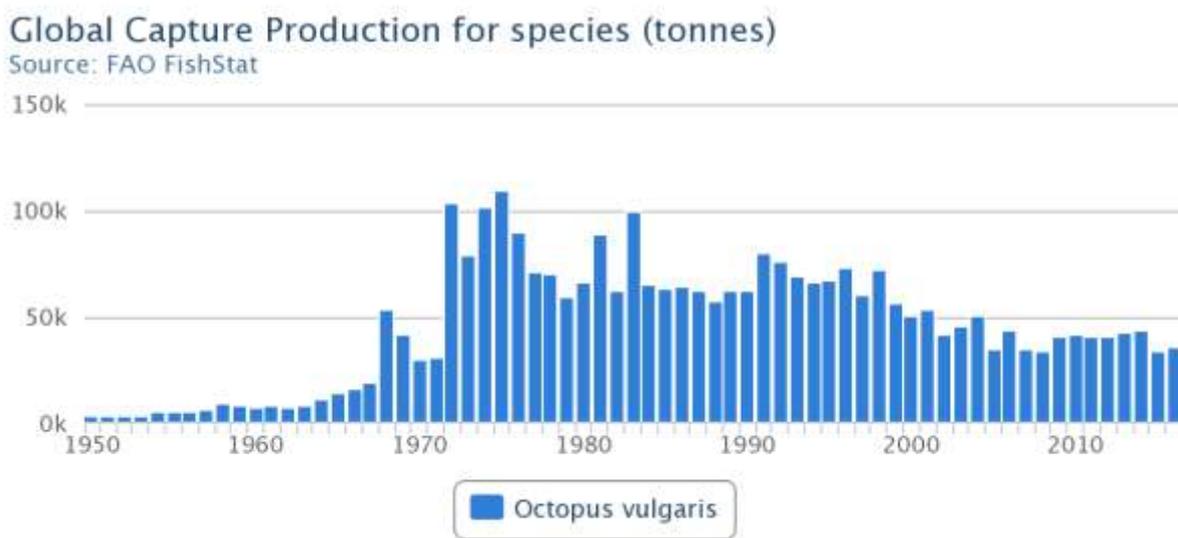


Figura 2. Captura global de Octopus vulgaris (miles de toneladas). (FAO, 2018)

A nivel mundial, Japón se mantiene en 2019 junto a diversos países europeos, tales como España, Italia y Portugal, como uno de los principales importadores de pulpo, con países como China, Marruecos y Mauritania como grandes exportadores de estos cefalópodos. Curiosamente, ciertos países presentan a la vez elevadas cantidades de exportación e importación de estas especies, tal como es el caso de China. Hay que tener en cuenta que estudios recientes han demostrado que *O. vulgaris* está compuesto realmente por varias especies

con diferencias morfológicas y genéticas (Avendaño et al., 2020), aunque estos resultados todavía no se tienen en cuenta a nivel comercial, puesto que se requiere un tiempo determinado para que los datos científicos sean validados e integrados.

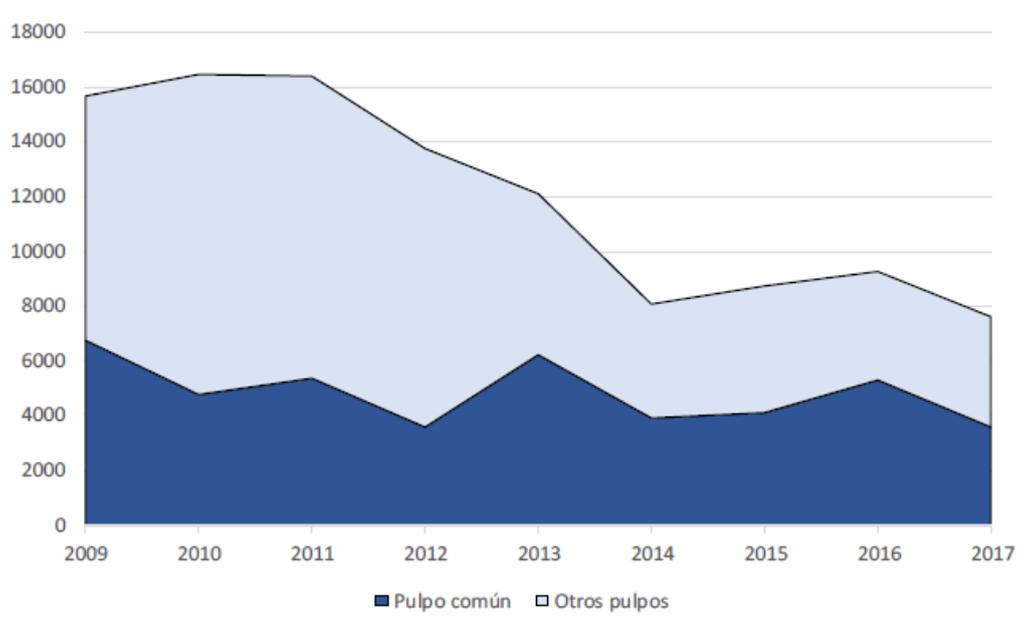


Figura 3. Evolución de las capturas de pulpo en España (toneladas) (EUMOFA, 2020)

A nivel europeo, la pesca de *O. vulgaris*, ha sufrido una disminución en la última década. De acuerdo con datos proporcionados por la FAO, en 2009 la producción comunitaria de esta especie era de alrededor de 21.000 t, mientras que en 2017 esta cifra se situó en 16.000 t, lo cual supone una reducción importante de las capturas. Dentro de la UE, los principales productores de *O. vulgaris* en 2017 fueron Portugal, España, Grecia, Italia y Francia, siendo la producción procedente del resto de Estados miembros cercana a cero (EUMOFA, 2020). A nivel nacional, España mostró, al igual que el resto de estados miembros, una fuerte reducción de las capturas, bajando en 8000 t, desde las 16000 t de 2009 hasta las 8000 t de 2017 (Figura 3). A nivel de la acuicultura, en 2015 su producción se limitaba al desarrollo de ejemplares salvajes capturados en el mar, pudiéndose capturar únicamente ejemplares de menos de 1 kg de peso. Esto se producía principalmente en España y otros países mediterráneos, debido a las dificultades del cultivo de la paralarva del pulpo (Jereb et al., 2015).

1.2. Biología del pulpo común (*Octopus vulgaris*)



Imagen 1. Ejemplar adulto de Octopus vulgaris (FAO Web)

O. vulgaris pertenece a la clase Cephalopoda, orden Octopoda y género Octopus. Es una especie que vive habitualmente en aguas templadas, si bien se ha observado que puede soportar temperaturas de hasta 6 °C, y se encuentra distribuida a lo largo de todo el globo (Figura 4).

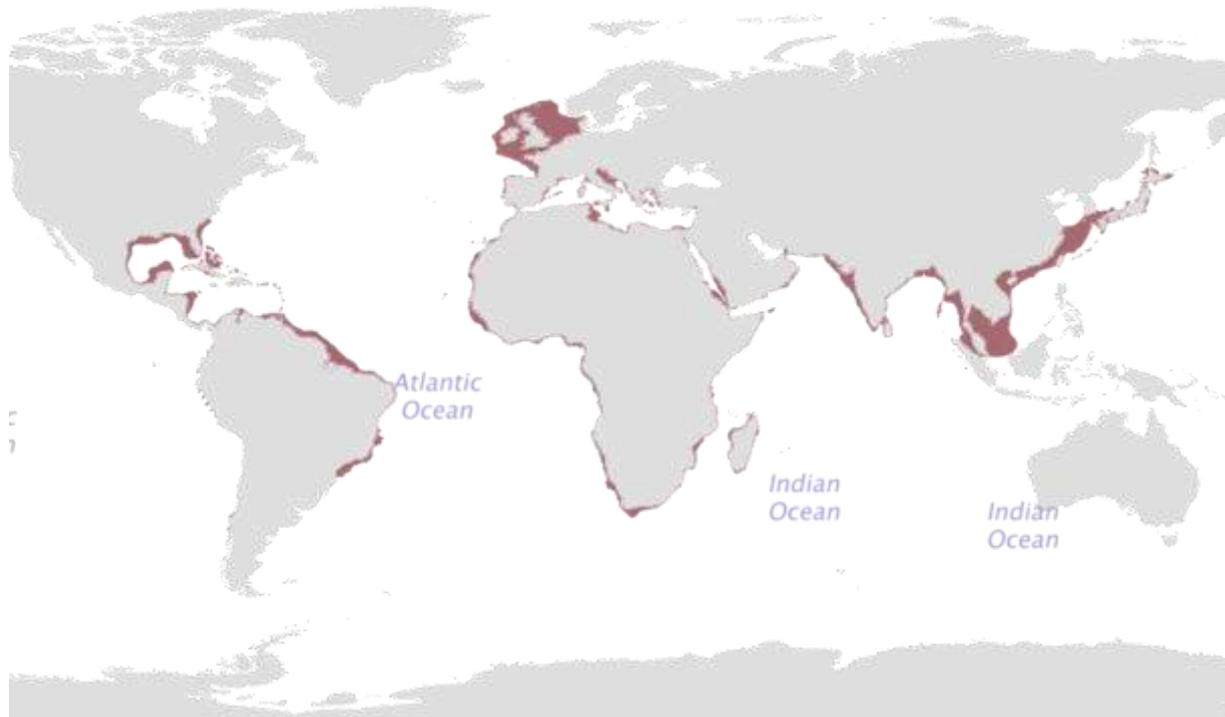


Figura 4. Distribución mundial de Octopus vulgaris (FAO Web)

Como se ha mencionado anteriormente, estudios recientes han demostrado que *O. vulgaris* contiene un grupo de seis especies de pulpos distintas, con caracteres morfológicos y genéticos que los diferencian (Avendaño et al., 2020). En algunos casos, como en el golfo de México, varias especies coexisten en el mismo hábitat, por lo cual resulta esencial su distinción para poder llevar a cabo su cultivo de la manera más adecuada para su correcto desarrollo.

En principio, esta especie presenta diversas características que la hacen favorable para su cultivo en tanques (Iglesias et al., 2007). Se adapta fácilmente a condiciones de cautividad, presenta un rápido crecimiento así como un alto contenido en proteínas y un alto ratio de conversión de la comida ingerida.

La velocidad de desarrollo del huevo depende fundamentalmente de la temperatura de incubación, produciéndose la eclosión alrededor de 30 días después de la puesta a 25 °C bajo condiciones controladas de laboratorio (Jereb et al., 2015). Los individuos eclosionados se denominan “paralarvas”, término acuñado por Young & Harman (1988), siendo durante esta fase de vida principalmente planctónicos (Villanueva et al., 1996). Esta etapa se extiende normalmente alrededor de 1 o 2 meses, dependiendo de las condiciones del medio en el que se encuentre. Transcurrido ese tiempo, las paralarvas pasan al medio bentónico, en el que permanecerán el resto de su vida, entre 12 y 15 meses (Jereb et al., 2015).

El estado de paralarva resulta el momento más crítico de desarrollo del pulpo en el ámbito de la acuicultura. Durante muchos años, este paso ha sido un cuello de botella, impidiendo cerrar el ciclo completo dentro de un tanque. Este hecho se debe principalmente al crecimiento y desarrollo inadecuado de la paralarva en sus primeras fases, en parte debido a su pobre alimentación, principalmente por la falta de aportación de determinados nutrientes esenciales para el pulpo, tales como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, del inglés polyunsaturated fatty acids). Así, durante muchos años únicamente se llevó a cabo el desarrollo de ejemplares adultos de *O. vulgaris* capturados en estado salvaje (Vaz-Pires et al., 2004). Para su alimentación se utilizaba principalmente *Artemia*, un crustáceo cuyas especies son fundamentalmente marinas. El uso de esta especie se debe a su fácil producción y cultivo, y actualmente es el alimento más habitual en las especies cultivadas en acuicultura. Sin embargo, el uso de *Artemia* como alimento para las paralarvas de *O. vulgaris* parece resultar insuficiente, puesto que a pesar de que se ha demostrado que pueden alimentarse de ella, presentan bajas proporciones de estos nutrientes esenciales, principalmente ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3) y ácido docosahexanoico (DHA, 22:6n-3) lo cual conlleva una pobre calidad

nutricional de la alimentación y por lo tanto, una tasa de supervivencia baja. En 2007, Iglesias y colaboradores demostraron la importancia de estos nutrientes, recomendando un estudio más profundo del tema y proponiendo el uso de copépodos y zoeas de cangrejos con el objetivo de mejorar su calidad nutricional y superar este problema.

1.3. Dieta

En la actualidad, diversos estudios han demostrado la importancia de una dieta equilibrada y rica en nutrientes esenciales en las paralarvas de *O. vulgaris* (Prato et al., 2010). De acuerdo con estos autores, la dieta presenta una gran influencia en el crecimiento, la supervivencia, la adquisición de nutrientes y la eficiencia alimenticia del pulpo tanto en estado salvaje como en condiciones de cultivo.

En estado salvaje, se ha observado que la dieta de juveniles y adultos de *O. vulgaris* se compone generalmente de diversos moluscos y crustáceos (Ambrose & Nelson, 1983; Quetglas et al., 1998). Las proporciones de las dietas encontradas pueden variar según el hábitat del pulpo, registrándose en ocasiones discrepancia entre distintos estudios realizados en una misma zona debido probablemente al uso de distintos métodos para estimar la dieta de los ejemplares capturados. Así, Ambrose (1983) observó una mayor presencia de moluscos en la dieta del pulpo común en el Mediterráneo utilizando como estimación los descartes de las presas, mientras que Guerra (1978) detectó una predominancia de los crustáceos mediante el estudio de los contenidos estomacales. Sin embargo, en general tanto estos como otros estudios más recientes (Smith, 2003; Prato et al., 2010) muestran resultados similares, además de una naturaleza oportunista, alimentándose de las presas más nutritivas que se puedan encontrar a su alcance dependiendo de su localización. A nivel de cultivos, se han demostrado los beneficios de las dietas combinadas sobre las monodietas (García & Cerezo, 2006). Así, una combinación de cangrejo mediterráneo (*Carcinus aestuarii*) y boga (*Boops boops*), parece garantizar unas tasas de crecimiento mayores en el pulpo adulto, así como una nutrición más adecuada que dietas monoespecíficas con una u otra especie.

En las paralarvas del pulpo, su dieta parece estar compuesta principalmente por distintos decápodos, destacando entre éstos diversas especies de cangrejos, si bien también destaca la presencia de copépodos, principalmente de la superfamilia Calanoidea. En menor frecuencia también se encontraron especies de distintos grupos taxonómicos tales como moluscos, peces o anfípodos (Roura et al., 2012; Olmos-Pérez et al., 2017). La distancia a la costa también

parece ser uno de los motivos de esta diversidad dietética, así como cambios en las condiciones oceanográficas que produzcan a su vez una modificación en las comunidades de zooplancton de la zona (Olmos-Pérez et al., 2017).

Los componentes nutricionales esenciales de su dieta parecen ser principalmente PUFA, con una dominancia de ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6), EPA y DHA (Prato et al., 2010). Este hecho debe tenerse en cuenta a la hora del cultivo de *O. vulgaris*, puesto que la deficiencia alimenticia es uno de los cuellos de botella que se encuentran los investigadores a la hora de conseguir tanto el correcto desarrollo de las paralarvas del pulpo como su adecuada calidad nutricional para el consumo humano (Zárate et al., 2017).

Es bien conocido que la presa más utilizada hasta el momento para la alimentación de las paralarvas en acuicultura es *Artemia*. Sin embargo, aunque esta presa parece ser aceptada por el pulpo durante esta fase, su composición nutricional resulta inadecuada para el correcto desarrollo de las paralarvas. En general, la *Artemia* no presenta la cantidad de PUFAs que precisa el pulpo para desarrollarse, principalmente EPA y DHA (Navarro et al., 1992). Por lo tanto, aunque puede usarse *Artemia* enriquecida en la alimentación de las paralarvas, es necesario complementarla con una presa alternativa o dieta inerte para un correcto desarrollo (Iglesias et al., 2014). En este sentido, varias especies de crustáceos se han mostrado adecuadas para el desarrollo de las paralarvas del pulpo común, como es el cangrejo araña (*Maja brachydactyla*), que fue utilizado en 2001 para conseguir cerrar el ciclo de vida de este pulpo (Iglesias et al., 2004). Asimismo, la quisquilla (*Palaemon elegans*) y el cangrejo rojo (*Grapsus adscensionis*), dos especies presentes de forma natural en las Islas Canarias, han demostrado tener efectos positivos en el crecimiento y en el contenido de PUFA en las paralarvas del pulpo (Reis, 2011).

En 2012, Shcherbakova volvió a utilizar al cangrejo rojo (*G. adscensionis*), como presa para la paralarva del pulpo para estudiar las diferencias con dietas basadas en nauplios y juveniles de *Artemia*. Este estudio obtuvo resultados significativos en el crecimiento y la supervivencia de paralarvas alimentadas con zoeas de *G. adscensionis* en comparación con la dieta de *Artemia*, pasando de un 9,61% de supervivencia a un 28,67% después de 15 días. Por lo tanto, la zoea de este cangrejo resultó ser candidata a ser utilizado para el cultivo de *O. vulgaris*, si bien su contenido nutricional podría ser mejorado con el objetivo de proporcionar un mejor crecimiento.

1.4. Cangrejo rojo (*Grapsus adscensionis*; Osbeck, 1765)

G. adscensionis, llamado comúnmente cangrejo rojo o cangrejo moro, es una especie perteneciente al phylum artrópodos, subphylum crustáceos. Su rango de distribución abarca la mayor parte del Atlántico oriental (Figura 5, WORMS). En la isla de Tenerife, esta especie se puede encontrar a lo largo de la costa de la isla, prefiriendo entornos rocosos en los que poder esconderse.

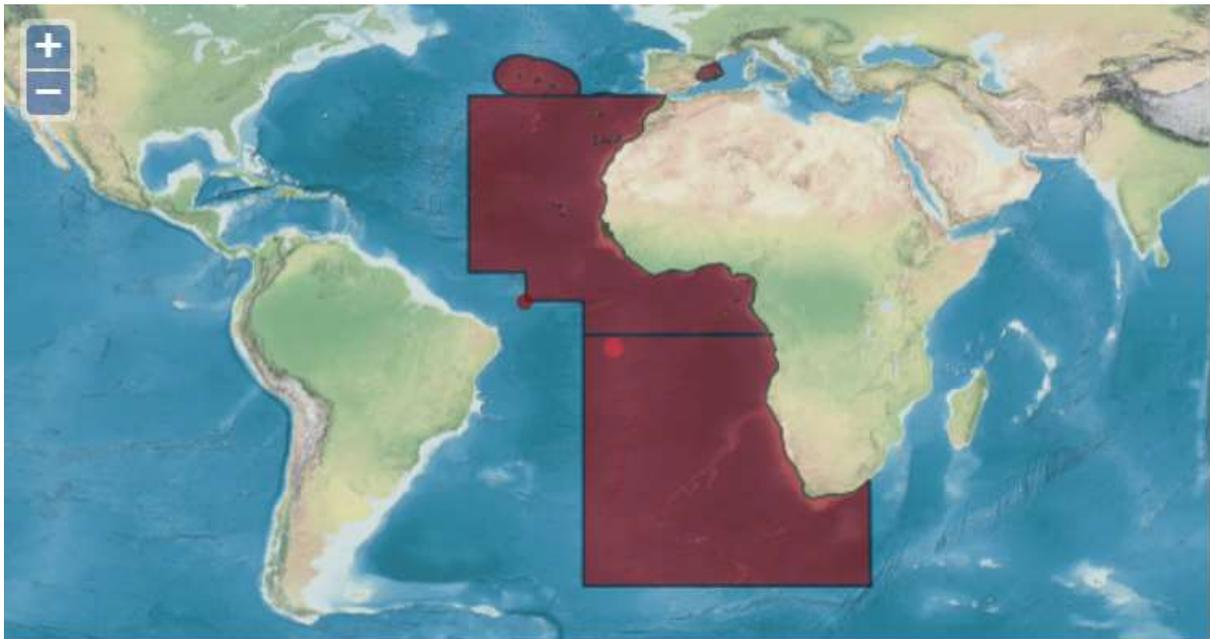


Figura 5. Distribución mundial de Grapsus adscensionis (WORMS)

La reproducción de *G. adscensionis* ha sido ampliamente estudiada. Se ha observado que este cangrejo presenta dos épocas de puesta a lo largo del año: de diciembre a marzo y de marzo a mayo, con máximos detectados en febrero y mayo (Shcherbakova et al., 2011). Este hecho parece afectar a la proporción de sexos, detectando un aumento en el número de hembras en los meses de mayo (1:1,2) y junio (1:2,2) con respecto al mes de marzo (1:0,7).



Imagen 2. Ejemplares de cangrejo rojo en la costa de Tenerife (Grapsus adscensionis).

Las diferencias en la composición lipídica entre las zoeas de *G. adscensionis* y los nauplios de *Artemia* sp. son bastante claras (Reis et al., 2017). Estos autores muestran que *Artemia* presenta una mayor cantidad de lípido total (LT) con respecto a las zoeas, pero los niveles de fosfolípidos y PUFAs de cadena larga (LC-PUFAs) son menores. Es por ello que, cuando *Artemia* es utilizada en la alimentación de especies marinas tales como *O. vulgaris*, deben ser enriquecidas previamente, y a pesar de ello resulta complicado obtener los niveles adecuados de estos nutrientes para satisfacer los requerimientos nutricionales de las especies. Diversos estudios han mostrado la escasa presencia de DHA en nauplios de *Artemia* enriquecida (Estévez et al., 1998; Reis et al., 2017). A pesar de ello, en las últimas décadas, la *Artemia* ha sido una de las presas más utilizadas en la acuicultura, debido principalmente a la simplicidad de su cultivo y a su alta disponibilidad. Los valores de este ácido graso en *G. adscensionis* parecen ser más elevadas, si bien es recomendable aumentar estos niveles, pues siguen siendo bajos para las paralarvas del pulpo (Roo et al., 2017).

Por lo tanto, las zoeas de *G. adscensionis* parecen ser una presa más adecuada para las paralarvas de *O. vulgaris*, que requieren de altas cantidades de LC-PUFAs, en especial EPA y DHA.

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos del presente trabajo fueron inicialmente:

- 1) Comprobar los efectos de distintos tipos de dietas de reproductores sobre la composición nutricional de zoeas de *G. adscensionis* de cara a su utilización como alimento para paralarvas de pulpo común (*O. vulgaris*).
- 2) Determinar los efectos de las zoeas de *G. adscensionis* obtenidas de reproductores alimentados con las distintas dietas experimentales en la supervivencia, crecimiento y composición nutricional de las paralarvas de *O. vulgaris*, principalmente a nivel de EPA y DHA, para su utilización en el cultivo de esta especie.

Debido a la aparición de la pandemia causada por la COVID-19 y las medidas tomadas por el gobierno español para reducir su expansión, resultó imposible abordar el segundo objetivo, principalmente por la paralización de gran parte de las actividades en las instalaciones de la planta de cultivo del COC-IEO, donde se estaban llevando a cabo los experimentos, así como por la imposibilidad de acceder a dichas instalaciones a lo largo del confinamiento.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La fase experimental de la presente memoria fue desarrollada en las instalaciones del Centro Oceanográfico de Canarias del Instituto Español de Oceanografía (COC-IEO) en Santa Cruz de Tenerife, mientras que los análisis bioquímicos de las muestras recogidas, se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Facultad de Ciencias, Sección Biología de la Universidad de La Laguna.

3.1. Obtención de ejemplares de *G. adscensionis*

Para la obtención de los ejemplares de *G. adscensionis* se requirió la colaboración de diversos pescadores de la isla de Tenerife, que capturaron y entregaron especímenes de esta especie al COC-IEO. Adicionalmente, varios muestreos fueron realizados por investigadores de éste centro, en la zona de Igueste de San Andrés (Santa Cruz de Tenerife). Los muestreos fueron nocturnos con el objetivo de facilitar la recolección de un mayor número de ejemplares.

3.2. Cultivo de reproductores

Los ejemplares capturados se introdujeron en tanques de 1000 L de capacidad, que se llenaron con unos 100 L de agua, hasta una altura de 10-15 centímetros, con el objetivo de adecuar los tanques a las condiciones naturales de los cangrejos. En el interior de los tanques se introdujeron los ejemplares capturados previamente, con una proporción de 1 macho por cada 4 hembras para favorecer la obtención de nuevas puestas a lo largo del periodo de reproducción. El interior del tanque se decoró con algunos refugios de PVC y piedras con el objetivo de favorecer su adaptación y disminuir la competitividad por el territorio, así como permitirles mantenerse fuera del agua y refugiarse (Imagen 3). Los tanques se encontraban en condiciones naturales de iluminación y de temperatura (18-23°C), con una renovación de agua de 250-300 L/h, lo que aseguraba niveles de oxígeno próximos a saturación y evitaba variaciones perjudiciales de pH, nitritos, nitratos o amonio.



Imagen 3: Tanque de cultivo de G. adscensionis en el COC-IEO

3.3. Alimentación de los reproductores

A la hora de realizar el experimento de alimentación, se propusieron tres dietas experimentales con distinta composición:

- Dieta 1. Dieta compuesta exclusivamente por caballa (*Scomber scombrus*), considerada como dieta control, al ser utilizada hasta el momento del desarrollo de la presente memoria para la alimentación de las zoeas del cangrejo.
- Dieta 2. Dieta multiespecífica compuesta por galera (*Squilla mantis*), chipirón (*Loligo opalescens*), langostino (*Penaeus vannamei*), almeja (*Meretrix lyrata*) y limanda (*Limanda limanda*),
- Dieta 3. Dieta compuesta por galera (*S. mantis*) y chipirón (*L. opalescens*).

A cada tanque se le asignó una de las tres dietas descritas previamente. En el caso de las dietas 2 y 3, se suministró la misma proporción de cada componente. Los cangrejos se alimentaban tres días a la semana *ad libitum* a primera hora de la mañana.

Asimismo, cada 15 días se realizaba una comprobación del estado de madurez sexual de las hembras, buscando detectar la presencia de huevos. Si alguna de las hembras presentaba huevos, se aislaba del resto en un tanque diferente. Las zoeas se recogieron directamente tras la eclosión de los huevos utilizando un sistema de mallas situado al final del conducto de salida del agua (Imagen 4) y se almacenaron inmediatamente.



Imagen 4. Recolectores de zoeas de G. adscensionis procedentes del tanque de cultivo

3.4. Análisis bioquímicos de las zoeas

Las muestras de zoeas recolectadas para su análisis fueron enjuagadas con agua dulce, almacenadas en bolsas de plástico y congeladas a -20°C hasta su posterior análisis bioquímico.

3.4.1. Extracción lipídica y determinación del contenido de humedad

La extracción de lípidos de las muestras se llevó a cabo mediante el método descrito por Folch y colaboradores (1957) con ligeras modificaciones (Eggers & Schwudke, 2016). Se utilizaron alrededor de 700-800 mg de tejido de cada muestra, siempre en presencia de hielo para evitar su afección por la temperatura. Las muestras se homogeneizaron en un tubo de ensayo con 10 mL de cloroformo: metanol (CL:MET; 2:1, v/v) en tres tandas, y se les añadió 2,5 mL de KCl (0,88%), agitando fuertemente. Posteriormente, se centrifugó a 1700 rpm durante 5 min para separar la fase acuosa, que se sitúa en la parte superior, y la parte orgánica, que contiene los lípidos y se sitúa en la parte inferior. Una vez concluida la centrifugación, se transfirió la fase inferior de cada muestra a un nuevo tubo de ensayo, se evaporó el solvente completamente con un vaporizador de nitrógeno, se resuspendieron nuevamente los lípidos en 1,5 mL de CL:MET (2:1, v/v) y se transfirieron a un bote de vidrio de 1,7 mL pesado previamente. Se volvió a eliminar el CL:MET en atmósfera de nitrógeno, se colocó el bote en vacío durante un mínimo

de 5 h y una vez transcurrido ese tiempo, cada bote se volvió a pesar, calculando así la cantidad de lípido presente por diferencia de peso. Seguidamente, las muestras se resuspendieron en CL:MET (2:1, v/v) a una concentración de 10 mg/mL, con 0,01% de butirilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante en atmósfera de nitrógeno, y se congelaron a -20°C con el objetivo de conservarlas correctamente, evitando su oxidación, hasta su posterior utilización. Con los datos obtenidos se realizó el cálculo del % de lípido en peso fresco y en peso seco:

$$\% \text{ Lípido en peso fresco: } \frac{\text{Peso lípido} \times 100}{\text{Peso muestra}}$$

$$\% \text{ Lípido en peso seco: } \frac{\text{Peso lípido} \times 100}{\text{Peso muestra} - \left(\% \text{ Humedad} \times \frac{\text{Peso muestra}}{100} \right)}$$

Para la determinación de la humedad, se pesaron alrededor de 100 mg de tejido en tiras de papel de aluminio previamente pesadas. Estas tiras se colocaron en una estufa a 110°C durante 24 h y transcurrido este tiempo, se sacaron de la estufa, se dejaron atemperar en desecador y se pesaron nuevamente. El % de humedad de las muestras se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Humedad: } \frac{\text{Peso fresco} \times 100}{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}$$

3.4.2 Determinación del perfil de clases lipídicas

Las clases lipídicas se determinaron por cromatografía en capa fina de alta resolución en placas de HPTLC (del inglés, High-Performance Thin-Layer Chromatography) mediante un doble desarrollo (Olsen & Anderson, 1989). Se utilizaron placas de HPTLC de sílice de 10x10 cm, previamente introducidas en una cubeta con 20 mL de éter para eliminar sus impurezas, secándolas posteriormente en estufa a 110°C durante 30 min. A continuación, se marcó cada placa suavemente con lápiz, evitando rascar la sílice. Una alícuota de 30 µg de lípido de cada muestra experimental se inyectó en la placa utilizando una jeringa Hamilton de 10 µL, utilizando como estándar externo un extracto de lípido de huevos de bacalao. Asimismo, se dejó una zona de blanco, con el objetivo de poder comprobar que la placa se encontraba bien

purificada. Seguidamente, se introdujo la placa en una solución para separar los lípidos polares, compuesta de isopropanol, cloroformo, metil acetato, metanol y KCl (0,25%) (5:5:5:2:1,8 en volumen), y se dejó desarrollar hasta la mitad de la placa. Una vez llegado al punto, se extrajo de la cubeta y se colocó en un desecador al vacío durante 10 min para eliminar posibles residuos de solventes y evitar su hidratación. Posteriormente, se preparó una solución para separar los lípidos neutros, compuesta de hexano, éter y ácido acético (20:5:0,5 en volumen) que se colocó en una nueva cubeta, donde se introdujo la placa. Se dejó desarrollar el solvente hasta encontrarse a 0,5 cm del límite superior de la placa, tras lo cual se extrajo y se introdujo en desecador al vacío para eliminar los solventes.

A continuación, se llevó a cabo la tinción de la placa con una solución de acetato cúprico y ácido ortofosfórico en metanol, tiñendo de forma homogénea antes de introducirla en estufa a 160°C durante 10-15 min. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la placa unos minutos y se escaneó en un CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttentz, Suiza) mediante el software winCATS versión 1.4.4 para determinar las bandas de las diferentes clases lipídicas por densitometría (Imagen 5). Su procesado y cuantificación se realizó mediante el software VideoScan versión 1.02, de forma que se obtuvo la proporción de cada clase lipídica de las muestras.

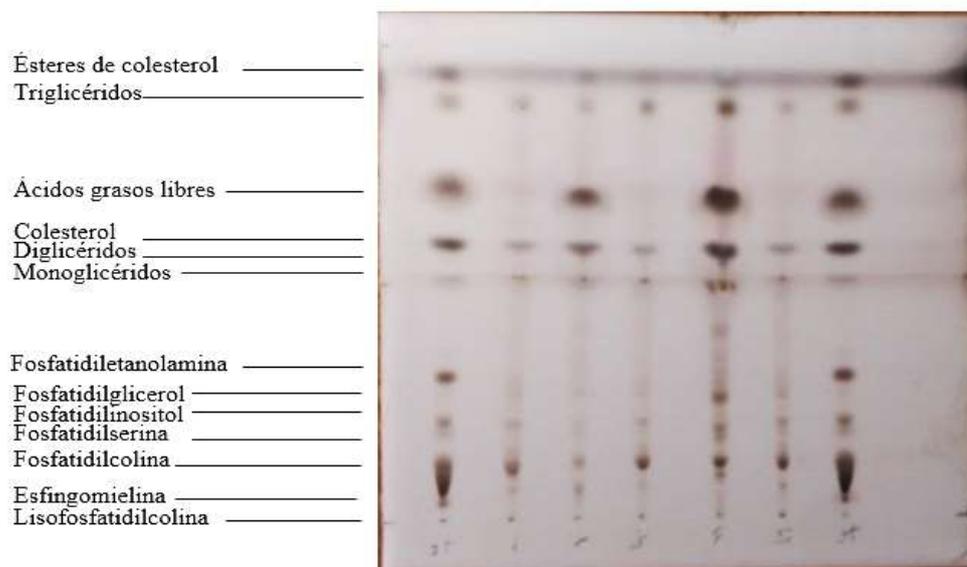


Imagen 5. Distribución de las clases lipídicas en cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)

3.4.3 Determinación del perfil de ácidos grasos

Para la determinación de los ácidos grasos, se tomó 1 mg de lípido disuelto en CL:MET (2:1, v/v), al cual se añadió un 5% de estándar interno (19:0). A continuación, se evaporó completamente el CL:MET utilizando un vaporizador de nitrógeno. Una vez evaporado, se añadió 1 mL de tolueno y 2 mL de ácido sulfúrico al 1% en metanol agitando la muestra con un vórtex para favorecer su acción. Las muestras se taparon, llenándolas con nitrógeno para evitar su oxidación, y se colocaron en una manta calefactora a 50°C durante 16 h en oscuridad.

Transcurrido el tiempo, los tubos se retiraron de la manta, se dejaron enfriar, se les añadió 2 mL de KHCO_3 al 2% y 5 mL de hexano:dietil éter (1:1, v/v) con BHT, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo y a la fase inferior se le añadieron nuevamente 5 mL de hexano:éter (1:1, v/v), y se volvió a centrifugar a 1500 rpm durante 5 min. Finalmente se transfirió la fase superior al nuevo tubo, se evaporó el solvente con nitrógeno y se resuspendió en 100 μL de hexano.

A continuación se llevó a cabo la purificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME, del inglés Fatty Acid Methyl Ester) mediante cromatografía líquida en capa fina (TLC, del inglés Thin Layer Chromatography). Para ello, se utilizó una placa TLC de 20 x 20 x 0,25 mm. Se inyectó en cada placa un máximo de 4 muestras experimentales y un estándar externo de hueva de bacalao, con la ayuda de una jeringuilla Hamilton de 100 μL de capacidad. Una vez depositadas en la placa, ésta se introdujo en una cubeta con una solución de hexano, éter y ácido acético (90:10:1 por volumen). La cubeta se tapó y se dejó que se desarrollase el solvente hasta 1 cm del límite superior de la placa, se extrajo de la cubeta y se secó bajo campana extractora. Seguidamente, la placa se tiñó con iodina al 1%, cubriendo la zona de las muestras y tiñendo la banda del estándar externo permitiendo la aparición de una serie de bandas claramente separadas, en orden descendente: BHT, FAME e impurezas. A continuación, se rasparon las bandas donde se encontraban los FAME y se introdujeron individualmente en tubos de ensayo, a los que se añadieron 10 mL de hexano:éter. Estos tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, y posteriormente se recogió la fase superior de cada tubo que se introdujo en un tubo nuevo. Por último, se evaporó completamente el solvente bajo atmósfera de nitrógeno, se recuperaron los FAME purificados mediante 1 mL de n-hexano, y se almacenaron en un bote de 1,5 mL de capacidad en atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta su determinación por cromatografía de gases.

Los ácidos grasos fueron identificados y cuantificados por cromatografía de gases (GC-ULTRA TRACE; Thermo Scientific, Milán, Italia) con inyección en columna y detector de ionización de llama (FID, del inglés Flame Ionitacion Detector) bajo las siguientes condiciones:

- Columna de sílice fundida SupelcowaxTM 10 (30 m x 0,32 mm I.D; 0,25 µm de espesor) (Supelco Inc., Bellefonte, EEUU) con fase estacionaria polar.
- El flujo de los gases: helio, 1,5 mL/min; hidrógeno, 35 mL/min; aire, 350 mL/min. El helio actúa como gas portador.
- Temperatura: Inyector (On Column) 50°C; Detector (FID) 240°C; Columna con rampas de temperatura con las siguientes características: temperatura inicial 50°C, tasa de incremento de temperatura de 40°C/min hasta alcanzar 150°C, segunda de tasa de incremento de 2°C/min hasta 200°C, incremento de 1°C/min hasta 214°C, y finalmente 40°C/min hasta una temperatura final de 230°C mantenida durante 5 min.

La identificación de cada ácido graso se llevó a cabo mediante un multiestándar de composición conocida.

3.4.4. Extracción y cuantificación de pigmentos

Los pigmentos carotenoides fueron extraídos a partir de 1 g de tejido siguiendo el método descrito por Barua et al. (1993). El tejido fue sometido a tres solventes de extracción: en primer lugar 10 mL de etil acetato:etanol (1:1, v/v) con 0,01% BHT; en segundo lugar, 5 mL de etil acetato, y, finalmente, 10 mL de hexano con 0,01% BHT. Tras la aplicación de cada solvente, se centrifugó la solución a 1700 rpm durante 3 min, y se recogió el sobrenadante (fase superior) que fue transferido a una pera de vidrio. Durante toda la extracción, se trabajó en oscuridad y en presencia de hielo debido a la alta inestabilidad de los pigmentos.

Una vez extraídos, se evaporó el solvente en un rotavapor al vacío (EYELA water bath SB-600, Madrid, España), se redisolvieron los pigmentos en 1,5 mL de hexano, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min y se filtró el sobrenadante a través de filtros de nylon de 0,45 µm. Se almacenó el filtrado en viales oscuros con atmósfera de nitrógeno a -20 °C hasta su cuantificación mediante la lectura de su absorbancia en espectrofotómetro (Beckman Coulter DU-800, Indianapolis IN, USA) a 468 nm, mediante la ecuación de Lambert-Beer:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times b \times C$$

Donde “ A_λ ” es la absorbancia a la longitud de onda determinada,” ϵ_λ ” es el coeficiente de absorptividad molar del hexano a esa longitud de onda, “b” es el camino óptico (cm) y “C” la concentración de la especie absorbente.

3.4.5. Determinación del nivel de peróxidos

Se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico de Shanta & Decker (1994), basado en la capacidad oxidante de los lipoperóxidos. Así, estos productos de la oxidación de los lípidos oxidan a los Fe (II), los cuales se transforman en Fe (III).

La determinación de los peróxidos de las dietas se llevó a cabo a partir de los lípidos extraídos según se explicó con anterioridad (Sección 3.4.1.). En primer lugar, se obtuvo una curva patrón para el Fe (III), con la cual se calcula la cantidad de Fe (III) que se genera en nuestra muestra al oxidar el Fe (II) añadido, debido al O_2 activo de los lipoperóxidos. La preparación de la recta patrón se realizó a partir de una disolución madre de cloruro de Fe (III) de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con CL:MET (7:3). La curva presentaba una cantidad creciente de Fe (III): 0, 1, 2, 5, 10, 20, 25, 35 y 40 μg . Una vez preparada la recta patrón, se tomaron las muestras extraídas previamente, a las cuales se añadieron 10 mL de CL:MET (7:3), tras lo cual se agitó la mezcla. Posteriormente, se añadieron 50 μL de una disolución de tiocianato de amonio, el cual reacciona con los iones Fe (III) produciendo una sustancia rosa que absorbe luz a 500 nm. Por ello, se introdujo a continuación una disolución de cloruro de Fe (II) y se dejó actuar durante 5 min y se leyó la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU-800.

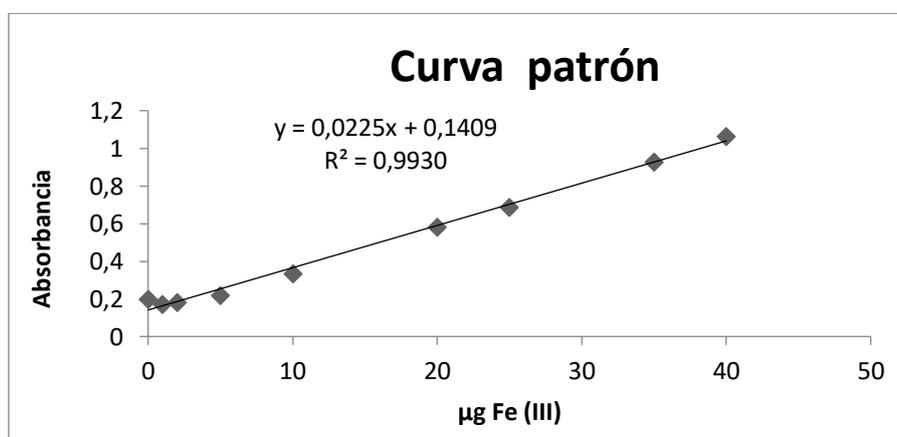


Figura 6. Ejemplo de curva patrón utilizada para la determinación de peróxidos.

El Índice de Peróxidos (IP) de cada muestra se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{IP (meq O}_2\text{/kg lípido): } \frac{\text{Abs muestra}-b}{m \times 55,845 \times 2}$$

Donde “a” es la pendiente de la recta patrón, “b” es la ordenada origen de la recta patrón y “m” es la masa del lípido en gramos. El valor 55,845 hace referencia al peso atómico del hierro, y por último el valor 2 se refiere a los miliequivalentes de oxígeno.

Se realizaron tres réplicas independientes de cada componente de la dieta y cuatro réplicas independientes de cada tratamiento de zoea. Los análisis se llevaron a cabo entre septiembre de 2019 y julio de 2020. Una vez obtenidos los resultados, se decidió la composición de las tres dietas experimentales, basándose en la distinta composición nutricional de las especies mencionadas previamente.

3.5. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics 25. Los datos obtenidos se presentan como medias de las réplicas \pm desviación estándar (DE). Para todos los datos se realizó una comprobación de la normalidad mediante el test de Saphiro-Wilk, así como la homogeneidad de las varianzas utilizando el test de Levene. A los datos que cumplieron ambas condiciones, se les aplicó un test ANOVA de un factor para determinar las diferencias entre tratamientos, considerando como diferencias significativas los valores de $P < 0,05$. En aquellos casos en los que se observaron diferencias significativas, se utilizó el test *post hoc* de Tukey para comparar los grupos y establecer las diferencias detectadas.

En aquellos casos en los que los valores no cumplían la normalidad o la homocedasticidad, se les aplicó la transformación del logaritmo o del arcoseno de la raíz cuadrada. Si aun así no cumplían la normalidad, se realizó una estadística no paramétrica, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, considerando los valores de $P < 0,05$ como significativamente diferentes. En estos casos, se realizó como *post hoc* el test de la U de Mann-Whitney con un ajuste de Bonferroni para determinar las diferencias entre tratamientos. Para aquellos casos en los que no se obtuvieron valores homogéneos, se utilizaron los estadísticos de Welch y de Brown y

Forsythe para determinar las diferencias entre tratamientos, y a continuación el test *post-hoc* T_3 de Dunnet para establecer las diferencias.

4. RESULTADOS

4.1. Dietas experimentales para reproductores de *G. adscensionis*

4.1.1. Composición lipídica y contenido de humedad

La Tabla 1 muestra las proporciones de humedad (H) y de lípido total en preso fresco (L p.f.) y en peso seco (L p.s.) de las dietas experimentales utilizadas para la alimentación de reproductores de *G. adscensionis* en el presente trabajo. Se pueden observar diferencias significativas entre las distintas especies analizadas ($P < 0,05$), con la limanda presentando los niveles más altos de humedad ($92,13 \pm 0,16\%$), así como los más bajos de lípido en peso fresco ($0,27 \pm 0,03\%$). Por el contrario, la caballa muestra, junto con la galera, los niveles de humedad más bajos de todos los tratamientos ($70,87 \pm 1,36$ y $75,90 \pm 0,46\%$, respectivamente), así como los mayores porcentajes de lípido, tanto en peso fresco como en peso seco (L p.f.: $6,91 \pm 2,32\%$; L p.s.: $23,56 \pm 7,20\%$). Cabe destacar igualmente, los elevados porcentajes que presenta el chipirón en los tres parámetros analizados con respecto al resto de tratamientos (H: $85,07 \pm 1,20\%$; L p.f.: $1,88 \pm 0,61\%$; L p.s.: $12,68 \pm 4,38\%$).

La composición de las clases lipídicas de las distintas especies utilizadas para alimentar a los reproductores del cangrejo rojo se muestra en la Tabla 2. La caballa presenta el mayor porcentaje total de lípidos neutros (TNL), en torno a un 85% del lípido total, no detectándose diferencias significativas entre las otras dietas. Cabe destacar la presencia de cerebrósidos en la galera, el chipirón y la almeja (0,79, 0,42 y 1,95%, respectivamente) mientras que en ambos peces (limanda y caballa) y en el langostino, no fue detectada. Entre los lípidos neutros, los triacilglicéridos (TAG) son la fracción más abundante en la caballa y la almeja ($38,37 \pm 4,88$ y $17,03 \pm 4,92\%$, respectivamente), mientras que los niveles de ácidos grasos libres (FFA) son los más bajos en la almeja ($2,78 \pm 0,95\%$). Por el contrario, la limanda y la galera presentan las mayores proporciones de FFAs ($38,47 \pm 1,99$ y $39,45 \pm 2,02\%$, respectivamente). La caballa destaca igualmente por sus elevados porcentajes de monoacilglicéridos (MAG, $13,35 \pm 2,39\%$) y diacilglicéridos (DAG, $4,15 \pm 0,47\%$), contrariamente al langostino, cuyos niveles son significativamente menores ($2,66 \pm 0,78$ y $0,57 \pm 0,28\%$, respectivamente). En cuanto a los lípidos polares, las fracciones más abundantes en todos los componentes dietarios son la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE), destacando los elevados valores de fosfatidiletanolamina (PE) en el langostino, chipirón y almeja ($14,44 \pm 1,93$; $17,83 \pm 3,84$ y

12,19 \pm 1,62% respectivamente) con respecto a las otras especies. La almeja destaca por presentar la más alta proporción de fosfatidilinositol (PI) (10,25 \pm 0,58%) y por la ausencia de lisofosfatidilcolina (LPC). Por el contrario, el porcentaje de LPC en la limanda es el más alto de todos los tratamientos (1,86 \pm 0,45%) que también presenta niveles de esfingomielina (SM) significativamente menores que los del chipirón.

Tabla 1. Contenido de humedad, lípido en peso fresco y lípido en peso seco de las dietas experimentales utilizadas en la alimentación de reproductores de *G. adscensionis*.

	Galera	Langostino	Chipirón	Limanda	Caballa	Almeja
H (%)	75,90 ± 0,46 a	79,54 ± 2,91 abc	85,07 ± 1,20 c	92,13 ± 0,16 d	70,87 ± 1,36 a	78,90 ± 0,43 b
L p.f. (%)	1,18 ± 0,43 bc	1,07 ± 0,51 abc	1,88 ± 0,61 c	0,27 ± 0,03 a	6,91 ± 2,32 d	1,23 ± 0,15 bc
L p.s. (%)	4,88 ± 1,73 b	5,11 ± 1,49 b	12,68 ± 4,38 c	3,38 ± 0,36 ab	23,56 ± 7,20 c	5,82 ± 0,61 b

Los resultados se presentan como media ± DE (n=3). **H:** Humedad; **L p.f.:** Lípido en peso fresco; **L p.s.:** Lípido en peso seco. Diferentes letras en cada fila indican diferencias significativas entre las distintas dietas (P<0,05).

Tabla 2. Perfil de clases lipídicas (% del lípido total) de las dietas experimentales utilizadas en la alimentación de reproductores de *G. adscensionis*.

	Galera		Langostino		Chipirón		Limanda		Caballa		Almeja	
LPC	0,93 ± 0,37	bc	0,34 ± 0,06	b	0,81 ± 0,30	bc	1,86 ± 0,45	c	0,16 ± 0,28	b	nd	a
SM	0,58 ± 0,34	a	0,87 ± 0,09	ab	2,30 ± 0,43	b	1,20 ± 0,79	a	1,02 ± 0,41	ab	0,13 ± 0,03	a
PC	12,08 ± 1,81	abc	15,52 ± 1,71	bc	18,76 ± 2,02	c	8,28 ± 0,53	ab	7,19 ± 2,03	a	12,44 ± 1,74	abc
PS	4,06 ± 0,35	abc	3,37 ± 1,57	ab	5,52 ± 1,71	bc	3,82 ± 0,86	abc	0,70 ± 0,14	a	4,51 ± 0,99	bc
PI	1,84 ± 0,24	ab	2,18 ± 0,84	ab	4,48 ± 1,00	c	3,11 ± 0,47	bc	0,82 ± 0,34	a	10,25 ± 0,58	d
PG	2,15 ± 0,13	b	2,20 ± 0,08	ab	nd	a	1,50 ± 0,76	b	1,51 ± 1,51	b	3,49 ± 1,85	b
PE	8,93 ± 1,31	bc	14,44 ± 1,93	cd	17,83 ± 3,84	d	6,94 ± 0,35	ab	2,26 ± 1,68	a	12,19 ± 1,62	bcd
TPL	31,36 ± 3,20	b	38,63 ± 4,92	b	50,13 ± 8,70	b	26,72 ± 0,91	b	13,67 ± 5,65	a	44,92 ± 2,16	b
CER	0,79 ± 0,22	b	nd	ab	0,42 ± 0,34	b	nd	a	nd	a	1,95 ± 0,60	b
MAG	5,76 ± 0,17	ab	2,66 ± 0,78	a	4,04 ± 1,63	ab	8,44 ± 1,85	b	13,35 ± 2,39	c	6,28 ± 2,93	ab
DAG	1,67 ± 0,22	ab	0,57 ± 0,28	a	1,37 ± 1,47	a	2,06 ± 0,90	ab	4,15 ± 0,47	b	1,89 ± 1,38	ab
CHO	15,47 ± 1,72	abc	24,38 ± 4,15	cd	18,97 ± 1,93	bcd	16,58 ± 0,42	abc	10,30 ± 2,12	ab	21,46 ± 1,09	bcd
FFA	39,45 ± 2,02	c	29,81 ± 6,89	bc	14,71 ± 3,28	b	38,47 ± 1,99	c	17,85 ± 3,19	bc	2,78 ± 0,95	a
TAG	4,63 ± 0,93	a	2,51 ± 1,79	a	6,90 ± 4,08	a	2,66 ± 1,34	a	38,37 ± 4,88	c	17,03 ± 4,92	b
SE	1,66 ± 0,50	a	1,44 ± 0,18	a	3,88 ± 1,08	ab	5,07 ± 0,07	b	2,32 ± 1,27	ab	5,64 ± 0,92	b
TNL	68,64 ± 3,20	abc	61,37 ± 4,92	abc	49,87 ± 8,70	a	73,28 ± 0,91	bc	86,33 ± 5,65	c	55,08 ± 2,16	ab

Los resultados se presentan como media ± DE (n=3). **LPC**: Lisofosfatidilcolina; **SM**: Esfingomiélin; **PC**: Fosfatidilcolina; **PS**: Fosfatidilserina; **PI**: Fosfatidilinositol; **PG**: Fosfatidilglicerol; **PE**: Fosfatidiletanolamina; **TPL**: Total de lípidos polares; **CER**: Cerebrósidos; **MAG**: Monoacilglicéridos; **DAG**: Diacilglicéridos; **CHO**: Colesterol; **FFA**: Ácidos Grasos Libres; **TAG**: Triacilglicéridos; **SE**: Ésteres de esterol; **TNL**: Total de lípidos neutros; **nd**: no detectado. Diferentes letras en cada fila indican diferencias significativas entre dietas (P<0,05).

La composición de ácidos grasos de las diferentes dietas expresada en $\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido se muestra en la Tabla 3. Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) cabe destacar que el chipirón y la limanda presentan la menor cantidad de ARA (20:4 n-6) de todos los tratamientos ($0,15 \pm 0,02$ y $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente), mientras que la caballa es la que contiene niveles más altos ($0,53 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{mg}$), si bien no resultan significativamente diferentes. En el caso del EPA, los valores más elevados se vuelven a encontrar en la caballa y también en el chipirón ($2,37 \pm 0,77$ y $1,64 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente), mientras que la limanda y la almeja son los que muestran las cantidades menores, en torno a $30 \mu\text{g}/\text{mg}$. Nuevamente la caballa presenta los valores más elevados de DHA de todas las dietas ensayadas ($9,96 \pm 2,70 \mu\text{g}/\text{mg}$). En base a estos resultados, el ratio DHA/EPA resulta significativamente mayor en la caballa ($4,28 \pm 0,35$) seguida de en el chipirón ($2,36 \pm 0,04$), y menor en la galera y el langostino ($1,25 \pm 0,10$ y $0,94 \pm 0,05$, respectivamente).

También se encuentran diferencias dietarias en las cantidades totales de ácidos grasos saturados (SFA) e insaturados. En el caso de los saturados, la caballa destaca con unos niveles claramente más elevados ($15,13 \pm 5,15 \mu\text{g}/\text{mg}$), mientras que la limanda presenta las cantidades más reducidas de SFA, monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) ($0,57 \pm 0,06$; $0,62 \pm 0,14$ y $1,04 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente). En el caso de los PUFA, de nuevo la caballa, junto al chipirón, contiene los valores más altos, aunque estadísticamente no resulte significativo en el caso de la caballa.

Dentro de los ácidos grasos saturados, destacan el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0). El primero, presenta su mayor contenido en la caballa ($9,10 \pm 3,06 \mu\text{g}/\text{mg}$) seguido del chipirón ($3,15 \pm 0,40 \mu\text{g}/\text{mg}$), mientras que el 18:0 es más abundante en la caballa ($3,20 \pm 1,01 \mu\text{g}/\text{mg}$) y más reducido en la limanda ($0,13 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$).

Los ácidos grasos más relevantes dentro de los MUFA fueron el 16:1 n-7 y el 18:1 n-9, que representan más el 60% del total en todas las dietas. Al igual que en los saturados, la caballa es el alimento que presenta cantidades mayores de estos dos ácidos grasos ($2,04 \pm 0,77$ y $6,98 \pm 2,49 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente), mientras que en el resto de organismos los valores se mantienen a niveles similares ($0,06-0,49$ y $0,32-2,71 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente).

En cuanto a los ácidos grasos omega 3 (n-3) y omega 6 (n-6), la caballa presenta los mayores niveles de ambos ($14,64 \pm 4,28$ y $1,75 \pm 0,51 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente), destacando también los valores del chipirón para los n-3 ($5,72 \pm 0,94 \mu\text{g}/\text{mg}$) y del langostino para los n-6 ($2,00 \pm 0,42 \mu\text{g}/\text{mg}$). Por el contrario, la limanda destaca por contener unos valores mucho menos elevados

de ambos grupos ($0,88 \pm 0,01$ y $0,16 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente). En lo que respecta al ratio entre los dos grupos de ácidos grasos (n-3/n-6), el chipirón y la caballa son los que presentan la proporción más elevada entre todos los tratamientos ($18,35 \pm 9,48$ y $8,36 \pm 0,06$, respectivamente), al contrario que el langostino ($0,75 \pm 0,07$). Individualmente, los 18C PUFA más importantes de ambas familias de ácidos grasos en la naturaleza, el ácido linoleico (18:2 n-6) y el ácido linolénico (18:3 n-3), se presentan en cantidades reducidas en todos los ejemplares analizados.

Tabla 3. Composición en ácidos grasos (μg ácido graso/mg) de las dietas experimentales utilizadas en la alimentación de reproductores de *G. adscensionis*

	Galera		Langostino		Chipirón		Limanda		Caballa		Almeja	
14: 0	0,24 \pm 0,14	ab	0,02 \pm 0,01	a	0,22 \pm 0,04	b	0,02 \pm 0,01	a	1,45 \pm 0,78	ab	0,13 \pm 0,06	ab
15: 0	0,05 \pm 0,03	ab	0,02 \pm 0,01	ab	0,05 \pm 0,01	b	0,01 \pm 0,00	a	0,42 \pm 0,15	ab	0,02 \pm 0,02	ab
15: 1 n-5	nd	a	nd	a	0,01 \pm 0,01	b	nd	a	nd	a	nd	a
16: 0 DMA	0,05 \pm 0,01	b	0,10 \pm 0,04	b	0,11 \pm 0,02	b	0,01 \pm 0,00	b	nd	a	nd	a
16: 0	1,09 \pm 0,46	a	1,16 \pm 0,24	a	3,15 \pm 0,40	b	0,37 \pm 0,05	a	9,10 \pm 3,06	c	1,08 \pm 0,34	a
16: 1 n-9	0,02 \pm 0,02	ab	0,03 \pm 0,01	ab	0,04 \pm 0,01	ab	0,01 \pm 0,00	a	0,21 \pm 0,07	ab	0,04 \pm 0,00	b
16: 1 n-7	0,49 \pm 0,26	a	0,09 \pm 0,04	a	0,13 \pm 0,05	a	0,06 \pm 0,01	a	2,04 \pm 0,77	b	0,25 \pm 0,09	a
16: 1 n-5	0,03 \pm 0,02	bc	0,01 \pm 0,01	bc	0,03 \pm 0,00	c	0,01 \pm 0,00	b	0,16 \pm 0,05	bc	nd	a
16: 2 n-4	nd	a	nd	a	nd	a	nd	a	0,12 \pm 0,10	b	nd	a
17: 1 ramificado	0,04 \pm 0,02	b	nd	a	nd	a	0,01 \pm 0,00	b	0,48 \pm 0,15	b	0,01 \pm 0,02	b
17: 0	0,09 \pm 0,04	ab	0,07 \pm 0,02	ab	0,07 \pm 0,01	b	0,02 \pm 0,00	a	0,60 \pm 0,19	ab	0,10 \pm 0,02	ab
16: 3 n-4	nd	a	0,08 \pm 0,01	b								
17: 1 n-7	0,07 \pm 0,03	ab	0,02 \pm 0,01	ab	0,01 \pm 0,02	ab	tr	a	0,31 \pm 0,10	ab	0,03 \pm 0,00	b
18: 0 DMA	0,03 \pm 0,01	b	0,18 \pm 0,05	b	0,01 \pm 0,01	b	nd	a	0,03 \pm 0,05	b	0,66 \pm 0,03	c
18: 1 n-9 DMA	0,07 \pm 0,03	c	nd	a	0,09 \pm 0,02	c	0,01 \pm 0,01	ab	nd	a	nd	a
18: 1 n-7 DMA	nd	a	0,02 \pm 0,01	b	tr	b	0,01 \pm 0,01	b	nd	a	nd	a
18: 0	0,40 \pm 0,16	ab	0,66 \pm 0,08	b	0,60 \pm 0,17	ab	0,13 \pm 0,01	a	3,20 \pm 1,01	c	0,42 \pm 0,10	ab
18: 1 n-9	0,74 \pm 0,13		1,02 \pm 0,23		2,71 \pm 4,00		0,32 \pm 0,15		6,98 \pm 2,49		0,42 \pm 0,09	
18: 1 n-7	0,32 \pm 0,14		0,21 \pm 0,06		0,29 \pm 0,16		0,14 \pm 0,00		1,35 \pm 0,37		0,13 \pm 0,04	
18: 1 n-5	0,03 \pm 0,01	ab	0,03 \pm 0,01	ab	0,05 \pm 0,05	ab	0,01 \pm 0,00	ab	0,18 \pm 0,04	b	0,02 \pm 0,02	a
18: 2 n-6	0,10 \pm 0,03		1,61 \pm 0,35		0,17 \pm 0,24		0,03 \pm 0,01		0,59 \pm 0,22		0,07 \pm 0,03	

18: 3 n-4	nd	a	nd	a	0,01 ± 0,01	b	nd	a	nd	a	0,03 ± 0,00	b
18: 3 n-3	0,03 ± 0,01	b	0,11 ± 0,02	b	0,01 ± 0,02	b	nd	a	0,36 ± 0,14	b	0,06 ± 0,03	b
18: 4 n-3	0,04 ± 0,02	bc	nd	a	tr	c	nd	a	0,49 ± 0,18	bc	0,06 ± 0,03	bc
20: 0	0,03 ± 0,02	b	0,03 ± 0,01	b	0,02 ± 0,03	b	nd	a	0,17 ± 0,06	b	nd	a
20: 1 n-11	0,02 ± 0,03	bc	nd	a	0,01 ± 0,02	b	nd	a	nd	a	0,15 ± 0,02	c
20: 1 n-9	0,04 ± 0,02	a	0,06 ± 0,01	ab	0,36 ± 0,06	b	0,02 ± 0,00	a	1,33 ± 0,53	ab	0,06 ± 0,02	a
20: 1 n-7	0,05 ± 0,04	bc	nd	a	0,02 ± 0,01	b	0,02 ± 0,00	b	nd	a	0,10 ± 0,01	c
20: 2 n-6	0,05 ± 0,03	ab	0,18 ± 0,02	c	0,03 ± 0,00	a	nd	a	0,19 ± 0,07	c	0,12 ± 0,02	bc
20: 4 n-6	0,33 ± 0,16	b	0,19 ± 0,09	ab	0,15 ± 0,02	a	0,11 ± 0,01	a	0,53 ± 0,12	ab	0,26 ± 0,02	b
20: 3 n-3	nd	a	0,02 ± 0,00	b	0,07 ± 0,00	c	nd	a	nd	a	nd	a
20: 4 n-3	0,03 ± 0,03	b	0,01 ± 0,01	b	0,01 ± 0,02	b	0,01 ± 0,00	b	0,37 ± 0,12	b	nd	a
20: 5 n-3	0,86 ± 0,49	ab	0,68 ± 0,24	ab	1,64 ± 0,27	bc	0,30 ± 0,02	a	2,37 ± 0,77	c	0,34 ± 0,12	a
22: 0	0,04 ± 0,02	b	0,05 ± 0,01	bc	0,04 ± 0,01	b	0,01 ± 0,00	b	0,16 ± 0,03	c	nd	a
22: 1 n-11	nd	a	nd	a	nd	a	tr	b	0,18 ± 0,07	b	0,02 ± 0,02	b
22: 1 n-9	nd	a	0,01 ± 0,01	bc	0,04 ± 0,00	c	nd	a	0,20 ± 0,07	bc	nd	a
22: 2 n-6	nd	a	nd	a	nd	a	tr	b	nd	a	nd	a
21: 5 n-3	nd	a	nd	a	0,01 ± 0,01	b	0,01 ± 0,00	b	0,16 ± 0,03	b	0,03 ± 0,01	b
22: 4 n-6	nd	a	nd	a	nd	a	0,01 ± 0,01	b	nd	a	0,08 ± 0,00	c
22: 5 n-6	0,05 ± 0,03	abc	0,02 ± 0,00	bc	0,04 ± 0,00	b	0,09 ± 0,00	c	0,44 ± 0,10	abc	0,10 ± 0,01	a
22: 5 n-3	0,10 ± 0,06	ab	0,06 ± 0,02	ab	0,06 ± 0,00	b	0,06 ± 0,01	b	0,93 ± 0,34	ab	0,10 ± 0,01	b
24: 0	nd	a	0,01 ± 0,02	b	nd	a	nd	a	nd	a	nd	a
22: 6 n-3	1,09 ± 0,63	a	0,63 ± 0,19	a	3,88 ± 0,70	b	0,50 ± 0,02	a	9,96 ± 2,70	c	0,65 ± 0,13	a
Total	6,81 ± 3,15	ab	7,44 ± 1,78	b	14,30 ± 4,16	b	2,30 ± 0,20	a	45,72 ± 14,94	c	6,06 ± 1,27	ab

Saturados	2,03 ± 0,90	bc	2,31 ± 0,48	c	4,27 ± 0,54	c	0,57 ± 0,06	a	15,13 ± 5,15	d	2,42 ± 0,57	c
MUFA	1,92 ± 0,71	a	1,49 ± 0,37	a	3,78 ± 4,23	a	0,62 ± 0,14	a	13,43 ± 4,71	b	1,23 ± 0,22	a
PUFA	2,68 ± 1,48	ab	3,51 ± 0,87	ab	6,12 ± 0,77	b	1,04 ± 0,02	ab	16,51 ± 4,89	ab	1,99 ± 0,42	a
LC-PUFA	2,52 ± 1,42	ab	1,80 ± 0,50	a	5,89 ± 0,98	b	1,01 ± 0,02	a	14,95 ± 4,24	ab	1,68 ± 0,32	a
n-3	2,15 ± 1,24	a	1,51 ± 0,45	a	5,72 ± 0,94	b	0,88 ± 0,01	a	14,64 ± 4,28	c	1,24 ± 0,33	a
n-6	0,53 ± 0,24	a	2,00 ± 0,42	b	0,39 ± 0,22	a	0,16 ± 0,01	a	1,75 ± 0,51	b	0,63 ± 0,08	a
n-3/n-6	3,85 ± 0,71	bc	0,75 ± 0,07	a	18,35 ± 9,48	e	5,39 ± 0,27	bc	8,36 ± 0,06	d	1,95 ± 0,26	b
ARA/EPA	0,40 ± 0,05	c	0,28 ± 0,03	bc	0,09 ± 0,00	a	0,36 ± 0,03	bc	0,23 ± 0,02	bc	0,81 ± 0,19	d
DHA/EPA	1,25 ± 0,10	a	0,94 ± 0,05	a	2,36 ± 0,04	c	1,66 ± 0,05	bc	4,28 ± 0,35	d	1,97 ± 0,27	bc
EPA+DHA	1,96 ± 1,12	ab	1,32 ± 0,42	a	5,52 ± 0,97	b	0,80 ± 0,01	a	12,33 ± 3,47	c	0,99 ± 0,25	a

Los resultados se presentan como media ± DE (n=3). **nd**: no detectado; **tr**: trazas (<0,01); **DMA**: dimetilacetales; **MUFA**: Ácidos grasos monoinsaturados; **PUFA**: Ácidos grasos polinsaturados; **LC-PUFA**: Ácidos grasos polinsaturados de cadena larga; **n-3**: Ácidos grasos omega 3; **n-6**: Ácidos grasos omega 6; **ARA**: 20:4 n-6; **EPA**: 20:5 n-3; **DHA**: 22:6 n-3. Diferentes letras en cada fila indican diferencias significativas entre dietas (P<0,05).

4.1.2. Contenido de pigmentos e Índice de peróxidos

En la Tabla 4 se muestra el contenido en pigmentos carotenoides de las distintas dietas, observándose diferencias significativas entre la limanda ($0,23 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$), y el resto de dietas cuyos valores son más elevados que los de este pescado blanco. En concreto, el langostino muestra el contenido de carotenoides más elevado, si bien no resulta significativo debido a la alta dispersión de los valores obtenidos ($11,22 \pm 3,67 \mu\text{g/g}$).

El índice de peróxidos (IP), utilizado para comprobar el grado de oxidación de los tejidos de los diferentes componentes de las dietas experimentales, son recogidos en la Tabla 5. En ella se puede observar cómo la almeja y la caballa presentan niveles de oxidación más elevados ($45,93 \pm 1,81$ y $34,43 \pm 7,75$ meq O_2/kg lípido respectivamente), mientras que en el langostino y el chipirón muestran los niveles de oxidación más bajos de todas las dietas ($4,69 \pm 0,69$ y $3,49 \pm 1,22$ meq O_2/kg lípido, respectivamente).

Tabla 4. Contenido de pigmentos carotenoides ($\mu\text{g/g}$) de las dietas experimentales utilizadas en la alimentación de reproductores de *G. adscensionis*.

	Galera	Langostino	Chipirón	Limanda	Caballa	Almeja
Carotenoides	1,12 \pm 0,13 b	11,22 \pm 3,67 b	2,81 \pm 1,83 b	0,23 \pm 0,05 a	1,02 \pm 0,37 b	2,70 \pm 0,37 b

Los resultados se presentan como media \pm DE (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas entre las distintas dietas (P<0,05).

Tabla 5. Índice de peróxidos (IP, meq O_2/kg lípido) de dietas experimentales utilizadas en la alimentación de reproductores de *G. adscensionis*.

	Galera	Langostino	Chipirón	Limanda	Caballa	Almeja
IP	11,58 \pm 2,28 ab	4,69 \pm 0,69 a	3,49 \pm 1,22 a	26,72 \pm 10,92 bc	34,43 \pm 7,75 cd	45,93 \pm 1,81 d

Los resultados se presentan como media \pm DE (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas entre las distintas dietas (P<0,05).

4.2. Zoeas de reproductores de *G. adscensionis* alimentados con las distintas dietas experimentales

4.2.1. Composición lipídica

La Tabla 6 muestra los porcentajes de humedad y de lípido en peso fresco y en peso seco de las zoeas obtenidas de reproductores de *G. adscensionis* alimentados con las diferentes dietas experimentales. Si bien a nivel de humedad no se encuentran diferencias entre los tres tratamientos, la zoea alimentada con caballa presenta unos porcentajes de lípido menores (L p.f.: $0,42 \pm 0,06\%$ y L p.s.: $3,91 \pm 0,59\%$) que los otros dos tratamientos de zoeas.

Tabla 6. Contenido de humedad, lípido en peso fresco y lípido en peso seco de zoeas de reproductores de *G. adscensionis* alimentados con las tres dietas experimentales.

	Zoea 1		Zoea 2		Zoea 3	
H (%)	$89,18 \pm 1,43$		$89,22 \pm 0,77$		$87,86 \pm 0,70$	
L p.f. (%)	$0,42 \pm 0,06$	a	$0,59 \pm 0,05$	b	$0,66 \pm 0,03$	b
L p.s. (%)	$3,91 \pm 0,59$	a	$5,49 \pm 0,81$	b	$5,48 \pm 0,44$	b

Los resultados se presentan como media \pm DE (n=4). **H:** Humedad; **L p.f.:** Lípido en peso fresco; **L p.s.:** Lípido en peso seco. Diferentes letras en cada fila indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($P < 0,05$).

En la Tabla 7 se encuentran representadas las clases lipídicas de los tres tratamientos de zoeas del cangrejo rojo. A nivel de las proporciones totales de lípidos polares y neutros no se encontró diferencia alguna entre tratamientos. Sin embargo, sí que se detectan algunos cambios en determinadas clases lipídicas específicas. En las zoeas del tratamiento 1, correspondiente a reproductores alimentados con caballa, se observó un porcentaje significativamente menor de TAG que en los otros dos tratamientos de zoeas ($15,11 \pm 2,44\%$ frente a $23,95 \pm 0,72$ y $23,82 \pm 3,87\%$, respectivamente). Asimismo, la zoea 1 fue la única en presentar LPC ($0,08 \pm 0,10\%$), la cual no se encontró en los tratamientos 2 y 3. En cuanto a la zoea 2, cuyos reproductores fueron alimentados con una dieta multiespecífica, sus niveles de ésteres de esteroles (SE) son menores que los de la zoea 3, procedentes de reproductores alimentados con galera y chipirón ($5,34 \pm 0,15$ frente a $9,48$

$\pm 0,89\%$, respectivamente). Por el contrario, el porcentaje de MAG resulta significativamente menor en la zoea 3 ($1,86 \pm 0,32\%$) que en la zoea 1 ($2,80 \pm 0,50\%$).

Tabla 7. Perfil de clases lipídicas (% del lípido total) de zoeas de reproductores de *G. adscensionis* alimentados con las tres dietas experimentales.

	Zoea 1	Zoea 2	Zoea 3
LPC	$0,08 \pm 0,10$ b	nd a	nd a
SM	$0,96 \pm 0,21$	$0,78 \pm 0,14$	$1,06 \pm 0,30$
PC	$17,44 \pm 4,89$	$17,48 \pm 0,74$	$17,09 \pm 1,11$
PS	$4,71 \pm 1,25$	$3,95 \pm 0,22$	$3,79 \pm 0,28$
PI	$2,70 \pm 0,90$ ab	$2,71 \pm 0,14$ b	$2,32 \pm 0,15$ a
PG	$3,68 \pm 0,74$	$3,16 \pm 0,18$	$3,04 \pm 0,41$
PE	$12,17 \pm 2,55$	$12,38 \pm 0,46$	$11,57 \pm 0,45$
TPL	$41,74 \pm 10,08$	$40,45 \pm 0,48$	$38,85 \pm 2,00$
MAG	$2,80 \pm 0,50$ b	$2,67 \pm 0,58$ ab	$1,86 \pm 0,32$ a
DAG	$1,79 \pm 0,43$ ab	$1,98 \pm 0,10$ b	$1,75 \pm 0,08$ a
CHO	$17,47 \pm 2,26$	$17,89 \pm 0,39$	$17,82 \pm 0,89$
FFA	$12,94 \pm 6,87$	$7,72 \pm 0,37$	$6,42 \pm 2,52$
TAG	$15,11 \pm 2,44$ a	$23,95 \pm 0,72$ b	$23,82 \pm 3,87$ b
SE	$8,16 \pm 2,68$ ab	$5,34 \pm 0,15$ a	$9,48 \pm 0,89$ b
TNL	$58,26 \pm 10,08$	$59,55 \pm 0,48$	$61,15 \pm 2,00$

Los resultados se presentan como media \pm DE (n=4). **LPC**: Lisofosfatidilcolina; **SM**: Esfingomielina; **PC**: Fosfatidilcolina; **PS**: Fosfatidilserina; **PI**: Fosfatidilinositol; **PG**: Fosfatidilglicerol; **PE**: Fosfatidiletanolamina; **TPL**: Total de lípidos polares; **MAG**: Monoacilglicéridos; **DAG**: Diacilglicéridos; **CHO**: Colesterol; **FFA**: Ácidos Grasos Libres; **TAG**: Triacilglicéridos; **SE**: Ésteres de Esterol; **TNL**: Total de lípidos neutros; **nd**: no detectado. Diferentes letras en cada fila indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($P < 0,05$).

La composición en ácidos grasos de las zoeas de *G. adscensionis* se muestran en la Tabla 8. Las zoeas de la dieta 1 presentan unos niveles significativamente menores con respecto a las zoeas 2 y 3 tanto en el contenido de ARA ($0,19 \pm 0,03$ μg ácido graso/mg frente a $0,32 \pm 0,09$ y $0,29 \pm 0,01$) como en el de EPA ($0,22 \pm 0,02$ frente a $0,40 \pm 0,04$ y $0,42 \pm 0,01$ μg ácido graso/mg, respectivamente) y de DHA ($0,26 \pm 0,03$ frente a $0,45 \pm 0,03$ y $0,50 \pm 0,03$ μg ácido graso/mg), no registrándose diferencias entre las zoeas de los dos últimos tratamientos.

En relación a la cantidad total de los grupos de ácidos saturados e insaturados, la zoea procedente de reproductores alimentados con caballa contiene unos niveles significativamente menores de saturados ($0,75 \pm 0,14 \mu\text{g ácido graso/mg}$), monoinsaturados ($0,75 \pm 0,19 \mu\text{g ácido graso/mg}$) y polinsaturados ($0,82 \pm 0,11 \mu\text{g ácido graso/mg}$) con respecto a las zoeas 2 y 3, mientras que entre estas dos no se registran cambios significativos.

Entre los saturados, se encuentran diferencias en los dos principales representantes de estos ácidos grasos. Tanto para el ácido palmítico como para el ácido esteárico, la zoea 1 muestra niveles más reducidos (16:0: $0,42 \pm 0,10$; 18:0: $0,19 \pm 0,03$) que los dos tratamientos restantes.

En el caso de los MUFA, destacan los valores de los ácidos 16:1 n-7 y 18:1 n-9 por su mayor presencia. En el primero, las zoeas 2 y 3 muestran niveles significativamente mayores que la zoea 1 ($0,22 \pm 0,04$ y $0,26 \pm 0,08 \mu\text{g ácido graso/mg}$ frente a $0,09 \pm 0,03 \mu\text{g ácido graso/mg}$). En el de 18C, de nuevo la zoea 1 contiene un valor menor, si bien en este caso la diferencia es menor con la zoea 2 que con la zoea 3 ($0,45 \pm 0,11$ frente a $0,63 \pm 0,07$ y $0,76 \pm 0,12$ respectivamente).

Por último, las proporciones de ácidos omega 3 (n-3) y omega 6 (n-6), muestran unos resultados muy similares a los mencionados previamente. La zoea 1 presenta niveles significativamente menores para ambos grupos (n-3: $0,51 \pm 0,06 \mu\text{g ácido graso/mg}$; n-6: $0,30 \pm 0,06 \mu\text{g ácido graso/mg}$). Asimismo, el ratio entre estos dos grupos para la zoea 1 resulta significativamente más bajo que en los dos tratamientos restantes ($1,76 \pm 0,27$ frente a $2,08 \pm 0,40$ y $2,21 \pm 0,23$).

Tabla 8. Composición en ácidos grasos (μg ácido graso/mg) de las zoeas de reproductores de *G. adscensionis* alimentados con las tres dietas experimentales.

	Zoea 1		Zoea 2		Zoea 3	
14: 0	0,02 \pm 0,01	a	0,05 \pm 0,01	b	0,05 \pm 0,00	b
15: 0	0,01 \pm 0,00	a	0,02 \pm 0,01	b	0,03 \pm 0,00	b
16: 0 DMA	0,02 \pm 0,00	a	0,03 \pm 0,00	b	0,02 \pm 0,00	b
16: 0	0,42 \pm 0,10	a	0,76 \pm 0,07	b	0,87 \pm 0,10	b
16: 1 n-9	tr		tr		tr	
16: 1 n-7	0,09 \pm 0,03	a	0,22 \pm 0,04	b	0,26 \pm 0,08	b
16: 1 n-5	nd	a	0,01 \pm 0,00	b	0,01 \pm 0,00	b
17: 1 ramificado	0,01 \pm 0,00		0,01 \pm 0,01		0,01 \pm 0,00	
17: 0	0,02 \pm 0,00	a	0,03 \pm 0,00	b	0,03 \pm 0,00	b
16: 3 n-4	0,02 \pm 0,00		0,03 \pm 0,01		0,03 \pm 0,01	
18: 0 DMA	0,04 \pm 0,00	a	0,05 \pm 0,01	ab	0,05 \pm 0,00	b
18: 0	0,19 \pm 0,03	a	0,28 \pm 0,04	b	0,30 \pm 0,01	b
18: 1 n-9	0,45 \pm 0,11	a	0,63 \pm 0,07	ab	0,76 \pm 0,12	b
18: 1 n-7	0,13 \pm 0,04	a	0,23 \pm 0,03	b	0,26 \pm 0,03	b
18: 1 n-5	0,01 \pm 0,00	a	0,02 \pm 0,00	b	0,02 \pm 0,01	b
18: 2 n-6	0,06 \pm 0,02		0,06 \pm 0,02		0,06 \pm 0,03	
18: 3 n-3	0,01 \pm 0,00		0,01 \pm 0,00		0,02 \pm 0,01	
20: 0	0,01 \pm 0,00	a	0,02 \pm 0,00	b	0,02 \pm 0,00	b
20: 1 n-9	0,04 \pm 0,00	a	0,06 \pm 0,01	b	0,01 \pm 0,01	a
20: 1 n-7	0,01 \pm 0,00	a	0,02 \pm 0,00	b	0,02 \pm 0,00	b
20: 2 n-6	0,04 \pm 0,01	c	0,01 \pm 0,01	b	0,01 \pm 0,00	a
20: 4 n-6	0,19 \pm 0,03	a	0,32 \pm 0,09	b	0,29 \pm 0,01	b
20: 3 n-3	0,01 \pm 0,00	a	0,01 \pm 0,00	b	0,01 \pm 0,00	b
20: 5 n-3	0,22 \pm 0,02	a	0,40 \pm 0,04	b	0,42 \pm 0,01	b
22: 0	0,01 \pm 0,00	a	0,02 \pm 0,00	b	0,02 \pm 0,00	c
22:1 n-9	tr		tr		0,01 \pm 0,01	
23: 0	tr	b	nd	a	nd	a
22: 5 n-6	0,01 \pm 0,00		0,01 \pm 0,00		0,01 \pm 0,00	
22: 5 n-3	0,01 \pm 0,00	a	0,01 \pm 0,00	b	0,01 \pm 0,00	b
22: 6 n-3	0,26 \pm 0,03	a	0,45 \pm 0,03	b	0,50 \pm 0,03	b
Total	2,38 \pm 0,45	a	3,91 \pm 0,42	b	4,37 \pm 0,39	b
Saturados	0,75 \pm 0,14	a	1,26 \pm 0,14	b	1,40 \pm 0,11	b
MUFA	0,75 \pm 0,19	a	1,19 \pm 0,13	b	1,44 \pm 0,26	b
PUFA	0,82 \pm 0,11	a	1,37 \pm 0,14	b	1,43 \pm 0,03	b
LC-PUFA	0,74 \pm 0,09	a	1,26 \pm 0,14	b	1,32 \pm 0,03	b

n-3	0,51 ± 0,06	a	0,90 ± 0,06	b	0,96 ± 0,03	b
n-6	0,30 ± 0,06	a	0,44 ± 0,09	b	0,44 ± 0,03	b
n-3/n-6	1,76 ± 0,27	a	2,08 ± 0,40	b	2,21 ± 0,23	b
ARA/EPA	0,86 ± 0,11	b	0,77 ± 0,15	ab	0,71 ± 0,01	a
DHA/EPA	1,20 ± 0,06		1,12 ± 0,09		1,19 ± 0,12	
EPA+DHA	0,48 ± 0,05	a	0,85 ± 0,06	b	0,91 ± 0,03	b

Los resultados se presentan como media ± DE (n=4). **nd**: no detectado; **tr**: trazas (<0,01); **DMA**: dimetilacetales; **MUFA**: Ácidos grasos monoinsaturados; **PUFA**: Ácidos grasos polinsaturados; **LC-PUFA**: Ácidos grasos polinsaturados de cadena larga; **n-3**: Ácidos grasos omega 3; **n-6**: Ácidos grasos omega 6; **ARA**: 20:4 n-6; **EPA**: 20:5 n-3; **DHA**: 22:6 n-3. Diferentes letras en cada fila indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos (P<0,05).

4.2.2. Presencia de pigmentos carotenoides

Las zoeas 1 presentaron el menor contenido de carotenoides ($3,22 \pm 1,13 \mu\text{g/g}$), mientras que las del tratamiento 2, cuyos reproductores fueron alimentados con una dieta de galera, langostino, chipirón, almeja y limanda, mostraron los mayores niveles ($13,22 \pm 2,75 \mu\text{g/g}$) (Tabla 9).

Tabla 9. Contenido de pigmentos carotenoides ($\mu\text{g/g}$) de las zoeas de reproductores de *G. adscensionis* alimentados con las tres dietas experimentales.

	Zoea 1		Zoea 2		Zoea 3	
$\mu\text{g/g}$	$3,22 \pm 1,13$	a	$13,22 \pm 2,75$	c	$7,57 \pm 2,70$	b

Los resultados se presentan como media \pm DE (n=4). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($P < 0,05$).

5. DISCUSIÓN

5.1. Composición bioquímica de las dietas y las zoeas de *G. adscensionis*

El contenido lipídico de los distintos tratamientos dietarios muestra una serie de diferencias significativas que deben ser destacadas. Así, la caballa, utilizada hasta el momento como alimento principal y casi exclusivo de los reproductores del cangrejo rojo en las instalaciones del COC-IEO de Santa Cruz de Tenerife, presenta un nivel de humedad inferior al de las otras especies estudiadas en este trabajo. Este hecho se acentúa aún más si se compara con la otra especie de pez estudiada, la limanda, que presenta un 20% más de humedad. Estas diferencias en la humedad también se pueden observar en los porcentajes de lípido en peso fresco (L p.f.) y en peso seco (L p.s.), puesto que la caballa es, con mucha diferencia, la especie con los mayores niveles de lípido. De nuevo en el extremo contrario se encuentra la limanda, cuyas proporciones lipídicas son de las más bajas de todas las especies analizadas aunque no siempre de manera significativa. Estas diferencias en la composición lipídica de ambas especies se corresponden perfectamente con su calificación como pescado azul de la caballa y como pescado blanco la limanda.

El porcentaje de humedad de las zoeas no mostró diferencias entre las tres dietas estudiadas, con valores bastante elevados en todos los casos (89%) como suele ser habitual en la mayoría de los invertebrados marinos, incluyendo el zooplancton. No obstante, estos resultados son ligeramente más elevados que los obtenidos por Reis (2011) (80,06%) y Shcherbakova (2012) (84,06%). Los niveles totales de lípido en peso fresco y seco, sin embargo, mostraron diferencias entre tratamientos. Así, a pesar de que los resultados del presente trabajo muestran a la caballa como la especie con mayor contenido lipídico, la zoea obtenida de reproductores alimentados con esta especie presentó niveles menores que aquellas alimentadas con dietas más variadas. Esto sugiere que una dieta variada, aunque sus componentes individualmente contengan menor cantidad de lípido, promueve la asimilación de lípido en los ejemplares de *G. adscensionis*. Los resultados lipídicos obtenidos para las Zoeas 2 y 3 son similares a los de Reis (2011) y Shcherbakova (2012) a pesar de la diferencia de humedad con los resultados expuestos en la presente memoria.

Otro punto que se debe tener en consideración es el porcentaje de cada clase lipídica que presentan los distintos tratamientos, puesto que las diferencias entre ellos pueden afectar a su vez a la composición lipídica de las zoeas de *G. adscensionis* y por lo tanto, a su calidad nutricional como potencial alimento para el cultivo del pulpo. En este caso, se vuelve a mostrar a la caballa como la especie que presenta las mayores diferencias con respecto al resto de dietas analizadas. Los análisis bioquímicos llevados a cabo en la presente memoria revelan que esta especie destaca por unos niveles muy elevados de lípidos neutros. Este mayor porcentaje se debe principalmente a los acilglicéridos (MAG, DAG y TAG), mientras que en otros lípidos neutros, tales como los ácidos grasos libres (FFA), presentan niveles similares o incluso inferiores a los de otras especies, tales como la limanda. Esta elevada proporción de acilglicéridos debe ser tomada en cuenta a la hora de formular una dieta para reproductores del cangrejo ya que son compuestos lipídicos con marcada función energética que, difícilmente van a formar parte de los tejidos de los ejemplares o de las zoeas que produzcan y por lo tanto, pueden no ser muy efectivos de cara a la mejora de la alimentación de las paralarvas de *Octopus vulgaris*.

Si bien no se detectaron diferencias en los porcentajes totales de lípidos polares (TPL) y neutros (TNL) de las zoeas de *G. adscensionis*, la principal diferencia entre ellas se encuentra en la cantidad de triacilglicéridos (TAG). Curiosamente, la zoea 1, procedente de reproductores alimentados con caballa, contiene un porcentaje significativamente menor que los otros dos tratamientos. Estos resultados contrastan con los obtenidos en las dietas utilizadas, puesto que los niveles de TAG en la caballa resultaban mucho más elevados que en el resto de especies utilizadas para la alimentación de las zoeas 2 y 3. De igual manera que se evidenció para el contenido total de lípido, parece ser que la mezcla de especies en la dieta produce cambios significativos en la composición lipídica de las zoeas. El otro factor diferencial parece ser el porcentaje de ésteres de esteroles (SE), cuyos niveles son menores en la zoea 2, que presenta la dieta más variada de los tres tratamientos. Los resultados aquí obtenidos son similares a los proporcionados por Shcherbakova (2012) para *G. adscensionis* y Reis (2011) para *G. grapsus*. En dichos estudios, sin embargo, se obtuvo un valor de TAG mayor incluso que en el presente trabajo, aunque no se detectó la presencia de monoacilglicéridos (MAG), que sí fue detectado en el presente estudio, si bien con unos niveles bajos.

El resto de clases lipídicas más relevantes de las zoeas no mostraron diferencias entre grupos, con los porcentajes de colesterol (CHO), fosfatidilcolina (PC) y

fosfatidiletanolamina (PE), tres clases lipídicas esenciales para los cefalópodos de acuerdo con diversos estudios (Navarro & Villanueva, 2000; Almansa et al., 2006), mostrando proporciones muy similares. Los fosfolípidos y el colesterol resultan de gran importancia para el desarrollo de numerosas especies marinas (Suzumura, 2005), tanto para la formación de membranas lipídicas como para el aporte de determinados compuestos esenciales, tales como el DHA (Kanazawa, 1997; Wold et al., 2009). Por ello, sus niveles en la dieta deben ser suficientes para cubrir las necesidades nutricionales de cada especie. Los FFA tampoco presentaron diferencias significativas, si bien en la zoea 1 los niveles parecen ser ligeramente mayores. Sin embargo, la importancia de los FFA en las paralarvas de pulpo y por lo tanto en las zoeas de *Grapsus*, se debe más a su composición que a las cantidades que puedan presentar, destacando la importancia de los LC-PUFA (EPA, DHA y ARA) (Reis et al., 2014).

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en los principales ácidos grasos poliinsaturados, cabe destacar como la caballa parece aportar una mayor cantidad de EPA y DHA, hecho que podría influir en el contenido de FAMES de la zoea 1, cuyos reproductores se alimentaron exclusivamente de esta especie. La relación DHA/EPA, que tiene gran importancia en el medio marino. Curiosamente, la caballa muestra un ratio especialmente elevado, indicando unos niveles de DHA muy elevados con respecto al EPA. En el extremo opuesto se encuentran los tratamientos de galera y langostino, todos los cuales presentan un ratio en torno a 1, teniendo por lo tanto unas cantidades de EPA y DHA mucho más equilibradas. Los otros tratamientos tienen un ratio ligeramente más elevado que éstos. Dada la influencia que tiene este ratio en el correcto desarrollo de la fauna marina, principalmente en sus estadios más tempranos (Reis et al., 2014), es un hecho que hay que tener en cuenta a la hora de elaborar una dieta correcta en el ámbito de la acuicultura

Los niveles de ácidos omega 3 (n-3) y omega 6 (n-6), así como el ratio entre los dos grupos, también destacan, principalmente por los valores obtenidos en los tratamientos de caballa. Así, esta especie, al igual que en resultados anteriores, presenta unos niveles de n-3 mucho más elevados que en los otros tratamientos, así como de n-6, en este caso junto al langostino. El ratio n-3/n-6 presenta una gran importancia en la mayor parte de los seres vivos, incluidos los animales marinos. Ambos grupos de ácidos grasos son utilizados por diversas enzimas, tanto para la obtención de nuevos PUFA como para la síntesis de determinados compuestos, tales como los eicosanoides. Dependiendo del

sustrato que usen estas enzimas, n-3 o n-6, los productos que se sintetizan son diferentes y presentan una acción distinta en los organismos. Así, los eicosanoides derivados del ARA (n-6) suelen ser considerados como proinflamatorios, contrariamente a los procedentes del EPA y DHA (n-3), los cuáles presentan una actividad anti-inflamatoria (Wall et al., 2010; Simopoulos, 2011). En general, un ratio de entre 1 y 2 es el recomendable en humanos, por lo que, el equilibrio entre ambos grupos puede resultar esencial tanto para la especie de estudio en cuestión, como para su posterior consumo y efecto en humanos (Tocher, 2015).

Entre los cefalópodos, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) destacan por su alto contenido, así como por su importancia en su correcto desarrollo, principalmente en su estado inicial de paralarva (Miliou et al., 2007; Prato et al., 2010). Diversos estudios han mostrado los efectos que este grupo de ácidos grasos tiene sobre *O. vulgaris*. Entre ellos, el DHA destaca por su función esencial en la formación de las membranas celulares, puesto que juega un papel importante en el mantenimiento de su integridad estructural y funcional (Navarro & Villanueva, 2000, 2003). Esta función se acentúa en las paralarvas de cefalópodos que presentan un crecimiento rápido, como es el caso del pulpo común, por lo que el contenido de LC-PUFA, principalmente ARA, EPA y DHA, debe ser primordial en la dieta básica del pulpo durante sus primeras fases de crecimiento (Miliou et al, 2007). Aunque en menor medida, este hecho también se observa en la mayor parte de las especies marinas, incluyendo las larvas de los peces (Watanabe, 1993; Izquierdo & Koven, 2011). Uno de los principales motivos por el que los crustáceos, entre ellos los cangrejos, se consideran una presa más adecuada para las paralarvas de *O.vulgaris* es precisamente por su alto contenido en estos ácidos grasos altamente poliinsaturados de cadena larga, sobretodo en comparación con la *Artemia*, utilizada hasta el momento como alimento principal de la paralarva pulpo en la acuicultura (Reis et al., 2017).

Independientemente de la dieta recibida por los reproductores, los ácidos grasos más destacados en las zoeas del cangrejo rojo son el ácido palmítico (16:0), el ácido esteárico (18:0), el ácido oleico (18:1 n-9), el ARA, el EPA y el DHA. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios realizados con anterioridad por Reis et al. (2017). Precisamente en estos ácidos grasos se encuentran las principales diferencias entre tratamientos. Los niveles de LC-PUFA de las zoeas 2 y 3, procedentes de reproductores alimentados con dietas variadas, son significativamente más elevados que en la zoea de

reproductores alimentados con caballa. Sin embargo, los porcentajes de EPA y DHA parecen mantenerse en niveles parecidos en todos los tratamientos, dado que en el ratio DHA/EPA no se observan diferencias significativas. Este ratio tiene una gran importancia, puesto que se ha observado una relación clara entre niveles bajos de DHA/EPA (<1,5) con un aumento de la mortalidad y una disminución del crecimiento en los cefalópodos, incluyendo *O. vulgaris* (Okumura et al., 2005; Reis et al., 2014).

El ratio ERA/EPA muestra unos niveles relativamente más elevados de ARA frente a EPA en la zoea 1, si bien en los tres tratamientos este ratio se mantiene por debajo de 1. Estos resultados difieren de lo obtenido en estudios previos (Reis, 2011; Shcherbakova, 2012), los cuales mostraron mayores niveles de ARA que de EPA. Este ratio resulta de gran importancia para *O. vulgaris*, ya que el ARA parece estar ligado a la mejora de la calidad de sus huevos, así como a un aumento de la supervivencia en diversas especies marinas, incluyendo los cefalópodos (Miliou et al., 2006). En adición a esto, diversos estudios han detectado una competencia entre ARA y EPA en la esterificación de algunos fosfolípidos, así como en la producción de eicosanoides (Shcherbakova, 2012), y un aumento en los niveles de EPA parece conducir a un descenso consecuente de ARA, presentando pues una relación inversa (Miliou et al., 2006; Estefanell et al., 2012).

5.2. Presencia y abundancia de pigmentos carotenoides en las dietas y zoeas de *G. adscensionis*

La presencia de carotenoides en diversas especies de cefalópodos, incluyendo *O. vulgaris*, ha sido reportada en diversos estudios (Maoka et al, 1989; Shahidi & Brown, 1998), destacando la importancia de la astaxantina y sus ésteres (Maoka, 2011). En general, los pigmentos carotenoides tienen una reconocida función antioxidante en la naturaleza, así como una potenciación de la resistencia al estrés oxidativo (Birben et al, 2012; D’Orazio et al, 2012), siendo unos compuestos esenciales para el mantenimiento de la integridad y función celular. En el ámbito de la acuicultura, esta protección frente a la oxidación resulta de gran importancia, especialmente en los PUFA, los cuales tienen una mayor tendencia a la oxidación, por lo que su presencia en la dieta es altamente necesaria. Esta repercusión se acentúa si se tiene en cuenta el gran relieve de estos ácidos grasos, en especial los LC-PUFA, en las especies de estudio. En menor medida los carotenoides, principalmente la astaxantina, también realizan una función de protección y defensa

contra los radicales libres, los cuales pueden penetrar en las membranas de las células y producir daños oxidativos importantes (Galasso et al, 2017). Debido a todo esto, y al hecho de que los cefalópodos requieren obtener estos pigmentos a través de la dieta, en el presente estudio se analizó la abundancia de carotenoides en las dietas de *G. adscensionis*, así como en las propias zoeas.

Nuestros resultados parecen indicar que los pigmentos ingeridos a través de la dieta por los reproductores de *G. adscensionis*, son transferidos eficientemente a sus zoeas. De esta forma, la dieta más variada, que a su vez contenía la especie con mayor nivel de carotenoides (langostino), dio lugar a zoeas con el mayor contenido de estos pigmentos antioxidantes. Por el contrario, la zoea alimentada exclusivamente con caballa muestra los niveles más bajos de todos los grupos experimentales, mostrando una posible escasez a la hora de proteger la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el ARA, el EPA y el DHA. Dada la gran transcendencia que los carotenoides tienen en la salud de los seres vivos, incluidos los cefalópodos, su contenido debería ser tenido en cuenta en la alimentación de *O. vulgaris*.

5.3. Diferencias en la oxidación en las dietas de reproductores de *G. adscensionis*

Como se ha visto previamente, la oxidación puede resultar un problema en el desarrollo de la fauna marina, especialmente a nivel de los LC-PUFA, varios de los cuales son ácidos grasos esenciales tanto para el cangrejo rojo como para el pulpo común. Este factor debe tenerse en consideración en el ámbito de la nutrición en acuicultura, principalmente en el cultivo de especies para las cuales no se ha desarrollado una dieta adecuada en las que es práctica común la utilización de dietas húmedas basadas en especies marinas con un bajo valor nutricional, puesto que lo que se busca es garantizar un suministro continuo de alimento. Además, estas dietas húmedas suelen ser proporcionadas congeladas, ya que se trata de la forma más sencilla y barata de asegurar una alimentación estable sin falta de stock. Sin embargo, en el proceso de congelación el alimento puede sufrir una pérdida en la calidad nutricional, que puede variar según el proceso de congelación utilizado, incluida la temperatura (Tolstorebrov et al, 2009; Secci & Parisi, 2016).

En este caso, y dado que el alimento de los reproductores del cangrejo rojo les fue proporcionado mediante trozos congelados, se analizaron su índice de peróxidos para

comprobar si el grado de oxidación que sufren debido al estado de congelación varía entre las diferentes especies que integraron las dietas experimentales.

Según los resultados obtenidos, se observa una clara diferencia en el estado de oxidación de las distintas especies de la dieta. Así, la almeja y la caballa presentan un índice de peróxidos mayor, lo cual indica un grado de oxidación mayor de sus lípidos debido a la congelación. Por el contrario, el chipirón y el langostino obtuvieron unos valores significativamente menores, y la galera muestra un nivel intermedio entre los dos grupos. Hay que tener en cuenta que los niveles de oxidación pueden verse influidos por otros efectos, tales como el proceso de congelación, puesto que pueden producirse problemas en la cadena de frío. Por ello, es recomendable realizar análisis de peróxidos cuando se vayan a utilizar estas dietas para comprobar la calidad del alimento, así como evitar el uso de dietas que lleven excesivo tiempo congeladas.

Estos resultados pueden ser importante a la hora de realizar la alimentación de cualquier especie, incluido *G.adscensionis*, dado que este índice indica una reducción del valor nutricional de la especie en cuestión.

En general, en base a los resultados obtenidos se puede deducir que la zoea procedente de reproductores alimentados con una dieta más variada resulta un alimento más adecuado para las paralarvas de pulpo debido a sus elevados niveles nutricionales en comparación con la zoea procedente de una monodieta. Sería recomendable estudiar los efectos de estas dietas en el número de huevos de las puestas, así como en la mortalidad y el tamaño de las zoeas resultantes, así como comprobar los efectos de la alimentación de las paralarvas de pulpo con zoeas enriquecidas.

6. CONCLUSIONES

1. La composición de la dieta de los reproductores del cangrejo rojo *Grapsus adscensionis* produce cambios significativos en la composición lipídica y de pigmentos de las zoeas producidas.
2. A pesar de que la dieta monoespecífica a base de caballa presenta el contenido lipídico más alto, éste no se ve reflejado en el contenido lipídico de las zoeas mostrando una limitada capacidad de los reproductores para asimilar el lípido dietario y su transferencia a la descendencia.
3. La dieta multiespecífica compuesta por galera, langostino, chipirón, almeja y limanda, incrementa el contenido de diversos ácidos grasos esenciales para el cultivo de *G. adscensionis* y *Octopus vulgaris*, tales como el ácido araquidónico (ARA), el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA), frente a una dieta monoespecífica, aunque ésta sea más rica en estos compuestos.
4. Las zoeas cuyos reproductores fueron alimentados con la dieta multiespecífica, presentan los niveles más elevados de pigmentos carotenoides, y por lo tanto pueden resultar más convenientes para la alimentación de *O. vulgaris* en la acuicultura.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Almansa, E., Domingues, P., 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.
- Ambrose, R.F. & Nelson, B.V. 1983. Predation by *Octopus vulgaris* in the Mediterranean. *Marine Ecology* 4 (3), 251-261.
- Avendaño, O., Roura, A., Cedillo-Robles, C.E., González, A.F., Rodríguez-Canul, R., Velázquez-Abunader, I. & Guerra, A. 2020. *Octopus americanus*: a cryptic species of the *O. vulgaris* species complex redescribed from the Caribbean. *Aquatic Ecology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10452-020-09778-6>.
- Barua, A.B., Furr, H.C., Janick-Buckner, D. & Olson, J.A. 1993. Simultaneous analysis of individual carotenoids, retinol, retinyl esters, and tocopherols in serum by isocratic non-aqueous reversed-phase HPLC. *Food Chemistry* 46 (4), 419-424.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5 (1), 9-19.
- D’Orazio, N., Gemello, E., Gammone, M. A., De Girolamo, M., Ficoneri, C. & Riccioni, G. 2012. Fucoxantin: A treasure from the sea. *Marine Drugs* 10 (3), 604-616.
- Eggers, L.F. & Schwudke, D. 2016. Liquid Extraction: Folch. *Encyclopedia of Lipidomics*, 1-6.
- Estefanell, J., Socorro, J., Izquierdo, M. & Roo, J. 2012. Growth, food intake, protein retention and fatty acid profile in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed agglutinated moist diets containing fresh and dry raw materials based on aquaculture by-products. *Aquaculture Research* 45 (1), 1-14.
- Estévez, A., McEvoy, L.A. & Bell, J.G. 1998. Effects of temperature and starvation time on the pattern and rate of loss of essential fatty acids in *Artemia* nauplii previously enriched using arachidonic acid and eicosapentaenoic acid-rich emulsions. *Aquaculture* 165, 295-311.
- EUMOFA, 2020. El pulpo en la UE: Estructura de los precios en la cadena de suministro. Los casos de Italia, España y Grecia. Observatorio Europeo del Mercado de los Productos de la Pesca y de la Acuicultura. 2-24.

- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2-33.
- Folch J., Lees, M. & Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226(1), 497-509.
- Galasso, C., Corinaldesi, C. & Sansone, C. 2017. Carotenoids from marine organisms: Biological functions and industrial applications. *Antioxidants* 6 (4), 96.
- 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.
- Iglesias, J., Fuentes, L., & Villanueva, R. (Eds.). 2014. Cephalopod culture, *Octopus vulgaris*, Paralarval culture and on growing. *Springer Science & Business Media*. 427-467. Dordrecht, Países Bajos.
- Iglesias, J., Otero, J.J., Moxica, C., Fuentes, L. & Sánchez, F.J. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International* 12, 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, 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.
- Izquierdo, M. & Koven, W. 2011. Lipids. *En: Larval Fish Nutrition*. Ed.: G. Joan Holt. Wiley-Blackwell, John Wiley and Sons Publisher, Chichester, UK. 47-81 pp.
- Jereb, P., Allock, A.L., Lefkaditou, E., Piatkowski, U., Hastie, L.C. & Pierce, G.J. 2015. Cephalopod biology and fisheries in Europe: II. Species Accounts. *ICES Cooperative Research Report No. 325*.
- Kanazawa, A. 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture* 155, 129-134.
- Maoka, T. 2011. Carotenoids in marine animals. *Marine Drugs*, 9, 278-293.
- Maoka, T., Yokoi, S & Matsuno, T. 1989. Comparative biochemical studies of carotenoids in nine species of cephalopoda. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 92 (2), 247-250.

- Miliou, H., Fintikaki, M., Tzitzinakis, M., Kountouris, T. & Verriopoulos, G. 2006. Fatty acid composition of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to rearing temperature and body weight. *Aquaculture* 256, 311-322.
- Miliou, H., Fintikaki, M., Tzitzinakis, M., Kountouris, T. & Verriopoulos, G., 2007. Nucleic acids and fatty acids of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to the growth rate. *Aquaculture Research* 38: 1693-1701
- Navarro, J.C., Amar, F. & Sargent, J.R. 1992. Fatty acid composition of coastal and inland *Artemia* sp. populations from Spain. *Aquaculture* 102, 219-230.
- 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.
- Okumura, S., Kurihara, A., Iwamoto, A. & Takeuchi, T. 2005. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture* 244, 147-157.
- Olmos-Pérez, L., Roura, A., Pierce, G.J., Boyer, S. & González, A.F. 2017. Diet composition and variability of wild *Octopus vulgaris* and *Alloteuthis media* (Cephalopoda) paralarvae: a metagenomics approach. *Frontiers in Physiology* 8: 321. DOI: 10.3389/fphys.2017.00321.
- Olsen, R.E. & Henderson, R.J. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 129, 189-197.
- 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.
- Quetglas, A., Alemany, F., Carbonell, A., Merella, P. & Sánchez, P. 1998. Biology and fishery of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, caught by trawlers in Mallorca (Balearic Sea, Western Mediterranean). *Fisheries Research* 36, 237-249.
- Reis, D.B. 2011. Improvement of common octopus (*Octopus vulgaris*) paralarval culture, based on studies of feeding and nutrition with alternative preys (Tesis de Máster). Universidade do Algarve, Faro.

- Reis, D.B., Acosta, N.G., Almansa, E., Navarro, J.C., Tocher, D.R., Andrade, J.P., Sykes, A.V. & Rodríguez, C. 2016. Comparative study on fatty acid metabolism of early stages of two crustacean species: *Artemia* sp. metanauplii and *Grapsus adscensionis* zoeae, as live prey for marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 204, 53-60.
- Reis, D.B., García-Herrero, I., Riera, R., Felipe, B.C., Rodríguez, C., Sykes, A.V., Martín, M.V., Andrade, J.P. & Almansa, E., 2014. An insight on *Octopus vulgaris* paralarvae lipid requirements under rearing conditions. *Aquaculture Nutrition* 21, 797–806.
- Roo, J., Estefanell, J., Betancor, M.B., Izquierdo, M., Fernández-Palacios, H & Socorro, J. 2017. Effects of supplementation of decapod zoea to *Artemia* basal diet on fatty acid composition and digestive gland histology in common octopus (*Octopus vulgaris*) paralarvae. *Aquaculture Research* 48 (2), 633-645.
- Roura, A., González, A. F., Redd, K. & Guerra, A. 2012. Molecular prey identification in wild *Octopus vulgaris* paralarvae. *Marine Biology* 159, 1335-1345.
- Secci, G. & Parisi, G. 2016. From farm to fork: lipid oxidation in fish products. A review. *Italian Journal of Animal Science* 15 (1), 124-136.
- Shahidi, F., Metusalach & Brown, J.A. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science* 38 (1), 1-67.
- Shanta, N.C. & Decker, E.A. 1994. Rapid, sensitive, iron-base spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International* 77 (2), 421-424.
- Shcherbakova, A. 2012. The effect of tank types on the growth and survival of *Octopus vulgaris* paralarvae fed the crab *Grapsus adscensionis* zoeae (Tesis de Máster). Universidade do Algarve, Faro.
- Shcherbakova, A., Riera, R., Almansa, E., Felipe, B., Rodríguez, C., Reis, D., Andrade, J.P. & Sykes, A.V. 2011. Reproductive investment and fecundity of the Red rock crab (*Grapsus adscensionis*) in Tenerife (Canary Islands, Atlantic Ocean) (Decapoda, Grapsidae). *Vieraea* 39, 139-147.
- Simopoulos, A.P. 2011. Importance of the Omega-6/Omega-3 balance in health and disease: Evolutionary aspects of diet. *World Review of Nutrition and Dietetics* 102, 10-21.
- Smith, C.D. 2003. Diet of *Octopus vulgaris* in False Bay, South Africa. *Marine Biology* 143, 1127-1133.

- Suzumura, M. 2005. Phospholipids in marine environments: a review. *Talanta* 66, 422-434.
- Tocher, D. R. 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449, 94-107.
- Tolstorebrov, I., Eikevik, T. M. & Indergård, E. 2014. The influence of long-term storage temperature and type of packaging material on the lipid oxidation and flesh color of frozen Atlantic herring fillets (*Clupea harengus*). *International Journal of Refrigeration* 40, 122-130.
- Vaz-Pirez, P., Seixas, P. & Barbosa, A. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. *Aquaculture* 238, 221-238.
- Villanueva, R., Nozais, C. & Boletzky, S. 1996. Swimming behaviour and food searching in planktonic *Octopus vulgaris* Cuvier from hatching to settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 208, 169-184.
- Wall, R., Ross, R.P., Fitzgerald, G. F. & Stanton, C. 2010. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews* 68 (5), 280-289.
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larva fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 24, 152-161.
- Wold, P.A., Hoehne-Reitan, K., Cahu, C.L., Infante, J.Z., Rainuzzo, J. & Kjørsvik, E. 2009. Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids: effects on gut liver and pancreas histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture nutrition* 15, 73-84.
- Young, R.E. & Harman, R.F. 1988. "Larvæ", "Paralarvæ" and "Subadult" in cephalopod terminology. *Malacologia* 29, 201-207.
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. 2017. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1), 25.