

La estrella de mar *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) como suplemento alimenticio de especies marinas y como posible candidata para acuicultura multitrófica integrada.

The starfish *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) as a food supplement for marine species and as a suitable candidate for integrated multi-trophic aquaculture.



Trabajo de Fin de Grado

Érica María Reina Hernández

Tutorizado por José Antonio Pérez Pérez y Nieves Guadalupe Acosta González

Grado en Biología. Junio 2022

Índice

Resumen	0
Abstract	0
1. Introducción	1
1.1. Actualidad de la acuicultura	1
1.2. Requerimientos nutricionales para el cultivo de especies marinas	2
1.3. La estrella de mar <i>Coscinasterias tenuispina</i> , especie candidata como suplemento para alimentar especies marinas	2
1.4. Equinodermos para alimentación humana y de animales terrestres	4
1.5. Condiciones nutritivas de especies marinas cultivadas	5
2. Objetivos	7
3. Material y métodos	8
3.1. Recolección y cultivo de <i>Coscinasterias tenuispina</i>	8
3.2. Alimentación	9
3.3. Análisis bioquímico	9
3.3.1. Extracción lipídica y determinación del contenido de humedad	10
3.3.2. Determinación del perfil de ácidos grasos	11
3.3.3. Determinación de clases lipídicas	14
3.4. Análisis estadístico	15
4. Resultados	16
4.1. Datos de crecimiento	16
4.2. Perfil de ácidos grasos	16
4.3. Contenido de lípido total y perfil de clases lipídicas	19
5. Discusión	20
6. Conclusiones	25
6. Conclusions	25
7. Bibliografía	26

Resumen

Actualmente, muchas especies marinas son candidatas potenciales para la diversificación de la acuicultura por su fácil adaptación a ser cultivadas en cautividad a pesar de verse dificultado por el alto requerimiento nutricional durante las primeras fases de su desarrollo. El objetivo del presente estudio es valorar el efecto de tres dietas experimentales en el crecimiento y composición lipídica de *Coscinasterias tenuispina* de cara a su posible uso como suplemento en la dieta de especies marinas y su potencial producción en acuicultura multitrófica. Las dietas experimentales se basaron en caballa y restos de sifonados, caballa, y una dieta mixta de caballa, almeja y cangrejo.

Las estrellas bajo diferentes tratamientos dietarios no mostraron variaciones en el crecimiento ni en la supervivencia, pero sí en el contenido de algunos ácidos grasos. Los ejemplares alimentados con la dieta mixta presentaron las proporciones más elevadas de ácido palmítico (16:0), ácido eicosapentanoico (20:5 *n*-3) y ácido docosahexanoico (22:6 *n*-3). Por el contrario, con las otras dos dietas mostraron valores más elevados de ácido α -linolénico (18:3 *n*-3). No se obtuvieron diferencias significativas en las clases lipídicas, pero predominan lípidos importantes en el desarrollo de especies marinas como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, colesterol y triacilglicéridos en todos los ejemplares experimentales.

Palabras clave: Acuicultura multitrófica, Asteroideo, Nutrición, Suplemento dietario.

Abstract

Currently, many of the marine species are candidates for aquaculture diversification due to their easy adaptation to captivity, although their cultivation is hampered by their high nutritional requirements during the first stages of their life cycle. The objective of the present study is to evaluate the effect of different experimental diets on the growth and lipid composition of *Coscinasterias tenuispina* regarding its possible use as a dietary supplement for marine species, and their potential production in multi-trophic aquaculture systems. The experimental diets were based on mackerel and siphonage wastes, exclusively mackerel, or a mixture of mackerel, clam and crab.

Dietary treatments did not significantly affect starfish growth and survival, but do show differences in the content of some fatty acids. Specimens fed the mixed diet presented the highest proportions of palmitic acid (16:0), eicosapentanoic acid (20:5 *n*-3) and docosahexanoic acid (22:6 *n*-3). By contrast, starfish receiving the other two experimental diets, showed higher values of α -linolenic acid (18:3 *n*-3). No significant differences in lipid classes were registered between treatments, but relevant lipid fractions for the development of marine species such as phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, cholesterol and triacylglycerides were predominant in all experimental specimens.

Key words: Multitrophic aquaculture, Asteroidea, Nutrition, Dietary supplement.

1. Introducción

1.1. Actualidad de la acuicultura

La demanda de la producción de alimentos de origen marino en las últimas 5 décadas ha aumentado en paralelo al incremento de la población mundial, que, según las Perspectivas de la Población Mundial de las Naciones Unidas, en 2050 llegará a alcanzar los 9.000 millones de personas, por lo que la demanda de estos alimentos será aún mayor (Rosa et al., 2020). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) indica que la acuicultura es la principal candidata para sostener la demanda mundial de productos marinos debido al estado de sobreexplotación de muchos caladeros mundiales, representando actualmente el 52% del total de pescado que se destina al año a la alimentación humana (FAO, 2020). Por ejemplo, en 2017, las cifras totales de producción de acuicultura en España fueron de 345.635 toneladas (APROMAR, 2018), de las cuales aproximadamente un 83% son moluscos, dentro de los que destacan los bivalvos y los cefalópodos (Aliaga, 2019).

En general, la producción alimentaria conlleva un impacto medioambiental negativo a ya que destruye los ecosistemas y afecta de forma directa a la calidad del suelo y del agua y con ello a la diversidad de la flora y la fauna (Santana et al., 2013). Uno de los propósitos del sector acuícola es mejorar la sostenibilidad ambiental junto al bienestar animal y la calidad nutricional de los alimentos que podría afectar a la salud pública (Aarset et al., 2004; Gormaz et al., 2014; Olsen and Osmundsen, 2017). Una de estas alternativas que ofrece muchas ventajas es la acuicultura multitrófica integrada (AMTI) (Rosa et al., 2020), que permite minimizar la carga orgánica que se genera en el medio marino ya que se trata de un cultivo combinado de especies de diferentes niveles tróficos en el que los eslabones inferiores o especies secundarias, tanto filtradores como detritívoros, aprovechan los residuos metabólicos y restos de alimentos no consumidos que generan los niveles tróficos superiores como peces y camarones que presentan su propia alimentación (Barrington et al., 2009; Cubillo et al., 2016; Granada et al., 2016; Ren et al., 2012).

Los niveles tróficos inferiores pueden estar constituidos por organismos filtradores que se alimentan tanto de materia orgánica en suspensión como del plancton (por ejemplo, moluscos bivalvos filtradores) mientras que la materia inorgánica es aprovechada por ejemplo por las macroalgas. También pueden ser detritívoros (la mayoría son crustáceos) que crecen a partir de los restos de todos los organismos anteriores (Xunta de Galicia, 2012).

1.2. Requerimientos nutricionales para el cultivo de especies marinas

El cultivo de especies marinas en fase larvaria es extremadamente delicado ya que la carencia de nutrientes esenciales puede afectar a su crecimiento y al desarrollo del sistema visual y neuronal (Estefanell, 2013). En un principio, las larvas de especies marinas como los peces dependen de los nutrientes endógenos del saco vitelino por lo que cuando esta fuente de nutrientes se agota utilizan una fuente exógena que es generalmente el zooplancton (Gatlin, 1998). La mayor parte de las dietas formuladas para acuicultura incluyen harina de pescado ya que contiene gran cantidad de proteínas y lípidos. No obstante, esta harina presenta desventajas como su insostenibilidad, elevado coste en el mercado, además de que muchas de estas dietas elaboradas para el cultivo en fase larvaria no han sido capaces de asemejarse a los alimentos que obtienen del medio natural en estado salvaje (Gatlin, 1998).

Para que el transcurso del ciclo de vida de las especies marinas se produzca de manera adecuada deben obtener los nutrientes que son esenciales, entre ellos, proteínas, carbohidratos, minerales y lípidos. Respecto a estos últimos, destacan los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs, del inglés *long chain polyunsaturated fatty acids*) como el ácido araquidónico (ARA, 20:4 *n*-6), el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 *n*-3) y el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6 *n*-3) (Prato et al., 2010). Por ejemplo, la deficiencia de estos ácidos grasos en los espáridos provoca una reducción en la eclosión de los huevos y malformaciones en el cuerpo (Watanabe et al., 1984).

1.3. La estrella de mar *Coscinasterias tenuispina*, especie candidata como suplemento para alimentar especies marinas

Las estrellas de mar son equinodermos al igual que los erizos de mar, pepinos de mar, lirios de mar y ofiuras, y son importantes en el medio marino porque transforman la materia orgánica que es utilizada por otros organismos y además son capaces de oxigenar el sedimento (Margulis and Chapman, 2009). Se caracterizan porque presentan un gran potencial para su cultivo acuícola por varias propiedades, entre ellas por su fácil reproducción y rápido crecimiento, por su capacidad de biorremediación y por su composición en productos bioactivos importantes desde el punto de vista farmacológico. Por ejemplo, Riccio y colaboradores (1986) caracterizaron en la especie *Coscinasterias tenuispina* sustancias con propiedades farmacológicas como las saponinas y esteroides (Kanazawa, 2001) y otros estudios han descrito sustancias con actividad antitumoral (Kilimnik et al., 2016; Tian et al., 2013).

C. tenuispina es una estrella de mar perteneciente a la clase Asteroidea y al orden Forcipulatida. Esta especie se distribuye ampliamente por el Mediterráneo y en las zonas de costas rocosas templadas y subtropicales del Atlántico y se está expandiendo a la parte noreste del Mediterráneo concretamente a las costas de Turquía (Barreto, 2019). Se puede localizar a poca profundidad incluso en la zona intermareal (Stamouli et al., 2018) y presenta un comportamiento depredador inespecífico en aguas del Mediterráneo por la gran abundancia de alimento (García-Cisneros et al., 2017). Su dieta omnívora, en general, incluye la predación de moluscos y equinodermos, así como el consumo de alimento inerte (Barreto, 2019).

Esta especie llega a medir 20 cm de diámetro y se caracteriza por presentar unas espinas cortas a lo largo de todo su cuerpo (Stamouli et al., 2018) (*Ilustración 1*). Se puede reproducir tanto de forma sexual como asexual y esta última forma se produce en la etapa adulta mediante fisiparidad (separación de los miembros del organismo para dar lugar a nuevos individuos clónicos) (Alves et al., 2002; Barreto, 2019) que tiene lugar a lo largo de todo el año, pero con mayor frecuencia en verano (Alves et al., 2002). Seto y otros autores (2013) descubrieron que la temperatura y la alimentación tienen una fuerte influencia en el tipo de reproducción y, por ende, en la evolución de las poblaciones de esta especie por lo que la posibilidad de controlar la fisiparidad permite evitar la fase de fecundación y desarrollo larvario, lo que simplifica significativamente su cría en cautividad.



Ilustración 1. *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816). Autor: Rogelio Herrera. Foto tomada de <https://redpromar.org/>

Otra de las ventajas de cultivar estrellas de mar es que al pertenecer a un nivel trófico inferior presentan un gran potencial para su integración en sistemas de acuicultura multitrofica integrada ya que se pueden mantener fácilmente con los desechos de tanques de otros cultivos

de especies marinas. Por todo ello, se pretende estudiar su posible uso en la alimentación acuícola mediante la preparación de harinas como suplemento en la dieta de especies marinas.

Sin embargo, las harinas de estrellas de mar como materia prima orgánica presentan algunos inconvenientes desde el punto de vista nutricional. Según un estudio realizado por Budiño y colaboradores (2021) sobre la evaluación de la especie *Asterias rubens* como materia prima para la fabricación de piensos acuícolas, la harina de estrella de mar presenta baja cantidad de proteínas, grasas y fibra, y un mayor contenido de cenizas que las harinas de pescado. El alto contenido de cenizas y su capacidad higroscópica dificultan su uso como materia prima en alimentos para peces, aunque se podría reducir este contenido mediante un proceso de hidrolización de la harina, lo que conduciría a un aumento en los porcentajes de los componentes restantes (Machuca-Loja et al., 2016). En general, la eficacia de las harinas de estrellas de mar va a depender de la especie objetivo a la que se va a alimentar.

1.4. Equinodermos para alimentación humana y de animales terrestres

El consumo de equinodermos es cada vez más frecuente en numerosos países y entre ellos se encuentra España, en la que una de las especies con más interés para el consumidor es el erizo de mar común (*Paracentrotus lividus*) (Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., 2001) principalmente por sus gónadas (Tourón, 2012). Para su cultivo acuícola se necesita controlar las condiciones ambientales en las que van a vivir (Fridberger et al., 1979) y las más efectivas se dan en tanques con circuito cerrado de agua (Tourón, 2012). La composición de la dieta que se le va a proporcionar va a afectar directamente a la composición bioquímica de los erizos, por lo que deben presentar un contenido considerable de proteínas necesario para el crecimiento gonadal por su percusión a la hora de almacenar de sustancias de reserva en las gónadas en forma de lípidos y carbohidratos (Fernández, 1995; Lawrence et al., 2007; Liyana-Pathirana et al., 2002), además de para un desarrollo óptimo del exoesqueleto y de la matriz intraestrómicamente en la cara interna (Dubois et al., 1989).

Aparte del uso de equinodermos para consumo humano y para especies marinas también puede ser útil como suplemento en dietas de animales terrestres. Por ejemplo, Sørensen y Nørgaard (2016) realizaron un estudio sobre la eficacia de proporcionar como suplemento la harina de estrella de mar (*Asterias rubens*) en las dietas de lechones destetados y para reemplazar, parcialmente, la harina de pescado y de soja. Sin embargo, cuando se aumenta su inclusión de un 5 a un 10% se produce un elevado nivel de Ca y con ello la relación Ca:P que

afecta negativamente a la digestibilidad y la absorción de P. Esto se debe a que el exceso de calcio limita la disponibilidad de fósforo al unirse al fitato, por lo que aumenta el pH intestinal y, por lo tanto, reduce la eficacia de la enzima fitasa exógena (Qian et al., 1996; Selle et al., 2009).

Además, Shadrina y otros autores (2019) determinaron en estrellas de mar el predominio de albúminas en *Patiria pectinifera* y de sustancias minerales en *Evasterias echinosoma*. El contenido cuantitativo de proteínas y sustancias minerales en las estrellas de mar puede ser la base para la producción de aditivos para pienso, principalmente productos proteicos para el cultivo de aves de corral y productos minerales para las gallinas ponedoras.

Para formular dietas a partir de asteroideos hay que tener en cuenta la presencia en estos de productos bioactivos. Las estrellas de mar presentan un sistema inmunológico muy desarrollado para defenderse de bacterias, hongos y virus que pueden ser peligrosos para su supervivencia, por lo que han desarrollado compuestos tóxicos que les permite competir con estos microorganismos y pueden ser antioxidantes, bactericidas, citotoxinas, antifúngicas y anticoagulante (Pastrana Franco et al., 2015). Paralelamente a este estudio se están llevando a cabo ensayos para analizar estos productos bioactivos, su supuesta toxicidad y posibles estrategias para reducir o eliminar esta toxicidad. Uno de los análisis es el método de hidrólisis combinada (enzimática en combinación con térmica) que permite obtener, a partir de materia prima caracterizada como biotóxica, aditivos alimentarios proteicos y minerales seguros (Shadrina et al., 2019).

1.5. Condiciones nutritivas de especies marinas cultivadas

El objetivo general de la AMTI es proporcionar alimentos marinos a la población de una forma sostenible reduciendo el impacto medioambiental de la actividad acuícola, pero también se debe tener en cuenta que estas especies cultivadas presenten las características nutricionales adecuadas y de calidad que cubran las necesidades del consumidor (Zárate et al., 2017). Para que esta última condición se cumpla, las dietas de las especies de cultivo deben proporcionar los nutrientes necesarios para que estos organismos sean una fuente rica en proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y elementos inorgánicos.

El presente trabajo se centra en el análisis lipídico, ya que los lípidos son esenciales para el correcto desarrollo larvario de especies acuáticas. En general, constituyen la principal reserva de energía del organismo, y son los responsables de almacenar y producir agua y calor a partir

de las reacciones de combustión de los triglicéridos. A nivel celular, se estructuran formando la bicapa lipídica de la membrana plasmática, que delimita el interior celular del medio extracelular. Es por ello que son fundamentales en el mantenimiento de la fluidez de la membrana y en los procesos de señalización celular asociados (Janssen and Kiliaan, 2014; Skowronska-Krawczyk and Budin, 2020), pudiendo intervenir, asimismo, como mediadores de inflamación al ser precursores de eicosanoides (Ruiz et al., 1998). Además, tienen un papel determinante en la reproducción al ser precursores de hormonas esteroideas (Rone et al., 2009).

Los lípidos están formados por ácidos grasos, los cuales son cadenas hidrocarbonadas con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro. Según el número de dobles enlaces presentes en la cadena hidrocarbonada, se clasifican en saturados (presentan enlaces simples) e insaturados (presentan dobles enlaces), que a su vez pueden dividirse en monoinsaturados o poliinsaturados si presentan uno, o dos o más dobles enlaces, respectivamente. Dentro de los insaturados, según la posición del doble enlace respecto al extremo metilo terminal, se dividen en omega 3, omega 6 y omega 9.

2. Objetivos

El presente estudio persigue analizar bioquímicamente el perfil lipídico de una posible especie candidata para acuicultura multitrófica integrada, la estrella de mar *Coscinasterias tenuispina*, y así determinar su viabilidad en función de su calidad nutricional como complemento a la dieta de especies marinas.

Basándonos en esto, el objetivo general de este trabajo es comprobar los efectos de diferentes tipos de dietas sobre la composición nutricional de *C. tenuispina* para valorar cuál de las dietas es la más favorable para alimentar a esta especie de cara a su utilización como suplemento en la alimentación de especies marinas.

Para la consecución de este objetivo general, se abordarán los siguientes objetivos específicos en el análisis de *C. tenuispina*:

1. Evaluar su contenido lipídico total.
2. Analizar su perfil de ácidos grasos.
3. Determinar su composición en clases lipídicas.

3. Material y métodos.

3.1. Recolección y cultivo de *Coscinasterias tenuispina*.

Las muestras de *Coscinasterias tenuispina* fueron obtenidas en la planta de cultivos del Centro Oceanográfico de Canarias del Instituto Español de Oceanografía (COC-IEO-CSIC). Los ejemplares experimentales fueron seleccionados a partir de individuos recolectados en las canaletas y zonas de desagüe de los tanques de cultivo donde son muy abundantes, basando su alimentación en los efluentes y restos de alimentos de estos tanques. Los individuos fueron repartidos en tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 100 L de capacidad y 50 cm de altura (*Ilustración 2*). El cultivo se mantuvo sin aireación y con un caudal de entrada de agua de 100 mL/5 seg, lo que permitió una renovación del volumen del tanque de unas 20 veces al día. La temperatura media de cultivo fue de $19,6 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$, la concentración de oxígeno del agua siempre estuvo por encima de 6,5 ppm, y la salinidad del agua fue de 36 psu. El régimen de luz correspondió a fotoperiodo natural, colocándose mallas de sombreado sobre los tanques.



Ilustración 2. Tanque de cultivo de *Coscinasterias tenuispina*. Autor: Eduardo Almansa.

Dado que la fisión asimétrica es frecuente en esta especie se trabajó con un solo individuo por tanque para poder hacer un seguimiento individual de su crecimiento. Se colocaron algunas rocas en el fondo del tanque ya que en estudios anteriores se había observado que suelen usarlas como refugios, mejorando su adaptación a la cautividad. El crecimiento se calculó mediante el incremento de la biomasa total en gramos en cada tanque ya que debido a la fisión asimétrica es normal encontrarse con dos individuos o incluso tres al final del experimento.

3.2. Alimentación

Ejemplares de *C. tenuispina* de entre 8 y 10 g (ver *Tabla 1*) fueron alimentadas una vez al día, cuatro veces por semana, durante 29 días a una tasa de alimentación del 10% de la biomasa total del tanque, con una de las siguientes dietas experimentales:

- Dieta 1. Caballa (*Scomber colias*) y restos obtenidos del sifonado de tanques de cultivo de medregal (*Seriola dumerili*). Estos restos podían incluir algas verdes (del tipo *Enteromorpha* sp.), pequeños crustáceos (principalmente gammaridos) y restos de pienso y heces de los peces.
- Dieta 2. Caballa (*S. colias*).
- Dieta 3. Dieta mixta compuesta por caballa (*S. colias*), almeja (*Meretrix lyrata*) y crustáceo (*Callinectes sapidus*) (50%, 25%, 25%, respectivamente).

Todas las dietas utilizadas presentan caballa al ser un alimento económico. La *Dieta 1* fue formulada específicamente para valorar el efecto de suplemente la caballa con los restos de sifonados de los tanques de medregal (*S. dumerili*), podían incluir algas verdes (del tipo *Enteromorpha* sp.), pequeños crustáceos (principalmente gammaridos) y restos de pienso y heces de los peces. Los restos de sifonado de tanques de 40 m³ fueron concentrados en 5 litros y de ahí se tomaron 100 mL para cada tanque experimental.

Una vez finalizado el periodo experimental, se recogieron los ejemplares de *C. tenuispina* que fueron almacenados en bolsas de plástico sacrificados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su posterior análisis lipídico.

3.3. Análisis bioquímico

Las determinaciones analíticas de las muestras experimentales fueron llevadas a cabo en el laboratorio de Fisiología Animal del departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna.

3.3.1. Extracción lipídica y determinación del contenido de humedad

Se siguió el método de Folch (1957) variado ligeramente por Christie en 2003, para la extracción de los lípidos. Se pesaron entre 700-800 mg de parte del disco central y de uno de los brazos de la estrella de mar y se depositó la muestra en tubos de ensayo mantenidos en hielo para evitar la modificación de su perfil graso. A cada tubo se le añadió 10 mL de cloroformo:metanol (CL:MET, 2:1) y se homogeneizó en un homogeneizador (Virtishear Mechanical Homogenizer, The Virtis Company, Inc., N.Y., USA) para extraer las sustancias liposolubles, pasando la muestra por papel de filtro de 14-18 μm de poro previamente humedecido. A continuación, se añadió 2 mL de KCl (0,88% w/v) en frío para aumentar la tensión superficial entre las fases a separar y se centrifugó la mezcla a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Una vez centrifugado, se recuperó la fase inferior del tubo, que contiene los lípidos, se evaporó el solvente orgánico en un vaporizador de nitrógeno y se trasvasó con CL:MET a un vial pequeño previamente pesado. Se evaporó nuevamente el solvente y el extracto de lípido se mantuvo en el vial en oscuridad, bajo vacío y en desecador durante toda la noche para retirar los restos de humedad, calculándose el contenido de lípido por diferencia de peso. A continuación, se disolvieron los lípidos en CL:MET (2:1) a una concentración de 10 mg/mL con 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante, para preservar la muestra frente a la oxidación lipídica. Por último, los viales etiquetados se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta su posterior análisis de clases lipídicas y ácidos grasos. Con los datos obtenidos se realizó el cálculo del % de lípido en peso fresco y en peso seco:

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

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

Para determinar el porcentaje de humedad se pesaron aproximadamente 600 mg de tejido de la estrella que se mantuvieron en una estufa a 110°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se volvió a pesar la muestra seca y se calculó el contenido de humedad mediante la siguiente fórmula:

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

3.3.2. Determinación del perfil de ácidos grasos

Para la rotura de los esqueletos hidrocarbonados se realizó la transmetilación ácida de 1 mg de lípido al que se añadió un 5% de estándar interno (ácido nonadecanoico, 19:0). La transmetilación consiste en la unión de un grupo metilo (-CH₃) a la molécula de ácido graso libre para obtener ésteres metílicos de ácidos grasos (del inglés *Fatty acid methyl esters*; FAMES) que serán separados y cuantificados por cromatografía de gases ya que les confiere la propiedad de ser volátiles. Tras evaporar con nitrógeno el solvente en el que estaba diluida la muestra, se añadió 1 mL de tolueno y 2 mL de ácido sulfúrico al 1% en metanol (v/v) al extracto de lípido seco, se agitó en vórtex, se mantuvo en atmósfera de nitrógeno, y se dejó reaccionar en oscuridad durante 16-18 horas a 50°C en un bloque calefactor.

Una vez pasado este tiempo, se dejó enfriar la mezcla, se añadió 5 mL de hexano:dietil éter 1:1 (v/v) con BHT y 2 mL de KHCO₃ al 2% (w/v) para retirar los elementos hidrosolubles, y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se recuperó la fase orgánica superior conteniendo los ácidos grasos metilados, se añadió otros 5 mL de hexano:dietil éter 1:1 (v/v) sin BHT a la primera mezcla para asegurar que se recuperan todos los FAME, y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, para después recuperar la fase orgánica superior. Finalmente, se evaporó completamente el solvente con nitrógeno y se procedió a la purificación de los FAME por cromatografía líquida en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*). Para ello, se disolvieron los FAME en 80-100 µL de hexano y se aplicaron en placas de TLC de 20 x 20 cm x 0,25 mm, en la que también se depositó 50 µL de extracto de FAMES de huevo de bacalao como estándar externo. Las placas de TLC fueron introducidas en una cubeta con 90 mL de hexano, 10 mL de dietil éter y 1 mL de ácido acético (*Ilustración 3*). Una vez desarrolladas las muestras, se dejaron secar y se pulverizaron con iodina al 1% las zonas en las que se encontraba el estándar externo para localizar los FAMES.



Ilustración 3. Cubeta para placas TLC conteniendo hexano:etil éter:ácido acético (90:10:1, v/v/v). Foto del autor.

Tras la tinción, se reveló en la placa una banda de color oscuro donde se ubica el BHT, por debajo de ésta, la banda de los FAMES, y más abajo aún, una banda con restos de esqueletos lipídicos y colesterol (*Ilustración 4*). Se raspó la sílice de la banda donde se encontraban los FAMES y se recogió en un tubo de ensayo al cual se le añadió 10 mL de hexano:éter (2 mL con BHT + 8 mL sin BHT), se agitó en el vórtex y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se recogió la fase superior, se evaporó el solvente con nitrógeno, se lavó con 1,5 mL de hexano y se trasvasó la muestra a un vial, almacenándose a -20°C y en atmósfera de nitrógeno hasta su inyección en el cromatógrafo de gases (GC).

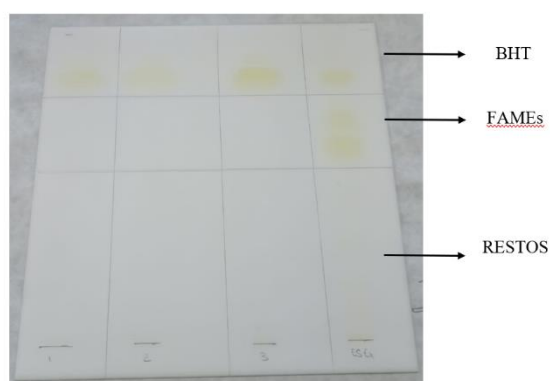


Ilustración 4. Placa TLC pulverizada con iodina al 1%. Foto del autor.

Los ácidos grasos fueron identificados y cuantificados mediante un cromatógrafo de gases (TRACE-GC Thermo Scientific, Milán, Italia) (*Ilustración 5*), con inyección en columna y detector de ionización de llama (FID, del inglés *Flame Ionitacion Detector*). Se inyectaron

mediante autoinyector unos 0,6 μ L de cada muestra en una columna capilar con las siguientes características: columna de sílice fundida SupelcowaxTM 10 (30 m x 0,32 mm I.D; 0,25 μ m de espesor) (Supelco Inc., Bellefonte, EEUU) con fase estacionaria polar. Las condiciones cromatográficas fueron:

- Flujo de los gases: helio, 1,5 mL/min (actúa como gas portador); hidrógeno, 35 mL/min; aire, 350 mL/min.
- Temperatura del inyector en columna, 50°C y del detector FID, 240°C. La rampa de temperatura de la columna siguió la siguiente secuencia: 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.

El contenido de cada ácido graso en las muestras fue expresado en porcentaje del total de ácidos grasos y la inclusión de un 5% del 19:0 nos permite saber el absoluto de cada ácido graso en la muestra. Los ácidos grasos fueron identificados por referencia a un estándar de huevas de bacalao de composición y tiempos de retención conocidos.



Ilustración 5. Cromatógrafo de gases (TRACE-GC Thermo Scientific, Milán, Italia).
Foto del autor.

Los ácidos grasos desconocidos se determinaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

3.3.3. Determinación de clases lipídicas

El análisis de las clases lipídicas se realizó a partir de 25 µg de lípido total por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, del inglés *High Performance Thin Layer Chromatography*) mediante doble desarrollo (Olsen y Henderson, 1989). Para ello, en placas de HPTLC de sílica gel 60, de 10 x 10 cm x 0,25 mm de grosor (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se añadió 2,5 µL de cada muestra y 2 µL de estándar de composición conocida (huevo de bacalao) disuelto en cloroformo-metanol con 0,01% BHT (2:1, v/v). Se separaron los lípidos polares (LP) introduciendo la placa en la cubeta con una mezcla de isopropanol:cloroformo:metilacetato:metanol:KCl (0,25%) (5:5:5:2:1,8, v/v/v/v/v). Tras desarrollarse la placa hasta la mitad, se dejó secar en vacío para eliminar el resto de solventes y se introdujo posteriormente en la cubeta con una solución de hexano:dietiléter:ácido acético (proporción 20:5:0,5, v/v/v) para separar los lípidos neutros (LN). A continuación, se tiñó la placa de manera homogénea con una solución de acetato cúprico al 3% en ácido ortofosfórico al 8% y se quemó en una estufa a 160°C durante 15 minutos. Para la resolución de las placas se llevó a cabo un escaneo en un CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza) (*Ilustración 6*) mediante el software winCATS versión 1.4.4 para determinar las bandas de las diferentes clases lipídicas por densitometría (*Ilustración 7*). Por último, su procesado y cuantificación se realizó mediante el software VideoScan versión 1.02, obteniéndose la proporción de cada clase lipídica de la muestra.



Ilustración 6. CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza). Foto del autor.



Ilustración 7. Placa HPTLC con clases lipídicas de *C. tenuispina* de diferentes tratamientos. Foto del autor.

3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados fue llevado a cabo con el programa IBM® SPSS Statistics versión 25.0 para Windows. El crecimiento *C. tenuispina* se comparó con una ANOVA de una vía. En cuanto a la composición de ácidos grasos y clases lipídicas se comprobó previamente la normalidad de los residuos de los datos mediante Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de la varianza con la prueba de Levene. Si no se cumplían estas propiedades se realizaron transformaciones de los datos de cada tratamiento mediante la inversa, el logaritmo y el arcoseno de la raíz. En función de los resultados de estas comprobaciones:

- Si los datos cumplían la normalidad y la homocedasticidad, para saber si había diferencias se realizó una ANOVA de 1 vía y las comparaciones se realizaron con el test post-hoc de Tukey.
- Se cumplía la normalidad, pero no la homogeneidad de la varianza, se analizaron las diferencias mediante la prueba de Welch, y de Brown y Forsythe y después se aplicó la prueba T3 de Dunnet.
- Si no se cumplía la normalidad, pero sí la homocedasticidad, se comprobaron las diferencias mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y se determinaron estas diferencias mediante la U de Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni.

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (n=6 para el primer tratamiento y n=5 para el segundo y tercer tratamiento) y las diferencias se consideraron significativas para $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Datos de crecimiento

La *Tabla 1* muestra la variación en el crecimiento en peso de los ejemplares de *Coscinasterias tenuispina* tras 29 días de alimentación. En general los individuos mostraron un buen crecimiento superando en algunos casos el 1% de incremento de peso seco al día, pero también se observó una importante variabilidad, lo que dio lugar a que no se observaran diferencias significativas entre tratamientos dietarios ($p=0,773$). El porcentaje de supervivencia de las estrellas fue del 100% en todos los grupos experimentales, aunque hay que señalar que la estrella del tanque T2 se encontraba en mal estado al cierre del experimento, lo cual también se reflejó en que fue la única que no mostró crecimiento positivo como puede verse en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Peso fresco (g) y tasa de crecimiento específica (expresada como el incremento del porcentaje de peso fresco por día) de ejemplares de *Coscinasterias tenuispina* alimentados con las dietas experimentales durante 29 días ($n = 3$).

	Tanque	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Δ peso (g)	TCE	TCE (media \pm DE)
Dieta 1	T-1	9,62	15,17	5,55	1,57	
	T-2	9,98	9,88	-0,1	-0,03	0,84 \pm 0,81
	T-3	6,68	8,90	2,22	0,99	
Dieta 2	T-4	7,99	9,71	1,72	0,67	
	T-5	10,20	10,61	0,41	0,14	0,70 \pm 0,58
	T-6	10,16	14,75	4,59	1,29	
Dieta 3	T-7	10,23	17,27	7,04	1,81	
	T-8	8,80	11,24	2,44	0,84	1,10 \pm 0,62
	T-9	10,25	12,39	2,14	0,65	

TCE: Tasa de crecimiento específica. DE = desviación estándar.

4.2. Perfil de ácidos grasos

En la *Tabla 2* se refleja el perfil de ácidos grasos los individuos de *C. tenuispina* según la dieta proporcionada. Independientemente del tratamiento dietario, las familias de ácidos grasos más ampliamente representadas fueron los poliinsaturados y monoinsaturados, con algo

más de una cuarta parte del total de ácidos grasos (27,66-30,85 y 23,82-27,87%, respectivamente). Por el contrario, los ácidos grasos saturados oscilaron entre el 11,95 y el 14,25% del total de ácidos grasos.

Los ejemplares alimentados con la dieta mixta (caballa + almeja + cangrejo) presentaron las mayores proporciones de ácido palmítico (16:0), ácido eicosapentanoico (20:5 *n*-3) y ácido docosahexanoico (22:6 *n*-3) así como del total de *n*-3 PUFA, total de *n*-3 LC-PUFA y relación *n*-3/*n*-6. Por el contrario, las estrellas que recibieron la dieta de caballa y restos de sifonado fueron las más abundantes en ácido α -linolénico (18:3 *n*-3) y de 20:2 *n*-9.

Es importante destacar los altos valores de ácido araquidónico (ARA, 20:4 *n*-6), 20:2 *n*-9, 20:1 *n*-11 y 20:1 *n*-9 en las estrellas de todos los grupos experimentales.

Tabla 2. Composición de los principales ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) y total de ácidos grasos (mg/ g de tejido) de los ejemplares de *Coscinasterias tenuispina* alimentados con diferentes dietas experimentales.

Ácidos grasos	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
14:0	0,83 ± 0,18	0,83 ± 0,20	0,90 ± 0,17
15:0	0,46 ± 0,13	0,39 ± 0,05	0,38 ± 0,04
16:0	4,45 ± 0,61 ^a	4,58 ± 0,69 ^{ab}	5,80 ± 1,00 ^b
17:0	0,44 ± 0,11	0,43 ± 0,04	0,48 ± 0,04
18:0	5,77 ± 0,91	6,65 ± 0,89	6,69 ± 0,76
<i>Total SFA</i>	11,95 ± 1,48	12,88 ± 1,57	14,25 ± 1,43
16:0 DMA	0,76 ± 0,36	0,69 ± 0,28	0,60 ± 0,08
18:0 DMA	12,06 ± 0,67	12,48 ± 1,61	11,10 ± 0,94
<i>Total DMA</i>	12,82 ± 0,46	13,16 ± 1,33	11,69 ± 0,87
16:1 <i>n</i> -9	0,58 ± 0,18	0,42 ± 0,11	0,39 ± 0,04
16:1 <i>n</i> -7	0,61 ± 0,12	0,54 ± 0,13	0,63 ± 0,17
18:1 <i>n</i> -9	2,27 ± 0,52	2,52 ± 0,51	3,22 ± 0,71
18:1 <i>n</i> -7	2,32 ± 0,38	1,83 ± 0,29	2,01 ± 0,20
18:1 <i>n</i> -5	0,65 ± 0,22	0,59 ± 0,13	0,42 ± 0,01
20:1 <i>n</i> -11	11,89 ± 0,47	12,43 ± 1,80	11,07 ± 1,21
20:1 <i>n</i> -9	6,64 ± 0,61 ^b	5,70 ± 0,40 ^a	6,23 ± 0,20 ^{ab}
22:1 <i>n</i> -9	0,78 ± 0,15	0,80 ± 0,08	0,81 ± 0,13
24:1 <i>n</i> -9	2,14 ± 0,36	1,98 ± 0,28	2,30 ± 0,30
<i>Total MUFA</i>	27,87 ± 1,04	26,82 ± 1,02	27,08 ± 1,86
20:2 <i>n</i> -9	14,63 ± 2,16 ^b	13,70 ± 0,71 ^{ab}	11,64 ± 1,05 ^a
18:2 <i>n</i> -6	0,35 ± 0,06	0,40 ± 0,13	0,40 ± 0,02
20:2 <i>n</i> -6	5,41 ± 2,07	4,44 ± 1,66	2,76 ± 0,49
20:4 <i>n</i> -6	7,49 ± 1,99	8,99 ± 2,73	7,33 ± 0,95
22:4 <i>n</i> -6	0,91 ± 0,26	0,98 ± 0,10	0,90 ± 0,13
22:5 <i>n</i> -6	0,63 ± 0,25	0,64 ± 0,25	0,86 ± 0,40
<i>Total n-6 PUFA</i>	14,79 ± 1,25 ^b	15,44 ± 0,93 ^b	12,25 ± 1,43 ^a
18:3 <i>n</i> -3	0,68 ± 0,08 ^b	0,61 ± 0,10 ^{ab}	0,52 ± 0,08 ^a
20:5 <i>n</i> -3 (EPA)	6,74 ± 0,99 ^{ab}	6,19 ± 0,35 ^a	8,52 ± 1,80 ^b
22:5 <i>n</i> -3	0,58 ± 0,06	0,55 ± 0,15	0,62 ± 0,09
22:6 <i>n</i> -3 (DHA)	4,88 ± 1,14 ^a	5,44 ± 1,78 ^a	8,94 ± 1,32 ^b
<i>Total n-3 PUFA</i>	12,87 ± 1,08 ^a	12,79 ± 2,07 ^a	18,60 ± 1,71 ^b
<i>Total PUFA</i>	42,29 ± 0,66	41,93 ± 1,32	42,49 ± 0,58
<i>Total n-3 LC-PUFA</i>	12,19 ± 1,12 ^a	12,18 ± 1,99 ^a	18,08 ± 1,77 ^b
<i>n-3/n-6</i>	0,88 ± 0,12 ^a	0,84 ± 0,18 ^a	1,55 ± 0,34 ^b
<i>DHA/EPA</i>	0,74 ± 0,23	0,88 ± 0,29	1,09 ± 0,32
<i>Total ácidos grasos</i>	2,40 ± 0,72	2,27 ± 0,73	2,65 ± 0,20

Los resultados se expresan como media ± DE (n=6 para el tratamiento 1, n=5 para el tratamiento 2 y 3). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; DMA, dimetilacetil. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

4.3. Contenido de lípido total y perfil de clases lipídicas

Destaca la elevada proporción de lípidos polares en los ejemplares experimentales, principalmente fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), y UKPolarSuperior, mientras que dentro de los lípidos neutros abundan el colesterol (CHO) y los triacilglicéridos (TAG). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de lípido total en peso seco (2,72-3,48%) ni en el perfil de clases lipídicas de *C. tenuispina* entre tratamientos, aunque se hace evidente una tendencia a aumentar en el porcentaje de lípido total en peso seco en los ejemplares del tratamiento dietario mixto ($3,48 \pm 0,39$).

Tabla 3. Contenido lipídico (% peso seco) y composición en clases lipídicas (% del total) de los individuos de *Coscinasterias tenuispina* de diferentes tratamientos.

	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
Lípido total (% p.s.)	2,72 ± 1,13	2,81 ± 0,34	3,48 ± 0,39
SM	0,91 ± 0,39	1,15 ± 0,75	1,51 ± 1,35
PC	19,22 ± 0,66	19,03 ± 2,36	20,59 ± 1,63
PS	4,61 ± 1,16	5,39 ± 0,71	5,21 ± 1,05
PI	4,11 ± 1,29	3,92 ± 1,61	4,49 ± 1,49
PG	2,10 ± 0,35	1,95 ± 0,33	1,78 ± 0,21
PE	15,60 ± 0,81	16,43 ± 1,81	14,62 ± 1,63
UK PolarInferior	6,90 ± 1,31	6,01 ± 0,97	5,89 ± 0,62
UK PolarMedio	1,02 ± 0,49	0,86 ± 0,53	0,82 ± 0,63
UK PolarSuperior	17,60 ± 0,88	18,70 ± 2,43	16,93 ± 1,79
TPL	72,06 ± 2,80	73,43 ± 4,99	71,85 ± 2,37
MAG	3,58 ± 1,07	2,94 ± 0,40	3,49 ± 0,35
DAG	0,27 ± 0,17	0,20 ± 0,11	0,19 ± 0,06
CHO	12,26 ± 0,80	12,20 ± 1,54	11,04 ± 1,59
FFA	1,70 ± 0,87	1,87 ± 0,86	1,75 ± 0,49
TAG	8,24 ± 1,09	7,07 ± 4,82	9,46 ± 2,11
UKNeutro	1,27 ± 0,75	1,27 ± 0,71	1,21 ± 0,60
SE	0,63 ± 0,39	1,01 ± 0,90	1,00 ± 1,08
TNL	27,94 ± 2,80	26,57 ± 4,99	28,15 ± 2,37

Los resultados se expresan como media ± DE (n = 6 para el tratamiento 1 y n=5 para el tratamiento 2 y 3). **SM**, esfingomielinina; **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 y ceras; **TNL**, total de lípidos neutros, **UK**, desconocido.

5. Discusión

La producción de especies marinas requiere de una dieta que asegure un stock alimentario constante y de calidad. El presente estudio ha permitido caracterizar el perfil nutricional, concretamente el perfil lipídico de una especie de equinodermo asteroideo, *Coscinasterias tenuispina*, de gran potencial para la acuicultura multitrófica integrada, por su viabilidad a la hora de ser cultivada, destacando su fácil adaptación a las condiciones de cultivo y su notable tasa de crecimiento durante el periodo experimental.

La mayoría de las larvas de especies marinas son incapaces de elongar y desaturar ácidos grasos precursores de 18 átomos de carbono para producir ARA, EPA y DHA, por lo que son considerados esenciales y deben ser ingeridos a través de la dieta para un adecuado desarrollo de los ejemplares cultivados (Sargent et al., 1999; Reis et al., 2014).

En general, los equinodermos, como las holoturias de mar, presentan cantidades considerables de ácido palmítico (16:0) y ácido oleico (18:1 *n*-9), característicos de aceites vegetales (Guzmán et al., 2014), y de ácidos grasos poliinsaturados como el ARA, EPA y DHA, que los obtienen de las macroalgas presentes en su hábitat a pocas profundidades (Yahyavi et al., 2012) ya que no pueden sintetizarlos por ellos mismos (Guzmán et al., 2014). Coincidiendo con nuestro estudio, también destacan altas cantidades ácidos grasos monoinsaturados de 20 y 22 átomos de carbono en equinodermos que habitan aguas profundas para el mantenimiento de la fluidez de la membrana a temperaturas frías y altas presiones (Drazen et al., 2008).

Como se ha demostrado en otras especies de vertebrados marinos, la composición en ácidos grasos de la dieta afecta al perfil de ácidos grasos de los animales que la ingieren (Pérez, 2011; Rainuzzo et al., 1994; Reis et al., 2014). Así, *C. tenuispina* alimentada con la dieta mixta de caballa, almeja y cangrejo presentó mayor cantidad de ácidos grasos saturados, concretamente de ácido palmítico (16:0), mientras que los individuos del tratamiento que recibió caballa y restos de sifonado presentaron mayores niveles de ácido eicosenoico (20:1 *n*-9), de 20:2 *n*-9 y del total de los ácidos grasos *n*-6 PUFA. Además, los animales que se alimentaron con la dieta mixta mostraron mayores proporciones de EPA y DHA que los que recibieron las otras dos dietas experimentales. Por tanto, estos ácidos grasos esenciales parecen ser aportados en gran medida por las almejas y los cangrejos al estar presentes exclusivamente en la dieta mixta. La proporción de ácidos grasos poliinsaturados *n*-3/*n*-6 es un índice importante en relación con el valor nutricional de los alimentos (Yahyavi et al., 2012), siendo

también los individuos que ingirieron la dieta mixta los que presentaron valores más beneficiosos.

Hay que destacar que los individuos de los tres tratamientos presentaron gran cantidad de un ácido graso 20:2 *n-9*, el cual podría ser un producto de la elongación e insaturación del 18:1 *n-9*, y que son frecuentes en algunas especies de peces como en los salmonetes juveniles que han sido alimentados con dietas baja en grasas (Seiliez et al., 2003). También observamos otros ácidos grasos que tratamos como desconocidos pero que pueden tratarse de dienos no interrumpidos por metileno (NMIDs, por sus siglas en inglés) que han sido identificados paralelamente en un cromatógrafo de gases asociado a espectrómetro de masas. Los NMIDs se pueden encontrar en moluscos, algas, equinodermos, rayas tropicales...y especialmente en los lípidos de invertebrados que viven en ambientes extremos como organismos respiraderos hidrotermales y de filtración fría de aguas profundas (Barnathan, 2009), por lo que la mayor parte de los NMIDs, como el 20:2 $\Delta 5, 13$, son de origen bacteriano (Ackman and Hooper, 1973). Los NMIDs se caracterizan por presentar propiedades biológicas y farmacológicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Barnathan, 2009).

También destaca la presencia en las estrellas de mar de dimetilacetales (DMA) de 16 y 18C que, aunque no presentan diferencias significativas entre tratamientos, se encuentran en grandes proporciones, principalmente el segundo de ellos. Los DMA son productos de la transmetilación de plasmalógenos que forman parte de la estructura de la membrana de las células, y se encuentran en grandes proporciones en el tejido nervioso (aproximadamente el 7% de los lípidos polares). Además, se ha descubierto recientemente que están directamente relacionados con el DHA, ya que a menor cantidad de DHA, menor nivel de plasmalógenos (García, 2017). Igualmente, los DMA han sido descritos en el tracto digestivo debido a la gran cantidad de neuronas que posee, de ahí a que se le considere como el segundo cerebro del organismo. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en juveniles de dorada (*Sparus aurata*), se observó gran cantidad de 18:0 DMA y 18:1 *n-9* DMA en el lípido total y en la fosfatidiletanolamina del intestino anterior y posterior (Pérez, 2011).

La mayoría de las larvas de especies marinas además de requerir presas ricas en PUFAs, también necesitan lípidos esenciales, principalmente lípidos polares y un contenido moderado de lípidos neutros como el colesterol (Lund et al., 2020; Navarro and Villanueva, 2003). Los individuos de los diferentes tratamientos no presentaron diferencias significativas en ninguna fracción lipídica, destacando la gran cantidad de fosfolípidos como la fosfatidilcolina (PC) y la

fosfatidiletanolamina (PE), y de lípidos neutros como el colesterol (CHO) y los triacilglicéridos (TAG). También destaca la presencia de clases lipídicas que en el presente trabajo se han nombrado como desconocidos (UKPolarSuperior, UKPolarMedio, UKPolarInferior y UKPolarNeutro) debido a que se dispone de los estándares comerciales necesarios para identificarlos, pero que, apoyado en conocimientos previos y en diferentes muestras conocidas, se ha podido llevar a cabo una comparación entre las clases lipídicas y establecer hipótesis sobre su posible identidad.

La clase lipídica “UKNeutro” se localiza entre los ésteres y ceras (SE) y los triacilglicéridos (TAG) en la placa de HPTLC, como podemos observar en la *Ilustración 7*, y se encuentra en baja proporción en los individuos pertenecientes a los tres tratamientos. Por su disposición, podría tratarse de diacil gliceril éteres (DAGE) los cuales son éteres de glicerilo de origen marino que se caracterizan por sus propiedades como agente tensioactivo y que son utilizados como suavizantes naturales en cosméticos (Hayashi and Kishimura, 1997). Se pueden encontrar en los lípidos de la carne de los peces teleósteos, en el hígado de los peces rata, en los tiburones, en los calamares y en los animales marinos bentónicos como los asteroideos, principalmente en los lípidos cecales y/o gonadales del píloro, aunque estos éteres de glicerilo son diferentes a los que se encuentran en las especies nombradas anteriormente (Hayashi and Kishimura, 1997). Hay que tener en cuenta que la extracción lipídica se llevó a cabo a partir de los brazos de la estrella donde se encuentran las gónadas y el disco central de ésta donde se localiza el tracto digestivo, lo que sustenta la hipótesis anterior.

Entre las clases lipídicas polares (LP) desconocidas, destaca, de mayor a menor proporción, el “UKPolarSuperior”, “UKPolarInferior” y el “UKPolarMedio”, como se puede observar en la *Tabla 3*. Se realizó una placa de HPTLC para intentar identificar estas tres clases lipídicas desconocidas en la que se incluyó muestras de diferente naturaleza, como cerebro de ratón, estrella de mar y músculo de caballa. Se va a comparar principalmente las clases lipídicas del cerebro de ratón con las estrellas (*Ilustración 8*), ya que una de las hipótesis es que el “UKPolarSuperior” podría ser un cerebrósido, moléculas que están presentes en el tejido neuronal y son glucoesfingolípidos (formado por una ceramida, es decir, por un ácido graso y una esfingosina) a los que se le une una hexosa (como la glucosa y la galactosa), responsable del carácter polar del lípido. Esta hipótesis podría estar sustentada por Ishii y otros autores (2006) en cuyo trabajo realizaron una separación cromatográfica guiada por bioensayo del extracto de metanol de muestras de *Asterias amurensis* y obtuvieron un nuevo glucocerebrósido

conocido como asteriacerebrosido. El “UKPolarMedio” podrían ser glucósidos esteroideos, que son responsables de proporcionar la propiedad tóxica que presentan las estrellas (D’Auria et al., 1993) y uno de los grupos en los que se subdivide son las asterosaponinas (Tang et al., 2006). Por lo tanto, las asterosaponinas se caracterizan por su grupo esteroideo unido a varios monosacáridos y también a ácido sulfúrico que le proporciona polaridad a la molécula.

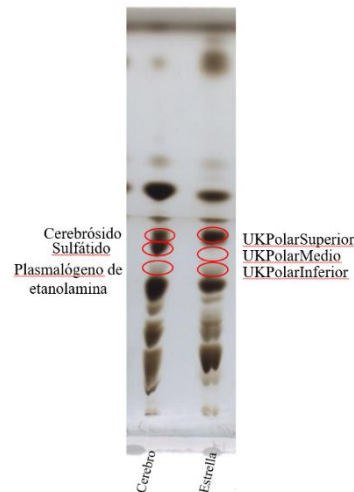


Ilustración 8. Sección de un aplaca HPTLC con clases lipídicas de *C. tenuispina* y cerebro de ratón. Foto del autor.

Por último, la clase lipídica nombrada como “UKPolarInferior” podría tratarse de plasmalógenos de etanolamina que se localizan también en el cerebro y que podrían ser responsables de las altas cantidades de dimetilacetales (DMA) obtenidas en la transmetilación de los lípidos de todos los grupos experimentales.

Los resultados de composición lipídica obtenidos en el presente estudio podrían hacer de la especie *Coscinasterias tenuispina* un candidato idóneo para elaborar dietas inertes para larvas de especies marinas de interés en acuicultura de una forma sostenible e incluso, obtener alimentos marinos con calidad nutricional para la población. Por ello, sería recomendable seguir realizando experimentaciones para obtener información que pueda complementar esta investigación, como por ejemplo formular nuevas dietas basadas en desechos de tanques de cultivos de otras especies de peces diferentes al medregal, para alimentar a las estrellas de mar y poder incluirlas en la acuicultura multitrófica integrada como niveles tróficos inferiores. También se podría intentar determinar la presencia de carotenoides en especies de estrellas de

mar. Los carotenoides son pigmentos que se pueden encontrar en animales marinos y que se caracterizan por actuar como antioxidantes eliminando los radicales libres, y también, como en el caso de la fucoxantina y la astaxantina, por poseer propiedades anticancerígenas entre otras (Cerpa, 2018) lo que podría ser útil en el ámbito de las Ciencias de la Salud e industria farmacéutica. Otra línea de investigación posible es el estudio lipídico de las clases lipídicas que se ha intentado analizar en este trabajo para obtener unos resultados más claros y analizar sus propiedades para saber que pueden aportar a las especies marinas, y paralelamente, como ya se ha dicho anteriormente, estudiar los productos bioactivos presentes en las estrellas de mar que podrían resultar tóxicos.

6. Conclusiones

1. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento ni en la supervivencia de *Coscinasterias tenuispina* con ninguna de las dietas experimentales ensayadas.
2. La dieta mixta compuesta por caballa, almeja y cangrejo (50%; 25%; 25%) parece ser la más adecuada para que *Coscinasterias tenuispina* pueda ser utilizada como ingrediente con un adecuado balance de ácidos grasos en dietas inertes para larvas de especies marinas.
3. La dieta compuesta por caballa y restos de sifonados no parece influir negativamente en el crecimiento de las estrellas de mar, lo que sugiere que el uso de desechos generados en sistemas de acuicultura multitrófica integrada puede ser empleado en su cultivo.
4. Independientemente del tratamiento dietario, los ejemplares de *Coscinasterias tenuispina* presentaron considerables proporciones de clases lipídicas necesarias para el adecuado desarrollo y crecimiento de las especies marinas, como fosfolípidos y colesterol.

6. Conclusions

1. No significant differences in growth and survival of *Coscinasterias tenuispina* were found with any of the experimental diets assayed.
2. The mixed diet made of mackerel, clam and crab (50%; 25%; 25%) seems to be the most suitable diet for *Coscinasterias tenuispina* regarding its possible use as a dietary supplement with an adequate fatty acid balance in inert diets for marine larval species.
3. The diet composed of mackerel and siphonage wastes does not negatively influence the growth of sea stars, so it could be a candidate species for feeding wastes generated in integrated multi-trophic aquaculture systems, as long as it is combined with other foods such as mackerel.
4. Regardless of dietary treatment, *Coscinasterias tenuispina* specimens presented notable proportions of lipid classes necessary for the proper development and growth of marine species larvae, such as phospholipids and cholesterol.

7. Bibliografía

- Aarset, B., Beckmann, S., Bigne, E., Beveridge, M., Bjorndal, T., Bunting, J., McDonagh, P., Mariojouis, C., Muir, J., Prothero, A., Reisch, L., Smith, A., Tveteras, R., & Young, J. (2004). The European consumers' understanding and perceptions of the "organic" food regime. *British Food Journal*, 106(2), 93-105. <https://doi.org/10.1108/00070700410516784>
- Ackman, R. G., & Hooper, S. N. (1973). Non-methylene-interrupted fatty acids in lipids of shallow-water marine invertebrates: A comparison of two molluscs (*Littorina littorea* and *Lunatia triseriata*) with the sand shrimp (*Crangon septemspinosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 46(1), 153-165. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(73\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(73)90057-6)
- Aliaga Taberner, C. (2019). Composición nutritiva del pulpo (*Octopus vulgaris*) alimentado con piensos formulados con fuentes proteicas vegetales y animales. <http://hdl.handle.net/10251/120065>
- Alves, S. L. S., Pereira, A. D., & Ventura, C. R. R. (2002). Sexual and asexual reproduction of *Coscinasterias tenuispina* (Echinodermata: Asteroidea) from Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology*, 140(1), 95–101. <https://doi.org/10.1007/s002270100663>
- Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR). (2018, julio). La Acuicultura en España. <https://apromar.es/wp-content/uploads/2021/12/La-Acuicultura-en-Espana-2018.pdf>
- Barnathan, G. (2009). Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie*, 91(6), 671-678. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.020>
- Barreto Pérez, L. (2019). Forcipulátidos en las Islas Canarias. Biología y ecología de " *Coscinasterias tenuispina*".
- Barrington, K., Chopin, T., & Robinson, S. (2009). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. *Integrated Mariculture: A global review. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 529, 7-46.
- Budiño B., Turull M., Nebot A., Fandiño B., Rambla-Alegre M., Savarino P., Mallo N., Díez S., & Cabaleiro S. (2021). Evaluation of starfish (*Asterias rubens*) as a raw material for the manufacture of aquaculture in diets. *Aquaculture Europe*, Madeira, Portugal.
- Cerpa Damas, Y. K. (2018). Potencial antioxidante de carotenoides de microalgas en el enriquecimiento de presas vivas como fuente de alimento en acuicultura.
- Christie, W.W. (2003). Lipid analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids, (Bridgwater, England).
- Cubillo, A. M., Ferreira, J. G., Robinson, S. M., Pearce, C. M., Corner, R. A., & Johansen, J. (2016). Role of deposit feeders in integrated multi-trophic aquaculture — a model analysis. *Aquaculture*, 453, 54-66.
- D'Auria, M. V., Minale, L., & Riccio, R. (1993). Polyoxygenated steroids of marine origin. *Chemical Reviews*, 93(5), 1839-1895. <https://doi.org/10.1021/cr00021a010>
- Drazen, J. C., Phleger, C. F., Guest, M. A., & Nichols, P. D. (2008). Lipid, sterols and fatty acid composition of abyssal holothurians and ophiuroids from the North-East Pacific Ocean: Food web implications. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 151(1), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.05.013>
- Dubois, P., Chen, C. P., Jangoux, M., & Lawrence, J. M. (1989). Calcification in echinoderms. *Echinoderm studies*, 109-178
- Estefanell, J. (2013). El pulpo común: candidato para la acuicultura. (ulpgc.10553.11880). accedaCRIS ULPGC. <http://hdl.handle.net/10553/11880>
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. Versión resumida. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9231es>

Fernandez, C., Dombrowski, E., & Caltagirone, A. (1995). Gonadal growth of adult sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in rearing: the effect of different diet type. *Echinoderm research*, 269-275.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the insolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)

Fridberger, A., Fridberger, T. & Lundin, L.G. (1979). Cultivation of sea urchins of five different species under strict artificial conditions. *Zoon*, 7: 149-151.

García Serrano, A. M. (2017). Diseño y evaluación de un complemento nutricional enriquecido en lípidos polares de origen lácteo y marino para la prevención del deterioro cognitivo en ratas de edad avanzada.

García-Cisneros, A., Pérez-Portela, R., Wangensteen, O. S., Campos-Canet, M., & Palacín, C. (2017). Hope springs eternal in the starfish gonad: preserved potential for sexual reproduction in a single-clone population of a fissiparous starfish. *Hydrobiologia*, 787(1), 291–305. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2971-8>

Gatlin III, D. M. (1998). Nutrición de reproductores y juveniles de peces marinos. *Avances en Nutrición Acuicola*.

Gormaz, J. G., Fry, J. P., Erazo, M., & Love, D. C. (2014). Public health perspectives on aquaculture. *Current Environmental Health Reports*, 1(3), 227-238. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0018-8>

Granada, L., Sousa, N., Lopes, S., & Lemos, M. F. L. (2016). Is integrated multitrophic aquaculture the solution to the sectors' major challenges? – A review. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 283-300. <https://doi.org/10.1111/raq.12093>

Guzmán, M., Quiroz, J., Angulo Ortiz, A., Torres, O., & Santafé, G.G. (2014). Bioprospección e identificación de los ácidos grasos del pepino de mar *Holothuria floridana*. *Evodia*, 1(1), 39-46.

Hayashi, K., & Kishimura, H. (1997). Content and composition of diacyl glyceryl ethers in the pyloric ceca and ovaries of the asteroids *Solaster paillatus* and *Asterias amurensis*. *Fisheries Science*, 63(6), 945-949. <https://doi.org/10.2331/fishsci.63.945>

Ishii, T., Okino, T., & Mino, Y. (2006). A ceramide and cerebroside from the starfish *Asterias amurensis* lütken and their plant-growth promotion activities. *Journal of Natural Products*, 69(7), 1080–1082. <https://doi.org/10.1021/np050530e>

Janssen, C. I. F., & Kiliaan, A. J. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Progress in Lipid Research*, 53, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.10.002>

Kanazawa, A. (2001). Sterols in marine invertebrates. *Fisheries Science*, 67(6), 997-1007. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00354.x>

Kilimnik, A., Kuklev, D. V., & Dembitsky, V. M. (2016). Antitumor acetylenic lipids. *Mathews Journal of Pharmaceutical Science*, 1(1): 005.

Lawrence, J.M., Olave, S., Otaiza, R., Lawrence, A.L. & Bustos, E. (2007). Enhancement of gonad production in the sea urchin *Loxechinus albus* in Chile fed extruded feeds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28(1): 91-96.

Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. & Whittick, A. (2002). The effect of an artificial diet on the biochemical composition of the gonads of the sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Food Chemistry*, 79: 461-472.

Lund, I., El Kertaoui, N., Izquierdo, M.S., Domínguez, D., Hansen, B.W. & Kestemont, P. (2018). The importance of phospholipids combined with long-chain PUFA in formulated diets for pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *British Journal of Nutrition*. 120, 628-644.

Machuca-Loja, G., Madrid-Celi, B., Sanmartín-Galvan, D., & Pérez-Rodríguez, J. (2016). Queratina a partir de la hidrólisis enzimática de harina de plumas de pollo, utilizando queratinas producidas por *Bacillus subtilis*. *Revista Ciencia UNEMI*, 9(20), 50-58.

Margulis, L., & Chapman, M. J. (2009). Kingdoms and domains: An illustrated guide to the phyla of life on earth. *Elsevier Science*. <https://books.google.es/books?id=9IWaqAOGyt4C>

- 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(1), 613-631. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00311-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00311-3)
- Olsen, M. S., & Osmundsen, T. C. (2017). Media framing of aquaculture. *Marine Policy*, 76, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2016.11.013>
- 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(2), 189–197. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90056-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90056-7)
- Pastrana Franco, O., Santafé Patiño, G., & Angulo Ortiz, A. (2015). Antibacterial and antifungal activity of the starfish *Oreaster reticulatus* (Valvatida: Oreasteridae) and the sea urchins *Mellita quinquesperforata* (Clypeasteroidea: Mellitidae) and *Diadema antillarum* (Diadematoida: Diadematidae) from the Colombian Caribbean. *Revista de Biología Tropical*, 63(Suppl. 2), 329-337. <https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v63i2.23167>
- Pérez Ruiz, A. O., Cartaya Padrón, L., Valencia Fernández, V., Sanjurjo Gámez, V., & Ilisástigui Ortueta, T. (1998). Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*, 35(2), 56-61.
- Prato, E., Portacci, G., & Biandolino, F. (2010). Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 309(1–4), 203–211. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.09.036>
- Qian, H., Kornegay, E. T., & Conner Jr, D. E. (1996). Adverse effects of wide calcium: phosphorus ratios on supplemental phytase efficacy for weanling pigs fed two dietary phosphorus levels. *Journal of Animal Science*, 74(6), 1288-1297.
- Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., Jørgensen, L., & Olsen, Y. (1994). Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 107(4), 699-710. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90372-7)
- Reis, D. B., Acosta, N. G., Almansa, E., Navarro, J. C., Tocher, D. R., Monroig, O., Andrade, J. P., Sykes, A. V., & Rodríguez, C. (2014). In vivo metabolism of unsaturated fatty acids in *Octopus vulgaris* hatchlings determined by incubation with ¹⁴C-labelled fatty acids added directly to seawater as protein complexes. *Aquaculture*, 431, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.016>
- Ren, J. S., Stenton-Dozey, J., Plew, D. R., Fang, J., & Gall, M. (2012). An ecosystem model for optimising production in integrated multitrophic aquaculture systems. *Ecological Modelling*, 246, 34-46.
- Riccio, R., Iorizzi, M., & Minale, L. (1986). Starfish saponins XXX. Isolation of sixteen steroidal glycosides and three polyhydroxysteroids from the mediterranean starfish *Coscinasterias tenuispina*. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 95(9-10), 869-893. <https://doi.org/10.1002/bscb.19860950912>
- Rodríguez-Bernaldo De Quirós, A., López-Hernández, J., González-Castro, M., De la Cruz-García, C., & Simal-Lozano, J. (2001). Comparison of volatile components in fresh and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*, Lamarck) gonads by GC–MS using dynamic headspace sampling and microwave desorption. *European Food Research and Technology*, 212(6), 643-647.
- Rone, M. B., Fan, J., & Papadopoulos, V. (2009). Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(7), 646–658. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2009.03.001>
- Rosa, J., Lemos, M. F. L., Crespo, D., Nunes, M., Freitas, A., Ramos, F., Pardal, M. Â., & Leston, S. (2020). Integrated multitrophic aquaculture systems – Potential risks for food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 79–90. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.12.008>
- Santana, K. D., Arteaga-Pérez, L. E., Ledon, Y. C., & Rico, I. L. R. (2013). Análisis de ciclo de vida y caracterización ambiental en una industria alimenticia. *Centro Azúcar*, 40(1).
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., & Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: Current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1), 217-229. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00191-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00191-X)

Seiliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kaushik, S., & Bergot, P. (2003). Cloning and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(3), 449-460. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00111-8](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00111-8)

Selle, P. H., Cowieson, A. J., & Ravindran, V. (2009). Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock science*, 124(1-3), 126-141.

Seto, Y., Komatsu, M., Wakabayashi, K., & Fujita, D. (2013). Asexual reproduction of *Coscinasterias acutispina* (Stimpson, 1862) in tank culture. *Cahiers De Biologie Marine*, 54, 641-647.

Shadrina, E. V., Maksimova, S. N. & Poleshchuk, D. V. (2019). Methods for obtaining the feed additives from the starfish of the sea of Japan. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 666(1), 012076. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/666/1/012076>

Skowronska-Krawczyk, D., & Budin, I. (2020). Aging membranes: Unexplored functions for lipids in the lifespan of the central nervous system. *Experimental Gerontology*, 131, 110817. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110817>

Sørensen, P., & Nørgaard, J. V. (2016). Starfish (*Asterias rubens*) as feed ingredient for piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 211: 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.11.012>

Stamouli, C., Akel, E. H. K., Azzurro, E., Bakiu, R., Bas, A. A., Bitar, G., Boyaci, Y., Cakalli, M., Corsinifoka, M., Crocett, F., Dragicevic, B., Dulcic, J., Durucan, F., Zrelli, R. E., Erguden, D., Filiz, H., Giardina, F., Giovos, I., Gönülal, O., Hemida, F., Kassar, A., Kondylatos, G., Macali, A., Mancini, E., Ovalis, P., Paladani de Mendoza, F., Pavicic, M., Rabaoui, L., Rizkalia, S., Tiralongo, F., Turan, C., Vrdoljak, D., Yapici, S., & Zenetos, A. (2018). New mediterranean biodiversity records (December 2017). *Mediterranean Marine Science*, 18(3), 534–556. <https://doi.org/10.12681/mms.15823>

Tang, H. F., Yi, Y. H., Li, L., Sun, P., Zhang, S. Q., & Zhao, Y. P. (2006). Asterosaponins from the starfish *Culcita novaeguineae* and their bioactivities. *Fitoterapia*, 77(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2005.07.009>

Tian, X., Tang, H., Lin, H., Cheng, G., Wang, S., & Zhang, X. (2013). Saponins: the potential chemotherapeutic agents in pursuing new anti-glioblastoma drugs. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(12), 1709-1724.

Tourón-Besada, N. (2012). Caracterización genética de poblaciones de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en Asturias, Galicia y Canarias y desarrollo de sistemas de cultivo en batea. (Tesis doctoral). Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Watanabe, T., Arakawa, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1984a. Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of red seabream. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 50, 495-501.

Xunta de Galicia. (2012). Acuicultura multitrofica integrada: Una alternativa sostenible y de futuro para los cultivos marinos en Galicia. Consellería do Medio Rural e do Mar. Centro de Investigacións Mariñas (CIMA). 111 pp.

Yahyavi, M., Afkhami, M., Javadi, A., Ehsanpour, M., Khazaali, A., Khoshnood R., & Mokhlesi, A. (2012). Fatty acid composition in two sea cucumber species, *Holothuria scabra* and *Holothuria leucospilata* from Qeshm Island (Persian Gulf). *African Journal of Biotechnology*, 11(12), 2862-2668.

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), e25. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6>

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a José Antonio Pérez Pérez y a Nieves Guadalupe Acosta González por estar ahí en todo momento ayudándome con el trabajo, aconsejándome y guiándome. A Jesús, por enseñarme todo lo que sabe en el laboratorio y a Diego por familiarizarme con los programas estadísticos. Pero quiero agradecer especialmente a José, a Lupe y a Eduardo, por la paciencia que me han tenido y por todo lo que he aprendido gracias a ellos durante estos meses.

También quiero agradecer a mis amigos, por apoyarme durante todos estos años de carrera, pero, sobre todo, a **mis padres**, que son los que realmente me han visto luchar día a día por mis sueños y los que siempre han confiado en mí a pesar de todo. Gracias.