

787

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"USO DE FEROMONAS Y AMINAS BIOGENICAS COMO
ATRACTANTES EN ALIMENTO PARA LANGOSTINOS,
Macrobrachium rosenbergii"

TESIS

QUE PRESENTA

BIOL. JESUS MONTEMAYOR LEAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN RECURSOS
ALIMENTICIOS Y PRODUCCION ACUICOLA

MONTERREY, N.L. A DICIEMBRE DE 1995

TM
SH380
16
C.1



1080073245

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"USO DE FEROMONAS Y AMINAS BIOGENICAS COMO
ATRACTANTES EN ALIMENTO PARA LANGOSTINOS,
Macrobrachium rosenbergii"

TESIS

QUE PRESENTA

BIOL. JESUS MONTEMAYOR LEAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN RECURSOS
ALIMENTICIOS Y PRODUCCION ACUICOLA

MONTERREY, N.L. A DICIEMBRE DE 1995

TM
30
M6



DO
TESIS
(73245)



FONDO
TESIS MAESTRIA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"USO DE FEROMONAS Y AMINAS BIOGENICAS COMO
ATRACTANTES EN ALIMENTO PARA LANGOSTINOS,

Macrobrachium rosenbergii"


TESIS

QUE PRESENTA


BIOL. JESUS MONTEMAYOR LEAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN RECURSOS
ALIMENTICIOS Y PRODUCCION ACUICOLA

PRESIDENTE:


DRA. JULIA VERDE STAR

SECRETARIO:


DR. ROBERTO MENDOZA

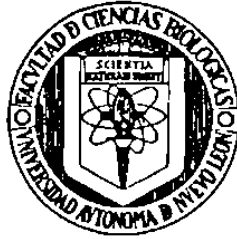
VOCAL:


DR. RAHIM/FOROUGHBAKHCH

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"USO DE FEROMONAS Y AMINAS BIOGENICAS COMO
ATRACTANTES EN ALIMENTO PARA LANGOSTINOS,

Macrobrachium rosenbergii"

TESIS

QUE PRESENTA

BIOL. JESUS MONTEMAYOR LEAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN RECURSOS
ALIMENTICIOS Y PRODUCCION ACUICOLA

DIRECTOR

DRA. JULIA VERDE STAR

CO-DIRECTOR

DR. ROBERTO MENDOZA

ASESOR EXTERNO

M.C. MARCELO COSTERO

ASESOR EXTERNO

DR. RAHIM FOROUGHBAKHCH

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Julia Verde por el apoyo incondicional que ha tenido hacia mi persona desde que tengo el gusto de conocerla y durante este trabajo.

Al Dr. Roberto Mendoza por la revisión exhaustiva que realizó para este estudio, por su apoyo y principalmente por su amistad.

Al Dr. Rahim Foroughbakhch por su participación como asesor en el presente trabajo y, al igual que a la Dra. Leticia Hauad por los acertados comentarios realizados a este trabajo.

Al M.C. Marcelo Costero por su participación como Asesor Externo y sus consejos para la elaboración de los bioensayos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca otorgada a mi persona durante mi estancia en la Maestría.

A la Sra. Cynthia de Lopez y todo su Staff de Quali Tech por su apoyo y la donación del attractante comercial "*Langobuds*" utilizado en este estudio.

A los directivos de la granja de langostinos "Los Desmontes" por haber permitido el uso de sus instalaciones.

Al Biól. Arcadio Valdés, Jefe del Laboratorio de Acuicultura, a la Dra. Elizabeth Cruz, Coordinadora de la Maestría, así como a mis compañeros y amigos y todas las personas que de alguna forma influyeron en la realización de este trabajo.

Por último, y no por eso menos meritorio, agradezco el apoyo de mi esposa Paty y mi hija Samantha, sin el cual no hubiese sido posible la terminación de esta etapa de mi carrera.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
I.- INTRODUCCION	4
II.- ORIGINALIDAD	6
III.- ANTECEDENTES	7
Características del Langostino	7
Producción	7
Hábitos alimenticios	8
Quimiorrecepción	8
Quimiorreceptores	8
Clasificación	11
Feromonas	13
Definición	13
Naturaleza	14
Ecomonas	15
Especificidad	16
Atracción de ambos sexos	16
Obtención	17
Modo de dispersión	19
Aminas Biogénicas	19
Formación	23
Tiempo de formación	24
Presencia y función	24
Detección	25
Método de extracción	25
Atractantes	26
Extractos orgánicos	26
Aminoácidos	29
Requerimientos estructurales	31
Dosis	31
Otras moléculas	33
Sistemas utilizados	34
Sistemas de monitoreo	38
Estado nutricional	38
Alternativas de incorporación	38
Técnicas inmunológicas	38
IV.- Hipótesis	41
V.- Material y métodos	43
Extracción de feromonas.....	43
Obtención de feromonas	44

Presencia de feromonas en la orina	44
Obtención del extracto hidroalcoholosoluble de calamar	47
Elaboración de la dieta base	48
Bioensayo de Quimiorrecepción	49
Aplicación de atractantes	49
Registro de la prueba	50
Diseño experimental	51
Bioensayo de ingestión	52
Observación directa	52
Descripción del bioensayo	52
Método inmunológico	53
Obtención de la proteína	53
Protocolo de inmunización	53
Especificidad del anticuerpo	54
Preparación de la placa	54
VI.- Resultados	56
Quimiorrecepción de acuarios	60
Bioensayo de ingestión	67
Prueba inmunológica	69
VII.- Discusión	70
VIII.- Conclusiones	81
IX.- Bibliografía	83

ABSTRACT

The use of attractants in formulated feed has become paramount to economic success due to the need to optimize feed conversion rates by maximizing consumption and reducing feed waste to lower production costs. Taking into account the importance of attractants we have carried out a series of experiments oriented to evaluate natural molecules, two biogenic amines (Putrescine and Cadaverine) and two sexual pheromones (crab urine and freshwater shrimp urine) compared with products of reference proved to be major attractants such as squid extracts, a commercial attractant known for its quality, and a basal diet designed to be non attractant. Results were obtained by three different approaches. First, we have performed a laboratory bioassay consisting in measuring the time that lasted an animal in presenting different alimentary stages (perception, orientation, movement, arrival, ingestion). A second approach was achieved in a commercial farm, in order to test the performance of the attractants in presence of other stimuli and in conditions of water movement that may imply a rapid dilution of the attractants. The test consisted in placing a certain quantity of feed in a tray, this was submerged in a cage (1m³) in which we have placed 10 animals (5 males and 5 females) of 20 gr. mean weight. The tray was lifted at different times (10, 20, 40, and 80 minutes) and the number of pellets left was counted. Three replicates were done for each treatment. A third approach consisted in incorporating an antibody in the feed; following a methodology similar to the above mentioned we have collected hepatopancreas at different times. Later we have executed immunodiffusions tests to assess the actual ingestion of the feed. The results obtained from the different tests show that the Cadaverine included at 0.2% was rated as the best attractant. On the other hand the crab and freshwater shrimp urine have shown good results only with males, so their utilization could be recommended for monosexual cultures.

RESUMEN

El uso de atractantes en la formulación de alimentos balanceados para crustáceos ha adquirido una gran importancia debido a las ventajas que representa su empleo, las cuales se reflejan tanto en la disminución de los costos de producción como en la optimización de la tasa de conversión alimenticia, dando como consecuencia una mayor rentabilidad en el cultivo.

En el presente trabajo se probó la capacidad de atracción que presentan dos feromonas sexuales (de langostino y de jaiba), y dos aminas biogénicas (Putrescina y Cadaverina), adicionalmente se utilizaron como referencia dos testigos positivos, un atractante comercial (*Langobuds*), así como un extracto hidroalcoholosoluble de calamar y un testigo negativo (dieta a base de soya, considerado antiatractante y antipalatable).

La metodología utilizada se dividió en tres etapas, la primera consistió en un bioensayo de quimioatracción en laboratorio, consistente en medir el tiempo que tarda el organismo en presentar las diferentes fases alimenticias (percepción, orientación, movimiento, arribo al alimento e ingestión) después de introducir el atractante a probar en un acuario.

La segunda etapa se realizó en una granja comercial de langostino y sirvió para demostrar si los atractantes estimulaban la ingestión del alimento en presencia de otros estímulos químicos. Para este efecto, en jaulas de un metro cuadrado se colocaron 10 individuos de un peso promedio de 20 gramos, a los cuales se les ofreció una cantidad determinada de alimento peletizado con el atractante a probar y se contabilizó el consumo de estos a diferentes tiempos (10, 20, 40 y 80 minutos). El testigo negativo utilizado en esta fase fue el alimento que normalmente utilizaban en la granja, esto con el fin de comparar el beneficio potencial de la utilización de los atractantes.

La tercera etapa consistió en un ensayo inmunológico para lo cual fue necesario la obtención de anticuerpos contra *Artemia salina*, los cuales fueron agregados al alimento que fue ofrecido a los langostinos en la misma granja comercial. Para corroborar la ingestión del

alimento, en cada uno de los diferentes tiempos (10, 20, 40 y 80 minutos) se colectaron hepatopancreas los cuales fueron congelados y trasladados al Laboratorio de Maricultura, donde se realizó la técnica de Inmunodifusión radial simple, para constatar la ingestión del alimento.

Los resultados obtenidos en las primeras dos fases revelan que existen diferencias significativas entre los tratamientos (atractantes) probados y que entre los mejores destacan la Cadaverina, la Putrescina, aún por encima del "Langobuds" y el Extracto Hidro-Alcoholosoluble de Calamar. Por otra parte, las orinas de langostino y de jaiba presentaron buenos resultados pero solo con organismos machos por lo que su utilización podría avocarse a cultivos monosexuales de langostino.

Mediante el método inmunológico se confirmó la mayor ingestión de alimento conteniendo Cadaverina y Putrescina, lo cual confirma los resultados obtenidos en las fases anteriores.

I.- INTRODUCCION

La necesidad de optimizar las tasas de conversión alimenticia y de reducir los problemas asociados con la acumulación de sedimentos orgánicos en los estanques, han sido identificados como algunos de los puntos más importantes para lograr disminuir los costos de producción en las empresas acuícolas. Para este efecto, es esencial adoptar medidas que permitan preservar un ambiente adecuado para el buen desarrollo de los organismos en cultivo y, al mismo tiempo, disminuir el posible impacto ambiental en la zona en donde son liberados los efluentes (Boyd y Tucker, 1995).

Una alternativa viable para solventar este tipo de problemas consiste en la adición de atractantes a las dietas comerciales, propiciando de ésta manera que el animal localice rápidamente el alimento, lo que conlleva a aumentar la probabilidad de ingestión, favoreciendo así la reducción de las tasas de conversión alimenticia. Adicionalmente, esta medida implicaría disminuir la incorporación de ligantes en el alimento, cuya presencia puede resultar detrimental para la calidad del mismo (Mendoza, 1993a).

Lo expuesto anteriormente responde a algunas de las necesidades de la industria acuícola, la cual viene exigiendo mejores alimentos en términos de atracción, para de esta forma asegurar la ingestión del mismo, ya que una dieta, por más completa que sea, si no es ingerida de inmediato o en un corto lapso de tiempo, es poco probable que se aproveche su valor nutricional. Asumiendo que una dieta contenga una mezcla ideal de proteínas, vitaminas y minerales, esta requiere que todo el alimento que se ofrece al organismo sea consumido, en la práctica esto raramente se cumple ya que una proporción de la dieta no es ingerida, lo cual reduce la tasa de conversión alimenticia de la dieta causando además una cierta contaminación en el agua.

Por otra parte, debe considerarse que el alimento representa entre el 50 y el 60% de los gastos de producción en una granja de langostino, por lo que es de suma importancia buscar alternativas para que su valor nutricional sea aprovechado al máximo.

No obstante que la inclusión de atractantes de buena calidad se considere definitiva para garantizar la ingestión de los alimentos en condiciones comerciales, dichas condiciones resultan ser a menudo adversas para la fácil localización del alimento, debido principalmente a la importante disolución de los atractantes en grandes volúmenes de agua y a la existencia de una gran variedad de moléculas con poder igualmente atractante presentes tanto en el bentos como en la columna de agua.

Por otro lado, cabe remarcar la limitada investigación sobre la detección de comportamientos alimenticios y/o quimiorrecepción en crustáceos de agua dulce comparado con la existente para crustáceos marinos (Tierney y Dunham, 1982).

Considerando el contexto anterior, el presente trabajo se orientó a demostrar el potencial de atracción de moléculas naturales hasta ahora nunca probadas, como lo son las feromonas y las aminos biogénicas en las dietas para langostinos.

II.- ORIGINALIDAD

Dentro de las aproximaciones utilizadas para investigar el papel de los atractantes, hasta la fecha no se ha experimentado ni con feromonas ni con aminos biogénicos. La mayor parte de las investigaciones realizadas se han restringido a evaluar extractos orgánicos y algunas moléculas puras. Esto ha originado que los productores de alimentos utilicen compuestos a los que se refieren como atractantes, encontrándose entre los más conocidos los siguientes:

- Harina de pescado
- Extractos solubles de pescados marinos
- Harina de cabeza de camarón
- Harina de calamar o aceite de hígado de calamar
- Extracto Hidroalcoholosoluble de calamar

Sin embargo, su inclusión como atractantes dentro de la formulación de los alimentos implica ciertos problemas debido a la variabilidad del producto, determinada a su vez por el tipo de proceso, la especie utilizada, el estado de la materia prima, etc. Por otra parte, no obstante que actualmente existen algunas moléculas cuyo potencial de atracción ya ha sido demostrado, tales como algunos amino ácidos y compuestos cuaternarios de amonio, su utilización es limitada ya que su empleo resulta oneroso (Holland y Borski, 1993). De aquí que la utilización de moléculas cuyo papel fisiológico es el de asegurar normalmente el comportamiento de atracción puede resultar una alternativa interesante y económica, debido a que la simplicidad de las moléculas caracterizadas como feromonas y las de las aminos biogénicos las harían fácilmente sintetizables (Gleeson, 1987).

III.- ANTECEDENTES

CARACTERISTICAS DEL LANGOSTINO (*Macrobrachium rosenbergii* De Man)

Existen varias características que hacen de los crustáceos excelentes especímenes para el estudio de la quimiorrecepción y el comportamiento de búsqueda, entre las que destacan su fácil mantenimiento en laboratorio y la exhibición de un comportamiento alimenticio claramente definido (Zimmer-Faust, 1989).

Uno de los crustáceos de agua dulce con mayor potencial de cultivo en México es el langostino *Macrobrachium rosenbergii*, el cual siendo originario de la región del Indo Pacífico, ha sido introducido en varios países, debido a las ventajas que presenta para su cultivo: tales como poca agresividad con respecto a otras especies de langostinos, rápido crecimiento, gran adaptabilidad y resistencia al manejo (Magallon, 1980).

PRODUCCION

En México, el cultivo comercial de langostino se inició en 1984 en los estados de Veracruz, Tamaulipas, Morelos, Colima y Jalisco. Para 1988 existían doce laboratorios productores de postlarvas con una capacidad instalada para 11 millones de postlarvas por año y 46 unidades de producción de individuos de talla comercial con un espejo de agua de 214.6 has, alcanzando una producción de 133.62 toneladas (SEPESCA, 1990). Por su parte, New (1990) reporta que la producción de langostinos en México para el año de 1987 fue de 361 toneladas, la cual lo colocaba en segundo lugar entre los países productores de langostino de Latinoamérica y El Caribe, sólo superado por Brasil con 1,000 toneladas anuales.

Es pertinente considerar que actualmente el 90% de la actividad acuícola está centrada en la producción de camarones peneidos debido a lo atractivo que resulta la exportación de

este producto, sin embargo, hay recursos entre los crustáceos de aguas continentales con un enorme potencial aún no completamente explotado.

En la actualidad existen muchos lugares en México donde se cultiva comercialmente el langostino y cada día es mayor el número de personas interesadas en esta actividad (Holtschmit, 1980).

HABITOS ALIMENTICIOS

El langostino *Macrobrachium rosenbergii* presenta hábitos alimenticios del tipo omnívoro, su alimentación normal incluye gusanos e insectos acuáticos, pequeños moluscos y crustáceos, cadáveres de peces y otros animales, semillas, frutas, algas, tallos y hojas suaves de plantas acuáticas. En estadio juvenil consumen cualquier tipo de materia orgánica, viva o muerta y cuando tiene suficiente hambre pueden recurrir al canibalismo (Ling, 1969; New, 1990; Holtschmith, *op. cit.*; SEPESCA, 1987)

QUIMIORRECEPCION

QUIMIORRECEPTORES

Los quimiorreceptores de los crustáceos pueden ser divididos en función de su estructura, en astetascos y no astetascos (Ache y Derby, 1985). Los astetascos se encuentran exclusivamente en el flagelo lateral de las anténulas en donde se componen como mechones de *sensillia* enervados por múltiples células bipolares (400,000/antenua). Los axones de los receptores celulares forman el nervio antenular que se proyecta hacia el lóbulo olfatorio del protocerebro de los crustáceos.

Estos quimiorreceptores parecen funcionar mediante la unión de moléculas estimuladoras y un sitio particular del receptor (Bauer *et al.*, 1981). La unión resulta en la

internalización de una corriente neta de sodio en el receptor, causando un potencial de acción que viaja a través de la neurona.

Por otra parte, los movimientos antenulares desempeñan un papel significativo en la fisiología de la quimiorrecepción adaptándose al ambiente local al cual están expuestos los astetascos y causando cambios mecánicos en la posición de los receptores. En efecto, los movimientos de las antenas sirven para aumentar la exposición de los astetascos a los químicos propiciando la circulación del agua (Pearson *et al.*, 1979).

Cabe mencionar que la habilidad para percibir la presencia y calidad del alimento se debe considerar no sólo como una ventaja que poseen los organismos sino también como una estrategia energética, ya que se minimiza el tiempo de búsqueda y se maximiza la proporción neta de energía o nutrientes ingeridos. La decisión para alimentarse se realiza bajo la influencia de diferentes factores, tanto internos (nivel de inanición, dominancia social, sexo y estatus reproductivos), como externos (presencia de predadores o competidores), de acuerdo con Schmitt y Holbrook (1985).

Atema (1977) menciona que los crustáceos poseen quimiorreceptores sensitivos en el primer par de antenas, la función de estos varía de alguna manera en relación con el sentido del olfato (receptores de distancia), y también poseen receptores en apéndices y partes bucales que funcionan en el sentido del gusto (receptores de contacto).

Aquellos quimiorreceptores más implicados con la búsqueda del alimento parecen localizarse en las anténulas especialmente asociadas con los astetascos o en los pereiópodos y también en los apéndices bucales e inclusive en el intestino anterior.

En la Figura 1, se presenta un diagrama generalizado en donde se identifican los sitios sugeridos de los órganos quimiorreceptores. Estos se localizan principalmente en el extremo anterior de los crustáceos, disminuyendo éstos en el abdomen. La mayor

concentración se presenta en los flagelos de las anténulas, los dactilos de los pereiópodos y las mandíbulas, maxilas y maxilípedos.

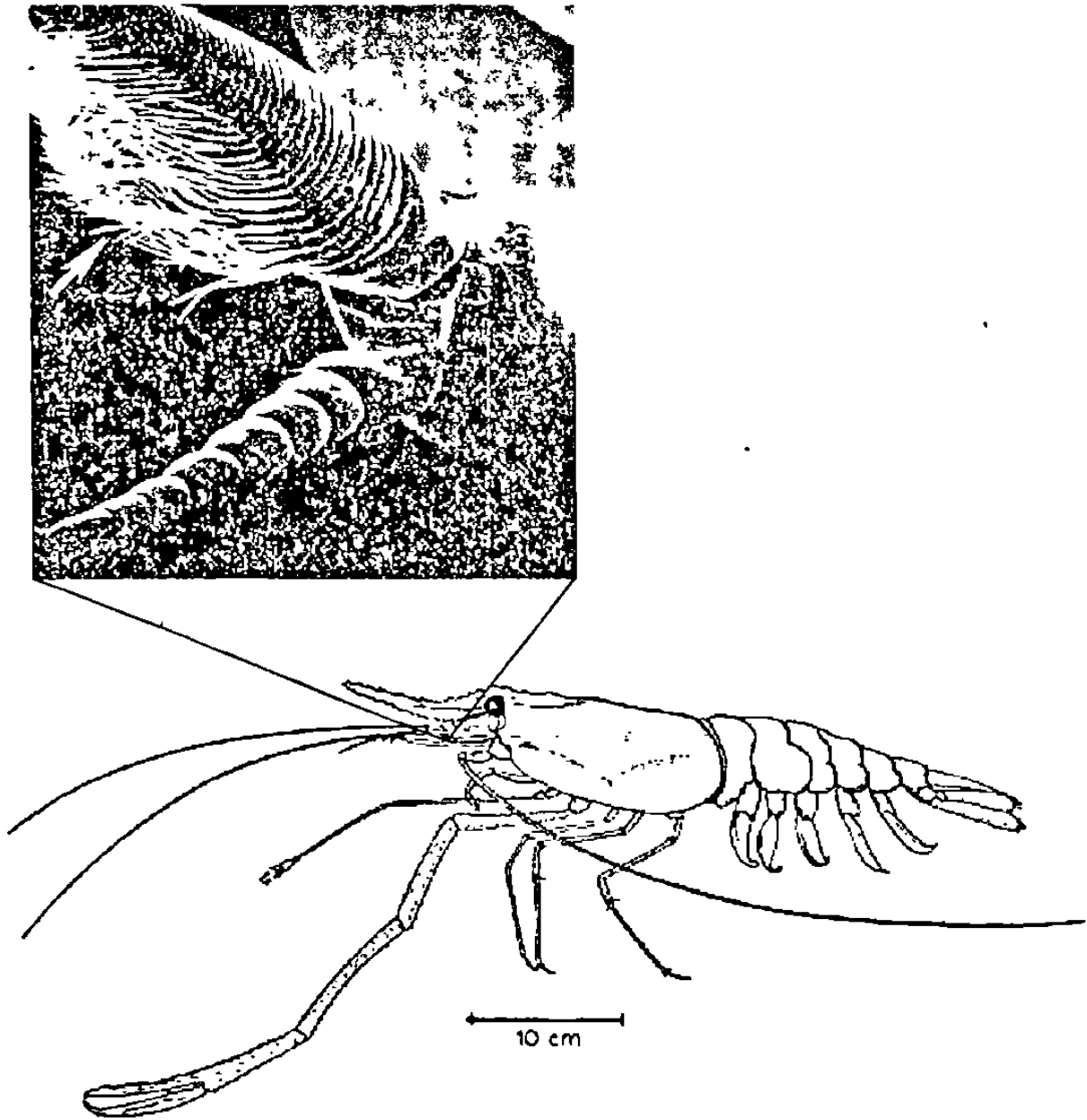


Figura 1.- Diagrama del langostino *Macrobrachium rosenbergii* y los astetascos.

CLASIFICACION

Existe cierto grado de confusión en la clasificación de los estímulos químicos, por lo que muchos incitantes o estimulantes alimenticios han sido erróneamente identificados como quimioattractantes. Esto ha originado que muchos de los primeros reportes tengan un valor comparativo limitado debido a la inconsistencia en la metodología y a la pobre descripción de las condiciones del medio ambiente, la salud de los animales y la variabilidad individual (Derby y Atema, 1982).

Según Lindsted (1970), Heinen (1980) y Mackie (1982) existen diferentes activadores e inhibidores del comportamiento alimenticio (Fig. 2).

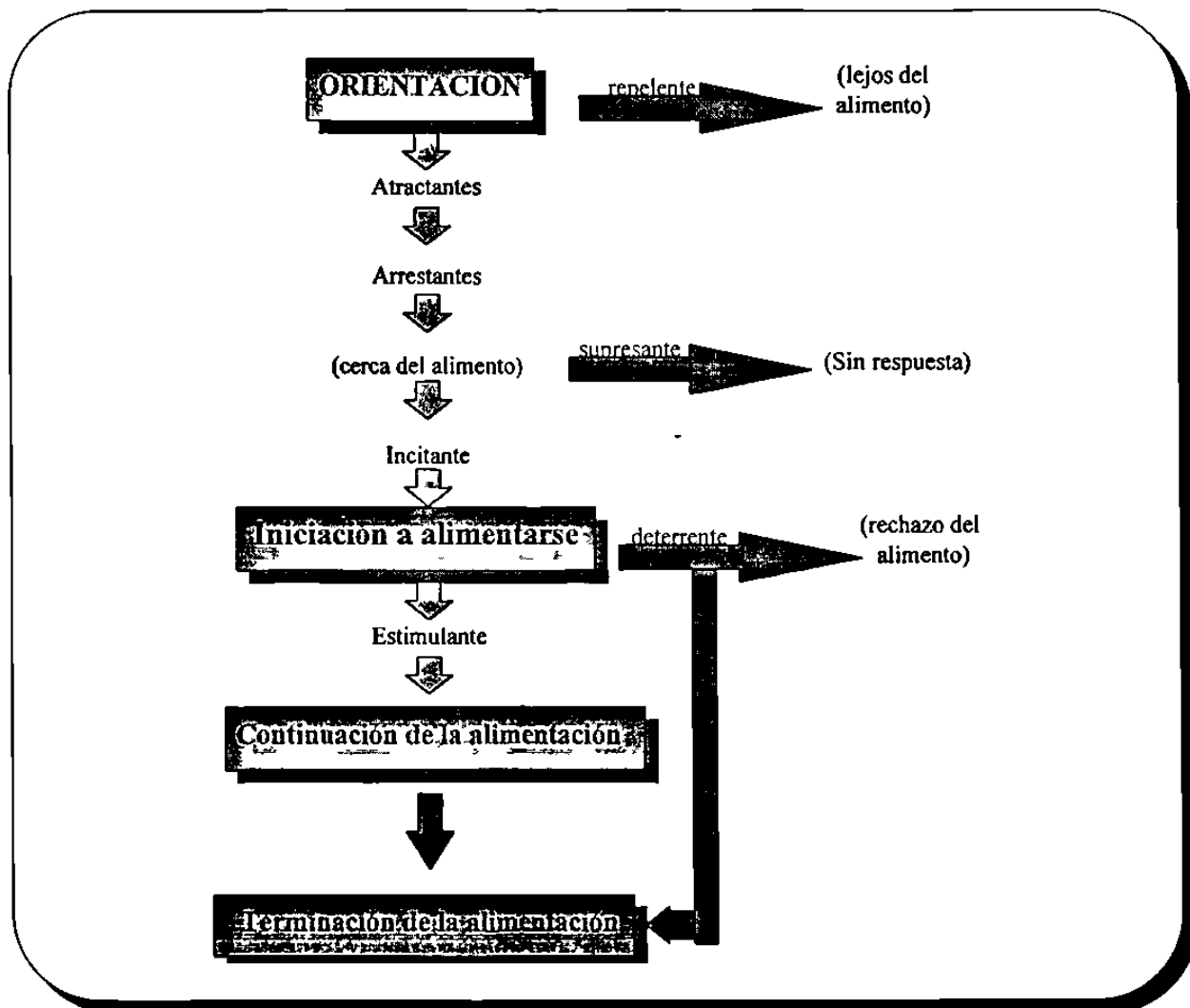


Figura 2.- Lista de activadores e inhibidores del comportamiento alimenticio.

Mucha de la información reportada en la literatura requiere ser evaluada, especialmente debido a que los criterios utilizados para estimar las respuestas de los animales no fueron los adecuados para reconocer los diferentes grados del comportamiento en respuesta a los químicos ya que consideramos que la detección no es equivalente de la atracción.

Para describir de manera precisa y poder predecir las respuestas a un estimulante alimenticio, las diferentes clases de estímulos deben ser inicialmente clasificados, categorizándose entonces las respuestas comportamentales para cada estímulo específico. Estos comportamientos (Tabla 1) ya han sido identificados en los crustáceos (Lindstand, 1970; Mackie y Mitchel, 1985; Lee y Meyers, 1995).

Tabla 1.- Características de las fases que presentan los estímulos químicos.

FASES	CARACTERISTICA
Orientación	Fase durante la cual los químicos pueden actuar como atractantes, repelentes o arrestantes.
Iniciación a alimentarse	En esta fase los químicos pueden actuar como incitantes o supresores.
Continuación de la alimentación	Los químicos pueden actuar como estimulantes o deterrentes.
Terminación de la alimentación	Los deterrentes actúan para detener la alimentación.

Por otra parte, los mismos autores señalan que algunos estímulos químicos pueden ser detectados a distancia y en bajas concentraciones, mientras que otros funcionan por contacto directo de la fuente con el receptor, tal y como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.- Detección de los estímulos químicos (Lindstedt, 1970).

QUIMICOS DETECTADOS A DISTANCIA	QUIMICOS DETECTADOS POR CONTACTO
Atractantes	Incitantes
Repelentes	Supresantes
Arrestantes	Estimulantes
	Deterrentes

Además, se han descrito cuatro componentes básicos asociados con la quimiorrecepción para la mayor parte de las especies de crustáceos (Lee y Meyers, 1995):

- a) **El movimiento de las antenas** parece ser el más sensible asociado con la quimiorrecepción a distancia.
- b) **Los movimientos de exploración** realizados con los pereopodos. Estos preceden normalmente a la locomoción y pueden servir para buscar una área inmediata, donde se localice su presa.
- c) **Locomoción**, la cual indica la real atracción o repulsión hacia el estímulo químico.
- d) **Movimiento de las partes bucales**, estas indican de manera general la estimulación alimenticia.

Los comportamientos anteriores pueden tener una correlación fisiológica, ya que algunos estudios han indicado que antenas, pereopodos y partes bucales están asociados con la quimioatracción a distancia, relacionados con la detección y locomoción y con la quimiorrecepción de contacto.

FEROMONAS

DEFINICION

Las feromonas han sido definidas como aquellas sustancias que al ser secretadas al medio ambiente por un individuo y percibidas por otro, regularmente de la misma especie, originan una reacción específica. Se ha reportado para un gran número de especies que las feromonas facilitan la cópula, ya que propician la atracción de los machos hacia las hembras o viceversa. Se sospecha que los sistemas olfatorios y gustatorios están involucrados, sin embargo, en la mayoría de los casos el sistema sensor involucrado no ha sido bien identificado (Pfeiffer, 1982).

NATURALEZA

El grado de avance en el conocimiento de las feromonas ha llegado a un punto en el que se puede generalizar acerca de su estructura molecular, así se sabe actualmente que los atractantes sexuales son en general compuestos que contienen entre 10 y 17 átomos de carbono y cuyo peso molecular varía entre 180 y 300 Daltons (Wilson, 1963, citado por Gleeson, 1990). Son moléculas polares solubles en agua y alcohol, la actividad se preserva aún después de calentarla durante 15-20 minutos y se conserva durante meses a -20°C sin perder su actividad biológica.

En lo que concierne a la estructura de las feromonas acuáticas, estas han sido pobremente descritas, con excepción de algunas hormonas esteroides y sus derivados glucoronoides (Carr, 1988), los cuales se encuentran entre los mejores ejemplos conocidos.

La frecuente sincronización entre la muda y la cópula en ciertos crustáceos ha llevado a varios investigadores a proponer la ecdisona y sus derivados como atractantes sexuales, o al menos como componente de un complejo feromonal (Bauchau, 1986), sin embargo, experimentos posteriores no apoyan esta conclusión, ya que cuando se probaron cuatro ecdisonas con *Homarus americanus* ninguna de ellas estimuló un comportamiento sexual (Atema y Gogosian, 1973, citado por Bauchau, 1986).

En otro experimento, Gleeson *et al.*, (1983) demostraron que dos concentraciones de crustecdisona no estimulaban el comportamiento de cortejo en jaibas *Callinectes sapidus*.

Gleeson (*com. pers.*), en un estudio para caracterizar la feromona sexual de la jaiba *Callinectes sapidus*, encontró que la molécula no poseía características físicas de un esteroide, siendo posible que fuera un péptido pequeño.

ECOMONAS

Las feromonas, al igual que los aleloquímicos forman parte de las ecomonas (Tabla 3). La particularidad de las feromonas es que éstas inducen respuestas intraespecíficas y se dividen en *disparadoras* o *inductoras*, dependiendo del tiempo en que tarda en presentarse el efecto y su implicación en la fisiología del organismo receptor. Contrariamente, los aleloquímicos al ser secretados por individuos de una especie al medio ambiente pueden ser percibidos por organismos de una especie diferente (respuesta interespecífica). Los aleloquímicos a su vez se dividen en *alomonas* y *kairomonas* en función del beneficio que pudiera obtener el organismo emisor o el individuo receptor respectivamente (Bauchau y Fontaine, 1984).

Funcionalmente las feromonas, como se dijo anteriormente, permiten a los animales de la misma especie identificar a los congéneres con los cuales se van a aparear y a sus competidores alimenticios (Dunham, 1988), mientras que los aleloquímicos son utilizados para evitar a los predadores o a las presas potencialmente peligrosas, para identificar el ambiente adecuado en el cual se establecerán las larvas para su metamorfosis, además de indentificar recursos o simbioses.

Tabla 3.- Definición de las moléculas secretadas al medio ambiente por organismos acuáticos (tomada de Bauchau y Fontaine, 1984).

ECOMONAS			
FEROMONAS intraespecíficos		ALELOQUIMICOS interespecíficos	
DISPARADORAS	INDUCTORAS	ALOMONAS	KAIROMONAS
Efecto inmediato reversible sobre el comportamiento del organismo receptor.	Efecto retardado que modifica la fisiología del organismo receptor.	Beneficio para el organismo emisor.	Beneficio para el organismo receptor.
Alarma Sexual Agregación Territorio	Maduración Inhibición Agregación Territorio		

ESPECIFICIDAD

No todas las feromonas promueven una atracción positiva, en efecto, algunas pueden actuar como repelentes. Las mismas feromonas que atraen hembras o machos y viceversa pueden actuar como repelentes en animales del mismo sexo, particularmente durante el período de alimentación (Daloze, *et al.*, 1980).

Kittredge, *et al.* (1971) reportaron que la hormona de la muda de los crustáceos (*b*-ecdisona o crustecdisona) inducía el comportamiento precopulatorio en machos de las jaibas *Pachygrapsus crassipes*, *Cancer antennarius* y *C. anthonyi*. Un fenómeno que cabe señalar es que la hormona liberada por las hembras de *P. crassipes* fué capaz de estimular el comportamiento de cortejo en *C. antennarius* de manera interespecífica, e igualmente se encontró que los machos de *Cancer magister* fueron excitados por la feromona de *Cancer productus*. En base a lo anterior concluyeron que podían existir feromonas con acción interespecíficas

De la misma manera, no obstante que se ha venido considerando que la percepción de feromonas esta mediada por receptores específicos. Recientemente se han reportado otras posibilidades de acción interespecífica, como lo demuestra un estudio hecho con la feromona de agregación de *Triatoma mazzottii*, (aislada a partir de las heces de este insecto) que funciona con varias especies estudiadas *T. mazzottii*, *T. longipennis*, *T. phillosoma*, *T. pallidipennis*, *T. barberi* y *T. prolixus* (Rojas, *et al.*, 1990).

ATRACCION DE AMBOS SEXOS

Uno de los posibles argumentos en contra de la utilización de las feromonas como atractantes alimenticios podría ser que éstas únicamente atrajeran a ejemplares de un sólo sexo, sin embargo, últimamente se ha comprobado que ciertas feromonas sexuales, como las de las hembras del anélido *Platynereis dumerlii* pueden actuar tanto con machos como con hembras

(Zeeck, *et.al.*, 1991). Igualmente se ha demostrado que las feromonas de insectos del género *Triatoma* funcionan como atractantes para ambos sexos (Rojas *et al.*, 1990).

En el caso de la langosta son las hembras y no los machos las que se activan en la selección sexual, ya que buscan a los machos maduros en sus madrigueras, de aquí que las feromonas tanto de machos como de hembras tengan una doble función de reconocimiento (Atema y Cowan, 1986).

OBTENCION

Hasta el momento, los métodos para la obtención de las feromonas se han basado en extracciones en las que se emplean organismos completos. Esto implica obviamente la utilización de un número elevado de individuos para obtener apenas una cantidad suficiente de feromona. Sin embargo, para muchas especies el mejor método consiste en extraer las feromonas directamente de las glándulas en las cuales se producen o almacenan, o bien, en su defecto extraer el fluido en el cual se secretan, lo que reduce el número de organismos necesarios para su colecta (Nordlund, 1981).

En el caso particular de los crustáceos, algunos de los principales estudios se han centrado en la extracción de feromonas sexuales que son liberadas por medio de la orina. Esto se ha investigado con detalle en las hembras de *Carcinus maenas* durante la fase de premuda copulatoria¹. Dicha feromona es percibida por los centros quimiorreceptores localizados en las anténulas de los machos. Se han postulado los órganos excretores (glándula verde), como el sitio más probable de síntesis (Fig. 3), ya que análisis de hemolinfa y otros órganos resultan sin actividad (Fontaine, *et al.*, 1989).

¹ La fase de premuda copulatoria ocurre justo antes de la muda, durante esta fase las hembras liberan una feromona para atraer a los machos a fin de que estos las protejan, debido a que en ese momento presentan un exoesqueleto muy blando por lo cual pueden ser presa fácil de otros organismos o de sus congéneres. Este comportamiento juega un papel importante en la reproducción ya que es justo en el momento en que acaban de mudar cuando se lleva a cabo la cópula (siempre se reproducen una hembra "blanda" con un macho "duro").

Este aspecto ha sido corroborado en ejemplares de jaiba azul (*Callinectes sapidus*), en la cual se ha constatado que la orina de las hembras es la ruta potencial de liberación de la feromona al medio ambiente. Experimentalmente este aspecto resulta ventajoso ya que la orina puede ser colectada directamente de los ductos de las glándulas antenales y ser almacenada hasta su uso, puesto que la orina puede ser calentada a 95°C durante 5 minutos y/o puede ser almacenada a -20°C sin perder su actividad biológica (Gleeson, 1990).

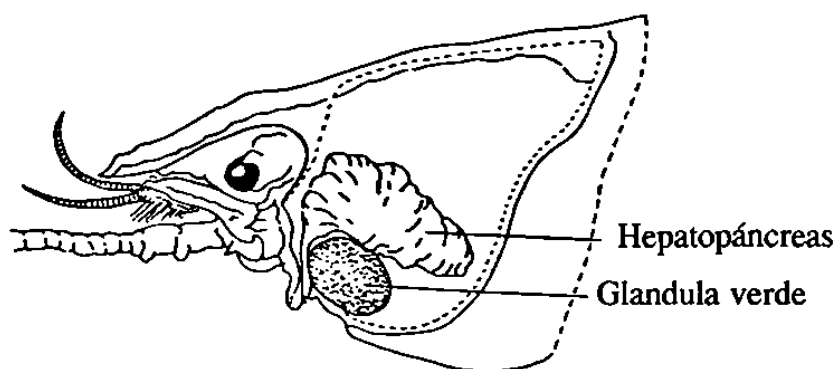


Figura 3.- Diagrama representativo del cefalotorax de un crustáceo indicando la posición de la glándula verde o glándula antenal.

Existen más de 20 especies de crustáceos en los cuales se ha reportado la presencia de feromonas comprobándose que su liberación se encuentra a menudo asociada con la excreción de la orina (Bauchau, 1986).

Por otro lado, se ha encontrado que la localización de las feromonas puede variar según la especie, ya que en *Palaemon pausidens* se descubrió que poseía glándulas externas en la base de los pereiópodos y que ésta funciona aparentemente como vía de liberación de las feromonas (Bauchau y Fontaine, 1984).

Es necesario tener ciertas precauciones al realizar la extracción de la orina, ya que puede haber otros "olores" corporales que pueden ser igualmente potentes a las feromonas, así ha sido determinado que los crustáceos en los momentos precedentes a la exuviación pueden emitir sustancias que son detectadas por sus congéneres y ante estas señales responden

diferentemente ambos sexos. De hecho se ha argumentado de que si existiera una seria competencia intersexual, ambos sexos responderían intrasexualmente a estas señales, lo cual permitiría a los ejemplares de cada sexo eliminar a los organismos que estuvieran mudando, ya que éstos serían considerados como competidores vulnerables (Atema y Cowan, 1986)

MODO DE DISPERSION

La orina de los crustáceos es almacenada, lo cual es una indicación de la necesidad de una liberación controlada. Esta orina es liberada de un par de papilas bilaterales (nefroporos) localizados en la base de las antenas relacionado directamente a la corriente branquial, por lo que se sugiere que esta corriente es utilizada, entre otras funciones, como un sistema para dispersar la señal química. De hecho ha sido constatado que la corriente branquial llega a proyectar la orina a una distancia de siete veces la longitud corporal del animal. Después de esta distancia se disuelve y se diluye. Posteriormente las corrientes locales se encargan de disipar y diluir aún más estas señales.

AMINAS BIOGENICAS

Las aminos biogénicas son moléculas provenientes de la degradación de diferentes aminoácidos (Gouygou *et al.*, 1989), proceso que se presenta normalmente en condiciones de descomposición de la materia orgánica.

Con la finalidad de lograr un mejor entendimiento, se deben de tomar en cuenta los procesos que ocurren inmediatamente después de la muerte de un organismo, los cuales se describen a continuación: al momento que un organismo muere, los sistemas de regulación cesan sus funciones y se detiene el suplemento de oxígeno y por consecuencia la producción de energía. Las células empiezan una nueva serie de procesos caracterizados por la descomposición del glicógeno (glicólisis) y la degradación de compuestos ricos en energía, tales como el ATP (Fig. 4).

En los organismos vivos el ATP es formado por la reacción entre el ADP y fosfato creatina (fosfágenos), formándose un reservorio de grupos de fosfatos ricos en energía en las células del músculo. Cuando este reservorio se agota, el ATP es regenerado a partir de ADP por refoforilización durante la glicólisis. Después de muerto el organismo, cuando cesa la regeneración, el ATP es rapidamente degradado y cuando sus niveles son bajos, se desarrolla lo que comunmente se denomina *rigor mortis*(Huss, 1988).

El ATP se degrada mediante una serie de reacciones de desfosforilación y desaminación hasta convertirse en inosina monofosfato (IMP), el cual a su vez se degrada en Inosina (HxR) y esta en hipoxantina (Hx) y ribosa (R).

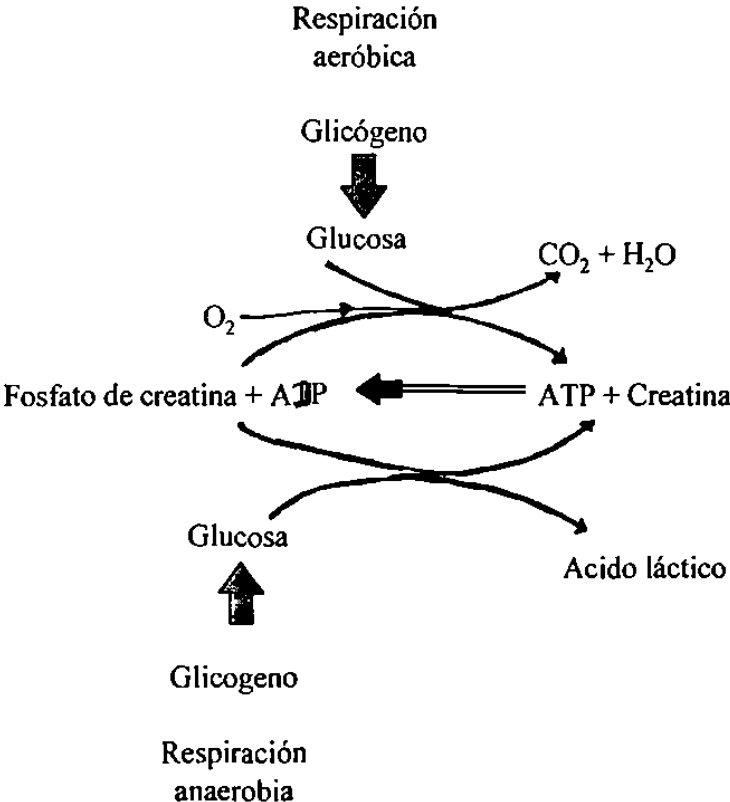
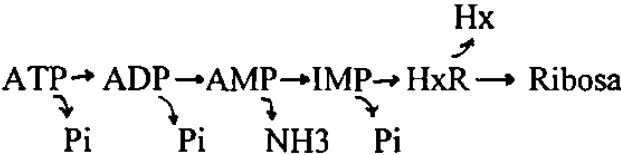
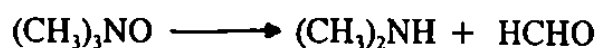


Figura 4.- Proceso de descomposición aeróbica y anaeróbica del glicógeno.

En los tejidos vivos el ATP, ADP y AMP dominan la concentración de nucleótidos, sin embargo, inmediatamente después de la muerte los nucleótidos se degradan enzimáticamente. La concentración relativa de los diferentes nucleótidos en el tejido *postmortem* depende de la actividad de las enzimas individuales y del tiempo transcurrido después de la muerte.

Por otro lado, debido a la falta de oxígeno, la glicólisis se desarrolla en condiciones anaerobias y su producto final es el ácido láctico, el cual causa una disminución en los valores de pH y por lo tanto en la capacidad de las proteínas de retener agua, favoreciendo así las condiciones para el desarrollo de la actividad bacteriana y enzimática (caso de la catepsina D). La catepsina D tiene una actividad óptima a valores de pH de 4 y es de las enzimas más importante para iniciar la degradación de las proteínas endógenas a péptidos, los que a su vez son degradados por otras catepsinas (A,B,C). De esta forma las proteínas se descomponen en péptidos de diferentes tamaños, que después son hidrolizados finalmente en aminoácidos y por último degradados (descarboxilados) en aminas biogénicas, por medio de las enzimas bacterianas (Fig. 3).

En cuanto a las bases nitrogenadas, las clases más comunes que se encuentran en los animales acuáticos son el TMAO (óxido de trimetilamina) y las betaínas. Se pueden presentar dos reacciones químicas responsables de la descomposición del TMAO en el músculo *postmortem*. El TMAO puede ser reducido enzimáticamente a TMA (trimetilamina) por la TMAO reductasa de los microorganismos. La segunda reacción de descomposición es la formación de DMA (dimetilamina) y formaldehído (FA), esta reacción se puede llevar a cabo enzimáticamente o no enzimáticamente. El formaldehído reacciona con los grupos aminos libres de las proteínas miofibrilares contribuyendo al deterioro proteico. Las betaínas son componentes menores en el músculo de los peces pero se pueden presentar en grandes concentraciones en crustáceos y moluscos. El más común de estos compuestos es la glicina-betaína.



Uno de los factores que juega un papel importante dentro del proceso de descomposición es la presencia de la flora bacteriana tanto en la superficie (piel y branquias) como en el intestino del organismo recién muerto.

Los cambios que se observan después de la muerte de un organismo se presentan bajo el siguiente diagrama (Fig. 5).

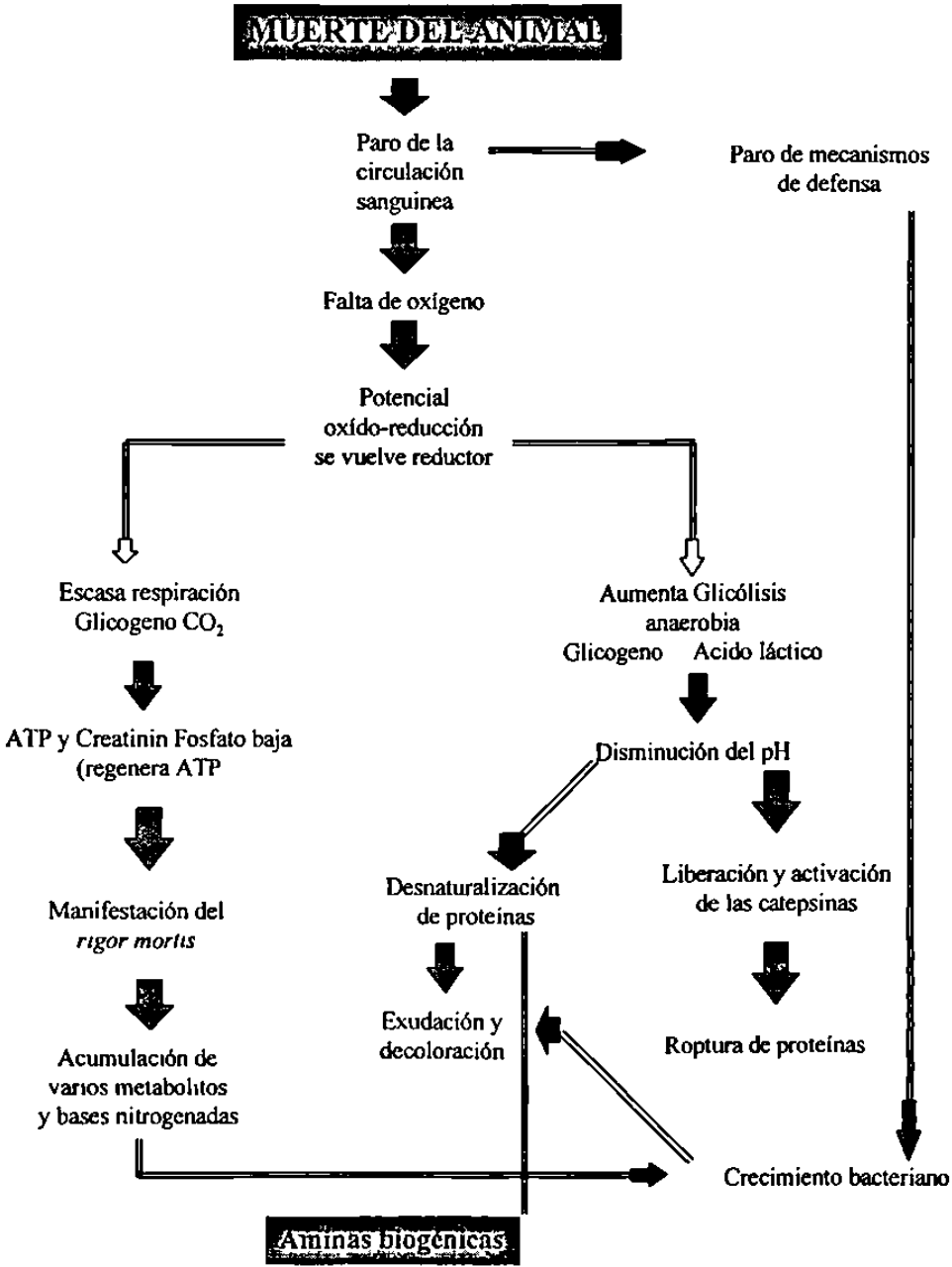


Figura 5.- Proceso de la descomposición de los organismos.

FORMACION DE AMINAS BIOGENICAS

Existen dos vías para la degradación de los aminoácidos, siendo la desaminación el mecanismo más común que permite a los microorganismos utilizar los aminoácidos libres. Esta desaminación bacteriana se puede llevar a cabo de diferentes formas en función de la constitución enzimática de los organismos y de las condiciones del medio ambiente. La desaminación puede dar como resultado la formación de amoníaco el cual es el componente primario relativo a la descomposición del alimento fresco. Por otra parte, la desaminación funciona regularmente a nivel metabólico como parte del mecanismo de transaminación. Otro mecanismo de degradación es la descarboxilación donde las bacterias juegan un papel importante para transformar los amino ácidos en aminas biogénicas y bióxido de carbono, ambas vías son mecanismos regulares de detoxificación y excreción de los organismos.

La putrescina es formada a partir de la descarboxilación de la ornitina, la cual a su vez es producto de la desaminación de la arginina, mientras que la cadaverina es formada por la descarboxilación de la lisina (Fujita, *et.al.* 1983). Por su parte, la tiramina y la histamina derivan de los amino ácidos tirosina e histidina, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4.- Principales aminas biogénicas.

AMINOACIDO PRECURSOR	AMINA BIOGENICA
Arginina	Putrescina y Agmatina
Ornitina	Putrescina-Espermidina
Lisina	Cadaverina
Tirosina	Tiramina
Histidina	Histamina

Fuente: Zaldivar, (1992) y Poole, (1993).

TIEMPO DE FORMACION DE LAS AMINAS BIOGENICAS

Suzuki *et al.*, (1994) observaron que la formación de putrescina y cadaverina a partir de arenque seco (*Clupea pallasii*) a temperatura de 15 a 20°C, llega al máximo a los 3 y 4 días respectivamente, pero desde el primer día se encuentran presentes a bajos niveles .

Klausen y Lund, (1986) mencionan que durante el almacenamiento de arenques enteros (*Clupea harengus*) las aminas biogénicas como la histamina y la cadaverina se forman mucho más rápido a una temperatura de 10°C que a 2°C.

PRESENCIA Y FUNCION DE LAS AMINAS BIOGENICAS EN LOS ORGANISMOS

En diversos estudios relacionados con las aminas biogénicas, se ha demostrado que tanto en pollos como en peces éstas pueden, en altas concentraciones, causar efectos adversos tales como intolerancia al alimento, hipersensibilidad o daño intestinal (Taylor, 1986; Kuba *et al.*, 1983; Murray *et al.*, 1982; Sacaguchi *et al.*, 1992). Sin embargo, al utilizarse en bajas concentraciones pueden resultar atractantes como en el caso de *Orconectes rusticus*, el cual resultó ligeramente estimulado por la putrescina (Tierney y Atema, 1987).

Las poliaminas son esenciales para el crecimiento celular, siendo necesarias para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y para la formación de purinas. Por otro lado, afectan las actividades de ciertas enzimas y en adición la putrescina puede proteger a las células de un shock osmótico (Pegg, 1986, citado por Cowey y Cho, 1992).

Por otra parte, las aminas biogénicas también juegan cierto papel como promotoras de crecimiento cuando se emplean en bajas concentraciones, así, cuando se utilizó la putrescina como suplemento en alimento para pollos se observó que a dosis de 0.2% incrementaba el crecimiento, sin embargo, este efecto no se logró encontrar cuando se adicionó putrescina al alimento para truchas, ya que aparentemente la putrescina era oxidada

antes de ser asimilada. La falta del efecto de esta amina se atribuye a la enzima diamino-oxidasa y siendo el paso del alimento más largo en truchas (36 horas) que en pollos (4 horas), hay más tiempo para oxidarla (Cowey y Cho, 1992).

Se ha detectado que la putrescina, espermidina y espermina son necesarias para el crecimiento de la mucosa intestinal, el desarrollo normal, maduración y adaptación, como también en la recuperación de daños en el intestino (Stuck *et al.*, 1992). Además se ha comprobado que la mucosa del intestino puede ser estimulada por la putrescina por la etilamina y por la dietilamina (Grant *et al.*, 1989).

DETECCION

Hasta la fecha las aminas biogénicas se han utilizado como un parámetro de referencia a fin de conocer la calidad de productos tales como la harina de pescado, esto debido a la relación directa que existe entre la cantidad y variedad de estas aminas y el estado detrimental de pescados y mariscos (Zaldivar, 1992; Castro, 1992; Balconi, 1991).

Existen una gran cantidad de métodos y técnicas utilizadas para la detección, identificación y determinación de aminas biogénicas entre las cuáles destacan: electroforesis (Raina, 1963), HPLC/detección por fluorescencia (Samejima *et al.*, 1976), cromatografía líquida (Cohen *et al.*, 1969), cromatografía de gas (Smith, 1970), analizador de amino ácidos (Fujita *et al.*, 1980) y métodos inmunoquímicos (Quash *et al.*, 1973), espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN).

METODO DE EXTRACCION PREPARATIVA

El método de separación de las poliaminas para su obtención se divide en dos fases. La primera consiste en realizar una hidrólisis a alta temperatura con ácido clorhídrico 0.6N seguida de una neutralización con Hidróxido de Sodio o bien una hidrólisis con Hidróxido de Potasio seguida de una neutralización con Acido Clorhídrico. Como segunda fase el

procedimiento más común después de la hidrólisis es la extracción de las poliaminas con n-Butanol seguida de la evaporación del solvente y la disolución del residuo en un buffer acuoso (Haaland *et al.*, 1990).

Otro método propuesto consiste en una desproteización con Acido Sulfosalicilico seguida de una hidrólisis en presencia de Hidróxido de Bario, para después neutralizar el hidrolizado con Acido Sulfúrico, se forma Sulfato de Bario insoluble (esto propicia que la solución tenga una fuerza iónica elevada). El Sulfato de Bario precipita, coprecipitando otros compuestos, entre estos las poliaminas, entonces y para evitar este problema, se deja el precipitado toda la noche antes de tomar el sobrenadante. Este tipo de técnicas se utilizan para aislar las poliaminas en orinas, suero y plasma (Adler *et al.*, 1977).

Suzuki *et al.*, (1994) describen un método para la extracción de aminas biogénicas a partir del arenque fresco (*Clupea pallasii*), el cual es almacenado en una secadora a una temperatura de 15 a 20°C. La extracción se lleva a cabo mezclando el músculo con cuatro volúmenes de Acido Tricloroacético (10%), homogenizando y centrifugando a 700 g. durante 20 minutos.

ATRACTANTES

Como ya se mencionó, en lo referente a la investigación sobre atractantes, se ha venido trabajando básicamente con dos aproximaciones, la primera que implica la utilización de extractos orgánicos y la segunda en la cual se emplean, bajo diferentes metodologías, moléculas puras, previamente identificadas.

EXTRACTOS ORGANICOS

Los estimulantes del comportamiento alimenticio para organismos acuáticos son frecuentemente obtenidos mediante la preparación de extractos acuosos de los organismos que ingieren normalmente.

Dentro de la amplia gama de extractos de organismos acuáticos probados como atractantes, cabe mencionar en particular las series experimentales desarrolladas con extractos de moluscos, crustáceos y otros organismos, como se ilustra en la Tabla 5.

Entre los extractos de moluscos, aquellos que han despertado mayor interés se encuentran los realizados a partir del calamar, el cual ha resultado fuertemente atractivo tanto para crustáceos como para peces. Cabe observar que entre los componentes dominantes de dicho organismo se encuentran algunos amino ácidos, aminas terciarias y TMAO (Mackie, 1973; Takei, 1977).

Por otra parte, en lo que respecta a extractos realizados a partir de crustáceos, estos han llegado a evocar respuestas del mismo orden de magnitud que la de los moluscos. (Carr, 1984).

Se han identificado tres características importantes de los estímulos alimenticios presentes en los extractos:

- a) Los estimulantes más potentes son metabolitos comunes de bajo peso molecular (aminoácidos, compuestos cuaternarios de amonio, nucleótidos y ácidos orgánicos).
- b) Especies diferentes pueden responder a diferentes sustancias presentes en un mismo extracto.
- c) La estimulación del comportamiento alimenticio de la mayor parte de los extractos se debe a una mezcla de sustancias más que a una sustancia dominante.

Como grupo estas sustancias son solubles en agua y se presentan de manera ubicua en los tejidos a concentraciones mayores que las presentes en el medio ambiente.

Tabla 5.- Resumen de los bioensayos realizados con extractos de moluscos y crustáceos.

GRUPO	EXTRACTO	ESPECIE	RESUL.	MOLECULAS	AUTOR
Molusco	Alcoholosoluble de calamar	<i>Erimacrus isenbekii</i>	positivo	Ac. glutámico, glicina, prolina, betaína, taurina	Takei, 1977
Molusco	Alcoholosoluble de calamar	<i>Homarus gammarus</i>	positivo	N.I.*	Mackie y Shelton, 1972
Molusco	Extracto de bivalvo, <i>Perna canaliculus</i>	<i>Penaeus esculentus</i>	negativo	N.I.	Wassenberg y Hill, 1987
Molusco	Ext. de <i>Mytilus edulis</i> (fracc. de bajo M.W.)	<i>Homarus americanus</i>	positivo	N.I.	Derby, 1984
Molusco	Ext. de <i>Mytilus edulis</i> (fracc. de alto M.W.)	<i>Homarus americanus</i>	negativo	N.I.	Derby, 1984
Molusco	Mezcla sintética de calamar	Salmones y Turbots	positivo	N.I.	Mackie, 1973b
Molusco	Extracto de calamar	<i>Homarus gammarus</i>	positivo	prolina, glicina, alanina, arginina	Mackie, 1973a
Molusco	Extracto de calamar	Turbots	positivo	Inosina	Mackie y Adron, 1978
Molusco	Ensilado de vísceras de abulón	<i>Haliotis fulgens</i>	positivo	N.I.	Viana <i>et al.</i> , 1994
Molusco	Caracoles en descomposición	Cangrejo hermitaño	positivo	N.I.	Rittschof, 1980
Molusco	Extracto de ostras	<i>Logodon rhomboides</i>	positivo	betaína	Carr <i>et al.</i> , 1977
Crustáceo	Extractos de jaiba y camarón	<i>Palaemonetes pugio</i>	positivo	glicina	Carr y Derby, 1986
Crustáceo	Extracto de jaiba	<i>Palaemonetes pugio</i>	positivo	glicina	Carr <i>et al.</i> , 1984
Crustáceo	Ext. del camarón <i>Metapeneus benattae</i>	<i>Penaeus esculentus</i>	positivo	N.I.	Hill y W. 1987
Crustáceo	Extracto de krill <i>Euphausia superba</i>	<i>Pagrus major</i>	positivo	N.I.	Shimizo, <i>et al.</i> 1990
Crustáceo	Extracto de cabeza de Camarón <i>P. monodon</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	positivo	N.I.	Holland y Borski, 1993

* N.I.= Las moléculas que componen el extracto fueron No Identificadas.

MOLECULAS PREVIAMENTE IDENTIFICADAS

Entre los estudios realizados para determinar el potencial de atracción de moléculas previamente identificadas, se han reportado algunas sustancias de bajo peso molecular que pueden ser utilizadas como atractantes en el alimento de crustáceos decápodos, dentro de las cuales destacan los aminoácidos, nucleótidos, sales cuaternarias y algunos azúcares, entre otros.

AMINOACIDOS

Los aminoácidos libres son abundantes como osmolitos en los tejidos de todos los invertebrados acuáticos, los cuales constituyen la dieta principal de los crustáceos omnívoros. Debido a que los aminoácidos se difunden rápidamente de las presas muertas, ellos probablemente determinan la frescura de los tejidos (Zimmer-Faust, 1987).

De la misma manera que en los extractos, la acción de los aminoácidos es sinérgica, ya que estos resultan más efectivos en forma conjunta que cuando se usan por separado (Heinen, 1980).

Por otra parte, en el caso de los bioensayos con aminoácidos, las generalizaciones resultan delicadas puesto que en la mayor parte de los casos sólo se han probado algunos aminoácidos y eso únicamente con ciertas especies, lo cual implica el desconocimiento sobre el potencial de la mayor parte de los aminoácidos.

En la Tabla 6 se suman algunas series experimentales que denotan la eficacia de algunos aminoácidos en particular.

Tabla 6.- Resumen de los bioensayos realizados con amino ácidos como atractantes alimenticios endiferentes especies..

AMINOACIDOS	ORGANISMO	RESULTADO	AUTOR
L-Glutámico Glicina, Taurina	Crustáceos Decápodos	positivo	Heinen, 1980
Arginina, Lisina Taurina	<i>Homarus americanus</i>	positivo	McLeese, 1970
Arginina, Alanina	<i>Ostrina sp.</i>	positivo	Beck y Hanec, 1958 ^a
Lisina, Arginina	<i>Penaeus merguensis</i>	positivo	Hindley, 1975
Taurina, Glicina Arginina	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	positivo	Harpaz <i>et al.</i> 1987
Taurina, Prolina Arginina, Glicina Alanina	<i>Pleuronectes platessa</i>	positivo	Mackie, 1980
Arginina	<i>Palaemon elegans</i>	positivo	Kurmaly, 1990
Glicina	<i>Cambarus sp.</i> <i>Panulirus sp.</i>	positivo	Hodgson, 1958
Arginina, Lisina Taurina	<i>Orconectes limosus</i>	positivo*	Hatt, 1984
Arginina	<i>Penaeus japonicus</i>	positivo	Kitabayashi <i>et al.</i> , 1971 ^b
Arginina	<i>Homarus americanus</i>	positivo	Carter y Steele, 1982 ^b
Arginina	<i>Penaeus japonicus</i>	positivo	Nakamura, 1987 ^b
Lisina	<i>Homarus americanus</i>	positivo	Carter y Steele, 1982 ^b
L-Isoleucina, Glicina Hidroxi-L-Prolina L-Glutamato, L-Valina	<i>Orconectes virilis</i>	positivo	Tierney y Atema, 1987
Glicina, L-Glutamato	<i>Orconectes rusticus</i>	positivo	Tierney y Atema, 1987
Glicina, Taurina	<i>Panulirus argus</i>	positivo	Derby y Atema, 1988
L-Arginina Taurina	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	positivo*	Derby y Harpaz, 1988
Hidroxi-Prolina Taurina	<i>Homarus americanus</i>	positivo*	Voight y Atema, 1992
L-Glutamato, Taurina Hidroxi-L-Prolina L-Arginina	<i>Homarus americanus</i>	positivo*	Coroto, <i>et al.</i> 1992
L-Glutamato L-Aspartato, L-Arginina, Glicina Taurina, L-Alanina	<i>Homarus americanus</i>	positivo*	Derby y Atema, 1981

* bioensayos realizados mediante técnicas eletrofisiológicas.. ^a citados por Lindstedt, 1971. ^b citados por Lee y Meyers, 1995.

REQUERIMIENTOS ESTRUCTURALES

Según Bauer *et al.*, (1981) los requerimientos estructurales de los aminoácidos para estimular los receptores presentes en los pereiópodos de la langosta de agua dulce (*Austropotamobius torrentium*) son los siguientes:

- a) Los grupos aminos y carboxilos son esenciales
- b) Las formas L son más efectivas que las formas D.
- c) Los α -aminoácidos son más efectivos que los β y los γ .
- d) Los aminoácidos con más de 5 átomos de carbono presentan menos efecto attractante.

Por otra parte, Hatt (1994) menciona que las moléculas carentes de un grupo amino a carboxilo son inefectivas para estimular una respuesta a células del *Orconectes*. Además coincide con Bauer *et al.* (1981) en que las formas L son más efectivas que las formas D y el remplazo de los grupos α -Hidrógeno por un grupo metilo reduce la efectividad de atracción. En adición, sugiere que para que exista una mayor efectividad los aminoácidos no deben de poseer más de 3 átomos de carbono.

DOSIS

Los datos de niveles óptimos de algunos aminoácidos y las consideraciones de costo sugieren que las concentraciones apropiadas de quimioattractantes sean de 1% ó menos (Heinen, 1980).

OTRAS MOLECULAS

Además de los estudios realizados con aminoácidos, se han probado con buenos resultados otras moléculas tales como nucleótidos, compuestos cuaternarios de amonio, compuestos nitrogenados, azúcares y otras moléculas. En la Tabla 7 se destacan los resultados obtenidos en bioensayos realizados con Betaína, Trimetilamina y los nucleótidos ATP, ADP, etc., observándose en la mayoría de los casos que los compuestos más degradados funcionan mejor como atractantes que los compuestos con alta carga energética.

Tabla 7.- Bioensayos realizados en los cuales se probaron diferentes moléculas como atractantes alimenticios de organismos acuáticos..

GRUPO	MOLECULA	ORGANISMO	RESULTADO	AUTOR
Nucleótido	Monofosfato de Adenosin 5' (AMP)	<i>Palaemonetes pugio</i>	positivo	Carr y Thompson, 1983
Nucleótido	Trifosfato de Adenosina	<i>Palaemonetes pugio</i>	negativo	Carr y Thompson, 1983
Nucleótido	(IMP) Inosina 5' Monofosfato	<i>Scophtalmus maximus</i>	positivo	Mackie y Adron, 1978
Nucleótido	(ATP) Adenisina Trifosfato	<i>Panulirus sp.</i>	positivo	Zimmer-Faust, 1987
Nucleótido	(AMP) Adenosina monofosfato	<i>Paniluris sp.</i>	negativo	Zimmer-Faust, 1987
Nucleótido	Xantina AMP y Citosina	<i>Haliotis discus</i>	positivo	Harada, 1986
Nucleótido	IMP, AMP	<i>Palaemon elegans</i>	positivo	Kurmaly <i>et al.</i> , 1990
C.C. de A.	Betaína y Trimetilamina	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	positivo*	Harpaz, <i>et al.</i> , 1987
C.C.de A.	Betaína	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	positivo*	Harpaz y Stainer, 1990
C.C.de A.	Betaína	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	negativo	Sick, 1976
C.C. de A.	Betaína	<i>Negaprion brevirostris</i>	positivo	Hodgson y Mathewson, 1976
C.C. de A.	Betaína	<i>Lagodon rhomboides</i>	positivo	Carr y Chaney, 1975
C.C. de A.	Betaína, Cloruro de Amonio	<i>Homarus americanus</i>	positivo	Corotto, <i>et al.</i> 1992

C.C. de A.	Betaina	<i>Orconectes limosus</i>	positivo	Hatt, 1984
C.C. de A.	Betaina	<i>Lagodon rhomboides</i>	positivo	Carr y Chaney, 1975
C.C. de A.	Betaina	<i>Panulirus argus</i>	positivo	Derby y Atema, 1988
C.C. de A.	Betaina	<i>Palaemonetes pugio</i>	positivo	Carr, 1978 ^a
C.C. de A.	Betaina	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	positivo	Derby y Harpaz, 1988 ^a
C.C. de A.	TMAH	<i>Macrobrachium rosebergii</i>	positivo	Costa-Pierce y Laws, 1985
C.C. de A.	TMAO	<i>Cambarus sp.</i>	positivo	Hodgson, 1958 ^b
C.C. de A.	TMAO	<i>Palaemon elegans</i>	positivo	Kurmaly <i>et al.</i> , 1990
C.C. de A.	Urea	<i>Penaeus margiensis</i>	negativo	Hindley, 1975
Azucar	Celobiosa, Sucrosa y Maltosa	<i>Orconectes rusticus</i>	positivo	Tierney y Atema, 1987
Azucar	Maltosa, Dulcitol y Filodulina	<i>Haliotis discus</i>	positivo	Harada <i>et al.</i> , 1994
A.B.	Putrescina	<i>Orconectes rusticus</i>	positivo	Tierney y Atema, 1987
O.M.	Sal sintética	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	positivo	Derby y Harpaz, 1988

C.C. de A.: Compuestos Cuaternarios de Amonio.

*Resultados obtenidos mediante técnicas electrofisiológicas

^a citados por Lee y Meyers, 1995

^b citados por Lindstedt, 1971

La anterior síntesis bibliográfica nos muestra que existen moléculas afines las cuáles inducen respuestas similares a una gran diversidad de organismos. La mayoría de estas moléculas que actúan como atrayentes juegan un papel importante en los procesos tanto de descomposición como de excreción en los organismos acuáticos.

SISTEMAS UTILIZADOS

Los estudios de laboratorio para estimar la quimiorrecepción incluyen diferentes diseños en tanques, acuarios y otros recipientes en donde los organismos se someten a uno o varios estímulos químicos mediante una gran diversidad de formas (McLeese, 1973; Carter y Steele, 1982; Zimmer-Faust, 1991; Bonefield y Aldrich, 1991; Costero y Meyers, 1993; Holland y Rusell, 1993).

Aunado a los sistemas anteriores se han venido desarrollado sistemas para el estudio de quimiorrecepción a través de técnicas electrofisiológicas (Derby y Atema, 1981).

A continuación se describen algunos de estos sistemas.

El uso de laberintos en "Y" (Y-mazes) o cámaras de opción múltiple elimina la posibilidad de que los animales respondan exclusivamente a la corriente, ya que el flujo en ambos brazos está balanceado de tal manera que solo varía en presencia o ausencia del estímulo químico, tal es el caso de los dispositivos utilizados por Borowski *et al.*, (1987) y Borowsky (1989) para observar las respuestas de los machos a las secreciones de hembras receptoras y no receptoras del anfípodo *Microdiutopus grillatalpa*. (Figuras 6AyB).

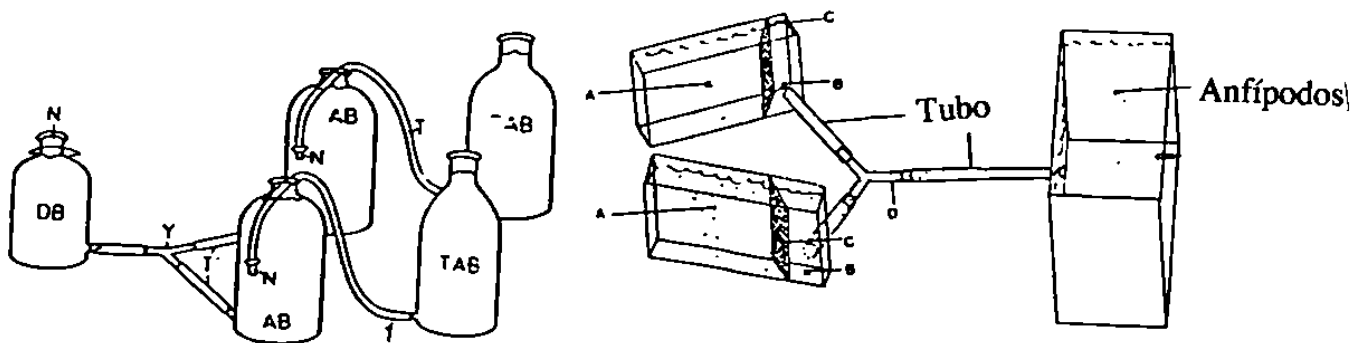


Figura 6.- Sistemas propuestos para observar la respuesta de los machos a las secreciones de hembras tanto receptoras como no receptoras del anfípodo *Microdiutopus grillatalpa*. A) Borowsky, *et al.*, (1987) y B) Borowsky (1989).

Otro de los sistemas utilizados esta representado por acuarios que presentan un flujo determinado de agua y barreras opacas con la intención de que los organismos no tengan contacto visual entre ellos (Fig. 7). Este tipo de sistema es utilizado para demostrar la presencia de feromonas u otro tipo de moléculas en el agua, secretadas por un individuo en un lado del tanque y percibida por otro organismo en el lado opuesto.

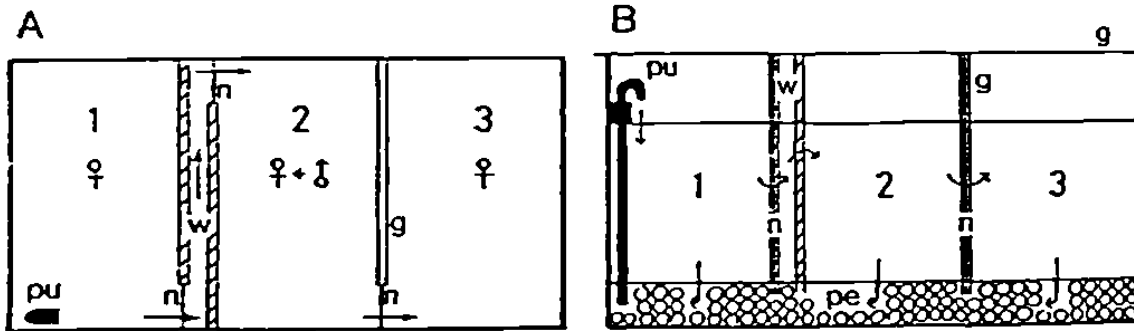


Figura 7.- Vista superior (A) y Lateral (B) del sistema propuesto por Takayanagi, *et al.*, (1986) para determinar la presencia de una feromona en machos del camarón de agua dulce, *Paratya compressa*.

Por otro lado, se han diseñado dispositivos para observar la atracción de postlarvas de camarón hacia una determinada calidad de agua, específicamente del factor de salinidad (Fig. 8). Este dispositivo cuenta con barras separadoras que dividen los tipos de agua a probar y se determina cual de estos presenta mayor atracción para los organismos utilizados.

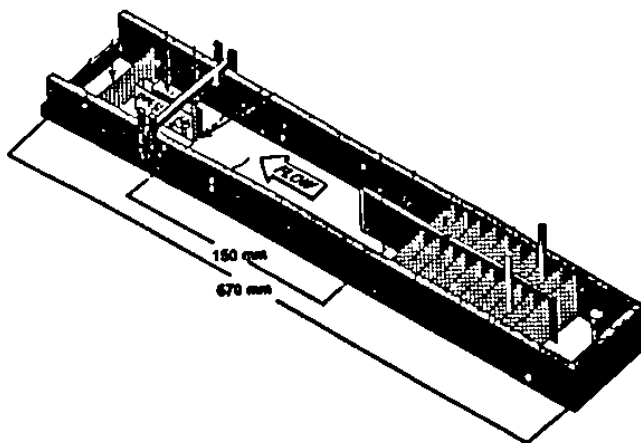


Figura 8.- Dispositivo utilizado para observar la atracción a postlarvas de camarón por diferentes tipos de agua.

Sistemas más simples (Fig. 9 A y B) son utilizados para observar la preferencia de los organismos hacia un determinado estímulo (Glesson, 1990; Harada *et al.*, 1994). Generalmente en este tipo de sistemas se cuantifica el número de organismos que llegan a la fuente del estímulo en un determinado tiempo.

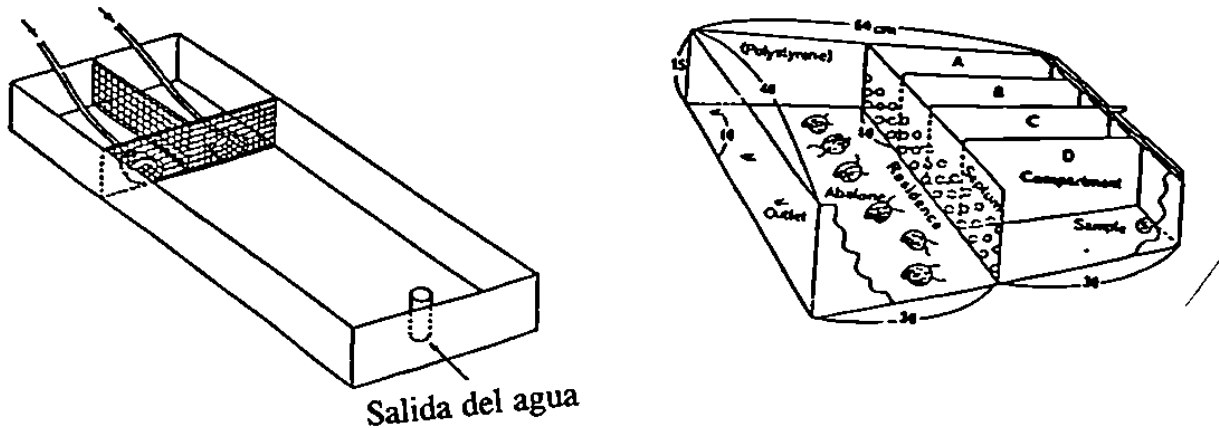


Figura 9.- Sistemas propuestos para observar preferencias hacia un determinado estímulo. (A) propuesto por Gleeson, (1990) para jaibas (*Callinectes sapidus*) y (B) propuesto por Harada, *et al.*, (1994) para el abulón negro (*Heliotis sp.*).

Otro tipo de diseño es el propuesto por Costero y Meyers (1991a) para observar la respuesta del comportamiento alimenticio de *Penaeus vannamei*, el cual implica la utilización de acuarios de 1.25 X 25 X 50 cm con flujo de agua de un extremo hacia el otro. Dicho acuario presenta una división removible de cristal en uno de los extremos lo cual permite inmovilizar al ejemplar mientras el atrayente es colocado al otro extremo del mismo (Fig. 10). En este tipo de ensayos se mide el tiempo que tardan en llegar al alimento con atrayente y si este es ingerido o no.

Como indica la Figura 11, los experimentos electrofisiológicos se realizan disectando los apéndices en los cuales se localizan presumiblemente los quimiorreceptores, éstos son colocados en un dispositivo especial dividido en dos partes, una área en la cual se lleva a cabo el contacto de los quimiorreceptores con el estímulo y la segunda en donde se encuentran los nervios que transmiten los impulsos a un amplificador que registra las respuestas a los estímulos (Derby y Atema, 1981).

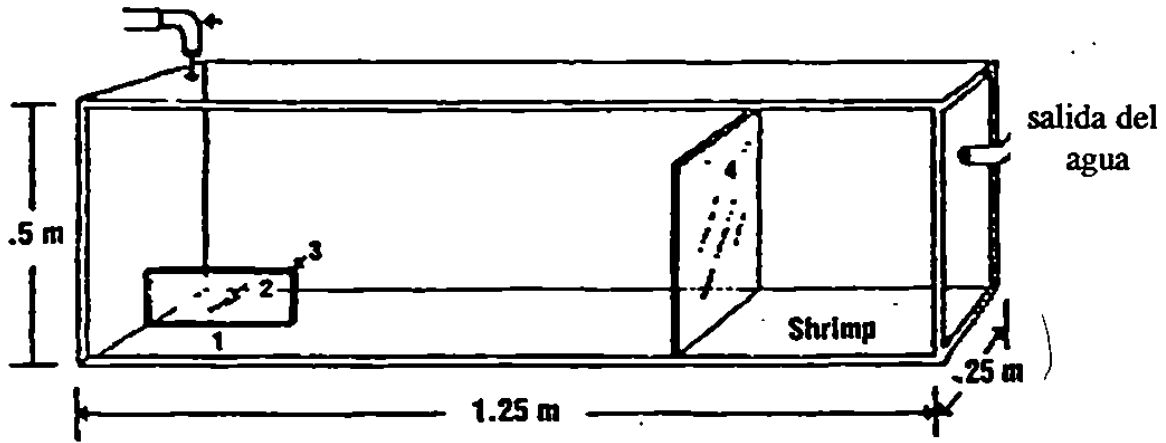


Figura 10.- Diseño utilizado por Meyers y Costero (1991a) para observar la quimiorrección en *Penaeus vannamei*.

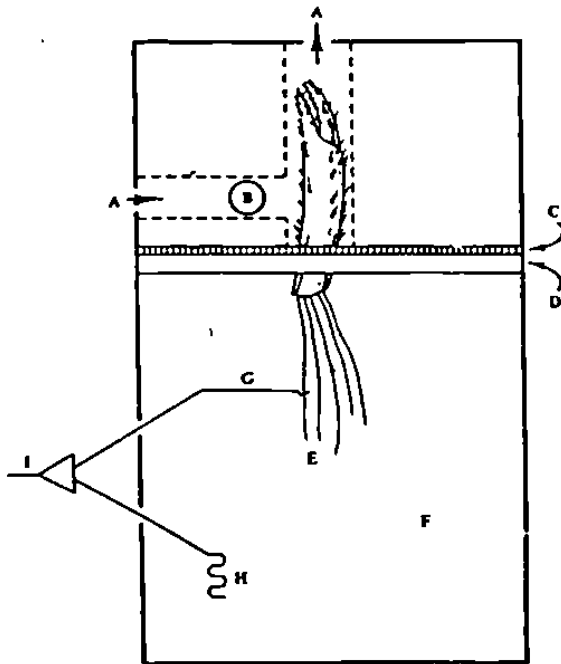


Figura 11.- Diagrama del dispositivo utilizado para técnicas electrofisiológicas.

SISTEMAS DE MONITOREO

Se recomienda el empleo de sistemas de monitoreo por televisión para observar las respuestas que presentan los organismos a diferentes estímulos y/o para medir las preferencias hacia determinado alimento (Hill y Wassenberg, 1987; Harpaz y Steiner, 1990). Lo anterior representa ventajas tales como una reducción en el stress inflingido al organismo utilizado y, por otro lado, facilita la detección de las diferentes fases comportamentales que presentan y el tiempo preciso en que se realizan.

ESTADO NUTRICIONAL

En términos generales, es recomendable trabajar con organismos sometidos a un período previo de ayuno que va de 24 horas hasta varios días, esto con la finalidad de acentuar las respuestas y evitar cualquier tipo de acondicionamiento hacia alguna dieta en particular (Costero y Meyers, 1993a).

Por otra parte, se pueden presentar cierto condicionamiento ingestivo debido a factores preingestivos (gusto, textura, forma del pellets, etc.) o postingestivos (digestibilidad, asimilación o valor nutricional) (Lee y Meyers, 1995). La mayor parte de las investigaciones sobre el comportamiento ingestivo se han enfocado a los efectos de la inanición. La privación del alimento antes de una prueba tiene un efecto directo en el umbral de detección, mientras que la adaptación a los químicos asociados con el alimento pueden resultar con la reducción en el consumo (Kurmary *et al.*, 1990).

ALTERNATIVAS DE INCORPORACION DE ATRACTANTES EN EL ALIMENTO

La forma de suministro de los atractantes a probar varía de acuerdo al sistema utilizado, así se pueden incorporar de las siguientes formas:

1) Incluidos en el alimento

- a) inclusión en el alimento antes de procesarlo;
- b) inclusión en el alimento (aspersión) después de procesarlo;
- c) inclusión en el alimento justo antes de ser ofrecido a los animales.
- d) inclusión en el estanque al mismo tiempo que se ofrece el alimento (Lee y Meyers, 1995).

2) Ser agregados directamente al acuario en forma líquida.

FACTORES CRITICOS EXPERIMENTALES

Lee y Meyers (1995) sugieren algunos factores críticos experimentales que afectan los resultados de los estudios de quimiorrepción y los enlistan como sigue:

- ♦ Se debe de utilizar un dispositivo experimental que asegure que los estímulos externos, visuales o mecánicos no interfieran con la percepción y respuesta de los estímulos químicos.
- ♦ Un protocolo experimental que minimice los efectos del observador. Son preferibles los experimentos a ciegas en los cuales los tratamientos y los químicos esten codificados y es importante que el bioensayo sea registrado en video para su análisis posterior.
- ♦ El uso de animales individuales en las primeras etapas de identificación de los atractantes y estímulos alimenticios es ampliamente recomendado. Las etapas subsecuentes, tales como estudios en campo pueden incluir poblaciones animales para evaluar la aplicación práctica de los quimioatractantes y estimulantes.
- ♦ La utilización de concentraciones adecuadas del estímulo químico a probar puede evitar la rápida habituación de los quimiorreceptores.

- La estandarización o definición de respuestas comportamentales específicas que puedan ser medidas cuantitativamente y analizadas estadísticamente.
- Un período de ayuno de 24 horas previo al experimento.
- La utilización de métodos estadísticos apropiados, paramétricos y no paramétricos.

TECNICAS INMUNOLOGICAS

Los estudios enfocados a la identificación del contenido estomacal resultan complicados debido al proceso de digestión, el cual puede transformar a la presa haciendo imposible su estimación mediante un análisis tradicional por microscopía. Por otra parte, en los animales que ingieren solo alimentos líquidos o que necesitan moler sus presas tampoco pueden ser identificadas cuantitativamente sus presas.

Esta problemática puede ser solventada por medio de métodos inmunológicos los cuales se revelan como una alternativa viable para poder detectar proteínas de la presa en el estómago del predador aún después de que se ha llevado a cabo la digestión.

La inmunodifusión en geles ofrece una variedad de técnicas que son utilizadas para el análisis de la interacción de antígenos y anticuerpos. Los principios inmunoquímicos fundamentales son exactamente los mismos que se aplican para interacciones de este tipo en estado líquido. Así, un antígeno puede reaccionar rápidamente con su anticuerpo específico formando un complejo cuya reacción va a depender de las concentraciones y proporciones en que se encuentren tanto los antígenos como los anticuerpos (Bailey, 1984)

IV.- HIPOTESIS:

1) Si las feromonas son capaces de estimular la atracción de los crustáceos, entonces al incluirlas en el alimento es posible que se promueva su ingestión.

2) Si las aminas biogénicas son constituyentes formados durante la descomposición de los cadáveres y los langostinos por su tipo de alimentación resultan atraídos hacia ellos, es posible que al incluirlas en el alimento se acelere su localización e ingestión.

V.- MATERIALES

QUIMIORRECEPCION

Para el bioensayo de quimiorrecepción se utilizaron las siguiente sustancias:

- ♦ Putrescina con pureza no menor del 97% (obtenido en Sigma Company)
- ♦ Cadaverina con pureza no menor del 97% (obtenido en Sigma Company)
- ♦ Orinas extraídas de jaibas azules y langostinos
- ♦ Atractante comercial *Langobuds* (Qualitech), como testigo positivo
- ♦ Extracto hidroalcoholosoluble de calamar (Ex-HAS), como testigo positivo.
- ♦ Alimento base como testigo negativo (Tabla 8)

Además se requirió del siguiente equipo:

- ♦ Acuario de 150 l
- ♦ Bombas de agua
- ♦ Potenciómetro
- ♦ Termómetro

INMUNOENSAYO

Para llevar a cabo la técnica de Inmunodifusión Radial Simple se utilizó el siguiente material y equipo:

- ♦ Animales experimentales (Conejos adultos de la raza New Zealand, peso promedio 2Kg)
- ♦ Jeringa Hamilton 50µl
- ♦ Agarosa tipo C de baja electroendósmosis
- ♦ Buffer Tris 10mM, pH 8.2
- ♦ Mezcla de coloración (azul de Coomassie (5g)/Acido acético/ETOH/agua: 10:35:55)
- ♦ Mezcla decolorante (Acido acético/ETOH/Agua: 10:35:55).
- ♦ Solución salina (NaCl 0.14 M)

METODOLOGIA

EXTRACCION DE FEROMONAS DE LANGOSTINO

La extracción de las feromonas sexuales de langostino implica como un primer paso la identificación de las hembras en estadio precopulatorio. Para este efecto un grupo de 10 individuos de langostinos de ambos sexos mantenidos en condiciones adecuadas (temperatura de 25-28°C, pH 7.4, alimentación tres veces al día en razón del 3% de su biomasa) fueron identificados mediante la técnica propuesta por Amir y Raanan (1985). Dicha técnica se basa en el examen externo del desarrollo gonadal de las hembras y el comportamiento típico reproductivo de los machos que es llevado a cabo sólo cuando las hembras son receptivas. Durante el desarrollo gonadal los ovarios crecen desde la parte posterior del cefalotórax y el desarrollo completo es fácilmente identificable a través del caparazón como una masa color naranja ocupando una gran porción del cefalotórax, aproximadamente desde el corazón hasta la base del rostrum (Fig. 12). Es durante esta última fase en la cual las hembras comienzan a liberar las feromonas sexuales con el fin de atraer a los machos y llevar a cabo la cópula después de la muda, la cual ocurre en un promedio de 5 a 6 días.

Considerando lo anteriormente descrito, las hembras que presentaban estas características fueron colectadas y sacrificadas con el fin de extraerles la glándula de la orina. Las glándulas fueron homogenizadas y centrifugadas a 4,200 r.p.m. durante 20 minutos, el sobrenadante fué congelado para su posterior utilización.

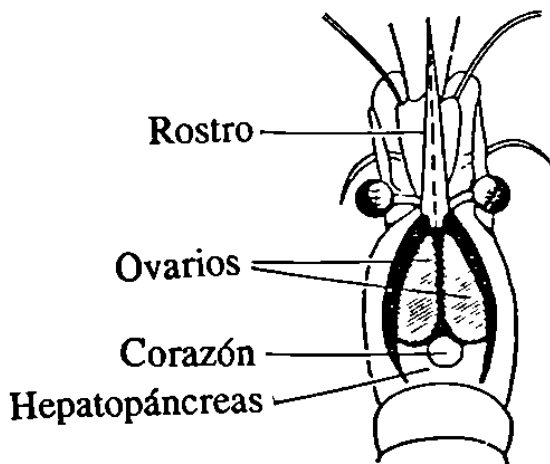


Figura 12.- Vista dorsal del cefalotórax de una hembra de langostino con desarrollo completo de los ovarios.

OBTENCION DE FEROMONAS DE JAIBA

La extracción de la orina de la Jaiba *Callinectes sapidus* fué realizada en el Laboratorio Whitney de la Universidad de Florida, por el Dr. Richard Gleeson, siguiendo la metodología propuesta por él mismo (1984). Dicha metodología se basa en la extracción de la orina de hembras púberes, que ha sido identificada como la vía de liberación de las feromonas. La recolección se ejecuta por aspiración directa de los poros de la glándula antenal, por medio de una pipeta Pasteur modificada. La orina colectada es inmediatamente congelada y almacenada hasta obtener la cantidad necesaria para llevar a cabo los bioensayos.

PRESENCIA DE FEROMONAS EN LAS ORINA

Para comprobar la presencia de la feromona en la orina se llevaron a cabo bioensayos preliminares en acuarios en los cuáles se pusieron en contacto muestras de orinas con machos adultos de jaibas y langostinos observando la eventual respuestas de excitación entre los mismos.

Para esto, fueron añadidos al acuario en el cual se habían colocado langostinos machos "detectores"², 300ml de la orina de jaiba (Gleeson *et al.*, 1987) y se observó la respuesta provocada. Después de 24 horas se llevó a cabo un cambio parcial de agua (50%) y se añadieron 300ml de orina de langostino para observar igualmente la respuesta.

La misma metodología se utilizó en acuarios conteniendo ejemplares machos en estado receptivo de la jaiba *Callinectes sapidus*.

² Machos "detectores" de langostinos son aquellos que presentan dominancia en la población y se caracterizan principalmente por poseer pinzas de color azul brillante.

A fin de corroborar que la respuesta observada fué ocasionada exclusivamente por la presencia de feromonas, se utilizaron otros tipos de estímulos tales como:

- a) agua acuario libre de crustáceos
- b) trozos pequeños de músculo de langostino y de jaiba
- c) agua salada y dulce en los acuarios de langostino y jaiba respectivamente.

Las observaciones realizadas demostraron la presencia de las feromonas en ambos casos ya que sólo cuando se les agregaba la orina los machos de ambas especies exhibían comportamientos precopulatorios.

En el caso de las jaibas, los machos se levantaban y caminaban sobre las puntas de sus apéndices posteriores, extendiendo las quelas anteriores (Fig. 13), mientras movían rápidamente sus apéndices bucales y las antenas.

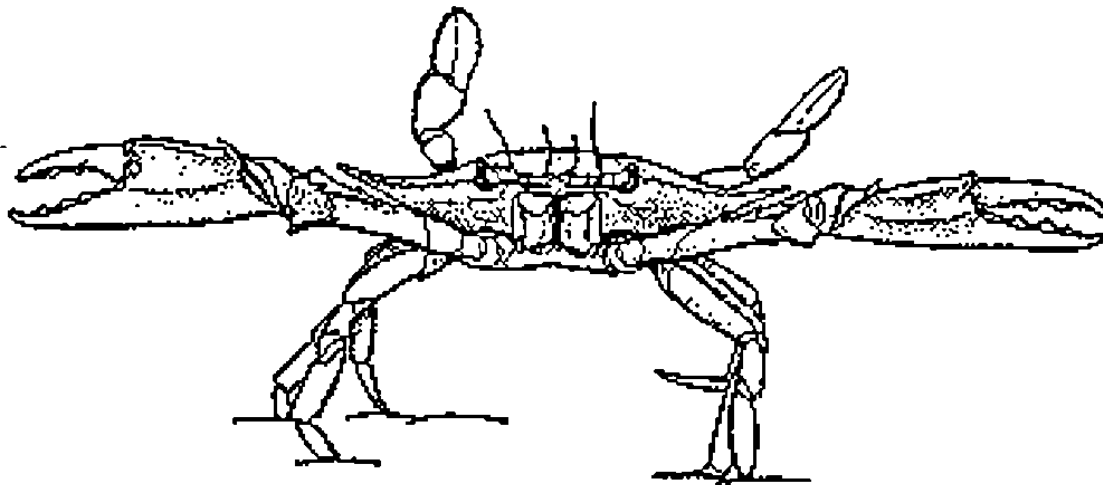


Figura 13.- Posición característica de los machos de jaiba *Callinectes sapidus* al percibir las feromonas sexuales en el medio ambiente (Glesson, 1990).

Los langostinos mostraban una posición similar (Fig. 14), dejando un hueco entre sus apéndices, el cual sirve para albergar a las hembras. Las antenas eran movidas rápidamente a manera de látigos.

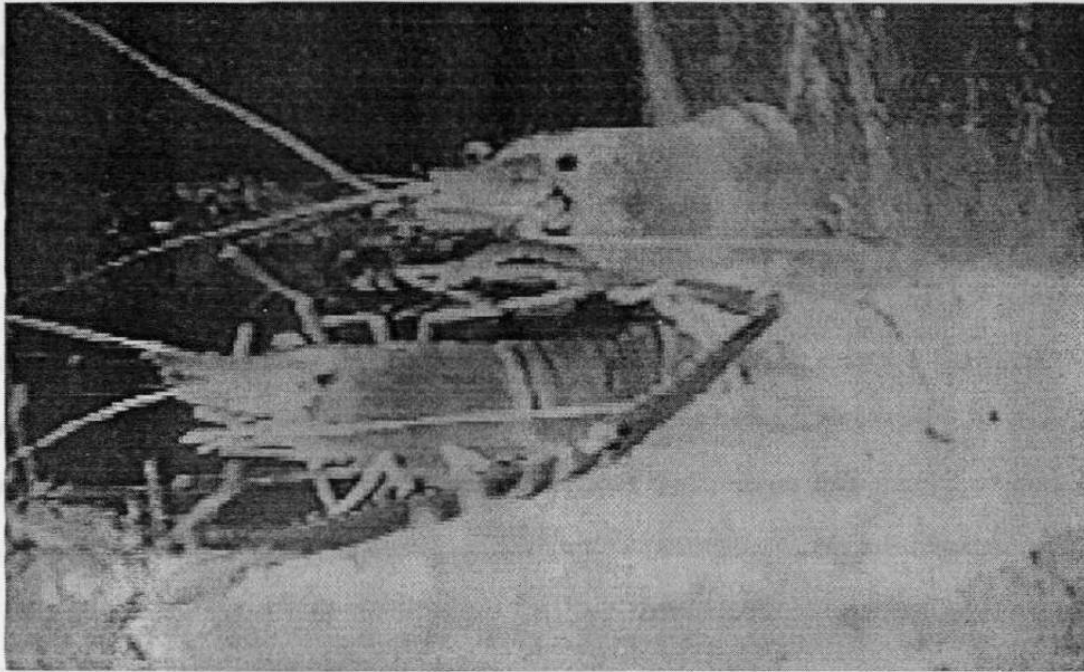


Figura 14.- Posición de cortejo de los machos del langostino *Macrobrachium rosenbergii*.

Cuando se utilizaron trozos de músculo de langostino y jaiba, estos fueron detectados y en algunas ocasiones consumidos, pero los ejemplares no mostraban comportamiento copulatorio y cuando los estímulos fueron agua de otros acuarios o con otro tipo de salinidad los ejemplares no mostraron ninguna reacción.

Tomando en cuenta las observaciones preliminares anteriores se consideró que la orina tanto de langostino como de jaiba contenían feromonas por lo cual estas fueron usadas como atractantes agregándose al alimento de base tal y como se especifica en la metodología de los bioensayos de quimiorrepción.

OBTENCION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLOSOLUBLE DE CALAMAR (EX-HAS).

El extracto hidroalcoholosoluble de calamar fué obtenido mediante la utilización del método de Bligh and Dyer (1959) cuyo principio reside en la utilización de una mezcla que comprende un alcohol para desnaturalizar las proteínas y romper las sinapsis, un solvente orgánico para retener los lípidos, y agua para solubilizar los componentes no lipídicos. La mezcla original de este método (metanol-cloroformo-agua) no se adoptó debido a la alta toxicidad de estos solventes, sobre todo cuando son utilizados para extracciones preparativas. En su lugar empleamos una mezcla de etanol-diclorometano-agua en razón de sus polaridades cercanas y principalmente porque este sistema ha sido ya objeto de una comparación con el precedente para la extracción de lípidos de tejidos de otros organismos marinos (Benninger, 1982) y se reveló más eficiente a nivel del rendimiento (99.5% vs 95.7% para hígado de salmón). En función de las proporciones utilizadas obtuvimos una interfase constituida por proteínas desnaturalizadas y una mezcla difásica compuesta de una fase hidroalcoholosoluble y de una fase orgánica que contenía lípidos. La fase hidroalcoholosoluble fué la utilizada como testigo positivo en el presente trabajo.

ELABORACION DE LA DIETA BASE

Se preparó la dieta base utilizando los ingredientes que se enlistan en la Tabla 8.

Tabla 8.- Fórmula utilizada para la elaboración del alimento base.

INGREDIENTE	PORCENTAJE EN BIOMASA HUMEDA
Harina de pescado PROESA	5.00
Pasta de soya	30.00
Harina de camarón	4.001
Harina de trigo	55.19
Lecitina	1.830
Aceite de pescado	2.701
Metionina	0.110
Mezcla vitamínica	0.220
Vitamina C	0.025
Monofosfato de sodio	0.923

Todos los ingredientes se molieron finamente utilizando un turbomolino *Pulvex*^R se pesaron de acuerdo a la formulación y se mezclaron en una batidora *Kitchen Aid* modelo K45SS de 5 litros.

Primeramente se mezclaron los macroingredientes (harina de pescado, pasta de soya, harina de camarón y harina de trigo durante un lapso de 20 minutos. Posteriormente se tomo una porción de esta mezcla en un vaso de precipitado de 300 ml para adicionar los microingredientes (mezcla vitamínica, monofosfato de sodio, lecitina, metionina y vitamina C), los cuales se agregaron manualmente hasta homogenizarse para después añadirlos lentamente a la macromezcla. El aceite de pescado se adicionó después de haber añadido a la mezcla los microingredientes. Finalmente se adicionaron 300 ml de agua (por Kg de alimento) hasta obtener una pasta homogénea.

La pasta se pasó por un molino de carne (*Tor-Rey*^R, Mod. 22) con un dado de 2mm de diámetro de orificio, obteniéndose así los pellets, los cuáles fueron secados en una estufa eléctrica (*Shel Lab*^R, modelo 1330FX) durante 8 minutos a 100°C .

BIOENSAYO DE QUIMIORRECEPCION EN ACUARIOS

Se preparó una dieta base como testigo negativo (Tabla 8). En esta dieta se incluyó expresamente un alto porcentaje de soya (30%), lo cual le confiere un efecto antipalatante a la dieta, previamente demostrado en otros organismos acuáticos como peces (Lim y Dominy, 1991) y camarones (Mendoza, *com. pers*).

APLICACION DE ATRACTANTES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los atractantes a probar fueron agregados al alimento de base en una dosis de 0.2%³. la metodología que se utilizó fué similar a la propuesta por Costero y Meyers (1991a). introduciéndose una modificación consistente en eliminar el flujo de agua, debido a que en bioensayos previos se observó que los langostinos presentaban una reacción al estímulo reostático del flujo de agua. Tanto la temperatura como el pH del agua se mantuvieron constantes a 26 +/- 1°C y 7.5-8 respectivamente, ya que se ha demostrado que estos parámetros fisicoquímicos pueden afectar el proceso de quimiorrecepción, tal como lo mencionan Tierney y Atema, (1988) y Lee y Meyers, (1995).

Se utilizó únicamente un solo individuo por prueba debido principalmente a que la presencia de un eventual competidor pudiera potenciar el efecto del atractante e influir en la tendencia de los resultados como lo sugieren Lee y Meyers, (1995).

³ Se utilizó una dosis del 0.2% debido a que es la dosis recomendada para el atractante comercial "Langobuds", siendo esta una buena referencia de comparación.

REGISTRO DE LA PRUEBA: Para cada uno de los tratamientos se registraron los tiempos en que los ejemplares presentaban las diferentes fases de comportamiento alimenticio (Tabla 9), esto es, percepción, orientación, movimiento hacia el estímulo, arribo al alimento e ingestión del mismo, tal y como lo recomiendan Costero y Meyers, (1993b). El test se registró como negativo si no llegaba a presentarse respuesta después de 500 segundos⁴. Después de cada prueba se vaciaron los acuarios y se llenaron con agua fresca que presentaba las mismas características de temperatura y pH. Esto se realizó con la finalidad de evitar que los estímulos dispersos en el agua de un bioensayo anterior afectaran las respuestas de los organismos a los nuevos estímulos.

Tabla 9.- Fases de comportamiento alimenticio de crustáceos decápodos de acuerdo con Costero y Meyers (1993b).

FASE	CARACTERISTICA
Percepción	Detección o reconocimiento de una señal química por las anténulas, maxilípidos y dácilos de los pereiópodos.
Orientación	Cambios de posición del animal en relación a su posición antes del estímulo y apuntando a la fuente del estímulo.
Movimiento	El animal inicia sus movimientos de desplazamiento ya sea en dirección de la fuente del estímulo o en otro sentido.
Arribo al alimento	El animal llega al lugar donde esta la fuente del estímulo y detiene sus movimientos de desplazamiento
Ingestión del alimento	El animal manipula la dieta con sus quelípedos y apéndices maxilares de forma que un número mayor de receptores químicos (de contacto) sean expuestos al estímulo alimenticio

⁴ Se consideró el tiempo de 500 segundos debido a que en bioensayos previos se determinó que después de este tiempo los individuos no cambiaban su comportamiento hacia un estímulo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los atrayentes experimentales probados fueron:

- ♦ Cadaverina
- ♦ Putrescina
- ♦ Orina de langostino
- ♦ Orina de Jaiba azul
- ♦ Testigo positivo - atrayente comercial (*Langobuds^R*)
- ♦ Testigo positivo - extracto hidroalcoholosoluble de calamar

Para confirmar el efecto de atracción sobre los sexos se llevaron a cabo cinco repeticiones para cada tratamiento con hembras y con machos por separado, .

Los ejemplares de langostino utilizados fueron mantenidos en una pileta de fibra de vidrio con capacidad de 1,500 litros. Estos fueron escogidos de manera aleatoria y se colocaron en un acuario limpio 24 horas antes de cada prueba con el fin de estandarizar el tiempo de inanición antes del bioensayo.

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza para determinar las eventuales diferencias entre los tratamientos. En el caso de encontrarse diferencias significativas entre las medias, los tratamientos fueron separados utilizando una prueba de comparación de medias de Tuckey (Zar, 1982).

En el caso particular de las respuestas entre los diferentes sexos se utilizó una prueba "t" de *student* para diferenciar estadísticamente aquel que presentara una mejor respuesta a los atrayentes utilizados.

BIOENSAYO DE INGESTION (A ESCALA COMERCIAL)

Por otro lado se llevaron a cabo dos bioensayos en los cuales se evaluó la ingestión de cada uno de los atractantes en condiciones de cultivo comercial con el fin de probar el poder atractivo y la ingestión de cada dieta en grandes volúmenes de agua y en presencia de otros atractantes naturales. Estos bioensayos se orientaron hacia la observación directa de la ingestión del alimento. El segundo bioensayo fué monitoreado con una técnica inmunológica.

OBSERVACION DIRECTA

Los bioensayos se realizaron en la granja comercial de langostinos "Los Desmontes" ubicada en el Municipio de Tecomán, Colima donde se probaron los mismos atractantes que para la prueba de quimiorrecepción en acuarios. Siendo la única diferencia que dichos atractantes fueron agregados por aspersion al alimento comercial que se utiliza en dicha granja en una dosis de 0.2%.

Descripción del bioensayo

En una jaula de un metro cuadrado se colocaron 10 ejemplares de langostino (5 hembras y 5 machos) con un peso promedio de 20 gramos a los cuáles se les ofrecieron 80 pellets de tamaño uniforme (0.4 cm) en una charola (la cantidad de pellets era equivalente a 6 gramos de alimento) .

Las charolas fueron levantadas a diferentes tiempos (10, 20, 40 y 80 minutos), contabilizándose el número de pellets presente, para que, por diferencia con respecto al número inicial de ellos, se obtuviera el número de pellets consumido a cada tiempo.

METODO INMUNOLOGICO

Con el fin de constatar si efectivamente habia existido ingestión de los pellets con atractantes, se empleó un método inmunológico para determinar cual de los tratamientos resultaba más eficaz. Para esto se elaboró un alimento similar a la dieta base a diferencia que en este se incluyó 25% de suero conteniendo anticuerpos dirigidos contra adultos de *Artemia salina*⁵. Dicho alimento se ofreció de manera similar que en el experimento anterior y después de cada uno de los tiempos fueron colectados 3 organismos a los cuáles se les realizó la disección de los hepatopáncreas que fueron congelados a -20°C para su posterior utilización con el método inmunológico.

La técnica utilizada es la de Inmunodifusión radial simple, para lo cual se prepararon anticuerpos contra proteínas solubles de *Artemia salina* de la siguiente manera:

OBTENCION DE LA PROTEINA

La *Artemia salina* fue homogenizada y solubilizada para la extracción de sus proteínas solubles con las cuáles se llevo a cabo el protocolo de inmunización.

PROTOCOLO DE INMUNIZACION

Una vez obtenido el antígeno se mezcló este con Adyuvante de Freund en una proporción de 1:1 de acuerdo con Pickavance, (1970) y Feller, (1979). La suspensión fué inyectada intradérmicamente (1 ml) a un conejo de raza Nueva Zelanda sin inmunizaciones previas, en buen estado fisiológico y en intervalos de 15 días durante tres ocasiones, como lo sugieren Williams y Chase (1967).

⁵ Se incluyó el suero al alimento debido a la alta proporción que se necesitaba, de tal forma que si se hubiese agregado el antígeno (*Artemia salina*) este podría haber actuado como atractante, enmascarando los resultados de los atractantes a probar.

En un tiempo de aproximadamente 45 días se observó el punto máximo en la producción de anticuerpos, momento en el cual se procedió a precipitar las inmunoglobulinas a partir del suero obtenido. El título resultante en los anticuerpos fue de 1/16.

ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO

Las pruebas de especificidad se realizaron probando los anticuerpos obtenidos (anticuerpos anti-*Artemia salina*) contra los antígenos originales y otros componentes de la dieta tales como harinas de pescado, camarón y trigo, pasta de soya y homogeneizados de intestino de langostino, utilizando el método de doble difusión en agar propuesto por Ouchterlony, (1968). Estas pruebas nos permitieron confirmar la ausencia de reacciones cruzadas y saber que el antígeno reconocía de manera exclusiva a la proteína original.

PREPARACION DE LA PLACA

Se preparó la placa de gel con buffer Tris (Tris 10mM, pH 8.2) y 1% de agarosa en la cual se corrieron las muestras de hepatopáncreas obtenidas en la granja. Dichas muestras se distribuyeron según la Figura 15, dando como resultado una precipitación alrededor de la muestra, cuyo diámetro nos indicaba el consumo de la proteína o alimento (anticuerpo). El diámetro del aro fue el indicador proporcional de la cantidad de proteína detectada en el hepatopáncreas. La placa fue incubada en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente fue colocada en solución salina (0.14M) a fin de favorecer la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo durante un tiempo de 3 horas. El siguiente paso fue secar el gel para posteriormente teñirlo con azul de Commasie durante 2 horas y decolorarlo posteriormente después con una solución decolorante por espacio promedio de una hora. Al final el gel fue secado con aire caliente (40°C) y observado (Mendoza, *comm. pers.*).

Los hepatopáncreas obtenidos en el bioensayo comercial fueron mezclados con la solución Buffer Tris en una proporción de 1:1 con el fin de homogenizarlos y extraer las

proteínas solubles (homogenización y centrifugación a 4°C y 4,200 r.p.m. durante 20 minutos). Posteriormente cada una de las muestras fueron corridas en un gel donde se ubicaban los diferentes tratamientos en cuatro tiempos: 10, 20, 40 y 80 minutos (Fig. 9), esto con la finalidad de observar en una misma placa cual de los tratamientos y en cual tiempo fue consumido la mayor proporción de proteína de la dieta. La cantidad de las muestras colocadas en la placa fué de 5ml.

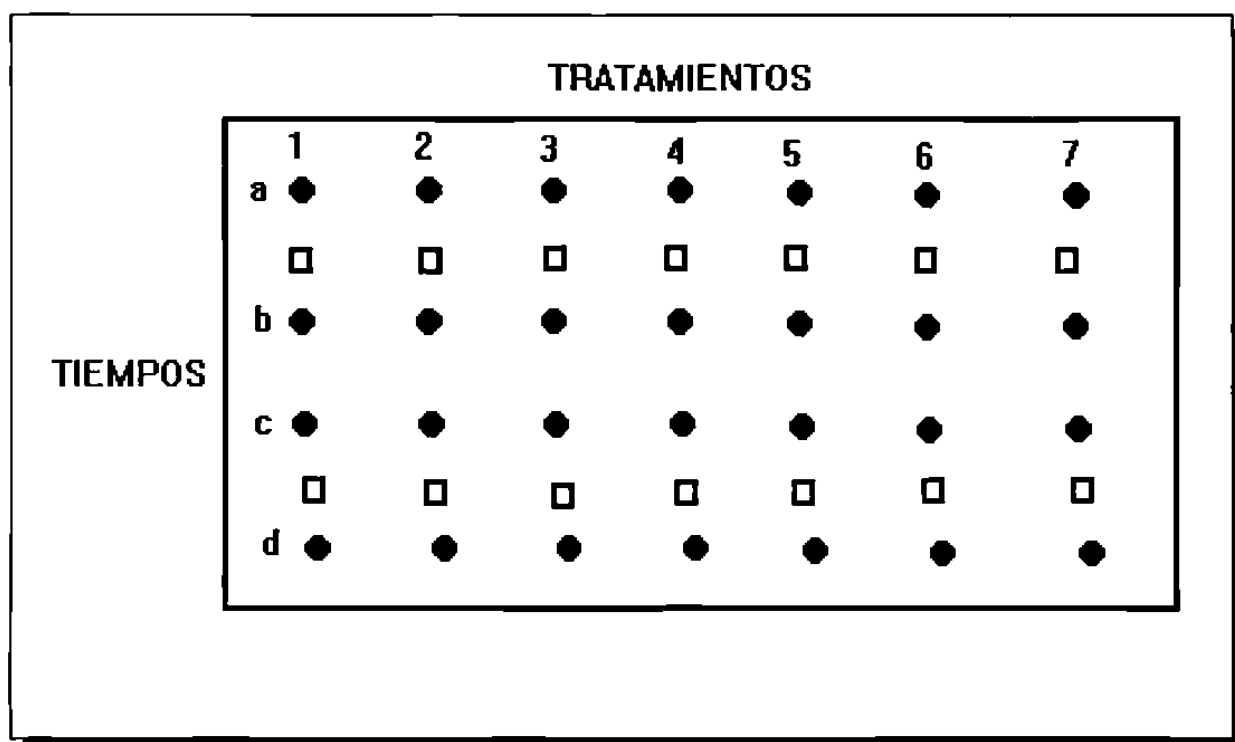


Figura 15.- Placa de gel que muestra la distribución de cada uno de los atrayentes probados, (1) Testigo Negativo, (2) Orina de Jaiba, (3) Orina de Langostino, (4) Langobuds, (5) Ex-HAS, (6) Putrescina y (7) Cadaverina, durante los diferentes tiempos, (a) 10 minutos, (b) 20 minutos, (c) 40 minutos y (d) 80 minutos. Los antígenos están representados por los cuadrados.

VI.- RESULTADOS

BIOENSAYO DE QUIMIORRECEPCION EN ACUARIOS

DESCRIPCIÓN DE LAS FASES COMPORTAMENTALES.

En esta parte de la serie experimental se observaron las distintas fases de comportamiento alimenticio que presentaron los langostinos (Fig. 11-14), las cuales se describen a continuación:

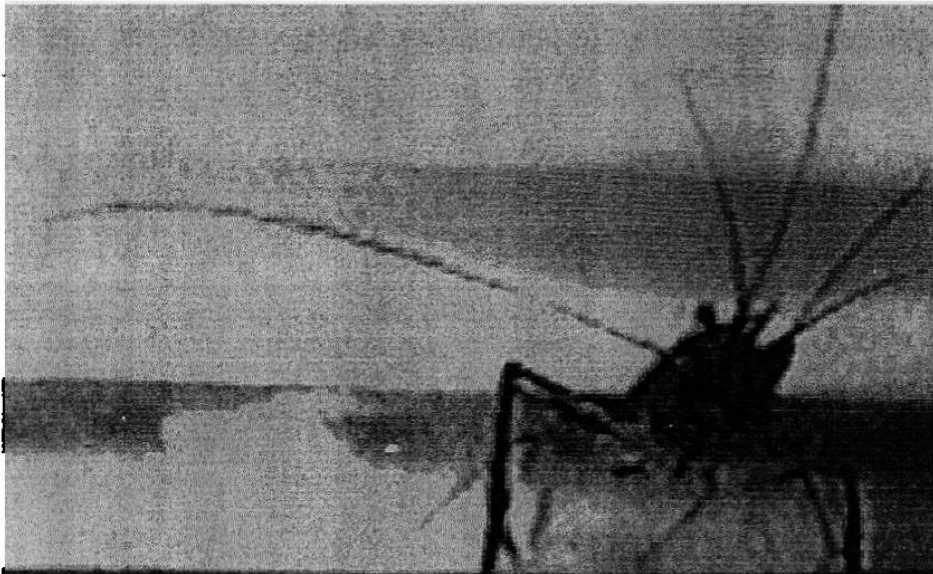


Figura 16.- **Percepción.** Esta fase está caracterizada por movimientos de las antenas, las cuales se mueven manera de látigo, lo que sirve para aumentar el contacto del estimulante con los quimiorreceptores. El ritmo y la velocidad de estos movimientos depende de la naturaleza del attractante

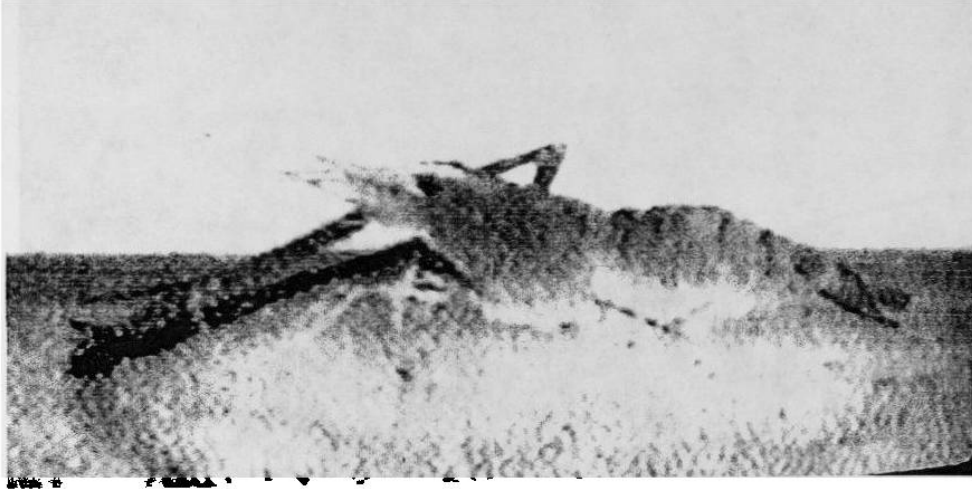


Figura 17.- **Orientación.** En esta fase el animal despliega movimientos antenales así como de los pereiópodos, con el fin de guiarse a la fuente del estímulo. El animal cambia continuamente su posición hasta apuntar su rostro hacia la fuente de atracción.

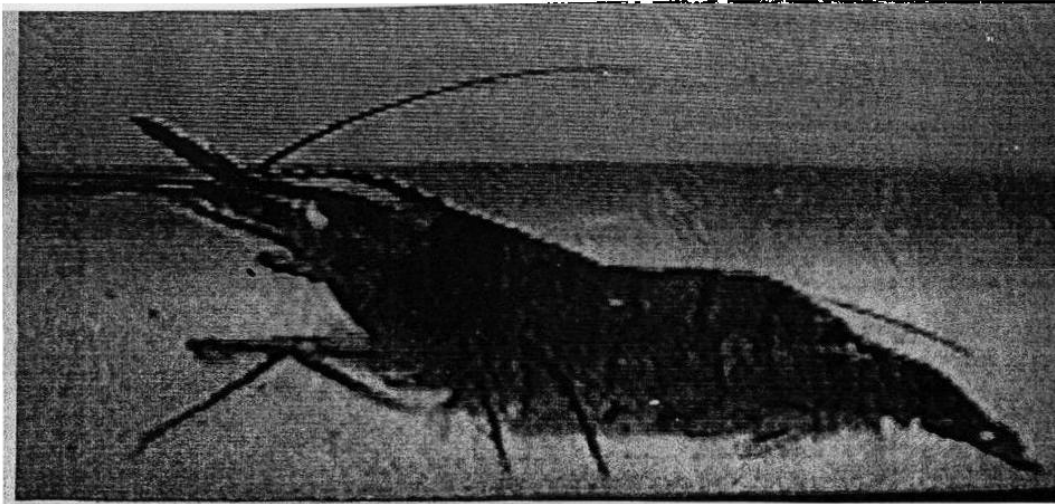


Figura 18.- **Movimiento.** El animal inicia la locomoción hacia la fuente del estímulo, esta se lleva a cabo usando únicamente sus pereiópodos. Durante esta fase el primer par de pereiópodos continúa su búsqueda en el área frontal y se lleva a la boca cualquier materia que encuentre en el camino. Los movimientos antenales y antenulares continúan efectuándose.

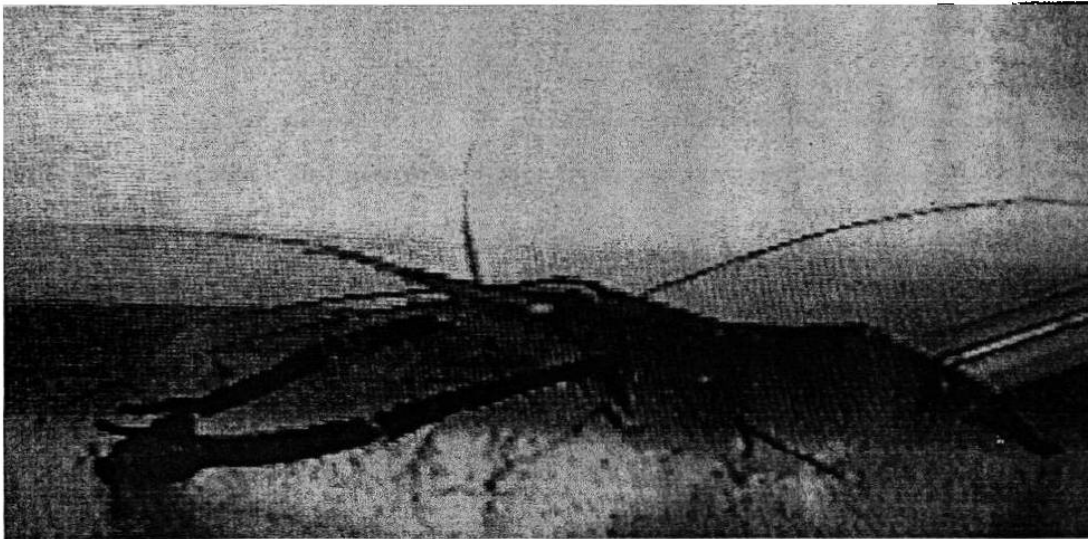


Figura 19.- **Arribo al alimento.** Es el evento final en la cual el animal llega a la fuente de estimulación. El animal hace contacto con los estímulos utilizando los pereiópodos y sus partes bucales en un movimiento típicamente exploratorio.

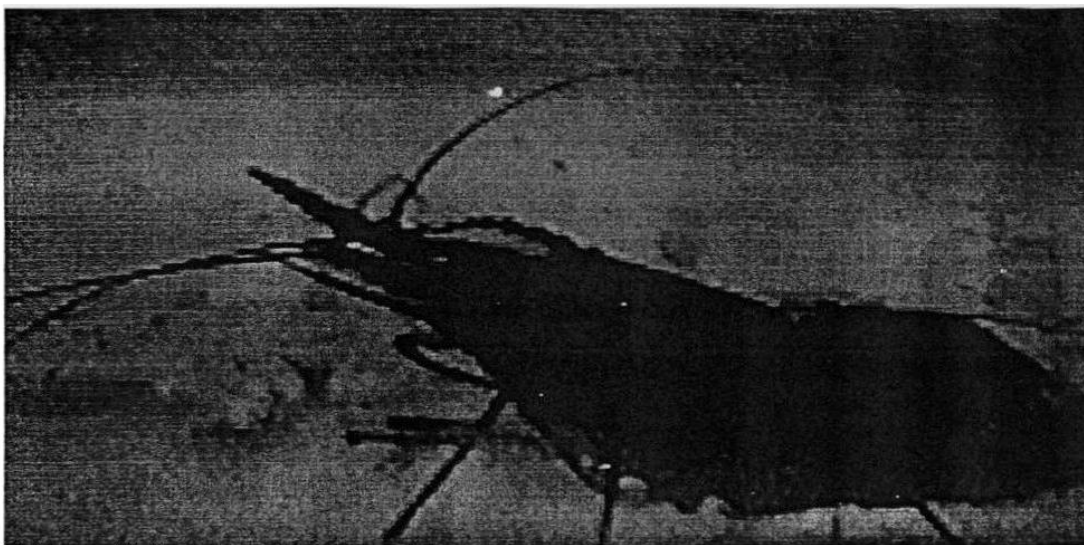


Figura 20.- **Ingestión.** En esta fase el animal ingiere el alimento en definitiva o bien, lo rechaza.

EVALUACION CUANTITATIVA DEL COMPORTAMIENTO

En la Tabla 10 se resumen los resultados del tiempo promedio que tardaron los langostinos en presentar las diferentes fases de comportamiento alimenticio, con cada uno de los tratamientos analizados.

Tabla 10.- Tiempo promedio en segundos que tardaron los langostinos Hembras (H) y Machos (M) en presentar las diferentes fases de comportamiento alimenticio.

TRATAMIENTOS	FASES									
	Percepción		Orientación		Movimiento		Arribo		Ingestión	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
T. negativo	110.8 ^a	104.4 ^a	231.5 ^a	198.0 ^a	349.0 ^a	268.6 ^a	473.0 ^a	448.4 ^a	496.0 ^a	478.0 ^a
Ex- HAS	39.0 ^{bc}	40.2 ^b	54.0 ^{ab}	49.2 ^b	65.2 ^{bc}	68.6 ^b	151.8 ^c	153.2 ^b	162.6 ^b	165.4 ^b
O. de jaiba	96.0 ^{ab}	25.6 ^b	202.0 ^a	39.0 ^b	257.8 ^a	52.2 ^b	434.0 ^{ab}	105.2 ^{bc}	439.4 ^a	112.0 ^{bc}
Langobuds	27.8 ^{bc}	29.2 ^b	46.2 ^{ab}	45.6 ^b	67.4 ^{bc}	60.8 ^b	113.4 ^c	102.4 ^{bc}	130.2 ^b	130.6 ^{bc}
Cadaverina	20.2 ^c	23.6 ^b	28.2 ^b	25.2 ^b	37.8 ^c	38.0 ^b	78.8 ^c	92.0 ^c	100.6 ^b	104.4 ^c
Putrescina	28.2 ^{bc}	28.4 ^b	42.0 ^{ab}	43.4 ^b	51.0 ^{bc}	54.2 ^b	115.8 ^c	118.4 ^{bc}	126.2 ^b	127.4 ^{bc}
O. langostino	109.4 ^a	24.6 ^b	127.6 ^{ab}	34.8 ^b	194.2 ^{ab}	42.4 ^b	361.8 ^b	95.8 ^c	449.8 ^a	109.8 ^{bc}

(Ex-HAS=Extracto hidroalcoholosoluble de calamar; O. de jaiba = Orina de jaiba; O. de langostino = Orina de langostino).

El análisis de varianza reveló la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (atractantes) para las distintas fases de comportamiento ($F=10.57$, G.L.10,6, $P<0.001$). Las comparaciones múltiples entre medias (Tuckey) permitieron distinguir la Cadaverina, la Putrescina, el alimento comercial "Langobuds" y el Ex-HAS como los mejores atractantes durante la fase de percepción, seguidos por las orinas de jaiba y langostino y por último el testigo negativo (Fig. 29).

Para la fase de orientación se obtuvieron los mismos resultados que para la fase anterior, mientras que para las fases de movimiento, arribo e ingestión, se destaca la Cadaverina como el mejor atractante, seguida por la Putrescina, el "Langobuds", el Ex-HAS y la orina de langostino (sin diferencia entre ellos) y por último la orina de jaiba y el testigo negativo (Tabla 11y Figs. 30-33).

Tabla 11.- Comparación de medias del tiempo promedio en segundos que tardaron en presentar ambos sexos las diferentes fases de comportamiento alimenticio.

TRATAMIENTOS	PERCEPCION	ORIENTACION	MOVIMIENTO	ARRIBO	INGESTION
Cadaverina	21.9 b*	29.6 b	37.9 c	85.4 d	102.5 c
Putrescina	28.3 b	42.7 b	52.6 bc	117.1 cd	126.8 c
Ex-HAS	39.6 b	44.9 b	66.9 bc	152.5 bcd	164.0 bc
Langobuds	28.5 b	51.6 b	64.1 bc	107.9 cd	130.4 c
Orina de Jaiba	61.2 ab	120.5 ab	155.0 ab	269.6 b	275.6 b
Orina de Lang.	67.0 ab	81.2 b	118.7 bc	228.8 bc	279.8 b
Test. Negativo	107.6 a	204.3 a	260.1 a	460.7 a	487.4 a

* Literales diferencias indican diferencias significativas ($P < 0.05$; Tuckey, 1984).

Por otro lado, al analizar los mismos resultados pero tomando en cuenta solo las pruebas con los machos se observó que en las primeras tres fases de comportamiento (percepción, orientación y movimiento) no se presentaron diferencias significativa entre la Cadaverina, la orina de langostino, la orina de jaiba, la Putrescina, el "Langobuds" y el Ex-HAS. Únicamente el testigo negativo presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos anteriores. En lo que respecta a las fases de arribo e ingestión destacaron efectos significativos para la cadaverina y la orina de langostino (ver Tabla 10).

Los análisis con los datos registrados para las hembras mostraron que la cadaverina es el tratamiento que presenta los mejores resultados en todas las fases de comportamiento, seguida por la Putrescina, los testigos positivos ("Langobuds" y Ex-HAS), mientras que las orinas de Jaiba y Langostino presentaban resultados muy similares al testigo negativo (ver Tabla 10).

Como prueba final se analizaron las diferencias encontradas entre los sexos mediante una "t" de *Student*, observándose que solo se presentaron diferencias entre sexos cuando se probaron las orinas de langostino y de jaiba, pudiéndose apreciar que los machos tardaron menos tiempo en llevar a cabo las fases de comportamiento, mientras que las hembras presentaron un tiempo similar al registrado para el testigo negativo (Tabla 12).

Tabla 12.- Prueba de "t" de Student para observar las eventuales diferencias presentadas entre machos y hembras al ser expuestos a un mismo tratamiento. Los valores de las celdas representan el valor de probabilidad "t". Se indica también el nivel de significancia.

TRAT.	PERCEPCION	ORIENTACION	MOVIMIENTO	ARRIBO	INGESTION
Cadaverina	.408573 NS	.586669 NS	.97934 NS	.307123 NS	.699734 NS
Putrescina	.947604 NS	.789663 NS	.497119 NS	.806996 NS	.881017 NS
Ex-HAS	.87716 NS	.69586 NS	.87074 NS	.952619 NS	.912239 NS
Langobuds	.866536 NS	.966891 NS	.527593 NS	.250459 NS	.979613 NS
Orina de Jaiba	.100221 NS	.110273 NS	.0342132 **	.000038 **	.000032 **
Orina de Lang.	.00000645 **	.00000505 **	.00000150 **	.000002**	.0000067**
Test. Negativo	.657619 NS	.63687 NS	.925418 NS	.314625 NS	.300015 NS

NS=valores no significativos, ** valores altamente significativos (P<0.001)

PERCEPCION

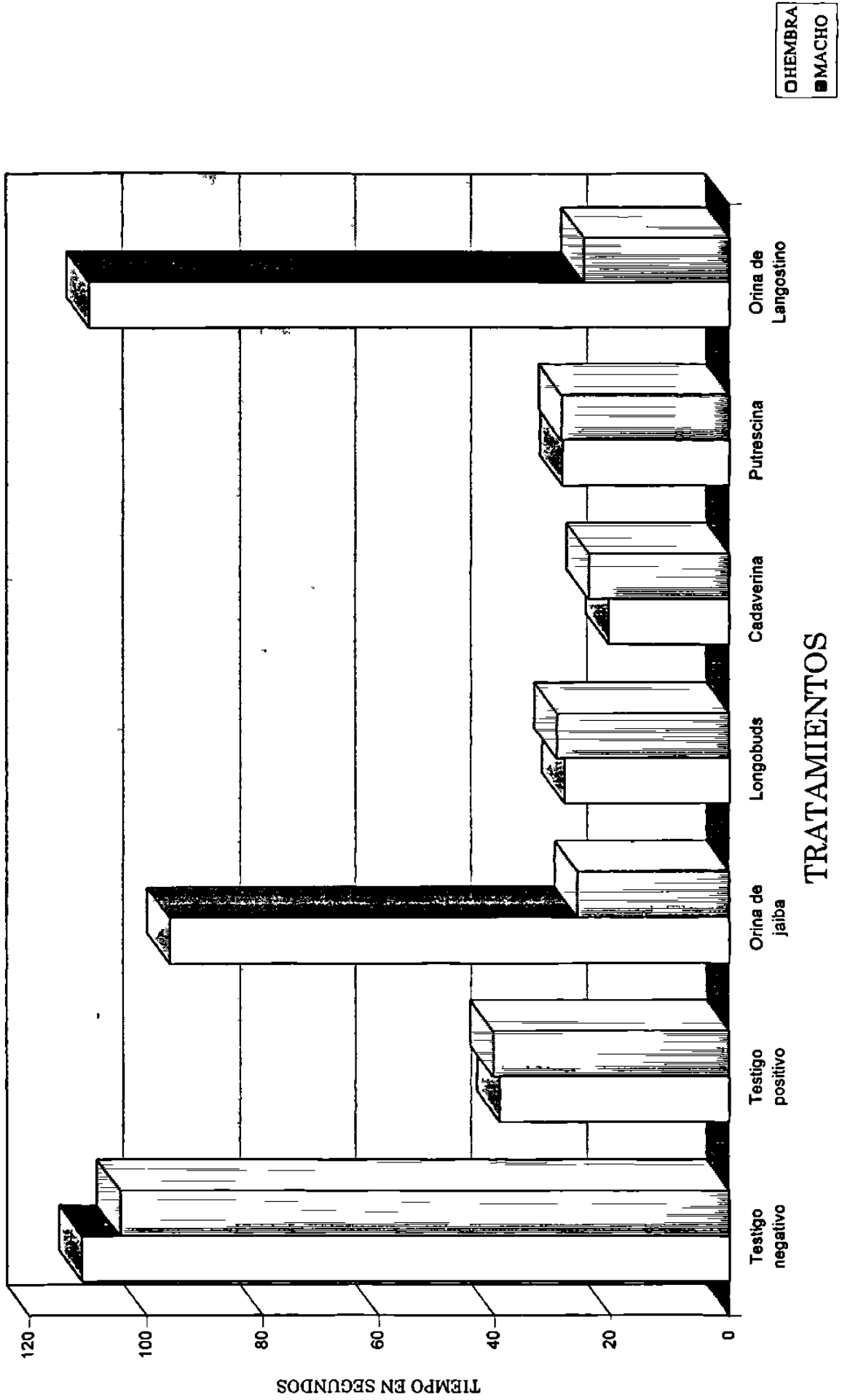


Figura 29.- Tiempo que tardan en percibir los diferentes atrayentes.

ORIENTACION

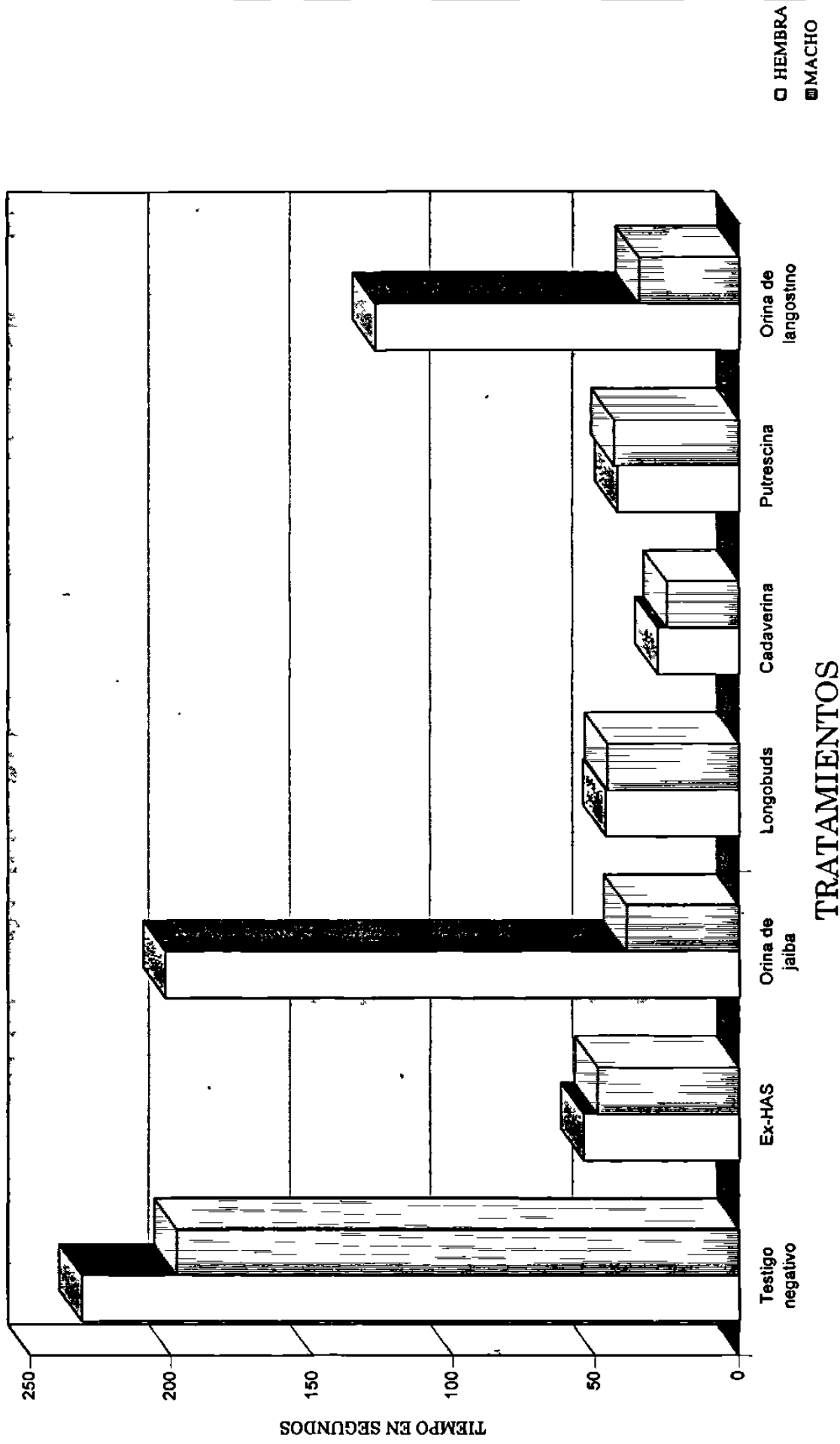


Figura 30.- Tiempo que tardan en percibir los diferentes atrayentes.

MOVIMIENTO

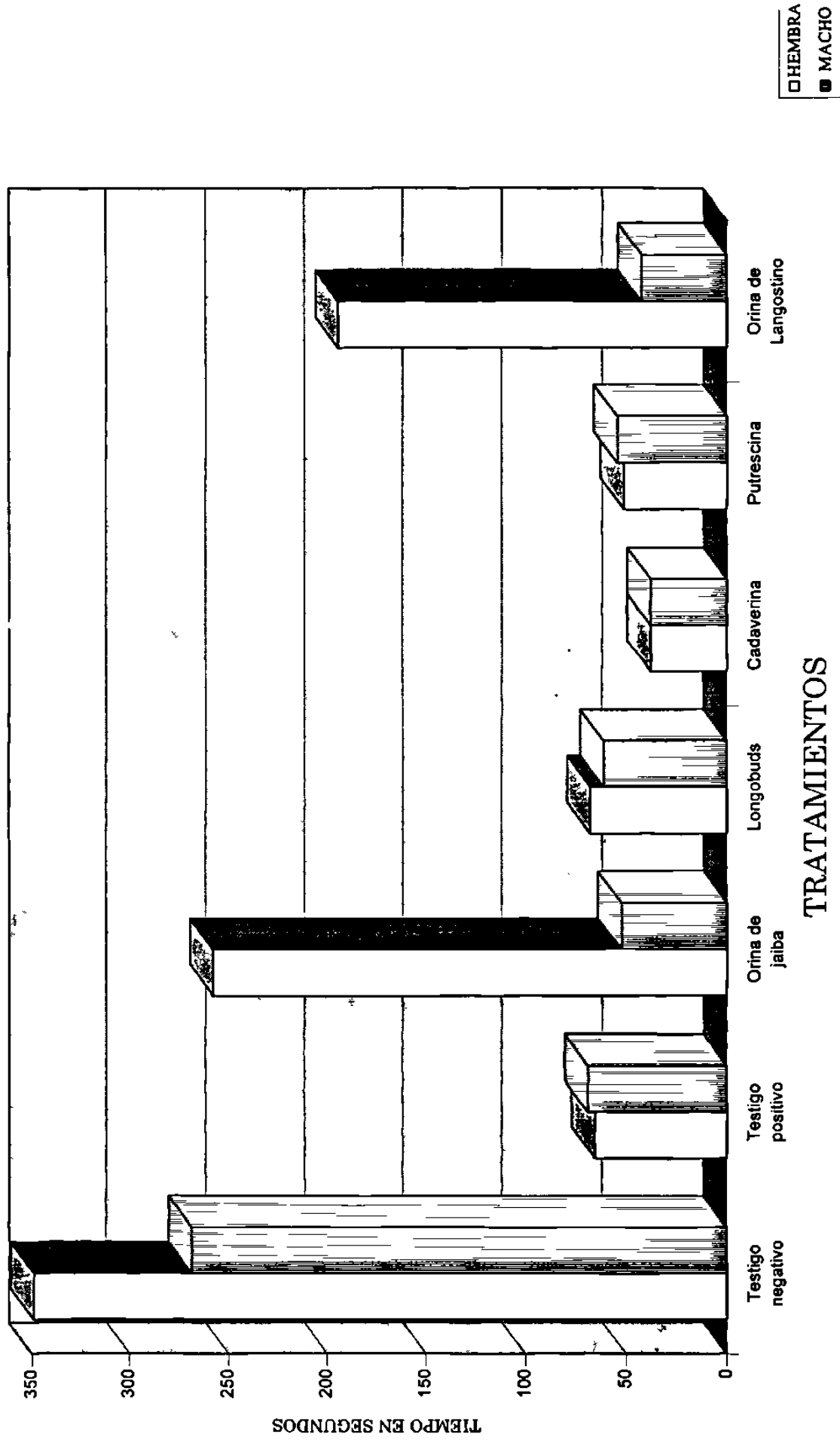


Figura 31.- Tiempo que tardan en percibir los diferentes atrayentes.

ARRIBO AL ALIMENTO

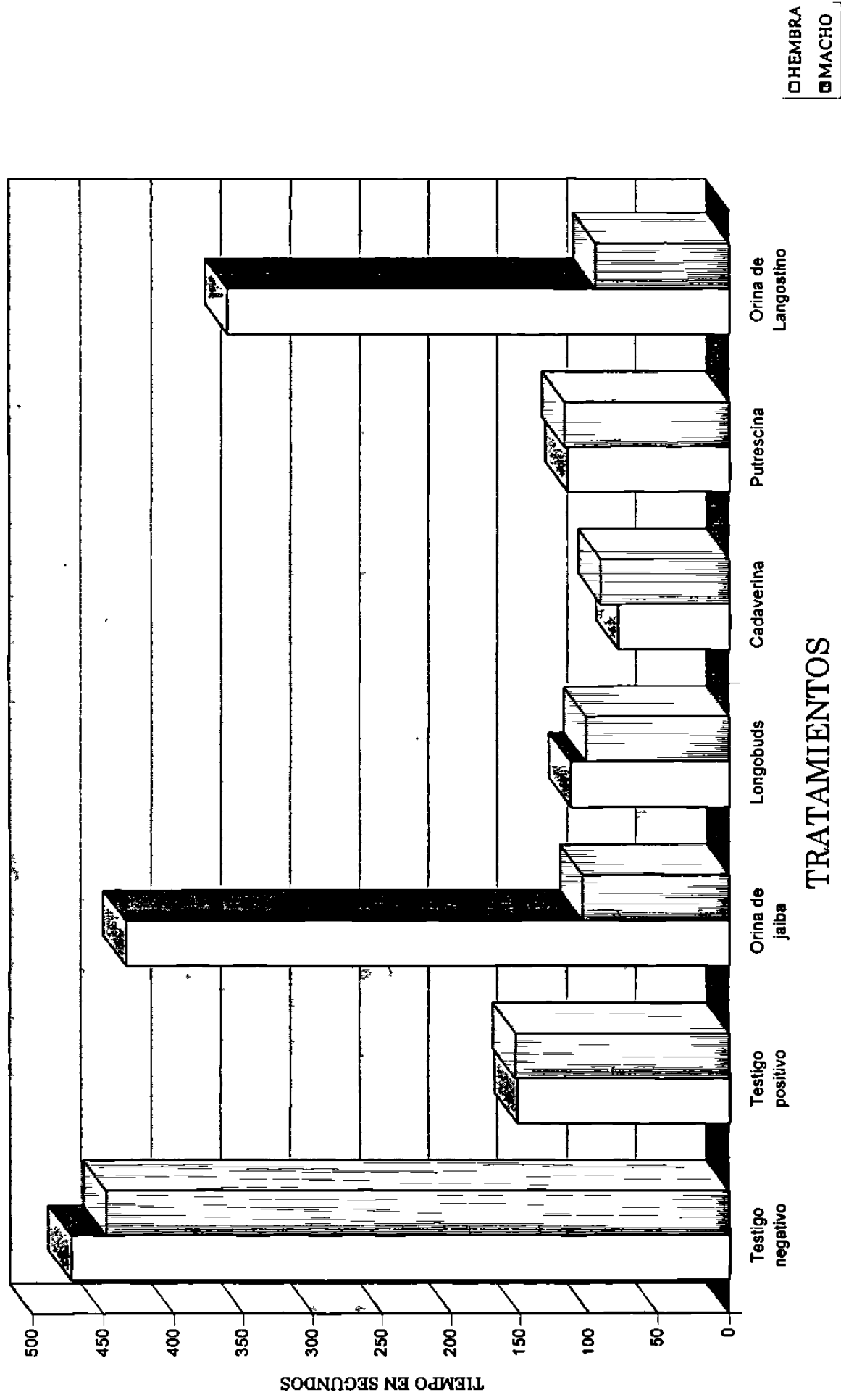
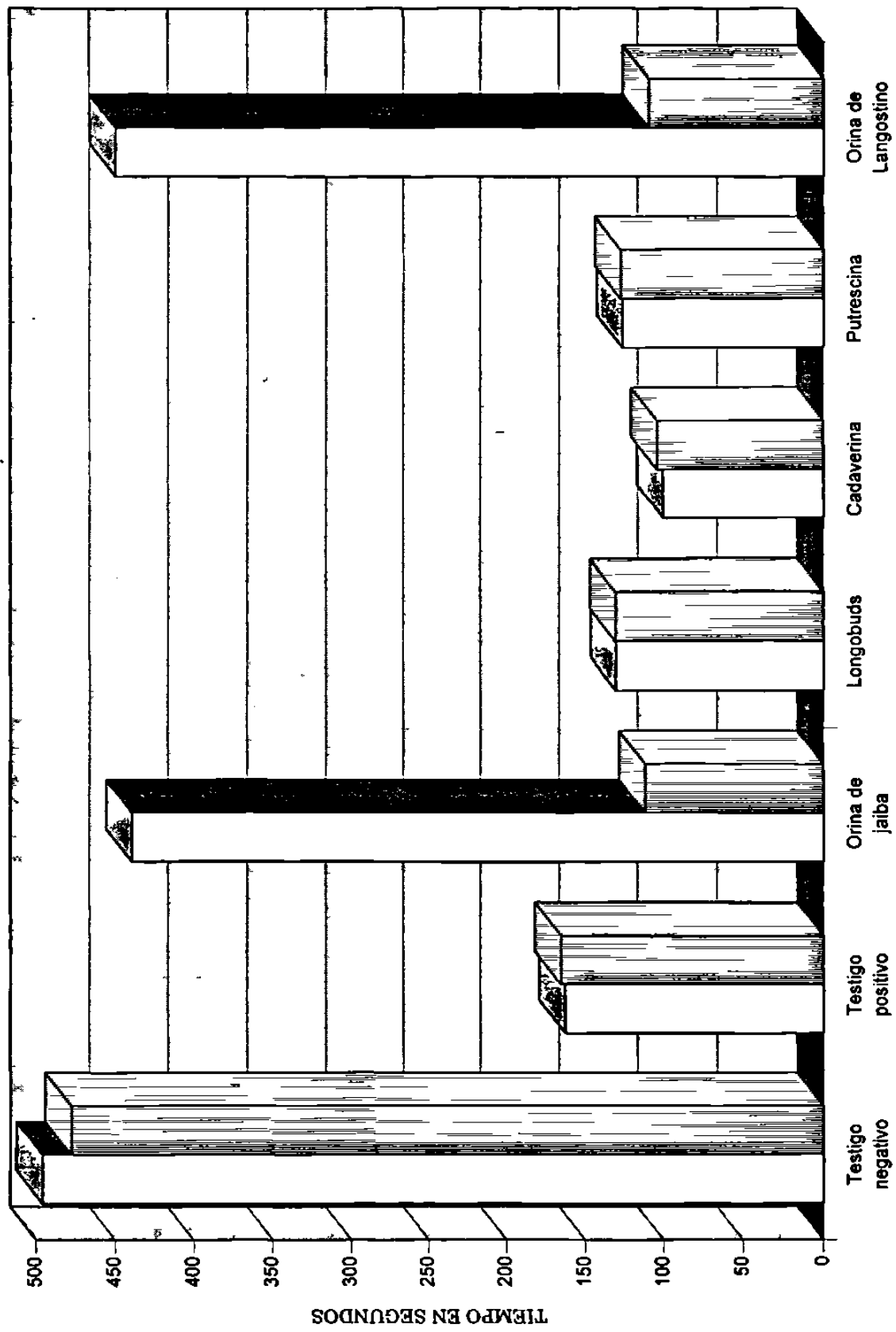


Figura 32.- Tiempo que tardan en percibir los diferentes atrayentes.

INGESTION



TRATAMIENTOS

□ HEMBRA
■ MACHO

BIOENSAYO REALIZADO EN CONDICIONES COMERCIALES

Los resultados obtenidos en el bioensayo a escala comercial (Fig. 34), indican el número promedio de pellets consumidos por tratamiento en diferentes tiempos de muestreo.

El análisis de varianza reveló la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos probados (Tuckey; Zar, 1984). Se observó que solo durante el primer tiempo (10 minutos) no se presentaron diferencias entre los tratamientos mientras que, a los 20 minutos destaca la fracción hidroalcoholosoluble de calamar (Ex-HAS) como el attractante que presenta mayor consumo, seguido por la Cadaverina, el "*Langobuds*" y la Putrescina y finalmente por las orinas de jaiba, langostino y el testigo negativo.

Sin embargo, a los 40 minutos no se observaron diferencias significativas entre el Ex-HAS, la Cadaverina, el "*Langobuds*" y la Putrescina, los cuáles presentaron mayor consumo que las orinas de jaiba y langostino y el testigo negativo.

En el último tiempo registrado (80 minutos) la Cadaverina y el Ex-HAS fueron los que presentaron mejores resultados seguidos por el "*Langobuds*" y la Putrescina y con un menor consumo fueron las orinas de langostino y de jaiba y el testigo negativo (Fig. 34).

INGESTION EN CONDICIONES COMERCIALES

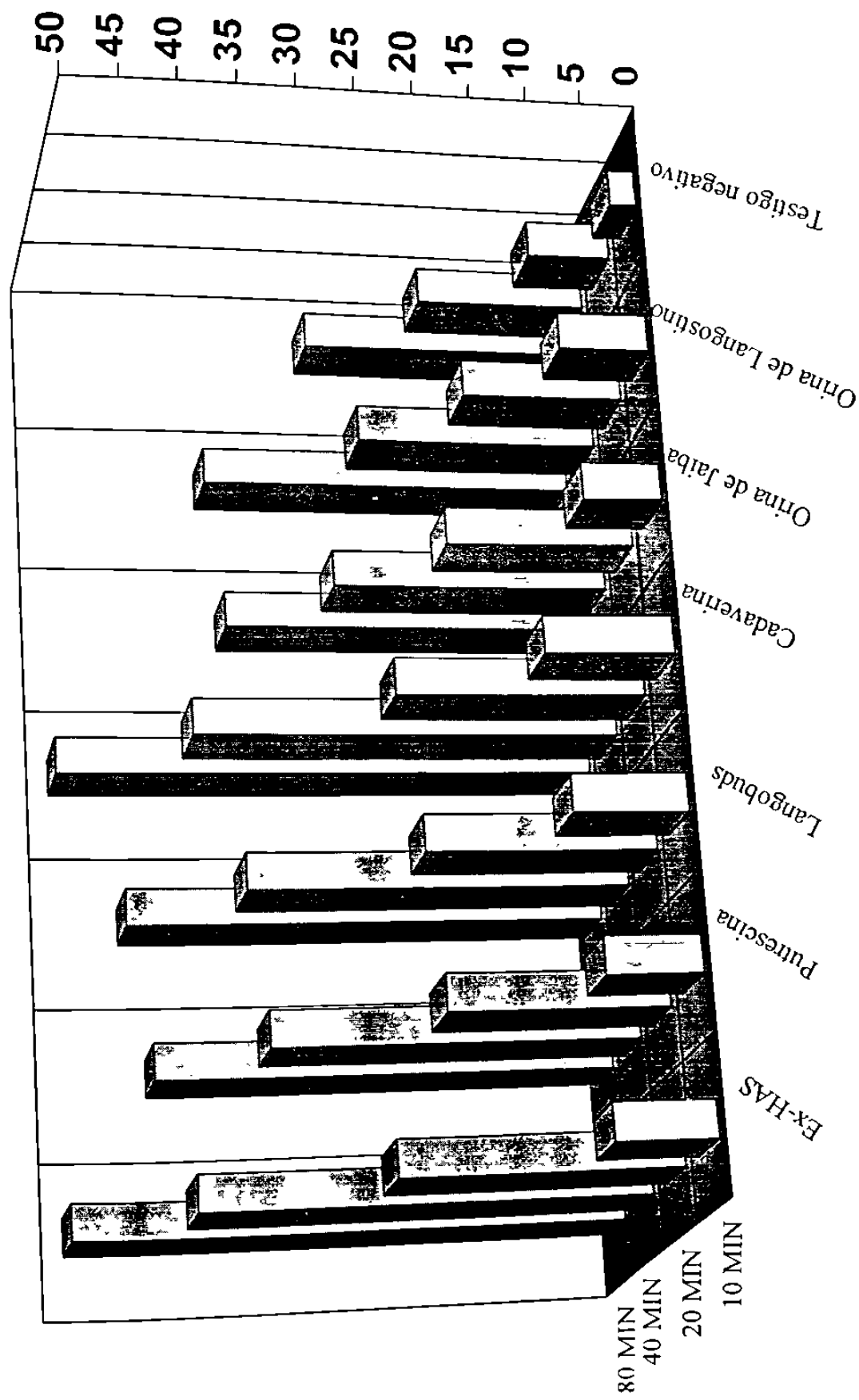


Figura 34.- Número de pellets consumidos en los diferentes tiempos.

PRUEBA INMUNOLOGICA

Mediante la técnica de Inmunodifusión Radial Simple se obtuvieron reacciones de precipitación para los tratamientos Cadaverina, Putrescina, "Langobuds" y en menor grado para el Ex-HAS, no observandose reacción alguna para las orinas de jaiba y de langostino ni para el testigo negativo.



Figura 35.- Placa de gel que muestra la reacción antígeno-anticuerpo obtenida para cada uno de los atrayentes probados, (1) Testigo Negativo, (2) Orina de Jaiba, (3) Orina de Langostino. (4) Langobuds, (5) Ex-HAS, (6) Putrescina y (7) Cadaverina, durante los diferentes tiempos, (1) 10 minutos, (2) 20 minutos, (3) 40 minutos y (4) 80 minutos.

VII.- DISCUSION

De manera general, los resultados obtenidos en la serie experimental muestran que todas las moléculas naturales probadas funcionaron como atractantes e incitantes alimenticios, ya que fueron detectadas a distancia y lograron estimular la iniciación y continuación de la alimentación. Esto quedó demostrado por la rapidez con la que trascurrieron todas y cada una de las fases con respecto a los testigos negativos, los cuales en los tres tipos de bioensayos llevados a cabo, se revelaron menos eficaces en terminos de atracción e ingestión.

SISTEMAS DE BIOENSAYOS

QUIMIORRECEPCION EN ACUARIOS

Fases Del Comportamiento Alimenticio

Las fases comportamentales registradas para *Macrobrachium rosenbergii* corresponden en cierta medida a las detectadas por otros autores como Harpaz *et al.*, (1987) y Costero y Meyers (1993) con la diferencia de que en la fase de percepción, Harpaz *et al.*, (*op. cit.*) mencionan que *Macrobrachium rosenbergii* limpiaba sus anténulas con los maxilípedos, aspecto que nunca logramos observar. Por otro lado, tampoco presenta movimientos de los maxilípedos, como se ha observado en el camarón *Penaeus vannamei* (Costero y Meyers, 1993). En la fase de orientación se presentaron diferencias con respecto a lo reportado por Costero y Meyers (*op. cit.*) y Harpaz *et al.*. (*op. cit.*) ya que en nuestras observaciones no se registraron actividades de búsqueda. En cuanto a la fase de movimiento, arribo al alimento e ingestión, nuestras observaciones se asemejan a las descritas por los autores arriba citados.

Por otra parte, Las características de las fases de comportamiento de *Macrobrachium rosenbergii* difieren sensiblemente de otras descripciones realizadas para otras especies tales

como *Panulirus interruptus* (Zimmer-Faust *et al.*, 1984) y *Cancer anthonyi* (Fuzessery y Childress, 1975).

El sistema adoptado durante el bioensayo de quimiorrecepción fué similar al propuesto por Costero y Meyers (1993), excepto por la modificación consistente en la eliminación del flujo de agua, medida que dió buenos resultados debido a que se excluyó una fuente de error provocada en este caso por el fenómeno de reotaxis positiva que presentan naturalmente los langostinos.

Otro aspecto importante dentro de la metodología aplicada fué la reducción del stress de los organismos, lo cual hubiera podido tener ciertas repercusiones en el comportamiento, ya que por experiencia con otros crustáceos sabemos que un organismo estresado altera su ritmo alimenticio de manera sustancial.

Método de aplicación del atractante

El empleo de los atractantes por medio del método de aspersión en el alimento resulto ser sin duda el método más adecuado, ya que este tipo de aplicación implica que los atractantes se lixivien rápidamente quedando disponibles de forma casi inmediata al entrar en contacto directo con el agua por lo que pueden ocasionar una respuesta de percepción en un tiempo sumamente corto, ya que la efectividad de los quimioatractantes está relacionada con su coeficiente de difusión y su solubilidad en el agua, lo cual ayuda a la rápida localización e ingestión del alimento, mejorando con esto las condiciones físicas y comerciales del cultivo. Nuestros resultados sugieren que se adicionen los atractantes mediante este tipo de aplicación, contrariamente a lo que señala Provasoli (1976) quien propone un proceso de microencapsulación para propiciar una difusión más lenta.

Un hecho que viene a apoyar nuestras observaciones es el bioensayo en condiciones comerciales realizado por Mendoza y Morales (datos no publicados) quienes llevaron a cabo

pruebas con atractantes en alimento para camarón observando mejores resultados cuando los atractantes fueron incluidos por aspersión que cuando estos fueron incluidos antes del proceso de peletización, por lo que se sospecha que este proceso pudiera estar al origen de las pérdidas en la actividad de atracción de las moléculas, presumiblemente debido a las temperaturas que se alcanzan durante la peletización (aprox. 75°C)

Método de Registro

Para detectar de manera exacta el tiempo invertido por los animales en presentar las fases de comportamiento nos apoyamos en un sistema de videofilmación, el cual fué revisado inmediatamente después de realizar el test de quimiorrecepción en acuario, y corroborado por tres observadores independientes. Este tipo de método ha sido utilizado con excelentes resultados por Hill y Wassenberg (1987) y Harpaz y Steiner (1990) y también es ampliamente recomendado por Lee y Meyers (1995), ya que con este tipo de apoyo se eliminan ciertos factores que podrían afectar el comportamiento normal de los organismos, como el stress que puede ser provocado por el mismo observador o bien la falta de objetividad al ser realizadas las observaciones por una sola persona. El empleo de videos ofrece adicionalmente una gran ventaja ya que se pueden llevar a cabo análisis cuantitativos de ciertos movimientos característicos del animal aún después de haber realizado la grabación.

BIOENSAYO EN CONDICIONES COMERCIALES

El propósito del bioensayo realizado a escala comercial para observar el efecto de los atractantes sobre la ingestión de alimento, fué la simulación lo más cercanamente posible las densidades y proporciones de sexos que se manejaban en la granja . En este caso se manejó un grupo relativamente grande de organismos. De acuerdo con Lee y Meyers (1995), el empleo de un solo animal resulta adecuado solo en condiciones de laboratorio, sin embargo, en

pruebas de validación experimentales a mayor escala es necesario manejar un número más elevado de animales para evaluar de manera precisa la aplicación práctica de los atractantes.

La gran importancia de realizar este tipo de bioensayos en condiciones de cultivo y alto riesgo de extrapolar los resultados del laboratorio directamente, son notables en nuestros resultados ya que no obstante que algunos de los atractantes probados funcionaron tanto en el bioensayo en acuarios como en condiciones comerciales. Se registró una marcada diferencia en el tiempo en que tardaron los animales en percibirlos en ambas condiciones, pudiendo esto ser provocado por la gran cantidad de estímulos que se presentan en el medio ambiente acuático.

INMUNOENSAYO

Constatación del alimento ingerido en condiciones comerciales.

En el caso de los crustáceos es imposible identificar visualmente los restos del alimento en sus contenidos estomacales. Lo anterior es debido a la maceración excesiva producto del trabajo mecánico que realizan las mandíbulas, lo cual aunado a la acción enzimática del hepatopáncreas propicia que el alimento se convierta en una masa fina. En función de esta acción conjugada del aparato masticatorio con la hidrólisis enzimática el examen directo al microscopio revela que en el mejor de los casos una alta incidencia de material duro y fragmentos de presas no identificables o material detrítico amorfo difícilmente discernible.

Ante la imposibilidad de poder identificar los alimentos pre-digeridos en diferentes invertebrados han surgido una serie de técnicas inmunológicas que representan una alternativa práctica y eficaz para estudiar la ingestión cualitativa y cuantitativa de estos. Así por medio de la preparación de anticuerpos dirigidos contra una proteína específica de un alimento compuesto es posible llevar a cabo la identificación eventual de éste en el tracto digestivo (Mendoza, 1994).

En efecto, en nuestro caso, el método utilizado (Inmunodifusión Radial Simple) resultó, a pesar de su simplicidad, ser una buena opción. Sin embargo, un aspecto que amerita ser

optimizado es la obtención de anticuerpos con un mayor título, ya que esto permitiría una menor incorporación de suero en el alimento y al mismo tiempo facilitaría su detección.

ATRACTANTES

Testigo negativo

Un aspecto relevante dentro de la serie experimental realizada es la adecuación de diferentes testigos negativos de acuerdo al tipo de bioensayo realizado.

Así, el testigo negativo utilizado en el bioensayo de quimiorrecepción en acuario resultó ser no solo antipalatable, sino también antiatractante, característica proporcionada por la alta inclusión de pasta de soya y harina de trigo (Lim and Dominy, 1989; Mendoza, 1993b), lo cual lo hace un alimento ideal para este tipo de pruebas, ya que como lo sugiere Mackie (1973) en este tipo de estudios solo existen dos alternativas, la primera en la cual se omiten componentes de la dieta hasta que ésta no es ingerida y una segunda aproximación consistente es agregar un estimulante potencial en una dieta que no tenga ningún sabor, es decir que hasta donde sea posible sea antipalatable. Un ejemplo de esto último es la dieta basada en caseína que fué probada en peces por Mackie y Mitchel (1985).

Por otra parte, en la prueba de ingestión en condiciones comerciales, el testigo negativo fué representado por el alimento que normalmente se utiliza en la granja, el cual ya incluía atractantes en su formulación. Al igual que para el caso anterior, el testigo negativo fué utilizado como vehiculo de los atractantes, de tal forma que la diferencia entre el testigo negativo y los demás tratamientos sólo era la inclusión de los atractantes a probar. Los datos obtenidos con el testigo negativo en esta prueba resultaron ser menores que los otros tratamientos, lo cual es indicativo de la poca cantidad y/o calidad de los atractantes en la formulación original. De hecho, en función de los resultados obtenidos se hace evidente que alimentos comerciales como el utilizado, a pesar de estar bien formulados, descuidan el factor de atractabilidad, indispensable en condiciones de producción.

Finalmente, en lo que toca al bioensayo inmunológico, se utilizó un testigo negativo similar al utilizado en las pruebas de quimiorrecepción en acuarios, que como se dijo anteriormente resultó ser antiatractante y antipalatable, con la diferencia de que a éste se le agregó suero conteniendo anticuerpos contra *Artemia salina*. En este bioensayo el testigo negativo no presentó reacción alguna en la técnica de inmunodifusión radial simple, lo cual en principio fué ocasionado por la poca ingestión de los pellets sin atractante.

Testigos Positivos

Se utilizaron dos tipos de testigos positivos, con la finalidad de contar con parámetros de referencia, tanto en condiciones comerciales (atractante comercial "*Langobuds*") como en condiciones de laboratorio (extracto hidroalcoholosoluble de calamar).

El atractante comercial "*Langobuds*" fue utilizado debido a los magníficos resultados que ha ofrecido tanto a nivel de laboratorio como en condiciones comerciales con distintas especies de camarones peneidos *Penaeus vannamei* y *P. monodon* (Costero y Meyers, 1993; Miller, 1993; Mendoza, *comm. per*). La utilización de este producto ha implicado reducir el tiempo de localización e ingestión hasta un 50% en estos estudios. En el caso de nuestra serie experimental demostró ser igualmente eficaz al probarlo con *Macrobrachium rosenbergii*, ya que se logró reducir estos parámetros hasta un 60% en condiciones de laboratorio y 40% en condiciones comerciales. El hecho de que este atractante se haya revelado ligeramente menos potente que otros de los tratamientos pudiera ser debido a alguno de los elementos de su composición, que resultara ser sumamente atractante para los camarones penaeidos, lo era en menor medida para los langostinos. En efecto, uno de los componentes del "*Langobuds*" es la betaina, molécula que resulta un excelente atractante para diferentes crustáceos (ver Tabla 7), sin embargo su uso en *Macrobrachium* ha sido sujeto de cierta controversia ya que si bien, en ciertos experimentos ha resultado atractante (Carr y Chaney, 1975; Hodgson y Mathewson, 1976; Harpaz *et al.*, 1987; Harpaz y Stainer, 1990), pero en otros, al contrario ha resultado

ser repelente (Dreby y Harpaz, 1988). En fin, no se puede descartar que el efecto sinérgico de otros componentes de esta mezcla compleja pudieran haber atenuado ligeramente la respuesta.

Por otra parte, el extracto hidroalcohólico soluble de calamar (Ex-HAS), presentó buenos resultados tanto en el bioensayo de quimiorrecepción en acuario como en las pruebas de ingestión a escala comercial, lo cual coincide con las numerosas observaciones realizadas por diversos investigadores (ver Tabla 6). Un aspecto interesante es que este potente atrayente tiene un amplio espectro zoológico, en efecto, como se podrá constatar ha dado efectivos resultados probado no sólo en peces de diferentes especies, sino, en todos los crustáceos con los cuáles se ha experimentado, acreditándolo, sin duda, como un excelente testigo positivo.

Orinas de Jaiba y Langostino

Las orinas de jaiba azul (*Callinectes sapidus*) y de langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) fueron utilizadas como atrayentes en el presente trabajo, las cuales fueron extraídas de hembras en estadio precopulatorio ya que es en esta fase cuando las feromonas se emiten y alcanzan su mayor actividad biológica (Gleeson, 1990). A pesar de los interesantes resultados obtenidos, la utilización de estas moléculas no es viable por el momento. En efecto, los métodos de extracción utilizados son imprácticos y difíciles de utilizar para obtener una cantidad suficiente de feromonas para ser aplicada a una importante cantidad de alimento, por lo que es imperativa su pronta identificación y caracterización tal y como se ha utilizado para la jaiba *Callinectes sapidus* (Gleeson *et al.*, 1984) y para *Hommarus americanus* (Atema y Cowan, 1986)

Los resultados obtenidos con ambas orinas no fueron diferentes entre lo que indicó que las feromonas de jaiba pudiesen presentar una marcada similitud con las de langostino ya que lograron atraer a este último. De la misma manera Kittredge *et al.*, (1971) mencionan que las feromonas de una hembra de una especie pueden ser detectadas por machos de otra especie. Otra posible alternativa es que existieran otras moléculas dentro de la orina de jaiba que

resultara atractivas para el langostino. Sin embargo, se logró apreciar el fenómeno inverso, por ejemplo, la orina de langostino resultó ser igualmente atractiva para las jaibas. Vale la pena considerar que las orinas, además de feromonas, contienen productos de excreción tales como urea y diversos compuestos nitrogenados como las aminas terciarias, aminoácidos y nucleótidos, los cuales resultaron ser atractantes en diferentes crustáceos (ver Tabla 5. 6, 7).

Aminas Biogénicas

La mayor parte de las sustancias de bajo peso molecular que han resultado ser estimulantes potentes y habitualmente atractantes en crustáceos, son los aminoácidos mientras que las azúcares, alcoholes, almidones y los ácidos grasos y otros compuestos han dado menores respuestas (o ninguna), esto puede ser atribuido a los hábitos alimenticios de la especie utilizada, así tenemos que *Orconectes rusticus* (vegetariano) es más sensible a azúcares que *Orconectes virilis* (carnívoro) que es más sensible a aminoácidos (Tierney y Atema, 1988). Por lo anterior, en el presente estudio decidimos evaluar moléculas naturales derivadas de aminoácidos, como es el caso de las aminas biogénicas.

Los resultados obtenidos en los diferentes bioensayos realizados demuestran que las aminas biogénicas Putrescina y Cadaverina resultaron ser de los mejores atractantes e incitantes, ya que como se observó en la prueba de quimiorrecepción en acuario los langostinos invierten menos tiempo en presentar las diferentes fases de comportamiento cuando son expuestos a la Cadaverina y solo un poco más de tiempo cuando son expuestos a la Putrescina. En la prueba de ingestión en condiciones comerciales, la Cadaverina presentó sistemáticamente mejores resultados que el resto de los atractantes probados, mientras que la putrescina presentó buenos resultados pero con menor eficacia que los testigos positivos y por consecuencia menores que la Putrescina, mientras que en un bioensayo, en el cual se realizó la constatación de lo ingerido por un método inmunológico, se observó que las aminas presentaban una reacción antígeno-anticuerpo más marcada, lo cual implicaba un mayor consumo del alimento con estas aminas.

Considerando los resultados de manera global, cabe hacer mención que en la literatura nunca se ha reportado que una sola molécula presente mejores resultados que mezclas artificiales o naturales de moléculas o extractos de diferentes organismos, tal fué el caso de la Cadaverina en nuestros resultados, ya que se reveló más potente que los demás tratamientos probados.

Los resultados obtenidos así como las numerosas observaciones reportadas en la literatura nos proveen de diversos puntos de reflexión que podrían ser conjuntados en una teoría complementaria a la estipulada por Zimmer-Faust (1987) quien señala que dentro del grupo de los crustáceos, aquellos con hábitos carnívoros tienden a buscar alimento con altos niveles de energía (una carga energética alta), mientras que nuestros resultados indican que los crustáceos de hábitos omnívoros tienden a ser atraídos por moléculas degradadas, las cuales son liberadas a menudo dentro del proceso de descomposición de los organismos, así como durante la excreción y que en consecuencia presentan un bajo valor en cuanto a carga energética.

Lo anterior puede ser ampliamente constatado si tomamos en cuenta que en el curso del proceso de descomposición se produce una especie de reacción en cadena en cuanto a la degradación proteica, esto es, que las proteínas y/o péptidos son convertidos en amino ácidos libres los cuales son convertidos a su vez en aminas biogénicas y por otro lado de manera simultánea, se forman nucleótidos y sales cuaternarias de amonio, los cuales son liberados al medio ambiente. Todas las moléculas anteriores presentan propiedades de atracción y estimulación hacia los langostinos y otros crustáceos tal y como lo describen los antecedentes mencionados en el presente trabajo.

Efectivamente, la alta concentración tisular de varias de las sustancias de bajo peso molecular están en relación con el papel que juegan en la regulación osmótica intracelular. Estas sustancias se escapan de los organismos como resultado de la lixiviación, excreción, daño tisular y descomposición. La rápida proliferación bacteriana y otros organismos normalmente aseguran la remoción de estas sustancias en el agua propiciando que existan bajas

concentraciones en el medio ambiente. Esta característica, la existencia de bajas concentraciones en el medio, es una condición *sine qua non* para que resulten atractantes, ya que como se ha mencionado en la literatura, las altas concentraciones de moléculas potencialmente atractantes en el medio ambiente provocan una disminución en su capacidad de atracción debido a que son bloqueados los receptores específicos para los mismos.

Por su parte Zimmer-Faust (1989) sostiene que la tasa de aminoácidos y su conversión en amonio decrece al aumentar el grado de descomposición del cadáver, lo que resulta en una disminución correspondiente en el comportamiento alimenticio predatorio ya que considera la relación entre los aminoácidos y el amonio como una señal relativa a la calidad del alimento en términos de nitrógeno. Por otra parte argumenta que el ATP al descomponerse rápidamente durante la muerte celular ya no atraería a los predadores puesto que poseen cierta sensibilidad al ATP, lo que se puede considerar de alguna manera como una señal energética. Sin embargo el ATP por si solo no puede actuar como un indicativo ya que las concentraciones celulares varían grandemente dependiendo de la etapa de vida del organismo, de su nivel de actividad y otros factores medioambientales, por consiguiente establece que la carga energética resulta una señal más adecuada de la energía metabólica total disponible para un organismo, de aquí que su percepción por un predador pueda asistir en el reconocimiento de la calidad energética de la presa. En oposición a esto, nuestros resultados indican que los langostinos resultan atraídos por moléculas que son liberadas durante el proceso de descomposición (Aminas biogénicas) y excreción (orina de jaiba y langostino) y que en consecuencia tienen una baja carga energética.

Cabe destacar, a este propósito, que justamente los langostinos presentan hábitos alimenticios del tipo omnívoro con una marcada preferencia por pequeños organismos y cadáveres de peces y otros animales (Ling, 1969) lo cual está en relación con los resultados de quimioatracción presentados por las aminas biogénicas.

Un argumento adicional que viene a apoyar esta teoría es que de acuerdo a Hatt (1984) y Bauer, *et al.*, (1981) la efectividad de los aminoácidos se pierde al sustituir, alterar o

eliminar el grupo amino, sin embargo, al eliminar el grupo carboxilo la eficacia en términos de atracción se mantiene, aunque en menor nivel. Estos resultados están en concordancia con nuestros resultados ya que las aminas biogénicas (formadas por descarboxilación de aminoácidos) estimulaban ampliamente el comportamiento alimenticio del langostino. Por otro lado mencionan que las formas L de los aminoácidos son más efectivas que las formas D, los α -aminoácidos son mejores que los β , y por último los aminoácidos con más de 5 átomos de carbono tienen menos efecto. Lo anterior concuerda con las características que presentan la Lisina y Arginina y por ende las características de las aminas biogénicas utilizadas.

Esta interpretación sería válida solo en las etapas de estadio juvenil y adulto puesto que no existen indicios de que los aminoácidos resulten atractantes para las etapas juveniles de crustáceos (Kurmaly *et al.*, 1990) por lo que es muy probable que tampoco las aminas biogénicas funcionen como tal, de esta manera solo podrían tener efecto una vez que estuvieran bien definidos los hábitos alimenticios del animal. Por otro lado, cabe señalar que si bien estas moléculas evocaron excelentes respuestas en términos de atractabilidad con *Macrobrachium rosenbergii*, podrían no provocar una respuesta de la misma naturaleza en otras especies y de hecho podrían incluso resultar inhibitorias. A este respecto Lee y Meyers (1995) mencionan que una misma molécula puede ser atractante para diferentes especies y repelente para otras.

Un aspecto importante en torno a la utilización de estas moléculas es la concentración a la cual se apliquen. Este parámetro resulta ser especialmente delicado en el caso de las aminas biogénicas, ya que existen antecedentes de efectos nocivos al ser utilizadas en grandes concentraciones (Smith, 1990; Cowey y Cho, 1992). En el otro extremo, si no se adiciona una concentración suficiente es probable que su efecto como atractante se vea limitado, por lo cual es necesario que en un futuro se considere la elaboración de curvas dosis-respuesta. Esta consideración no debería perjudicar el eventual uso de estas moléculas, puesto que se encuentran normalmente en todos los organismos vivos y cumplen con funciones biológicas particulares.

Entre las funciones de la putrescina en el metabolismo de los organismos destaca que es esencial para el crecimiento celular y se cree que tiene un papel importante en la síntesis del DNA, RNA y proteínas (Pegg, 1984). También se le atribuye un rol en la estabilización de los ribosomas y un aumento en la absorción de aminoácidos por las células. Además la Putrescina puede tener un papel promotor de crecimiento (Smith, 1990).

VIII.- CONCLUSIONES

Las moléculas utilizadas en el presente estudio resultaron ser atractantes e incitantes, destacando las aminas biogénicas Cadaverina y Putrescina. Este es un dato sumamente interesante tomando en cuenta que en la naturaleza la mayoría de los decápodos, debido a sus hábitos alimenticios, tienen marcadas preferencias por material en descomposición de origen animal o vegetal.

Otros atractantes que presentaron buenos resultados fueron los testigos positivos, el attractante comercial "*Langobuds*" y el extracto hidroalcoholosoluble de calamar (Ex-HAS), ya que no existe diferencia significativa con las aminas biogénicas. La ventaja del attractante comercial sobre el extracto de calamar es su consistencia en la composición, mientras que el extracto de calamar puede mostrar en algunas ocasiones buenos resultados, su composición depende de la especie, el tamaño, el estado fisiológico y su nutrición las cuales finalmente determinan su composición.

Las diferencias en atracción que se presentaron entre hembras y machos indican que las muestras de orina efectivamente presentaban actividad "feromonal", ya que solo los machos eran atraídos hacia el estímulo. A pesar de no haber mostrado buenos resultados con hembras como los otros atractantes, existe cierto potencial para que estas pueden ser utilizadas en cultivos monosexuales de *Macrobrachium rosenbergii*.

Tomando en cuenta que el alimento representa entre el 50 y 60% de los gastos de operación en una granja de langostino, el uso de atractantes es una buena opción para mejorar las condiciones de cultivo y por lo tanto incrementar la rentabilidad del mismo.

Considerando que el uso de aminos biogénicas comerciales puede resultar oneroso al igual que el uso de atractantes comerciales y por otro lado, hasta el momento no se ha logrado sintetizar las feromonas sexuales, la tendencia a seguir es la obtención de aminos biogénicas naturales a partir de subproductos de pescado.

Lo anterior se puede lograr con apoyo de una gran cantidad de estudios realizados para identificar la presencia de poliaminas mediante diferentes métodos.

Otra opción es analizar otros tipos de atractantes, de fácil obtención y de bajo costo.

IX.- BIBLIOGRAFIA

- ADLER, H., M. MARGOSHES., L. SNYDER & C. SPITZER (1977) Rapid Chromatographic Method To Determine Polyamines In Urine And Whole Blood. Journal Of Chromatography, 143:125-136.
- AKIYAMA, D.M., (1986). The development of a purified diet and nutritional requirements of lysine in Penaeid shrimps. Ph D Thesis, Texas A&M University. 80 pp.
- AKNES, A. & B. BREKKEN (1988) Tissue Degradation, Amino Acid Liberation and Bacterial Decomposition of Bulk Stored Capelin. J. Sci. Food Agric. 45:53-60.
- AMIR, S. & Z. RAANAN (1988) Rapid identification of reproductive state and the receptive period of females in pond populations of *Macrobrachium rosenbergii*- A new technique. Aquaculture 48:361-267.
- ATEMA J. & D. COWAN (1986) Sex-Identification Urine and Molt Signals in Lobster (*Homarus americanus*). J. of Chemical Ecology. 12(11):2065-2080.
- BALCONI, I.R. (1991). La harina de pescado en alimentos balanceados. Nutrición y Alimentación. 37: 14-23.
- BAUCHAU, A.G. & M.T. FONTAINE (1984) Chemoreception et comportement de la reproduction chez les crustacés. Oceanis. Vol 10. Fasc. 2:151-168.
- BAUCHAU, A.G. (1986) Sex Pheromones in Crustacea. Elsevier Science Publishers B.V. Advances in Invertebrate Reproduction 4. M.Porchet, J.-C.Andries and A. Dhainaut editors. pp:337-243.
- BAUER, V., J. DUDLEY & H. HATT (1981) Characteristics of single monoreceptive units sensitive to amino acids and related substances in the crayfish leg. J. Comp. Physiol. 144:67-74.
- BENFIELD, M. & D. ALDRICH (1992) Attraction of postlarval *Penaeus aztecus* Ives and *P.setiferus* (L) (Crustacea:Decapoda:Penaeide estuarine water in a laminar flow choice chamber. Elsevier Science Publishers B.V. 098:39-52
- BONEFIELD, M.C. & ALDRICH, D.V. (1991) A laminar flow choice chamber for testing the responses of postlarval penaeids to olfactants. Contributions in Marine Science. 52: 73-88.

BOROWSKY, B. (1984) Effects of receptive females' secretions of some male reproductive behaviors in the amphipod crustacean *Microdeutopus grillotalpa*. Marine Biology, 84:183-187.

BOROWSKY, B., C. AUGELLI & S. WILSON (1987) Towards Chemical Characterization of Waterborne Pheromone of Amphipod Crustacean *Microdeutopus grillotalpa*. J. Chemical Ecology. 13:1673-1679.

BOROWSKY, B. (1989) Responses of the Amphipod Crustacean *Gammarus palustris* to Waterborne Secretions of Conspecifics and Congenerics. J. of Chemical Ecology. 11(11):1545-1552.

BOYD, C. & C. TUCKER (1995) Sustainability of channel catfish farming. World Aquaculture. 26(3):45-53.

BROWN & HARA (1982) Biochemical aspects of Amino Acid Receptors in Olfaction and Taste. In *Chemoreception in Fishes*. Edited by Toshiaki J. Hara. Elsevier Scientific Publishing Company. Canada, pp: 159-180.

CALVER, M.C. (1984) A review of ecological applications of immunological techniques for diets analysis. Australian Journal of Ecology 9:19-25.

CARR, W.E.S. & T. CHANEY (1975) Chemical Stimulation of Feeding Behavior in the Pinfish, *Lagodon rhomboides*: Characterization and Identification of Stimulatory Substances Extracted From Shrimp. Comp. Biochem. Physiol. 54A:437-441.

CARR, W.E.S. (1978) Chemoreception in the Shrimp, *Palaemonetes pugio*: the role of Amino Acid and Betaine in Elicitation of a Feeding Response by Extracts. Comp. Biochem. Physiol. 61A:127-131.

CARR, W.E.S. (1982) Chemical Stimulation of feeding behavior. In *Chemoreception in Fishes*. Edited by Toshiaki J. Hara. Elsevier Scientific Publishing Company. Canada.

CARR, W.E.S & H.W.THOMPSON (1983) Adenosine 5'-Monophosphate, an internal regulatory agent, is a potent chemoattractant for a marine shrimp. J.Comp. Physiol., 153:47-53.

CARR, W.E.S., NETHERTON,J.C.III & M.L.MILSTEAD (1984) Chemoattractants of the shrimp *Palaemonetes pugio*: variability in responsiveness and the stimulatory capacity of mixtures containing amino acids, quaternary ammonium compounds, purines and other substances. Comp. Biochem. Physiol., 77A, 469-474.

- CARR, W.E.S. & C. DERBY** (1986) Behavioral chemoattractants for the shrimp, *Palaemonetes pugio*: identification of active components in food extracts and evidence of synergistic mixture interactions. Chemical Senses Vol. 11(1): 49-64.
- CARR, W.E.S., H.G. TRAPIDO-ROSENTHAL & R.A.GLEESON** (1989) Stimulants of feeding behavior in marine organisms: receptor and perireceptor events provide insight into mechanisms of mixture interactions. In *Perception of Complex Smells and Tastes*. Academic Press, Australia, pp:27-45.
- CARTER, J.A. & STEELE, D.H.** (1982) Attraction to and selection of prey by immature lobsters *Homarus americanus*. Canadian Journal of Zoology. 60: 326-336.
- CASTRO CAMPOS E.** (1992) Calidad nutricional y biotoxicología de harinas de pescado. Tec. Avipecuaria. Año 5, No. 48:12-16.
- COHEN, S.S., S. MORGAN & I. STREIBEL** (1969) The polyamine content of the t-RNA. Pros. Natl. Acad. Sci. 61:669-676.
- COSTA-PIERCE, B.A. & E.A.LAWS** (1985) Chemotactically-active feed additive for prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). The Progressive Fish Culturist 47(1), 59-61.
- COSTERO M.C. & S.P. MEYERS** (1993a) Evaluation of chemoreception by *Penaeus vannamei* under experimental conditions. Preogressive Fish Culturist. 55:157-162.
- COSTERO M.C. & S.P. MEYERS** (1993b) Application of an agar disk bioassay for chemoreception by *Penaeus vannamei* Bonne. Prog. Fish Cult. (In press).
- COSTERO M.C. & S.P. MEYERS** (1993c) Consideraciones sobre atrayentes quimicos y estimulantes de la alimentación del camarón de cultivo *Penaeus vannamei* (Bonne). Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. Mendoza, Cruz y Rique Editores. Monterrey, N.L.
- COWEY, C.B. & C.Y. CHO** (1992) Failure of Dietary Putrescine to Enhance the Growth of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can J. Fish. Aquat. Sci. 49:2469-2473.
- DALOZE, D., J.C. BRAEKMAN & B. TURSCH** (1980) Chemical communication in the marine environment. In R. Gilles (ed.), *Animal Environmental Fitness. Physiological and Biochemical Aspects of Adaptation and Ecology*, Vol. 1 Invented lectures. Pergamon Press, Oxford, pp.243-261.
- DANIEL, P.C. & R.C. BAYER** (1987) Development of chemically mediated prey-search response in postlarval lobster (*Homarus americanus*) through feeding experience. Journal of Chemical Ecology 13:13-27.

CARR, W.E.S. & C. DERBY (1986) Behavioral chemoattractants for the shrimp, *Palaemonetes pugio*: identification of active components in food extracts and evidence of synergistic mixture interactions. Chemical Senses Vol. 11(1): 49-64.

CARR, W.E.S., H.G. TRAPIDO-ROSENTHAL & R.A.GLEESON (1989) Stimulants of feeding behavior in marine organisms: receptor and perireceptor events provide insight into mechanisms of mixture interactions. In *Perception of Complex Smells and Tastes*. Academic Press, Australia, pp:27-45.

CARTER, J.A. & STEELE, D.H. (1982) Attraction to and selection of prey by immature lobsters *Hommarus americanus*. Canadian Journal of Zoology. 60: 326-336.

CASTRO CAMPOS E. (1992) Calidad nutricional y biotoxicología de harinas de pescado. Tec. Avipecuaria. Ano 5, No. 48:12-16.

COHEN, S.S., S. MORGAN & I. STREIBEL (1969) The polyamine content of the t-RNA. Pros. Natl. Acad. Sci. 61:669-676.

COSTA-PIERCE, B.A. & E.A.LAWS (1985) Chemotactically-active feed additive for prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). The Progressive Fish Culturist 47(1), 59-61.

COSTERO M.C. & S.P. MEYERS (1993a) Evaluation of chemoreception by *Penaeus vannamei* under experimental conditions. Preogressive Fish Culturist. 55:157-162.

COSTERO M.C. & S.P. MEYERS (1993b) Application of an agar disk bioassay for chemoreception by *Penaeus vannamei* Bonne. Prog. Fish Cult. (In press).

COSTERO M.C. & S.P. MEYERS (1993c) Consideraciones sobre atrayentes quimicos y estimulantes de la alimentación del camarón de cultivo *Penaeus vannamei* (Bonne). Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. Mendoza, Cruz y Rique Editores. Monterreey, N.L.

COWEY, C.B. & C.Y. CHO (1992) Failure of Dietary Putrescine to Enhance the Growth of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can J. Fish. Aquat. Sci. 49:2469-2473.

DALOZE, D., J.C. BRAEKMAN & B. TURSCH (1980) Chemical communication in the marine environment. In R. Gilles (ed.), *Animal Environmental Fitness. Physiological and Biochemical Aspects of Adaptation and Ecology*, Vol. 1 Invented lectures. Pergamon Press, Oxford, pp.243-261.

DANIEL, P.C. & R.C. BAYER (1987) Development of chemically mediated prey-search response in postlarval lobster (*Homarus americanus*) through feeding experience. Journal of Chemical Ecology 13:13-27.

- DERBY, C.D. & J. ATEMA (1981) Chemosensitivity of walking legs of the lobster *Homarus americanus*: neurophysiological response spectrum and thresholds. J. Exp. Biol. 98:303-315.
- DERBY, C.D. & J. ATEMA (1982) The function of chemo- and mechanoreceptors in lobster (*Homarus americanus*) feeding behaviour. Journal of Experimental Biology 98, 317-327.
- DERBY, C.D. (1984) Molecular weight fractions of natural foods that stimulate feeding in crustaceans, with data from the lobster *Homarus americanus*. Mar. Behav. Physiol. Vol 10, pp.273-282.
- DERBY, C.D. & S.HARPAZ (1988) Physiology of chemoreceptor cells in the leg of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 90A(1): 85-91.
- DUNHAM, D. & J. OH (1992) Chemical Sex Discrimination in the Crayfish *Procambarus clarkii*: Role of Antennules. J. of Chemical Ecology. 18(12):2363-2371.
- FELLER, R.J., G.L. TAGHON, E.D. GALLAGHER, G.E. KENNY & P.A. JUMARS (1979) Immunological methods for food web Analysis in a Soft-Bottom Benthic Community. Marine Biology 54:61-74.
- FINNE, G. (1979) Non-Protein Nitrogen Compounds in Fish and Shellfish. Advances in Sea Food Biochemistry. U.S.A. pp:393-401.
- FONTAINE, M.T., A.G. BAUCHAU & E. PASSELECQ-GERIN (1989) *Carcinus maenas* (L.)(Decapoda, Reptantia) sex pheromone: Site of synthesis. Crustaceana, 57(2):208-216.
- FUJITA, K., T. NAGATSU, K. SHINPO, K. MATUTA, R. TERRADARA & M. NAKAMURA (1980) Improved analysis for urinary polyamines by use of high voltage electrophoresis in paper. Clin. Chem. 26: 1577-1582.
- FUJITA, K., T. NAGATSU & K. SHINPO (1983) Assay Methods for polyamines. In Methods in Biogenic Amine Research. Edited by S. Parvez, T. Nagatsu & H. Parvez.
- FUKE, S., S. KONOSU & K. INA (1981) Identification of Feeding Stimulants for Red Sea Bream in the Extract of Marine Worm *Perinereis brevicirrus*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 47(12): 1631-1635.
- FUZESEY, Z., W. CARR & B. ACHE (1978) Antennular Chemosensitivity in the Spiny Lobster *Panulirus argus*: Studies of Taurine Sensitive Receptors. Biol. Bull. 154:226-240.

GERHART, D.J. (1984) Prostaglandin A₂: an agent of chemical defense in the Caribbean gorgonian *Plexaura homomalla*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 19:119-134.

GLEESON R.A., M.A. ADAMS, & A.B. SMITH (1984) Characterization of a sex pheromone in the blue crab, *Callinectes sapidus*: Crustecdysone studies. Journal of Chemical Ecology 10(6):913-921.

GLEESON, R.A., M.A. ADAMS & A.B. SMITH (1987) Hormonal Modulation of Pheromone-Mediated Behavior in a Crustacean. Biol. Bull. 172: 1-9.

GLEESON R.A. (1990) Intrinsic factors mediating pheromone communication in the blue crab, *Callinectes sapidus*. In: Crustacean Sexual Biology. Columbia University Press. New York. pp 17-32.

GOUYGOU, J.P.; MERTIN, C.; SINQUIN, C. & DURAND, P. (1989) Determination of biogenic amines in fish. Oceanis. 15: 599-604.

GRANT, A.L., R.E. HOLAND, J.W. THOMAS, K.J. KING & J.S. LIESMAN (1989) Effects of Dietary Amines On the Small Intestine In Calves Fed Soybean Protein. American Institute of Nutrition. 1034-1041.

HAALAND, H., E. ARNESEN & R. NJAA (1990) Amino Acid Composition of Whole Mackarel (*Scomber scombrus*) stored anaerobically at 20°C and at 2°C. International Journal of Food Science and Technology. 25:82-87.

HAINEN J.M. (1980) Chemoreception in decapod crustacea and chemical feeding stimulants as potential feed additives. Proc. World Maricul. Soc. 11:319-334.

HARA, T.J. (1982) Structure-Activity Relationship of Amino Acids as olfactory stimuli. In Chemoreception in Fishes. Edited by Toshiaki J. Hara. Elsevier Scientific Publishing Company. Canada, pp: 135-155.

HARADA, K. (1986) Feeding Attraction Activities of Nucleic Acid-Related Compounds for Abalone, Oriental Weatherfish and Yellowtail. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 52(11):1961-1968.

HARADA, K., T. MIYASAKI & T. YAKIYOSI (1994) Chemoattract effects of sugar and their related compound on black abalone *Haliotis discus*. Comp. Biochem. Physiol. 109 A (1):111-115.

HARPAZ, S., KAHAN, D., GALUN, R & I. MOORE (1987) Responses of fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*, to chemical attractants. Journal of chemical ecology. Vol. 13, No. 9.

- HARPAZ, S. & J.E.STEINER** (1990) Analysis of Betaine-induced feeding behavior in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1987) (Decapoda, Caridae). Crustaceana 58 (2) 175-185.
- HATT, H.** (1984) Structural requirements of amino acid and related compound for stimulation of receptors in crayfish walking leg. J. Comp.Physiol. A. 155:219-231.
- HAZLETT, B.** (1984) Chemical Detection of Sex And Condition in the Crayfish *Orconectes virilis*. J. of Chemical Ecology, 11(2):181-189.
- HENTSCHEL, B. & J. FELLER** (1990) Quantitative immunoassay of the proventricular contents of white shrimp *Penaeus setiferus* Linnaeus: a laboratory study. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 139:85-99
- HENRIK, H.** (1988) Fresh Fish-Quality ant Quality Changes. FAO Fisheries series No. 29. Roma, pp:27-61.
- HILL J. & J. WASSENBERG** (1987) Feeding behaviour of adult Tiger Prawns, *Penaeus esculentus*, Under Laboratory Conditions. Aust. J. Mar. Freshw. Res. 38:183-190.
- HINDLEY J.P.R.** (1975) The detection, location and recognition of food by juvenile banana prawns, *Penaeus merguensis* de Man. Marine Behaviour and Physiology 3, 193-210.
- HOESE, H.D. & D. HOESE** (1967) Studies on the biology of the feeding reaction in *Gabiosoma bosci*. Tulane Studies Zool. 14:55-62.
- HOLLAND, K.N. & B.J.RUSELL** (1993) A palatability bioassay for determining ingestive stimuli in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 109:153-164.
- INGLES, D., J. F. BACK, D. GALLIMORE. R. TINDALE & K. SHAW** (1985) Estimation of Biogenic Amines in Foods. J. Sci. Food Agric. 36:402-406.
- KITTREDGE, J.S., M.TERRY & F.T.TAKAHASHI** (1971) Sex pheromone activity of the molting hormone, crustecdysone, on male crabs (*Pschygrapsus crassipes*, *Cancer antennarius* and *C. anthonyi*). U.S. Fish Wildl. Serv. Fish Bull. 69:337-343.
- KLAUSEN, N. & E. LUND** (1986) Formation of Biogenic Amines in Herring and Mackerel. Z. Lebens Unters Forsh. 182:459-463.
- KRATT C.M. & D. RITTSCHOF** (1991) Peptide Attraction of Hermit Crabs *Clibanarius vittatus* Bosc: Roles of Enzymes and Substrates. J. of Chemical Ecology. 17(12):2347-2365.

KUBA K., S.MIYASAKY & Y.UMEMURA (1983) Contents of free histidine and histamine in fish meals and in the model compounds and their toxicities to induce gizzard erosion. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.) 23:69-70.

LAVERACK, M.S. (1968) On the receptors of marine invertebrates. Annual Review of Oceanography and Marine Biological 6:249-324.

LEE, P.G. & S. MEYERS (1995) Chemoattraction and Feeding Stimulation. In Press.

LIM, C. & W. DOMINY (1989) Evaluation of soybean meal as replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). Draft, pp. 22.

LINDSTEDT, J. (1971) Chemical Control of Feeding Behavior. Comp. Biochem. Physiol. Vol.39A, pp:553-581.

LING, S.W. (1969) The General Biology and Development of *Macrobrachium rosenbergii* (LE MAN). Proceedings of the World Scientific Conference on the Biology and Culture of Shrimps and Prawns. Roma. pp: 589-606.

MACKIE, A.M. & R.G. SHELTON (1972) A whole-animal bioassay for the determination of the food attractants of the lobster *Homarus gammarus*. Marine Biology. 14:217-221.

MACKIE, A.M. (1973) The Chemical Basis of Food Detection in the Lobster *Homarus gammarus*. Mar. Biol. 21: 103-108.

MACKIE, A.M. (1982) Identification of the gustatory feeding stimulants. In Chemoreception in Fishes. Edited by Toshiaki J. Hara. Elsevier Scientific Publishing Company. Canada. pp:228-240

MACKIE, A.M. & A.I.MITCHELL (1985) Identification of gustatory feeding stimulants for Fish-Applications in Aquaculture. In Nutrition and feeding in fish. Edited by C.B.Cowey, A.M.Mackie & G. Bel. Academic Press. Great Britain. pp: 177-189.

MAGALLON, F. (1980) Datos Sobre el Cultivo de Langostino Asiático *Macrobrachium rosenbergii* (LE MAN) en México. Memorias de Segundo Simposio Latinoamericano de Acuicultura. México. Vol. 1: 621-639.

McLEESE, D.W. (1973) Orientation of lobsters *Hommarus americanus* to odor. J. of the Fish. Res. Board of Canada. 30: 838-840.

MENDOZA, R. (1993a) Métodos para evaluar la digestibilidad proteica de los alimentos destinados a los organismos acuáticos. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de alimentos en acuicultura. México. pp. 155-204.

- MENDOZA, R.** (1993b) Utilización de fuentes de proteína no convencionales y reciclamiento de subproductos para acuicultura. Memorias del Curso Teórico-Práctico sobre extrusión y sus aplicaciones en nutrición animal. México.
- MENDOZA, R.** (1994) Utilización de métodos inmunológicos en el estudio de la nutrición de organismos acuáticos. Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. México.
- MERK INDEX.** Eleventh Editran Centennial Edition.
- MILLER, B.** (1993) Effect of Langobuds as an Attractant for *P. monodon*. International Aquaculture Newsletter. Published by Quali Tech. Vol 4, No.1. U.S.A.
- MURRAY, C.F.; HOBBS, G. & R.G. GILBERT** (1982) Scombrotxin and Scombrotxin-like poisoning from *channel fish*. J. of Hygiene, 82:215-220.
- NEW, M.B.** (1976) A review of dietary studies with shrimp and prawns. Aquaculture 9:101-144.
- NEW, M.B.** (1982) Freshwater Prawn Farming. A Manual for the culture of *Macrobrachium rosenbergii*. FAO Fisheries Technical Paper No. 225. Roma, pp.115.
- NEW, M.B.** (1990) Freshwater Prawn Culture: A Review. Aquaculture. 88:99-143.
- NORDLUND, D.A., JONES, R.L. & W.J. LEWIS** (1981) Semiochemicals, their role in pest control. Wiley Interscience Publication. New York, pp 306.
- PFEIFFER W.** (1982) Chemical Signals in Communication. In Chemoreception in Fishes. Edited by Toshiaki J. Hara. Elsevier Scientific Publishing Company. Canada. pp:228-240
- POOLE, D.** (1993) Las Aminas Biogénicas Pueden Afectar el Desempeño de las Aves de Corral. Memorias de Seminario Técnico sobre Nutrición Avícola. México. pp: 33-41
- PROVASOLI, L.** (1976) Nutritional aspects of creustacean aquaculture. In K.S. Price (eds.), Proceedings of the First International Conference on Aquaculture Nutrition. Collage of Marine Studies, University of Delaware, Newark.
- RAINA A.** (1963) Studies on the determination of spermadine and spermina and their metabolism in teh developing chick embryo. Acta Physiol. Scand. 60:218-222.
- RITTSCHOF, D.** (1980) Enzimatic production of small molecules attracting hermit crabs to stimulated gastropod predation sites. J.Chem. Ecol. 6(3):665-675.

- RITTSCHOF, D. & P. SUTHERLAND** (1986) Field Studies on Chemically Mediated Behavior in Land Hermit Crabs: Volatile and Nonvolatile Odors. J. of Chemical Ecology. 12(6): 1273-1283.
- RITTSCHOF, D.** (1990) Peptide-Mediated Behaviors in Marine Organisms. Evidence for a Common Theme. J. of Chemical Ecology. 16(1):261-271.
- RITTSCHOF, D.** (1993) Body Odors and Neutral-Basic Peptide Mimics: A review of Responses by Marine Organisms. Amer. Zool., 33:487-493.
- ROJAS, J.C., E.A.MALO, A.GUTIERREZ & R.N. ONDARZA.** (1990) Mating behavior of *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. Ann. Entomol. Soc. Am. 83.
- ROSSY, A.C.** (1969) Chemical Signals and Nest-Building in two species of Colisa (Piscis, Anabantidae). Monit. Zool. Ital. 3:225-237.
- SAGY, A. & Z. RAANAN** (1985) Rapid identification of reproductive state and the receptive period of females in pond populations of *Macrobrachium rosenbergii*- A new technique. Aquaculture, 48:365-367.
- SAMEJIMA, K., M. KAWASE, S. SAKAMOTO & M. OKADA** (1976) A sensitive fluorometric method for determination of aliphatic diamines and polyamines in biological materials by high-speed liquid chromatography. Anal Biochem. 6: 392-404.
- SARAGUCHI, M.; MURATA, M. & A. KAWAI** (1982) Changes in free amino acids and creatine contents in yellow tail (*Seriola quinquiradiata*) muscle during ice storage. J. of Food Science, 47: 1662-1666.
- SCHMITT, R. J. & S. J. HOLBROOK** (1985) Patch Selection by Juvenile black surfperch (Embiotocidae) under variable risk: interactive influence of food quality and structural complexity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 85:269-285.
- SEPESCA** (1987) Pesquerias Mexicanas. Estrategias para su Administración. (Esquema para la Administración del langostino). pp. 907-941.
- SEPESCA** (1990) Anuario Estadístico de Producción Pesquera. Cifras de 1988. México. 428p.
- SMITH, T.A.** (1970) The quantitative estimation of putrescine by gas chromatography. Anal Biochem. 33: 10-15.
- SMITH, T.K.** (1990) Effect of Dietary Putrescine on Whole Body Growth and Polyamine Metabolism. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 194: 332-336.

- SUZUKI, S., K. KOBAYASHI & K. TAKAMA** (1994) Occurrence of Biogenic Amines at Different Processing Stages of Dried Herring. Fisheries Science 60(3):353-354.
- TAKAYANAGI, H., Y. YAMAMOTO & N. TAKEDA** (1986) Ovary-Stimulating Pheromone in the Freshwater Shrimp, *Paratya compressa*. Exp. Zoology. 240: 397-400.
- TAKEI M.** (1977) Feeding behavior of crabs *Erimacrus isenbekii* and *Neptunus trituberculatus*. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 89:75-82.
- TAYLOR, S.L.** (1984) Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. CRC Critical Review of Toxicology, 17: 91-128.
- THURMAN, E.M.** (1986) Organic Geochemistry of Natural Water. Nijhoff/Junk, Dordrecht.
- TIERNEY, A.J. & D.W. DUNHAM** (1982) Chemical communication in the reproductive isolation of the crayfishes, *Orconectes propinquus* and *Orconectes virilis* (Decapoda, Cambaridae). Journ. Crust. Biol., 2:544-548.
- TIERNEY, A.J. & J. ATEMA** (1987) Behavioral responses of crayfish (*Orconectes virilis* and *Orconectes rusticus*) to chemical feeding stimulants. Journal of chemical Ecology, Vol. 14, No.1, pp 123-133.
- VIANA, M., M. CERVANTES-TRUJANO & R. SOLANA-SENSORES** (1994) Attraction and palatability activities in juvenile abalone (*Haliotis fulgens*): nine ingredients used in artificial diets. Aquaculture 127:19-28.
- WALKER, M.J.** (1984) Methods in Molecular Biology. Vol. 1 "Proteins". John M. Walker (Ed). Human Press, Clifton.
- WILCOX, R. & H.P. JEFFRIES** (1974) Feeding habits of the sand shrimp *Cragon septemspinosa*. Biological Bulletin 146:424-434.
- WOLFGANG, PFEIFFER** (1990) Chemical signals in communication. In Chemoreception in Fishes. Edited by Toshiaki J. Hara. Elsevier Cientific Publishing Company.
- ZALDIVAR, L.** (1992) Criterios de calificación de harinas de pescado. CORPESCA Sep-Oct 43-47.
- ZAR. J.H.** (1982) Bioestatistical Analysis. Prentice-Hall, Inc. N.J. pp.345.
- ZEECK, E., HARDEGE, J.D., BARTELS-HARDEGE, H., WILLIG, A. & G. WESSELMANN** (1991) Sex Pheromones In a Marine Polichaete: Biologically Active Compounds from female *Platynereis dumerilii*. Journal of Exp. Zoo. 260:93-98.

ZIMMER-FAUST R.K., J.E. TYRE, W.C. MICHEL & J.F.CASE (1984) Chemical mediation of appetitive feeding in a marine decapod crustacean: the importance of suppression and synergism. Biological Bulletin 167:339-353.

ZIMMER-FAUST, R.K. (1987) Crustacean Chemical Perception: Towards a Theory on Optimal Chemoreception. Biol. Bull. 172:10-29.

ZIMMER-FAUST, R.K. (1989) The relationship between chemoreception and foraging behavior in crustaceans. Limnol. Oceanogr., 34(7): 1367-1374.

ZIMMER-FAUST, R.K. (1991) Chemical signal-to-noise detection by spiny lobsters. Biological Bulletin. 181: 419-426

