

## RESUMEN

La acuicultura se ha convertido en una de las industrias con mayor crecimiento en el mercado mundial y su expansión ha traído como consecuencia un aumento en la demanda en cantidad y calidad de alimentos para los organismos acuáticos. Una de las alternativas para mejorar la eficiencia de los alimentos es la adición de atractantes en las dietas, lo que contribuye a que los animales localicen rápidamente el alimento, con el fin de maximizar la ingestión y así contribuir a mejorar las tasas de conversión alimenticia. Esta aproximación disminuye además los problemas asociados con la acumulación de sedimentos orgánicos en los estanques de producción y el posible impacto ambiental en la zona donde son liberados los afluentes (Boyd y Tucker, 1995).

El presente estudio fue orientado a evaluar el potencial atractivo de moléculas naturales como las aminas biogénicas (Putrescina, Cadaverina, Tiramina, Espermina y Espermidina) y sus aminoácidos precursores (Arginina, Histidina, Lisina y Tirosina), así como extractos de animales (peces, crustáceos y moluscos) y vegetales (*Chara sp.*, coco y alfalfa).

La metodología se dividió en tres fases jerarquizadas, 1) una serie de bioensayos de quimiodetección (Piteet, 1996, modificado), 2) un bioensayo de quimioatracción (Costero y Meyers, 1993, modificado), y 3) un bioensayo de campo llevado a cabo en condiciones comerciales (Mendoza *et al.*, 1997).

Los atractantes que presentaron mejores resultados para *M. rosenbergii* fueron la Arginina, la Cadaverina, el liofilizado de langostilla y el extracto de coco a una dosis de 0.33, 0.32, 0.27 y 1.48% respectivamente. Para *P. clarkii*, el extracto de pescado (2.96%), la Putrescina (0.30%) y el agua de cola de langostilla (2.69%) obtuvieron los mejores resultados. En el caso de *L. vannamei*, los mejores tratamientos resultaron ser la Cadaverina (0.249%), la Arginina (0.255%), el extracto de coco (1.25%) y el liofilizado de langostilla (0.298%). Por último, los mejores tratamientos para *L. stylirostris* fueron el extracto de coco (3.18%), la Arginina (0.25%), la Cadaverina (0.38) y el agua de cola de langostilla (3.36%).

La relevancia de éste estudio se refleja en el hecho de que la adición de atractantes no solo promovió la rápida localización del alimento, sino que también propició un aumento significativo en el consumo de la dieta comercial (hasta más de un 300%), la cual ya contaba con una fuente de atractivo. Este aspecto es particularmente importante ya que la detección y la ingestión del alimento determinarán finalmente el valor comercial de las dietas para organismos acuáticos. Por último, la adición de atractantes en las dietas, además de presentar amplias ventajas económicas, constituye una buena práctica para la conservación del ambiente en el cual se desarrollan los organismos.

## INTRODUCCION

La acuicultura se ha convertido en una de las industrias con mayor crecimiento en el mercado mundial y su expansión ha traído como consecuencia un aumento en la demanda de cantidad y calidad de alimentos para los organismos acuáticos. Este aspecto es de suma relevancia si se considera que la alimentación es uno de los factores más importantes dentro de los costos de producción en las granjas acuícolas (Holland y Rusell, 1993), llegando a representar entre 40-60% en la producción de salmónidos y 50% en el caso de los peneidos (Mendoza *et al*, 1998). Por esta razón, se han venido desarrollando objetivos orientados a mejorar la eficacia de los alimentos, y una de las alternativas que mayores ventajas y beneficios ofrece es la adición de atractantes en estos, ya que a pesar del gran esfuerzo que realizan los investigadores para formular dietas que cubran los requerimientos nutritivos de cada especie, estas no podrán ser aprovechadas, al menos que se garantice la ingestión del alimento (Mendoza *et al*, 1997).

A este respecto, es pertinente considerar que el alimento representa la mayor fuente de contaminación en los estanques, lo cual se traduce no solamente en problemas ecológicos sino también económicos, ya que la utilización de dietas inadecuadas provoca su acumulación en el sedimento, lo que implica que al final de cada cosecha se requiera de más tiempo y trabajo para mantener el sedimento del estanque en condiciones adecuadas. Esta condición repercute directamente en la disminución de la calidad del agua, afectando así el crecimiento de los organismos, lo cual a su vez significa mayores gastos de operación y producción, todo esto sin contar la contaminación de los efluentes donde es liberada el agua de las granjas (Lawrence, 1999). Dentro de este contexto, una aportación significativa es la utilización de atractantes alimenticios, ya que contribuye a que los animales localicen rápidamente el alimento, maximizando y asegurando así su ingestión (Costero y Meyers, 1993).

No obstante que la inclusión de atractantes se considera definitiva para garantizar la ingestión del alimento en condiciones comerciales, estas 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 que se encuentran presentes tanto en el bentos como

en la columna de agua, por lo que es necesario identificar moléculas con el mayor poder *atractante* posible.

Dentro de las aproximaciones utilizadas para investigar el papel de los *atractantes*, hasta la fecha la mayor parte de las investigaciones se han restringido a la evaluación de extractos animales y algunos compuestos de bajo peso molecular (aminoácidos y nucleótidos principalmente). Esto ha originado que los productores de alimentos utilicen diversos ingredientes a los que genéricamente se han venido refiriendo como *atractantes*, encontrándose entre los más conocidos las harinas de pescado y camarón y extractos solubles de pescados marinos y calamar. Sin embargo, su inclusión dentro de la formulación de alimentos no necesariamente implica que funcionen como *atractantes*, debido principalmente a la variabilidad del producto, determinada a su vez por el tipo de proceso, la especie utilizada, el estado de la *materia prima*, etc.

En virtud de la importancia creciente de los *atractantes* dentro del campo de la elaboración de los alimentos acuícolas y considerando el potencial que presentan algunas aminas biogénicas (Cadaverina y Putrescina) como estimulantes alimenticios (Mendoza *et al.*, 1997), se decidió establecer una nueva serie experimental destinada a probar las dosis más adecuadas de éstas y otras aminas biogénicas y su eficiencia al ser comparadas con sus amino ácidos precursores. Por otra parte, en búsqueda de alternativas más económicas, la presente investigación se orientó a la identificación de fracciones *atractantes* a partir de extractos animales y vegetales, considerando su facilidad de obtención y bajo costo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar el potencial de moléculas sintéticas: aminas biogénicas y sus aminoácidos precursores, así como de extractos de animales y vegetales, como estimulantes alimenticios, al ser adicionados en dietas experimentales y comerciales destinadas a crustáceos marinos y dulceacuícolas.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar la dosis óptima para cada uno de los tratamientos experimentales.
- Estimar el efecto sinérgico de los atractantes putativos.
- Establecer cuales fracciones le confieren el poder attractante a ciertos extractos animales y vegetales.
- Estimar la relación costo - beneficio de los atractantes que ofrecieron los mejores resultados.
- Identificar los mejores atractantes y estimulantes alimenticios para cada una de las especies de crustáceos utilizadas.

## **HIPOTESIS**

Si las distintas especies de crustáceos producidos a nivel comercial tienen diferentes hábitos alimenticios, entonces estas serán atraídas por diferentes moléculas.

## ANTECEDENTES

### **LANGOSTINO (*Macrobrachium rosenbergii* De Man)**

#### **CARACTERISTICAS Y PRODUCCION**

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 en su manejo, tales como poca agresividad con respecto a otras especies de langostinos, rápido crecimiento, gran adaptabilidad y resistencia (Magallon, 1980).

La producción mundial de *M. rosenbergii* en 1989 fue de 27,000 toneladas métricas, siendo Tailandia, Vietnam y Taiwan los principales productores (New, 1990). Para 1992 su producción se incrementó a 31, 235 toneladas métricas (FAO, 1994), y para 1997 la producción se incrementó a 46,000 toneladas (Bird, 1998).

En México, el cultivo comercial de langostino se inició en 1984 en los estados de Veracruz, Tamaulipas, Morelos, Colima y Jalisco. Para 1988 existían ya 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). Estos reportes oficiales contrastan con lo reportado por New (1990) quien señala 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. Debido a estos bajos volúmenes de producción, New (*op. cit.*) describió a México como "el gigante dormido" de América, adjudicando esta baja de producción al mayor interés existente en la producción de camarones marinos en el país.

#### **HABITOS ALIMENTICIOS**

El langostino *Macrobrachium rosenbergii* presenta hábitos alimenticios del tipo omnívoro y su alimentación normal incluye gusanos e insectos acuáticos, pequeños moluscos y

crustáceos, cadáveres de peces y otros animales, además de semillas, frutas, algas, tallos y hojas suaves de plantas acuáticas. En estadio juvenil consumen cualquier tipo de materia orgánica, viva o muerta y pueden llegar a recurrir al canibalismo (Ling, 1969; New, 1990; Holschmith, 1988; SEPESCA, 1990). Mientras que en condiciones de cultivo, los langostinos adultos pueden ser mantenidos con alimentos comerciales y trozos de hígado de res y calamar dos veces por semana (Daniels, *et al.* 1992).

Por otra parte, Fonseca (1980), al experimentar con *Macrobrachium* sp. en estanques de concreto con diferentes alimentos ricos en proteínas, como carne de pescado y alimentos balanceados para pollos, observó que el suministro de éstos no se reflejaba en un mayor rendimiento al que se presentaba en estanques rústicos, concluyendo que la alimentación natural era importante para su cultivo.

### ***ACOCIL ROJO (Procambarus clarkii)***

#### ***CARACTERISTICAS Y PRODUCCION***

*Procambarus clarkii*, comúnmente llamado acocil rojo, se distribuye naturalmente en los estados del noreste de México, así como en los Estados Unidos, específicamente en Texas, Alabama, Louisiana, Mississippi, Florida, Arkansas, Tennessee, Missouri, Illinois, Nuevo México y Oklahoma. (Huner y Barr, 1982; Hobbs III *et al.*, 1989). Estos organismos son considerados como la principal fauna macrobentónica en zonas lólicas y lénticas (Momot, 1984), presentan hábitos nocturnos por lo que en el día se esconden entre la vegetación acuática, debajo de rocas y en sus madrigueras (Huner y Barr, 1982).

El acocil rojo es una especie atractiva para la acuicultura debido principalmente a que posee una gran capacidad de adaptación a diferentes hábitats, además de que presenta un rápido crecimiento y un alto potencial reproductivo (Huner y Barr, 1982; LaCaze, 1981). La mayor producción comercial de esta especie se lleva a cabo en los Estados Unidos, principalmente en el sur del estado de Louisiana, en donde se cosecha cerca del 98% de la producción total, en una área de más de 100,000 acres (Huner y Barr, 1982).

El sistema de cultivo para el acocil rojo implica la utilización de trampas con carnada para su cosecha, la que representa del 60 al 80% de los costos de producción (De La Bretone y Romaine, 1991), por lo que, la rápida expansión de esta industria en los E.U. ha incrementado la demanda por carnadas o cebos efectivos y de bajo costo (Cauge, *et al*, 1982).

Entre las carnadas utilizadas más comúnmente destacan peces como sardinas, carpas y bagres y también se ha utilizado carne de res, especialmente el hígado (Huner y Barr, 1982). Esto vino a ser confirmado por Rodríguez (1993) quien al comparar la efectividad de diversos cebos, encontró que el hígado de res ofrecía mejores resultados que las vísceras de pollo, el músculo de pescado y la cabeza de camarón.

### *HABITOS ALIMENTICIOS*

Los acociles son particularmente activos después del atardecer y continúan su actividad de alimentación hasta el amanecer. Las plantas acuáticas son componentes esenciales en la dieta de esta especie, sin embargo, recientemente se ha demostrado que también consumen animales planctónicos como copépodos, pulgas de agua y ostrácodos. Estos organismos obviamente proveen a los acociles de nutrientes ausentes en plantas verdes y detritus, aunque el consumo de estos no excede del 10% del consumo total (Huner y Barr, 1982).

Por otra parte, Wiernicki (1984) encontró que la eficiencia alimenticia de juveniles de acociles es relativamente mayor cuando consume *Elodea sp.* descompuesta que cuando consume *Elodea* fresca. A partir de lo anterior fue posible estimar que al menos un 70% de su dieta esta constituida por nutrientes de origen bacterial o fúngico.

### **CAMARON BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) y CAMARON AZUL (*Litopenaeus stylirostris*)**

#### *CARACTERISTICAS Y PRODUCCION*

El camarón es uno de los recursos más explotados desde la década de los 70's. En virtud de su demanda, en México estas especies se han venido cultivando en varios estados de la República, adicionalmente a las capturas regulares que se llevan a cabo a lo largo de las costas del Océano Pacífico (Martínez, 1993).

El cultivo de camarón se ha convertido en una industria multimillonaria a nivel mundial, con producciones que se han incrementado de 170,000 TM en 1984 a 932,000 TM en 1995, representando el 29% del mercado mundial de crustáceos (FAO, 1997).

En México, el camarón constituye uno de los recursos pesqueros más importantes por su volumen de captura y su alto valor comercial, desafortunadamente las pesquerías tendieron a disminuir en los últimos años, lo que propició que el cultivo de camarón se haya convertido en la principal actividad dentro de la acuicultura a nivel nacional (FAO, 1997), creciendo a razón de un 10% anual en los últimos años. La producción total mexicana de camarones cultivados en granjas en el año de 1997 fue de 17,000 toneladas, de las cuales el 75% correspondió a *Litopenaeus stylirostris* y el restante 25% a *L. vannamei*. Las cifras anteriores corresponden al 2.3% de la producción mundial en el mismo año (Rosenberry, 1998). En 1999 la producción total de camarones peneidos bajo a 13,315 toneladas (Gallagher, 2000) debido probablemente a que muchas granjas fueron afectadas por el Huracán Mitch a finales de 1998 (Rosenberry, 1998).

La diferencia presentada en la producción por especie se debe principalmente a que se han desarrollado nuevas líneas de *L. stylirostris* resistentes a diferentes enfermedades, además de que la mayoría de las granjas en México operan bajo condiciones de alta salinidad (> 45 ppt), lo que favorece el cultivo de esta especie (Clifford III, 1998).

### *HABITOS ALIMENTICIOS*

Los hábitos alimenticios de los camarones peneidos son difíciles de determinar, pero en general se han descrito como omnívoros oportunistas, alimentándose de cualquier materia animal o vegetal disponible, incluyendo material de detritos (Mc Tighe y Zimmerman, 1991). Se ha observado que en sus primeras etapas se alimentan de fitoplancton y zooplancton, mientras que los camarones juveniles y adultos son organismos carroñeros que se alimentan principalmente de tejidos y restos orgánicos que se encuentran en el bentos, tales como ciertas colonias de bacterias y de algas filamentosas asociadas a protozoarios, pequeños nemátodos y algunos copépodos, siendo éstos un importante componente de su dieta. Igualmente, consumen algunos vegetales entre los que se encuentran plantas terrestres y algas (Hindley 1975; Dall *et al.*, 1990; Martínez,



1993). Así mismo, se ha reportado que los peneidos son predadores de pequeños animales epi-bentónicos, especialmente crustáceos, poliquetos y moluscos (Sevilla, 1983).

De igual manera, los análisis de contenidos estomacales de peneidos revelaron la existencia de restos de poliquetos, crustáceos, moluscos, peces y vegetales. De aquí que se considere a los camarones como organismos omnívoros selectivos (Hindley, 1975).

En cultivos en laboratorio bajo condiciones controladas, los camarones son alimentados con nauplios de *Artemia* en sus primeras etapas y al alcanzar una talla mayor se les proporcionan dietas artificiales (Ayala y Valencia, 1987), además de todos aquellos organismos que se encuentran disponibles (plantas, algas unicelulares, detritos, etc.) en los estanques donde se cultivan.

Dentro de esta generalización cabe mencionar las diferencias entre los hábitos alimenticios de *L. stylirostris* y *L. vannamei*, ya que al primero se le ha catalogado como más carnívoro. Lo anterior fue corroborado al observar una mayor predisposición de las larvas de *L. stylirostris* para consumir nauplios de *Artemia* (Clifford III, 1998). De igual forma se han encontrado diferencias entre los hábitos alimenticios de especies emparentadas filogenéticamente, tal es el caso de *Penaeus setiferus* y *P. aztecus*, siendo la primera de hábitos carnívoros, mientras que la segunda es de hábitos herbívoros (McTigue y Zimmerman, 1991)

## PRODUCCION DE HARINAS PARA ALIMENTOS ACUATICOS

La producción de alimento para organismos acuáticos está basada principalmente en la utilización de harinas de pescado, las cuales le confieren a la dieta un adecuado contenido proteico, sustentado además por la presencia de un buen perfil de aminoácidos.

En México existen pocas compañías productoras de alimento para especies acuícolas, entre las cuales destacan tres compañías con base en Estados Unidos: Agribrands International (formalmente Ralston Purina International), Rangcn y Zeigler, que son las que dominan el

mercado de alimentos para camarón. La producción total consumida en nuestro país fluctúa alrededor de 40,000 toneladas métricas por año (Rosenberry, 1998).

#### *Importancia y Producción de la harina de Pescado.*

El 95% de la pesca mundial de peces es utilizado para la producción de harina. Mediante esta transformación se obtiene un producto más estable y con mayor contenido proteico que el pescado mismo (Barlow y Windsor, 1984). En relación con la industria acuícola, se ha estimado que en 1995 se consumió un 15% de la harina de pescado producida a nivel mundial (New, 1996) y se ha venido considerando que si la tendencia continua, se incrementará la demanda de harina de pescado para ser utilizada en dietas para organismos acuáticos (Mendoza, 1998).

Dentro del contexto de la producción de harinas, otra de las fuentes más prometedoras son las harinas de crustáceos, entre las que destacan la de camarón y la de langostilla.

#### *Importancia y Producción de la harina de Langostilla.*

Considerando que la langostilla (*Pleuroncodes planipes*) es probablemente el crustáceo decápodo bentónico más abundante de México, en los últimos años se ha vislumbrado la posibilidad de iniciar la pesquería de la langostilla en México debido a que es un recurso que se encuentra disponible prácticamente todo el año. Esta alternativa permitiría obtener los máximos rendimientos económicos mediante el aprovechamiento de la cola fresca-congelada y por otro lado aprovechar los residuos para la producción de harina, aceite, pigmentos y enzimas, asegurando con todo ello la permanencia del recurso a través de todo el año (Aurióles-Gamboa, *et al.*, 1995).

El proceso al que es sometida la langostilla para la obtención de los productos antes mencionados se muestra en la Figura 1.

# PROCESAMIENTO DE LA LANGOSTILLA

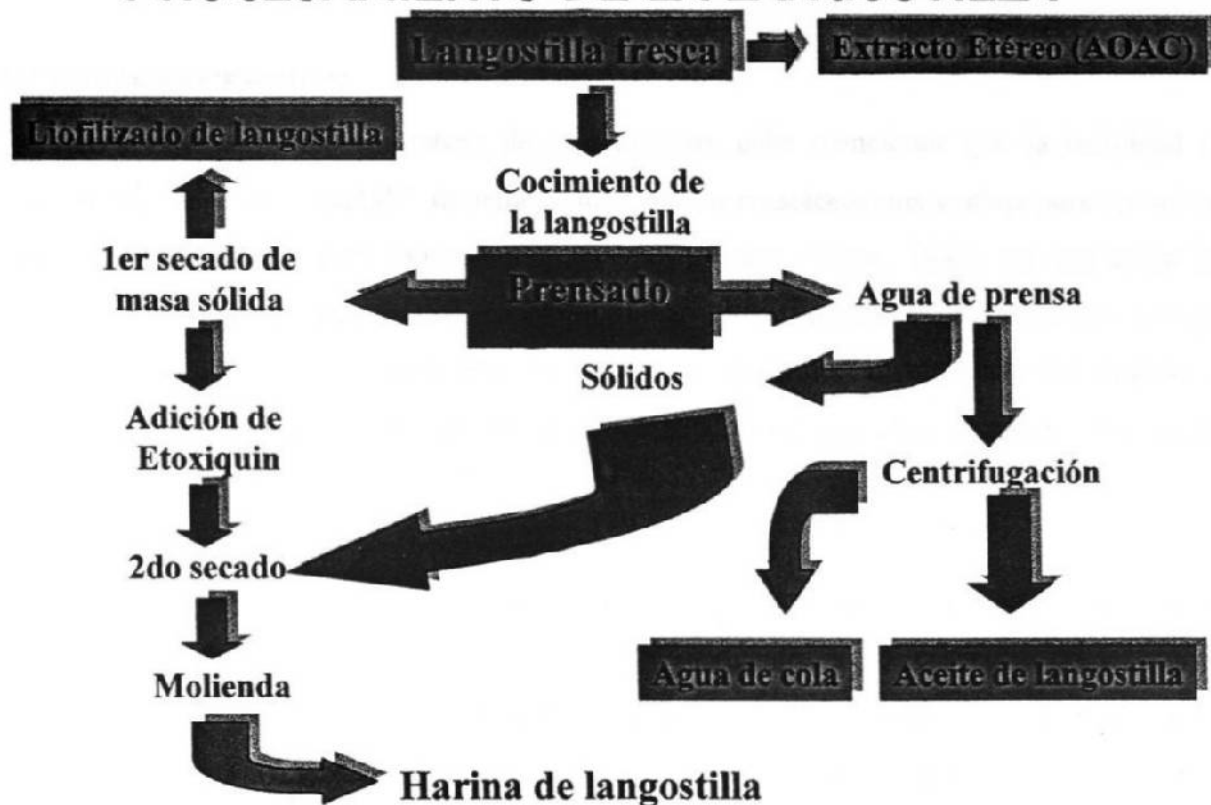


Figura 1.- Proceso de transformación de la langostilla para la obtención de harina y aceite.

El objetivo principal del cocimiento es el de esterilizar, coagular la proteína y liberar los lípidos retenidos en el producto. Por su parte, el objetivo del prensado es el de obtener una pasta con una mínima cantidad de agua y lípidos, y un licor de prensa, el cual al ser centrifugado se separa en aceite de langostilla y agua de cola. Al igual que en el procesamiento que se lleva a cabo para elaborar harinas de pescado (Abdó, 1994), la harina de langostilla se obtiene mediante una serie de procesos de secado y molienda

Tomando en cuenta lo anterior y considerando que la mayor cantidad de aminos biogénicas se concentra en el agua de cola (Veciana *et al.*, 1990; Zaldivar, 1992), además de ser

ésta un subproducto indeseable en la obtención de harina, la hace un buen prospecto para ser utilizada en pruebas de quimiorrecepción en crustáceos.

## QUIMIORRECEPCION

Para destacar la importancia de este proceso, cabe mencionar que la habilidad para detectar a lo lejos la calidad del alimento, confiere a los crustáceos una ventaja para optimizar el esfuerzo que necesitan para capturar su alimento (Zimmer - Faust, 1987), ya que así se logra minimizar el tiempo para seleccionar su alimento y maximizar la ganancia de energía y nutrientes consumidos. Es tan importante este proceso, que se ha reportado que del 30 al 40% de las actividades cerebrales están canalizadas a procesar las señales olfativas que reciben (Mellon, *et al*, 1992).

De manera general, los crustáceos presentan características especiales, fisiológicas y cerebrales, que les permite ser utilizados en experimentos de quimiorrecepción, ya que son fáciles de mantener en condiciones de laboratorio, muestran comportamientos que definen claramente una respuesta en los registros alimenticios, y además poseen células receptoras de químicos que son accesibles a análisis electrofisiológicos (Zimmer-Faust, 1989).

Así, la acción de los quimioattractantes y estimulantes generalmente ha sido evaluada mediante respuestas comportamentales o electrofisiológicas (Derby y Atema, 1982; Derby y Harpaz, 1988), sin embargo, la evidencia de sensibilidad electrofisiológica a un compuesto no necesariamente garantiza que este actúe como attractante en bioensayos comportamentales (Heinen, 1980).

La importancia de este proceso queda de manifiesto en diversos artículos que describen el rol de la quimiorrecepción en crustáceos decápodos, especialmente en langostas, cangrejos y camarones, (Derby y Atema, 1980; Ache, 1988; Atema, 1988; Carr y Derby, 1986a; y Carr, 1988).

## ***Quimiorreceptores***

Como ya se mencionó, en los crustáceos, la percepción de los estímulos químicos es de suma importancia para que el individuo ubique la fuente de alimento que está disponible en el medio. Esto se lleva a cabo por un tipo particular de quimiorreceptores llamados astetascos o teloreceptores, los cuales se encuentran localizados principalmente en el primer par de anténulas, antenas, partes bucales y/o quelas de los apéndices de mayor exposición (Derby, 1984; Derby y Atema, 1988; Mendoza *et al.*, 1997). En cualquiera de los casos, los astetascos están inervados por múltiples células receptoras bipolares. Se estima por ejemplo, para la langosta *Panulirus argus*, la existencia de 350 neuronas por sensillia con un total de 400,000 en cada anténula (Derby y Atema, 1988).

La importancia de la presencia e integridad de los órganos quimiosensoriales fue corroborada en *Homarus americanus* por Devine y Atema (1982) y Cowan (1991) quienes encontraron que las langostas que no poseían anténulas laterales perdían toda habilidad de detección.

Por otra parte, los movimientos antenulares desempeñan un papel significativo en la fisiología de la quimiorrecepción, adaptándose al ambiente al cual están expuestos los astetascos, ya que originan cambios mecánicos en la posición de los receptores. Así, los movimientos de las antenas aumentan la exposición de los astetascos a los estímulos químicos, propiciando además la circulación del agua (Pearson *et al.*, 1980).

Adicionalmente a lo anterior, la decisión de los organismos para alimentarse se realiza bajo la influencia de diferentes factores, tanto internos: nivel de inanición, dominancia social, sexo y estatus reproductivo; como externos: presencia de predadores o competidores (Schmitt y Holbrook, 1985).

De manera resumida, los quimiorreceptores traducen una serie de interacciones específicas entre los estímulos y las respuestas fisiológicas, siendo el primer paso para procesar la información de los quimiorreceptores el detectar las moléculas extracelulares y enviar esta

información hacia el cerebro, observándose así una interacción inicial entre estímulos y sus receptores a nivel olfatorio y gustativo, concluyendo de esta manera que existe una interacción estímulo-receptor, como se indica en la Figura 2 (Brown y Hara, 1982).

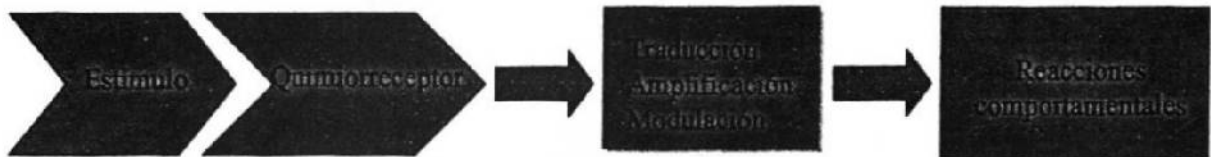


Figura 2.- Esquema de la reacción estímulo-quimiorreceptor, tomado de Brown y Hara ( 1982)

### *CLASIFICACION DE LOS ESTIMULOS QUIMICOS*

Existe cierto grado de confusión con respecto a 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 poco detallada descripción de las condiciones del medio ambiente, la salud de los animales y la variabilidad individual, que son factores muy importantes en el proceso de detección y estimulación (Derby y Atema, 1982).

Según Lindstedt (1971), Heinen (1980) y Mackie (1982) existen diferentes activadores e inhibidores del comportamiento alimenticio en los organismos acuáticos (Figura 3). En función de esta consideración, mucha de la información reportada en la literatura requiere ser re-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.

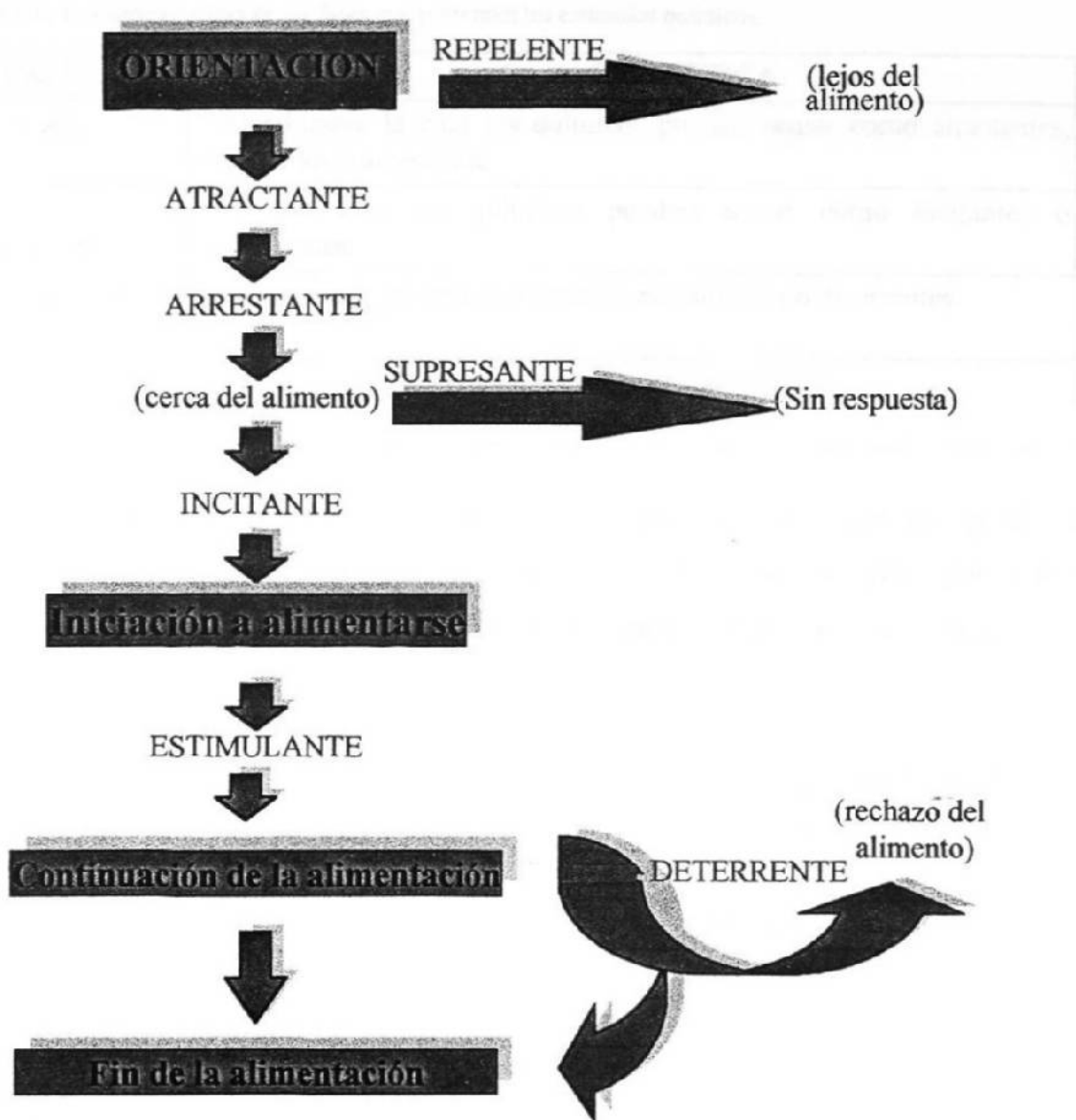


Figura 3.- Lista de activadores e inhibidores del comportamiento alimenticio.

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 ya han sido identificados en algunos crustáceos, tal y como se muestra en la Tabla 1 (Lindstedt, 1971; Mackie y Mitchel, 1982; Lee y Meyers, 1996a).

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

<b>FASES</b>	<b>CARACTERISTICA</b>
Orientación	Fase durante la cual los químicos pueden actuar como atractantes, repelentes o arrestantes.
Inicio de la alimentación	En esta fase los químicos pueden actuar como incitantes o supresantes.
Continuación de la alimentación	Los químicos pueden actuar como estimulantes o deterrentes.
Fin 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 (Lindstedt, 1971), tal y como se muestra en la Tabla 2

Tabla 2.- Detección de los estímulos químicos

<b>QUIMICOS DETECTADOS A DISTANCIA</b>	<b>QUIMICOS DETECTADOS POR CONTACTO</b>
Atractantes	Incitantes
Repelentes	Supresantes
Arrestantes	Estimulantes
	Deterrentes

### **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.

Los resultados de diversas investigaciones indican que los crustáceos responden mejor a estímulos específicos provenientes de su alimento natural con alta energía y contenido nutricional, aunque las respuestas a un estímulo difieren entre especies, lo que probablemente es ocasionado por los hábitos alimenticios (Zimmer-Faust, 1987).



## ***EXTRACTOS ANIMALES***

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

Dentro de la amplia gama de extractos probados como atractantes, cabe mencionar en particular las series experimentales desarrolladas con extractos de moluscos, crustáceos y otros organismos, como se enlista en la Tabla 3.

Entre los extractos de moluscos, aquellos que han despertado mayor interés son los realizados a partir del calamar, el cual ha resultado fuertemente atractante tanto para crustáceos como para peces. Cabe destacar que entre los componentes más abundantes en dicho extracto se encuentran algunos aminoácidos, aminas terciarias y óxido de trimetil-amina (TMAO) (Mackie, 1973; Takei, 1977). Por otra parte, en lo que respecta a crustáceos, los extractos realizados a partir de jaiba han llegado a evocar respuestas del mismo orden de magnitud que la de los extractos de calamar (Carr, 1988). Finalmente, extractos de otro tipo de organismos acuáticos han resultado también atractantes, aunque en menor magnitud que los anteriores (Fuke, *et al.*, 1981; Daniel y Bayer, 1989).

A este respecto, 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 como: aminoácidos, compuestos cuaternarios de amonio, nucleótidos y ácidos orgánicos.
- b) Especies diferentes de crustáceos y peces 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 éstas sustancias son solubles en agua y se presentan de manera ubícua en los tejidos, a concentraciones mayores que las presentes en el medio ambiente.

Tabla 3.- Resumen de los bioensayos realizados con extractos de moluscos, crustáceos y otros organismos.

GRUPO	EXTRACTO	ESPECIE	RESUL.	MOLECULAS	AUTOR
Molusco	Alcoholosoluble de calamar	<i>Homarus gammarus</i>	positivo	N.I.*	Mackie & Shelton, 1972
Molusco	Alcoholosoluble de calamar	<i>Erimacrus isenbekii</i>	positivo	Ac. glutámico, glicina, prolina, betaína, taurina	Takei, 1977
Molusco	Mezcla sintética de calamar	<i>Salmo gardneri</i> y <i>Scophtalmus sp</i>	positivo	N.I.	Mackie, 1973
Molusco	Extracto de calamar	<i>Homarus gammarus</i>	positivo	prolina, glicina, alanina, arginina	Mackie, 1973
Molusco	Extracto de ostras	<i>Logodon rhomboies</i>	positivo	betaína	Carr <i>et al.</i> , 1984
Molusco	Extracto de calamar	<i>Scophtalmus sp.</i>	positivo	Inosina	Mackie & Adron, 1978
Molusco	Extracto hidroalcoholosoluble de calamar	<i>Penaeus japonicus</i>	positivo	N.I	Cruz-Suárez y Guillaume, 1983
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	Músculo de abulón	<i>Panulirus interruptus</i>	positivo	Taurina, glicina, lisina	Zimmer-Faust <i>et al.</i> , 1984
Molusco	Extracto de bivalvo, <i>Perna canaliculus</i>	<i>Penaeus esculentus</i>	negativo	N.I.	Hill Wassenberg, 1987
Molusco	Ensilado de vísceras de abulon	<i>Haliotis fulgens</i>	positivo	N.I.	Viana <i>et al.</i> , 1994
Molusco	Caracoles en descomposición	<i>Coenobita rugosis</i>	positivo	N.I.	Rittschof & Sutherland, 1996
Molusco	Extracto de calamar	<i>Salvelinus alpinus</i>	positivo	N.I.	Toften & Jobling, 1997
Crustáceo	Extracto de jaiba	<i>Palaemonetes pugio</i>	positivo	glicina	Carr <i>et al.</i> , 1984

Continuación de la Tabla 3.

GRUPO	EXTRACTO	ESPECIE	RESUL.	MOLECULAS	AUTOR
Crustáceo	Ext. del camarón <i>Metapeneus benattae</i>	<i>Penaeus esculentus</i>	positivo	N.I.	Hill & Wassenberg, 1987
Crustáceo	Extracto de krill <i>Euphausia superba</i>	<i>Pagrus major</i>	positivo	N.I.	Shimizu, <i>et al.</i> 1990
Crustáceo	Extractos de camarón y jaiba	<i>Octopus maya</i>	positivo	N.I.	Lee, 1992
Crustáceo	Extracto de cabeza de Camarón <i>P. monodon</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	positivo	N.I.	Holland & Russell, 1993
Peces	Extracto de arenque	<i>Homarus americanus</i>	positivo	N.I.	Daniel y Bayer, 1989
Otros	<i>Perineireis brevicirrus</i>	<i>Chrysophrys major</i>	positivo	amino ácidos	Fuke <i>et al.</i> , 1981

\* N.I.= No Identificadas las moléculas que componen el extracto.

### EXTRACTOS VEGETALES

Hasta el momento la utilización de fuentes vegetales en las dietas para crustáceos, en comparación con las fuentes animales, ha sido limitada, lo que explicaría la secases de bioensayos de quimiorrecepción en los cuales se hayan utilizado extractos vegetales.

No obstante, ha sido sugerido que a pesar de que los animales acuáticos no tienen la oportunidad de alimentarse de plantas terrestres, algunas de ellas atraen o estimulan a los vertebrados e invertebrados acuáticos (Harada, 1991). Así, ha sido comprobado el potencial atractante de diferentes sustancias alimenticias terrestres, tales como especias, plantas medicinales y frutas en animales acuáticos.

Sin embargo, hasta el momento este tipo de evaluaciones se han llevado a cabo únicamente con peces y moluscos, y no se conocen estudios de este tipo en crustáceos. Actualmente solo el conocimiento empírico de los pescadores y acuacultores los ha llevado a probar la pulpa del coco como señuelo en trampas para langostino *M. rosenbergii* (Tripathi, 1990). Dentro de este contexto, cabe destacar un estudio realizado con abulón *Haliotis discus*, peces *Misgurnus anguillicaudatus* y atún cola amarilla *Seriola quinqueradiata* los cuales fueron expuestos a diferentes partes del coco, mostrando un gran potencial atractante en las tres especies

de animales acuáticos. Tanto la leche de coco como la cáscara y la albúmen de coco se encontraron siempre con los valores más altos de atracción (Harada y Miyasaki, 1997).

Por otra parte, se ha determinado el valor de ciertos forrajes agrícolas y subproductos como alimentos suplementarios para cangrejos de río *Procambarus clarkii*, reportando mayores rendimientos con heno de arroz (736 Kg/ha) y heno de zacate bahía (733 Kg/ha) (Rivas *et al.*, 1978). Adicionalmente se ha reportado que los acociles crecen mejor cuando se les alimenta con una combinación de plantas (*Polygonum sp.* y *Jussiaea*) que al alimentarlos con paja de pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) (Romaine *et al.*, 1978). Lo anterior implica que los vegetales constituyen una fuente importante de alimento para los acociles y por lo tanto existe la posibilidad de que los extractos puedan estimular su comportamiento alimenticio.

En estudios similares, se ha estudiado el consumo y la digestibilidad aparente de macrofitas acuáticas con el langostino *Orconectes virilis*, siendo la cola de caballo (*Equisetum sp.*) la que presentó mejores resultados, muy por encima de otras como *Typha sp.*, *Sagittaria sp.* y *Vallisneria sp.* (Brown *et al.*, 1990). Por último, se evaluó la eficiencia de asimilación y el porcentaje de ingestión de *Procambarus clarkii*, alimentados con alfalfa (*Medicago sativa*), lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y berro (*Nasturtium sp.*); cuando estos vegetales fueron utilizados frescos se encontró un mayor porcentaje de eficiencia de asimilación con la alfalfa, mientras que cuando se utilizaron con un tiempo de descomposición de 30 días, el lirio acuático presentó mayor consumo (Muñoz-Ortiz, 1993). Por otra parte, se determinó que la alfalfa fresca poseía una mayor cantidad de los aminoácidos arginina, lisina, histidina y tirosina, mientras que al ser analizada después de un proceso de ensilado presentaba una mayor cantidad de aminas biogénicas, específicamente putrescina, cadaverina y espermidina, encontrándose una relación inversamente proporcional entre la arginina-putrescina, lisina-cadaverina y metionina-espermidina (Phuntsok, *et al.*, 1995).

Los antecedentes anteriores, a pesar de no estar directamente relacionados con las pruebas clásicas de quimiorrepción, nos pueden dar una idea del tipo de extractos vegetales que pueden

ser utilizados como atractantes para crustáceos en bioensayos de laboratorio como en bioensayos de campo en condiciones naturales.

En este sentido, también se deben tomar en cuenta algunos estudios en los cuales se mencionan fuentes vegetales que actúan como deterrentes, tal es el caso del alga verde *Halimeda incrassata* para el pez herbívoro *Sparisoma radians* (Targett *et al*, 1986 ), sin olvidar que el uso de proteínas vegetales en alimentos para organismos acuáticos tiende a restringirse debido a que la mayoría de estas fuentes presentan toxinas y factores antinutricionales que probablemente actúen como arrestantes o deterrentes (Mendoza, 1993), de la misma manera, la inclusión de altos porcentajes ha sido asociada a factores anti-palatables y anti-atractantes (Lim y Dominy, 1989).

#### ***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 para crustáceos decápodos, dentro de las cuales destacan los aminoácidos, nucleótidos, sales cuaternarias y algunos azúcares, entre otros.

#### ***Aminoácidos***

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 de ellos y únicamente con ciertas especies, lo cual implica cierto desconocimiento sobre el potencial de la mayor parte de éstos. En la Tabla 4 se sumarizan algunas series experimentales que denotan la eficiencia de algunos aminoácidos en particular.

Tabla 4- Resumen de los bioensayos realizados con aminoácidos como atrayentes alimenticios en diferentes especies de crustáceos y peces.

AMINOACIDOS	ORGANISMO	RESULTADO	AUTOR
Glicina	<i>Cambarus sp.</i>	positivo	Hodgson, 1958
Arginina, Alanina	<i>Ostrina sp.</i>	positivo	Beck y Hanec, 1958*
Alanina, Prolina, Tirosina, Ac. glutámico	<i>Homarus americanus</i>	positivo	McLeese, 1970
Arginina	<i>Penaeus japonicus</i>	positivo	Kitabayashi <i>et al.</i> , 1971 <sup>b</sup>
Lisina, Arginina	<i>Penaeus merguensis</i>	positivo	Ilindley, 1975
Taurina	<i>Panulirus argus</i>	positivo*	Fuzessery <i>et al.</i> , 1978
L-glutámico Glicina, Taurina	Crustáceos Decápodos	positivo	Heinen, 1980
Taurina, Prolina Arginina, Glicina	<i>Pleuronectes platessa</i>	positivo	Mackie, 1982
Taurina	<i>Panulirus argus</i>	positivo*	Thompson y Ache, 1980
L-Alanina, L-Serina L-Histidina	<i>Orconectes limosus</i>	positivo	Bauer <i>et al.</i> , 1981
Arginina, Lisina	<i>Homarus americanus</i>	positivo	Carter y Steele, 1982 <sup>b</sup>
Alanina, Leucina, Phenilalanina	<i>Salmo gairdneri</i>	positivo	Marui <i>et al.</i> , 1983
Taurina, Ac. glutámico	<i>Panulirus argus</i>	positivo*	Derby <i>et al.</i> , 1984
Arginina, Lisina Taurina	<i>Orconectes limosus</i>	positivo*	Hatt, 1984
Isoleucina	<i>M. rosenbergii</i>	positivo	Holland, 1985
Taurina, Glicina Arginina	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	positivo	Harpaz <i>et al.</i> 1987
Arginina	<i>Penaeus japonicus</i>	positivo	Nakamura, 1987 <sup>b</sup>
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
Arginina	<i>Palaemon elegans</i>	positivo	Kurmaly <i>et al.</i> , 1990
Taurina, Glicina	<i>Panulirus argus</i>	positivo*	Trapido <i>et al.</i> , 1990
Valina y $\beta$ -alanina	<i>Uca longisignalis</i> <i>Uca pugilator</i>	positivo	Weissburg & Zimmer-Faust, 1991
Glicina	<i>Panulirus interruptus</i>	positivo	Zimmer-Faust, 1991

Continuación de la Tabla 4.

AMINOACIDOS	ORGANISMO	RESULTADO	AUTOR
L-glutamato, Taurina Hidroxi-L-prolina L-arginina	<i>Homarus americanus</i>	positivo*	Coroto, <i>et al.</i> 1992
Glicina, Prolina, Taurina	<i>Octopus maya</i>	positivo	Lee, 1992
Histidina, Arginina	<i>Planorbarius corneus</i>	positivo	Lombardo <i>et al.</i> , 1992
Hidroxi-prolina Taurina	<i>Homarus americanus</i>	positivo*	Voight y Atema, 1992
Histidina, Arginina	<i>Panulirus argus</i>	Positivo*	Fadool <i>et al.</i> , 1993
Mezcla de aminoácidos	<i>Penaeus monodon</i>	positivo	Hartati y Briggs, 1993
Alanina, Arginina, Serina, Taurina	<i>Penaeus monodon</i>	Positivo	Coman <i>et al.</i> , 1996

\* bioensayos realizados mediante técnicas electrofisiológicas.

† citados por Lindstedt, 1971.

‡ citados por Lee y Meyers, 1996a.

#### Utilización de los aminoácidos como quimioestimulantes.

La quimiodetección de ciertos aminoácidos por los crustáceos y otros organismos acuícolas parece tener un rol dentro de la sobrevivencia de las especies, ya que están dotados evolutivamente de receptores específicos que permiten la localización de determinadas sustancias o moléculas que forman parte de su dieta (Derby y Atema, 1982).

Dentro de este contexto, cabe mencionar que los aminoácidos libres son abundantes como osmolitos difundiendo rápidamente de los tejidos de los invertebrados acuáticos que constituyen la dieta principal de los crustáceos omnívoros (Zimmer-Faust, 1987).

Así, por ejemplo, se ha encontrado que la arginina es parte constituyente de diversos extractos de calamar, mismos que a su vez han presentado buenos resultados como quimioestimulantes para la langosta *Homarus gammarus* (Mackie y Shelton, 1972; Mackie, 1973), al igual que para el salmón *Salmo gairdneri* (Mackie, 1973), y el cangrejo *Erimacrus isenbekii* (Takei, 1977).

De igual manera, la lisina ha sido identificada como componente del músculo del abulón, que resultó ser estimulante del comportamiento alimenticio de la langosta *Panulirus interruptus* (Zimmer-Faust *et al.*, 1984b) y del camarón *Penaeus merguensis* (Hindley, 1975).

Por su parte, Carr *et al.*, (1996) mencionan que la histidina se ha encontrado como un constituyente importante en extractos de sardinias y macarelas (*Sardinella anchovia* y *Scomber japonicus*, respectivamente), además de la jaiba azul (*Callinectes sapidus*). Extractos de esta última especie fueron utilizados para estimular el comportamiento alimenticio de *Palaemonetes pugio* (Carr *et al.*, 1984).

Por último, se ha observado que la tirosina forma parte, aunque en concentraciones muy bajas, de extractos de camarón (*Metapeneus benattae*), el cual propicia un efecto estimulante positivo en individuos de *Penaeus sculentus* (Carr *et al.*, 1984).

### **AMINAS BIOGENICAS**

Las aminas 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, tal y como se describe en la Figura 4.



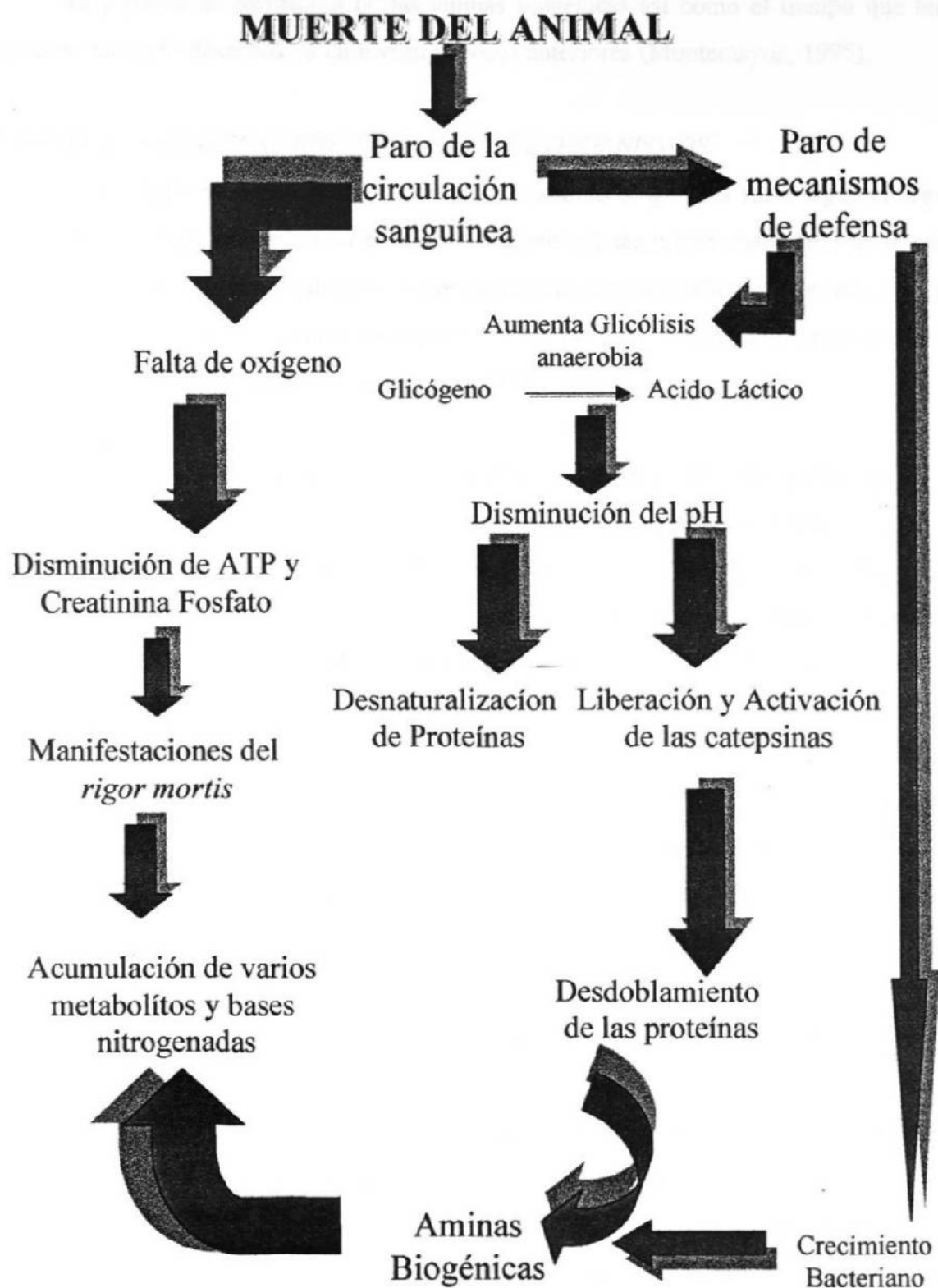


Figura 4.- Proceso de la descomposición de los organismos.

El proceso de formación de las aminas biogénicas así como el tiempo que tardan en formarse han sido descritos ya en investigaciones anteriores (Montemayor, 1995).

### ***EFECTO DE LAS AMINAS BIOGENICAS EN LOS ORGANISMOS***

Los efectos provocados por el consumo de aminas biogénicas varía según el organismo. En el hombre se pueden producir cambios en la presión sanguínea, reducción de la movilidad intestinal, diarrea y efectos adversos sobre el sistema nervioso (Huisman, *et al.*, 1992). En el caso específico de la histamina, esta puede ocasionar una respuesta alérgica ya que es un dilatador capilar (Regenstein y Regenstein, 1991).

Las aminas biogénicas, al ser utilizadas en concentraciones adecuadas pueden resultar atractantes, como en los casos de *Orconectes rusticus* y *Macrobrachium rosenbergii*. En estas investigaciones, el primero resultó ligeramente estimulado por la putrescina (Tierney y Atema, 1987), mientras que para el segundo, la cadaverina y la putrescina resultaron ser atractantes y estimulantes alimenticios logrando promover un consumo de alimento mayor al 200% en comparación con un alimento comercial (Mendoza, *et. al.* 1997). Sin embargo, a bajas concentraciones no se obtienen diferencias significativas en atractabilidad cuando se utilizan con *Homarus americanus* (Daniel y Bayer, 1987). Contrariamente, al ser ingeridas en altas concentraciones por pollos y peces, pueden causar efectos adversos tales como intolerancia al alimento, hipersensibilidad o daño intestinal (Taylor, 1984; Kuba *et al.*, 1983; Murray *et al.*, 1982; Sakaguchi *et al*, 1982).

Así mismo, se ha reportado que las aminas biogénicas juegan cierto papel como promotoras de crecimiento cuando se emplean en bajas concentraciones. Cuando se utilizó la putrescina como suplemento en alimento para pollos, se observó que a dosis de 0.2% incrementaba el crecimiento (Smith, 1990), 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, ya que el trayecto del alimento es mas largo en truchas (36 horas) que en pollos (4 horas), por lo que hay más tiempo para oxidarla (Cowey y Cho, 1992).

Por otro lado, las aminos son esenciales para el crecimiento celular, siendo necesarias para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y para la formación de purinas (Smith, 1990). Además afectan las actividades de ciertas enzimas y en particular la putrescina protege a las células de un shock osmótico (Pegg, 1986, citado por Cowey y Cho, 1992).

### **SINERGISMO Y ANTAGONISMO**

Existe la posibilidad de que el estímulo alimenticio sea provocado por distintas sustancias o moléculas que actúen de manera combinada. Hasta el momento, en bioensayos realizados con diferentes crustáceos (Tabla 5), se han utilizado mezclas a concentraciones establecidas y en proporciones definidas. Dentro de estas mezclas destaca en particular la utilización de aminoácidos, nucleótidos, nucleósidos, lactato y compuestos cuaternarios de amonio. Estas pueden provocar en un organismo dos respuestas: supresión o sinergismo. El primer tipo de respuesta se genera cuando los resultados de las mezclas son menores a los resultados de cada uno de sus componentes por separado y el segundo cuando los resultados de las mezclas son superiores a los resultados de cada uno de sus componentes (Carr *et al.*, 1989).

Con el fin de ejemplificar este aspecto, vale la pena mencionar la serie de bioensayos efectuados con *Palaemonetes pugio* en los cuales se utilizó una mezcla de cuatro tejidos animales que contenían metabolitos de bajo peso molecular (nucleótidos, nucleósidos y compuestos cuaternarios), en donde se observó que existía una mayor excitabilidad empleando la mezcla, que aplicando los metabolitos de forma individual (Carr y Derby, 1986a).

Por su parte, Kamamura *et al.*, (1995) observaron que una mezcla de extracto de pescado con caña de azúcar funcionaba mejor como un cebo para las jaibas *Portunus pelagicus* y *Charybdis japonica*, que el extracto de pescado o la caña de azúcar utilizados de manera individual.

De la misma manera que en los extractos, la acción de los aminoácidos puede resultar sinérgica, ya que éstos generalmente son más efectivos en forma conjunta que cuando se usan por separado (Heinen, 1980; Hartati y Briggs, 1993).

En un estudio de quimioatracción con el camarón marino *Palaemonetes pugio*, se comparó la efectividad de una mezcla sintética de aminoácidos más betaína en concentraciones similares a los encontrados en el extracto acuoso de cangrejo azul (*Callinectes sapidus*), se probaron estos dos atractantes y un tercero que incluía además de la mezcla de aminoácidos y la betaína, una serie de nucleótidos tales como el AMP, ADP, ATP, etc., resultando con mayor efectividad el extracto acuoso de cangrejo, seguido de la mezcla con nucleótidos (Carr, *et al.*, 1986).

La betaína esta presente en altos niveles en muchos invertebrados marinos los cuales son presas de peces y crustáceos, esto contribuye a explicar el porque tenga entre sus propiedades una alta palatabilidad (Guerin, 1998). Además, la betaína generalmente presenta un efecto sinérgico al ser mezclada con otros aminoácidos como la glicina y la alanina, o con otros metabolitos de bajo peso molecular, ocasionando un aumento en su atractabilidad.

El sinergismo ha sido demostrado en numerosas ocasiones en estudios de quimiosensibilidad y se ha sugerido que es el resultado de la activación de varios sitios receptores por diferentes compuestos. Un ejemplo es la fuerte respuesta de *P. monodon* a las mezclas de aminoácidos y betaína, lo que sugiere que puede ocurrir una interacción sinérgica (Coman *et al.*, 1996).

En resumen, la mezcla de estimulantes alimenticios frecuentemente tiene un mayor efecto sobre el comportamiento de una gran variedad de animales acuáticos, que iguales concentraciones de compuestos simples (Carr, 1978; Carr y Derby, 1986b; Ache, 1988). Sin embargo, se ha demostrado que pueden igualmente presentarse efectos antagónicos al utilizar ciertas combinaciones de moléculas en conjunto como atractantes, tal es el caso de la mezcla Prolina-Alanina-Arginina-Taurina utilizadas en langostas y cuya falta de eficacia se atribuye principalmente a la competencia por los sitios receptores (McLeese, 1970; Johnson y Ache, 1978; Ache, *et al.*, 1986). Resultados similares han sido reportados por Derby, *et al.*, (1991) al utilizar mezclas de betaína mas cistina y cistina más taurina, observando que en *P. argus* éstas mezclas tenían menor efecto que al utilizar sus componentes por separado.

Contrariamente a todo lo anterior, Zimmer-Faust *et al.*, (1984b) encontraron que un compuesto simple (glicina) puede ser más efectivo para *Panulirus interruptus*, que ciertas mezclas conteniendo la misma molécula entre sus componentes. Igualmente, para *Macrobrachium rosenbergii* se encontró que un solo compuesto (cadaverina) presentaba mejores resultados en términos de atractabilidad y palatabilidad que algunos extractos como el hidroalcoholosoluble de calamar (Mendoza *et al.*, 1997).

Tabla 5.- Lista de estudios sobre sinergismo realizados con diferentes especies de crustáceos.

MEZCLAS	GRUPO o ESPECIE	RESULTADO	AUTOR(ES)
Betaína + Arginina	<i>Palaemonetes pugio</i>	(+)	Carr, 1978
Glutamina + Betaína + Taurina	<i>Penaeus monodon</i>	(+)	Hainen, 1980
Aminoácidos + betaína + AMP + ADP + ATP + IMP + Ac. Láctico + TMO + Homarina	<i>Palaemonetes pugio</i>	(+)	Carr <i>et al.</i> , 1984
Betaína + Alanina + Arginina + Cisteína + Glicina + Lisina + Histidina + Serina + Prolina + Tirosina + Valina + Taurina + Ac. Aspártico	<i>Palaemonetes pugio</i>	(+)	Carr <i>et al.</i> , 1984
Aminoácidos + Lactato + Nucleótidos + Nucleósidos + Compuestos cuaternarios (Betaína, Homarina y TMO).	<i>Palaemonetes pugio</i>	(+)	Carr y Derby, 1986a
Glicina + Putrescina + Glicina	<i>Orconectes rusticus</i>	(+)	Tierney y Atema, 1987
Triptófano + Tirosina	<i>Orconectes virilis</i>	(+)	Tierney y Atema, 1987
AMP + extractos de camarón	<i>Homarus americanus</i>	(+)	Carr <i>et al.</i> , 1986
Arginina + Tirosina + Histidina + Cisteína + Glicina + Lisina	<i>Penaeus monodon</i>	(+)	Hartati y Briggs, 1993
Glicina + Alanina + Serina + Succinato + Oxalato	<i>Palinurus argus</i>	(+)	Lee y Meyers, 1996b
Glicina + Alanina o Taurina	Crustáceos	(-)	Lee y Meyers, 1996a
Betaína + Alanina + Lisina + Prolina + Cisteína	<i>Penaeus monodon</i>	(+)	Coman <i>et al.</i> , 1996
Taurina	<i>Homarus americanus</i>	(+)	Daniel, <i>et al.</i> , 1996
Glutamina + Taurina	<i>Panulirus argus</i>	(+)	Steullet & Derby, 1997
Glutamina + Taurina	<i>Panulirus argus</i>	(+)	Steullet & Derby, 1997
Betaína + Glicina o Alanina	Crustáceos	(+)	Guerin, 1998

## **FACTORES EXPERIMENTALES**

### ***SISTEMAS DE MONITOREO PARA BIOENSAYOS DE QUIMIOESTIMULANTES***

Hasta hace algunos años la mayoría de los bioensayos con especies acuáticas eran utilizados para conocer los efectos de los contaminantes así como su grado de toxicidad, basándose principalmente en la mortalidad de los organismos. En la actualidad, y debido a la necesidad de evaluar el comportamiento de los organismos al contacto con diferentes moléculas se ha incentivado la búsqueda de nuevas técnicas. La mayor ventaja al utilizar la conducta como una herramienta, es que los resultados de las pruebas de comportamiento a menudo se presta a una interpretación directa con respecto al medioambiente, lo que permite extrapolar las posibles respuestas a la población.

#### *Bioensayos en Acuarios*

Este tipo de bioensayos es el realizado en acuarios con barreras opacas con la intención de que los organismos no tengan contacto visual entre ellos. Este tipo de sistemas ha sido utilizado para demostrar la presencia de feromonas, u otro tipo de moléculas en el agua, secretadas por individuos situados en un lado del acuario y percibidas por otros organismos en el lado opuesto (Takayanagi, *et al*, 1986). Este tipo de dispositivo permite la utilización de organismos de mayor tamaño, pero, al igual que en el caso anterior, las concentraciones de las moléculas son difíciles de estimar cuando estas son liberadas por los organismos, no así cuando son añadidas directamente al acuario o por medio de un vehículo, el cual debe de tener características anti-attractante y antipalatable. Una variante de este tipo de bioensayos es la utilización de acuarios relativamente grandes (mayores de un metro de largo), en el cual es colocado el estímulo en un extremo mientras el organismo es colocado en el extremo opuesto. La finalidad de esta metodología es determinar el comportamiento alimenticio de los organismos registrando el tiempo que tardan desde la percepción hasta la ingestión del alimento que contiene el estímulo (Costero y Meyers, 1993).

En la Tabla 6 se enlistan las investigaciones realizadas hasta el momento utilizando acuarios.

Tabla 6.- Serie de investigaciones sobre quimiorrecepción realizadas en acuarios.

<p><b>Bioensayos en acuarios</b></p> 	<i>Homarus americanus</i>	McLeese (1970)
	<i>Homarus americanus</i>	Mackie y Shelton (1972)
	<i>Homarus americanus</i>	McLeese (1973)
	<i>Homarus gammarus</i>	Mackie (1973)
	<i>Callinectes sapidus</i>	Pearson y Olla (1977)
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Carr (1978)
	<i>Cancer magister</i>	Pearson <i>et al.</i> (1980)
	<i>Homarus americanus</i>	Carter y Steele (1982)
	<i>Salmo gairdneri</i> <sup>1</sup>	Marui <i>et al.</i> (1983)
	<i>Homarus americanus</i>	Derby (1984)
	<i>Panulirus interruptus</i>	Zimmer-Faust <i>et al.</i> (1984a)
	<i>Orconectes virilis</i>	Hazlett (1985)
	<i>Homarus americanus</i>	Daniel y Bayer (1987)
	<i>Orconectes virilis</i> <i>O. rusticus</i>	Tierney y Atema (1987)
	<i>Panulirus argus</i>	Zimmer-Faust <i>et al.</i> (1988)
	<i>Panulirus argus</i>	Derby <i>et al.</i> (1989)
	<i>Panulirus argus</i>	Fine-Levy <i>et al.</i> (1989)
	<i>Orconectes rusticus</i>	Hazlett (1990)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> <sup>1</sup>	Koskela <i>et al.</i> (1991)
	<i>Clibanarius vittatus</i>	Kratt y Rittschof (1991)
	<i>Panulirus interruptus</i>	Zimmer-Faust (1991)
	<i>Uca longisignalis</i>	Weissburg y Zimmer-Faust (1991)
	<i>Procambarus clarkii</i>	Dunham y Oh (1992)
	<i>Panulirus argus</i>	Fine-Levy y Derby (1992)
	<i>Anguilla anguilla</i> <sup>1</sup>	Ajuzie y Appelbaum (1993)
	<i>Penaeus vannamei</i>	Costero y Meyers (1993)
	<i>Seriola quinqueradiata</i> <sup>1</sup>	Kohbara y Hidaka (1993)
	<i>Penaeus monodon</i>	Coman <i>et al.</i> (1996)
	<i>Procambarus clarkii</i>	Dunham y Oh (1996)
	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Mendoza, <i>et al.</i> (1997)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> <sup>1</sup>	Oikawa y March (1997)	

<sup>1</sup> - peces

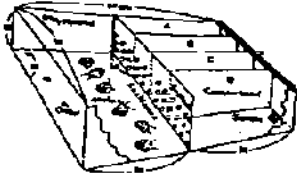
### Opción Múltiple

Existen sistemas denominados de opción múltiple que se realizan en tanques o acuarios, con la finalidad de observar la preferencia de los organismos a una amplia gama de estímulos (Harada, *et al.*, 1994), con la ventaja de que al estar disponibles diferentes tipos de estímulos al mismo tiempo, queda de manifiesto la preferencia de aquel estímulo que evoque la mayor respuesta comportamental. La principal desventaja de este sistema se presenta cuando se utiliza

más de un organismo, ya que puede influir la diferencia de tamaño de los mismos y por lo tanto la presencia de organismos dominantes en la población.

En la Tabla 7 se enlistan la serie de investigaciones desarrolladas hasta el momento utilizando este tipo de dispositivo.

Tabla 7.- Serie de investigaciones en las cuales se utilizó un dispositivo de opción múltiple.

<p>Opción Múltiple</p> 	<i>Merlangius merlangius</i> <sup>1</sup>	Pawson (1977)
	<i>Pinnotheres maculatus</i>	Derby y Atema (1980)
	<i>Panulirus argus</i>	Reeder y Ache (1980)
	<i>Homarus americanus</i>	Devine y Atema (1982)
	<i>Urosalpinx cinerea</i> <sup>2</sup>	Brown y Ritschof (1984)
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Carr <i>et al.</i> (1984)
	<i>Homarus americanus</i>	Atema y Cowan (1986)
	<i>Homarus americanus</i>	Daniel y Bayer (1987)
	<i>Brachidanio rerio</i> <sup>1</sup>	Steele <i>et al.</i> (1990)
	<i>Penaeus aztecus</i> <i>Penaeus setiferus</i>	Benfield y Aldrich (1991)
	<i>Seriola quinqueradiata</i> <sup>1</sup> y <i>Haliotis discus</i> <sup>2</sup>	Harada (1991)
	<i>Penaeus aztecus</i> <i>Penaeus setiferus</i>	Benfield y Aldrich (1992)
	<i>Haliotis fulgens</i> <sup>2</sup>	Viana <i>et al.</i> (1994)
	<i>Cambarus bartonii</i>	Dunham <i>et al.</i> (1997)

<sup>1</sup>.- peces

<sup>2</sup>.- moluscos

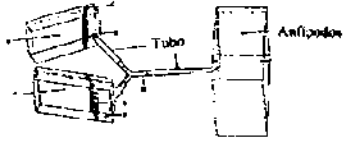
### Y-Mazes

Este tipo de dispositivos son una variante de las pruebas de opción múltiple, con la particularidad que el número de opciones se limita a dos. Son utilizados principalmente en estudios hechos sobre feromonas con el fin de observar las respuestas de un sexo a las secreciones conteniendo feromonas del sexo opuesto en etapa receptiva y/o no receptiva (Borowski, 1984). El uso de este tipo de dispositivos presenta la ventaja de eliminar la posibilidad de que los organismos respondan exclusivamente a la corriente de agua. Esto es, porque el flujo en ambos lados esta balanceado de tal manera que solo varía la presencia o ausencia del estímulo. Sin embargo, este sistema tiene como desventaja el solo poder ser utilizado con especies de pequeño tamaño como anfipodos, adicionalmente resulta difícil estimar las concentraciones de los estímulos, ya que estos son liberados por los mismos organismos.



En la Tabla 8 se enlistan la serie de investigaciones que se han desarrollado utilizando dispositivos del tipo Y-mazes.

Tabla 8.- Investigaciones realizadas utilizando dispositivos del tipo Y-mazes.

Y-Mazes	ESPECIE	REFERENCIA
		<i>Asterias rubens</i> <sup>3</sup>
	<i>Carcinus maenas</i>	Shelton y Mackie (1971)
	<i>Asterias rubens</i> <sup>3</sup>	Castilla (1972)
	<i>Urosalpinx cinerea</i> <sup>2</sup>	Pratt (1974)
	<i>Echinus acutus</i> <sup>3</sup>	Bondsdorff y Vahl (1982)
	<i>Echinus esculentus</i> <sup>3</sup>	
	<i>Crossaster papposus</i> <sup>1</sup>	Sloan y Northway (1982)
	<i>Orconectes propinquus</i>	Tierney y Dunham (1982)
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Carr y Thompson (1983)
	<i>Carcinus maenas</i>	Hauchau y Fontaine (1984)
	<i>Microdeutopus gryllotalpa</i>	Borowski (1984)
	<i>Gammarus palustris</i>	Borowski (1985)
	<i>Petromyzon marinus</i> <sup>1</sup>	Lisowski <i>et al</i> (1986)
	<i>Oncorhynchus kisutch</i> <sup>1</sup>	Rehnberg y Schreck (1987)
	<i>Penaeus setiferus</i>	Benfield y Aldrich (1991)
	<i>Penaeus aztecus</i>	
	<i>Penaeus setiferus</i>	Benfield y Aldrich (1992)
	<i>Penaeus aztecus</i>	
	<i>Octopus maya</i> <sup>2</sup>	Lee (1992)
	<i>O. bimaculoides</i> <sup>1</sup>	
	<i>Planorbarius corneus</i> <sup>2</sup>	Lombardo <i>et al</i> (1992)

<sup>1</sup> - peces

<sup>2</sup>.- moluscos

<sup>3</sup>.- equinodermo

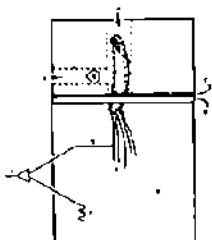
Dentro de los tipos de dispositivos mencionados anteriormente, es recomendable el empleo de sistemas de monitoreo por televisión para observar las respuestas que presentan los organismos a diferentes estímulos y/o para medir las preferencias hacia determinado alimento (Hill y Wassenberg, 1987; Harpaz y Steiner, 1990). La utilización de vídeo-cámara, representa ventajas tales como una reducción en el stress provocado 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.

## ELECTROFISIOLÓGICOS

Otro tipo de aproximación desarrollada para realizar estudios de quimiorrecepción, implica la evaluación de la respuesta electrofisiológica a nivel de células receptoras sensoriales ubicadas en células específicas (astetascos). Este tipo de estudios presenta la ventaja de poder determinar con exactitud la concentración del estímulo por medio de la cual se obtiene el umbral máximo de respuesta. Otra ventaja estriba en la baja cantidad de animales que se utilizan, ya que con un solo apéndice es posible llevar a cabo varias pruebas, sin tener que desarrollar los métodos tradicionales de comportamiento alimenticio. Contrariamente, la desventaja de este tipo de aproximaciones radica principalmente en que se ha demostrado que la quimiorrecepción de una molécula o compuesto a nivel electrofisiológico, no garantiza que estos puedan influir en el organismo a nivel de comportamiento (Derby y Atema, 1982; Derby y Harpaz, 1988).

En la Tabla 9 se enlistan la serie de investigaciones desarrolladas hasta el momento utilizando este tipo de dispositivo.

Tabla 9.- Serie de investigaciones realizadas mediante respuestas electrofisiológicas.

<p><b>Electrofisiológicos</b></p> 	<i>Panulirus argus</i>	Fuzessery <i>et al.</i> (1978)
	<i>Panulirus argus</i>	Thompson y Ache (1980)
	<i>Orconectes limosus</i>	Bauer <i>et al.</i> (1981)
	<i>Homarus americanus</i>	Derby y Atema (1982)
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Derby <i>et al.</i> (1984b)
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Carr y Derby (1986b)
	<i>Panulirus argus</i>	Carr <i>et al.</i> (1986)
	<i>Panulirus interruptus</i>	Zimmer-Faust <i>et al.</i> (1988)
	<i>Panulirus argus</i>	Derby <i>et al.</i> (1989)
	<i>Pagrus major</i> <sup>1</sup>	Shimizu <i>et al.</i> (1990)
	<i>Panulirus argus</i>	Daniel y Derby (1991)
	<i>Panulirus argus</i>	Derby <i>et al.</i> (1991)
	<i>Homarus americanus</i>	Corotto <i>et al.</i> (1992)
	<i>Panulirus argus</i>	Steullet y Derby (1997)

<sup>1</sup> - peces

## ESTADO NUTRICIONAL DE LOS ORGANISMOS EXPERIMENTALES

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, 1993).

Lee y Meyers, (1996a) constataron que se puede presentar cierto condicionamiento ingestivo debido a factores preingestivos (gusto, textura, forma del pellets, etc.) o postingestivos (digestibilidad, asimilación o valor nutricional). 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 en la reducción del consumo (Kurnaly *et al.*, 1990).

#### **ALTERNATIVAS DE INCORPORACION DE ATRACTANTES EN EL ALIMENTO**

La forma de suministro de los atractantes varía de acuerdo al sistema utilizado, así, pueden ser incorporados de las siguientes maneras:

- 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, 1996a).
- 2) Ser agregados directamente al acuario en forma líquida.

#### **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).

Por otro lado, se debe tomar en cuenta que la concentración de los estimulantes puede alterar su efecto, un ejemplo es el caso de la betaína, la cual induce el comportamiento

alimenticio en *M. rosenbergii* cuando es utilizada en bajas concentraciones (Harpaz y Steiner, 1990), pero actúa como repelente a altas concentraciones en *Palaemonetes pugio* (Carr, 1978).

### ***FACTORES CRITICOS EXPERIMENTALES***

Lee y Meyers (1996a) sugieren algunos factores críticos experimentales que afectan los resultados de los estudios de quimiorrecepción 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.
- ◆ El uso de animales individuales en las primeras etapas de identificación de los atrayentes 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 quimioatrayentes y estimulantes.
- ◆ La utilización de concentraciones adecuadas del estímulo químico 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.

## METODOLOGIA

Se utilizaron cuatro especies de crustáceos de interés comercial, siendo dos de éstas dulceacuícolas: Langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) y Acocil rojo, (*Procambarus clarkii*) y dos marinas: Camarón blanco (*Liopenaeus vannamei*) y Camarón azul (*L. stylirostris*). Se emplearon juveniles y adultos de ambos sexos para observar las eventuales diferencias con respecto a los estímulos probados. Únicamente se evaluaron organismos en fase de intermuda (Pebbles, 1977), para evitar cualquier posible interferencia de este fenómeno sobre el proceso de percepción, como lo señalan Harpaz, *et al* (1987). También se tuvo especial cuidado en utilizar ejemplares sin ausencia de apéndices, específicamente antenas y antenulas, ya que es en éstas donde se localizan los receptores. Los ejemplares se mantuvieron con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y fueron acondicionados a la dieta base por 7 días antes de iniciar las pruebas. Los experimentos se llevaron a cabo con ejemplares sujetos a un período de inanición de 24 horas. Cada organismo fue evaluado una sola vez con la finalidad de evitar un posible acondicionamiento al tipo de bioensayo utilizado. Por último y tomando en cuenta resultados preliminares que indicaron que machos y hembras presentaban respuestas similares a los quimioestimulantes probados, se usaron indistintamente ejemplares de ambos sexos.

### ORIGEN DE LOS ANIMALES

Se obtuvieron ejemplares de *L. vannamei*, con un peso promedio de  $8 \pm 2$  gr., de la granja camaronícola Vista Hermosa, ubicada en el Municipio de Soto La Marina, Tamaulipas.

Los individuos de *L. Stylirostris*, con un peso promedio de  $8 \pm 2$  gr. fueron obtenidos tanto de la granja camaronícola Acuatam, localizada en Tampico, Tamaulipas como del CIBNOR de La Paz, Baja California Sur.

Los ejemplares de *P. clarkii* fueron colectados en diversas localidades en los municipios de Santiago y Cadereyta Jiménez, Nuevo León. Adicionalmente, una parte de los organismos experimentales se obtuvieron mediante la reproducción y mantenimiento de los mismos en las

instalaciones del laboratorio de zoología de la F.C.B., U.A.N.L. Los ejemplares de esta especie fueron utilizados cuando alcanzaron un peso promedio de  $7 \pm 1$  gr.

Los ejemplares de *M. Rosenbergii*, con un peso promedio de  $9 \pm 1$  gr., fueron obtenidos del Laboratorio Vista Hermosa, a cargo del Gobierno de Tamaulipas, ubicado en el Municipio de Soto La Marina, Tamps.

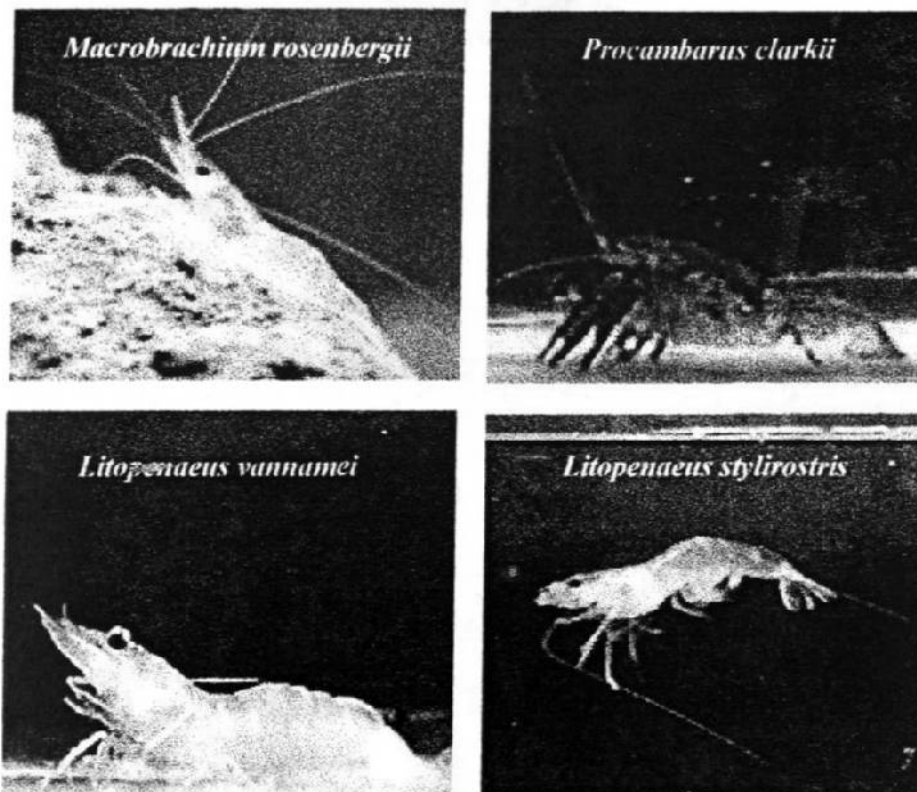


Figura 5.- Especies de crustáceos utilizadas en el presente estudio.

#### CATEGORIZACION DE LAS FASES EXPERIMENTALES

La metodología se dividió en tres fases jerarquizadas, 1) una serie de bioensayos de quimiodetección (Piteet, 1996, modificado), 2) un bioensayo de quimioatracción (Costero y Meyers, 1993, modificado), y 3) un bioensayo de campo llevado a cabo en condiciones comerciales (Mendoza *et al.*, 1997).

A partir de los resultados obtenidos en los bioensayos de quimiodetección (1), se seleccionaron los mejores tratamientos que subsecuentemente fueron utilizados en los bioensayos de quimioatracción (2), de los cuales, a su vez, se seleccionaron aquellos tratamientos que presentaron los mejores resultados para ser finalmente utilizados en los bioensayos de campo en condiciones comerciales (3). A manera de resumen de la metodología, en la Figura 6 se muestra la ruta crítica de la misma.

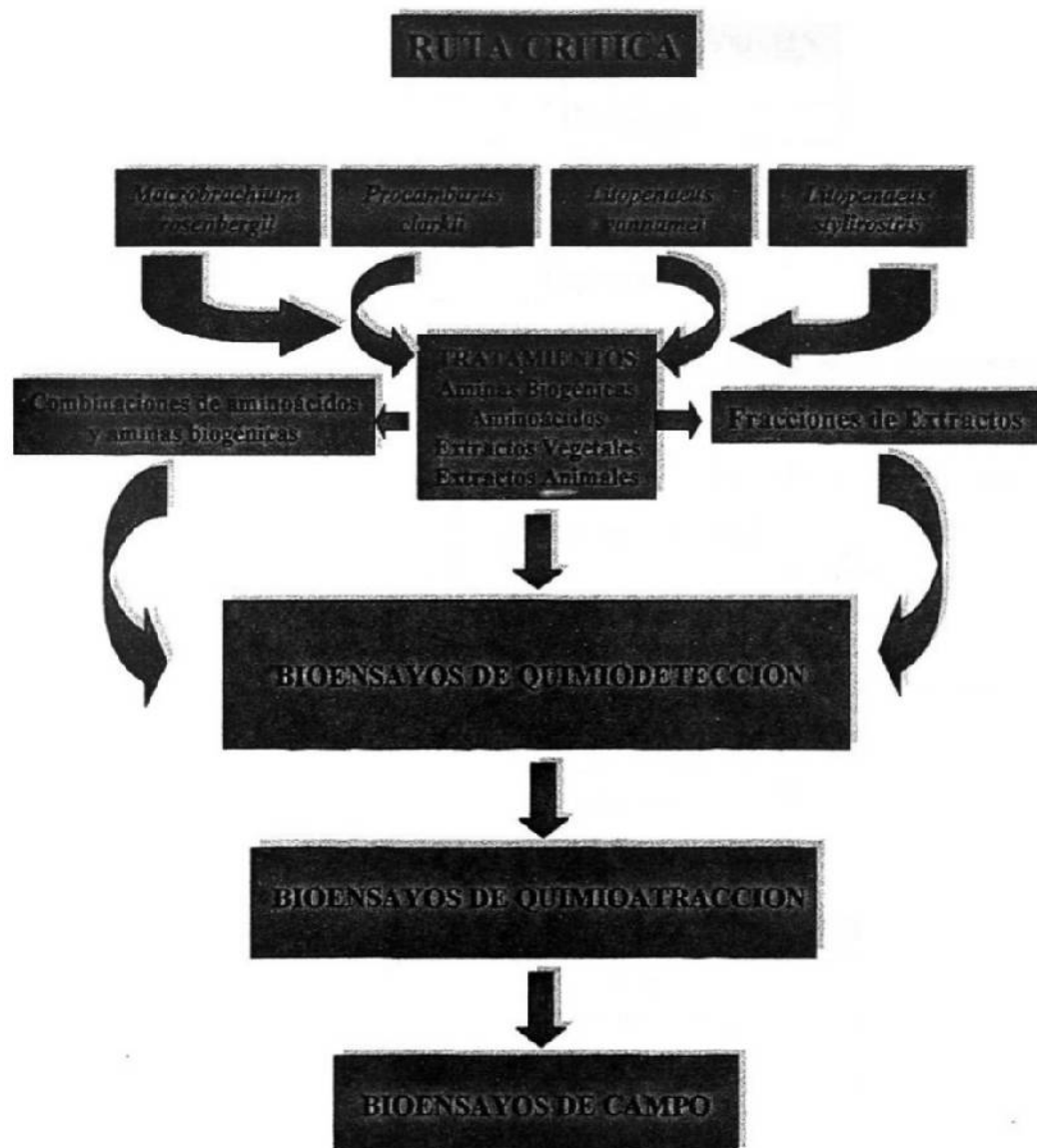


Figura 6.- Ruta crítica de la metodología utilizada.

La serie experimental comprendida dentro de este estudio estuvo destinada a probar los siguientes tratamientos (Tabla 10):

## TRATAMIENTOS

Tabla 10.- Lista de los tratamientos.

AMINOACIDOS
Arginina
Histidina
Lisina
Tirosina

AMINAS BIOGENICAS
Putrescina
Histamina
Cadaverina
Tiramina
Espermina
Espermidina

EXTRACTOS ANIMALES		
Peces	lisa ( <i>Mugil cephalus</i> )	
Crustáceos	jaiba ( <i>Callinectes sapidus</i> )	
	Langostilla ( <i>Pleurocodes planipes</i> )	aceite agua de cola liofilizado extracto etéreo
Moluscos	caracol ( <i>Pomacea bridgesi</i> )	
	calamar ( <i>Loligo sp</i> )	

EXTRACTOS VEGETALES
Coco ( <i>Cocus nucifera</i> )
<i>Chara sp.</i>
Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )

TESTIGO POSITIVO	TESTIGO NEGATIVO
Atractante Comercial <i>Langobuds®</i>	Dieta base



Tanto los aminoácidos como las aminas biogénicas fueron obtenidas comercialmente en la Compañía *Sigma-Aldrich*, con una pureza no menor al 98%. La preparación de los extractos se realizó mezclando las muestras de los tejidos en partes iguales de agua, estos fueron homogeneizados con un homogenizador marca Pyrex y centrifugados por 20 minutos. Únicamente el sobrenadante fue utilizado para las evaluaciones. Una excepción fue el extracto de langostilla (*Plauroncodes planipes*), del cual se obtuvieron diferentes fracciones, como el extracto etereo, el agua de cola, el liofilizado y el aceite, mismas que fueron utilizadas por separado como tratamientos (Tabla 10).

Adicionalmente se llevaron a cabo dos estudios colaterales con *L. vannamei* y *M. rosenbergii*, con el fin, por una parte, de dilucidar aquellas fracciones químicas derivadas de los extractos animales y vegetales que pudieran ofrecer resultados interesantes en términos de atractabilidad. Así, los extractos animales y vegetales que presentaron mejores resultados en las pruebas preliminares de quimiodetección, fueron fraccionados mediante diversas técnicas y las fracciones obtenidas (un total de 17, Tabla 11) fueron sometidas al mismo protocolo experimental para determinar el tipo de fracciones que le conferían al extracto su poder atractante. Los extractos utilizados fueron de las siguientes especies:

- Extracto de coco: *Cocus nucifera*
- Subproductos de langostilla: *Pleurocondes planipes*
  - agua de prensa de langostilla
  - liofilizado de langostilla

Tabla 11.- Fracciones obtenidas.

MUESTRA	FRACCIÓN	TECNICA	FASE	
COCO ( <i>Cocos nucifera</i> )	Extracto	-	-	
	Agua	-	-	
	Pulpa	B&D I		Superior
				Inferior
		B&D II		Superior
				Inferior
				Intermedia
		B&D III		Superior
				Inferior
		B&D IV		Superior
				Inferior
				Intermedia
Verde		Superior		
		Inferior		
LANGOSTILLA ( <i>Pleurocondes planipes</i> )	Agua de cola	-	-	
	Liofilizado	-	-	
	Liofilizado	Verde	Superior	
CALAMAR		B&D IV	Inferior	
			Superior	
			Intermedia	
TESTIGO (+)	-	-	-	
TESTIGO (-)	-	-	-	

Las diferentes técnicas de extracción y separación de los extractos se describen en el Anexo I.

Por otra parte, se llevaron a cabo estudios de laboratorio y campo dirigidos a identificar las eventuales reacciones sinérgicas o antagónicas de diferentes moléculas sintéticas, utilizando aminoácidos y aminas biogénicas que fueron seleccionados por presentar los mejores resultados al ser probados por separado en los bioensayos de quimiodección. De esta manera se eligieron los siguientes tratamientos que fueron sujetos al mismo protocolo experimental:

Para *P. vannamei*

- 1) Cadaverina-Putrescina
- 2) Cadaverina-Arginina
- 3) Cadaverina-Histidina
- 4) Putrescina-Arginina
- 5) Putrescina-Histidina
- 6) Arginina-Histidina
- 7) Cadaverina-Putrescina-Arginina
- 8) Cadaverina-Putrescina-Histidina
- 9) Putrescina-Arginina-Histidina
- 10) Cadaverina-Putrescina-Arginina-Histidina
- 11) Extracto acuoso de lisa\* (*Mugil cephalus*)

Para *M. rosenbergii*

- 1) Cadaverina-Histamina
- 2) Cadaverina-Arginina
- 3) Cadaverina-Histidina
- 4) Histamina-Arginina
- 5) Histamina-Histidina
- 6) Arginina-Histidina
- 7) Cadaverina-Histamina-Arginina
- 8) Cadaverina-Histamina-Histidina
- 9) Histamina-Arginina-Histidina
- 10) Cadaverina-Histamina-Arginina-Histidina.
- 11) Extracto acuoso de lisa\*

Cabe señalar que todas las combinaciones se realizaron en una proporción de 1:1 w/w.

Por último, el extracto acuoso de lisa\* fue obtenido de ejemplares de lisa los cuales fueron previamente eviscerados y colocados a temperatura ambiente en una cámara húmeda por

un tiempo de 72 horas, con la finalidad de acelerar el proceso de descomposición. Muestras con 20ml del extracto acuoso resultante de dicha descomposición fueron colectadas cada 4 horas durante los tres días. Las muestras fueron congeladas hasta su utilización.

### ***FASE I.- BIOENSAYO DE QUIMIODETECCION***

Esta fase se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Pittet *et al.* (1996) modificada, la cual se basa en la investigación cualitativa del grado de excitación del organismo en presencia de las moléculas probadas. El equipo consistió en un acuario de 15 x 10 X 15 cms., el cual contenía 1.5 litros de agua, este acuario fue cubierto en su exterior por un túnel de madera color negro, al final del cual se colocó una video-cámara, tal y como se muestra en la Figura 7. Después de colocar dentro del túnel el acuario que contenía al organismo, se incluyeron los diferentes tratamientos, diluidos en agua dulce o marina según la especie, utilizando una micropipeta eppendorf. El volumen de la muestra incluida en el acuario siempre fue de 300µl.

Se realizaron curvas de dosis-respuesta para cada uno de los tratamientos y especies con la finalidad de determinar la dosis óptima, la cual se utilizó en los bioensayos subsecuentes. Para conocer el rango de respuesta con relación a la dosis, se realizaron pruebas preliminares donde los tratamientos fueron evaluados a dosis de 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10%, seleccionando así la dosis inicial de 0.1% para el caso de las moléculas sintéticas (aminoácidos y aminos biogénicas), el attractante comercial y el liofilizado de langostilla, y de 1% en el caso de los extractos animales y vegetales.

La secuencia de movimientos comportamentales que define las diferentes fases de atracción de los crustáceos fue registrada mediante vídeo. La duración de cada bioensayo fue de tres minutos, ya que se estimó que si no existían evidencias de detección del estímulo durante este período de tiempo, no lo habría posteriormente. Se tomaron en cuenta los movimientos de los organismos registrando el grado de excitación de acuerdo al criterio establecido por Pittet, *et al.*, (1996), como se indica en la Tabla 12. Como testigo negativo se utilizó agua dulce o marina, en función de la especie empleada en cada prueba, y un extracto de la dieta basal (Tabla 12).

Tabla 12.- Escala de actividad propuesta por Pittet *et al* (1996).

Escala	Actividad
0	Sin reacción aparente.
1	Movimiento esporádico de los maxilípedos: sin actividad antenular.
2	Movimiento regular de los maxilípedos: sin actividad antenular.
3	Movimiento regular de los maxilípedos: actividad antenular esporádica.
4	Movimiento continuo de los maxilípedos: actividad antenular esporádica.
5	Movimiento continuo de los maxilípedos: actividad antenular extrema.



Figura 7.- Sistema de cámara estática con acuario para realizar los bioensayos de detección de estímulos.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Considerando los valores registrados para cada uno de los tratamientos (24), dosis (5) y repeticiones (3) se realizaron curvas de dosis-respuesta mediante un análisis de regresión polinomial de segundo grado, obteniéndose mediante la utilización de la ecuaciones  $X=-b/2a$  y  $Y=4ac-b^2/4a$ , la dosis óptima y el grado máximo de excitación, respectivamente, determinadas por el uso de cálculo diferencial (máximos y mínimos), para cada uno de los tratamientos (Anexo II).

## **FASE II.- BIOENSAYO DE QUIMIOATRACCION EN ACUARIOS**

Para esta fase se elaboró una dieta basal utilizando ingredientes que le conferían una característica anti-attractante y anti-palatable, por lo cual se uso como testigo negativo (Tabla 13). Dichos ingredientes fueron molidos, tamizados, mezclados y peletizados con un molino de carne

para producir pellets de 1.5 mm. de diámetro. Posteriormente se secaron a 80°C durante 1 hora y fueron colocados en bolsas de plástico, las cuales se almacenaron a -20°C y 48 horas antes de utilizarse se pasaron a un refrigerador a 4°C.

Tabla 13.- Fórmula utilizada para la elaboración del alimento base.

INGREDIENTE	PORCENTAJE EN BIOMASA HUMEDA
Pasta de soya	45
Harina de trigo	50
Gelatina	5

### ***APLICACION DE ATRACTANTES Y DISEÑO EXPERIMENTAL***

Los tratamientos fueron agregados a la dieta basal por aspersión, en la dosis óptima determinada en la fase anterior. La metodología que se utilizó es similar a la propuesta por Costero y Meyers (1993), introduciéndose una modificación consistente en eliminar el flujo de agua, debido a que en bioensayos previos se observó que los crustáceos presentaban una reacción al estímulo reostático del flujo de agua. Tanto la temperatura como el pH del agua se mantuvieron constantes (7.0 - 7.5 y 24-26 °C, respectivamente), ya que se ha demostrado que estos parámetros fisicoquímicos pueden afectar el proceso de quimiorrecepción, como lo mencionan Tierney y Atema, (1988) y Lec y Meyers, (1996a).

El dispositivo utilizado para llevar a cabo las pruebas correspondientes a esta fase consistió en un acuario de 120 X 30 X 40 cm, sin flujo de agua (Figura 8). Este acuario poseía una división removible en uno de los extremos, lo que nos permitió inmovilizar al animal mientras que la fuente de estímulo (alimento) era colocada del otro lado del acuario. Después de cada prueba, el acuario fue vaciado y llenado con agua fresca con las mismas características fisicoquímicas, esto con la finalidad de excluir cualquier posible interferencia del attractante disuelto en el agua del bioensayo anterior, lo cual hubiera podido afectar la respuesta de los organismos.

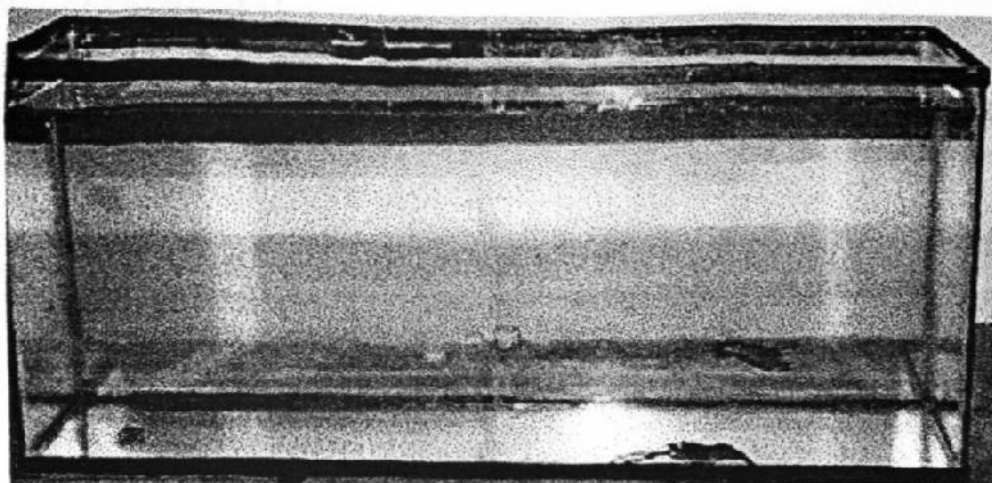


Figura 8.- Esquema representativo del acuario utilizado en los bioensayos de quimioatracción.

**Registro de la Prueba:** Para cada uno de los tratamientos se registró el tiempo en que los ejemplares presentaban las diferentes fases de comportamiento alimenticio (Tabla 14) apoyandonos en un sistema de videofilmación. Estas fases han sido definidas como percepción, orientación, movimiento hacia el estímulo, arribo al alimento e ingestión del mismo, como lo señalan Costero y Meyers, (1993) y Mendoza *et al.*, (1997). El test se registró como negativo si no llegaba a presentarse respuesta en un tiempo de 500 segundos<sup>1</sup>.

Tabla 14.- Fases de comportamiento alimenticio de crustáceos decápodos de acuerdo con Costero y Meyers (1993).

FASE	CARACTERISTICA
<b>Percepción</b>	Detección o reconocimiento de una señal química por las anténulas, maxilípedos y dactilos de los pereiópodos.
<b>Orientación</b>	Cambios de posición del animal en relación a su posición antes del estímulo y apuntando a la fuente del estímulo.
<b>Movimiento</b>	El animal inicia sus movimientos de desplazamiento ya sea en dirección de la fuente del estímulo o en otro sentido.
<b>Arribo al alimento</b>	El animal llega al lugar en donde está la fuente del estímulo y detiene sus movimientos de desplazamiento
<b>Ingestión del alimento</b>	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

<sup>1</sup> Se considera 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***

Se utilizaron los tratamientos que en el bioensayo de quimiodetección presentaron mejores resultados, realizándose 3 repeticiones para cada uno de ellos.

Los resultados se sometieron a un Análisis de Varianza para determinar las eventuales diferencias comportamentales provocados por los distintos tratamientos. En el caso de encontrarse diferencias significativas, los tratamientos fueron separados utilizando una prueba de comparación de medias de Tuckey (Zar, 1982).

## ***FASE III.- BIOENSAYO DE INGESTION (CONDICIONES COMERCIALES)***

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos a nivel de laboratorio (Fases I y II), se llevaron a cabo bioensayos de ingestión en condiciones comerciales. Esta fase es particularmente importante para confirmar el desempeño de los atractantes al ser expuestos a grandes volúmenes de agua en movimiento, tal como sucede en los estanques, y el reto que representa la diversidad natural de moléculas con poder atractante presentes tanto en el bentos como en la columna de agua.

Los bioensayos se realizaron en granjas comerciales que se encuentran produciendo actualmente las diferentes especies utilizadas.



## ***DESCRIPCIÓN DEL BIOENSAYO***

En jaulas de un metro cuadrado (Figura 9) se colocaron 10 ejemplares adultos, de la especie que se estaba evaluando, a los cuáles se les ofrecieron pellets de tamaño uniforme (0.4 cm) en una charola (la cantidad de pellets era equivalente al 3% de su peso corporal). Las charolas fueron levantadas a diferentes tiempos (20, 40 y 80 minutos), contabilizándose el número de pellets presentes, para que, por diferencia con respecto al número inicial de ellos, se obtenga el número de pellets consumido en cada intervalo de tiempo.



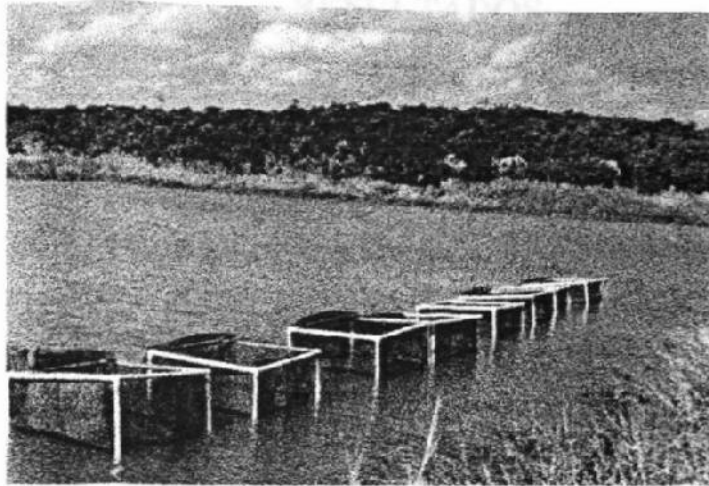


Figura 9.- Jaulas utilizadas en los bioensayos de campo en condiciones comerciales.

### *DISEÑO EXPERIMENTAL*

Para cada una de las especies, se utilizaron los tratamientos que presentaron los mejores resultados en los bioensayos previos. Se realizaron 3 repeticiones para cada uno de ellos y los resultados fueron sometidos a un Análisis de Varianza para determinar las eventuales diferencias entre los tratamientos. Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante la prueba de contraste múltiple de medias de Tuckey (Zar, 1982).

### **BIOENSAYO DE CAMPO CON ACOCILES**

Debido a que en México todavía no se establecen granjas comerciales de acocíl rojo, *Procambarus clarkii*, se utilizó una metodología alterna para evaluar el potencial de atracción de los tratamientos en condiciones naturales. El bioensayo consistió en colocar trampas utilizando los tratamientos como cebos. Las trampas fueron colocadas a una distancia de 10 metros entre una y otra y los atractantes fueron asperjados en la dieta base a la dosis óptima obtenida en los bioensayos de quimiodetección.

Los tiempos de muestreo fueron de 20, 40 y 80 minutos, después de los cuales se registró el número de ejemplares capturados por tratamiento en cada tiempo. Se llevaron a cabo 3 repeticiones para validar los resultados por medio de un Análisis de Varianza complementado con una comparación de medias de Tuckey, (Zar, 1982).

## RESULTADOS

### *Macrobrachium rosenbergii*

#### FASE DE QUIMIODETECCION

En esta fase se probaron 24 tratamientos en total, correspondientes a la utilización de 4 aminoácidos, 6 aminas biogénicas, 8 extractos animales, 3 extractos vegetales, 3 testigos (un atractante comercial y un alimento comercial como testigos positivos y la dieta basal como testigo negativo) (Tabla 15).

#### *Aminoácidos*

Los resultados revelaron que entre los aminoácidos probados, la histidina y la arginina presentaron los mayores grados de excitación (3.64 y 4.01, respectivamente) de acuerdo a la escala de Pittet. Por su parte, la lisina y la tirosina provocaron menores grados de excitación (2.52 y 2.43, respectivamente)

#### *Aminas Biogénicas*

En el caso de las aminas biogénicas utilizadas, la cadaverina y la putrescina se destacaron por presentar altos grados de excitación (4.26 y 4.15, respectivamente). Mientras que las aminas que presentaron más bajos resultados fueron la histamina y la tiramina (2.34 y 2.53, respectivamente).

#### *Extractos Animales*

Dentro de los extractos animales, los que presentaron mayores valores fueron el extracto liofilizado y el aceite de langostilla (4.78 y 3.52, respectivamente), además del extracto de caracol (3.46) y el agua de cola de langostilla (3.21).

#### *Extractos Vegetales*

De los extractos vegetales solamente el de coco mostró un grado considerable de excitación (3.21), no así los extractos de *Chara sp* (1.12) y de alfalfa (1.02).

### Testigos

Por último, el atractante comercial (testigo positivo), provocó también comportamiento excitatorio en *Macrobrachium rosenbergii* (4.55 en la escala de Pittet), el cual fue solo superado por el liofilizado de langostilla. Como se esperaba, el testigo negativo (dieta basal) y sorprendentemente el alimento comercial no lograron provocar grados de excitación de la magnitud de los anteriores tratamientos, en los ejemplares utilizados.

Tabla 15.- Dosis óptima y grado máximo de excitación presentado por *M. rosenbergii* mediante los bioensayos de quimiodetección.

TRATAMIENTOS	DOSIS EN %	MAXIMO GRADO DE EXCITACION
Liofilizado de Langostilla	0.275	4.78
Atractante comercial (+)	0.230	4.55
Cadaverina	0.324	4.26
Putrescina	0.272	4.15
Histidina	0.169	4.01
Arginina	0.339	3.64
Aceite de Langostilla	1.110	3.52
Ext. de Caracol	1.110	3.46
Ext. de Coco	1.480	3.21
Agua de cola de Langostilla	1.060	3.21
Espermina	0.308	2.98
Espermidina	0.307	2.96
Ext. de Jaiba	2.010	2.91
Extracto de Pescado	1.460	2.84
Tiramina	0.126	2.53
Lisina	0.258	2.51
Tirosina	0.118	2.43
Ext. de Calamar	2.460	2.37
Histamina	0.310	2.34
Alimento Comercial	2.380	1.42
Ext. de Chara	2.210	1.12
Ext. de Alfalfa	1.350	1.02
Dieta Basal (-)	2.580	1.02
Ext. Etereo de Langostilla	1.370	0.76

### FASE DE QUIMIOATRACCION

Para la realización de esta fase se seleccionaron solo aquellos tratamientos que presentaron los mejores resultados en la fase de quimiodetección, empleándose la dosis óptima de cada uno de ellos, tal y como se muestra en la Tabla 16.

Se seleccionaron solamente los tratamientos que presentaron un grado de excitación mayor a 3, siendo estos 4 extractos animales, dos aminoácidos, dos aminos biogénicas y un extracto vegetal. Adicionalmente, en todas las pruebas se incluyeron los testigos positivos y negativo.

Tabla 16.- Dosis utilizadas en la fase de quimioatracción, con *M. rosenbergii*

TRATAMIENTOS	DOSIS EN %
Liofilizado de Langostilla	0.275
Atractante comercial (+)	0.23
Cadaverina	0.324
Putrescina	-- 0.272
Histidina	0.169
Arginina	0.339
Aceite de Langostilla	1.11
Ext. de Caracol	1.11
Ext. de Coco	1.48
Agua de cola de Langostilla	1.06
Alimento Comercial (+)	
Dieta basal (-)	

El Análisis de Varianza reveló que en todas y cada una de las fases comportamentales consideradas (percepción, orientación, movimiento, arribo al alimento e ingestión) se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que se realizaron las respectivas comparaciones de medias por el método de Tuckey. Esto permitió observar que en la fase de percepción, los tratamientos que presentaron menores tiempos fueron el liofilizado de langostilla, la cadaverina, el aceite de langostilla, la arginina, el extracto de coco, el attractante comercial, la putrescina y el agua de cola de langostilla ( $F= 23.256$ ; d.f. 11,35;  $P < .0001$ ). Para la fase de orientación, los mejores tratamientos fueron el liofilizado de langostilla, la cadaverina, la

arginina, el agua de cola de langostilla, el aceite de langostilla, la putrescina y el attractante comercial (F = 35.779; d.f. 11,35; P < .0001). Para las fases de movimiento, arribo e ingestión destacan los siguientes tratamientos: liofilizado de langostilla, Cadaverina, Extracto de coco, el attractante comercial, y la Arginina (Figura 9). Los resultados promedio de todas las fases se encuentran enlistados en la Tabla 1 del Anexo III y los análisis de varianza y las comparaciones de medias se presentan en el Anexo V.

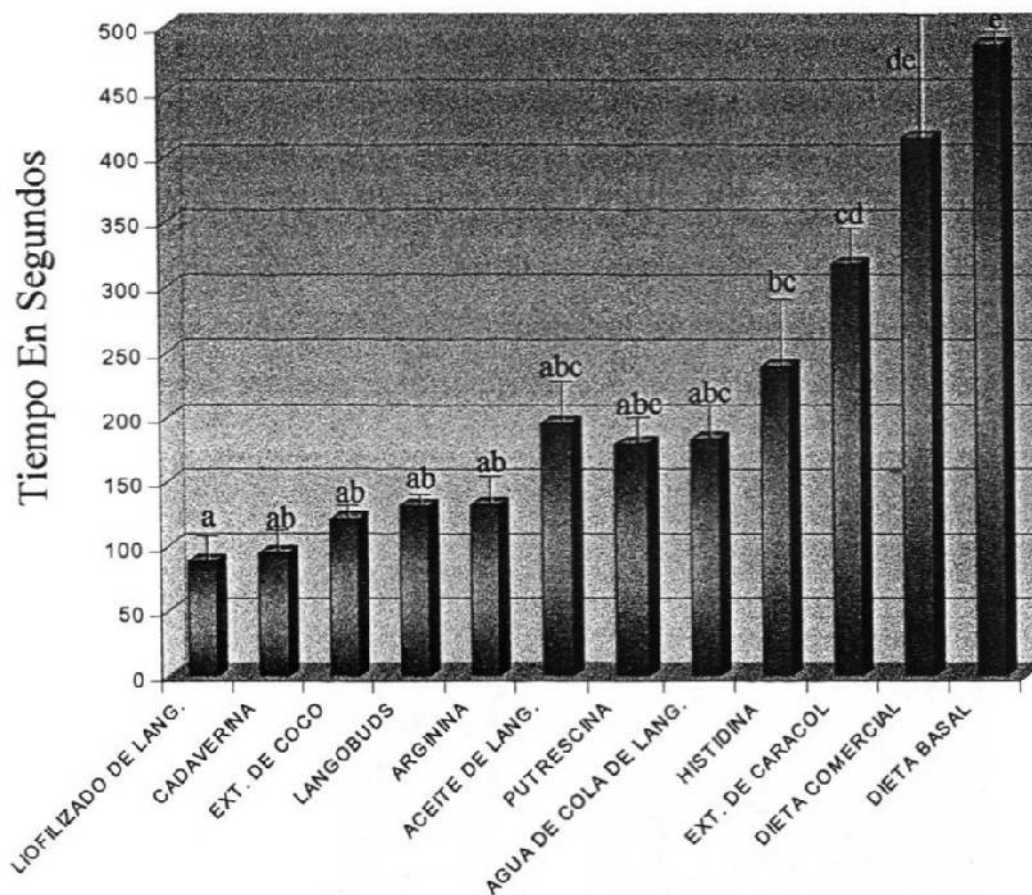


Figura 9.- Tiempo que tarda *M. rosenbergii* en ingerir los alimentos a los cuales fueron añadidos los tratamientos (F= 21.543; d.f. = 11,35; P < 0.0001). Las medias con la misma literal denotan grupos homogéneos.

### BIOENSAYO DE CAMPO

En esta fase se utilizaron los siguientes tratamientos: liofilizado de langostilla, cadaverina, extracto de coco y arginina. Como testigo negativo se utilizó el alimento comercial (*Camaronina*®, de Purina) el cual se estaba utilizando en la granja para el mantenimiento y

crecimiento de los langostinos. Como testigo positivo se utilizó el atractante comercial (*Langobuds*<sup>®</sup>).

#### Fase de Observación Directa

Los resultados indicaron que en el tiempo I (20 minutos) no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F = 3.555$ ; d.f. 5,17;  $P < 0.05$ ). Para el tiempo II (40 minutos) solo el alimento comercial presentó diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos, debido a que fue el menos consumido ( $F = 7.148$ ; d.f. 5,17;  $P < 0.005$ ). Para el tiempo III (80 minutos), se destacó el consumo de la arginina, seguido por la cadaverina, el atractante comercial y el liofilizado de langostilla sin diferencias significativas entre ellos. El extracto de coco y el alimento comercial presentaron el menor consumo ( $F = 21.726$ ; d.f. 5,17;  $P=0.0001$ ) (Figura 10). Los resultados promedio de consumo de pellets a los diferentes tiempos se encuentran enlistados en la Tabla 1 del Anexo IV y los análisis de varianza y las comparaciones de medias se presentan en el Anexo V.

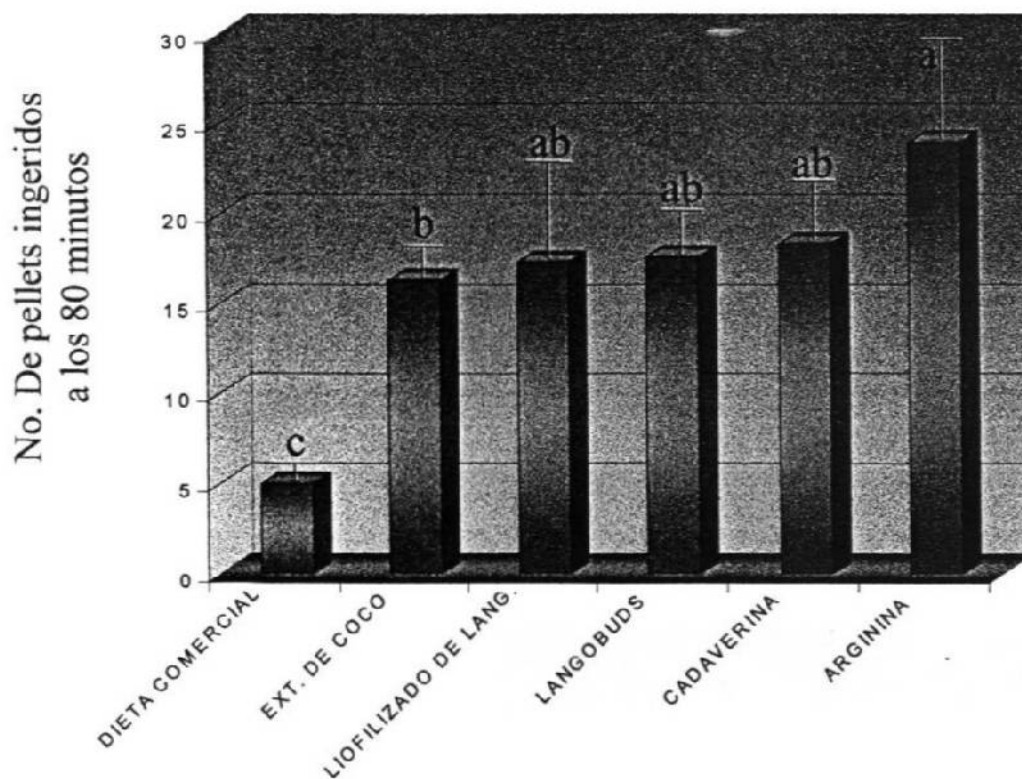


Fig. 10.- Número de pellets consumidos por *M. rosenbergii* a los 80 minutos. Las medias con la misma literal denotan grupos homogéneos.

En la Tabla 17 se enlista el comportamiento de la totalidad de los tratamientos utilizados a través de las tres fases metodológicas (quimiodetección, quimioatracción y bioensayos de campo).

Tabla 17.- Utilización de los atractantes a través de los diferentes bioensayos.

TRATAMIENTOS	QUIMIO-DETECCION	QUIMIO-ATRACCION	BIOENSAYO DE CAMPO
Arginina			
Lisina			
Histidina			
Tiramina			
Cadaverina			
Putrescina			
Histamina			
Tirosina			
Espermina			
Espermidina			
Extracto de pescado (Lisa)			
Ext. de Caracol ( <i>Pomacea bridgesi</i> )			
Ext. de Calamar			
Ext. de Jaiba ( <i>Callinectes sapidus</i> )			
Liofilizado de Langostilla ( <i>Pleurocondes planipes</i> )			
Agua de cola de Langostilla ( <i>P. planipes</i> )			
Aceite de Langostilla ( <i>P. planipes</i> )			
Ext. Eterco de Langostilla ( <i>P. planipes</i> )			
Ext. de Coco ( <i>Cocos nucifera</i> )			
Ext. de <i>Chara sp.</i>			
Ext. de Alfalfa			
Atractante comercial ( <i>Langobuds®</i> )			
Alimento Comercial			
Dieta Basal (-)			

Nota: Las áreas sombreadas en gris son indicativas de la eficiencia, en términos de atractabilidad y estimulación alimenticia de cada uno de los tratamientos.

## ***Procambarus clarkii***

### **FASE DE QUIMIODETECCION**

#### ***Aminoácidos***

Las pruebas efectuadas con el acocil rojo, *Procambarus clarkii*, mostraron que entre los aminoácidos probados, la histidina y la lisina fueron las que ofrecieron los mejores resultados alcanzando un grado de excitación de 3.25 y 3.05, respectivamente.

#### ***Aminas Biogénicas***

Entre las aminas biogénicas utilizadas, la putrescina y la cadaverina se destacaron por presentar altos grados de excitación (3.84 y 3.3, respectivamente).

#### ***Extractos Animales***

Dentro de los extractos animales, los que presentaron las mejores respuestas fueron el agua de cola de langostilla (3.42) y el extracto de pescado (3.27).

#### ***Extractos Vegetales***

Entre los extractos vegetales, el de coco mostró un alto grado de excitación (3.47), así como el extracto de *Chara sp.* (3.15).

#### ***Testigos***

Por último, el testigo positivo, *Langobuds®*, provocó igualmente un importante comportamiento excitatorio (3.83 en la escala de Pittet). El testigo negativo y el alimento comercial no lograron provocar ningún grado de excitación considerable en los ejemplares utilizados.

En la Tabla 18 se muestran los grados de excitación alcanzados para cada uno de los tratamientos, así como la dosis óptima para cada uno de los mismos.



Tabla 18.- Dosis óptima y grado máximo de excitación presentado por *P. clarkii* mediante los bioensayos de quimiodetección.

TRATAMIENTOS	DOSIS EN %	MAXIMO GRADO DE EXCITACION
Atractante comercial (+)	0.26	3.83
Putrescina	0.3	3.84
Ext. de Coco	2.48	3.47
Agua de cola de Langostilla	2.69	3.42
Cadaverina	0.33	3.3
Extracto de pescado (Lisa)	2.96	3.27
Histidina	0.29	3.25
Ext. de Chara	3.03	3.15
Lisina	0.29	3.05
Ext. de Calamar	2.85	2.43
Ext. de Caracol	2.85	2.3
Ext. de Jaiba	3.72	2.06
Arginina	0.37	1.9
Espermina	0.31	1.88
Espermidina	0.36	1.78
Histamina	0.26	1.77
Liofilizado de Langostilla	0.36	1.68
Alimento Comercial (+)	0.29	1.65
Tiramina	0.34	1.53
Aceite de Langostilla	2.7	1.52
Tirosina	0.29	0.91
Dieta Basal (-)	4.6	0.91
Ext. Etereo de Langostilla	3.92	0.86
Ext. de Alfalfa	3.41	0.11

#### FASE DE QUIMIOATRACCION

Al igual que con *M. rosenbergii*, los tratamientos utilizados en esta fase fueron aquellos que ofrecieron los mejores resultados en la fase de quimiodetección, empleándose la dosis óptima de cada uno de ellos, tal y como se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19.- Dosis utilizadas en la fase de quimioatracción, con *P. clarkii*.

TRATAMIENTOS	DOSIS EN %
Atractante comercial (+)	0.26
Putrescina	0.3
Ext. de Coco	2.48
Agua de cola de Langostilla	2.69
Cadaverina	0.33
Extracto de pescado (Lisa)	2.96
Histidina	0.29
Ext. de Chara	3.03
Lisina	0.29
Dieta comercial (+)	
Dieta basal (-)	

El Análisis de Varianza reveló que en todas las fases existían diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que realizaron comparaciones de medias por la prueba de Tuckey, observándose que en general los tratamientos que presentaron menores tiempos fueron el attractante comercial, putrescina, *Chara sp*, extracto de pescado (lisa), agua de cola de langostilla, lisina, cadaverina y extracto de coco. Los tratamientos que tardaron más tiempo en alcanzar la fase de ingestión fueron la histidina, la dieta comercial y la dieta basal (Figura 11). Los resultados promedio de todas las fases se encuentran enlistados en la Tabla 2 del Anexo III y los análisis de varianza y las comparaciones de medias se presentan en el Anexo V.

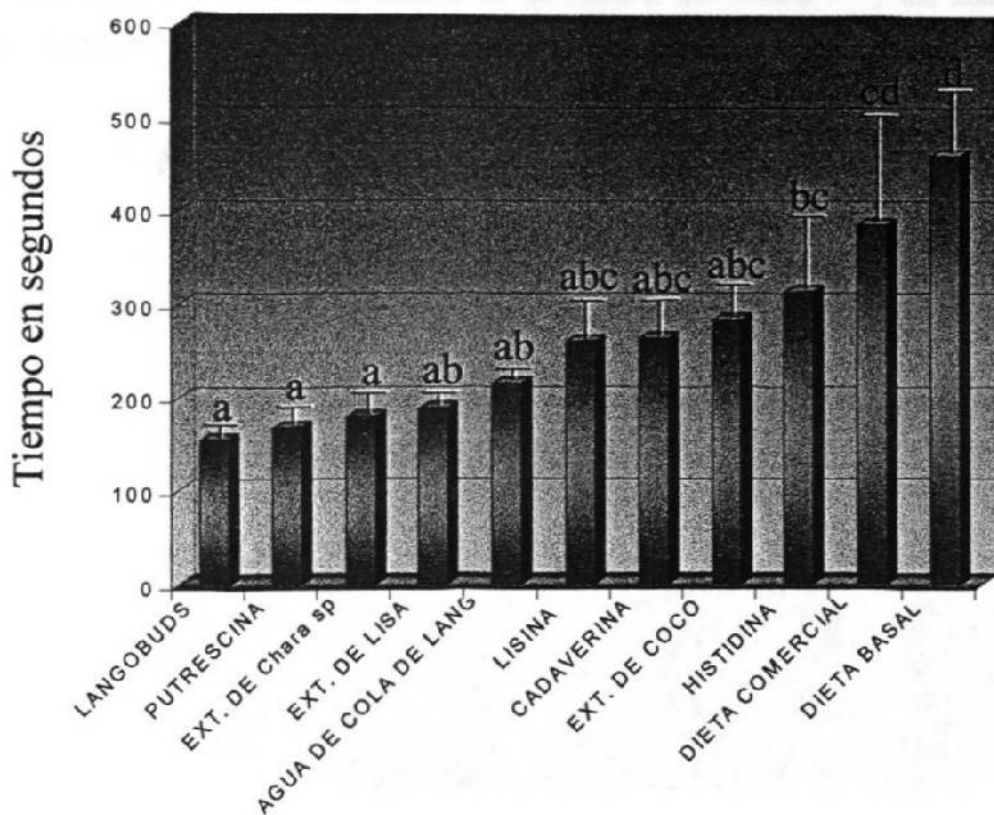


Figura 11.- Tiempo que tarda *P. clarkii* en alcanzar la fase de ingestión ( $F = 13.805$ ; g.l. 10,32;  $P < 0.0001$ ). Las medias con la misma literal denotan grupos homogéneos.

#### BIOENSAYO DE CAMPO (Condiciones naturales)

En esta fase, los tratamientos utilizados fueron la putrescina, extracto de *Chara sp*, extracto de pescado (lisa) y agua de cola de langostilla, ya que presentaron los mejores resultados en los bioensayos de quimioatracción. Como testigos positivos se utilizaron el atractante comercial (*Langobuds*<sup>®</sup>) e hígado de res. Como testigo negativo se utilizó la dieta basal.

Los resultados (Anexo IV) revelaron la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos en relación al número de ejemplares capturados a los diferentes tiempos, observándose que con el extracto de pescado (lisa) se capturaron más ejemplares que con el resto de los tratamientos, seguido por el atractante comercial (*Langobuds*<sup>®</sup>), la putrescina, el hígado de res, el agua de cola de langostilla y el testigo negativo, mientras que con el extracto de *Chara sp* se capturaron menos ejemplares (Figura 12). Los resultados promedio de individuos capturados a

los diferentes tiempos se encuentran enlistados en la Tabla 2 del Anexo IV y los análisis de varianza y las comparaciones de medias se presentan en el Anexo V.

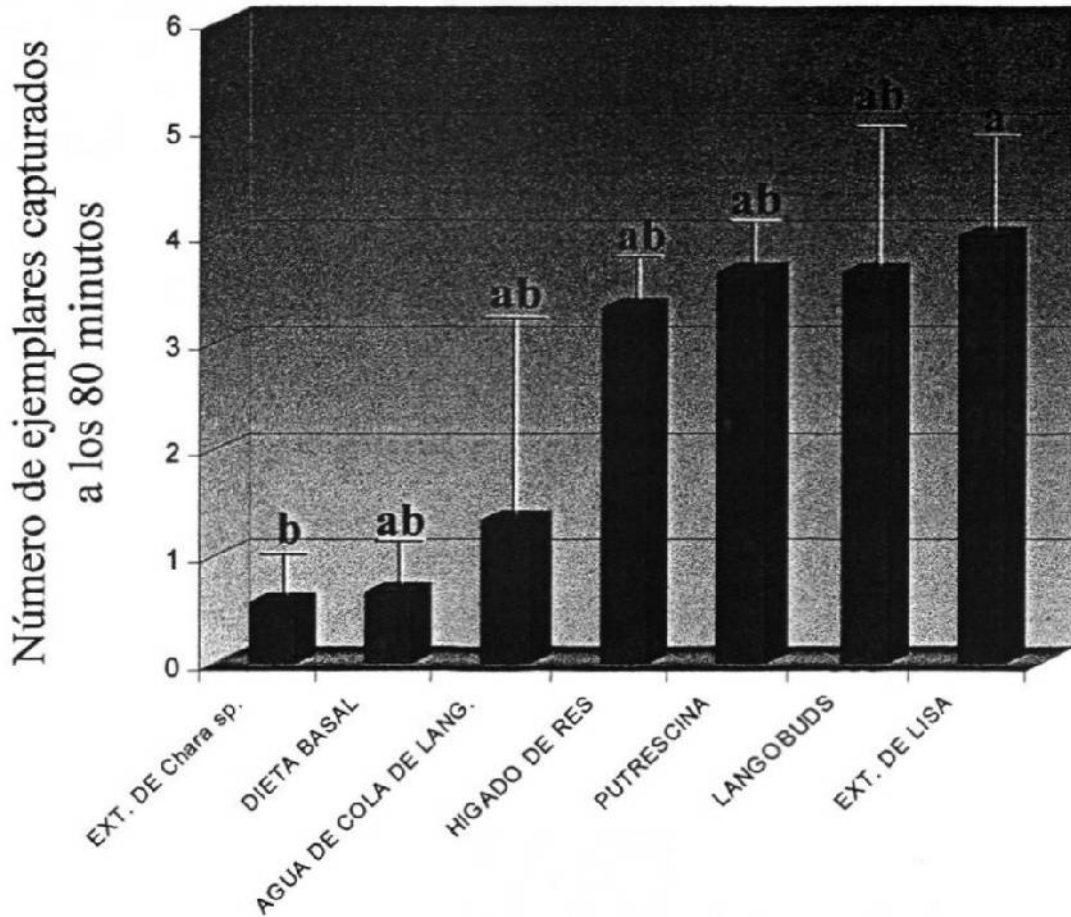


Figura 12.- Número de ejemplares de *P. Clarkii* capturados a los 80 minutos ( $F = 5.125$ ; g.l. 6,20;  $P < 0.01$ ). Las medias con la misma literal denotan grupos homogéneos.

En la Tabla 20 se enlista el comportamiento de la totalidad de los tratamientos utilizados a través de las tres fases metodológicas (quimiodetección, quimioatracción y bioensayos de campo).

Tabla 20.- Utilización de los atractantes a través de los diferentes bioensayos.

TRATAMIENTOS	QUIMIO-DETECCION	QUIMIO-ATRACCION	BIOENSAYO DE CAMPO
Arginina			
Lisina			
Histidina			
Tiramina			
Cadaverina			
Putrescina			
Histamina			
Esermina			
Extracto de pescado (Lisa)			
Ext. de Caracol ( <i>Pomacea bridgesi</i> )			
Ext. de Calamar			
Ext. de Jaiba ( <i>Callinectes sapidus</i> )			
Liofilizado de Langostilla ( <i>P. planipes</i> )			
Agua de cola de Langostilla ( <i>P. planipes</i> )			
Aceite de Langostilla ( <i>Pleurocondes planipes</i> )			
Ext. Etereo de Langostilla ( <i>P. planipes</i> )			
Ext. de Coco ( <i>Cocos nucifera</i> )			
Ext. de <i>Chara sp.</i>			
Ext. de Alfalfa			
Atractante comercial ( <i>Langobuds®</i> )			
Alimento Comercial			
Dieta Basal (-)			

Nota: Las áreas sombreadas en gris son indicativas de la eficiencia, en términos de atractabilidad y estimulación alimenticia de cada uno de los tratamientos.

## ***Litopenaeus vannamei***

### **FASE DE QUIMIODETECCION**

Se utilizaron los mismos tratamientos que para las especies anteriores y se elaboraron gráficas de dosis-respuesta para cada uno de ellos.

#### ***Aminoácidos***

Los resultados revelaron que entre los aminoácidos probados, la arginina y la histidina fueron los que presentaron los mejores resultados alcanzando un grado de excitación de 3.97 y 3.83, respectivamente.

#### ***Aminas Biogénicas***

Entre las aminas biogénicas utilizadas, la cadaverina y la putrescina se destacaron por presentar altos grados de excitación (3.97 y 3.22, respectivamente).

#### ***Extractos Animales***

Dentro de los extractos animales, los que presentaron mejores respuestas fueron el liofilizado de langostilla (4.42), el aceite de langostilla (3.98), el extracto de caracol (3.62) y el agua de cola de langostilla (3.98).

#### ***Extractos Vegetales***

De los extractos vegetales, al igual que con *M. rosenbergii*, solamente el de coco mostró un alto grado de excitación (4.22).

#### ***Testigos***

El testigo positivo, *Langobuds®*, provocó también comportamiento alimenticio en *Litopenaeus vannamei* (3.95). En el caso de el testigo negativo y el alimento comercial, estos no lograron provocar ningún grado de excitación en los ejemplares utilizados.

En la Tabla 21 se muestran los grados de excitación alcanzados para cada uno de los tratamientos, así como la dosis con la que se obtuvo esta respuesta.

Tabla 21 .- Dosis óptima y grado máximo de excitación presentado por *L. vannamei* durante los bioensayos de quimiodetección.

TRATAMIENTOS	DOSIS EN %	MAXIMO GRADO DE EXCITACION
Liofilizado de Langostilla	0.298	4.42
Ext. de Coco	1.25	4.22
Aceite de Langostilla	1.02	3.98
Arginina	0.255	3.97
Cadaverina	0.249	3.97
Atractante comercial (+)	0.236	3.95
Histidina	0.242	3.83
Ext. de Caracol	1.21	3.62
Agua de cola de Langostilla	0.95	3.51
Putrescina	0.248	3.22
Espermina	0.284	2.99
Soluble de Pescado	1.24	2.91
Ext. de Calamar	2.01	2.87
Ext. de Jaiba	1.42	2.48
Espermidina	0.291	2.45
Lisina	0.257	2.44
Histamina	0.272	2.36
Tiramina	0.235	2.28
Tirosina	0.23	2.28
Alimento Comercial	0.236	1.57
Ext. Etereo de Langostilla	1.15	1.36
Dieta Basal (-)	2.01	1.32
Ext. de Alfalfa	1.35	1.02
Ext. de Chara	1.75	0.87

### FASE DE QUIMIOATRACCION

Los tratamientos utilizados en esta fase fueron los que presentaron mejores resultados en la fase de quimiodetección, empleándose la dosis óptima de cada uno de ellos, tal y como se muestra en la Tabla 22.