

La langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*, Stimpson, 1860) (Crustacea:Galatheidae), como alimento funcional en el crecimiento, supervivencia y composición corporal de larvas de camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*, Burkenroad, 1936) (Crustacea:Penaeidae)

The red crab (*Pleuroncodes planipes*, Stimpson, 1860) (Crustacea:Galatheidae), as fuctional feed to growth, survival and corporal composition of white shrimp larvae (*Litopenaeus schmitti*, Burkenroad, 1936) (Crustacea:Penaeidae)

Fernando Vega-Villasante,¹ Ubaldo Bécquer-Zúñiga²,
Niurka Hernández², Héctor Nolasco-Soria,³ y Olimpia Carrillo-Farnés⁴

¹ Laboratorio de Tierra, Océano y Atmósfera. Centro Universitario de la Costa de la Universidad de Guadalajara.
Av. Universidad de Guadalajara no. 203, Del. Ixtapa. 48280, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

² Centro de Investigaciones Marinas. Universidad de La Habana, Cuba.

³ Programa de Acuicultura. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. A.P.128,
La Paz 23000, Baja California Sur, México. E-mail: hnolasco04@cibnor.mx

⁴ Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.

Vega-Villasante, F., U. Bécquer-Zúñiga, N. Hernández, H. Nolasco-Soria y O. Carrillo-Farnés. 2006. La langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*, Stimpson, 1860) (Crustacea: Galatheidae), como alimento funcional en el crecimiento, supervivencia y composición corporal de larvas de camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*, Burkenroad, 1936) (Crustacea:Penaeidae). *Hidrobiológica* 16 (3): 241-249.

RESUMEN

El extracto crudo de langostilla, *Pleuroncodes planipes* (ETL), obtenido por prensado mecánico del organismo completo, posee compuestos nutritivos y no nutritivos con actividad funcional. Cuando el ETL fue adicionado, como aditivo alimentario, en el agua de cultivo (1 μ g/mL) de larvas de *Litopenaeus schmitti*, se observó un incremento del 24% en el crecimiento (en peso) y un 10% en la supervivencia de los organismos respecto al control. El ETL modificó la composición química corporal de las larvas obteniendo valores de proteína (%) de 74 \pm 3.1 y de glucógeno (mg/g) de 9.3 \pm 0.9, superiores al control (62 \pm 2.2 y 6.5 \pm 0.7, respectivamente). Así mismo, las larvas suplementadas con ETL incrementaron su actividad proteolítica digestiva (16.2 \pm 0.3 U/mg prot.) y la actividad de la superóxido dismutasa (39.18 \pm 2.0 U/mg prot.), en comparación con el control (9.5 \pm 0.2 y 22.7 \pm 1.2, respectivamente).

Palabras clave: Langostilla roja, nutrición, contenido proteico, camarón blanco.

ABSTRACT

The crude extract of red crab, *Pleuroncodes planipes* (ETL), obtained by mechanical pressing of the whole organism, has nutritive, and non nutritive compounds with functional activity. When ETL was added as feed additive, in larvae culture water (1 μ g/mL) of *Litopenaeus schmitti*, a 24% in increase growth (in weight), and a 10% in increase survival

were observed in experimental organisms in comparation to control experiment. ETL modified the larvae body chemical composition obtaining values of protein (%) of 74 ± 3.1 , and glycogen (mg/g) of 9.3 ± 0.9 , higher than control (62 ± 2.2 , and 6.5 ± 0.7 , respectively). Therefore, ETL supplemented larvae, increased its digestive proteolitic activity (16.2 ± 0.3 U/mg protein), and superoxide dismutase activity (39.18 ± 2.0 U/mg protein), in comparison to control organisms (9.5 ± 0.2 y 22.7 ± 1.2 , respectively).

Key words: Red crab, nutrition, protein content, white shrimp.

INTRODUCCIÓN

La langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*, Stimpson, 1860) es un crustáceo decápodo de la familia Galatheidae que habita la costa oeste de Norteamérica y la plataforma continental de las costas de Baja California desde los 11° a 37° N, forma parte de algunas pesquerías (camarón, atún, sardina) del Pacífico mexicano, como fauna de acompañamiento. Actualmente, es un recurso no utilizado, pero que ha sido calificado por diversos autores como una importante fuente marina potencial para industrias tales como la de alimentos, farmacéutica y de cosméticos (Kato, 1974; Spinelli *et al.*, 2000, Vega Villasante *et al.*, 2002).

Aurioles-Gamboa (1995) planteó que podrían capturarse 40,000 toneladas de langostilla bento-pelágica durante la fase inicial de la pesquería con el fin de no abatir el recurso, generando una pesquería sustentable que permita la obtención de biomasa susceptible de aprovechamiento a escala industrial.

Se han realizado diversas investigaciones sobre la calidad nutricional de la langostilla, al emplearla en forma de harina como ingrediente en alimentos experimentales para camarones peneidos; sin embargo, hasta ahora los estudios se han enfocado principalmente al uso de la harina de langostilla como sustituto parcial o total de las harinas de pescado, cabeza de camarón o pasta de soya, en alimentos para diversas especies de camarones de cultivo, midiendo el efecto que esto produce en la supervivencia y el crecimiento de los organismos, así como el efecto sobre la digestibilidad *in vivo* de nutrientes (Civera-Cerecedo *et al.*, 1992; Villareal & Castro, 1992; Civera *et al.*, 1994; Villareal *et al.*, 1994; Casillas & Magallón, 1998). De estos trabajos los autores concluyeron que la langostilla no sólo es un ingrediente viable para sustituir a las harinas convencionales, sino que a ciertos niveles de inclusión en la dieta, permite acelerar el crecimiento, aumentar la actividad proteolítica en el hepatopáncreas, mejorar la supervivencia y la pigmentación así como conferir al alimento una mayor digestibilidad de proteína, lípidos y atractabilidad, considerado que tales efectos no siempre corresponden con su simple calidad nutricional.

Los estudios realizados hasta el momento en cuanto a composición química de este recurso y a su utilización en la alimentación de crustáceos, se han basado solamente en su

contenido de nutrientes; sin embargo, en los últimos años se ha estimulado mucho el estudio de la interacción alimentos-salud y se ha acuñado el nombre de "alimentos funcionales", en los que se acepta el papel de los componentes alimenticios como nutrientes esenciales para el mantenimiento de la vida y de la salud, pero también se tienen en cuenta otros compuestos no nutricionales que contribuyen a prevenir o retardar las enfermedades; este punto de vista se ha convertido en un área de mucho interés para las grandes compañías de alimentos (Best, 1997; Hollingworth, 1997). Los alimentos por lo tanto no pueden seguir siendo evaluados solo en términos de su aporte de macro o micronutrientes.

De acuerdo con Vega-Villasante *et al.* (2002) el extracto crudo de langostilla (ETL) obtenido por prensado mecánico del organismo completo, posee compuestos que pueden no ser considerados nutrientes y que pueden ejercer efectos en los camarones modificando la respuesta fisiológica y composición química corporal. En el ETL se logró detectar: i) actividad enzimática digestiva de proteasas, amilasas y lipasas, ii) actividad antioxidante hacia la lipoperoxidación de tejido cerebral de rata y de iones superóxido producidos por la reacción de la xantina-oxidasa, iii) actividad de péptidos tipo insulina.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto del ETL sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de *Litopenaeus schmitti*, Buerkenroad, 1936, y determinar el efecto sobre la composición corporal de proteínas y glucógeno, así como la actividad enzimática digestiva y la concentración de superóxido dismutasa, como indicador del estado de salud y de su capacidad para reducir el estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento de obtención del extracto de langostilla. Para la obtención del extracto se utilizó langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) capturada en Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. El jugo de langostilla se obtuvo por prensado mecánico del cuerpo completo del animal. El jugo resultante se denominó extracto total de langostilla (ETL), se congeló y almacenó a -40° C hasta su uso. Éste fue el material empleado en todos los

experimentos. Para su utilización en los ensayos posteriores el extracto se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos con el objetivo de eliminar impurezas y se liofilizó y almacenó a -10°C hasta su utilización.

Organismos. Las larvas de *L. schmitti* fueron obtenidas de la Empresa de Producción de larvas y primeras postlarvas YAGUACAM, provincia de Cienfuegos ($\approx 80^{\circ}$ LW y 22° LN), Cuba. En ese mismo lugar se desarrollaron los bioensayos.

Sistema experimental. Se utilizaron nueve estanques de 100 litros de capacidad, de fibra de vidrio con aforo interno (50 litros), llenados con agua de mar hasta 5 μ m, en los que se sembraron los nauplios 4/5 a razón de 140 nauplios/litro (7000 nauplios/estanque).

Las larvas fueron alimentadas tomando como base el protocolo de alimentación de YAGUACAM (Tabla 1) con la diatomea *Chaetoceros muelleri* (Lemmerman, 1898) a razón de 60-100 000 células/mL y la clorofícea *Tetraselmis suesica* (Butcher, 1960) (Ts) a una concentración deseada de 1 000 células/mL. A partir de p-3 se añadió a toda la cría el alga seca *Spirulina* sp. (Turipin, 1827) a una dosis de 0.001 g/L dos veces al día. Se añadieron también nauplios de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) (0.5-2 nauplios por mL) y el alimento balanceado comercial (ABM) (ABM-4000, AQUAFAUNA, BIOMARINE inc. Hawthorne, California, USA) suministrado por millón de larvas, 15 g entre p-3 /m-2 y 20 g desde m-3, variando el tamaño de partícula entre 125 y 400 μ m, respectivamente.

Se recambio el agua en un 50% del volumen del recipiente por día con un aumento progresivo del nivel hasta 80 litros. Se disminuyó la salinidad desde el estadio p-1 hasta alcanzar una concentración de 28 ups en el estadio de mysis y de 20 ups en postlarvas. La salinidad se ajustó de acuerdo a los diferentes estadios en los estanques contiguos; el oxígeno disuelto se mantuvo a saturación mediante el uso de sopladores. Se instalaron resistencias con termostatos acoplados a cada unidad para mantener la temperatura estable a 28 °C (\pm 1.0).

Diseños experimentales. Se diseñaron dos bioensayos para evaluar el efecto del ETL en el crecimiento y supervivencia de estadios larvales de *L. schmitti*. En el primero se utilizó el ETL como única fuente de alimento y en el segundo como suplemento de la alimentación normal.

Bioensayo I. Se establecieron tres tratamientos con tres réplicas cada uno:

*Control o testigo, larvas alimentadas de acuerdo al protocolo de alimentación en la empresa YAGUACAM.

*Tratamiento I(a): ETL a razón de 1 mg/100 mL (10 μ g/mL) de agua de cultivo, cada 24 horas.

*Tratamiento I(b): ETL a razón de 1mg/100mL (10 μ g/mL) de agua de cultivo, cada 48 horas.

El ETL se comenzó a adicionar a partir del estadio de mysis, agregándolo directamente en el agua de cultivo, a un tamaño de partícula de 100 μ m.

Bioensayo II. Se establecieron tres tratamientos con tres réplicas cada uno:

*Control o testigo, cría de larvas de acuerdo al protocolo de alimentación en la empresa YAGUACAM.

*Tratamiento II(a): Igual al testigo + ETL a razón de 1 mg/100 mL (10 μ g/mL) de agua de cultivo cada 24 horas.

*Tratamiento II(b): Igual al testigo + ETL a razón de 1mg/100mL (10 μ g/mL) de agua de cultivo cada 48 horas.

El ETL se comenzó a adicionar a partir del estadio de mysis.

Muestreos y análisis estadístico. Para determinar el crecimiento de las larvas de *L. schmitti* en ambos bioensayos se utilizó el Índice de Desarrollo (I.D.) (Villegas & Kanazawa, 1979), el cual mide la velocidad de crecimiento y está dado por la siguiente fórmula: ID = $(\Sigma An) / n$

Donde A, es un valor absoluto convencional aplicado a cada subestadio desde protozoa p-1(1) hasta postlarva 1 (7); y n es el número de larvas muestreadas.

El estadio fue determinado todos los días a las 08:00 horas, muestreando 30 larvas por estanque, utilizando un microscopio estereoscópico (OLYMPUS VM, Japón, 1x-4x). Al final de la experiencia se determinó el peso total de las postlarvas tempranas, individualmente, utilizando una balanza analítica (SARTORIUS, A120S, GMBH, Gottingen, Germany).

En la cosecha de los ejemplares se contó el número total para estimar la supervivencia por estanque y por tratamiento. Los resultados de los bioensayos fueron procesados para determinar su normalidad (prueba de Lilliefors) y se constató la homogeneidad de varianza por la prueba de Bartlett (Montgomery, 2001). Los datos por tratamientos se agruparon para la aplicación de un Análisis de Varianza de efectos fijos (ANOVA de clasificación simple) y posteriormente un análisis de rangos múltiples de Duncan (Montgomery, 2001). La variable "supervivencia" se procesó de igual forma previa transformación angular (arco seno $\sqrt{Proporción}$) y se contrastó mediante un ANOVA y análisis de rangos múltiples de Duncan para definir qué tratamiento o tratamientos diferían significativamente.

Determinación de glucógeno. El glucógeno fue cuantificado con la técnica del ácido sulfúrico y fenol según la técnica de Dubois *et al.* (1965). Las larvas previamente congeladas se homogeni-

Tabla 1. Protocolo de alimentación de larvas en la empresa YAGUACAM

ESTADIO	Fitoplancton (células/mL)	Concentración veces/día	Artemia nauplios/mL	Concentración 125 µm	ABM (x millón de larvas) 400 µm
n-5	Cm	60 000			
p-1	Cm	100 000			
-2	Cm	100 000			
p-3	Cm +Ts	60000/1000			15g
p-3/m-1	Cm +Ts	60000/1000	1	0.5	15g
m-1	Cm +Ts	60000/1000	3	2.5	15g
-2	Cm +Ts	60000/1000	3	2.5	15g
m-3	Cm +Ts	60000/1000	3	2.5	20g
-1/PI-7	Cm +Ts	60000/1000	3	20-65	20g

Cm= *Chaetoceros muelleri*Ts= *Tetraselmis suecica*

. n= nauplio

.p= postlarva

.m= mysis

.PI-1/PI-7= protozoea/postlarva

ABM= ABM-4000 (AQUAFAUNA, BIOMARINE, INC. Hawthorne, California, USA).

zaron en ácido tricloroacético (TCA) al 5%. El homogenado se centrifugó durante dos minutos a 3000 g y se mezcló un mL del extracto en TCA con 5 mL de etanol (95%). Los tubos se colocaron en una estufa a 37 °C durante 3 h, después de la precipitación del glucógeno los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos, y el precipitado de glucógeno se disolvió añadiendo 0.5 mL de agua hirviendo y posteriormente 5 mL de una solución de fenol al 5% en ácido sulfúrico concentrado. El contenido de los tubos se transfirió a una cubeta y se leyó a 490 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresan en mg de glucógeno por gramo de tejido fresco.

Determinación de Cu, Zn-Superóxido dismutasa (E.C.:1.15.1.1). Esta enzima fue determinada según el método descrito por McCord y Fridovich (1969). El sistema de generación del anión superóxido es la reacción catalizada por la xantina oxidasa, la cual al promover la transformación de la xantina en ácido úrico transfiere un electrón al O₂ molecular, produciendo O₂[·]. Esta reacción está acoplada a la reducción del citocromo c por O₂[·], midiéndose el aumento de absorbancia a 550 nm, a 25 °C. La adición de superóxido dismutasa (SOD) promueve una inhibición de la velocidad de reducción del citocromo c, ya que compite con el citocromo por el O₂[·], dismutándolo a H₂O₂. La actividad de Cu, Zn-SOD es medida en presencia de cianuro de potasio 20 µmol/L, inhibiendo de esta manera la actividad de citocromo c oxidasa.

La mezcla de reacción contiene citocromo c 10 µmol/L, xantina 50 µmol/L, EDTA 0,1 mmol/L, KCN 20 µmol/L y amortiguador de fosfato de potasio (PB) 50 mmol/L, pH 7,8. La xantina oxidasa se

diluye en amortiguador de fosfato de potasio 50 mmol/L, pH 7,8 buscando promover una variación de la absorbancia de 0,030 unidades por minuto, que corresponde a una inhibición de la velocidad de reducción del citocromo c por el O₂[·] de entre 20 y 40%, en la mezcla de reacción sin muestra.

Los resultados son expresados en unidades de SOD/mg de proteína. Una unidad de SOD está definida como la cantidad de enzima que promueve 50% de inhibición de la reducción del citocromo c, por minuto, a 25 °C y pH 7,8.

Análisis estadístico. Los resultados de todos los análisis bioquímicos anteriores se compararon a través de la prueba t de Student, con el análisis no paramétrico de Mann-Whitney.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los resultados del Índice de Desarrollo (ID) de las larvas de *L. schmitti* alimentadas exclusiva y parcialmente con el ETL cada 24 [I(a)] y 48 [I(b)] horas y el ID de larvas alimentadas normalmente. No se encontraron diferencias (P > 0,05) entre los tratamientos de las larvas que fueron sometidas a la alimentación exclusiva con el ETL (cada 24 o 48 horas), demostrando índices de desarrollo similares a los controles.

En la Figura 2 se muestran los resultados del Índice de Desarrollo (ID) de las larvas de *L. schmitti* alimentadas con el ETL como aditivo alimentario cada 24 [II(a)] y 48 [II(b)] horas y el ID de

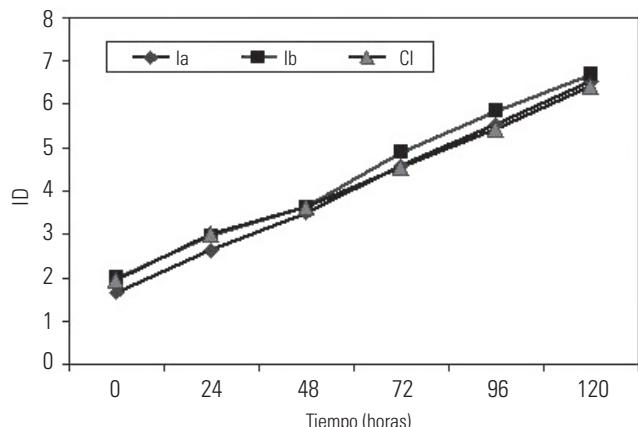


Figura 1. Resultados del Índice de Desarrollo (ID) de las larvas de *L. schmitti* alimentadas exclusivamente con el ETL cada 24 [I(a)] y 48 [I(b)] horas y el ID de larvas alimentadas normalmente (CI) según protocolo de la empresa YAGUACAM.

larvas alimentadas normalmente. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos de las larvas que fueron sometidas a la alimentación con el ETL (cada 24 o 48 horas) como aditivo, demostrando índices de desarrollo similares a los controles.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de crecimiento y supervivencia de las larvas obtenidos en el primer y segundo bioensayos. En el primer bioensayo los pesos finales de los organismos controles fueron significativamente superiores ($P < 0.05$) a los tratamientos I(a) y I(b) mientras que en estos últimos no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$). El crecimiento porcentual (tomando el control como el 100%) refleja que los organismos de los tratamientos I(a) y I(b) alcanzaron solo el 30% del peso que se obtuvo en los controles, sin encontrarse una tendencia relacionada con la frecuencia de suministro de ETL;

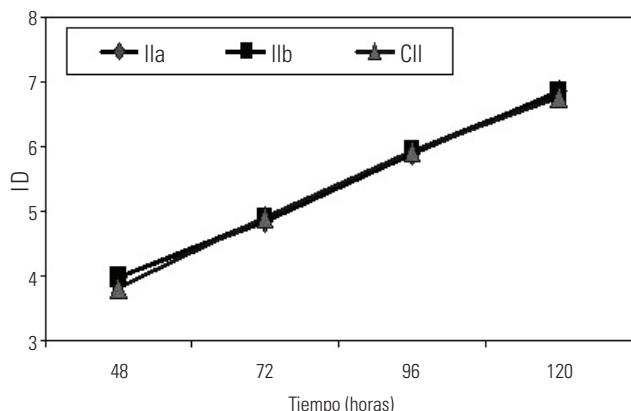


Figura 2. Resultados del Índice de Desarrollo (ID) de las larvas de *L. schmitti* alimentadas según protocolo de la empresa YAGUACAM y con adición del ETL cada 24 [III(a)] y 48 [III(b)] horas y el ID de larvas alimentadas normalmente (CII) según protocolo de la empresa YAGUACAM.

sin embargo, la supervivencia hasta PI-7 se mantuvo a niveles muy similares en los dos tratamientos y en los controles. En el segundo bioensayo el promedio final de los organismos del tratamiento II(a) fue significativamente superior ($P < 0.05$) a los promedios de los pesos finales del tratamiento II(b) y el control, mientras que entre estos últimos no se determinaron diferencias significativas ($P > 0.05$). El crecimiento porcentual demostró que en el tratamiento II(a) se produjo un incremento en el peso de las larvas del 24 % con respecto al control. En relación a la supervivencia de los organismos, ésta en el segundo bioensayo fue más alta en el tratamiento II(a) seguido por el II(b), ambas superiores a la registrada en el control.

En la Tabla 3 se presentan los valores obtenidos de las determinaciones de composición corporal de larvas de camarón cuya alimentación fue suplementada con ETL, comparadas con larvas control. En todos los casos los valores de las larvas que recibieron el ETL fueron superiores a los controles, lo que indica que existió un aporte de compuestos biológicos activos que influyeron en la composición corporal, en la actividad enzimática y en el *status oxidativo* de las larvas.

DISCUSION

Desde hace varios años se conocen los efectos de algunos factores que, manejados en bajas concentraciones, promueven el crecimiento de los camarones. En juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) y *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1974), Fenucci *et al.* (1980) encontraron un mejor crecimiento cuando se incorporó harina de calamar en la dieta. Cruz-Suárez y Guillaume (1987), demostraron que el factor de crecimiento se encontraba en una fracción proteica de calamar y que, incorporada en la dieta, incrementó significativamente el crecimiento en juveniles de *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). Otros resultados obtenidos mostraron que este efecto en el crecimiento estuvo acompañado de un incremento en la actividad específica de la amilasa, la tripsina y las proteasas cuando se incorporó un 10% de harina de calamar como fuente de proteínas en el alimento (Van Wormhoudt *et al.*, 1986).

De acuerdo con Vega-Villasante *et al.* (2002), la evaluación química del ETL indicó que puede ser un alimento con potencialidades en diferentes direcciones de la nutrición y la salud de los camarones y que ingerido, sin ningún tipo de purificación, puede ejercer efectos múltiples como mejorar la actividad metabólica, propiciar una mejor actividad digestiva y evitar la formación de radicales libres a través de vínculos e interrelaciones de compuestos bioactivos y que finalmente resultan, a través de vías metabólicas directas o indirectas, en un mayor crecimiento y supervivencia de los organismos alimentados con éste. Según Vega-Villasante *et al.* (op. cit.), el análisis proximal del ETL lo

Tabla 2. Resultados de bioensayos de crecimiento de larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas con ETL.

	Bioensayo I			Bioensayo II		
	Control I	II(a)	II(b)	Control II	II(a)	II(b)
Peso final (mg)	0.42a \pm 0.05	0.11b \pm 0.01	0.13b \pm 0.01	0.53b \pm 0.03	0.66a \pm 0.07	0.51b \pm 0.03
Crecimiento (%)	100 ^a \pm 12	26b \pm 6.0	30b \pm 3.0	100b \pm 7.0	124a \pm 11.0	96b \pm 3.0
Supervivencia (%)	52 ^a \pm 4.2	52a \pm 7.1	49a \pm 7.4	54b \pm 5.1	67.5a \pm 4.0	64.7a \pm 3.2

Bioensayo I): adición del ETL 1mg/100mL en el agua de cultivo de larvas de *Litopenaeus schmitti* sin suministro de alimento.

Control I: larvas alimentadas de acuerdo al protocolo de alimentación en la empresa YAGUACAM.

Tratamiento I(a): ETL a razón de 1 mg/100 mL (10 μ g/mL) de agua de cultivo, cada 24 horas.

Tratamiento I(b): ETL a razón de 1mg/100mL (10 μ g/mL) de agua de cultivo, cada 48 horas.

Bioensayo II): adición de ETL 1 mg/100ml en el agua de cultivo de larvas de *Litopenaeus schmitti* con suministro de alimento.

Control II: larvas alimentadas de acuerdo al protocolo de alimentación en la empresa YAGUACAM.

Tratamiento II(a): Igual al control + ETL a razón de 1 mg/100 mL (10 μ g/mL) de agua de cultivo cada 24 horas.

Tratamiento II(b): igual al control + ETL a razón de 1mg/100mL (10 μ g/mL) de agua de cultivo cada 48 horas.

Valores promedio de 3 réplicas \pm error estándar. Valores con diferentes letras indican que hay diferencias significativas ($P < 0.05$).

coloca dentro del intervalo de consumos proteicos: humedad 90%, proteína cruda ($N \times 6.25$) 50.8%, grasa cruda 14.5%, cenizas 12.06%, fibra cruda 0.04%, extracto libre de nitrógeno 12.6% y energía 3.35 Kcal/g. Estos datos no fundamentan los efectos determinados sobre el crecimiento y supervivencia cuando es utilizado en la alimentación de especies acuáticas.

Los resultados encontrados con el ETL en la especie de interés comercial *Litopenaeus schmitti*, sugieren con solidez (bajo los protocolos establecidos en el estudio y con los biomarcadores utilizados) que puede ser considerado como un alimento funcional donde sus efectos en la magnificación del desarrollo y de disminución de la mortalidad han quedado demostrados.

Tabla 3. Determinación de proteínas totales, actividad de proteasas totales, glucógeno y actividad de superóxido dismutasa en larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas normalmente y con el ETL como aditivo alimentario cada 24 horas.

	Larvas control	Larvas con tratamiento de ETL
Proteínas totales (%)	62 \pm 2.2	74 \pm 3.1 **
Actividad de proteasas totales (U/mg de proteína)	9.5 \pm 0.2	16.2 \pm 0.3 **
Glucógeno (mg/g)	6.5 \pm 0.7	9.3 \pm 0.9 **
Superóxido dismutasa (U/ mg de proteína)	22.7 \pm 1.2	39.18 \pm 2.0**

Resultados expresados como valores promedio (3 réplicas por muestra) \pm error Estándar.

Prueba t de Student ** diferencias significativas $P < 0.01$.

Las evidencias obtenidas por Vega-Villasante *et al.* (op. cit.) en los cultivos celulares expuestos al ETL demuestran que éste promovió, a las más bajas concentraciones probadas (1 μ g/ml), la proliferación celular. En este sentido Blundell *et al.* (1972) mencionan que la exposición de las células a bajas concentraciones de insulina ha resultado en una rápida estimulación de una gran variedad de enzimas y sistemas de transporte que estimulan el metabolismo celular. Kahn (1985), Rechler *et al.* (1974) y Zapf *et al.* (1978) mencionan que administrados por largos períodos de tiempo, los péptidos tipo insulina promueven el crecimiento y la síntesis macromolecular.

Cuando el ETL fue adicionado libre en el agua de cultivo de larvas de *Litopenaeus schmitti* se pudo constatar su efecto en el crecimiento y supervivencia de los organismos sometidos a la misma concentración probada en cultivos celulares: 1 μ g/mL (Vega-Villasante *et al.*, 2002). El crecimiento de los organismos no se vio reflejado en el índice de desarrollo (ID), el cual mide el paso de un estadio larvario al inmediato superior en función del tiempo (y que no es sino el efecto de la velocidad de muda); sin embargo, si se reflejó en los resultados finales, donde el peso de los organismos expuestos al ETL diariamente fue superior al control. De tal forma se infiere que el crecimiento más que por el número de mudas se debió a una incorporación más acelerada de nutrientes durante los procesos de postmuda e intermuda temprana, que son los estadios donde los crustáceos llevan a cabo el proceso de crecimiento (Vega-Villasante *et al.*, 2000). Es también necesario comentar que el efecto promotor del crecimiento solo se observó cuando el ETL fue adicionado como suplementación diaria a la alimentación normal. Utilizando algunos parámetros bioquímicos como marcadores del efecto

del ETL sobre la modificación de la fisiología de las larvas, se pudo comprobar que la adición de este extracto crudo favoreció el incremento de la proteína corporal y del glucógeno, de igual forma las actividades de proteasas generales y superóxido dismutasa se vieron incrementadas con respecto a las larvas control que no recibieron el aporte adicional del ETL en su dieta. Estos últimos resultados pueden utilizarse como reivindicaciones de los efectos de magnificación funcional y de disminución de riesgos de contraer enfermedades que son obligadas para considerar a un alimento como funcional.

En particular, la superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que protege contra el estrés oxidativo de los radicales superóxido en los organismos vivos (Yao *et al.*, 2004). Neves *et al.* (2000) cuantificaron la actividad de la SOD en juveniles del camarón *Palaemonetes argentinus* infestado por el isópodo *Probopyrus ringueleti*, y de camarones sanos. Ellos encontraron que la actividad de la enzima disminuía en los camarones infestados (20 U/mg proteína) con respecto a los camarones sanos (35 U/mg proteína) posiblemente por la incapacidad de realizar el proceso respiratorio con normalidad, lo que afectaría directamente los niveles de la enzima SOD. Efectos similares, de disminución de actividad SOD, para organismos sometidos a estrés han sido reportados para otros crustáceos (Huang & Chen, 1999; Pan *et al.*, 2003; Wang & Chen, 2005). En nuestro estudio, cuando las larvas fueron suplementadas con el ETL, suspendido en el agua de cultivo, incrementaron la actividad de la SOD, indicando un aumento en su capacidad antioxidativa. Este resultado de la actividad de la SOD también ha sido reportado para otros crustáceos que reciben en su dieta compuestos con capacidad inmunoestimulante (Cai *et al.*, 2002; Campa-Cordova *et al.*, 2002, Chang *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2005). Si bien no se ha determinado la concentración de pigmentos carotenoides en el ETL, se conoce que de la concentración total de los mismos en el cuerpo entero del animal, la astaxantina representa el 83.50% (Castro Gonzalez *et al.*, 1995). Estudios fisiológicos han demostrado que la astaxantina en camarones incrementó la tolerancia al estrés y mejoró la respuesta inmune (Prabhala *et al.* 1989 según Bendich, 1989).

Davis *et al.* (2000) informaron que niveles de 0.2 y 0.4 g/100 g peso seco de una proteasa incorporada dentro de un alimento comercial incrementaba la digestibilidad aparente de proteínas de 65.3 a 74.3% sobre la dieta control. Buchanan *et al.*, (1997), demostraron un aumento de ganancia en peso por la adición de un suplemento multienzimático a dietas de camarón contenido altos niveles (64 g/100 g dieta) de harina de canola. Chen y Lin (1990) mezclaron la dieta de postlarvas de *Penaeus monodon* con un polvo obtenido por extracción con acetona del hepatopáncreas de la misma especie. Las postlarvas que ingirieron la dieta enriquecida con la mezcla enzimática crecieron más rápidamente que las no suplementadas. La actividad proteolítica

del hepatopáncreas fue influenciada significativamente por el tratamiento dietético. En nuestros resultados observamos que la suplementación de la alimentación de las larvas con ETL resultó de igual forma en la modificación de la actividad enzimática digestiva (proteasas), sugiriendo la participación de proteasas exógenas en la actividad total encontrada y/o en la activación de zimógenos dentro de la glándula digestiva, lo que a su vez podría suponer una mayor capacidad de hidrólisis del alimento. Este resultado también ha sido reportado por Civera-Cerecedo *et al.*, (1994) para *Penaeus californiensis*, cuando fue alimentado con dietas conteniendo harina de langostilla.

De acuerdo con Rosas *et al.* (2000) el glucógeno es la molécula de almacenamiento de carbohidratos en los crustáceos decápodos, siendo la glándula digestiva el sitio donde principalmente se acumula y es utilizado principalmente como materia prima para la formación de la quitina, la cual puede llegar a ser hasta el 35% del peso seco de los camarones. Estos autores encontraron que con dietas en las que se incluyeron porcentajes crecientes de carbohidratos, la concentración de glucógeno se elevó hasta llegar a una meseta al 22% de inclusión. A este porcentaje de inclusión se determinó que para *L. vannamei* la concentración de glucógeno fue de 17 mg/g y para *L. stylirostris* de 7 mg/g. Nuestros resultados en larvas de *L. schmitti* corresponden a estos mismos ordenes de magnitud. Rosas *et al.* (op. cit.) mencionan que la cuantificación del glucógeno y otros metabolitos sanguíneos son adecuados para determinar el estado nutricional de los camarones, en este sentido nuestros resultados sugieren, que el incremento de la concentración de glucógeno en el tejido de las larvas alimentadas con ETL con respecto a las larvas control, es el reflejo de un mejor estado fisiológico donde las energía aportada por los carbohidratos no solo bastan para paliar las necesidades de los organismos sino que incluso se acumulan.

Es difícil sugerir la utilización única de alimentos funcionales en la nutrición de organismos marinos en cultivo, debido a que las investigaciones realizadas hasta la actualidad no han sido diseñadas para tal efecto. Además sería pretencioso tratar de solventar todas las necesidades nutricionales de los animales y buscar efectos fisiológicos extraordinarios con alimentos naturales completos. Sin embargo, sí es posible considerar una suplementación con alimentos funcionales a los ingredientes utilizados de forma convencional en la alimentación de tales organismos.

El uso del ETL en la nutrición comercial de camarones peneidos y otras especies de crustáceos es por lo tanto factible. Sin embargo, problemas logísticos con la captura de la langostilla tendrán que ser superados para poder ofrecer un producto de confiabilidad en el suministro y estabilidad de la producción como lo demanda la industria de la camaronicultura.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto SAGARPA-2003-033.

REFERENCIAS

- AURIOLES-GAMBOA, D., 1995. Distribución y abundancia de la langostilla bentónica (*Pleuroncodes planipes*) en la plataforma continental de la costa occidental de Baja California. En: Auriolles-Gamboa D. & Balart E. (Eds.). *La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México. pp. 59-92
- BENDICH A. 1989. Carotenoids and the immune response. *Journal of Nutrition* 119:112-115.
- BEST, D. 1997. All natural and nutraceutical. *Prepared Foods* 166:32-38.
- BLUNDELL, T.L., G.G. DODSON, D.A. MERCOLA, & D.C. HODGKIN. 1972. Structure, chemistry and biological activity of insulin. *Journal of Protein Chemistry* 26: 279-402
- BUCHANAN, J., H. Z. SARAC, D. POPÍ, & R.T. COWAN. 1997. Effect of enzyme addition to canola meal in prawn diets. *Aquaculture* 151:29-35
- CAI, Y., C. XUE, X. JIANG, H. LIN, Q. XU & X. ZHAO. 2002. Effects of fucoidan on enzymes of *Penaeus chinensis* immune. *Journal of the Ocean University of Qingdao* 32:161-165.
- CAMPA-CORDOVA, A.I., N.Y. HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, R. DE PHILIPPI & F. ASCENCIO. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology* 12:353-366.
- CASILLAS, H. R. & B.F. MAGALLÓN. 1998. Substitución de insumos tradicionales en las dietas para la engorda del camarón. *Informe Interno del Centro de Investigaciones Biológicas de B. C. S.*, México. 87 p.
- CASTRO-GONZÁLEZ, M. I., S. CARRILLO-DOMÍNGUEZ, F. PÉREZ-GIL ROMO & C. CALVO-CARRILLO. 1995. Composición química de la langostilla y procesos tecnológicos. En: Auriolles-Gamboa & Balart (Eds.). *La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México. p. 163-177.
- CHANG, C., M. SU, H. CHEN, & I. LIAO. 2003. Dietary beta -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology* 15:297-310.
- CHENG, W., C.H. LIU, C. M. KUO & J.C. CHEN. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 18:1-12.
- CHEN, H.Y. & H.F. LIN. 1990. The effect of exogenous digestive enzymes on the growth of early postlarval *Penaeus monodon*. In: R. Hirano & I. Hanyu (Eds). *Proceedings of the Second Asian Fisheries Forum*, Tokio, Japan. pp. 349-352
- CIVERA-CERECEDO, R., E. GOYTORTÚA-BORES, S. ROCHA-MEZA & A. GREEN-YEE. 1992. Utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal as protein source for *Penaeus vannamei* juveniles. *Abstracts of the Annual Conference of the World Aquaculture Society*. pp: 21-25.
- CIVERA, R., H. VILLARREAL, F. VEGA-VILLASANTE, H. NOLASCO, S. ROCHA, M. GONZÁLEZ, E. GOYTORTÚA & M. CAMARILLO. 1994. Digestive enzyme activity and growth of *Penaeus californiensis* fed diets containing red crab, *Pleuroncodes planipes*, meal as a protein source. *Abstracts of Annual Conference of the World Aquaculture Society*, New Orleans. USA.
- CRUZ-SUÁREZ, L.E. & J. GUILLAUME, J. 1987. Squid protein effect on growth of four penaeid shrimp. *Journal of the World Aquaculture Society* 18:209
- CRUZ-SUÁREZ, L. E., D. RIQUE & AQUACOP. 1992. Effect of squid meal on growth of *Penaeus monodon* juveniles reared in pond pens and tanks. *Aquaculture* 106: 293-299.
- DAVIS, D. A., W. L. JOHNSTON & C. R. ARNOLD. 2000. El uso de suplementos enzimáticos en dietas para camarón. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Rique-Marie, D. y L.E. Cruz-Suárez (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B.C.S*, México. pp. 452-462
- DUBOIS, M.K., L.A. LILLES, J.C. HAMILTON, P.A. REBERS & F. SMITH. 1965. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356
- FENUCCI, J.L., Z. ZEIN-ELDIN & A.L. LAWRENCE. 1980. The nutritional response of two penaeid species to various levels to squid meal in a prepared feed. *Proceedings of the World Aquaculture Society* 11: 403-409.
- HOLLINGWORTH, P. 1997. Mainstreaming healthy foods. *Food Technology* 51: 55-58.
- HUANG, C. & D. CHEN. 1999. A study of isoenzyme phenotypic change in diseased shrimp *Penaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China/Zhongguo Shuichan Kexue* 6 :45-49.
- KAHN, C. R. 1985. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. *Annual Review of Medicine* 36: 429-445
- KATO, S. 1974. Development of the pelagic red crab (Galatheidae, *Pleuroncodes planipes*) fishery in the eastern pacific ocean. *Marine Fisheries Review* 36: 1-9
- MCCORD, J. M. & I. FRIDOVICH. 1969. Superoxide Dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein. *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055.

- MONTGOMERY, D.C. 2001. *Design and analysis of experiments*. Arizona State University, John Wiley & Sons. Fifth edition. USA. 684 pp.
- NEVES, C. A., E. A. SANTOS & A. C. D. BAINY. 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaeomonetes argentinus* (Decapoda, Palemonidae) infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Diseases of Aquatic Organisms* 39:155-158
- PAN, C.H., Y.H. CHIEN & B. HUNTER. 2003. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 297:107-118
- PRABHALA, R. H., H. M. MAXEY & R. WATSON. 1989. Enhancement of the expression of activation markers of human peripheral blood mononuclear cells by *in vitro* culture with retinoids and carotenoids. *Journal of Leukocyte Biology* 45: 249-254.
- ROSAS, C., G. CUZON, G. GAXIOLA, C. PASCUAL, R. BRITO, M. CHIMAL & A. VAN WORMHOUDT. 2000. El metabolismo de los carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. & R. Civera-Cerecedo (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mérida, Yucatán. pp. 340-359.
- RECHLER, M.M., J.M. PODSKALNY, I.D. GOLDFINE & C.A. WELLS. 1974. DNA synthesis in human fibroblast: stimulation by insulin and by nonsuppressible insulin-like activity (NSILA-S). *Journal of Endocrinology Metabolism* 39: 512-521.
- SPINELLI, J., L. LEHMAN & D. WIEG. 2000. Composition, processing and utilization of Red Crab *Pleuroncodes planipes* as an agricultural feed ingredient. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 31: 1025-1029
- VAN WORMHOUDT, A., E. CRUZ, J. GUILLAUME & P. FAVREL. 1986. Action de l'inhibiteur trypsique de soja sur la croissance et l'activité des enzymes digestives chez *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda): rolé éventuel des hormones gastro-intestinales. *Océanis* 12: 305-319.
- VEGA-VILLASANTE, F., H. NOLASCO-SORIA, R. CIVERA-CERECEDO, R. GONZÁLEZ-VALDÉS & M. OLIVA-SUÁREZ. 2000. Alternativa para la alimentación del camarón en cultivo: el manejo de la muda. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M. & R. Civera-Cerecedo (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. México*. pp. 313-320
- VEGA-VILLASANTE, F., H. NOLASCO, A. FALLARERO & O. CARRILLO-FARNÉS. 2002. Biochemical characterization of crude extract from *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Galatheidae) as potential feed additive, considerations for a new fishery on the Mexico Pacific coast. *Hidrobiología* 12:119-128
- VILLARREAL, H. & M. CASTRO. 1992. Preliminary studies on the effect of protein content on the growth of *Penaeus vannamei*. *Abstracts of the Annual Conference of the World Aquaculture Society*.
- VILLARREAL, H., R. CIVERA, J. PASTÉN, F. VEGA-VILLASANTE, S. ROCHA & E. GOYTORTÚA. 1994. Effects of the partial and total substitution of shrimp meal and red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal in the growth of the juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Abstracts of Annual Conference of the World Aquaculture Society*, New Orleans. USA.
- Villegas, C. & A. Kanazawa, A. 1979. Relationship between diet composition and growth of the zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. *Fisheries Research Journal of Philippines* 4:32-40
- Wang, L.U. & J.C. Chen. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish and Shellfish Immunology* 18: 269-278.
- Yao, C. L., A.L. Wang, W. N. Wang & R.Y. Sun. 2004. Purification and partial characterization of Mn superoxide dismutase from muscle tissue of the shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture* 241: 621-631.
- Zapf, J., E. Schoenle & E.R. Froesch. 1978. Insulin-like growth factors I and II: some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of no suppressible insulin-like activity of human serum. *European Journal of Biochemistry* 87: 285-296.

Recibido: 3 de enero de 2005.

Aceptado: 16 de noviembre de 2005.