



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS MARINAS Y PESQUERÍAS
MAESTRÍA EN ECOLOGÍA Y PESQUERÍAS

Variaciones morfométricas y bioquímicas en las primeras etapas de
vida del pulpo *Octopus insularis*

Presenta

Biol. Liced Joana Pérez Rodríguez

Comité tutorial:

Dra. María Piedad Sánchez Morillo-Velarde (Directora)

Asesores

Dr. César Gabriel Meiners Mandujano

Dr. Luis Alfredo Ortega Clemente

DEDICATORIA

A mis padres, Janeth Rodríguez y Samuel Pérez,
que son mi guía y pilar. Gracias por todo su apoyo,
Confianza, comprensión y amor siempre.

A mis hermanas Genifer y Mayra Alejandra por ser cómplices e
incondicionales.

A mi abuelita María Diva Rodríguez por acompañarme
en cada uno de mis pasos con sus oraciones.

A mi ahijada Edna Salomé Rodríguez Avellaneda,
la niña de mi corazón.

A la memoria de Hervin Gamboa Lopez
un alma valiosa en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Veracruzana, al Programa de Posgrado en Ecología y Pesquerías del Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías (ICIMAP) y a su programa de Maestría en Ecología y Pesquerías, por su apoyo y todos los conocimientos que me brindaron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Dra. María Piedad Sánchez por ser mi directora y tutor académico, por creer en mí, guiarme, brindarme sus conocimientos, por su apoyo, su disciplina, por ser incondicional, por toda su entrega, dedicación, tiempo y empeño durante todo el proceso y finalmente lograr la culminación de este trabajo. Gracias por acogerme en su laboratorio y hacerme parte de su grupo de trabajo.

A mi asesor el Dr. Cesar Meiners por escucharme muchas veces y darme sus consejos en lo académico y personal, por su ayuda en la pesca de los pulpos y sus comentarios acertados en la construcción del este escrito.

A mi asesor el Dr. Alfredo Ortega por el apoyo fundamental en el trabajo de laboratorio, capacitación y realización de los análisis bioquímicos, asesorías y comentarios en la elaboración de este escrito y por la hospitalidad recibida en su laboratorio.

A los pescadores de Antón Lizardo quienes donaron los animales utilizados en este estudio y me permitieron acompañarlos en sus días de pesca.

A mis compañeros de posgrado Gabriel Fajardo Alvarado, Abderramán Alfonso Hernández Isleño y Roberto González Gómez con quienes hicimos equipo para trabajar en el laboratorio, cuidar de los animales y lograr cada que cada uno tuviera sus resultados.

Al personal administrativo del ICIMAP y en especial al Sr. Cipriano Anaya y Sr. Agustín Pastrana quienes me acompañaron y en ocasiones me ayudaron a cuidar de mis pulpitos.

A mis compañeros de generación Loyda García Ferrer, Minerva Flores Vargas, Óscar Gustavo López Quiroga y Perla Karina Montero Ramírez con quienes goce y sufrí este posgrado. A mis compañeras de Doctorado Saraí Acuña y Tania Reyes quienes nos acompañaron en el proceso.

A todos profesores del posgrado por brindarme todos sus conocimientos, mostrarme sus vivencias, trabajos y recorrido en este mundo científico.

A mis amigos y compañeros extranjeros Ángel Marval, Jaime Bolaños y Auristela Villarroel, fueron las primeras personas a quienes conocí en México, siempre fueron muy atentos y colaboradores.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías, del Instituto Tecnológico Boca del Río. Sergio, Diana, Diego, Tiare, Mike, Juventino por su interés en mi trabajo, compañía y ayuda. Especialmente a Flor Virginia (Vicky) quien me acompañó, apoyo y fue muy especial para mí en toda la maestría.

A Daniel y su familia Samarron-Ruiz en Campeche, quienes me acogieron en su hogar de forma muy especial y afectuosa en varias oportunidades.

A mis familiares por su ánimo y apoyo. Muy especialmente a mi tía Aida Astrid Obando Rodríguez que siempre me ha inspirado, ha estado muy pendiente de mí y me ha apoyado más allá de este posgrado.

A mi hermana Genifer y amigos que me visitaron en México y con quienes tuve la oportunidad de conocer un pedacito más de este lindo país.

A mi amiga Diana Carolina Arias Rubio quien fue mi confidente, consejera y quien me apoyo en todos los aspectos durante mi posgrado. Gracias a nuestras conversaciones, sus buenos consejos, empatía y ánimo, que siempre fueron mi mejor compañía en la distancia.

A mis amigos Herwin Gamboa, Edna Avellaneda, Jef Flambert, Yuli Narvaez, Diego Carantón, Carolina Patiño, Diana Duarte, Camila Rueda, Rafael Martínez, Albert Quiroga, Erika Sánchez, Luisa Rangel y Mario Sánchez, cada uno desde su mundo ha compartido su tiempo y cariño conmigo; son especiales porque siempre se han mantenido conectados a mí, me han dado su confianza, me han celebrado y han compartido mis alegrías y tristezas durante este proceso.

A todos y cada uno de los que no he nombrado y que mediante un mensaje, un correo, un chat, una palabra, un detalle o un minuto de su tiempo me ha apoyado.

Gracias, Dios.

RESUMEN

Los pulpos son considerados, por sus características biológicas, candidatos favorables para la diversificación de la acuicultura. *Octopus insularis* es una especie recientemente descrita de la cual aún se desconocen muchos aspectos de su biología y en especial, las características bioquímicas de las primeras etapas de vida en condiciones de cautividad que permitan su aprovechamiento. El objetivo del presente trabajo fue determinar las variaciones morfométricas y bioquímicas en los huevos los días 1 y 20 después del desove (DD) y en la paralarva recién eclosionada del pulpo *O. insularis* obtenidas en cautividad. La fecundidad estimada de las hembras fue de $161\,355 \pm 30\,811$ huevos / desove y el desarrollo embrionario duró en promedio 25 días (a 25.5 °C y 37 de salinidad). En cuanto a la morfometría, la longitud del embrión y ancho del huevo mostraron un crecimiento del 21.6 y 21.0 %, respectivamente, siendo significativo el crecimiento entre los días 1 y 20 DD ($t = -120.31$ y $t = -22.63$, $P < 0.05$), la longitud total de las paralarvas recién eclosionadas fue de 2.60 ± 0.18 mm. La variación de la composición bioquímica a lo largo del desarrollo embrionario se evidenció por un aumento de 123 % de lípidos, un aumento de 26 % de humedad y una disminución de 36 % del peso seco. En conclusión nuestros resultados resaltan la importancia del contenido de lípidos en la paralarva de *O. insularis* como reserva de energía, probablemente relacionado con un mejor estado nutricional y con la probabilidad de supervivencia. Los resultados de esta tesis brindan avances en el conocimiento sobre los requisitos nutricionales en las primeras etapas de vida de *O. insularis* necesarios para explorar el desarrollo tecnológico para el cultivo de esta especie en cautividad.

Palabras clave: *Octopus insularis*, desarrollo embrionario, bioquímica, morfometría, calidad del desove.

ABSTRACT

Octopuses are considered, favorable candidates for the diversification of aquaculture, due to their biological characteristics. *Octopus insularis* is a recently described species and many aspects of its biology are still unknown, especially, the biochemical characteristics of the first life stages in captive conditions. The objective of this work was to determine the morphometric and biochemical variations in the eggs on days 1 and 20 after spawning and the newly-hatched paralarvae of *O. insularis* obtained in captivity. The estimated fecundity of the females was $161\,355 \pm 30\,811$ eggs / spawning and the embryonic development lasted on average 25 days (at 25.5 °C and 37 ups). Regarding morphometry, the length of the embryo and width of the egg showed a significant growth of 21.6 and 21.0 %, respectively, between the 1st and 20th DD ($P < 0.05$). The total length of the hatchlings was 2.60 ± 0.18 mm. The variation in the biochemical composition throughout embryonic development was evidenced by a 123 % increase in the percentage of lipids, a 26 % increase in humidity and a 36 % decrease of dry weight. In conclusion, our results also highlight the importance of the lipid content in the hatchlings of *O. insularis* as an energy reserve, probably related to a better nutritional status and the probability of survival. The results of this thesis shed light in the knowledge about the nutritional requirements in the first stages of life of *O. insularis* necessary to explore the technological development for the culture of this species in captivity.

Key words: *Octopus insularis*, embryonic development, biochemistry, morphometry, spawning quality.

Abreviaturas

Ac	Ancho de la cabeza
AG	Ácidos grasos
Am	Ancho del manto
ARA (en inglés)	Ácido araquidónico
DD	Después del desove
DHA (en inglés)	Ácido docosahexaenoico
Do	Diámetro de los ojos
EPA (en inglés)	Ácido eicosapentaenoico
L2b	Longitud del segundo par de brazos
Lm	Longitud del manto
Lt	Longitud total
LT	Lípidos totales
HUFA (en inglés)	Ácidos grasos altamente insaturados
MUFA (en inglés)	Ácidos grasos monoinsaturados
PUFA (en inglés)	Ácidos grasos poliinsaturados
SFA (en inglés)	Ácidos grasos saturados
UFA(en inglés)	Ácidos grasos insaturados

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Cultivo del pulpo	1
1.1.1.	Parámetros de cultivo	1
1.2.	Reproducción del pulpo.....	2
1.3.	Requerimientos nutricionales del pulpo	3
2.	ANTECEDENTES	6
3.	HIPÓTESIS	9
4.	OBJETIVOS.....	10
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	11
5.1.	Colecta y transporte de los organismos	11
5.2.	Aclimatación de los reproductores de pulpo	11
5.3.	Mantenimientos de las hembras, desoves e incubación de la puesta.....	12
5.4.	Fecundidad de las hembras.....	13
5.5.	Morfometría de los huevos y los embriones.....	13
5.6.	Morfometría de las paralarvas	15
5.7.	Protocolo de eutanasia en huevos, paralarvas y hembras.....	16
5.8.	Análisis bioquímicos	16
5.9.	Análisis estadístico.....	18
6.	RESULTADOS	19
6.1.	Fecundidad de las hembras.....	19
6.2.	Medidas morfométricas de los huevos y las paralarvas	19

6.3. Composición bioquímica y de ácidos grasos de huevos y paralarvas	22
7. DISCUSIÓN.....	29
8. CONCLUSIONES.....	34
9. LITERATURA CITADA.....	35
10. ANEXOS.....	45
Anexo 1. Procedimiento para la obtención de biomasa en peso seco y peso húmedo de huevos y paralarvas.....	45
Anexo 2. Extracción de ácidos grasos por el Método de Soxhlet	46
Anexo 3. Derivatización de los ácidos grasos. (modificado de Lepage y Roy, 1984)	47
Anexo 4. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos por Cromatografía de gases.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Ejemplar de hembra de <i>O. insularis</i> cuidando la puesta dentro del refugio de cerámica. B) Huevos desovados.....	13
Figura 2. Equipos utilizados para las mediciones morfométricas de los huevos y paralarvas de <i>O. insularis</i> de cada uno de los desoves obtenidos. A) Equipos. B) Realización de las Mediciones.	14
Figura 3. Imágenes de los diferentes estadios de desarrollo de <i>O. insularis</i> analizados en el estudio. A) huevos de pulpo el día 1 después del desove; B) huevos al día 20 después del desove; C) paralarva de pulpo recién eclosionada (longitud total \approx 2.6 mm).	15
Figura 4. A) Equipos del método Soxhlet usados para la extracción de lípidos en muestras secas de huevos y paralarvas de <i>O. insularis</i> . B) Equipo de cromatografía de gases empleado para la identificación y cuantificaron los ácidos grasos.	17
Figura 5. Comparación del tamaño de los huevos de <i>O. insularis</i> el día 1 y 20 después del desove. Resultados representan la media \pm D.E. (N = 120). * Representa diferencias significativas.	21

Figura 6. Contenido total de lípidos (%) en los huevos el día 1 y 20 después del desove y en las paralarvas de <i>O. insularis</i> . La barra representan la media \pm D.E. Letras diferentes representan diferencias significativas.	23
Figura 7. Porcentaje de humedad en función del porcentaje de lípidos en huevos y paralarvas durante el desarrollo embrionario de <i>O. insularis</i>	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del desove y la fecundidad en <i>O. insularis</i>	20
Tabla 2. Medidas morfométricas (mm) de las paralarvas de <i>O. insularis</i> recién eclosionadas. (N=60)	21
Tabla 3. Correlaciones de Pearson entre las medidas y los pesos de los huevos de <i>O. insularis</i> el día 1 y 20 después del desove contra las medidas de las paralarvas recién eclosionadas.	22
Tabla 4. Composición bioquímica de los huevos de <i>O. insularis</i> el día 1 y 20 después del desove y de las paralarvas recién eclosionadas.	23
Tabla 5. Perfil de ácidos grasos principales (%) de los huevos de <i>O. insularis</i> el día 1 y 20 después del desove y paralarvas recién eclosionadas.	25
Tabla 6. Contenido total (%) de lípidos y ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) de diferentes especies de pulpo en tres estadios de desarrollo obtenidos en cautividad, de diferentes estudios.....	27
Tabla 7. Composición de ácidos grasos totales (%) de diferentes estudios en tres estadios de desarrollo de diferentes especies de pulpo obtenidos en cautividad.	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cultivo del pulpo

Los pulpos son considerados, por sus características biológicas, candidatos favorables para la acuicultura (Vaz-Pires *et al.*, 2004; Villanueva *et al.*, 2014). Dentro de estas características, las más relevantes para su cultivo son su ciclo de vida corto (Mangold & Boletzky, 1973), crecimiento rápido (Nixon, 1969; Mangold, 1983), altas tasas de conversión del alimento (Vaz-Pires *et al.*, 2004), alta fecundidad (García-García & Aguado, 2002), rápida adaptación a condiciones de cautiverio (Nixon, 1969; Iglesias *et al.*, 2000) y aceptación a una amplia variedad de alimento (Mangold, 1983).

Además, el pulpo es un molusco de gran importancia nutricional (Mangold, 1983; Prato *et al.*, 2010) y económica en muchos países del mundo (Vaz-Pires *et al.*, 2004; Pita *et al.*, 2015), incluido México (Coronado *et al.*, 2020). En México recientemente se está trabajando en distintas fases del ciclo de vida de varias especies de pulpo para lograr su cultivo en cautividad, como son *Octopus maya* (Rosas *et al.*, 2014), *O. bimaculoides* (Solorzano *et al.*, 2009), *O. bimaculatus* (López-Peraza *et al.*, 2018), *O. hubbsorum* (Alejo-Plata & Herrera, 2014) y *O. insularis* (Fajardo-Alvarado *et al.*, 2018). Aunque, hoy en día, todavía no se ha logrado el cultivo de ninguna especie de pulpo a nivel industrial, se continúa investigando para avanzar en el conocimiento de aspectos relacionados con su cultivo y los parámetros necesarios para su mantenimiento en cautividad (Maldonado *et al.*, 2019; Deryckere *et al.*, 2020).

1.1.1. Parámetros de cultivo

Los parámetros de cultivo en pulpo generalmente, se han establecido en condiciones de laboratorio (Vidal *et al.*, 2014). Dentro de estas condiciones se incluyen, los parámetros de calidad del agua y los específicos de cultivo. En cuanto a los parámetros de calidad del agua, el rango de temperatura óptimo para el cultivo depende de las especies, si estas son de aguas tropicales (Rosas *et al.*, 2014; Zúñiga *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014) y si son especies de aguas templadas difiere su rango

óptimo (Vaz-Pires *et al.*, 2004; Iglesias & Fuentes, 2014; Sánchez *et al.*, 2014; Uriarte & Farías, 2014a,b), ya que por encima o por debajo de estos intervalos se dispara la mortalidad. Otros parámetros como el oxígeno (O₂), la salinidad y el pH se conoce los rangos adecuados en pulpo (Vaz-Pires *et al.*, 2004; Iglesias & Fuentes, 2014; Sánchez *et al.*, 2014; Uriarte & Farías, 2014a,b). En cuanto a las concentraciones de los productos nitrogenados (amonio, nitratos y nitritos), están poco estudiados para pulpo, pero se han definido límites sobre los cuales varias especies se mantienen en cautiverio (Sánchez *et al.*, 2014; Rosas *et al.*, 2014). Todos estos parámetros junto a otros más particulares del cultivo son definitivos para mantener la calidad el agua en niveles óptimos.

Dentro de los parámetros específicos del cultivo del pulpo se incluyen la densidad del cultivo, el caudal, la renovación del agua y la intensidad de luz, entre otros (Iglesias *et al.*, 2014), los cuales son indispensables para mantener los parámetros de calidad del agua en niveles óptimos. Durante la reproducción es importante brindarles condiciones de semi-oscuridad para estimular la maduración gonadal (Zúñiga *et al.*, 1995) y suministrar refugios individuales de PVC u otro material para facilitar la puesta de los huevos de la hembra (Villanueva, 1995; Hanlon & Messenger, 1996).

1.2. Reproducción del pulpo

Los pulpos tienen dos estrategias en su ciclo de vida: holobentónica o merobentónica. En las especies holobénticas (desarrollo directo) producen huevos grandes, con embriones bien desarrollados que se parecen a los adultos y al eclosionar, adoptan rápidamente el hábito de sus progenitores, y por lo tanto, se les denomina juveniles (Villanueva, 1995), como es el caso de *O. maya*. Las especies merobénticas (desarrollo indirecto) se caracterizan por producir huevos pequeños y numerosos, los organismos que eclosionan del huevo no comparten el biotipo de sus adultos, teniendo un estadio planctónico posterior a la incubación, denominado paralarva (Young & Harman 1988; Vaz-Pires *et al.*, 2004), como es el caso de *O. insularis*.

Los pulpos presentan características reproductivas tales como sexos separados y dimorfismo sexual evidente al llegar a una edad adulta. En los machos el tercer brazo derecho está modificado para transferir los espermatozoides a la hembra durante la cópula a través del hectocotilo (Boyle & Rodhouse, 2005). Las hembras de pulpo en su proceso de maduración presentan cambios en los órganos reproductores y dentro del ovario los ovocitos tienen un proceso de crecimiento y acumulación de grandes cantidades de lipoproteína (Boyle & Rodhouse, 2005). En los machos la madurez sexual es evidente por el aumento en el tamaño del testículo, que ocurre al mismo tiempo que la espermatogénesis y el desarrollo del complejo espermatozoidal (Ortiz & Ré, 2014).

Una vez se produce la cópula, y las hembras de pulpo completan su madurez sexual, ocurre la fecundación de los óvulos en los oviductos, glándulas oviductales y ovarios dependiendo de la especie. Después de la fecundación, la hembra pone los huevos en racimos y generalmente los une o fija a un sustrato (Hernández-Urcera & Guerra, 2014). La primera descripción de la duración del desarrollo embrionario en los huevos de *O. insularis* fue de 30 a 38 días a 26 ± 1 °C (Lenz *et al.*, 2015). En pulpo el desarrollo embrionario va desde la formación del cigoto hasta la eclosión de la paralarva, pasando por XX estadios de desarrollo (Naef, 1928). Las hembras son semélparas es decir cuidan los huevos durante un largo período de tiempo, en el cual no se alimentan, y después que se produce la eclosión de las paralarvas mueren como consecuencia de la inanición (Hernández-García *et al.*, 2002; Mather & Scheel, 2014). La reproducción es el evento terminal en el ciclo de vida de las hembras de pulpo, debido a que se reproducen una sola vez (O'dor & Wells, 1978).

1.3. Requerimientos nutricionales del pulpo

La composición bioquímica de los tejidos del pulpo ha sido estudiada solo en algunas especies y estos estudios hacen referencia principalmente, a la composición de la musculatura y a la glándula digestiva (Cerezo-Valverde *et al.*, 2008; Cruz-López, 2010; Morillo-Velarde *et al.*, 2015a,b). Para *O. vulgaris* que es la especie de pulpo más estudiada, se conoce que su composición bioquímica es de aproximadamente 79 % de humedad, 16 % de proteína, 1 % de grasa, 1.8 % de cenizas, 0.05 % de fibras en peso húmedo (Cabello *et al.*, 2004). De su composición corporal se deduce los

requerimientos nutricionales que deben suplirse en la dieta, y estos se basan en el aporte de una gran cantidad de proteínas y en menor proporción requieren carbohidratos y lípidos (Lee, 1994).

Los pulpos requieren concentraciones elevadas de proteínas y aminoácidos de la dieta para mantener el crecimiento y satisfacer las demandas de energía. Las proteínas son utilizadas en mayor medida por el pulpo para la locomoción, el soporte estructural, fuente de energía, transporte de oxígeno y la osmorregulación (Lee, 1994). Los pulpos tienen altas tasas de síntesis y retención de proteínas y bajas tasas de degradación de estas (Moltschaniwskyj & Carter, 2010). La proteína es esencial en el desarrollo embrionario y en el crecimiento de la paralarva, en estos estadios los aminoácidos son requeridos para el desarrollo óptimo y también son usados como fuente de energía en el metabolismo (Lee, 1994). Las paralarvas recién eclosionadas de *O. vulgaris* presentan un porcentaje de proteína de aproximadamente 72 % del peso seco (Estefanell *et al.*, 2017).

En relación con los requerimientos de carbohidratos, los pulpos no tienen un requisito específico para los carbohidratos procedentes de la dieta (Lee, 1994). Sin embargo, tienen la capacidad de digerir, almacenar y utilizar los carbohidratos para obtener energía, permitiendo ahorrar y destinar mayor cantidad de proteína al crecimiento (Morillo-Velarde *et al.*, 2015a) y usarlos en actividades explosivas de carácter anaeróbico o en períodos de inanición (Wells y Clarke, 1996; Morillo-Velarde *et al.*, 2011).

Los pulpos requieren mínimos contenidos de lípidos en la dieta para mantener su metabolismo y es raro el uso de estos como fuente de energía (Lee, 1994; Morillo-Velarde *et al.*, 2015b). La composición de lípidos total en el pulpo representa niveles muy bajos, con una composición corporal de menos de un 2 % en peso húmedo (Prato *et al.*, 2010; Morillo-Velarde *et al.*, 2013). No obstante el contenido de lípidos de las paralarvas de *O. vulgaris* representa aproximadamente una cuarta parte del peso húmedo del animal (Navarro *et al.*, 2014) y está compuesto principalmente por fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA), de los cuales entre 20 – 30 % son ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y entre 8.3 – 17.3 % son ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) (Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou 1998; Navarro & Villanueva 2003). Se sugiere que las paralarvas requieren una alimentación con presas

de bajo contenido de lípidos pero rico en lípidos polares, PUFA y posiblemente colesterol (Navarro & Villanueva 2000, 2003). Sin embargo, no existe todavía información sobre el perfil de ácidos grasos (AG) de los huevos y paralarvas de *O. insularis*, que nos permita estimar los requerimientos lipídicos en las primeras etapas de su desarrollo y establecer una dieta óptima para su supervivencia en cautividad.

Muchos esfuerzos de investigación se están centrando en obtener información básica sobre las primeras etapas de vida de estas especies con potencial acuícola (Solorzano *et al.*, 2009; Alejo-Plata & Herrera, 2014; Caamal-Monsreal *et al.*, 2015; López-Peraza *et al.*, 2018), definiendo criterios en diferentes aspectos reproductivos y de desarrollo que permitan evaluar el éxito de los sistemas de cultivo. Por esta razón, los esfuerzos de este estudio están encaminados en obtener información sobre la calidad de huevos y paralarvas de *O. insularis*, relacionada con aspectos morfométricos y bioquímicos durante su desarrollo embrionario en condiciones de cultivo. Así mismo, a generar información de otros aspectos de su biología relacionados con la calidad del desove. La información que se obtenga de este trabajo contribuiría al futuro desarrollo del cultivo del pulpo común *O. insularis* en Veracruz, ya que conocer la composición bioquímica durante las primeras etapas de desarrollo, puede ser una aproximación de los requisitos nutricionales de la etapa paralarval y un paso importante para el aprovechamiento del potencial de esta especie en la acuicultura.

2. ANTECEDENTES

Hasta la publicación de los recientes estudios basados en taxonomía integrativa (Lima *et al.*, 2014; González-Gómez *et al.*, 2018) se consideraba que la especie de pulpo común de las aguas someras del golfo de México y mar Caribe era *O. vulgaris*. Esta confusión taxonómica se debe al hecho de que ambas especies comparten características morfológicas y fisiológicas similares. Por esta razón, en el presente trabajo se ha tomado a *O. vulgaris* como el taxón de referencia para realizar las comparaciones fisiológicas y morfométricas con *O. insularis*.

Los estudios sobre el pulpo *O. insularis* se han centrado hasta ahora en aspectos biológicos y pesqueros (Leite *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2014; Flores-Valle *et al.*, 2018; González-Gómez *et al.*, 2018; Maldonado *et al.*, 2019; Rosas *et al.*, 2019). En contraste, los estudios sobre los aspectos morfométricos del crecimiento, el desarrollo de los organismos en sus primeros días de vida y los requerimientos nutricionales, son escasos o nulos.

Las investigaciones sobre fecundidad, morfometría de huevos y paralarvas, y duración del desarrollo embrionario llevadas a cabo en *O. insularis*, se presentan a continuación. En Brasil, Leite *et al.* (2008) determinaron en animales silvestres de *O. insularis* una fecundidad de 213 000 ovocitos y Lima *et al.* (2014) reportaron un promedio de 93 820 ovocitos en los ovarios, mientras que en condiciones de cautiverio se estimó una fecundidad de 85 000 huevos para una hembra de 1 680 g (Lenz *et al.*, 2015). Estos mismos autores describieron por primera vez los huevos y paralarvas de *O. insularis* en condiciones de cautividad, reportando que el primer día después del desove, los huevos tenían una longitud y ancho promedio de 2.13 ± 0.06 mm y 0.82 ± 0.04 mm, respectivamente, y un día antes de la eclosión de 2.29 ± 0.06 mm y 0.92 ± 0.03 mm, respectivamente. Para el Golfo de México, González-Gómez *et al.* (2018) reportaron en animales silvestres de *O. insularis* una longitud y ancho promedio de los huevos al momento del desove de 2.23 ± 0.05 y 0.92 ± 0.06 mm, respectivamente.

En cuanto a la descripción morfométrica de las paralarvas, en Brasil se ha reportado una la longitud total y longitud del manto al momento de la eclosión de 2.34 ± 0.16 mm y 1.68 ± 0.13 mm,

respectivamente, y el diámetro del ojo de 0.31 ± 0.04 mm. La duración del desarrollo embrionario duró de 30 a 38 días a 26 ± 1 °C (Lenz *et al.*, 2015). Para el Golfo de México, se reporta del desarrollo embrionario XX estadios en 22 días a una temperatura 25-28 °C y una salinidad de 36-40 en condiciones de cautiverio para *O. insularis*, considerado erróneamente para la fecha del estudio como *O. vulgaris* (Morales-Ortega, 2009).

Los estudios en pulpo sobre la relación entre las medidas morfométricas, la calidad de desove y la composición bioquímica en huevos, paralarvas y juveniles se desglosan a continuación. En *O. vulgaris*, Quintana *et al.* (2015) encontraron que el contenido de lípidos totales (LT) del huevo se correlacionó significativa y positivamente con parámetros biométricos como la longitud y ancho del huevo de 10 días y el contenido de LT de las paralarvas se correlacionó fuertemente con el peso húmedo del huevo, el peso seco de la paralarva, longitud y ancho del huevo de 10 días, y ancho del huevo de 20 días; obteniéndose correlaciones entre la calidad del desove con la composición de LT y la proteína total, que podrían ser el resultado de la dieta suministrada a los reproductores. En otro estudio con hembras de *O. maya* alimentadas con dietas formuladas, las características morfométricas de los embriones y la supervivencia de las crías en ayuno de 10 días fueron similares para todas las dietas; aunque encontraron diferencias en las crías de las hembras alimentadas con cangrejo (*Callinectes sapidus*) y con una dieta mixta (cangrejo, calamar y SELCO), las de la primera dieta produjeron crías con mayor peso y las hembras alimentadas con la segunda dieta produjeron crías más grandes (Tercero *et al.*, 2015). Caamal-Monsreal *et al.* (2015) reportaron un rendimiento reproductivo similar respecto al número promedio de huevos por cordón, huevos por desove y el número crías por desove en todas las hembras de *O. maya* alimentadas con diferentes dietas naturales. Estos autores no encontraron diferencias significativas en las características morfológicas de los embriones y huevos, excepto en el diámetro del ojo (0.47 ± 0.10 mm) para los embriones de hembras alimentadas con calamar-cangrejo el cual fue significativamente mayor.

Por otra parte, en estudios sobre la composición de proteína y lípidos de las primeras etapas de vida en cefalópodos, se ha descrito que la fracción proteica en huevos y paralarvas de *O. vulgaris* es de alrededor de un 70 % (Villanueva *et al.*, 2004; Estefanell *et al.*, 2017). Otro estudio encontró una correlación positiva entre el contenido total de proteína con los principales parámetros biométricos

de huevos y paralarvas de *O. vulgaris* y con la supervivencia de las paralarvas a diferentes tiempos de ayuno (Quintana *et al.*, 2015). Farías *et al.* (2011) no encontraron variaciones en el contenido de proteína del líquido perivitelino durante el desarrollo embrionario de huevos provenientes de hembras alimentadas con distintas dietas.

Los primeros estudios de la composición de lípidos y ácidos grasos (AG) en las primeras etapas de vida de cefalópodos se realizaron en sepias (*Sepia officinalis*), donde se encontró una relación inversa entre la temperatura con respecto de la talla de las crías y la calidad de lípidos (Bouchaud & Galois, 1990, Bouchaud, 1991). Sykes *et al.* (2009) observaron un aumento de los LT en huevos cultivados de *S. officinalis* comparados con silvestres durante el desarrollo embrionario. Además, los autores sugieren que los lípidos en *S. officinalis* no se utilizan como sustrato energético sino como componente estructural en los huevos. Navarro y Villanueva (2000) reportaron para las primeras etapas de vida de *S. officinalis*, *Loligo vulgaris* y *O. vulgaris* altos requerimientos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y ácido docosahexaenoico (DHA). La composición del total de AG en las tres especies fue de un 25 a 35 % saturados, 9 a 14 % monoeno y, aproximadamente 50 % poliinsaturados. En un estudio realizado en las primeras etapas de vida de *O. vulgaris* en España, Quintana *et al.* (2015) analizaron la relación entre la calidad del desove y la composición bioquímica de huevos y paralarvas producto de tres dietas parentales, observaron un predominio de los grupos saturados y Ácidos grasos altamente insaturados n-3 (HUFA), que representa un 63 – 75 % del contenido total de AG sin importar la dieta. Por otra parte, Estefanell *et al.* (2017) compararon el perfil de AG de huevos y paralarvas silvestres y cultivados de *O. vulgaris*, reportando que los LT representan entre 11.5 - 13.5 % en peso seco. Estos autores resaltan la importancia del DHA para *O. vulgaris*, ya que fue el componente de mayor cantidad en el perfil de AG y señalan la importancia del ácido araquidónico (ARA), el cual presentó una disminución de su contenido en el desarrollo entre huevos y paralarvas. Sugieren el uso del ARA como sustrato energético durante el desarrollo embrionario en la fracción neutra y la disminución en la fracción polar debido probablemente a un cambio en la clase de fosfolípidos.

En México, la especie de pulpo más estudiada es *O. maya* y, hasta el momento, se conocen dos estudios relacionados con los AG en las primeras etapas de vida, donde no se encontraron

resultados asociados al contenido de proteína. Uno realizado por Caamal-Monsreal *et al.* (2015) donde analizaron el efecto de diferentes dietas naturales suministradas a las hembras sobre el desarrollo embrionario y reportan de forma general como resultado de las cuatro dietas suministradas el contenido de AG del vitelo eran, 48 a 54 % AG saturados, de 15 a 19 % AG monoinsaturados (MUFA) y los PUFA entre 21 y 27 %. Los autores indican que los embriones engendrados por hembras que fueron alimentadas con dietas mixtas mostraron que el crecimiento en las primeras etapas de vida está relacionado con el nivel de PUFA contenidos en el vitelo. En otro estudio, Tercero *et al.* (2015) evaluaron los efectos de las dietas formuladas suministradas a los reproductores en el rendimiento reproductivo y la calidad de los embriones y crías, encontraron en el perfil de AG valores altos en el ácido palmítico, ARA (10.21 - 17.32 % del porcentaje total), EPA (6.84 - 12.01 %) y DHA (12.52 - 18.56 %) y reportan que el perfil de AG del vitelo y las crías fue relativamente similar sin importar la dieta.

3. HIPÓTESIS

- El crecimiento de *O. insularis* durante el desarrollo embrionario incubados a 25 °C y 37 ups mostrará un crecimiento similar, no significativo, al de *O. vulgaris*; incubado en condiciones similares.
- Durante el desarrollo embrionario de *O. insularis*, la fracción proteica se mantendrá contante y la fracción lipídica aumentará del huevo a la paralarva como ocurre en *O. vulgaris*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar las variaciones morfométricas y bioquímicas en los huevos los días 1 y 20 después del desove y en las paralarvas recién eclosionadas del pulpo *Octopus insularis* obtenidas en cautividad, para obtener información sobre los requisitos nutricionales en las primeras etapas de vida.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar las medidas morfométricas de los huevos de días 1 y 20 después del desove y de las paralarvas recién eclosionadas del pulpo *O. insularis*.
2. Determinar la composición de humedad, lípidos y proteína de los huevos de días 1 y 20 después del desove y de las paralarvas recién eclosionada del pulpo *O. insularis*.
3. Identificar la composición de ácidos grasos de los huevos de días 1 y 20 después del desove y de las paralarvas del pulpo *O. insularis*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Colecta y transporte de los organismos

Las hembras y los machos de *O. insularis*, fueron capturados en distintos arrecifes del Sistema Arrecifal Veracruzano, suroeste del Golfo de México, frente a la costa de Veracruz, durante diciembre de 2018 y marzo de 2019. Los pulpos fueron capturados con la ayuda de los pescadores locales de forma manual. Durante la captura los organismos se mantuvieron en la embarcación dentro de una hielera con agua de mar, a la cual se le realizaron recambios para mantener una buena calidad de la misma.

Posteriormente, los organismos fueron transportados a las instalaciones del Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías (ICIMAP) de la Universidad Veracruzana, mantenidos en la misma hielera cerrada, adicionándoles un sistema de aireación portátil.

5.2. Aclimatación de los reproductores de pulpo

A su llegada al ICIMAP, los pulpos se sexaron verificando la presencia del hectocotilo en el tercer brazo derecho en machos y su ausencia en hembras. Los pulpos fueron pesados y distribuidos en tres tanques cilíndricos de polietileno de 1 500 L para su aclimatación, de acuerdo con su peso, en cuatro parejas los de mayor tamaño. Los individuos de menor tamaño se colocaron en un solo tanque. Las hembras de pulpo pesaron entre 485.0 – 1 336.0 y los machos entre 80.0 – 709.3 g. Durante el tiempo de aclimatación, los pulpos se alimentaron *ad libitum* con cangrejo (*Callinectes* spp.) a las 9:00 h y se retiraba los restos de comida sobrante a las 14:00 h, seis días a la semana. La aclimatación fue de aproximadamente ocho días, tiempo en el que se observó la cópula.

Los tanques de aclimatación contaron con un sistema cerrado de recirculación de agua de mar y un sistema de filtración mecánico y biológico (aerobio y anaerobio), sin control de temperatura y fotoperíodo natural. El suministro de aire se proporcionó por medio de un soplador con mangueras

a cada tanque, adicionalmente para cada pulpo se dispuso un refugio (casita de cerámica triangular). Los tanques fueron cubiertos con una malla para evitar que los pulpos se escaparan.

Para mantener constantes y óptimos los parámetros de calidad el agua, en cada tanque se registró diariamente el porcentaje (%) de saturación de oxígeno disuelto y la temperatura (°C), utilizando un medidor multiparámetro portátil (Bante820). Estos parámetros se mantuvieron $>80\%$ y 24.18 ± 1.07 °C, respectivamente. Semanalmente, se midió la concentración de compuestos nitrogenados por colorimetría, los cuales se mantuvieron en valores por debajo de 0.25 ppm para amoníaco (NH_3), en 0 ppm nitritos (NO_2^-) y entre 80 - 160 ppm para nitratos (NO_3^-). También se registró el pH 8.0 ± 0.2 y la salinidad 37.0 ± 1.0 ups.

5.3. Mantenimientos de las hembras, desoves e incubación de la puesta

Después de la aclimatación, las cuatro hembras (con pesos de 485.0, 733.8, 813.7 y 1 336.0 g) fueron trasladadas individualmente a tanques circulares de fibra de vidrio de 120 L. Estos tanques estaban acondicionados de la misma manera que los tanques de aclimatación y además, contaban con filtración ultravioleta y control de temperatura del agua con un enfriador (TECO TK 2000). Para evitar el escape de los pulpos, a los tanques se les colocó una malla ajustada y sobre esta una malla sombra para disminuir la incidencia de la luz solar y estimular así la maduración gonadal. En cada tanque, también se colocó un refugio de cerámica (Fig. 1). El mantenimiento de los parámetros de calidad del agua (temperatura 25.52 ± 0.97 °C) se llevó a cabo por el mismo procedimiento que para la aclimatación de los reproductores.

Las hembras fueron alimentadas *at libitum* con cangrejo (*Callinectes* spp.) a las 09:00 h, seis días de la semana. El alimento no consumido fue retirado diariamente a las 14:00 h mediante un sifón de limpieza. Se observó que días antes del desove las hembras dejaron de comer y se dejó de ofrecerles alimento a partir de ese día. Las hembras se mantuvieron con los huevos (Fig. 1) hasta el momento de la eclosión de las primeras paralarvas, luego se sacrificaron y pesaron.

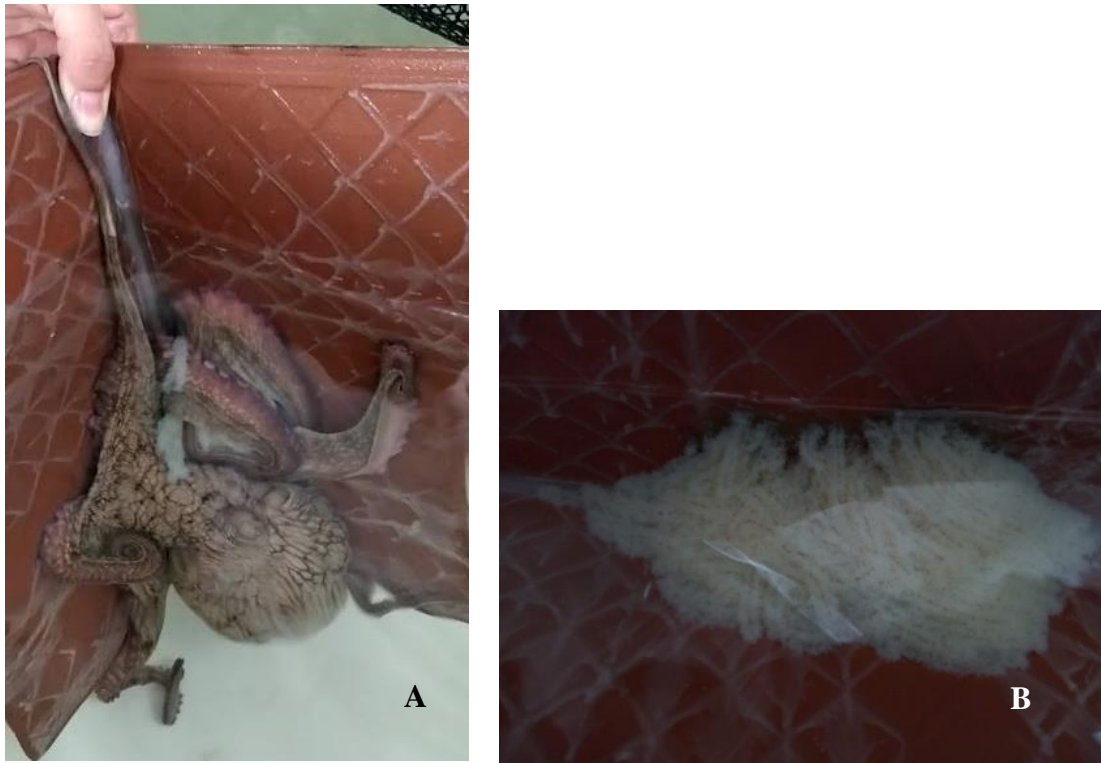


Figura 1. A) Ejemplar de hembra de *O. insularis* cuidando la puesta dentro del refugio de cerámica. B) Huevos desovados.

5.4. Fecundidad de las hembras

Para estimar el número total de huevos del desove de cada una de las hembras, se contó el número total de huevos en un centímetro del cordón ($n = 9$), luego se midió la longitud (cm) de 40 cordones y se promedió esta medida, finalmente, se contó el número total de cordones desovados. Para estimar del número total de huevos de cada hembra, se contaron los huevos por cm de cordón; este número se multiplicó por la longitud promedio de cordón y este valor por el total de cordones.

5.5. Morfometría de los huevos y los embriones

La toma de medidas de huevos y embriones se realizó a partir de las fotografías. Estas se hicieron con un microscopio (Motic BA 210) con cámara a $4\times$ de magnificación unido a una computadora,

donde las imágenes se analizaron usando el software Motic2000 image® (Fig. 2). Para las mediciones morfométricas de los huevos y embriones no se incluyó el pedúnculo y la medición del ancho del huevo y del embrión se hicieron en el plano ecuatorial. A cada huevo y embrión se le midió la longitud y el ancho (mm). La toma de medidas Al momento de medir la longitud del huevo. Se midieron 10 huevos de tres cordones diferentes de cada hembra los días 1 y 20 después del desove (DD) (Fig. 3).

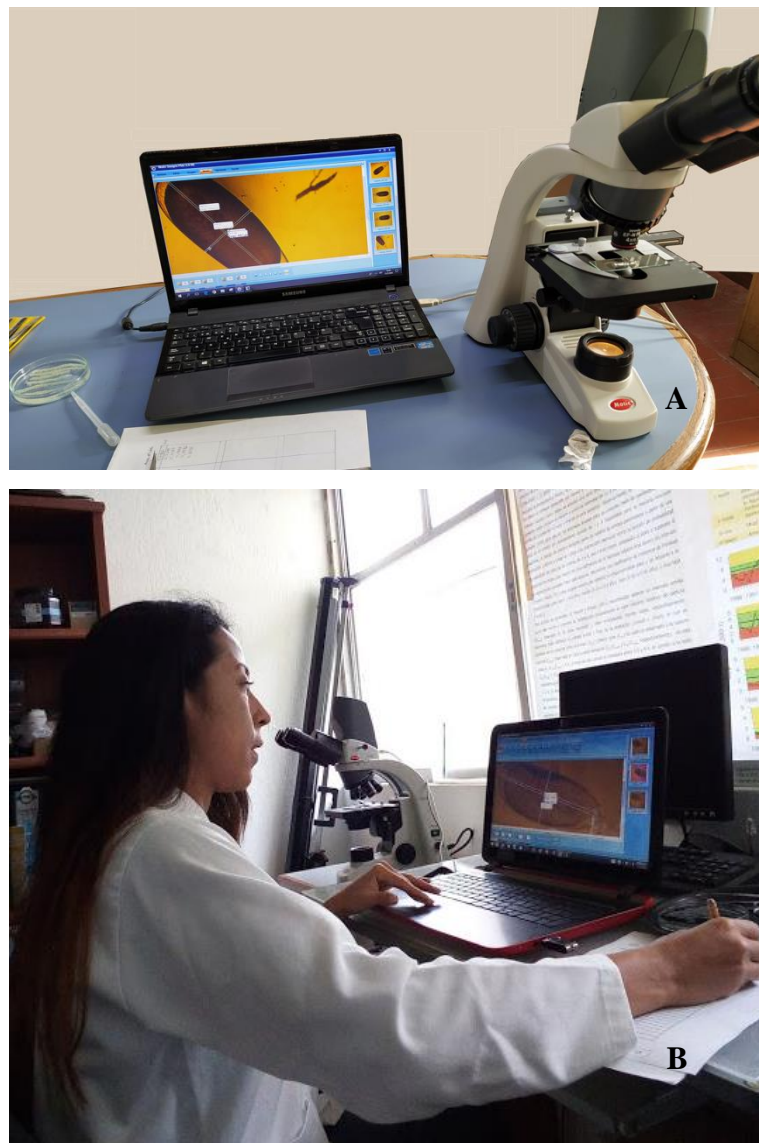


Figura 2. Equipos utilizados para las mediciones morfométricas de los huevos y paralarvas de *O. insularis* de cada uno de los desoves obtenidos. A) Equipos. B) Realización de las Mediciones.

5.6. Morfometría de las paralarvas

Para la morfometría (Fig. 3), se seleccionaron 15 paralarvas por cada hembra. A cada paralarva se le midió la longitud del manto (Lm), ancho del manto (Am), ancho de la cabeza (Ac), longitud del segundo par de brazos (L2b), diámetro de los ojos (Do) y longitud total (Lt), siguiendo la metodología de Lenz *et al.* (2015).

Las muestras de paralarvas se tomaron el día 2 de eclosión, teniendo en cuenta que fue uno de los días donde se observó una mayor cantidad de paralarvas y se garantizó que no tuvieran más de 24 horas de eclosión.

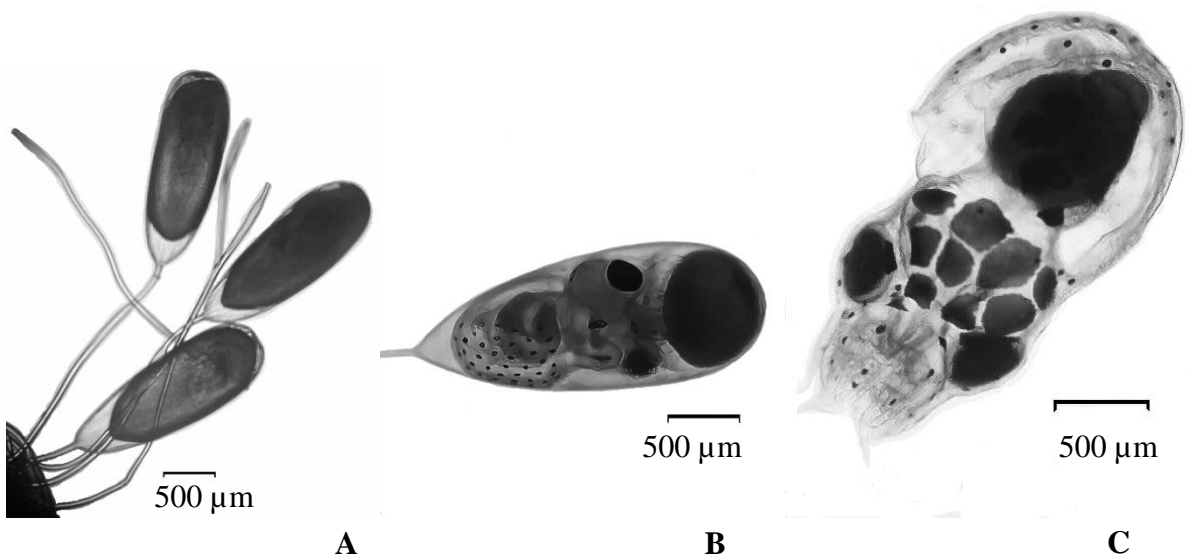


Figura 3. Imágenes de los diferentes estadios de desarrollo de *O. insularis* analizados en el estudio. A) huevos de pulpo el día 1 después del desove; B) huevos al día 20 después del desove; C) paralarva de pulpo recién eclosionada (longitud total \approx 2.6 mm).

5.7. Protocolo de eutanasia en huevos, paralarvas y hembras.

Se siguió un protocolo de eutanasia para las muestras de huevos y paralarvas, teniendo en cuenta la normatividad de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, ya que no existe una normatividad similar para el caso de México. Los huevos y paralarvas se colocaron en una solución de 27 g/l de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) durante 5 minutos (Fiorito *et al.*, 2015), con la cual se anestesiaron y mataron de forma ética. Posteriormente, se lavó con agua destilada para eliminar residuos de $MgCl_2$. Para las hembras el procedimiento fue el mismo, aunque el tiempo varió; se dejaron en la solución hasta que murieron y luego del lavado se procedió a pesarlas. En el caso de huevos y paralarvas, al finalizar el lavado se realizó el análisis bioquímico.

5.8. Análisis bioquímicos

Los análisis bioquímicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías, y en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Acuícola (LIBA) del Tecnológico Nacional de México campus Boca del Río, Veracruz.

Los análisis realizados a los huevos y paralarvas fueron: peso húmedo, peso seco, contenido de lípidos totales, composición de ácidos grasos y contenido de proteína. El peso húmedo y seco fue determinado a partir de 10 huevos de tres cordones diferentes (tres réplicas) los días 1 y 20 DD y 10 paralarvas recién eclosionadas (< 24 h; tres réplicas) por cada una de las hembras. A las muestras se les quitó el exceso de agua con papel absorbente y se colocaron en cajas de aluminio previamente pesadas y etiquetadas para cuantificar el peso húmedo (g) en una balanza analítica (Velab VE300). Posteriormente, las cajas de aluminio se introdujeron en una estufa durante 48 horas a 40 °C hasta obtener un peso constante y se pesaron nuevamente para obtener el peso seco (g). La humedad se determinó por la fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(M1 - M2) \times 100}{M}$$

M1 = peso de la caja de aluminio más muestra húmeda

M2 = peso de la caja de aluminio más muestra seca

M = peso de la muestra húmeda

Para determinar los lípidos totales (%), se tomaron tres cordones de huevos (tres réplicas) de los días 1 y 20 DD y entre 2.0 y 6.0 g de paralarvas en peso húmedo. Las muestras se secaron en la estufa durante 48 horas a 40 °C (ver Anexo 1) y posteriormente, se conservaron a -20 °C hasta el momento de la extracción.

Para la obtención de los lípidos totales se tomaron 1.0 y 0.5 g de muestras secas de huevos y paralarvas, respectivamente. La extracción lipídica se llevó a cabo con una solución cloroformo/metanol (1:2 v/v) por medio del método Soxhlet (Fig. 4; ver anexo 2) (Halim *et al.*, 2012, Ferrer-Álvarez *et al.*, 2015).



Figura 4. A) Equipos del método Soxhlet usados para la extracción de lípidos en muestras secas de huevos y paralarvas de *O. insularis*. B) Equipo de cromatografía de gases empleado para la identificación y cuantificaron los ácidos grasos.

Los ácidos grasos se obtuvieron a partir de los lípidos totales por derivatización por el método modificado de Lepage & Roy, 1984 (ver anexo 3). Finalmente, una vez la muestra estuvo

derivatizada, se identificaron y cuantificaron los ácidos grasos (%) por cromatografía, a través de la inyección de la muestra (~200 µL) en el cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Mod. Clarus 580 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar Elite-WAX de 30 metros de longitud y 0.250 mm de diámetro) (Fig. 4; ver anexo 4). La cuantificación del contenido de proteína se determinó con la muestra seca y desgrasada de los huevos, usando el método Kjeldahl y en las paralarvas la muestra no fue suficiente para su análisis.

5.9. Análisis estadístico.

Se analizó si existían relaciones significativas entre el número de huevos por cm de cordón, la longitud del cordón y la fecundidad estimada con el peso de las hembras al morir.

Para determinar si existen diferencias en el ancho y la longitud de huevos, el ancho y la longitud del embrión del huevo entre los días 1 y 20 DD, se utilizaron pruebas T Student para muestras relacionadas.

Los datos de los ácidos grasos y humedad, los cuales se expresan en porcentajes, se transformaron en arco seno antes del análisis. Se comprobó la normalidad de todos los datos (peso húmedo, peso seco y porcentaje de humedad, lípidos, proteína y ácidos grasos) con la prueba de Kolmogorov-Smirnov de una muestra (Zar, 1999), así como la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene (Zar, 1999).

Para la comparación entre los parámetros bioquímicos de los huevos (día 1 y 20 DD) y paralarvas recién eclosionadas, se hizo un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias entre grupos se determinaron con una prueba post-hoc de Tukey y se realizó un análisis de regresión simple para evaluar el aumento o la disminución de los parámetros bioquímicos estudiados. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete IBM SPSS Statistics Version 25.0. (Armonk, NY: IBM Corp. EE UU). Para todas las pruebas estadísticas se estableció un nivel de significación $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Fecundidad de las hembras

De las hembras de *O. insularis* utilizadas en el presente estudio se obtuvieron cuatro desoves. La fecundidad promedio estimada fue de $161\,355 \pm 30\,811.91$ huevos/desove, llegando hasta $200\,283 \pm 74\,587$ huevos para una hembra con un peso al morir de 598.20 g (Tabla 1).

El número promedio de huevos por centímetro de cordón fue de 119.17 ± 17.50 , con un intervalo de entre 103.30 ± 3.60 a 144.00 ± 13.90 huevos/cm. La longitud promedio del cordón fue de 6.0 ± 0.96 cm. El número total de cordones fue menor en las hembras de mayor peso al morir (205 y 208 cordones) y mayor en las hembras de menor peso (249 y 248 cordones; Tabla 1). El desarrollo embrionario duró en promedio 25 ± 3.95 días, desde el inicio del desove hasta la eclosión de las paralarvas (Tabla 1).

No se encontraron relaciones significativas ($P < 0.05$) entre el número de huevos por cm, la longitud del cordón y la fecundidad estimada con el peso de las hembras al morir.

6.2. Medidas morfométricas de los huevos y las paralarvas

Todos los datos morfométricos de los huevos y embriones se incrementaron de manera significativa ($P < 0.05$) y conforme avanzó el desarrollo embrionario (Fig. 5).

La longitud del embrión ($t = -120.31$) y ancho del huevo ($t = -22.63$) mostraron su mayor incremento con un 21.6 y 21.0 % respectivamente; mientras que el ancho del embrión ($t = -19.71$) y longitud del huevo ($t = -16.89$) aumentaron un 18.0 y 9.1 % respectivamente (Fig. 5).

Tabla 1. Características del desove y la fecundidad en *O. insularis*.

Característica	Hembra 1	Hembra 2	Hembra 3	Hembra 4	Media DE
Peso (g) al morir	1 005.30	886.90	647.90	598.20	711.00 ± 154.35
N° de huevos por cm*	144.00 ± 13.90	103.30 ± 3.60	112.40 ± 18.70	117.00 ± 50.30	119.17 ± 17.50
Longitud cordón (cm)*	5.90 ± 1.10	6.50 ± 2.20	4.70 ± 1.50	6.90 ± 1.55	6.00 ± 0.96
N° total de cordones	205	208	249	248	227.50 ± 24.28
Fecundidad estimada*	171 290 ±16525	141 415 ± 4 887	132 434 ±22 074	200 283 ±74 587	161355.50 ± 30811.91
Días de incubación	21	28	26	26	25 ± 3.95

* Media ± DE

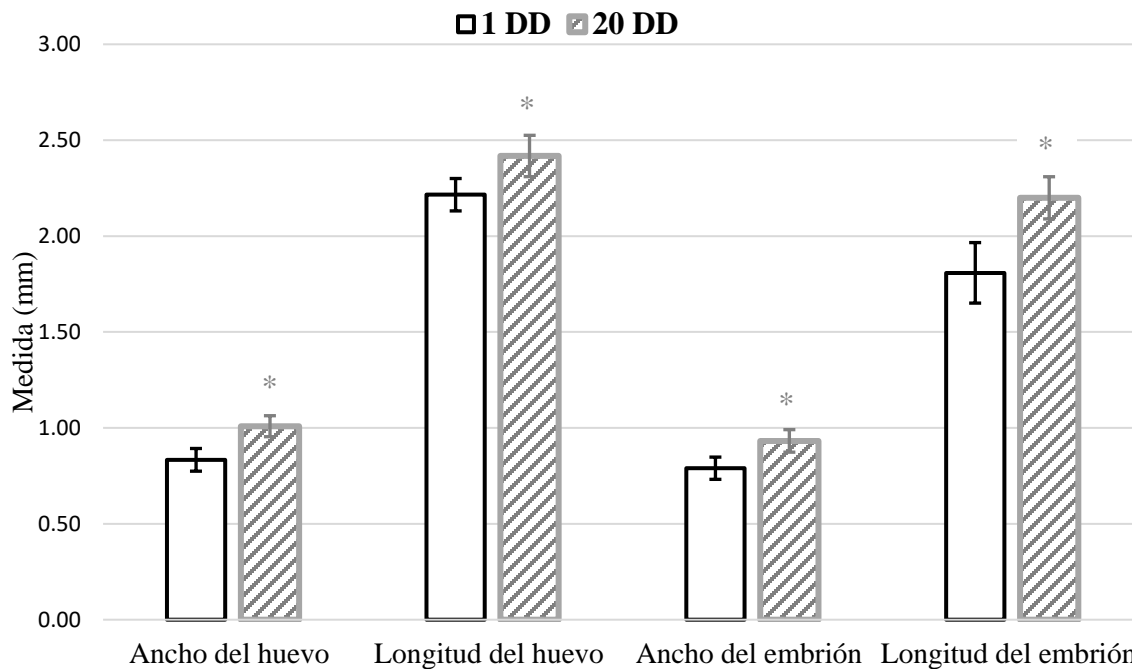


Figura 5. Comparación del tamaño de los huevos de *O. insularis* el día 1 y 20 después del desove. Resultados representan la media \pm D.E. (N = 120). * Representa diferencias significativas.

Los resultados de las mediciones morfométricas medias de las paralarvas recién eclosionadas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Medidas morfométricas (mm) de las paralarvas de *O. insularis* recién eclosionadas. (N=60)

	Media \pm D.E.	Rango
Longitud del manto (Lm)	1.53 \pm 0.17	1.23-1.91
Ancho del manto (Am)	1.21 \pm 0.09	1.06-1.43
Longitud segundo par de brazos (L2b)	0.57 \pm 0.07	0.39-0.69
Ancho de cabeza (Ac)	1.03 \pm 0.13	0.83-1.27
Diámetro de los ojos (Do)	0.36 \pm 0.04	0.29-0.44
Longitud total (Lt)	2.60 \pm 0.18	2.27-2.99

Se encontraron correlaciones significativas entre los parámetros biométricos de los huevos y las paralarvas de *O. insularis* (Tabla 3). La longitud del huevo del día 1 DD mostró una correlación moderada y positiva con el peso seco de la paralarva, el peso húmedo del huevo del día 1 DD mostró una correlación alta y negativa con la longitud total de la paralarva y el ancho del huevo del día 20 DD se correlacionó fuerte y positivamente con la longitud del manto de las paralarvas. Los parámetros morfométricos de los huevos del día 1 DD ancho del huevo, la longitud y peso húmedo de los huevos del día 20 DD no mostraron correlaciones significativas frente a las variables de la paralarva.

Tabla 3. Correlaciones de Pearson entre las medidas y los pesos de los huevos de *O. insularis* el día 1 y 20 después del desove contra las medidas de las paralarvas recién eclosionadas.

Variables del huevo		Variables de la Paralarva					
		Longitud del Manto		Longitud Total		Peso Seco	
		R	P valor	R	P valor	R	P valor
Huevos 1 DD	Longitud	0.452	0.222	0.224	0.563	0.665	0.013
	Ancho	0.629	0.069	-0.225	0.561	-0.099	0.800
	Peso Húmedo	0.584	0.099	-0.842	0.004	-0.403	0.282
Huevos 20 DD	Longitud	0.605	0.084	0.280	0.466	0.569	0.110
	Ancho	0.761	0.017	-0.443	0.233	-0.156	0.689
	Peso Húmedo	-0.014	0.971	-0.550	0.125	-0.114	0.771

Valores en negrita indican correlaciones significativas ($P < 0.05$; $N = 9$)

6.3. Composición bioquímica y de ácidos grasos de huevos y paralarvas

El peso seco fue significativamente mayor en los huevos (día 1 y 20 DD) que en las paralarvas ($F= 13.11$, $P<0.05$), mientras que el porcentaje de humedad fue mayor en las paralarvas que en los huevos el día 1 y 20 DD ($F=12.48$, $P<0.05$; Tabla 4). No se detectó una tendencia significativa ni en el peso seco ni en la humedad como consecuencia de desarrollo embrionario. El contenido total de lípidos fue menor en los huevos del día 1 DD (9.72 %) en comparación con los de 20 DD (14.98 %) y las paralarvas (21.69 %) en *O. insularis* ($F= 112.28$, $P<0.05$; Tabla 4, Fig. 6), con un incremento de 0.44 % de lípidos / día de desarrollo. El contenido de proteína permaneció constante en los huevos los días 1 y 20 DD.

Tabla 4. Composición bioquímica de los huevos de *O. insularis* el día 1 y 20 después del desove y de las paralarvas recién eclosionadas.

	HUEVOS 1 DD	HUEVOS 20 DD	PARALARVA	y=a+b*días desarrollo	
Peso seco (mg)	0.30±0.03 ^a	0.29±0.02 ^a	0.19±0.03 ^b	0.31	-0.003
Humedad (%)	64.50±5.05 ^a	75.19±4.67 ^a	81.46±3.88 ^b	63.49	0.67
Lípidos (%)	9.72±1.16 ^a	14.98±1.06 ^b	21.69±0.65 ^c	8.76	0.44*
Proteína (%)	61.61±5.40	60.94±7.07	-		

Todos los resultados representan la media ± DE. (N = 9). Letras diferentes en la misma fila significan diferencias significativas (P < 0.05). * Regresión con un ajuste significativo.

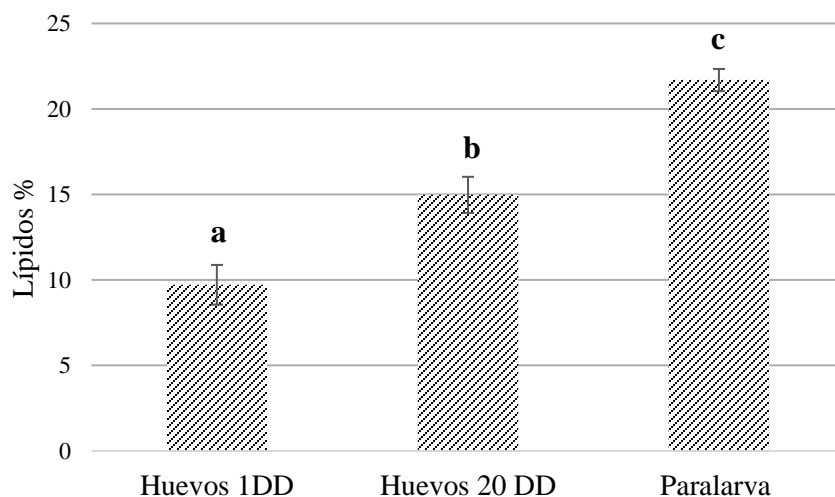


Figura 6. Contenido total de lípidos (%) en los huevos el día 1 y 20 después del desove y en las paralarvas de *O. insularis*. La barra representan la media ± D.E. Letras diferentes representan diferencias significativas.

Además, se observó una probable relación entre el porcentaje de humedad y el contenido total de lípidos, donde estos aumentaron a medida que avanzó el desarrollo embrionario del huevo a la paralarva del pulpo *O. insularis* (Fig. 7).

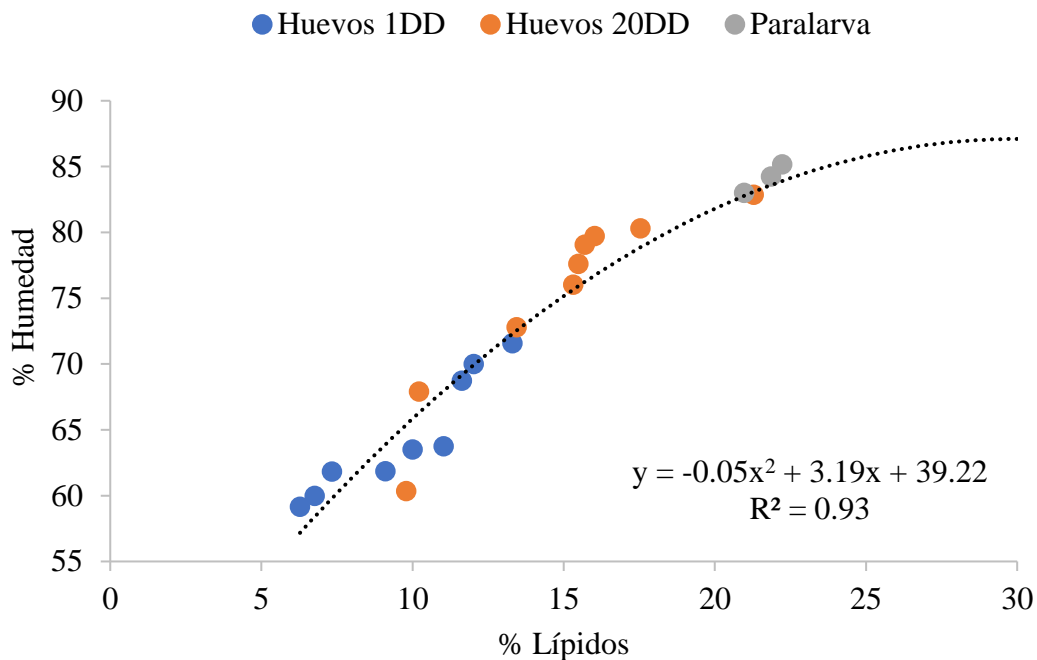


Figura 7. Porcentaje de humedad en función del porcentaje de lípidos en huevos y paralarvas durante el desarrollo embrionario de *O. insularis*.

En referencia a los ácidos grasos se detectaron hasta 32 picos en los cromatogramas realizados, de los cuales 13 correspondieron a ácidos grasos saturados (SFA) y 19 a insaturados (UFA) (Tabla 5). Los SFA predominaron (84.87 - 51.29 %) frente a los UFA (48.73 - 15.09 %) en los huevos y paralarvas durante el desarrollo embrionario.

En la regresión lineal al considerar el contenido total de lípidos, se detectó una tendencia negativa en los SFA y una tendencia positiva de los UFA, aunque solo fue significativa en los PUFA con un aumento de 1.32 % / día de desarrollo ($P < 0.05$; Tabla 5).

Es importante señalar, que debido a la emergencia sanitaria por el COVID-19 las muestras para el análisis de ácidos grasos no se pudieron conservar de forma óptima, provocando la degradación de estos. Como resultado, se encontraron grandes diferencias con los resultados de otras especies de cefalópodos (tabla 6 y 7). Por lo que consideramos nuestros datos de AG inexactos y no serán comentados en la discusión.

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos principales (%) de los huevos de *O. insularis* el día 1 y 20 después del desove y paralarvas recién eclosionadas.

	HUEVOS 1 DD	HUEVOS 20 DD	PARALARVA	y=a+b*días desarrollo	
C4:0	0.76±0.18	2.87±3.35	2.51±3.51	0.77	0.08
C11:0	0.08±0.05 ^a	0.03±0.02 ^a	1.42±1.27 ^b	-0.10	0.04
C13:0	7.57±0.41	3.13±4.21	N.D.		
C14:0	N.D.	1.28±0.00	3.07±0.00		
C15:0	30.04±0.81	25.19±13.55	9.99±8.45	32.09	-0.68
C15:1	0.14±0.04 ^a	0.33±0.14 ^a	3.07±0.14 ^b	-0.22	0.09
C16:0	1.09±0.97	0.76±0.86	0.52±0.64	1.13	-0.02
C16:1	0.78±0.97 ^a	3.80±0.78 ^b	0.06±0.04 ^a	1.21	0.02
C17:0	0.24±0.27	N.D.	0.02±0.01		
C17:1	0.38±0.04	0.10±0.13	0.02±0.00	0.40	-0.02*
C18:0	8.56±4.06 ^a	0.31±0.39 ^b	0.19±0.00 ^b	8.73	-0.37
C18:1n9t	N.D.	0.05±0.06	0.10±0.00		
C18:1n9c	0.01±0.00	N.D.	N.D.		
C18:2n6t	N.D.	0.02±0.00	N.D.		
C18:2n6c	0.06±0.00	20.83±15.68	33.47±1.81	-1.96	1.31
C20:0	35.15±1.66	12.28±14.32	30.72±0.48	33.20	-0.47
C18:3n6	0.23±0.19	0.21±0.00	N.D.		
C20:1	0.04±0.03	0.05±0.00	0.84±0.00	-0.06	0.02
C18:3n3	0.21±0.19 ^a	0.18±0.18 ^a	2.82±2.59 ^b	-0.13	0.08
C21:0	0.32±0.50	0.99±1.34	0.83±1.14	0.33	0.03
C20:2	0.59±0.77	1.31±1.74	0.82±1.37	0.64	0.02
C22:0	0.32±0.52	4.72±0.00	0.54±0.74	0.78	0.07
C20:3n6	7.72±2.40	9.02±7.49	2.58±0.74	8.53	-0.14
C22:1n9	2.68±2.27	6.31±5.48	3.04±0.05	3.03	0.06
C20:3n3	0.27±0.38	5.09±4.95	0.24±0.21	0.81	0.07
C23:0	0.22±0.33	0.61±0.83	1.46±2.04	0.13	0.04
C20:4n6	0.39±0.63	0.03±0.00	0.64±1.09	0.32	0.002
C22:2	0.29±0.45	0.12±0.00	0.05±0.06	0.30	-0.01
C24:0	0.52±0.82	0.18±0.07	0.02±0.01	0.55	-0.02
C20:5n3	0.53±0.83	N.D.	0.25±0.40		
C24:1	0.53±0.59	0.02±0.00	0.06±0.00	0.53	-0.02
C22:6n3	0.24±0.29	0.12±0.14	0.67±1.01	0.17	0.01
SFA	84.87±12.32 ^a	52.35±7.39 ^b	51.29±8.77 ^b	85.62	-1.49
UFA	15.09±1.86 ^a	47.59±5.39 ^b	48.73±8.20 ^b	14.34	1.49
MUFA	4.56±0.94 ^a	10.66±2.67 ^b	7.19±1.48 ^{a,b}	4.89	0.17

PUFA	10.53±2.35 ^a	36.93±7.00 ^b	41.54±10.87 ^b	9.44	1.32*
HUFA	1.16±0.15	0.15±0.06	1.56±0.23	14.34	1.49
n - 3	0.98±0.18	0.30±0.04	3.74±1.38	0.55	0.07
n - 6	8.34±4.28	9.26±5.14	3.22±1.37	9.10	-0.14
HUFA/PUFA	0.11	0.004	0.04		
DHA/EPA	0.45	-	2.68		
DHA/ARA	0.62	4.00	1.05		
EPA/ARA	1.36	-	0.39		

Nota: Todos los resultados representan la media ± DE. (N = 9). SFA: Ácidos grasos saturados; UFA: Ácidos grasos insaturados; MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: Ácidos grasos altamente insaturados; ARA: Ácido araquidónico (20: 4n-6); EPA: Ácido eicosapentaenoico (20: 5n-3); DHA: Ácido docosahexaenoico (22: 6n-3). N.D.: no detectado. Letras diferentes en la misma fila significan diferencias significativas (P < 0.05). * Regresión con un ajuste significativo.

Tabla 6. Contenido total (%) de lípidos y ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) de diferentes especies de pulpo en tres estadios de desarrollo obtenidos en cautividad, de diferentes estudios.

Especie	Lípidos	Ácidos grasos (% sobre el total)			Fuente datos
		SFA	MUFA	PUFA	
HUEVOS ESTADIO DE DESARROLLO INICIAL					
<i>O. maya</i>	11.00	54.01±0.50	19.22±0.47	26.77±0.40	Caamal-Monsreal <i>et al.</i> (2015)
<i>Enteroctopus megalocyathus</i>	14.50	45.97±3.20	11.16±0.47	42.88±2.73	Uriarte <i>et al.</i> (2014)
<i>O. vulgaris</i>	11.50	28.7±0.80	18.6±0.20	53.9±1.30	Estefanell <i>et al.</i> (2015)
<i>O. insularis</i>	9.72	84.87±12.32	4.56±0.94	10.53±2.35	Este trabajo
HUEVOS ESTADIO DE DESARROLLO AVANZADO					
<i>O. vulgaris</i>	11.60	36.90	9.60	40.50	Navarro & Villanueva (2003)
<i>O. insularis</i>	14.98	52.35±7.39	10.66±2.67	36.93±7.00	Este trabajo
PARALARVAS RECIÉN ECLOSIONADAS					
<i>O. maya</i>	-	37.81±3.44	16.71±0.44	45.48±3.21	Tercero <i>et al.</i> (2015)
<i>Enteroctopus megalocyathus</i>	-	35.70±4.42	15.97±2.05	48.33±6.47	Uriarte <i>et al.</i> (2014)
<i>O. vulgaris</i>	13.40	27.20	13.5	49.2	Navarro & Villanueva (2000)
<i>O. insularis</i>	21.69	51.29±8.77	7.19±1.48	41.54±10.87	Este trabajo

Tabla 7. Composición de ácidos grasos totales (%) de diferentes estudios en tres estadios de desarrollo de diferentes especies de pulpo obtenidos en cautividad.

Especie	C16:0	C18:0	C18:1n9c/t	C18:2n6c	C18:3n3	C20:4n6	C20:5n3	C22:6n3	Fuente datos
HUEVOS ESTADIO DE DESARROLLO INICIAL									
<i>O. maya</i>	35.08±2.33	10.04±0.84	10.36±0.72	1.32±0.19	0.52±0.05	0.46±0.04	10.49±0.60	9.07±0.37	Caamal-Monsreal <i>et al.</i> (2015)
<i>E. megalocyathus</i>	32.33±2.14	6.97±0.02	2.42±0.32	0.30±0.03	0.84±0.18	6.30±0.19	15.18±0.31	19.11±2.31	Uriarte <i>et al.</i> (2014)
<i>O. vulgaris</i>	21.60±0.20	3.80±0.40	5.80±0.20	0.20±0.10		1.40±0.20	9.60±0.80	24.70±1.00	Estefanell <i>et al.</i> (2015)
<i>O. insularis</i>	1.09±0.97	8.56±4.06	0.01±0.00	0.06±0.00	0.21±0.19	0.39±0.63	0.53±0.83	0.24±0.29	Este trabajo
HUEVOS ESTADIO DE DESARROLLO AVANZADO									
<i>O. vulgaris</i>	28.10	6.10	2.60	0.20	0.10	8.60	8.40	19.80	Navarro & Villanueva (2003)
<i>O. insularis</i>	0.76±0.86	0.31±0.39	0.05±0.06	20.83±15.68	0.18±0.18	0.03±0.00	N.D.	0.12±0.14	Este trabajo
PARALARVAS RECIÉN ECLOSIONADAS									
<i>O. maya</i>	16.05±4.48	11.97±0.51	7.28±0.68	0.42±0.09	0.09±0.02	15.81±1.49	11.71±0.79	15.75±1.34	Tercero <i>et al.</i> (2015)
<i>E. megalocyathus</i>	23.18±5.01	7.16±0.44	5.11±0.05	0.39±0.39	0.52 ±0.52	8.67±1.00	15.13±2.82	19.11±4.13	Uriarte <i>et al.</i> (2014)
<i>O. vulgaris</i>	17.50	6.30	4.00	3.30	N.D.	7.30	12.60	21.20	Navarro & Villanueva (2000)
<i>O. insularis</i>	0.52±0.64	0.19±0.00	0.10±0.00	33.47±1.81	2.82±2.59	0.64±1.09	0.25±0.40	0.67±1.01	Este trabajo

7. DISCUSIÓN

Un aspecto relevante encontrado en este estudio fue la alta fecundidad de las hembras ($161\ 355.50 \pm 30\ 811.91$ huevos / hembra), siendo valores muy superiores a los reportados en Brasil para esta misma especie en condiciones silvestres (93 820 ovocitos; Lima *et al.*, 2014) y en cautiverio (85 000 huevos; Lenz *et al.*, 2015). Se ha comprobado que la fecundidad se ve afectada por la dieta parental en *Idiosepius pygmaeus* (Lewis & Hodward, 1993) y al mismo tiempo influye en la calidad del huevo y las crías en *E. megalocyathus* (Farías *et al.*, 2011), *O. maya* (Caamal-Monsreal *et al.*, 2015; Tercero *et al.*, 2015) y *O. vulgaris* (Márquez *et al.*, 2013; Quintana *et al.*, 2015). Estudios realizados en *O. maya* y *O. vulgaris* sugieren que la calidad del desove está determinada por la composición bioquímica de la dieta de los reproductores, obteniéndose mejores resultados con monodietas de calamar y cangrejo en *O. vulgaris* (Quintana *et al.*, 2015) y dieta mixta de cangrejo-mejillón en *O. maya* (Caamal-Monsreal *et al.*, 2015). El aumento de la fecundidad en *O. insularis* que muestran nuestros resultados comparados con trabajos anteriores (Lenz *et al.*, 2015) podría deberse al efecto de la dieta parental, ya que en el presente estudio las hembras fueron alimentadas con cangrejo (*Callinectes sapidus*) en lugar de una mezcla de sardina y cangrejo (Lenz *et al.*, 2015), mejorando la calidad del desove en cuanto al número de huevos obtenidos.

Durante el desarrollo embrionario de *O. insularis* la longitud y el ancho del huevo se incrementó un 9.1 y 21.0 %, respectivamente. Las medidas morfométricas e incrementos del tamaño en los huevos en esta etapa concuerdan con lo reportado para la especie por otros autores (Lenz *et al.*, 2015; González-Gómez *et al.*, 2018); considerándose estas medidas reportadas, características de la especie. Incrementos similares durante el desarrollo embrionario fueron encontrados en *O. vulgaris*, cuyos huevos provenientes de hembras con una dieta de cangrejo incrementaron un 3 % en la longitud y un 20 % en el ancho y los huevos de hembras con una dieta de sardina incrementaron un 9 % en la longitud y 30 % en el ancho (Quintana *et al.*, 2015).

Las paralarvas recién eclosionadas de *O. insularis* fueron un 11 % de mayor tamaño que lo reportado por Lenz *et al.* (2015) en Brasil (2.60 ± 0.18 vs. 2.34 ± 0.16 mm de longitud total).

Estos resultados podrían explicarse a partir de estudios donde recientemente se ha comprobado en dos especies de pulpo que la dieta materna es la principal responsable de la variación morfométrica de las paralarvas recién eclosionadas (Caamal-Monsreal *et al.*, 2015; Spreitzenbarth & Jeffs, 2021). Las diferencias de tamaño también podrían ser atribuidas a la mayor salinidad; 37 ± 1 ups en el presente trabajo frente a 32 ± 1 ups en Lenz *et al.* (2015). Un estudio demostró la existencia de un efecto de la salinidad en el incremento de tamaño de las paralarvas en pulpo (Castellano *et al.*, 2017). Lo cual nos podría indicar que el intervalo de salinidad para *O. insularis* está entre 32 y 37 ups, siendo esta última la más óptima en condiciones de cautiverio, pudiendo tener implicaciones en el desarrollo de los huevos y el tamaño de las paralarvas. Por otra parte, según Quintana *et al.* (2015), los huevos y las paralarvas más pequeñas tienen una vida más corta en *O. vulgaris*, indicando que las medidas biométricas pueden utilizarse como un parámetro de la viabilidad de estas, siendo también un indicador de los nutrientes almacenados y disponibles (reservas de lípidos) al momento de la eclosión. Por lo tanto, el tener un mayor tamaño de las paralarvas nos podría indicar una mayor viabilidad en estas.

Las paralarvas recién eclosionadas de *O. insularis* mostraron un diámetro mayor del ojo que lo reportado para esta especie en Brasil (0.36 ± 0.04 vs. 0.31 ± 0.04 mm, Lenz *et al.*, 2015). En cefalópodos se ha usado el diámetro del ojo como indicador del crecimiento de los embriones, esta característica se ha relacionado con el desarrollo del sistema nervioso (Villanueva & Norman, 2008; Uriarte *et al.*, 2009, 2012, Maldonado *et al.*, 2019). En *O. maya* Caamal-Monsreal *et al.* (2015) encontraron una tendencia exponencial entre la relación del crecimiento de los embriones con el diámetro del ojo. Estos autores observaron una relación positiva entre el diámetro de ojo y la composición del vitelo y que a su vez dependía de la dieta materna, reconociendo que la mejor dieta estimula más el desarrollo del sistema nervioso en los embriones. El diámetro del ojo aquí reportado nos indica crecimiento y tal vez, un mejor desarrollo del sistema nervioso si se comparan nuestros resultados con las paralarvas obtenidas en Brasil. Además, según lo reportado por Caamal-Monsreal *et al.* (2015), las medidas del diámetro del ojo y longitud total de la paralarva de nuestro estudio podrían indicar que muy probablemente la dieta a base de cangrejo en *O. insularis* promovió

un mayor éxito en el desarrollo del embrión, siendo medible al momento de la eclosión de la paralarva.

Las variaciones en la composición bioquímica durante el desarrollo embrionario de huevo a paralarva en *O. insularis* se evidenció en el peso seco, la humedad y el contenido total de lípidos, en los tres momentos del desarrollo (huevos 1 y 20 días DD, y paralarvas recién eclosionadas) y finalmente los valores del contenido de proteína en los dos estadios de los huevos. El peso seco disminuyó durante el desarrollo embrionario aproximadamente un 36 %. El peso seco en los huevos fue similar a lo reportado para *O. insularis* en Brasil el día 1 después del desove (0.33 ± 0.03 mg; Lenz *et al.*, 2015) y el peso seco de la paralarva, similar a lo reportado en *O. vulgaris* (0.22 ± 0.01 mg; Estefanell *et al.*, 2017). En nuestro trabajo la disminución de peso seco podría explicarse por el metabolismo y consumo del vitelo en el desarrollo embrionario, entre otros factores.

El porcentaje de humedad durante el desarrollo embrionario en *O. insularis* aumentó un 26 % desde el día 1 del huevo (64.50 ± 5.05 %) a la paralarva (81.46 ± 3.88 %), observándose un aumento acentuado en los últimos días de desarrollo. Este aumento del 27 % es similar al (63.7 ± 2.7 % en huevos y 81.2 ± 5.0 % en paralarvas) reportado por Quintana *et al.* (2015) y al 22 % (70.4 ± 2.8 % en huevos y 86.3 ± 5.2 % en paralarvas) por Estefanell *et al.* (2017) en *O. vulgaris*. Lo anterior sugiere que el aumento porcentual de humedad durante el desarrollo embrionario de *O. insularis* es similar al de *O. vulgaris*. En cefalópodos el aumento del volumen o hinchamiento de los huevos es una característica general durante el desarrollo embrionario (Boletzky, 1987; Bouchaud & Daguzan, 1990; Uriarte *et al.*, 2009), este proceso suele comenzar durante la segunda mitad del desarrollo embrionario en *O. vulgaris* (Silva & Vidal, 2006).

En nuestro estudio el porcentaje de humedad y el contenido total de lípidos fue mayor en las paralarvas que en los huevos de 1 y 20 DD, estas dos variables aumentaron de inicio a fin del desarrollo embrionario. Estos resultados estarían correlacionados como una forma característica y particular de las primeras etapas de vida del pulpo donde los huevos aumentan

de volumen ocurre la organogénesis y los lípidos aumentan como componente haciendo parte estructural de membranas, neuronas y del sistema nervioso.

El contenido total de lípidos aumentó constantemente en los tres momentos del desarrollo embrionario de *O. insularis*, resultados similares se encontraron en *O. vulgaris* (Navarro & Villanueva, 2000, 2003; Estefanell *et al.*, 2017). El porcentaje de LT en el huevo el 1 día DD en nuestro estudio, fue mayor de lo reportado para *O. vulgaris* en este mismo momento del desarrollo (9.7 % vs. 6.5 – 6.8 %; Quintana *et al.*, 2015). Sin embargo, se han reportado valores mayores para *O. vulgaris* (11.5 %, Estefanell *et al.*, 2015) y para *O. maya* (11.5 %, Caamal-Monsreal *et al.*, 2015). En el huevo al día 20 DD nuestros valores de LT fueron un poco más altos a lo reportado en un estadio similar en *O. vulgaris* (14.9 % vs. 11 – 12 %; Navarro & Villanueva, 2003) y similar al valor encontrado en huevos al inicio del desarrollo embrionario en *E. megalocyathus* (14.5 %; Farías *et al.* 2011). En la paralarva, el porcentaje de LT fue similar a lo reportado en las paralarvas recién eclosionadas de *O. vulgaris* (21.7 % vs. 19.4 ± 1.0 %; Domingues *et al.*, 2013) pero mayor a lo reportado en otros trabajos para *O. vulgaris* (13.4 %; Navarro & Villanueva, 2000) y llegando a porcentajes más altos en paralarvas de *O. vulgaris* alimentadas (14.5 %, Okumura *et al.*, 2005; 25.1 %, Navarro & Villanueva, 2000). Estos valores nos indican que tal vez se presenta una gran variación en este parámetro de calidad, intra e interespecie, sin embargo para llegar a una conclusión clara se tendrían que hacer más estudios sobre el metabolismo de esta especie, en especial en las primeras etapas de vida.

Por último, el porcentaje del contenido de proteína en huevos de 1 y 20 días DD permaneció constante, sin variación durante el desarrollo, siendo de un 61 %. Este resultado es un poco menor a lo reportado tanto en huevos como en paralarvas en *O. vulgaris* donde se conoce que el contenido de proteína es de alrededor de un 70 % (Villanueva *et al.*, 2004; Estefanell *et al.*, 2017). Adicionalmente, Domingues *et al.* (2013) encontró en *O. vulgaris* que el contenido de proteínas y lípidos son tal vez inversamente proporcionales entre sí. Por lo tanto, al tener un contenido total de lípidos más alto en nuestros resultados, se espera tener un porcentaje de proteína un poco más bajo que lo reportado para otras especies de pulpo.

Los resultados de la presente investigación muestran las medidas morfométricas y bioquímicas del desarrollo embrionario de *O. insularis* cultivados y mantenidos a 25.5 °C y 37 ups. Estos resultados brindan avances en el conocimiento sobre los requisitos nutricionales en las etapas tempranas de *O. insularis* necesarios para explorar el desarrollo tecnológico para el cultivo de esta especie en cautividad.

8. CONCLUSIONES

- Los huevos del pulpo *O. insularis* crecieron un 9.1 % de longitud y 21.0 % de ancho entre los días 1 y 20 DD, el crecimiento de la longitud del huevo fue menor en *O. vulgaris* y solo la medida del ancho del huevo tiene un crecimiento similar en las dos especies.
- El tamaño de las paralarvas de *O. insularis* al momento de la eclosión fue un 11 % mayor que lo reportado para la misma especie en Brasil.
- La longitud del huevo al inicio del desarrollo embrionario es la medida morfométrica más adecuada para predecir un desarrollo óptimo de las paralarvas recién eclosionadas de *O. insularis*.
- La variación de la composición bioquímica de los huevos y paralarvas *O. insularis* estuvo dada por una disminución de 36 % del peso seco y un aumento de 26 % humedad y del 123 % de lípidos lo largo del desarrollo embrionario. El incremento de los lípidos fue 0.44 % por día.
- La fracción proteica se mantuvo constante en los huevos de *O. insularis* entre los días 1 al 20 DD.

9. LITERATURA CITADA

Alejo-Plata, M.C. & S. Herrera. 2014. First description of eggs and paralarvae of green octopus *Octopus hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae) under laboratory conditions. Am. Malacol. Bull. 32: 132-139.

Boletzky, S. V. 1987. Ontogenetic and phylogenetic aspects of the cephalopod circulatory system. *Experientia*, 43(5): 478-483.

Bouchaud, O. & R. Galois. 1990. Utilization of egg-yolk lipids during the embryonic development of *Sepia officinalis* L. in relation to temperature of the water. *Comp. Biochem. Physio.* 97B: 611–615.

Bouchaud, O. & J. Daguzan. 1990. Étude expérimentale de l'influence de la température sur le déroulement embryonnaire de la siche *Sepia officinalis* L. (Céphalopode, *Sepioidae*). *Cahiers Biol.* 31: 131–145.

Bouchaud, O. 1991. Energy consumption of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) during embryonic development, preliminary results. *Bull. Mar. Sci.* 49: 333–340.

Boyle, P. & P. Rodhouse. 2005. *Cephalopods: ecology and fisheries*. (Ed.). Lackwell Science Ltd. Oxford. 452 pp.

Caamal-Monsreal, C., M. Mascaró, P. Gallardo, S. Rodríguez, E Noreña-Barroso, P, Domingues & C. Rosas. 2015. Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchling quality. *Aquaculture*. 441: 84-94.

Cabello, A., R. Villarroel-Lezama, B. Figuera-García, M. Ramos-Marcano, Y. Márquez-Figueroa & O. Vallenilla-González. 2004. Parámetros de frescura de moluscos. *Revista científica, FCV-LUZ*. XIV (5): 457-466.

Castellano, G.C., M.P.T. da Veiga, F.S. Mazzini, E.A. Vidal, & C.A. Freire. 2017. Paralarvae of *Octopus vulgaris* Type II are stenohaline conformers: relationship to field distribution and dispersal. *Hydrobiologia*, 808 (1): 71–82.

Cerezo-Valverde, J., M.D. Hernández, F. Aguado-Giménez & B. García. 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*. 275 (1-4): 266–273.

Coronado, E., S. Salas, M.F. Cepeda-González & R. Chuenpagdee. 2020. Who's who in the value chain for the Mexican octopus fishery: Mapping the production chain. *Mar. Policy*. 118: 104013.

Cruz-López, H. 2010. Caracterización estacional de la condición fisiológica de la población silvestre del pulpo rojo *Octopus maya* (Voss y Solís-Ramírez, 1966) en la localidad del Sisal, Yucatán, México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero. 66 pp.

Deryckere, A., R. Styfhals, E.A. Vidal, E. Almansa & E. Seuntjens. 2020. A practical staging atlas to study embryonic development of *Octopus vulgaris* under controlled laboratory conditions. *bioRxiv*. 2020.01.13.903922.

Domingues, P., F.J. Sánchez, J. Iglesias, J.J. Otero, G. Pazos & F. Linares. 2013. Variations in Weight and Proximate Composition of Newly Hatched *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) Paralarvae. *J. Appl. Aquac.* 25 (3): 219-226.

Estefanell, J., A. Mesa-Rodríguez, B. Ramírez, A. La Barbera, J. Socorro, C.M. Hernandez-Cruz & M. Izquierdo. 2017. Fatty Acid Profile of Neutral and Polar Lipid Fraction of Wild

Eggs and Hatchlings from Wild and Captive Reared Broodstock of *Octopus vulgaris*. *Front. Physiol.* 8: 453.

Fajardo-Alvarado, G., R. González-Gómez, C. Meiners-Mandujano, L. Jiménez-Badillo & P.S. Morillo-Velarde. 2018. Comportamiento Reproductivo del Pulpo Común (*Octopus insularis*) en Veracruz, Bajo Condiciones de Cultivo». In *Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquería, Desarrollo rural, Transferencia de tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos naturales y Cambio climático*. Veracruz, México: INIFAP. 1130-1139.

Farías, A., J.C. Navarro, V. Cerna, S. Pino, S. & I. Uriarte. 2011. Effect of broodstock diet on the fecundity and biochemical composition of eggs of the Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocyathus* Gould 1852). *Cien. Mar.* 37: 11–21.

Ferrer-Álvarez, Y., L. Ortega-Clemente, L. Pérez-Legaspi, M. Hernández-Vergara, P. Robledo-Narváez, E. Ríos-Leal & H. Poggi-Varaldo. 2015. Growth of *Clorella vulgaris* and *Nannochloris oculata* in effluents of Tilapia farming for the production of fatty acids with potential in biofuels. *Afr. J. Biotechnol.* 1710-1717.

Fiorito, G., A. Affuso, J. Basil, A. Cole, P. de Girolamo, L. D'Angelo, *et al.* 2015. Guidelines for the care and welfare of cephalopods in research - a consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Lab. Anim.* 49: 1–90.

Flores-Valle, A., R. Pliego-Cárdenas, M.L. Jiménez-Badillo, J.L. Arredondo-Figueroa & I.A. Barriga-Sosa. 2018. First Record of *Octopus insularis* Leite and Haimovici, 2008 in the Octopus Fishery of a Marine Protected Area in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.* 37 (1): 221-227.

García-García, B.G. & F. Aguado. 2002. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture.* 211: 171–182.

González-Gómez, R., Barriga-Sosa, I., Pliego-Cárdenas, R., Jiménez-Badillo, L., Markaida, U., Meiners-Mandujano, C. & P.S. Morillo-Velarde. 2018. An integrative taxonomic approach reveals *Octopus insularis* as the dominant species in the Veracruz Reef System (southwestern Gulf of Mexico) PeerJ 6:e6015 <https://doi.org/10.7717/peerj.6015>

Halim, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. Biotechnol. Adv. 30(3): 709-732.

Hanlon, R.T. & J.B. Messenger. 1996. Cephalopod Behaviour. Cambridge University Press, London. 220 pp.

Hernández-Urcera, J. & A. Guerra. 2014. La reproducción del pulpo. Investigación y ciencia. Prensa Científica S.A. Muntaner. España. 2 pp.

Iglesias, J., F.J. Sánchez, J.J. Otero & C. Moxica. 2000. Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): present knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. Zaragoza: CIHEAM. 313-321.

Iglesias, J. & L. Fuentes. 2014. *Octopus vulgaris*. Paralarval Culture. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). Cephalopod culture. Springer, Netherlands. 427-450.

Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. 2014. Cephalopod Culture. Springer. Netherlands. 494 pp.

Lee, P. 1994. Nutrition of cephalopods: fueling the system. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 25: 35-51.

Leite, T.S., M. Haimovici, W. Molina & K. Warnke. 2008. Morphological and genetic description of *Octopus insularis*, a new cryptic species in the *Octopus Vulgaris* Complex (Cephalopoda: Octopodidae) from the tropical southwestern Atlantic. J. Mollus. Stud. 74 (1): 63-74.

Lenz, T.M., H. E. Nathalia, T.S. Leite & E.A.G. Vidal. 2015. First Description of the Eggs and Paralarvae of the Tropical Octopus, *Octopus insularis*, Under Culture Conditions. Am. Malacol. Bull. 33 (1): 1-9.

Lepage, G., & Roy, C.C. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. J. Lipid Res. 25(12): 1391-1396.

Lewis, A.R. & J. Hodward. 1993. Spawning mode and reproductive output of the tropical cephalopod *Idiosepius pygmaeus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50: 20–28.

Lima, F.D., T.S. Leite, M. Haimovici & J.E. Lins-Oliveira. 2014. Gonadal development and reproductive strategies of the tropical octopus (*Octopus insularis*, Octopodidae) in northeast Brazil. Hydrobiologia. 725: 7–21.

López-Peraza, D.J., M. Hernández-Rodríguez & B. Barón-Sevilla. 2018. Fatty acid profile, proteolytic activity and survival of *Octopus bimaculatus* paralarvae fed with enriched *Artemia franciscana*. Molluscan Res. 38 (4): 227-237.

Maldonado, E., E. Rangel-Huerta, R. González-Gómez, G. Fajardo-Alvarado & P.S. Morillo-Velarde. 2019. *Octopus insularis* as a new marine model for evolutionary developmental biology. Biol Open. 8: bio046086.

Mangold, K. & S. Von Boletzky. 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. Mar Biol. 19 (1): 7-12.

Mangold, K. 1983. Food, feeding and growth in cephalopods. Memoirs of the National Museum, Victoria. 44: 81–93.

Márquez, L., D. Quintana, A. Lorenzo, & E. Almansa. 2013. Biometrical relationships in developing eggs and neonates of *Octopus vulgaris* in relation to parental diet. Helgol. Mar. Res. 67 (3): 461–470.

Mather, J. & D. Scheel. 2014. Behaviour. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). Cephalopod culture. Springer, Netherlands. 17-39.

Morales-Ortega, J.C. 2009. Desarrollo embrionario del pulpo *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) proveniente del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. Tesis licenciatura en biología. Universidad de las Americas Puebla.

Morillo-Velarde, P.S., J. Cerezo Valverde, R.M. Serra Llinares & B. García. 2011. Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). J. Molluscan Stud. 77: 318–320.

Morillo-Velarde, P.S., J.C.Valverde, R.M Serra Llinares & B.G. García. 2013. Changes in lipid composition of different tissues of common octopus (*Octopus vulgaris*) during short-term starvation. Aquac. Res. 44 (8): 1177-1189.

Morillo-Velarde, P. S., Cerezo Valverde, J., Aguado-Giménez, F., Hernández, M. D., & B. García-García. 2015a. Effective use of glucose rather than starch in formulated semimoist diets of common octopus (*Octopus vulgaris*). Aquac. Nutr. 21 (2): 206-213.

Morillo-Velarde, P. S., Cerezo Valverde, J., & B. García-García. 2015b. Utilization of diets with different fish oil content in common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) and resulting changes in its biochemical composition. Aquac. Res. 46 (12): 2871-2884.

Moltschaniwskyj, N. A., & C.G. Carter. 2010. Protein synthesis, degradation, and retention: mechanisms of indeterminate growth in cephalopods. Physiol. Biochem. Zool. 83 (6): 997-1008.

Naef, A. 1928. Die Cephalopoden. Embryologie. Die Fauna Flora Golf Neape. 35 (2): 1–357.

Navarro, J.C. & R. Villanueva. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: An approach to their lipid requirements. *Aquaculture*. 183 (1-2): 161–177.

Navarro, J.C. & R. Villanueva. 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: Deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*. 219: 613-631.

Navarro, J.C., O. Monroig & A.V. Sykes. 2014. Nutrition as a Key Factor for Cephalopod Aquaculture. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). *Cephalopod culture*. Springer, Netherlands. 77-95.

Nixon, M. 1969. The life span of *Octopus vulgaris* Lamarck. *Proc. Malacol. Soc. Lond.* 38: 529-540.

O'dor, R.K. & M.J. Wells. 1978. Reproduction versus somatic growth: hormonal control in *Octopus vulgaris*. *J. Exp. Biol.* 77 (1): 15-31.

Okumura, S., Kurihara, A., Iwamoto, A., & T. Takeuhi. 2005. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture*. 244: 147–157.

Ortiz, N. & M. Ré. 2014. Cephalopoda. In: Calcagno, J.A. (ed.). *Los Invertebrados Marinos*. Vazquez Mazzini Editores, Buenos Aires, Argentina. 173-191.

Pita, C., J. Pereira, S. Lourenço, C. Sonderblohm & G.J. Pierce. 2015. The Traditional Small-Scale Octopus Fishery in Portugal: Framing Its Governability. In: Jentoft S & R. Chuenpagdee. (eds.) *Interactive Governance for Small-Scale Fisheries: Global Reflections*. Cham: Springer International. 117-132.

Prato, E, G. Portacci & F. Biandolino. 2010. Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*. 309 (1-4): 203-211.

Quintana, D., L Márquez, J.R. Arévalo, A. Lorenzo & E. Almansa. 2015. Relationships between spawn quality and biochemical composition of eggs and hatchlings of *Octopus vulgaris* under different parental diets. *Aquaculture*. 446: 206–216.

Rosas, C., P. Gallardo, M. Mascaró, C. Caamal-Monsreal & C. Pascual. 2014. *Octopus maya*. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). *Cephalopod culture*. Springer, Netherlands. 383-396.

Rosas Luis, R., Jiménez Badillo, M. D. L., Montoliu-Elena, L., & P.S. Morillo-Velarde. 2019. Food and feeding habits of *Octopus insularis* in the Veracruz Reef System National Park and confirmation of its presence in the southwest Gulf of Mexico. *Mar. Ecol.* 40 (1): e12535.

Sánchez, F.J., J. Cerezo-Valverde & B. García-García. 2014. *Octopus vulgaris*: Ongrowing. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). *Cephalopod culture*. Springer, Netherlands. 451-466.

Sinanoglou, V.J., & S. Miniadis-Meimaroglou, 1998. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Research International*. 31 (6-7): 467-473.

Spreitzenbarth, S. & A. Jeffs. 2021. Temperature induced changes in the development of embryos and paralarvae of the merobenthic octopus, *Octopus tetricus*. *Aquaculture* 538.

Solorzano. Y., M.T. Viana, L.M. López, J.G. Correa, C.C. True & C. Rosas. 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: Growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. *Aquaculture*. 289: 84-90.

Sykes, A., Almansa, E., Lorenzo, A. & J. Andrade. 2009. Lipid characterization of both wild and cultured eggs of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) throughout the embryonic development. *Aquac. Nutr.* 15: 38-53.

Tercero-Iglesias, J.F., C. Rosas, M. Mascaro, G. Poot, P. Domingues, E. Noreña. C. Caamal, C. Pascual, J. Estefanell & P. Gallardo. 2015. Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture*. 448: 234-242.

Uriarte, I., O. Zúñiga, A. Olivares, V. Espinoza, V. Cerna, A. Farías & C. Rosas. 2009. Morphometric changes and growth rate during embryonic development of *Robsonella fontaniana*. *Vie Milieu*. 59:315–323.

Uriarte I, V. Espinoza, M. Herrera, O. Zúñiga, A. Olivares, P. Carbonell, S. Pino, A. Farías & C. Rosas. 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 416–417:168–175.

Uriarte, I., V. Espinoza, R. Gutiérrez, O. Zúñiga, A. Olivares, C Rosas, *et al.* 2014. Key aspects of egg incubation in Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocyathus*) for cultivation purposes. *Aquaculture*. 424: 158-166.

Uriarte, I & A. Farías. 2014a. *Enteroctopus megalocyathus*. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). *Cephalopod culture*. Springer, Netherlands. 365-382.

Uriarte, I & A. Farías, 2014b. *Robsonella fontaniana*. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). *Cephalopod culture*. Springer, Netherlands. 467-475.

Vaz-Pires, P., P. Seixas, & A. Barbosa. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. *Aquaculture*. 238: 221-238.

Vidal E.A., R. Villanueva, J.P. Andrade, I.G. Gleadall, J. Iglesias, N. Koueta, *et al.* 2014. Cephalopod culture: current status of main biological models and research priorities. *Adv. Mar. Biol.* 67: 1–98.

Villanueva, R. 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 2639–2650.

Villanueva, R., J. Riba, C. Ruiz-Capillas, A.V. González & M. Baeta. 2004. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*. 242(1-4): 455-478.

Villanueva, R. & M.D. Norman. 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 46: 105–202.

Villanueva, R., A. Sykes, E. Vidal, C. Rosas, J. Nabhitabhata, L. Fuentes & J. Iglesias. 2014. Current Status and Future Challenges. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). *Cephalopod culture*. Springer, Netherlands. 479–489.

Wells, M.J. & A. Clarke. 1996. Energetics: the costs of living and reproducing for an individual cephalopod. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 351 (1343): 1083–1104

Young, R.E. & R.F. Harman. 1988. “Larva”, “paralarva” and “subadult” in cephalopod terminology. *Malacologia*. 29 (1): 201–207.

Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. Pearson Education India.

Zheng, X.D., Y.S. Qian, L. Chang & L. Qi. 2014. *Octopus minor*. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). *Cephalopod culture*. Springer, Netherlands. 415-426.

Zúñiga, O., A. Olivares & L. Ossandón. 1995. DE HEMBRAS *Octopus mimus*. *Estud. Oceanol.* 14: 75-76.

Zúñiga, O., A. Olivares & C. Rosas. 2014. *Octopus mimus*. In: Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva. (eds.). *Cephalopod culture*. Springer, Netherlands. 397-413.

10. ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para la obtención de biomasa en peso seco y peso húmedo de huevos y paralarvas

Las muestras se secaron en la estufa durante 48 horas a 40°C.

1. Se pesó una membrana (papel filtro) de 110 mm de diámetro, que previamente se puso a peso constante en estufa modelo AR-130 D a 60°C por 24 horas, y se registró el peso (peso membrana seca, **Pm** en g).
2. La muestra de huevos fue de tres cordones, los cuales después de sumergirse en agua destilada se procedió a extraer la humedad mas superficial con papel absorbente y se fueron poniendo cordón por cordón sobre la membrana.
3. Se registró el peso de la membrana junto a los huevos/paralarvas en base húmeda en g (**Pm+Bh**).
4. Se llevó la membrana a la estufa a 40 °C, por 48 horas, y se registró el peso de la membrana (peso seco membrana con huevos/paralarvas), en g (**Pm+Bs**).

En cuanto a las paralarvas en el punto 2 la cantidad de muestra fue variable dependiendo de las paralarvas eclosionadas/día, estas se sumergieron en agua destilada y luego se colocaron sobre el papel filtro, donde se extrajo la mayor cantidad de humedad a través de la filtración por vacío.

Biomasa húmeda $BH = Pm - (Pm+Bh)$

Biomasa seca $BS = (Pm+Bs) - (Pm+Bh)$

Anexo 2. Extracción de ácidos grasos por el Método de Soxhlet

La biomasa seca se sometió a extracción con una mezcla solvente cloroformo/metanol (1:2 v/v) por el método Soxhlet (Halim *et al.*, 2012).

1. Se lavaron los matraces de extracción, se enjuagaron con agua destilada y se secaron por 24 horas a 60 °C. Una vez secos se pesaron 3 veces y se registró el peso promedio de cada matraz (g).
2. Se colocó dentro del tubo de extracción un cartucho de celulosa con el papel filtro y la biomasa seca.
3. Se acomodó el matraz de extracción en el sistema Soxhlet en el tubo de extracción y adicionó el solvente al matraz.
4. Se extrajo la muestra con el solvente realizando 3 reflujos a una velocidad de goteo constante. Una vez terminada la extracción se eliminó el solvente por evaporación en baño María bajo campana de extracción.
5. Se secó el matraz con el extracto lipídico y el solvente en una estufa a 60 °C por 24 horas, se enfrió en desecador y se registró el peso del matraz con lípidos (m2).
6. Los lípidos se solubilizaron con 10 ml de solvente y se conservaron en frasco ámbar hasta su derivatización.
7. Se realizaron los cálculos pertinentes para conocer la cantidad de lípidos extraídos con la ecuación.

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{m2 - m1}{m} * 100$$

Dónde:

m: peso de la muestra

m1: tara del matraz solo

m2: peso matraz con lípidos.

Anexo 3. Derivatización de los ácidos grasos. (modificado de Lepage y Roy, 1984)

1. Adicionar a la muestra de grasa obtenida 3 pastillas de KOH.
2. Adicionar 30 ml de metanol y 10 ml de agua.
3. Evaporar en una parrilla con agitación constante.
4. Enfriar a temperatura ambiente.
5. Adicionarle 30 ml de HCl al 3 % en metanol.
6. Colocar nuevamente a evaporación hasta observar una formación de sales.
7. Enjuagar la muestra con 20 ml de agua destilada y se colocar en un embudo de separación, agregando 30 ml de hexano (10 x 10 ml)
8. Agitar fuertemente por un minuto, se dejar que se formaran 2 fases y se desechar el precipitado formado.
9. El sobrenadante se colocará en un vaso de precipitado de 100 ml para evaporar el solvente presente.
10. Se concentro la muestra a 2ml y se guardó en viales color ámbar para después leerlos en cromatógrafo de gases.

Anexo 4. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos por Cromatografía de gases.

Los ácidos grasos se identificaron y cuantificaron con un cromatógrafo de gases (**Perkin Elmer, Mod. Autosystem de ionización de flama**). Para la lectura se utilizará una columna capilar Elite-WAX de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro y como gas portador nitrógeno (N₂). La temperatura del inyector fue de 250 °C y del detector de 300 °C. El programa de temperatura del horno fue de 140 °C (5 min) con una rampa de 5 °C/min hasta 215 °C con una rampa de 4 °C por minuto hasta 240°C (25 min). El volumen de inyección fue de 2 µl por muestra.