1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una empresa que crece y consolida cada vez más su puesto en el mercado mundial. La necesidad de producir a bajos costos y con una alta eficiencia es de vital importancia para el sector acuícola. Por este motivo, está surgiendo la necesidad de sustituir ingredientes de origen marino de gran demanda y alto costo, por materias primas de origen vegetal de buena calidad nutricional y más económica (Farmanfarmaian *et al.* 1982). Sin embargo, una de las desventajas de estos ingredientes es la poca aceptación que tienen por parte de las especies marinas en cultivo por lo que el uso de atractantes y estimulantes alimenticios dietéticos en la industria acuícola surge como una alternativa que permitiría incrementar el consumo de alimentos con ingredientes de baja palatabilidad (Kolkovski *et al.* 1993).

Los alimentos frescos como el calamar, poliquetos, bivalvos y peces son empleados contínuamente en dietas frescas de maduración para camarones peneidos. Estos alimentos contienen compuestos de bajo peso molecular como lo son ciertos aminoácidos, que tiene propiedades altamente estimulantes. No obstante, el valor nutricional del alimento fresco puede variar por las especies y proporciones utilizadas, la estación del año y el ciclo de vida en el que se encontraban cuando fueron capturados. Así, el uso intensivo de estos ingredientes puede mermar la calidad del agua por su pobre estabilidad y rápida descomposición. Por otro lado, los alimentos artificiales para maduración pueden ser formulados con una composición nutricional establecida, son de fácil almacenaje y alimentación y tiene bajo impacto en el medio acuático (Tacon, 1989; Perez-Velazquez *et al.* 2002). Aunque estas dietas artificiales presentan ventajas, comunmente son utilizadas en pequeñas cantidades, por su baja palatabilidad y menor eficiencia reproductiva para los crustáceos (Harrison, 1990). Sin embargo, la adición de estimulantes alimenticios en la dieta artificial podría permitir el incremento de su ingestión en camarones peneidos y la sustitución parcial o total de alimento fresco, como un primer paso para establecer las cantidades y fuentes de nutrientes adecuados para lograr un alimento artificial que de por lo menos los mismos resultados que los alimentos frescos.

Se han formulado algunas dietas artificiales para maduración utilizando harinas de cefalópodos y crustáceos (Wouters, 2001; Perez-Velazquez *et al.* 2002) pero nunca se han dejado de utilizar fuentes alimenticias de origen marino como ingredientes de estas dietas. En los organismos marinos, distintos que los utilizados como alimento fresco en maduración de peneidos, también se encuentran moléculas de bajo peso molecular (<1000 daltons- unidades de peso molecular) que inducen el comportamiento alimenticio de los camarones (Zimmer-Faust *et al.* 1984). Estos mismos autores mencionaron que estimulantes alimenticios, detectados por las anténulas y dactilos de crustáceos principalmente, al incluirse en la dieta seca pueden provocar una mayor o igual tasa de ingestión que el alimento fresco. Adicionalmente, esta dieta con mayor atractabilidad puede ser utilizada como complemento alimenticio en dietas de maduración. La concentración del estimulante alimenticio purificado en la dieta artificial, afecta la respuesta de comportamiento alimenticio siendo dosis-dependiente. En conclusión, dietas con quimioestimulantes alimenticios y la sustitución de ingredientes de origen marino es un panorama amplio por investigar en dietas para reproductores de camarón.

La presente investigación valora el potencial atractante de varias moléculas sintéticas frente a extractos naturales por medio de la tasa de ingestión y conducta alimenticia de reproductores *L. vannamei*.

2. ANTECEDENTES

2.1. TIPOS DE ATRACTANTES

Tanto los atractantes químicos sintéticos como los naturales se pueden diferenciar por el efecto atractante, incitante, o estimulante que provocan sobre las especies acuáticas. En base a esta diferenciación los atractantes o estimulantes son clasificados (Tabla 1) de acuerdo a la conducta alimenticia que muestran hacia una fuente alimenticia (Lenhoff y Lindstedt, 1974; Mackie y Mitchell, 1985; Métallier y Guillaume, 2001).

Tabla 1. Efectores químicos de la conducta alimenticia de organismos marinos.

Efector Químico de Alimentación	**Efecto**
Atractante	Atracción hacia la fuente.
Arrestante	Detención hacia la fuente.
Repelente	Orientación opuesta al alimento o no receptividad de la fuente.
Incitante	Iniciación a la alimentación.
Supresante	Inhibe la iniciación a la alimentación.
Estimulante	Contínua la alimentación.
Deterrente	Cese de la alimentación.

En el estudio del comportamiento alimenticio de los organismos acuáticos, la primera barrera en la producción acuícola es la ingestión y asimilación del alimento artificial. Este punto, clave para la acuicultura, ha sido estudiado superficialmente, pues se ha tratado de mimetizar el alimento del medio ambiente brindándoles en dietas productos atractantes como: extractos, liofilizados o derivados de presas depredadas por los organismos en estudio. Sin embargo, estos ingredientes atractantes comunmente presentan diferencias en su composición y capacidad de actractabilidad dependiendo de la posición geográfica de pesca, estado fisiológico en la captura, estado nutricional, manejo postcaptura y procesamiento de organismo (Mendoza *et al.* 1998;Chiou y Huang, 2003).

Investigaciones recientes han determinado que L-aminoácidos, la amina cuaternaria betaína y las sustancias purificadas de extractos marinos de peso molecular inferior a 700 Da, son los mayores efectores del comportamiento alimenticio y en menor grado, los nucleótidos, nucleósidos, ácidos grasos, compuestos lipídicos y algunos azúcares (Metallier y Guillaume, 2001). En los peces la visión es esencial para consumir el alimento. Los crustáceos a diferencia de los peces por su alta capacidad de quimiorrecepción pueden alimentarse en la oscuridad o en penumbra, siguiendo la presencia de los efectores químicos en el alimento (Ishida y Hidaka, 1987; Tacon, 1989).

2.2. PRUEBAS EMPLEADAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ALIMENTICIA

A continuación se describen las modalidades más comunes para medir el comportamiento alimenticio en diversas especies.

- Determinar la ingestión de extractos, homogenizados o sobrenadantes de organismos marinos y de vegetales en dietas basadas en caseína.
- Probar sustancias químicas puras en dietas de agar para determinar la ingestión y actividad atractante cualitativa de peces o crustáceos.
- Detectar fracciones cromatográficas de músculos de diferentes organismos atractantes en dietas para diferenciar el consumo de una fracción con la mayor atractabilidad.

- Determinar una respuesta alimenticia específica en moluscos y crustáceos utilizando extractos o filtrados de organismos marinos potencialmente atractantes.
- Determinar la ingestión de alimentos no palatables para crustáceos o peces al añadir soluciones con compuestos estimulantes químicos y naturales en piscina.
- Medir la velocidad, frecuencia y período de atracción hacia una fuente alimenticia cualquiera mediante videofilmación o circuito cerrado y el uso de efectores químicos en solución.

Esta simplificación de metodologías o técnicas se pueden dividir en dos grupos: pruebas de quimioatracción (telorrecepción) y pruebas de estimulación alimenticia. Las pruebas de quimioatracción ocurren en una distribución espacial y miden la actividad atractante del animal hacia el estímulo químico mediante filmaciones. En tanto que las pruebas de estimulación alimenticia evalúan mediante el uso de disco de agar, pelets de agar, pelets de almidón o dietas purificadas y semipurificadas, la ingestión o consumo de la fuente de estimulación (Adams y Johnsen, 1986; Costero y Meyers, 1995; Hidaka *et al.* 2000).

2.2.1. Peces

Los peces tiene yemas gustativas en la boca y en la faringe por eso el uso de estimulantes alimenticios es clave para la ingestión del alimento. La presencia de un sabor indeseable en el alimento provocaría el rechazo del alimento en la boca y por lo tanto una pérdida total de nutrientes en el medio. Aunque los peces son consumidores principales guiados mediante la visión se apoyan de estos quimiorreceptores presentes en la boca, labios, barbelas y aletas para detectar y aceptar o rechazar el alimento presentado (Cowey y Tacon, 1981; Mackie y Mitchell, 1985; Tacon, 1989).

En el tambulero (*Takifugu rubripes*) Takaoka *et al*. (1995) desarrollaron una metodología para preparar extractos o concentrados de especies marinas como almeja, escalopa, krill y calamar. Estos autores luego de homogenizar estas especies con agua desionizada, centrifugaron a 10000 x *g* por 20 minutos a 4ºC. Los sobrenadantes una vez aforados a 93 ml con agua desionizada, fueron mantenidos a –20ºC. Esta metodología permitió fácilmente utilizar los extractos en dietas, aunque sin poder conocer cual fue la composición de cada extracto. Por otro lado, en el mismo estudio, estos investigadores hicieron la composición de extractos sintéticos, preparados mediante reactivos químicos. Los extractos sintéticos y naturales fueron evaluados en dietas purificadas basadas en caseína. Este estudio permitió suponer cuales fueron los aminoácidos que causaron la mayor ingestión, aunque no permitió definir claramente efectos de sinergia o antagonismo entre aminoácidos.

Las actividades atractantes de extractos de vegetales de origen terrestre sobre la Alocha oriental (*Misgurnus anguillicaudatus*) y el atún Aleta Amarilla (*Seriola quinqueradiata*) fueron estimadas mediante experimentos de comportamiento en tanques de laboratorio. En principio, los vegetales fueron pasados a través de un procesador de alimento y homogenizados con agua desionizada. Los extractos fueron centrifugados a 8000 x *g* a 5ºC por 15 minutos, y el sobrenadante filtrado por papel filtro fue almacenado a –40ºC. Este experimento permitió medir el número de peces con actividad alimenticia en un tiempo predeterminado desde la introducción directa del extracto líquido del vegetal en el tanque. Aunque esta metodología es eficaz para determinar cuales vegetales son atractantes comparándose con otros vegetales, es poco práctica cuando se compara con reactivos químicos atractantes y extractos de organismos marinos comunmente utilizados (Harada *et al.* 1996a).

Papatryphon y Soares Jr. (2000) demostraron que en la Perca americana (*Morone saxatilis*) el efecto de estimulantes alimenticios como aminoácidos, amonio cuaternarios, nucleótidos, nucleósidos y ácidos orgánicos encontrados en productos naturales tienen mayor efecto en conjunto que individualmente. En este estudio, los resultados de estimulación obtenidos de una matriz de agar fueron preferidos por la sensibilidad que muestran contra la dieta práctica peletizada. El ensayo con agar permitió una evaluación rápida de los compuestos individuales con baja capacidad de atracción. Aunque esta metodología permite observar con precisión el comportamiento alimenticio de este pez no debe ser considerado como definitivo por que al elaborar una dieta con atractantes/estimulantes débiles, éstos pueden enmascararse por algún ingrediente comunmente usado en dietas prácticas para acuicultura.

El comportamiento alimenticio de juveniles de “Snook” *Centropomus undecimalis* fue evaluado con sustancias químicas atractantes mediante su inclusión en pelets de agar. Bórquez y Cerqueira (1998) evaluaron 5 comportamientos en este pez. (1) Sin reacción: pez sin movimiento, (2) Orientación: movimiento rápido dirigiendo cabeza del pez al pelet, (3) Aproximación: movimiento rápido hacia el pelet, (4) Captura-rechazo: pez toma el pelet en la boca pero lo escupe, (5) Captura-ingestión: pez consume el pelet. Las respuestas fueron agrupadas en 2 categorias donde los comportamientos 3, 4 y 5 fueron considerados positivos y los comportamientos 1 y 2 fueron designados como negativos. Esta metodología es práctica para observar el comportamiento alimenticio de un pez no cultivado previamente, sin embargo para peces comerciales, el uso de dietas prácticas (purificadas o no purificadas) brinda datos más precisos de producción como crecimiento, tasa de ingestión, eficiencia de asimilación y/o factor de conversión alimenticia.

Hidaka *et al*. (2000) estudiaron algunos estimulantes presentes en alimentos para peces omnívoros en el atún Aleta Amarilla (*Seriola quinqueradiata*). Mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se lograron separar los componentes del músculo de la caballa en cuatro fracciones: NA (no eluída), AA (eluída por un paso), $A_{0.2}$ (eluída en solución 0.2 M de NaCl) y $A_{0.2\text{-}0.6}$ (eluída en solución 0.6 M de NaCl). Fue concluido que la utilización de una mezcla de ácido glutámico, ácido láctico e IMP encontrados en abundancia en la fracción AA inducen un efecto estimulante alimenticio (Hidaka *et al*, 2000). Este método permitió evaluar, la presencia de un amplio grupo de aminoácidos, sin embargo un mayor fraccionamiento de cada fracción mediante cromatografía de columna permitiría detectar los aminoácidos que causan la mayor atracción o estimulación en el Atún Aleta Amarilla para su utilización en dietas.

2.2.2. Moluscos

En el gastrópodo marino *Nassarius obsoletus* se investigó la respuesta de la reacción de búsqueda proboscídia (PSR) mediante la utilización de 8 extractos de animales marinos. Esta respuesta de búsqueda proboscídia es la acción alimenticia del órgano masticatorio (proboscis) de este gastrópodo. Fluidos y macerados de moluscos (*Mercenaria campechiensis*, *Aequipecten irradians concentricus*), artrópodos (*Callinectes sapidus, Penaeus duoraroum*), equinodermo (*Lytechinus variegatus*), peces cordados (*Hyporhamphus* *unifasciatus, Elops saurus, Mugil cephalus*) fueron homogenizados individualmente, centrifugados a 4ºC y el suero sobrenadante fue colectado. A cada extracto se le adicionó sulfato de amonio para precipitar las proteínas y seguidamente se ultrafiltraron a través de membranas para retener moléculas menores a 1000 unidades de peso molecular. El filtrado fue fraccionado mediante cromatografía de gel y finalmente las fracciones atractantes fueron extraídas en metanol absoluto (Carr *et al.* 1974). Esta metodología ha sido la primera en ser utilizada para identificar los compuestos químicos presentes en extractos de animales marinos que causan mayor atracción en este gastrópodo marino. Esta clase de estudios exploratorios podrían servir para otros moluscos de importancia comercial.

En otro molusco, como es el abulón negro (*Haliotis discus*), las actividades atractantes de especias, condimentos y frutas fueron evaluadas previo al fraccionamiento de sus componentes por cromatografía de columna. La fracción neutral en la cromatografía de columna fue la que demostró tener una mayor fuerza atractante para el abulón que el resto (Harada *et al.* 1996b).

2.2.3. Crustáceos

Mendoza *et al*. (1998) investigaron el comportamiento alimenticio atractante del langostino malayo (*Macrobrachium rosenbergii*) utilizando aminas biogénicas y feromonas. Colocando un camarón en intermuda por acuario (120x30x40 cm), una dieta con 0.2% de atractante fue adicionada para detectar el efecto de atracción mediante videofilmación. Este procedimiento de evaluar atracción fue muy efectivo para determinar el tiempo que tardaron los langostinos en arribar al pelet con atractante por que asemeja la situación en el campo. De igual forma, evaluaron la tasa de ingestión en campo, en jaulas de 1 m^3 con 10 langostinos cada una, donde se ofreció una cantidad de pelets y 80 minutos después contaron el número de pelets no consumidos. Sin embargo, este método no tomó en consideración la lixiviación del pelet en el agua.

Con *Penaeus monodon* fue realizado un experimento con dietas semipurificadas utilizando atractantes comerciales, sintéticos individuales y mezclas, aminas, nucleósidos y extracto de levadura. La atracción fue medida contando el número de camarones alimentándose en cada dieta, mientras que la estimulación fue medida calculando la ingestión actual de alimento consumido por dieta durante 28 días (Hartati y Briggs, 1993). Este técnica midió con precisión la atracción y la estimulación de una dieta y pudo ser utilizada para fines de producción en piscina camaronera.

2.2.4. Otros

Takii *et al*. (1986) evaluaron a la anguila japonesa (*Anguilla japónica*) con estimulantes alimenticios que fueron adicionados a las dietas y probados en acuarios pequeños (80*60*50 cm) durante 20 días a 27ºC. Un considerable incremento en el crecimiento, eficiencia alimenticia y retención de energía fue observado comparado con el control. Esta metodología evaluó la ingestión de forma precisa y permitió obtener información de lo que podría suceder en la producción en campo, pues al adicionar una mezcla de "sabor" en la dieta basal fueron obtenidos mejores resultados de ingestión en la anguila japonesa.

2.3. ATRACTANTES/ESTIMULANTES EXITOSOS

En esta recopilación de información acerca de atractantes, incitantes y estimulantes exitosos en organismos de importancia económica, serán mostrados los más fuertes efectores químicos de respuesta alimenticia.

2.3.1. Peces

Takaoka *et al*. (1995) estudiaron al pez globo o tambulero (*Takifugu rubripes*) donde utilizaron extractos naturales y sintéticos de almeja, escalopa, krill (*Euphausia pacifica*) y calamar (*Loligo vulgaris*) para comparar la respuesta entre extractos sintéticos y naturales y su posible sinergia o antagonismo con aminoácidos, nucleótidos y otros químicos. La mezcla de aminoácidos, procedentes del extracto de almeja, provocó la mayor actividad alimenticia, mientras su fracción de nucleótidos, ácidos orgánicos y aminas presentaron actividad casi nula. El extracto sintético de la almeja fue el que proporcionó mayor actividad estimulante entre los demás extractos sintéticos y naturales. De igual manera fueron probados por separado una mezcla de 4 aminoácidos (L-serina, L-ácido aspártico, L-alanina, glicina) más betaína y/o ácidos orgánicos. El mejor resultado de actividad relativa (al extracto sintético de almeja) y tasa de ingestión diaria fue alcanzado por la mezcla de los 4 aminoácidos más la betaína. En contraste, la actividad estimulante de la mezcla de aminoácidos con los ácidos orgánicos fue menor que la de la mezcla misma, lo que indicó que los ácidos orgánicos (ácido succínco, ácido málico y ácido fumárico) tienen efecto deterrente.

En el juvenil de “Snook”, Bórquez y Cerqueira (1998) evaluaron 12 compuestos químicos puros en pelets. El estudio mostró que cuatro sustancias fueron consideradas atractantes: Uridina, L-isoleucina, inosina y glicina para un pez y éstas más L-prolina, L-arginina, L-leucina y L-ácido glutámico para dos peces. En conclusión, los autores demostraron que el número de peces por compartimento, acuario o tanque puede influenciar el comportamiento alimenticio.

Papatryphon y Soares Jr. (2000) demostraron que al adicionar en dietas prácticas una mezcla de alanina, serina, inosina monofosfato y betaína se obtuvo la mayor tasa de consumo por parte de la Perca americana. Cuando se removió ya sea la betaína o el inosina monofosfato, los resultados de tasa de ingestión no difirieron significativamente. Esto demostró que los componentes de origen proteico (aminoácidos) son importantes atractantes y estimulantes en peces carnívoros marinos.

Un producto comercial llamado FinnStim, que contiene como principal componente la betaína, fue evaluado en tres niveles y en diferentes salinidades en la trucha arcoiris (*Oncorhyncus mykiss*). FinnStim fue dosis-dependiente en el crecimiento y la mortalidad de pez en agua salada. A un nivel de 1% de FinnStim en la dieta se produjo una reducción de 60% en la mortalidad y un incremento del 12% en la tasa específica de crecimiento durante condiciones de estrés por alta salinidad. Virtanen *et al*. (1994), autores de este trabajo, indicaron que estos resultados son producto de la acumulación intracelular de betaína lo cual disminuyó la inhibición osmótica del metabolismo en la transferencia a agua de mar. La utilización de este amonio cuaternario en trucha arcoiris fue recomendada de 1 a 1.5% en la dieta para alcanzar óptimos resultados.

2.3.2. Moluscos

En el gastrópodo marino *Nassarius obsoletus*, el método de extracción de fracciones con diferentes pesos moleculares permitió determinar que el extracto de camarón tuvo la mejor respuesta de búsqueda proboscídia (PSR) y que las fracciones con componentes menores a 700 unidades de peso molecular solubles parcial o totalmente en metanol son las que presentaron la mayor actividad alimenticia en este molusco marino (Carr *et al.* 1974). Por otro lado, tres componentes lipídicos provenientes de la especia (*Pimenta officinalis*), detectados mediante cromatografía, causaron alta atracción alimenticia en el abulón negro (*Haliotis discus*). De los tres componentes lipídicos atractantes: α-terpineol, ρ-cimeno y β-elemeno, el último componente, provocó la mayor atracción en el abulón (Harada *et al.* 1996b).

2.3.3. Crustáceos

En el langostino malayo (*Macrobrachium rosenbergii*) se han ensayado varios compuestos para determinar su efecto como atractantes. Harpaz (1997) determinó que la presencia de betaína condujo a un incremento significativo en el crecimiento, búsqueda y consumo de la dieta comparado con el grupo de langostinos juveniles alimentados con dieta carente de la solución de este amonio cuaternario. En tanto, Harpaz y Steiner (1990) determinaron que la respuesta de comportamiento fue dependiente de la dosis de betaína dietética aplicada. Además, Mendoza *et al*. (1998) concluyeron que la cadaverina, la putrescina y el extracto de calamar tiene una alta respuesta estimulante y atractante en el langostino.

Heinen (1980) realizó un estudio a profundidad de los efectores químicos de comportamiento alimenticio en diferentes especies de crustáceos. En dicho estudio fue reportado que las sustancias estimulantes individuales más importantes son el ácido L-glutámico, la glicina y la taurina. Adicionalmente, este autor indicó que la mezcla de sustancias puede ser más eficiente que la sustancias individuales, y la betaína en conjunto con aminoácidos es una opción para activar el comportamiento alimenticio en crustáceos.

En el camarón *Palaemonetes pugio* fue medida la respuesta quimioatractante de aminoácidos, amonio cuaternarios, purinas, nucleótidos y mezclas sintéticas de extractos marinos. Contrario a otros estudios con camarones, la mayor respuesta estimulante fue lograda por el extracto natural de jaiba azul (*Callinectes sapidus*) que con la mezcla del extracto sintético, sin embargo una compleja mezcla de nucleótidos, purinas, homarina, trimetilamina, ácido láctico, aminoácidos y betaína si equipara la respuesta estimulante del extracto natural de la jaiba azul en este camarón. De todos las sustancias sintéticas evaluadas, solamente el adenosin monofosfato produjo la mayor estimulación alimenticia sobre el *Palaemonetes pugio* (Carr *et al.* 1984).

Hartati y Briggs (1993) concluyeron que la taurina y el extracto de levadura presentaron alta atracción en el *Penaeus monodon*. Aunque en otra fase del ensayo, los mismos autores determinaron que la ingestión alimenticia fue igual para todos los tratamientos que para el control, sin embargo la ganancia de peso, la tasa de crecimiento específico y el factor de conversión alimenticia fueron óptimos para la taurina y la mezcla de aminoácidos. Estos mismos autores resumieron que la taurina y extracto de levadura inducen la atracción, mientras que la taurina y la mezcla de aminoácidos provocan el óptimo desarrollo del camarón *Penaeus monodon*, pero ninguno activa el comportamiento de ingestión alimenticia.

2.3.4. Otros

En la anguila japonesa fueron probados con éxito una mezcla de "sabor" compuesto de L-alanina, glicina, L-histidina, L-prolina y uridina monofosfato. Los mejores resultados en términos de ganancia de peso, tasa de ingestión, eficiencia de asimilación, eficiencia proteica y porcentajes de retención de proteína, energía y lípidos comparados con el control en la anguila. En este ensayo de 25 días, la digestibilidad aparente de carbohidratos y proteínas es significativamente mayor en la mezcla de "sabor" que en el control, lo que indica que estos compuestos palatables tienen posiblemente otras funciones fisiológicas o metabólicas que deberían ser estudiadas en la anguila japonesa (Takii *et al.* 1986)

2.4. FACTORES QUE AFECTAN EL COMPORTAMIENTO ALIMENTICIO

Los crustáceos a diferencia de los peces tiene una alta capacidad de recepción sensorial a distancia mediante el uso de quimiorreceptores y una baja capacidad de recepción sensorial por efecto de la visión (Heinen, 1980). Por lo tanto, la telorrecepción o identificación del estímulo químico a distancia es clave para que los crustáceos puedan identificar el alimento o la fuente alimenticia. Otro factor a considerar en estudios de decápodos es el ciclo de muda. En este ciclo, los procesos fisiológicos que se llevan a cabo durante la preparación a la ecdisis o muda (reemplazo del exoesqueleto viejo por uno nuevo para facilitar el crecimiento o la reproducción) y posteriores a ella afectan la actividad alimenticia provocando variabilidad

(Smith y Dall, 1985; Robertson *et al.* 1987; Chan *et al.* 1988; Betancourt *et al.* 1993; Vijayan *et al.* 1997). Por lo tanto es de vital importancia, identificar a los camarones peneidos en estadio de muda B, C y Do que es cuando alcanzan su mayor tasa de ingestión y actividad alimenticia (Chan *et al*. 1988;Cadena, 2000). Además, los procesos físicos que determinan la homogeneidad en la distribución en la columna de agua horizontal y verticalmente también influencian el comportamiento alimenticio animal (Zimmer-Faust, 1989). Finalmente, la efectividad de los atractantes, incitantes y/o estimulantes depende principalmente de la especie, el estado fisiológico, la edad y la etapa reproductiva.

2.5. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICAS, BIOLÓGICAS E HISTÓRICAS DE ALGUNOS ATRACTANTES

2.5.1. Taurina

Este aminoácido (ácido 2-aminoetanosulfónico), con peso molecular de 93 Da (Figura 1), es un compuesto que está presente en algunos invertebrados acuáticos como camarón, jaiba, calamar, moluscos y también en peces marinos (Pochon-Masson *et al.* 1983). Estos autores demostraron la presencia de concentraciones muchas veces más altas en mejillones que en la carne de res. Cuando Carr *et al.* (1996) realizaron análisis bioquímicos para 30 especies marinas entre invertebrados y peces, ellos cuantificaron un alto contenido de taurina en tejidos musculares de 4 especies de crustáceos y 8 de moluscos. Adicionalmente, existe evidencia que sugiere que este ß-aminoacido juega un papel importante en los pigmentos biliares en peces (Goto *et al.* 2001). Es un metabolito final de los aminoácidos sulfurados tales como la metionina y la cisteína en los mamíferos (Dalla, 1986). Por ejemplo, la rata excreta taurina cuando hay abundancia de proteína con alto contenido de estos aminoácidos en la dieta (Yokoyama y Nakazoe, 1992). Además, éste es uno de los tres aminoácidos con capacidad probada que inducen el máximo comportamiento alimenticio de los crustáceos (Zimmer-Faust, 1987). Sin embargo, la composición de extracto de la almeja cuello corto, la cual es altamente atractante para crustáceos decápodos, activa los quimiorreceptores de estos invertebrados más fuertemente que la taurina (Lee y Meyers, 1997).

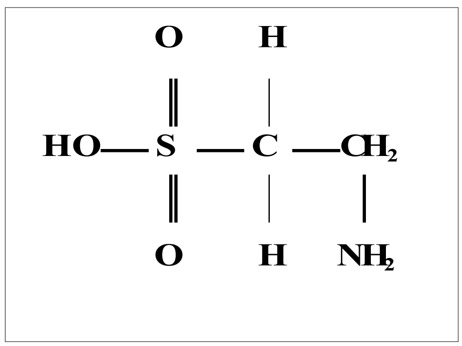

Figura 1. Estructura química de la taurina.

2.5.2. Betaína

La betaína con un peso molecular de 91 Da, es una molécula presente en la naturaleza tanto en ingredientes de origen animal como vegetal (Figura 2). Carr *et al.* (1996) analizaron varias especies de peces e invertebrados y determinaron que la betaína se presenta en altas concentraciones en el mejillón azul (*Mytilus edulis*), la langosta espinosa (*Panulirus japonicus*) y 2 especies de calamar. Este amonio cuaternario está asociado a la síntesis y ruptura de las proteínas, es encontrado en la sangre y productos excretores de ambos, vertebrados e invertebrados y es producto de descomposición del zooplancton (Fuzessery y

Childress, 1975). Es conocida también como betaína glicina, aunque su nombre químico es trimetilglicina, clasificada como una metilamina. Debido a que lleva consigo 3 grupos metilo es un donador importante en algunas reacciones metabólicas críticas. Es un electrolito que tiene propiedades atractantes y osmoprotectantes (Virtanen *et al*. 1989). Cuando se agrega en la dieta éste funciona como osmoprotectante (facilitador de procesos osmóticos) durante la ecdisis en condiciones hiperosmóticas para camarones marinos. Así también, Guerina (1998) observó que el camarón y otros crustáceos son fuertemente atraídos hacia la betaína. Además, el mismo autor notó que la inclusión dietética de la betaína incentivó el crecimiento y la asimilación alimenticia. Otros estudios realizados en peces, demuestran que la betaína al combinarse con aminoácidos neutros como la L-alanina y la glicina tienen un efecto sinérgico y activador al inducir el comportamiento alimenticio (Takaoka *et al.* 1995).

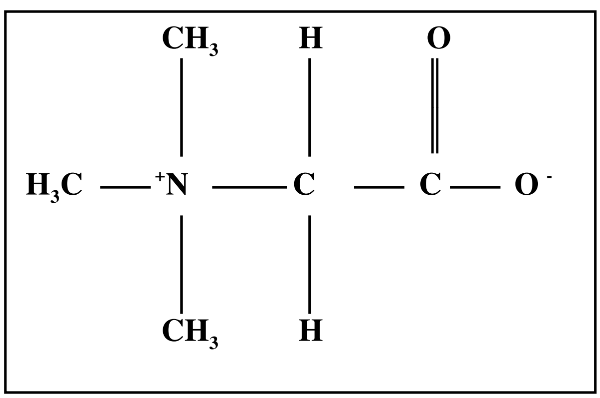

Figura 2. Estructura química de la betaína.

2.5.3. Glicina

La glicina es el principal neurotransmisor inhibidor en la médula espinal y es el aminoacido más simple con un peso molecular de 74 Da (Figura 3). Además, la glicina cuyo nombre deriva de su sabor dulce, es el único aminoácido común que no tiene un carbono asimétrico. La glicina es el aminoacido que induce un comportamiento alimenticio en decápodos similar al obtenido con un extracto de la almeja de cuello corto (Lee y Meyers, 1997). Zimer-Faust (1987) menciona que es el aminoacido más estimulante para *Panulirus*, *Cancer*, *Pleuroncodes* y *Gnahophausia*.

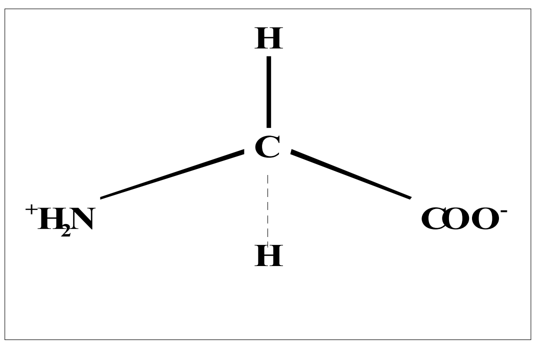

Figura 3. Estructura química de la glicina.

2.5.4. Ácido Glutámico

El ácido glutámico es un aminoacido polar (Figura 4) presente en las proteínas de origen animal, (Masterton *et al.* 1981), que no es esencial en dietas para los camarones según Guillaume (1997). Es el componente principal de las algas rojas y otras algas, y se encuentra en concentración de 10^{-4} a 10^{-3} moles.100 g^{-1} de peso seco. Se encuentra en medianas concentraciones (3 a 16 $mM.kg^{-1}$ peso húmedo) en 2 especies de crustáceos y 4 de moluscos según análisis realizados por Carr *et al.* (1996). Así también, algunos invertebrados y peces lo contiene, pero no en concentraciones altas; con un peso molecular de 146 Da es el más pesado de los cuatro aminoácidos evaluados (Guillaume, 1997). Inclusive, es el aminoacido más estimulante para los crustáceos *Pagurus* y *Podochela* (Zimmer-Faust, 1987).

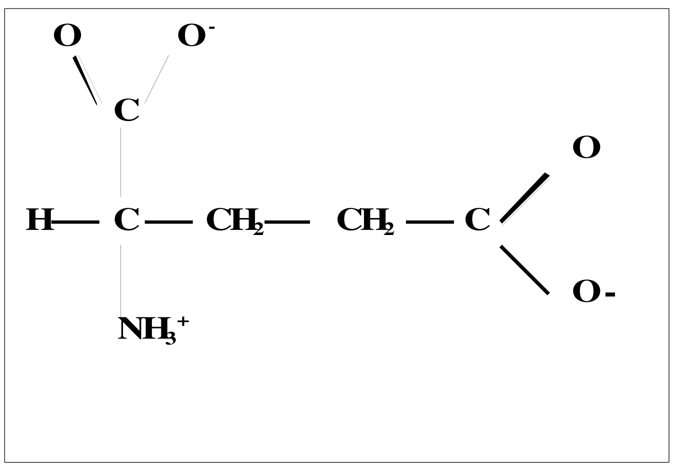

Figura 4. Estructura química del ácido glutámico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PROCEDENCIA DE LOS ANIMALES

Camarones reproductores *Litopenaeus vannamei* provenientes de una selección genética, (generación F1) con peso promedio en machos de 31.4 ± 2.9 g y hembras 36.1 ± 4.3 g fueron obtenidos de la camaronera Expofruto ubicada en Engunga, Provincia del Guayas. En la camaronera, dos grupos de 90 machos y 90 hembras fueron colocados individualmente en tubos de PVC (5x25 cm, diámetro x largo) cerrados con malla y transportados en dos tanques de dos toneladas hasta el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) en San Pedro de Manglaralto, Provincia del Guayas. El agua de mar en los tanques transportadores se mantuvo a 28.9 ups de salinidad, 34 ºC y 14 ppm de oxígeno disuelto medido con oxigenometro YSI-85. En las instalaciones del CENAIM, se transfirieron los camarones a dos tanques de 20 toneladas en el área de maduración donde los camarones fueron aclimatados hasta alcanzar una salinidad y temperatura de 35 ups y 30ºC, respectivamente en un período de 10 horas. Los camarones fueron alimentados por 2 semanas con un alimento comercial marca Ziegler para reproductores (40 % de proteína, 4 % de fibra cruda, 9 % de grasa cruda, 15 % de ceniza y 12 % de humedad). El alimento fue suministrado a razón del 5% de la biomasa en dos raciones por día (12h00 y 20h00). Un fotoperíodo de 14h luz:10h oscuridad y un recambio de agua entre 200-300%, 30ºC de temperatura y 35 ups de salinidad fueron mantenidos.

3.2. DESCRIPCIÓN DEL SET EXPERIMENTAL

Todos los ensayos biológicos fueron realizados en el set experimental. Este set consiste de 4 tanques ovalados de 8 toneladas cada uno, dvididos en 4 subunidades o compartimentos de 2 toneladas cada uno. Los tanques del set experimental fueron utilizados para los ensayos de a)dos horarios de alimentación, b)tasa de ingestión y tiempo de atracción con discos de agar y c)tasa de ingestión y eficiencia de asimilación con dietas artificiales. Cada tanque y cada compartimento del mismo tenía flujo independiente de agua y aire. La columna de agua fue de 0.15 m y el área de cada compartimiento fue de 1.96 m^2 . Para la iluminación de la sala experimental fueron usados focos de luz amarilla de 100 vatios que daban una intensidad lumínica entre 60 y 100 lux, medido con luxometro Yokogawa 3281. El fotoperíodo fue ajustado a 14h luz:10h oscuridad y el recambio diario de agua entre 80-120%. A continuación se muestra un tanque del set experimental (Figura 5).

Figura 5. Tanque con 4 compartimientos independientes utilizado para evaluación de la tasa de ingestión y tiempo de respuesta a la presencia de los atractantes por parte de los reproductores de *Litopenaeus vannamei*.

3.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.3.1. Evaluación de dos horarios de alimentación

La tabla 2 muestra el diseño experimental para determinar el horario de alimentación entre las 12h00 y 20h00 donde el camarón tiene una mayor tasa de ingestión, tal como ha sido reportado para el juvenil *Litopenaeus vannamei* (Molina *et al.* 2000). Los camarones fueron seleccionados aleatoriamente y distribuidos individualmente por compartimento. Macho y hembra fueron evaluados independientemente en ambos horarios de alimentación durante los 5 días del experimento. El número de réplicas por tratamiento fue 4 por cada sexo. Mediante observación de los urópodos en un estereomicroscopio con aumento de 10X se seleccionaron camarones en estadío intermuda (Cadena, 2000; Chan *et al.* 1988), por ser el estadío donde se ha observado el mayor consumo de alimento (Molina *et al.* 2000). Seguidamente, cada camarón secado con papel toalla, fue pesado en una balanza Shimadzu EB-3200D de 0.01g de precisión y transferido a uno de los 4 compartimientos del tanque experimental (Figura 5). El alimento utilizado fue la dieta comercial marca Ziegler para reproductores (literal 3.1.) a razón de 10 % de la biomasa diaria proporcionado en dos raciones durante 3 días consecutivos. Dos horas después de cada alimentación, el alimento no consumido fue colectado en malla metálica de 700 µm mediante sifoneo y secado a 60 ºC por 24 horas en estufa Isuzu-Seisakusho modelo MNS-115S (Romero y Diaz, 1987). La materia seca resultante fue pesada en una balanza analítica Mettler AE240 de 0.0001g de precisión y el porcentaje de alimento consumido fue determinado mediante la siguiente fórmula propuesta por Takeuchi (1988) y Hartati y Briggs (1993):

$$\text{Tasa de Ingestión} = \frac{AI}{((Po+Pf)/2)*d} * FC * 100$$

Donde

AI = Alimento ingerido (g) = Alimento suministrado (g) – Alimento no consumido (g)

Po = Peso inicial (g) del camarón

Pf = Peso final (g) del camarón

d = días (d)

FC = Factor de corrección

La temperatura, salinidad y oxígeno disuelto del agua de los compartimientos fueron 28.0 ± 0.5 º C, 35.9 ± 0.2 ups, 5.7 ± 0.2 ppm, respectivamente.

Tabla 2. Diseño experimental con camarones reproductores distribuidos individualmente y separados por sexo en dos horarios de alimentación (12h00 y 20h00). Los camarones fueron mantenidos en ayuno por 48 h. Símbolos iguales (* o +) en la misma fila significa que el ensayo fue realizado consecutivamente.

Sexo	Horario de alimentación	
	12h00	20h00
Macho	*	*
Hembra	+	+

3.3.2. Determinación de la tasa de ingestión y tiempo de atracción con discos de agar

3.3.2.1. Diseño experimental y condiciones del ensayo

Los discos de agar fueron preparados al 1.5% (p/v) de agar de acuerdo a Holland y Borski (1993). Para formar el disco de agar, se prepararon dos soluciones, una de agar (marca Difco) y otra de atractantes (marca Sigma). Para la solución de agar, 3 g de agar fueron disueltos en 130 ml de agua destilada mediante agitación continua y calentamiento hasta alcanzar 70 ºC. Para la solución de atractante, 3 g de atractante fueron disueltos en 70 ml de agua destilada a temperatura ambiente. En el caso del ácido glutámico, se disolvió en agua acidulada al 2% con ácido clorhídrico y seguidamente fue llevado a pH 7 mediante la adición de hidróxido de sodio en pelets. El control negativo sólo contuvo agua destilada en sustitución de la solución con el atractante. El control positivo fue un extracto de calamar realizado mediante el procedimiento modificado a partir de Takaoka *et al*. (1995) donde 100 g de calamar (*Loligo* sp) congelado fue homogenizado con 50 ml de agua desionizada a baja velocidad por 1 minuto en una licuadora Oster®. El homogenizado de calamar fue centrifugado a 10000 x g (47500 rpm) por 20 minutos a 4ºC. El líquido sobrenadante fue mantenido a –20ºC hasta su utilización y empleado como control positivo. Todos los atractantes (sintéticos y naturales) fueron añadidos hasta alcanzar el 1.5% (p/v) en el agar (Deshimaru y Yone, 1978).

Una vez preparadas las soluciones de agar y la del atractante, ambas fueron mezcladas a 45ºC y el pH fue medido utilizando el potenciómetro HM-5S, pero no ajustado a 7. Previa solidificación el agar fue vaciado en tubos cortos de PVC (Cloruro de Polivinilo) que fueron usados como moldes para obtener discos de 2 cm de alto y 3 cm de diámetro. Posteriormente, el disco de agar fue puesto sobre un pedazo de madera atravesado por un clavo con un peso para evitar la flotación del mismo (Figura 6).

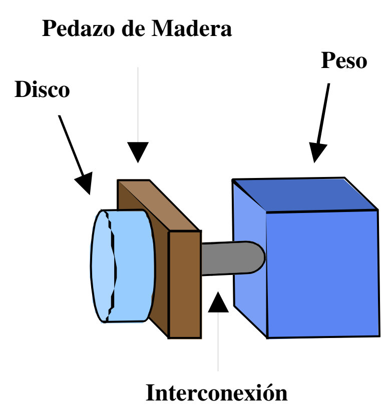

Figura 6. Diagrama de aparato sujetador para disco de agar.

En el ensayo con discos de agar fueron evaluados los camarones individualmente y en grupo (3 camarones) de forma independiente y con los 9 tratamientos (7 tratamientos con atractantes sintéticos y 2 tratamientos fueron control negativo y positivo). Los 7 tratamientos con atractantes sintéticos fueron taurina, betaína, glicina, ácido glutámico, taurina:glicina, betaína:glicina y ácido glutámico:glicina. En los tratamientos donde habían 2 atractantes combinados, éstos fueron adicionados en una relación 1:1. En los experimentos evaluando 1 camarón y 3 camarones, un solo disco de agar fue utilizado por réplica y por tratamiento. Adicionalmente, en el experimento evaluando 3 camarones fue añadido 1 ml de solución atractante (1.5% p/v) por gravedad mediante pipeta serológica colocada a un costado del disco de agar para incrementar la respuesta alimenticia. Reproductores machos y hembras en intermuda de 32.6 ± 2.5 g y 36.7 ± 3.8 g respectivamente, fueron utilizados para esta prueba, donde las condiciones físicoquímicas fueron temperatura de 26 a 27ºC, oxígeno disuelto > 5 ppm y salinidad de 35 a 37 ups medidas con el oxigenometro YSI-85. El diseño experimental se muestra en la Figura 7. El horario único de evaluación de la tasa de ingestión y el tiempo de atracción fue a las 20h00.

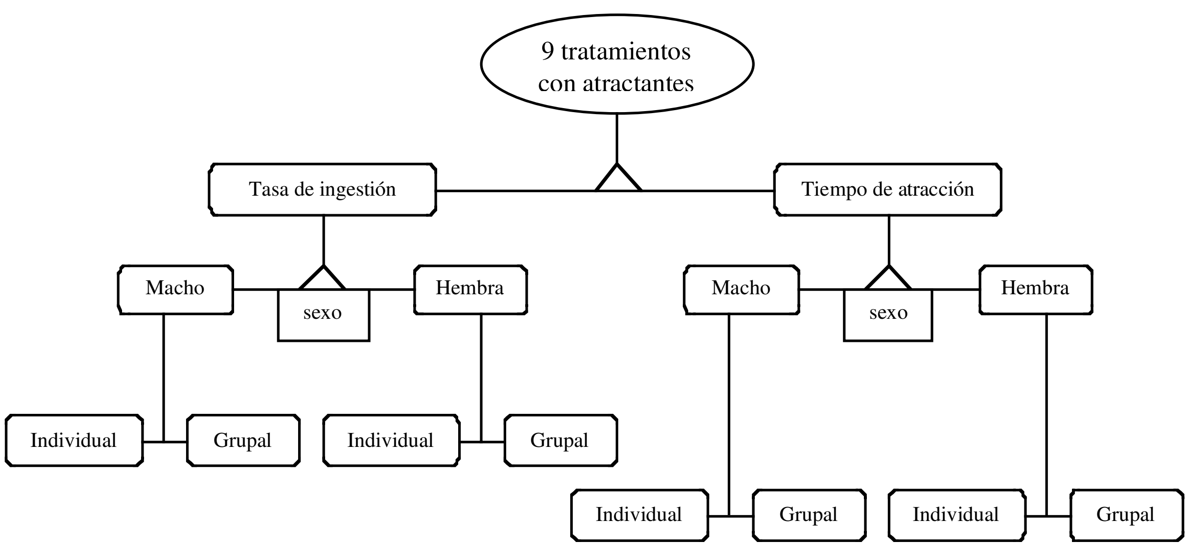

Figura 7. Diseño experimental de bioensayo con discos de agar y reproductores en estadio de intermuda distribuidos individualmente y en grupo donde se midió la tasa de ingestión y el tiempo de atracción, luego de 48 horas de ayuno.

3.3.2.2. Tasa de ingestión utilizando discos de agar

La tasa de ingestión fue determinada mediante la fórmula descrita previamente en el literal 3.3.1. El disco de agar (con el tratamiento atractante) sumergido en la columna de agua fue extraído y pesado después de 2 y 12 hrs de haber sido introducido en el agua y secado utilizando papel toalla. En ausencia de camarones y para ambos tiempos de inmersión, un factor de corrección por pérdidas de peso del disco de agar en el agua de mar fue calculado. Mientras que el camarón presentaba su comportamiento alimenticio sobre el disco de agar, los flujos de agua y aire fueron suspendidos durante las primeras 2 horas y restablecido el de aire durante el resto de experimento. Como controles negativo y positivo fueron agua destilada y extracto de calamar, respectivamente.

3.3.2.3. Tiempo de atracción utilizando discos de agar

Los camarones fueron filmados mediante cámara de video Sony Digital 8 modelo DCR-TRV510, en módulo de filmación nocturna. Para determinar el tiempo de reacción ante la presencia del atractante, se filmaron los camarones por 30 minutos desde la exposición al disco de agar y/o la solución atractante. El tiempo de atracción fue medido desde la inclusión de disco de agar hasta el primer arribo alimenticio de al menos un camarón.

Cuando el camarón no mostró atracción durante el período de grabación se consideró un valor de 1800 segundos que fue el tiempo máximo de videograbación (30 minutos). La videograbación de las 4 réplicas de cada tratamiento fue consecutiva.

3.3.3. Determinación de la tasa de ingestión y eficiencia de asimilación de dietas artificiales

3.3.3.1. Diseño experimental y condiciones de ensayo con dietas artificiales

La dieta fue formulada en base a la utilizada por Hartati y Briggs (1993) pero empleando la premezcla de vitaminas y minerales de Wouters (2001) para reproductores (Tabla 3). La mezcla de ingredientes fue realizada de menor a mayor porcentaje, con el fin de obtener la mayor homogeneidad posible. Posteriormente, se añadió el agua destilada (400-500 g/kg) a temperatura ambiente, y se mezcló hasta formar una masa pastosa que fue pasada por un molino de carne LIEME Serie 2062 obteniéndose pelets de 2 mm de diámetro y 10 cm de largo. Inmediatamente, los pelets fueron colocados sobre bandejas de malla de aluminio para ser precocidos a 90ºC por 8 minutos en un secador vertical Isuzu modelo 2-2132, para seguidamente secarlos a 60 ºC por aproximadamente 3 a 5 horas en una estufa Isuzu-Seisakusho modelo MNS-115S. Por último, cada dieta fue cortada en pedazos de 2 cm y colocada en funda plástica con cierre hermético y refrigerada a 5ºC.

Las condiciones fisicoquímicas del ensayo fueron temperatura de 25 a 27ºC, oxígeno disuelto > 5 ppm y salinidad de 35 a 36 ups y un recambio de agua de 200%. Los reproductores fueron seleccionados en estadio de intermuda con un peso promedio de 35.5 ± 3.5g y 38.3 ±

4.1g para machos y hembras, respectivamente. En este bioensayo fueron distribuidos 4 camarones por compartimento y se realizaron 4 réplicas por tratamiento. Los 4 tratamientos evaluados fueron betaína, taurina:glicina, control negativo (α-celulosa) y positivo (extracto de calamar) y el porcentaje de inclusión del atractante en la dieta fue 1.5% (p/v) por tratamiento.

Tabla 3. Dieta base para bioensayo de tasa de ingestión y eficiencia de asimilación.

INGREDIENTE	% PESO SECO
Caseína (Libre de vitaminas)[a]	42.5
Gelatina[b]	14.0
Dextrina[c]	22.4
Astaxantina[d]	0.1
Premezcla de Vitaminas [a,e]	2.0
Premezcla de Minerales[f, i]	2.0
Aceite de Pescado[g]	6.0
Lecitina[g]	3.0
Colesterol[h]	0.5
α-Celulosa[a]	6.0
Atractante[a]/α-Celulosa[a]	1.5

[a]Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA
[b]Gel'hada Quito, Ecuador
[c]Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Japon
[d]NatuRose™ (2 % Astaxantina)
[e]Premezcla vitamínica (mg*kg dieta^{-1}): ácido ascórbico, 2857; biotina, 5; pantotenato de Ca, 500; calciferol (D3), 12.7; Colina, 3500; cianocobalamina (B12), 0.3; ácido fólico, 15; inositol, 4000; menadiona (K3), 40; niacina, 750; ácido benzoico *p*-amino, 100; piridoxina HCl, 120; riboflavina, 200; tiamina, 120; vitamina A palmitato, 67; acetato de alfa-tocoferol, 1831.5; α-celulosa, 5882.
[f]Premezcla de minerales (mg* kg dieta^{-1}): cloruro de cobalto, 0.456; sulfato de cobre, 7.700; citrato de hierro monohidratado, 681.074; KH_2PO_4, 7998; sulfato de manganeso monohidratado, 44.768; fosfato de sodio, 6258; selenito de sodio, 0.249; sulfato de zinc heptahidratado, 577.03; α-celulosa, 4432.
[g]ALIMENTSA, Guayaquil, Ecuador
[h]Prilabsa, Guayaquil, Ecuador
[i]Spectrum Chemical MFG Gadema, California, USA.

Al igual que el bioensayo con discos de agar, los camarones fueron mantenidos en ayuno por 48 horas. Cada uno de los 4 tratamientos atractantes fueron evaluados en tres niveles:

machos, hembras y combinación machos:hembras (1:1). Así mismo, fueron evaluadas la tasa de ingestión y la eficiencia de asimilación para los tratamientos en sus tres niveles. El diseño experimental de este bioensayo se observa en la Figura 8.

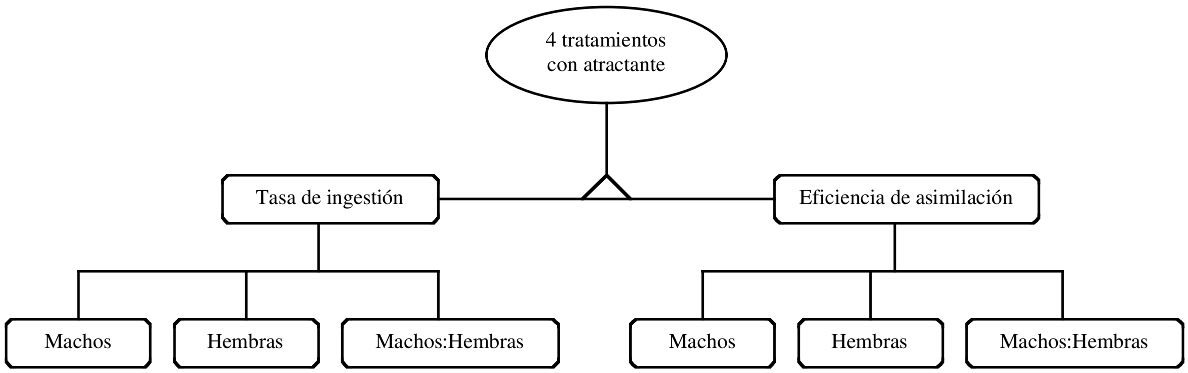

Figura 8. Diseño experimental de camarones reproductores distribuidos en grupo de 4 con dietas artificiales en tres niveles, mantenidos en ayuno por 48 h. Se evaluaron la tasa de ingestión y la eficiencia de asimilación durante 5 días del ensayo.

3.3.3.2. Determinación de la tasa de ingestión y eficiencia de asimilación de dietas

En las pruebas de ingestión y asimilación fueron suspendidos la aireación y el flujo de agua durante los períodos de consumo de alimento peletizado, recolección de alimento no consumido y de heces. La recolección de alimento no consumido y de heces fueron realizados 1.5 y 3 horas después de la inmersión del pelet al agua, respectivamente. La recolección, secado y pesado de alimento no consumido y heces fue realizada siguiendo el procedimiento de Romero y Diaz (1987), la tasa de ingestión fue calculada mediante la fórmula descrita previamente (literal 3.3.1.) y ajustando con anterioridad la pérdida de materia seca por dieta mediante el análisis de estabilidad (literal 3.4.). La eficiencia de asimilación fue calculada con la siguiente fórmula propuesta por Romero y Diaz (1987):

$$EA = \frac{AI - HP}{AI} * 100$$

Donde

EA = Eficiencia de Asimilación

AI = Alimento Ingerido (g) por camarones

HP = Heces producidas (g) por camarones

Durante los días del bioensayo, la dosificación de alimento fue realizada una vez por día, a las 20h00, a un porcentaje de biomasa del 10%.

3.4. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD

La estabilidad de las dietas del bioensayo anterior (literal 3.3.3.) fue evaluada de acuerdo con lo descrito por Obaldo *et al*. (2002). El método de estabilidad empleado fue el de agitación horizontal mediante la utilización de un termoagitador EYELA NTS-120 ajustado a 70 rpm y 28ºC. En cada frasco de 250 ml fue vertido 100 ml de agua de mar a 35 ups y 2 g de alimento peletizado. Los tiempos de lixiviación medidos fueron 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. Después del período de agitación respectivo, el contenido del frasco fue extraído y filtrado en papel Whatman No. 3 (5 µm) usando un aparato Buchner de filtración y una bomba de vacío Millipore. Los sólidos colectados fueron secados en una estufa a 60 ºC por

24 horas. La estabilidad fue realizada por triplicado y expresada como porcentaje de materia seca retenida.

La determinación de humedad realizada por triplicado, consistió en pesar una muestra de 2.5 g de dieta pulverizada (500 µm) en una cápsula de aluminio. Una vez secada a 105 ºC por 2 horas, la muestra fue enfriada en un desecador y pesada en balanza analítica. La muestra fue nuevamente secada en la estufa por 30 minutos y pesada para verificar que no existió una variación mayor de 0.002 g entre el 1^{er} y 2^{do} peso. En caso contrario, se volvió a repetir este procedimiento.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron verificados por las pruebas de Lilliefor y Bartlett para determinar distribuciones normales y homogeneidad de varianza, respectivamente. Una vez que los datos pasaron estas pruebas fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). En caso de obtener diferencias significativas ($\propto = 0.05$) entre tratamientos, los datos fueron analizados mediante la prueba de Fisher o también conocido como método de la mínima diferencia significativa, para comparaciones múltiples. En todos los ensayos, los reproductores fueron distribuidos en forma de bloque completamente aleatorizado. Solamente en el bioensayo de evaluación de dos horarios de alimentación (literal 3.3.2.), se utilizó una prueba de t-student. Los datos de tasa de ingestión de disco de agar (literales 3.3.3 y 3.3.4.) debido a la falta de homogeneidad de varianzas fueron analizados por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y en caso de encontrarse diferencias significativas, la prueba de Dunn para comparaciones múltiples fue realizada. El tiempo de atracción fue transformado mediante raíz cuadrada debido a su falta de normalidad en su distribución y homogeneidad de varianzas. En el bioensayo de las dietas con los mejores atractantes/estimulantes (literal 3.3.5.), se realizó un ANOVA de dos vías (atractante y sexo). Los análisis estadísticos se efectuaron a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ utilizando los paquetes estadísticos Data Desk (6.1, Ithaca, EU, 1997) y Statistica (Statsoft, EU, 1994).

4. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE DOS HORARIOS DE ALIMENTACIÓN

De los dos horarios evaluados (12h00 y 20h00), las 20h00 se registró un significativo ($p<0.05$) mayor consumo de alimento que el de medio día tanto para machos como para hembras (figura 9). No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en consumo de alimento entre sexos.

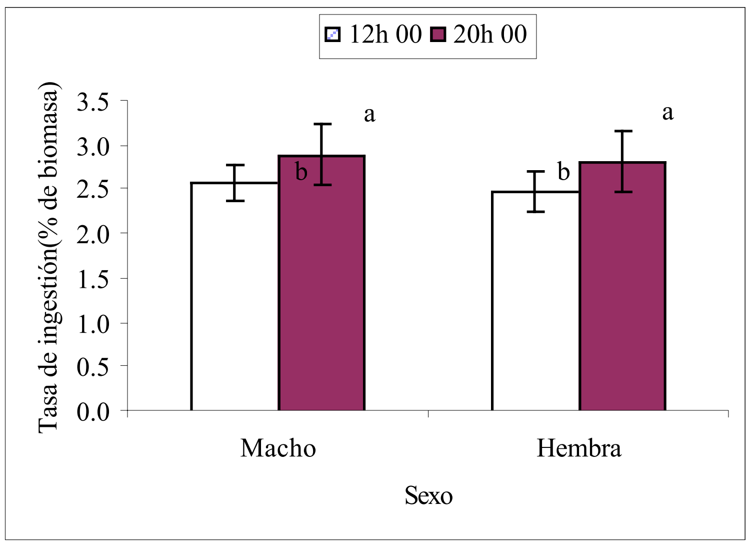

Figura 9. Tasa de ingestión (expresada como % de la biomasa alimentada) promedio de 3 días consecutivos de alimentación a reproductores *Litopenaeus vannamei* para machos como hembras después de 24 horas de ayuno.

4.2. BIOENSAYOS CON DISCOS DE AGAR

Los discos de agar con atractante pesaron de 10 a 16 g y presentaron un rango de pH de 5.5 a 8.5. Los factores de corrección en la tasa de ingestión causado por la pérdida de sólidos del agar al medio marino fue de 0.9984 y 0.9920 a las 2 horas y a las 12 horas, respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) de consumo entre macho y hembra en la estimación de la tasa de ingestión (literal 4.2.1.), ni en tiempos de atracción (literal 4.2.2.).

4.2.1. Estimación de la tasa de ingestión

De los estimulantes evaluados en los discos de agar, aquellos con las más altas tasas de ingestión fueron betaína y taurina-glicina tanto individual como colectivamente (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Tasa de ingestión (expresado como % de biomasa alimentada) de discos de agar obtenida con los camarones mantenidos individualmente después de 2 y 12 hrs. Los valores son porcentajes promedio ± desviación estándar del consumo de reproductores macho y hembra de *L. vannamei*, por que no presentaron diferencias significativas (P>0.05) por sexo (Valores con letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente (p<0.05)).

Tratamiento	Tasa de Ingestión (% biomasa) después de 2 Horas	12 Horas
Taurina	0.524 ± 0.179^{b}	0.713 ± 0.203^{b}
Betaína	0.748 ± 0.122^{c}	1.859 ± 0.333^{c}
Glicina	0.433 ± 0.282^{b}	1.060 ± 0.706^{b}
Ácido Glutámico	0.499 ± 0.137^{b}	0.697 ± 0.489^{b}
Taurina : glicina	0.777 ± 0.288^{c}	1.662 ± 1.457^{c}
Betaína : glicina	0.613 ± 0.167^{b}	1.245 ± 0.233^{b}
Ácido Glutámico : glicina	0.409 ± 0.219^{b}	0.965 ± 0.360^{b}
Control Negativo	0.047 ± 0.066^{a}	0.105 ± 0.063^{a}
Control Positivo	0.488 ± 0.358^{b}	0.724 ± 0.282^{b}

Tabla 5. Tasa de ingestión (expresada como % de biomasa alimentada) de disco de agar obtenida con los camarones mantenidos 3 por compartimiento después de 2 y 12 hrs. Los valores son porcentajes promedio ± desviación estándar del consumo de reproductores machos y hembras de *L. vannamei*, por que no presentaron diferencias significativas (P>0.05) por sexo. (Valores con letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente (p<0.05)).

Tratamiento	Tasa de Ingestión (% biomasa) después de	
	2 Horas	12 Horas
Taurina	0.302 ± 0.130^{cd}	0.463 ± 0.0872^{cd}
Betaína	0.441 ± 0.123^{de}	1.008 ± 0.299^{f}
Glicina	0.242 ± 0.200^{bc}	0.355 ± 0.214^{bc}
Ácido Glutámico	0.382 ± 0.139^{cde}	0.516 ± 0.148^{cd}
Taurina : glicina	0.405 ± 0.091^{de}	0.785 ± 0.139^{ef}
Betaína : glicina	0.440 ± 0.126^{de}	0.593 ± 0.135^{de}
Ácido Glutámico : glicina	0.116 ± 0.104^{ab}	0.204 ± 0.100^{ab}
Control Negativo	0.043 ± 0.067^{a}	0.123 ± 0.049^{a}
Control Positivo	0.516 ± 0.309^{e}	1.004 ± 0.520^{f}

4.2.2. Determinación del tiempo de atracción

Los mejores atractantes fueron considerados a aquellos que provocaron la llegada más rápida de los camarones a la fuente alimenticia por efecto de quimiorrecepción. En la videograbación individual, el mejor resultado de atracción y el menor tiempo de llegada del crustáceo a la fuente atractante fue obtenido por el control positivo (extracto de calamar), mientras que en los demás tratamientos no fueron observadas diferencias significativas (Figura 10).

Sólo en la videograbación colectiva fue posible encontrar diferencias entre los tratamientos dietéticos evaluados. Los mejores 4 atractantes para reproductores de *Litopenaeus vannamei* fueron taurina, betaína y glicina junto con el control positivo dieron estadísticamente ($p<0.05$) el tiempo de respuesta más corto comparado con el resto de los tratamientos. Las mezclas binarias de betaína:glicina y taurina:glicina, no tuvieron un tiempo de atracción significativamente menor ($p>0.05$) que los anteriores atractantes. Aquellos tratamientos que presentaron el menor poder atractante (mayor tiempo de atracción) fueron el ácido glutámico, ácido glutámico:glicina y el control negativo (Figura 11).

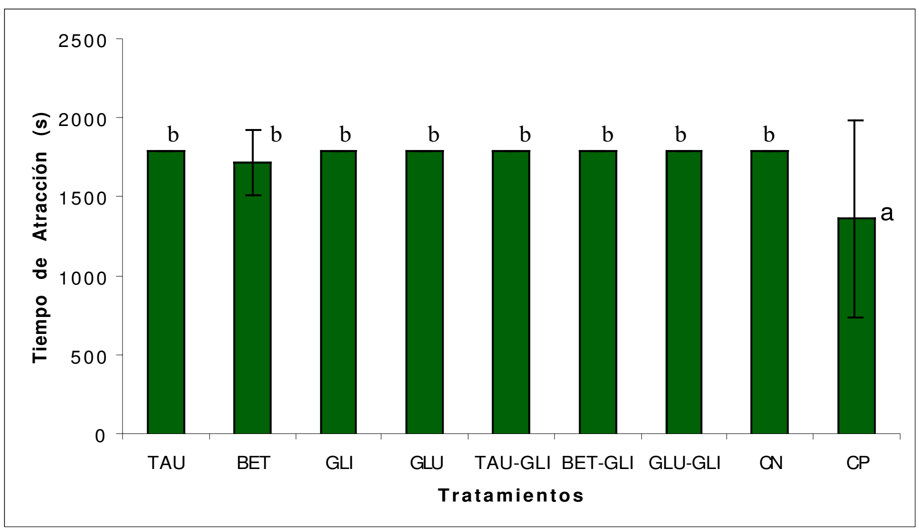

Figura 10. Tiempo de atracción (expresado en segundos hasta primer arribo alimenticio) de disco de agar obtenido con camarones reproductores mantenidos individualmente por compartimiento después de 48 horas de ayuno. El tiempo de atracción medido es un valor promedio de macho y hembra, por que no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) por sexo.

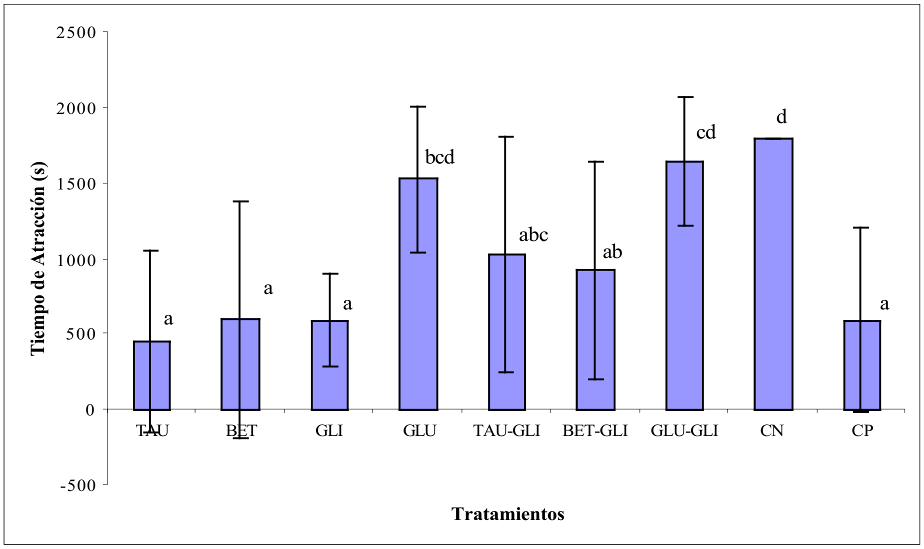

Figura 11. Tiempo de atracción (expresado en segundos hasta primer arribo alimenticio) de disco de agar obtenido con camarones reproductores mantenidos tres por compartimiento después de 48 horas de ayuno. El tiempo de atracción medido es un valor promedio de machos y hembras, por que no presentaron diferencias significativas por sexo (P>0.05).

4.3.DETERMINACIÓN DE LA TASA DE INGESTIÓN Y EFICIENCIA DE ASIMILIACIÓN CON DIETAS

Del bioensayo con disco de agar tanto individual como grupal (literal 4.2.), se seleccionaron dos quimioatractantes por su mayor tasa de ingestión y menor tiempo de atracción de los camarones hacia la fuente alimenticia. Los mejores activadores del comportamiento alimenticio completo (atracción, incitación y estimulación) fueron taurina:glicina y betaína (Tabla 4 y 5 y Figura 11).

En el ensayo con reproductores de ambos sexos (proporción 1:1), la dieta de control positivo fue estadísticamente la más consumida, seguida por las dietas con taurina:glicina y betaína sin presentar entre ambas diferencias significativas ($p>0.05$). Mientras que el control negativo fue significativamente ($p<0.05$) la menos consumida (Tabla 6).

Tabla 6. Tasa de ingestión (expresada como % de biomasa alimentada) de dietas obtenida con 4 camarones por compartimiento, por 48 horas en ayuno y alimentados por 3 días consecutivos. Los valores son porcentajes promedio ± desviación estándar del consumo de reproductores de *L. vannamei* (Valores de letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ($p<0.05$)).

Tratamiento	Machos:Hembras (1:1)	Machos	Hembras
Control Positivo	3.9 ± 0.8^{a}	3.6 ± 0.9^{a}	3.8 ± 0.8^{a}
Taurina : Glicina	3.2 ± 0.6^{b}	3.4 ± 0.6^{a}	3.2 ± 0.7^{b}
Betaína	3.1 ± 1.1^{b}	2.3 ± 0.3^{b}	2.7 ± 0.4^{c}
Control Negativo	1.8 ± 0.3^{c}	2.0 ± 0.4^{b}	1.7 ± 0.4^{d}

Tabla 7. Eficiencia de asimilación (expresada como % de alimento consumido) de dietas obtenida con 4 camarones por compartimiento, por 48 horas de ayuno y alimentados por 3 días consecutivos. Los valores son porcentajes promedio ± desviación estándar de reproductores de *L. vannamei* (Valores de letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ($p<0.05$)).

Tratamiento	Machos : Hembras (1:1)	Machos	Hembras
Control Positivo	93.3 ± 1.7^{a}	92.4 ± 1.7^{a}	93.6 ± 2.3^{a}
Taurina : Glicina	91.8 ± 2.3^{a}	94.1 ± 0.6^{a}	94.2 ± 2.7^{a}
Betaína	95.0 ± 2.2^{a}	93.3 ± 3.3^{a}	93.2 ± 2.5^{a}
Control Negativo	87.4 ± 7.7^{b}	93.1 ± 1.9^{a}	90.4 ± 4.5^{b}

Por otro lado, en el ensayo con reproductores de ambos sexos, las dietas de control positivo, taurina:glicina y betaína, no presentaron diferencia significativa entre ellas ($p>0.05$), pero tuvieron una eficiencia de asimilación significativamente mayor ($p<0.05$) al control negativo (Tabla 7).

En este bioensayo (literal 4.3.), el análisis estadístico de los datos reveló que las variables: tasa de ingestión y eficiencia alimenticia fueron dependientes de los factores: tratamiento y sexo. En los subsiguientes bioensayos, los camarones tuvieron un comportamiento diferenciado por sexo. En los machos, las dietas con extracto de calamar (control positivo) y taurina:glicina fueron significativamente las más consumidas ($p<0.05$), a diferencia de las dietas con betaína y α-celulosa (control negativo) que dieron la más pobre respuesta y no presentaron diferencias estadísticas entre ambas. Los machos ingirieron al menos 1.5% más balanceado cuando contenía taurina:glicina que el considerado como control negativo (Tabla 6).

En tanto que en hembras el efecto de los distintos tratamientos dietéticos fue más evidente. La dieta control positivo fue significativamente ($p<0.05$) las más consumida, seguidas por las demás en el siguiente orden: CP>Tau-Gli>Bet>CN (Tabla 6).

En términos de eficiencia de asimilación de las dietas, ésta de acuerdo al género. En machos no se encontró diferencias significativas ($p>0.05$) por efecto de la variable tratamiento a diferencia de las hembras que presentaron estadísticamente la menor eficiencia de asimilación con la dieta control negativo (Tabla 7).

4.4. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD

Siguiendo la prueba de estabilidad según Obaldo *et al.* (2002), lás pérdidas de materia seca fueron de 8.0 a 8.5% a las 3 horas en el agua salada (Figura 12). Las dietas contenían entre 9 y 11 % de humedad.

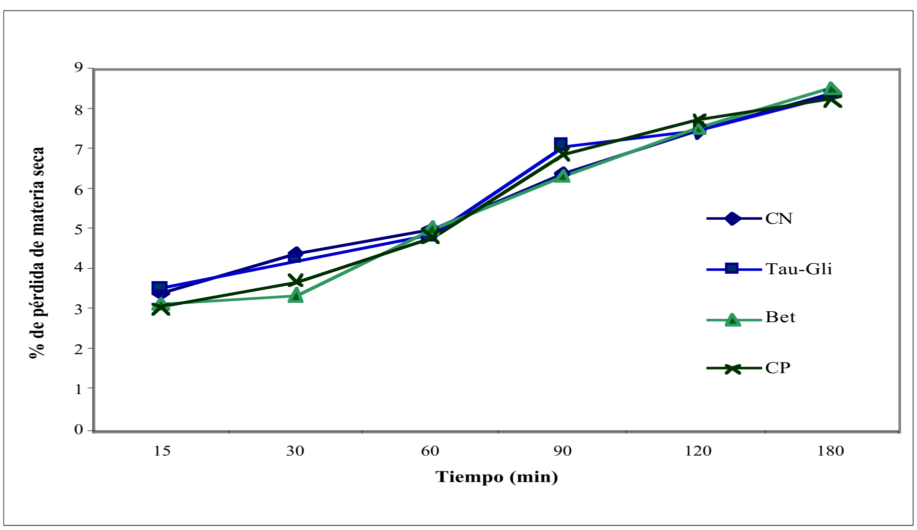

Figura 12. Pruebas de porcentaje de pérdida de materia seca.

5. DISCUSIÓN

Los procesos de quimiorrecepción juegan un papel clave para la alimentación de los crustáceos marinos. Desde los años 60's, múltiples ensayos han sido realizados para evaluar los estimulantes químicos y naturales tanto en dietas como en soluciones para hacer más eficientes y palatables las dietas para acuicultura (Cowey y Tacon, 1981; Taki *et al.* 1986; Anggawati, 1992; Hartati y Briggs, 1993; Holland y Borski, 1993; Guerin, 1998). Estos estimulantes naturales adicionados en dietas artificiales para reproductores de camarón han logrado sustituir parcialmente con éxito al alimento fresco (Wouters, 2001;Perez-Velazquez *et al.* 2002). Sin embargo los ingredientes de origen animal marino se siguen utilizando en un alto porcentaje en alimentos artificiales porque no se han encontrado quimioestimulantes purificados que al añadirlos en dietas secas, induzcan el mismo comportamiento alimenticio que los ingredientes originales.

Previo a la evaluación en este estudio de los atractantes/estimulantes se estimó si durante el día o la noche se produce el mayor consumo de alimento así como también si dejar de alimentar por 2 días consecutivos se incrementaba el estímulo alimenticio comparado con 1 día de ayuno. De los resultados observados, los camarones reproductores en ambos sexos consumen más alimento en el horario nocturno que el diurno (Figura 9), un comportamiento similar fue reportado por Hill y Wassenberg (1987) quienes mencionan que la alimentación de adultos de *Penaeus esculentus* ocurre antes y después de la medianoche. Esto puede ser consecuencia del aumento de la actividad enzimática después de 2-3 h de anochecer tal como ha sido observado por Cuzon *et al*. (1982) en *Marsupenaeus japonicus*. Estos autores señalan que el mejor crecimiento del camarón se da cuando es alimentado en ese momento del día. Además, Hill (1985) observó que la mayor parte de la actividad de los camarones peneidos ocurre en la noche. En base a esta evaluación en los siguientes bioensayos, los reproductores fueron alimentados únicamente en el horario nocturno de las 20h 00.

Por otro lado, en un estudio llevado a cabo para determinar el efecto del tiempo de ayuno fisiológico sobre la conducta alimenticia (información no publicada) fue observado que los animales ingieren más alimento y con mayor avidez cuando son mantenidos en ayuno por 48 h que aquellos privados de alimento por 24 h. Zimmer-Faust (1987) corrobora que la selectividad del alimento podría disminuir con el incremento de la privación de alimento, sólo si la capacidad de reconocer el alimento disponible es modificado por el nivel de hambre en el crustáceo. De ahí que los camarones que se han mantenido en ayuno por más de 24 horas tienen un incremento de la actividad locomotora como ha sido notado por Hill y Wassenberg (1987). Adicionalmente, Carr *et al*. (1984) mencionan que la efectividad aparente de los estimulantes alimenticios utilizados en su estudio, se incrementa con la prolongación del período de ayuno. En crustáceos como *Palaemonetes pugio* y *P. monodon*, mantenidos en ayuno por 48 horas no se observó que afectara su comportamiento alimenticio (Carr *et al*. 1984; Hartati y Briggs, 1993). Incluso, Harpaz y Steiner (1990) privaron por 4 días de alimento al langostino malayo *M. rosenbergii* sin observar efectos en la quimiorrecepción del crustáceo. Sin embargo, un período más prolongado de no alimentación (6 días) cambia el umbral de detección por contacto (estimulación) en otros crustáceos como la jaiba azul *Callinectes sapidus* (Pearson y Olla, 1977). Acorde con estos estudios, en los bioensayos realizados en el presente trabajo fue aplicado un período de ayuno no mayor de 48 horas con el fin de que no afecte los umbrales de detección a distancia ni de contacto.

5.1. BIOENSAYOS CON DISCO DE AGAR

Estudios de potenciales atractantes/estimulantes han sido desarrollados con éxito en peneidos y tilapia, utilizando el disco de agar como un medio adecuado para incorporar los compuestos de interés (Holland y Borski, 1993; Adams y Johnsen, 1986). Entre algunas de las ventajas que presentan el uso de discos de agar están el de ser fáciles de preparar y utilizar, carecer de compuestos que pueden interferir con las propiedades estimulantes o atractantes de los compuestos que se valoran y por que evitan pérdidas de concentración del atractante (termolábil) por efecto de la temperatura, al incorporárselo en el agar previa solidificación a temperatura ambiente. Además, a diferencia de las dietas artificiales, los discos de agar no presentan pérdidas de materia seca sino variaciones del contenido de humedad por efecto de la salinidad del agua en que se realizan los ensayos. Holland y Borski (1993) en su estudio con discos de agar, no mencionaron haber utilizado ningún factor para corregir un posible cambio de peso en el disco (hidratación o deshidratación). Por el contrario, Adams y Johnsen (1986) utilizando discos de agar obtuvieron un porcentaje de hidratación de 1-2% probablemente debido a que el ensayo con Tilapia fue realizado en agua dulce, mientras que el de Holland y Broski (1993) y el presente ensayo por haberse realizado en agua de mar donde hay alta concentración iónica, no se encontró diferencia significativa en el peso del disco. Ensayos con discos de agar en camarones reproductores son una metodología práctica y sencilla que permite evaluar los procesos de atracción y estimulación alimenticia.

Pocos son los experimentos que han mencionado el efecto de número de organismos sobre el comportamiento alimenticio utilizando atractantes. Nuestro estudio evaluó este factor con 1 y 3 camarones reproductores para verificar si se presentaba alguna diferencias en el tiempo de atracción o en la tasa de ingestión. La respuesta observada era ligeramente diferencial en el comportamiento alimenticio global y notoria en el tiempo de atracción. Sin embargo, Bórquez y Cerqueira (1998) observaron que los patrones de respuesta alimenticia fueron similares al utilizar un pez que dos peces. Posiblemente, la respuesta diferencial en este ensayo ocurrió debido la adición de una solución atractante en la prueba con 3 camarones que incrementó la concentración del atractante en el medio acuático. Posiblemente, el efecto de número de camarones en ensayos con atractantes no afecta su respuesta alimenticia, sin embargo posteriores investigaciones podrían aclarar este tema.

En crustáceos, el comportamiento alimenticio integral consiste de tres fases: Atracción (detección y movimiento hacia la fuente alimenticia), Inducción (primer consumo de la fuente alimenticia) y Estimulación (continuación del consumo de la fuente alimenticia). De las moléculas individuales evaluadas, la betaína fue el más integro y potente atractante, por su rápida respuesta de quimioatracción y su alta estimulación (Figura 9 y Tablas 5 y 6). Fuzessery y Childress (1975) concluyeron que un alto porcentaje de las especies de crustáceos evaluadas, tuvieron una fuerte respuesta alimenticia a la betaína. En *M. rosenbergii*, Harpaz y Steiner (1990) reportaron que la betaína en la dieta, incrementa fuertemente la búsqueda de alimento. De igual forma, la betaína induce actividad quimioatractante en el camarón *Palaemonetes pugio* (Carr *et al.* 1984). Guerin (1998) observó efectos positivos de atracción en algunas especies de peces y crustáceos.

Contrariamente a los resultados del presente bioensayo, Hatt (1984) concluye que las moléculas faltantes del grupo amino o carboxilo, como la betaína (Figura 2), son inefectivas en el langostino de agua dulce *Austropotamobius torrentium*. Esta diferencia en las respuestas de quimiosensibilidad están dadas por distinto desarrollo filogenético y ontogenético (Weissburg y Zimmer-Faust, 1991).

Las menores respuestas de atracción de ácido glutámico, glicina y taurina han sido también reportadas en otros trabajos. En el atún Aleta Amarilla, Hidaka *et al*. (2000) demostraron que el ácido glutámico es un fuerte inductor del comportamiento alimenticio. Sin embargo, Hatt (1984) mencionó que aunque los α-aminoácidos son más efectivos que los ß-aminoácidos, aquellos con cadenas electronegativas, como el ácido glutámico (Figura 4), tienen mínimo efecto atractante en el langostino *A. torrentium*. Este mismo autor también determinó que la glicina es un aminoacido más efectivo que la taurina en activar el comportamiento alimenticio, y notoriamente más efectivo que el ácido glutámico. Acorde con los resultados de la presente investigación (Tabla 3 y 6 y Figura 9), la betaína fue el mejor activador individual del comportamiento alimenticio, mientras que el ácido glutámico, la glicina y la taurina como moléculas atractantes/estimulantes individuales fueron activadores parciales o menores del comportamiento alimenticio completo en peneidos reproductores de *L. vannamei*.

Sinergismo, aditividad y supresión son efectos resultantes del comportamiento alimenticio inducido por la mezcla binaria de moléculas atractantes. El sinergismo y la aditividad se produce cuando el comportamiento alimenticio de un crustáceo es mayor o igual, respectivamente, que la sumatoria de palatabilidad causada por sus componentes individuales. Mientras que un efecto de supresión se observa cuando esta sumatoria es menor (Laing *et al*. 1984; Zimmer-Faust, 1987; Olson y Derby, 1995). Acorde con resultados del presente estudio, Zimmer-Faust (1987) menciona que los aminoácidos y ácidos orgánicos son más efectivos cuando son probados como estímulos palatables combinados que individuales. Fuzessery y Childress (1975) también indicaron que la mezcla de aminoácidos causó un mayor efecto estimulatorio en el crustáceo *P. hisutiusculus* que cuando fueron ensayados individualmente. En nuestro estudio (Tabla 4 y 5) de las 3 mezclas binarias, todas evidenciaron supresión sobre el comportamiento alimenticio de los camarones, a excepción de la combinación de taurina:glicina. La mayor estimulación ocasionada por la mezcla de taurina:glicina que sus componentes individuales, demuestra el efecto aditivo que se presenta cuando se mezclan ambas moléculas atractantes en dietas para reproductores de *L. vannamei*. Similares resultados de ingestión alimenticia al presente ensayo obtuvieron Fuzessery y Childress (1975) con la mezcla de los aminoácidos taurina y glicina en todas las especies de crustáceos batipelágicos y del litoral. A diferencia de las otras combinaciones de aminoácidos, la mezcla binaria de taurina y glicina no presentó efectos de supresión en la quimiorrecepción, posiblemente por que, como ocurre en la langosta *P. argus*, la glicina no interfiere en la quimiodetección de la taurina a diferencia de otros aminoácidos, nucleótidos y amonio cuaternario que si afectan la percepción del estímulo atractante (Olson y Derby, 1995). Zimmer-Faust *et al*. (1984) mencionan que la glicina es un alto inductor del apetito y los α-aminoácidos con grupos-R no cargados son más efectivos que los que tienen grupos-R cargados eléctricamente. En tanto que la taurina, según estos autores, induce movimiento antenular (quimiodetección), pero no a la locomoción, activando parcialmente el comportamiento alimenticio en el crustáceo *Panulirus sp*. Así mismo, Fuzessery *et al*. (1978) y Carr *et al*. (1987) probaron que la taurina es el compuesto más estimulante entre la hipotaurina, y ß-alanina en *Panulirus* sp. y está presente en altas concentraciones en una amplia variedad de tejidos animales. Estudios realizados en *Panulirus interruptus* demostraron que una combinación de aminoácidos mono o dicarboxílicos podría presentar un efecto aditivo estimulatorio, al activar más tipos de receptores (Fuzessery y Childress, 1975). El presente estudio reportó un caso de aditividad con la mezcla de taurina: glicina, sin embargo Zimmer-Faust *et al*. (1984), con la misma mezcla, reportó un efecto de sinergismo en *Panulirus interruptus*, aunque debido a diferencias en la metodología del ensayo y la especie estudiada, distintos resultados de comportamiento alimenticio pueden ser observados. En la evaluación de las mezclas binarias, la combinación en partes iguales (0.75% cada uno) de taurina y glicina indujo el mayor comportamiento apetitivo de reproductores de *L. vannamei.* A nivel de ingestión, a pesar que la betaína fue más consumida que la mezcla de taurina:glicina no presentó diferencias significativas (Tabla 4 y 5).

5.2. TASA DE INGESTIÓN Y EFICIENCIA DE ASIMILACIÓN EN DIETAS

Debido a la mayor tasa de ingestión y al menor tiempo de reacción ante la presencia del compuesto ensayado, betaína y la mezcla de taurina:glicina fueron seleccionados como los dos mejores atractantes y estimulantes para el estudio con dietas semipurificadas. Con los químicos seleccionados, un consumo diferenciado de los alimentos entre machos y hembras fue evidenciado debido a posibles diferencias fisiológicas o metabólicas. En crustáceos, Waterman (1961) demostró diferencias entre individuos de la misma especie en los procesos metabólicos y determinó que la existencia de diferencias en el metabolismo es afectada por edad, estadio de desarrollo o sexo. Los procesos de maduración de los camarones peneidos aparte de afectar el metabolismo y las necesidades nutricionales, la quimiorrecepción (detección, consumo y asimilación de moléculas palatables) podría variar según el sexo. En jaibas por ejemplo ha sido observada una quimiorrecepción diferenciada entre sexos (Weissburg Com. Per. 2003).

Primavera (1985) ha determinado que la mayoría de los estudios nutricionales en reproductores se enfocan hacia la hembra, motivado por alta necesidad de nutrientes que este sexo requiere. La hembra en maduración sexual necesita un alimento muy rico en lípidos y proteínas que el macho en la misma etapa y como consecuencia el metabolismo de la hembra difiere del observado en el macho. Así, la nutrición femenina durante maduración debe aumentar para proveer suficiente energía y nutrientes apropiados para suplir los gastos metabólicos para biosíntesis hormonal y movilización de nutrientes hacia las gónadas para el proceso de vitelogénesis (Harrison, 1990). Si las necesidades metabólicas y nutricionales en etapa reproductiva de las hembras son diferentes del macho, entonces la quimiorrecepción de cada sexo podría cambiar con estas necesidades. Esto sugiere que durante el proceso de maduración, la hembra reproductora de *L. vannamei* presentaría una quimiodetección agudizada. Por lo tanto, la hembra detectaría con mayor precisión las mezclas complejas de moléculas atractantes en extractos naturales que las mezclas binarias sintéticas, como fue observado en los ensayos *in vivo* con dietas (Tabla 6).

Durante el proceso de maduración, múltiples cambios metabólicos y hormonales ocurren a la par del desarrollo ovárico. En éste proceso de maduración, la producción de vitelogenina en el huevo es afectada parcialmente por el consumo dietético de lípidos y proteínas. En la maduración de *Carcinus maenas* fue especulada la necesidad metabólica de taurina en los oocitos (Pochon-Masson *et al*. 1984). Este aminoacido a pesar de no ser esencial para los peneidos, posiblemente en reproductores de *L. vannamei*, podría ser utilizado para procesos de estabilización de membranas biológicas y transferencia de reservas de nutrientes (Pochon-Masson *et al*. 1984). En el cangrejo *C. maenas,* la concentración de taurina cambió en el hepatopáncreas y los ovarios con ayuno prolongado y dietas con diversas concentraciones de taurina (Pochon-Masson *et al.* 1983). Esta función permitiría incrementar la quimiosensibilidad de la hembra de camarón hacia la taurina en un período de elevada actividad metabólica como el proceso de maduración gonadal. Por otro lado, en machos, es posible que sea utilizado en menor grado debido al menor requerimiento energético para la producción hormonal y espermática o sólo sea quimiodetectado como estimulante alimenticio en dietas sin demostrar función fisiológica o metabólica. La mezcla binaria de taurina con glicina, posiblemente activa y facilita procesos metabólicos de transferencia de nutrientes en la hembra reproductora, mientras que activa en alto nivel el comportamiento alimenticio en ambos sexos de reproductores de *L. vannamei*.

Son pocas las referencias bibliográficas de quimioatracción alimenticia en reproductores de crustáceos (Wouters, 2001), por lo tanto, esta investigación evaluó adicionalmente la quimiorrecepción utilizando moléculas químicas purificadas para determinar diferencias de atractabilidad por sexo en dietas semipurificadas. De esta forma, Mendoza *et al.* (1998) evaluaron en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* una mezcla de feromonas femeninas y obtuvieron resultados de atracción en machos más que en hembras, pero ninguno de incitación (probar alimento), ni estimulación (consumo de alimento). El estudio de estos autores demuestra que existen diferencias claras en la quimiodetección sexual con fin reproductivo con feromonas, pero no para fines alimenticios. Una causa posible de la quimiorrecepción diferencial es el incremento de los umbrales de detección química en la hembra bajo desarrollo gonadal para compuestos simples debido a que una mezcla compleja de atractantes es una mejor clave para disponibilidad de alimento (Robertson *et al.* 1981). Aunque la taurina y glicina se encuentran también en altas concentraciones en el calamar, junto con otros aminoácidos y compuestos orgánicos (Carr *et al*, 1996), el macho no logró diferenciar entre la mezcla de taurina:glicina y la mezcla compleja en control positivo. Lo cual sugiere que durante el proceso de maduración diferencias sexuales ocurren tanto en los procesos fisiológicos y metabólicos, así como en los procesos de quimiorrecepción.

La eficiencia de asimilación es la capacidad que tiene los crustáceos de digerir y asimilar el alimento ingerido. En el presente ensayo fue observado que la incorporación de taurina:glicina, la betaína y el extracto de calamar (control positivo) en las dietas resulta en un incremento en la asimilación de nutrientes. Similarmente, Peñaflorida y Virtanen (1996) observaron que al utilizar la betaína en dietas incrementaron tasa específica de crecimiento y mejoraron el factor de conversión alimenticia en el camarón *Penaeus monodon*. Así mismo en el lenguado *Paralichthys olivaceus*, Park *et al.* (2001) confirmaron que la taurina afecta el metabolismo de asimilación de ciertos aminoácidos como posiblemente ocurrió en las pruebas de asimilación de alimento del presente ensayo. En alevines de lenguado *Paralichthys olivaceus*, Kim *et* al. (2003) observaron que la taurina tiene un rol estimulatorio en el crecimiento y la eficiencia alimenticia, sin embargo su función fisológica aún no está clara. Similarmente, Guerin (1998) reportó en varios ensayos de peces (como *Sparus aurata* y *Solea solea*) usando betaína que este atractante mejoró el crecimiento y la eficiencia alimenticia. Por otra parte, en la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) Takii *et* al. (1986) evaluaron la glicina y otros aminoácidos que indujeron la actividad enzimática proteolítica y glucosídica. En resumen, el uso de atractantes como taurina:glicina, betaína y extracto de calamar produce un incremento de asimilación de nutrientes en dietas para reproductores de *L. vannamei*, probablemente como resultado de una estimulación de la secreción de enzimas digestivas las cuales condujeron a un mejor aprovechamiento de los nutrientes presentes en el alimento.

6. CONCLUSIONES

- Los camarones reproductores son organismos bentónicos que se alimentan principalmente en la noche.
- El tiempo de ayuno afecta la quimiosensibilidad de moléculas atractantes de los reproductores de *L. vannamei*.
- La evaluación con disco de agar es un método eficaz para evaluar una respuesta completa de comportamiento alimenticio en reproductores de *L. vannamei*.
- Las mezclas binarias de quimioatractantes purificados comunmente presentan un efecto de supresión entre sus componentes individuales, pero son mejores atractantes que moléculas individuales.
- En dietas semipurificadas, el uso de la mezcla binaria de taurina y glicina puede sustituir parcialmente el alimento fresco para maduración.
- Hay diferencia de quimioatracción cuantitativa por sexo, pero no cualitativa, debido posiblemente a los procesos fisiológicos y nutricionales que afectan a la hembra durante la maduración gonadal.
- El uso de ciertos atractantes en dietas artificiales permite incrementar la asimilación de nutrientes para reproductores de *L. vannamei* y es de suponer que podría tener resultados similares en otras etapas de desarrollo del mismo organismo.

7. RECOMENDACIONES

- Evaluar diferentes concentraciones del atractante en el alimento artificial para reproductores con el propósito de corregir posible interferencias que se podrían dar con los demás ingredientes presentes en la dieta los cuales podrían enmascarar el efecto atractante/estimulante establecido mediante la prueba con el disco de agar.
- Así mismo es importante evaluar diferencias sexuales de respuesta alimenticia entre machos y hembras de *L. vannamei* fuera del proceso de maduración a nivel cuantitativo y cualitativo.
- Posteriores investigaciones podrían determinar el efecto de número de camarones en ensayos con atractantes.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adams, M.A. y P.B. Johnsen. 1986. A solid matrix bioassay for determining chemical feeding stimulants. The Progressive Fish-Culturist 48:147-149.

Anggawati, A.M. 1992. Fish protein in juveline tiger shrimp diets. Food Magazine 2:22-24.

Bórquez, A. y V.R. Cerqueira. 1998. Feeding behavior in juvenile snook, *Centropomus undecimalis*. I. Individuals effect of some chemical substances. Aquaculture 169:25-35.

Cadena, E. 2000. Relación entre el ciclo de muda y la actividad de las enzimas digestivas y su efecto en la tasa de alimentación y el crecimiento del juvenil *Penaeus vannamei*. ESPOL. FIMCM. Tésis de grado. Pp.106.

Carr, W.E.S., E.R Hall y S. Gurin. 1974. Chemoreception and the role of proteins: a comparative study. Comparative Biochemistry and Physiology 47A:559-566.

Carr, W.E.S., J.C. Netherton III, R.A. Gleeson y C.D. Derby. 1996. Stimulants of feeding behavior in fish: analyses of tissues of diverse marine organisms. Biological Bulletin 190:149-160.

Carr, W.E.S., J.C. Netherton III, y L. Milstead. 1984. Chemoattractants of the shrimp, *Palaemonetes pugio*: Variability in responsiveness and the stimulatory capacity of mixtures containing amino acids, quaternay ammonium compounds, purines and other substances. Comparative Biochemistry and Physiology 77A (3):469-474.

Costero, M.C. y S.P. Meyers. 1995. Consideraciones sobre atrayentes químicos y estimulantes de la alimentación del camarón de cultivo *Penaeus vannamei*. En Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D. y R. Mendoza, editores. Avances en

Nutrición Acuicola I. Programa de Maricultura. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Pp.355-364.

Cowey, C.B., A.M. Mackie y J.G. Bell. 1985. Nutrition and feeding in fish. Academic Press. Hardourt Brace Jovanovich, Publishers. Pp. 177-189.

Cowey, C.B. y A.G.J. Tacon. 1981. Fish Nutrition-Relevance to invertebrates. Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition: biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. Pp. 13-30.

Cruz-Suarez, L.E., D. Ricque-Marie y R. Mendoza. 1998. Quimioatracción en crustáceos: Papel de moléculas homólogas. Avances en nutrición acuícola III. Programa de maricultura. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Pp. 365-401.

Cuzon, G., M. Hew y D. Cognie. 1982. Time lag effect of feeding on growth of juvenile shrimp, *Penaeus japonicus*. Aquaculture 29: 33-44.

Chan, S-M., S.M. Rankin y L.L Keeley. 1988. Characterization of the molt stage in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteoids and glucose. Biological Bulletin 175:185-192.

Chiou, T.K. y J.P. Huang. 2003. Chemical constituents in the abdominal muscle of cultured mud crab *Scylla serrata* in relation to seasonal variation and maturation. Fisheries Science 69:597-604.

D'abramo, L.R., D.E. Conklin y D.M. Akiyama. 1997. Crustacean nutrition. Advances in World Aquaculture. Vol. 6. Pp. 26-50.

Dalla Via, G.J. 1986. Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus*. II. Free amino acids. Aquaculture 55:307-316.

Deshimaru, O. y Y. Yone. 1978. Effect of dietary supplements on the feeding behavior of prawn. Bulletin of the Japanese Society Fisheries 44(8):903-905.

Farmanfarmaian, A., T. Lauterio y M. Ibe. 1982. Improvement of the stability of commercial feed pellets for giant shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*). Aquaculture 27:29-41.

Goto, T., S. Takagi, T. Ichiki, T. Sakai, M. Endo, T. Yoshida, M. Ukawa, y H. Murata. 2001. Studies on the green liver in cultured red sea bream fed low level and non-fish meal diets: relationship between hepatic taurine and biliverdin levels. Fisheries science 67:58-63.

Guerin, M. 1998. Betaine use in aquafeeds: attractant, osmo-regulant or litotropic metabolite?. IV International Symposium on Aquatic Nutrition, November 15-18. pp. 1-10.

Guillaume, J. 1997. Protein and amino acids. En D'abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M., editores. 1997. Crustacean nutrition. Advances in World Aquaculture. Vol. 6. Pp. 26-50.

Harada, K., T. Miyasaki, y A. Karimata. 1996a. Attraction activites of terrestrial vegetable extracts for aquatic animals. Fisheries Science 62(5):675-682.

Harada, K., T. Miyasaki, S. Kawashima, y H. Shiota. 1996b. Studies on the feeding attractants for fishes and shellfishes. XXVI. Probable feeding attractants in allspice *Pimenta officinalis* for black abalone *Haliotis discus*. Aquaculture 140:99-108.

Harpaz, S. 1997. Enhancement of growth in juvenile freshwater prawns, *Macrobrachium reosenbergii*, through the use of a chemoattractant. Aquaculture 156:221-227.

Harpaz, S. y J.E. Steiner. 1990. Analysis of betaine-induced feeding behavior in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) (Decapoda, Caridea) Crustaceana 58(2):175-185.

Harrison, K.E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. Journal of Shellfish Research 9(1):1-28.

Hartati, R., y R.P. Briggs. 1993. Effect of feeding attractants on the behaviour and performance of juvenile *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture and Fisheries Management 24:613-624.

Hatt, H. 1984. Structural requirements of amino acids and related compounds for stimulation of receptors in crayfish walking legs. Journal of Comparative Physiology A 155:219-231.

Heinen, J.M. 1980. Chemoreception in decapod crustacea and chemical feeding stimulants as potential feed additives. Proceedings of the World Mariculture Society 11:319-334.

Hidaka, I., J. Kohbara, T. Araki, T. Morishita, T. Miyajima, S. Shimizu y I. Kuriyama. 2000. Identification of feeding stimulants from jack mackerel muscle extract for young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Aquaculture 181:115-126.

Hill, B.J. 1985. Effect of temperature on duration of emergence, speed movement, and catchability of the prawn *Penaeus esculentus*. Second australian national prawn seminar. Pp. 77-83.

Hill, B.J. y T.J. Wassenberg. 1987. Feeding behaviour of adult tiger prawns, *Penaeus esculentus* under laboratory conditions. Australian Journal of Marine and Freshwater Resources 38: 183-190.

Holland, K.N. y J.R. Borski. 1993. A palatability bioassay for determining ingestive stimuli in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 109:153-164.

Ishida, Y. y I. Hidaka. 1987. Gustatory response profiles for amino acids, gycinebetaine and nucleotides in several marine teleosts. Nippon Suisan Gakkaishi 53(8):1391-1398.

Kim, S.K., T. Takeuchi, M. Yokoyama, y Y. Murata. 2003. Effect of dietary supplementation with taurine, _-alanine and GABA on the growth of juvenile fingeling Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science 69:242-248.

Kolkovski, S., A. Tandler, G.W. Kissil y A. Gertler. 1993. The effect of dietary exogenous digestive encimes on ingestión assimilation, growth and survival of gilhead seabream (*Sparus aurata*., Sparidae, Linnaeus) larvae. Fish Physiology and Biochemistry 12 (3):203-209.

Laing, D.G., H. Panhuber, M.E. Willcox y E.A. Pittman. 1984. Quality and intensity of binary odor mixtures. Physiological Behavior 33:309-319.

Lee, P.G. y S.P. Meyers. 1997. Chemoattraction and feeding stimulation. En D'abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M., editores. 1997. Crustacean nutrition. Advances in World Aquaculture. Vol. 6. Pp. 292-352.

Lenhoff, L. y D. Lindstedt. 1974 en Heinen, J.M. 1980. Chemoreception in decapod crustacea and chemical feeding stimulants as potential feed additives. Proceedings of the World Mariculture Society 11:319-334.

Mackie, A.M. y A.I. Mitchell. 1985. Identification of gustatory feeding stimulants for fish-applications in aquaculture. En Cowey, C.B., A.M. Mackie y J.G. Bell, editores. 1985. Nutrition and feeding in fish. Academic Press. Hardourt Brace Jovanovich, Publishers. Pp. 177-189.

Martinez-Gomez, M, M. Guarneros, R. Zempoalteca y R. Hudson. 1997. A comparison of spontaneus and odor-induced chin marking in male and female domestic rabbits (Oryctolagus cuniculus domestica). Ethology 103 (11):893-901.

Masterton, W.L., E.L. Slowinski y C.L. Stanitski. 1981. Chemical Principles, Fifth edition. Saunders college publishing. Pp. 631-637.

Mendoza, R., J. Montemayor, J. Verde y C. Aguilera. 1998. Quimiatracción en crustáceos: papel de moléculas homologas. En Cruz-Suarez, L.E., D. Ricque-Marie y R. Mendoza, editores. 1998. Avances en nutrición acuícola III. Programa de maricultura. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Pp. 365-401.

Métallier,R. y J. Guillaume. 2001. Part IV. Feeding of fish: Applications. Raw materials and additives used in fish foods. En: Guillaume, J., S. Kaushik, P. Bergot y R. Métallier, editores. Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. Praxis Publishing. pp. 279-295.

Molina, C., E. Cadena y F. Orellana. 2000. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta al ritmo circadiano y ciclo de muda. En: Cruz-Suarez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Ceredo, editores. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre 2000. Mérida, Yucatán, México.

Molina, C., Y. Paredes, N. Montoya, A. León-Hing, S. Townsend y A. Pedrazzoli. 1997. Manual de técnicas para nutrición acuícola. Fundación CENAIM-ESPOL. Proyecto JICA-CENAIM. Pp. 5-7.

Obaldo, L.G., S. Divakaran y A.G. Tacon. 2002. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. Aquaculture research 33:369-377.

Olson, K.S. y C.D. Derby. 1995. Inhibition of taurine and 5'AMP olfactory receptor sites of the spiny lobster *Panulirus argus* by odorant compounds and mixtures. Journal of Comparative Physiology A 176:527-540.

Park, G.S., T. Takeuchi, T.Seikai y M. Yokoyama. 2001. The effects of dietary taurine on growth and taurine levels in whole body of juveniles Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Nippon Suisan Gakkaishi 67(2):238-243.

Papatryphon, E. y J.H. Soares Jr. 2000. Identification of feeding stimulants for striped bass *Morone saxatilis*. Aquaculture 185:339-352.

Pearson, W.H. y B.L. Olla. 1977. Chemoreception in the blue crab *Callinectes sapidus*. Biological Bulletin 153:346-354.

Perez-Velazquez, M., A.L. Lawrence, D.M. Gatlin III, M.L. González-Félix y W.A. Bray. 2002. Replacement of fresh dietary components by a dry feed for successful maturation of male *Litopenaeus vannamei* (Boone) broodstock. Aquaculture Research 33:1091-1095.

Pochon-Masson, J., G.G. Payen, C. Portemer y F. Chatagner. 1983. Effects of experimental diets and or fasting on the concentration of taurine in various organs of the shore crab *Carcinus maenas*(L.) DECAPODA:BRACHYURA). Comparative Biochemistry and Physiology 87:141-145.

Pochon-Masson, J., G.G. Payen, C. Portemer y F. Chatagner. 1984. Variations of taurine concentrations in the ovaries and hepatopancreas of the female crab *Carcinus maenas* L. (Decapoda Brachyura) during the different phases of its genital activity. International Journal of Invertebrate Reproduction and Development 7:127-133.

Primavera, J.H. 1985. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. Proceedings of the first international conference on the culture of penaeid prawns/shrimps, Iloilo city, Philippines. Pp. 47-64.

Robertson, L., W. Bray, J. Leung-Trujillo y A. Lawrence. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. Journal of World Aquaculture Society 18(3):180-185.

Smith, D.M. y W. Dall. 1985. Moult staging the tiger prawn *Penaeus esculentus*. En: Second Australian National Prawn Seminar. Pp.85-93.

Tacon, A.G.J. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Pp. 516.

Takaoka, O., K. Takii, M. Nakamura, H. Kumai y M. Takeda. 1995. Identification of feeding stimulants for Tiger Puffer. Fisheries Science 61(5):833-836.

Takeuchi, T. 1988. Laboratory work-Chemical evaluation of dietary nutrients. En Watanbe, T. 1988. Fish Nutrition and Mariculture. JICA Textbook. The general aquaculture course. Pp.179-226.

Takii, K., S. Shimeno, M. Takeda y S. Kamekawa. 1986. The effect of feeding stimulants in diet on digestive enzyme activities of eel. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 52(8):1449-1454.

Vijayan, K.K., K. Sunilkumar-Mohamed y A.D. Diwan. 1997. Studies on moult staging, moulting duration and moulting behavior in indian white shrimp *Penaeus indicus* Milne Edwards (Decapoda: Penaeidae). Journal of Aquaculture in the Tropics 12(1):53.64.

Virtanen, E., R. Hole, J.W. Resink y K-E. Slinning y M. Junnila. 1994. Abstracts/Aquaculutre 124:210-222.

Virtanen, E., M. Junnila y A, Soivio. 1989. Effects of food containing betaine/amino acid additive on the osmotic adaptation of young Atlantic Salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 89:109-122.

Waterman, T.H. 1961. Comparative Physiology. En Waterman, T.H.(ed.) 1961. The Physiology of crustacea.Vol II. Sense organs, integration and behavior. Pp. 521-553.

Weissburg, M.J. y R.K. Zimmer-Faust. 1991. Ontogey versus phylogeny in determining patterns of chemoreception: Initial studies with Fiddler crabs. Biological Bulletin 181:205-215.

Wouters, R. 2001. Importance of Broodstock Nutrition in White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Tesis Doctoral. Universidad de Ghent. Pp. 195.

Yokoyama, M. y J-I. Nakazoe. 1992. Acumulation and excretion of taurine in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) fed diets supplemented with methionine, cysteine and taurine. Comparative Biochemistry and Physiology 102ª (3):565-568.

Zimmer.Faust, R.K. 1987. Crustacean chemical perception: towards a theory on optimal chemoreception. Biological Bulletin 172:10-29.

Zimmer-Faust, R.K. 1989. The relationship between chemorreception and foraging behavior in crustaceans. Limnology and Oecanography 34 (7):1367-1374.

Zimmer-Faust, R.K., W.C. Michel, J.E. Tyre y J.F. Case. 1984. Chemical induction of feeding in california spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall): responses to molecular weight fractions of abalone. Journal of Chemistry and Ecology 10:957-971.