



Posgrado en Ciencias de Mar y Limnología  
Universidad Nacional Autónoma de México

Efecto de *Lactobacillus acidophilus* suministrado con dos métodos de microencapsulación sobre el crecimiento y la supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*

## T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

P r e s e n t a

Iris Zuen Hernández Hernández

Director de Tesis: Dra. Ruth Pedroza Islas

Comité Tutorial: Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés

Dr. Domenico Voltolina Lobina

Dra. Cristina Pascual Jimenez

Dr. Alfonso Alvarez González

México, 2011.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Este trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M. con sede en Sisal, Yucatán bajo la codirección de la Dra. Ruth Pedroza Islas y la Dra. Gabriela Gaxiola Cortés con el apoyo financiero del proyecto CONACYT-CIENCIA BÁSICA- y de la beca nacional otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (349393/240505) durante el periodo 2010-2011. Se agradece su participación en el proyecto a los técnicos académicos M. en C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga, Ing. Miguel Arévalo López, , M. en C. Maribel Badillo, Ing. Adriana Paredes, Tec. Concepción Uc Burgos y Tec. Moisés Cab Marín por su apoyo en las diferentes en las diferentes etapas de este trabajo.

*A mi familia: Jorge, Marilú y Sve. Gracias por su apoyo. Los amo.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional autónoma de México U.N.A.M. y al posgrado en Ciencias del Mar y Linología PCMyL por la oportunidad de continuar con mi formación académica.

A la Dra Ruth Pedroza Islas y la Dra. Gabriela Gaxiola Cortes por la dirección de esta tesis y por su gran apoyo académica y profesionalmente, por ser unas excelentes personas, amigas y ejemplo a seguir.

A los miembros de mi jurado, el Dr. Domenico Voltolina Lobina por su gran apoyo e interés en el seguimiento de esta tesis, muchas gracias por estar siempre pendiente y por sus valiosos comentarios para el mejoramiento de esta tesis, a la Dra. Cristina Pascual por su ayuda en el montaje de una técnica y por sus valiosas observaciones y al Dr. Alfonso Alvarez por sus sugerencias para el mejoramiento y culminación de esta tesis, a todos gracias por el apoyo en la pronta revisión.

A los técnicos académicos de la UMDI-Sisal, M. en C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga, Ing. Miguel Arévalo López, M. en C. Maribel Badillo, Ing. Adriana Paredes, Tec. Concepción Uc Burgos y Tec. Moisés Cab Marín, Dr. Gabriel Lizama, Dra. María Goreti Campos, M. en C. Karla Escalante por su apoyo en las diferentes etapas de este trabajo.

A la Universidad Iberoamericana y a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación en Sisal, Yucatán por el apoyo en infraestructura para la obtención de las microcaspulas, el desarrollo de las partes experimentales y análisis Bioquímicos.

A la directora del PCMyL Dra. Gloria Vilaclara y al personal administrativo, M. en C. Diana Juárez, Gabriela Almaraz, Lupita Godoy y Chantal Guerrero, por su apoyo y seguimientos en todo momento.

A todos aquellos que de alguna forma me apoyaron y alentaron para el desarrollo y culminación de este trabajo y por ser grandes amigos: Andrea, Isa, San, Pau, Kawa, Mago, Norts y Alanchú. Los quiero.

## Abreviaturas

AG	Acilglicéridos
N <sub>1</sub>	Estadío naupliar 1
PZ <sub>1</sub>	Protzooea 1
M <sub>1</sub>	Mysis 1
PL <sub>1</sub>	Postlarva 1
WPI	Weight of the protein isolated (proteína aislada del suero de leche)
CPSP	Hidrolizado de pescado al 70% de proteína
UFC	Unidades formadoras de colonia
F	Flotabilidad
T	tiempo
$\tau_f$	Constante de tiempo de flotación
D	Dieta microencapsulada sin probióticos
DP1	Dieta microencapsulada con probiótico (método 1: coacervación)
DP2	Dieta microencapsulada con probióticos (método 2: emulsión múltiple)
C	Control de alimento vivo
ID	Indice de desarrollo
TCA	Ácido tricloroacético
$\mu\text{g}$	microgramos
P	Probabilidad

Índice	Página
1. Introducción	9
2. Antecedentes	11
2.1 Camaronicultura y uso de antibióticos	11
2.2 Probióticos	11
2.3 Beneficios y uso de probióticos	11
2.3.1 Mecanismos de acción propuestos para los probióticos	12
2.3.2 Métodos de adición de probióticos	13
2.3.3 Prebióticos	13
2.4 Sistema digestivo de larvas	14
2.4.1 Papel de la microflora	14
2.4.2 Ontogenesis de <i>Litopenaeus vannamei</i>	14
2.4.3 Actividad enzimática	16
2.5 La microencapsulación como método de protección de microorganismos probióticos.	17
2.5.1 Técnicas de microencapsulación	17
2.5.2 Materiales encapsulantes	18
3. Justificación académica	23
4. Preguntas de investigación	23
5. Hipótesis	24
6. Objetivo general y específicos	24
7. Materiales y métodos	25
7.1 Microencapsulación de probióticos por emulsión múltiple	25
7.1.1 Materiales	25
7.1.2 Formación de la emulsión	25
7.2 Microencapsulación de probióticos en una matriz de proteínas-polisacáridos	26
7.2.1 Formación de las microcápsulas	26
7.2.2 Producción de biomasa del probiótico	26
7.2.3 Preparación del inóculo y dispersión	27
7.2.4 Viabilidad ants del secado (inóculo)	27
7.2.5 Viabilidad bacteriana después del secado	27
7.2.6 Viabilidad por ensayo de fluorescencia	27

---

7.3 Microencapsulación de una dieta microparticulada para <i>L. vannamei</i>	28
7.3.1 Materiales	28
7.3.2 Análisis fisicoquímico de las microcápsulas obtenidas	30
7.3.2.1 Estructura y forma de las microcápsulas	30
7.3.2.2 Flotabilidad	30
7.3.2.3 Solubilidad de las microcápsulas	31
7.3.2.4 Tamaño de partícula	32
7.4 Bioensayos	33
7.4.1 Evaluación biológica	35
7.4.2 Indicadores zootécnicos	35
7.4.3 Ensayo enzimático	37
7.4.3.1 Actividad enzimática	37
7.4.3.2 Metabolitos	38
7.4.4 Análisis estadístico	40
8. Resultados y discusión	41
8.1 Microcápsulas por emulsión múltiple	41
8.2 Microcápsulas de probióticos en matriz de proteínas-polisacáridos	42
8.3 Dieta microencapsulada	43
8.4 Viabilidad del probiótico por ensayo de fluorescencia.	48
8.5 Bioensayos	49
8.5.1 Supervivencia	49
8.5.2 Índice de Desarrollo	52
8.5.3 Crecimiento	53
8.5.4 Fisiología energética (respirometría)	56
8.5.5 Actividad específica de enzimas digestivas	57
8.5.6 Contenido de proteína soluble, triglicéridos y colesterol.	59
9. Análisis de resultados	60
10. Conclusiones	72
11. Referencias bibliográficas	74

---

## Resumen

El presente trabajo consistió en evaluar dos diferentes métodos de microencapsulación de microorganismos probióticos, que se adicionaron al cultivo larvario de camarón blanco, a partir de la hipótesis de que si los probióticos llegan vivos y en cantidad suficiente a las larvas, esto podría mejorar el crecimiento y la supervivencia del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Se microencapsuló *Lactobacillus acidophilus*, un probiótico frecuentemente utilizado en la industria alimentaria por sus beneficios en el balance de la microbiota intestinal, pero con efectos poco conocidos en acuicultura; asegurando que la microencapsulación por cualquiera de los dos métodos lo protegiera contra las condiciones del proceso así como de la exposición hacia el oxígeno para su posterior almacenamiento.

Los dos métodos utilizados para la obtención del probiótico microencapsulado fueron el realizado mediante una matriz de proteínas polisacáridos y el de emulsión múltiple, mismas que fueron secadas posteriormente para obtener las microcápsulas en forma de un polvo.

Antes y después de la microencapsulación se determinó la viabilidad del probiótico por cuenta en placa y después de un año de almacenamiento se determinó la viabilidad del probiótico mediante un ensayo de fluorescencia y cuenta en placa, además también se realizó una valoración fisicoquímica de la microcápsulas para determinar si eran aptas para ser adicionadas a las larvas.

Se realizaron bioensayos para observar el efecto del probiótico en la supervivencia y desarrollo de las larvas de camarón; se probaron cuatro tratamientos, un tratamiento contenía únicamente una dieta (D) microencapsulada especialmente diseñada para *L. vannamei* en la etapa larvaria, otro tratamiento se conformó de esta dieta junto con microcápsulas de probiótico por método de emulsión múltiple (DP2), un tercer dieta mas

microcápsulas por método de matriz de proteínas polisacáridos (DP1) y un control de alimento vivo (C) para poder ver el efecto que ejerce el probiótico en la supervivencia y desarrollo de los organismos.

Los resultados obtenidos indicaron que el método de microencapsulación que mantuvo la mejor viabilidad del probiótico *in vivo* e *in vitro*, fue el de interacción proteínas polisacáridos. Sin embargo, ambos métodos lograron conservar una concentración adecuada después de un año de almacenamiento. Ambas microcápsulas con probiótico presentaron resultados equivalentes en cuanto a estabilidad en medio simulado (Flotabilidad y porcentaje de disolución) además de un tamaño adecuado para su consumo. Después de ser adicionadas a los organismos, de los dos tratamientos conteniendo el probiótico (DP1 y DP2) el tratamiento que logró la mejor supervivencia, el mejor crecimiento y el menor retraso en el índice de desarrollo respecto al control fue el obtenido con las microcápsulas del probiótico por emulsión múltiple (DP2).

Se concluye que el probiótico microencapsulado con la técnica de Emulsión múltiple sirvió pues se lograron resultados similares al control con el alimento vivo ayudando al desarrollo y supervivencia de las larvas.

El análisis de enzimas, metabolitos y consumo de oxígenos, indicó que la dieta fué deficiente en acilgricéridos por lo que es necesario una reformulación de la dieta.

## 1. Introducción

La producción de los cultivos paralelos (microalgas y nauplios de *Artemia*) necesarios durante el desarrollo larvario del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* tiene un elevado costo para las granjas de producción de camarón, por lo que es necesario utilizar alimentos artificiales en el cultivo larvario debido a los altos costos y riesgos que representa la producción de alimentos vivos (Jones et al., 1993; Kanazawa et al., 1982, 1989; Kurmaly et al., 1989a; Vergara, 1990; Chu, 1991; Chittravadivelu, 1992).

Debido al aumento en pérdidas económicas en la acuicultura por muertes de los organismos ya sea por una inadecuada alimentación o por enfermedades, es importante desarrollar alimentos que sean adecuadamente formulados y que provean protección contra enfermedades.

Los probióticos juegan un papel muy importante en estanques de cultivo sobre la productividad, la nutrición de los organismos, el control de enfermedades, la calidad del agua, y el impacto hacia el ambiente.

Probiótico se refiere a "organismos o sustancias que contribuyen a un balance en la microbiota intestinal" (Parker, 1974). Entre los beneficios de suplementar probióticos se encuentran: mejoras al valor alimenticio, contribución enzimática para la digestión, inhibición de microorganismos patógenos, promoción del crecimiento, y un incremento en la respuesta inmune (Chiu et al., 2007).

Sin embargo, hay que tomar en cuenta que existen diferentes factores que afectan la viabilidad de los microorganismos probióticos, y que los probióticos deben ser suministrados y consumidos en estado viable para que puedan tener el efecto que se atribuye a estos productos.

Se sabe que *Lactobacillus acidophilus* es una bacteria ácido láctica de origen humano, su temperatura de crecimiento es de 35°C se desarrolla en medios ácidos (pH 4-5 o menores) siendo esta una ventaja sobre bacterias patógenas

pues éstos no toleran pH bajos, se considera una bacteria proteolítica por su capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos y se microaerófila por lo que concentraciones elevadas de oxígeno le son tóxicas (Pelczar, 1982, Briceño et al, 2001).

Debido a que las principales funciones de la microencapsulación son: protección contra el deterioro por efecto del oxígeno y otros gases, control de la transmisión de humedad, manejo de materiales líquidos y sólidos, control sobre la liberación del material microencapsulado y protección contra la contaminación microbiana es necesario encontrar la mejor técnica de encapsulación, para poder asegurar que el probiótico se encuentre viable al momento del consumo.

Además las microcápsulas deben presentar características fisicoquímicas tales como tamaño de partícula adecuado al estadio de la larva de camarón, tiempo de disolución y flotabilidad adecuada a las características del sistema de cultivo y los hábitos de consumo, lo cual puede determinar el éxito o no del cultivo larvario, pues se ha demostrado una fuerte correlación entre el crecimiento y la supervivencia de las larvas y la estabilidad de los alimentos artificiales en el agua, que no es debida solamente al tamaño de partícula o contenido nutrimental de los alimentos (Amjad et al., 1992), ya que es necesario considerar que las partículas serán ingeridas y rotas mecánicamente para permitir que el contenido sea digerido o bien puedan ser susceptibles de hidrólisis enzimática.

Una técnica muy utilizada para microencapsular es mediante la interacción de proteínas con polisacáridos y su posterior secado por aspersión seleccionando adecuadamente los materiales que formarán la pared de la microcápsula, de tal manera de proveer un ambiente que asegure la estabilidad del microencapsulado. Otra técnica recientemente utilizada para microencapsular compuestos es por emulsión múltiple, la cual puede ser secada por aspersión para obtener finalmente el probiótico en forma de polvo.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Camaronicultura y uso de antibióticos

La camaronicultura se ha desarrollado en todo el mundo por la gran demanda que existe en el mercado por este alimento. Sin embargo en la práctica de cultivo intensivo uno de los problemas existentes es la alta mortandad, que conlleva a serias pérdidas económicas y que es causada principalmente por el estrés y por enfermedades.

Aún cuando por mucho tiempo se han utilizado antibióticos para la prevención y el control de enfermedades, su uso ha sido cuestionado por la evolución en la resistencia que generan en las bacterias patógenas (Castro Mejía *et al.*, 2005; Balcázar *et al.*, 2006), además de que estos productos ocasionan problemas ambientales, por lo que se ha incrementado la necesidad de encontrar prácticas alternativas, como el uso de probióticos (Tinh *et al.*, 2008).

### 2.2 Probióticos

También puede referirse al “suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal hospedero por la mejora en el balance de la microbiota intestinal” (Fuller, 1989).

### 2.3 Beneficios y usos de probióticos

Entre los beneficios de estos suplementos se encuentran: mejoras al valor alimenticio para los organismos, contribución enzimática para la digestión, inhibición de microorganismos patógenos, actividad antimutagénica y anticancerígena, factores promotores de crecimiento, y un incremento en la respuesta inmune (Farzanfar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

El uso de los probióticos es ahora ampliamente aceptado en la acuicultura con aplicaciones en el cultivo de moluscos, peces y camarones, con resultados

efectivos para la preservación de la salud de los animales acuáticos (Balcázar et al., 2006; Chiu et al., 2007; Kesarcodi-Watson et al., 2008) y con beneficios en la calidad del agua (Dalmin et al., 2001).

Las bacterias probióticas utilizadas para la mejora de la calidad del agua principalmente por su capacidad de disminuir la concentración de las sustancias orgánicas disueltas, están representadas por el género *Bacillus* spp y se sabe que en general, las bacterias Gram positivas presentan una mejor habilidad para convertir la materia orgánica en CO<sub>2</sub> en relación con las Gram negativas (Balcazar et al., 2006; Dalmin et al., 2001).

En cuanto a los efectos benéficos sobre la salud por la adición de probióticos a los cultivos de las especies acuícolas, se ha evaluado una serie de microorganismos con estas características: microalgas como *Tetraselmis*, levaduras como *Debaryomyces*, *Phaffia* y *Saccharomyces* (Aguirre Guzmán et al., 2002), bacterias Gram positivas como *Bacillus* (Brunt et al., 2008), *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* (Hagi y Hoshino et al., 2009), *Micrococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* y Gram negativos como *Aeromonas* (Brunt et al., 2008), *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* y *Vibrio* (Chiu et al., 2007).

Actualmente se sabe que existe una asociación benéfica entre los microorganismos probióticos y los hospederos, sin embargo, aún no se conoce a fondo el funcionamiento del tracto digestivo de los organismos acuáticos, en especial de las larvas, para entender la contribución que los probióticos tienen en la salud y bienestar de estos organismos.

### 2.3.1 Mecanismos de acción propuestos de probióticos

Los mecanismos de acción que han sido propuestos para explicar el efecto benéfico de los probióticos son: antagonismo contra patógenos, competencia por sitios de adhesión en el tracto gastrointestinal, competencia por nutrientes, contribución enzimática a la digestión, mejoramiento de la calidad del agua, y estimulación de la respuesta inmune en el huésped, como ya fue mencionado antes (Tinh et al., 2008).

Existen estudios sobre el efecto que ejercen las bacterias anaeróbicas intestinales en la mejora de la asimilación y digestión del alimento (Ramirez y Dixon *et al.*, 2003). También se ha reportado su actividad como bacterias antagónicas de microorganismos patógenos (Fukami *et al.*, 2002; Yoshinaga *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2008) además de que la competencia por la adhesión y colonización de las superficies mucosas sirve como primera barrera de defensa contra la invasión de bacterias patógenas (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2004). Por ejemplo se ha reportado que inoculaciones diarias en los tanques de cultivos de larvas de camarón blanco con bacterias probióticas, previenen la colonización por bacterias patógenas durante el cultivo (Peeters y Rodríguez, 1999).

La competencia por nutrientes también ejerce un importante rol en la composición de la microbiota (Vershuere *et al.*, 2000) y conviene insistir en la estimulación de la respuesta inmune por la adición de probióticos (Chiu *et al.*, 2007), lo cual es de gran importancia, pues existen grandes pérdidas económicas en la camaronicultura por problemas de enfermedad de los organismos, como ya fue mencionado.

### 2.3.2 Métodos de adición de probióticos

Los probióticos pueden ser proporcionados al huésped o adicionados a su ambiente acuático en diferentes maneras: a) adición por medio del alimento vivo (bioencapsulación); b) adición al agua de cultivo y c) adición a una dieta artificial (Balcazar *et al.*, 2006). Cuando se elige utilizar dietas artificiales es necesario hacer una adecuada selección de ingredientes que sean digeribles y biodisponibles por el organismo acuático.

### 2.3.3 Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles, que estimulan el crecimiento y/o la actividad de una bacteria específica o de un número de especies bacterianas del colon, promoviendo su desarrollo (Picot y Lacroix, 2004; Ozer *et al.*, 2005). También coadyuvan para encapsular bacterias probióticas de forma simple, conjunta o como co-encapsulantes, con el

objetivo de proporcionar un efecto protector ante los efectos físicos, químicos, medio ambiente, y las condiciones de almacenamiento, procesamiento y fluidos gastrointestinales (Lian et al., 2003; Ann et al., 2007).

## 2.4 Sistema digestivo de larvas

### 2.4.1 Papel de la microflora

El sistema digestivo de los hidrobiontes es un sistema abierto en constante contacto con el ambiente acuoso, el tracto es rico en nutrientes y por lo tanto favorece el crecimiento de muchas bacterias. La microflora del tracto intestinal juega un importante papel en el proceso digestivo y nutricional de los animales acuáticos, tanto en estado larval como en estado adulto, ya que puede servir como una fuente suplementaria de vitaminas, aminoácidos esenciales, enzimas extracelulares, etc. (Balcazar et al., 2006).

También contribuye a la resistencia a enfermedades infecciosas pues puede favorecer el equilibrio bacteriano. Por ejemplo, se sabe que las bacterias ácido lácticas producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, y que pueden favorecer la modulación de la respuesta inmune (Chiu et al., 2007).

### 2.4.2 Ontogenia de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

En los estadios larvarios los camarones se encuentran como libres nadadores, y los cambios tanto en morfología como en hábitos, se llevan a cabo a lo largo de algunas semanas, en lugar de que ocurran transformaciones bruscas en el estado decápodo (PL<sub>1</sub>) (referencia).

Después de la eclosión, las larvas pasan a través de cinco estadios naupliares (N<sub>1</sub>-N<sub>5</sub>), tres estadios protozoetas (PZ<sub>1</sub>-PZ<sub>3</sub>) y tres Mysis (M<sub>1</sub>-M<sub>3</sub>) antes de transformarse a decápodo (PL<sub>1</sub>). (referencia)

Durante los primeros estadios larvarios a partir de PZ<sub>1</sub>, las larvas presentan un tubo digestivo indiferenciado en el que se lleva a cabo el proceso de digestión y absorción de nutrientes, en este tubo existe una región denominada intestino medio, donde se da el mayor proceso de absorción y digestión, el cual más tarde, da lugar a la glándula digestiva (Lovett y Felder 1989). En esta etapa, las larvas empiezan a alimentarse de microalgas como las *diatomeas* con tamaños menores a 6 µm, o flagelados como *Tetraselmis spp* de 14 a 26 µm (Trecce y Yates, 1990), y hacia el final del estadio protozoa, cuando se va formando un tubo digestivo más diferenciado y con una mayor actividad de las enzimas digestivas (entre PZ<sub>3</sub> y M<sub>1</sub>) se incorpora zooplancton por el aumento en la demanda de proteína de origen animal, en donde la *Artemia spp*, es la mas frecuentemente utilizada.

La estructura mandibular en las larvas de crustáceos tiene un particular desarrollo de superficies para molienda, las cuales pueden ser relacionadas con los hábitos alimenticios que cambian de herbívoro a carnívoro. Dichas adaptaciones aparentemente se relacionan con el desarrollo de la morfología funcional del intestino, pues estudios en larvas de crustáceos han demostrado cómo su fisiología digestiva se adapta a las diferentes estrategias de alimentación durante el desarrollo larvario, lo que provee una buena perspectiva para el diseño apropiado de dietas artificiales para cultivos (Jones et al., 1997a). Las larvas del estado protozoa tienen como principal fuente de alimento el fitoplancton, por lo que poseen una gran área digestiva secretoria en relación al volumen del intestino, y se ha observado que las larvas secretan mayores niveles de enzima cuando los nutrientes de la dieta como las proteínas son escasos o poco digeribles (Le Moullac et al., 1994). Cuando la larva se desarrolla y cambia a carnívora, esta área secretoria disminuye, lo que refleja la regresión del intestino medio (Abubakr y Jones, 1992; Lovett y Felder 1990b). Al mismo tiempo, el hepatopáncreas y la glándula filtradora se desarrollan hacia la morfología funcional adulta durante los últimos estados larvarios.

### 2.4.3 Actividad Enzimática

La actividad enzimática se incrementa durante los primeros estadios larvarios, debido al tipo de alimentación, la cual consiste principalmente por fitoplancton, teniendo picos de actividad entre PZ<sub>3</sub> y M<sub>1</sub> (Pedroza et al., 2004) y disminuye conforme la larva crece hacia PL<sub>1</sub> (Lovett Y Felder, 1990), y se explica al cambiar tanto la morfología como la alimentación de la larva (de fitoplancton a zooplancton). Esto se ha observado en *Litopenaeus vannamei* el cual ha sido capaz de adaptarse exitosamente a una alimentación carnívora en estados de desarrollo tempranos (PZ<sub>2</sub>) y se ha encontrado que el contenido de tripsina en el estado PZ<sub>1</sub> es más elevado que el de otras especies (Jones et al., 1993; Le Vay et al., 1993).

Todo esto implica que existe una fuerte modulación del contenido de enzimas, en respuesta a la calidad de la dieta en los primeros estadios larvarios, lo cual ha sido observado en estados mysis de otras especies de peneidos (Jones et al., 1993; Le Vay et al., 1993; Rodríguez et al., 1994, Le Vay et al, 2001).

El incremento en la actividad de las enzimas digestivas coincide con la diferenciación del intestino de las larvas entre PZ<sub>3</sub> y M<sub>1</sub> (Buddington y Doroshov, 1986) y el decremento de estas actividades se da inmediatamente después de la metamorfosis y coincide con la degeneración del intestino medio y la formación de la glándula digestiva o hepatopáncreas, así como la aparición del molino gástrico para el fraccionamiento de las partículas alimenticias (Lovett y Felder, 1989).

Las enzimas reportadas para *Litopenaeus vannamei* son: tripsina, quimiotripsina, elastasa, colagenasa, lipasa y amilasa (Le Moullac et al, 1992). Todo lo anterior, abre la posibilidad del uso de diversos materiales para ser utilizados en la formulación de las dietas y como materiales de protección para las bacterias ácido-lácticas.

## 2.5 La microencapsulación como método de protección de microorganismos probióticos

Recientemente se ha evaluado el uso de bacterias ácido lácticas como probióticos para acuicultura (Chiu *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2008). Dado que se trata de bacterias anaerobias y en algunos casos microaerófilas, altas concentraciones de oxígeno en el medio al cual se adicionan pueden ser tóxicas (Briceño *et al.*, 2001). Para proteger a las bacterias ácido lácticas de la influencia deletérea del ambiente, se ha utilizado la microencapsulación que es una forma de empaquetado microscópico que permite mantener su viabilidad al protegerlas en su sensibilidad al oxígeno, a las condiciones de procesamiento y durante el almacenamiento (Favaro-Trinidad y Grasso, 2002; Picot y Lacroix, 2003, Ann *et al.*, 2007).

Para asegurar una buena protección de los materiales a encapsular es importante hacer una adecuada selección de las condiciones de microencapsulación así como de los materiales encapsulantes, considerando: capacidad de formar películas, liberación completa del material encapsulado, capacidad de protección a condiciones ambientales, facilidad de manipulación a altas concentraciones, habilidad para dispersar o emulsificar el material activo y estabilizar la emulsión producida (Rodríguez-Huezo *et al.*, 2007).

### 2.5.1 Técnicas de microencapsulación

Una de las técnicas de microencapsulación más utilizada es el secado por aspersión, que es un método físico muy apropiado para compuestos termolábiles ya que la deshidratación ocurre en 5 a 20 segundos, dependiendo del material elegido para formar la pared de la cápsula. Su principio radica en la transformación de un líquido o fluido en un material sólido por la atomización en forma de gotas minúsculas en un medio de secado caliente. Esto provoca la evaporación del líquido de las cápsulas, lo que permite que el material a encapsular quede atrapado en el material encapsulante (Murillo *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2008). Al respecto se han realizado diversos estudios

para microencapsular bacterias lácticas teniendo como material formador de pared leche, suero de leche, azúcares y gomas, probando ser un método adecuado para asegurar más de un 60% de viabilidad de los microorganismos microencapsulados (Rodríguez-Huezo *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2008; Ding y Shah, 2009).

Otra técnica de microencapsulación es por emulsión: en este caso, se adiciona en una determinada cantidad de aceite una pequeña cantidad de una suspensión de bacterias contenidas en una solución acuosa de hidrocoloides. La mezcla se homogeniza para formar una emulsión de agua en aceite. La fase interna de la emulsión debe corresponder a tamaños de glóbulo lo más pequeño posible para favorecer la estabilidad y por otra parte brindar la posibilidad de contener nutrientes para las células apoyando la supervivencia de los microorganismos (Krasaekoop *et al.*, 2003).

Existe otro tipo de emulsiones llamadas emulsiones múltiples las cuales, son caracterizadas por poseer una fase acuosa ( $W_1$ ) inmersa dentro de la fase interna (oleosa) de la emulsión (O), la cual está emulsionada con la fase acuosa continua de la emulsión ( $W_2$ ), para formar así finalmente la emulsión múltiple ( $W_1/O/W_2$ ) (Rodríguez-Huezo M. E. *et al.*, 2004). Una vez obtenida la emulsión múltiple estable, ésta es sometida a un secado por aspersion para la obtención de las microcápsulas.

Una vez microencapsulados, los probióticos pueden ser adicionados al estanque de cultivo o bien incorporarlos en la dieta. No obstante se requiere evaluar la viabilidad de los microorganismos y la eficiencia para proveer de beneficios a la salud de las larvas acuícolas.

### 2.5.2 Materiales encapsulantes

Existe un gran interés en la búsqueda y utilización de nuevos materiales formadores de pared para la elaboración de dietas microencapsuladas, por lo que existen diversos estudios que han demostrado que mezclas de proteínas

con polisacáridos son una excelente opción para la elaboración de las mismas (Espinoza- Herrera, 2002), pues ciertos materiales representan una excelente fuente de proteína, lo que ayuda a cubrir las necesidades nutricionales de las larvas de camarón, además de que se busca que pudieran presentar una adecuada atractabilidad y digestibilidad.

#### Proteínas aisladas del suero de leche (WPI)

Las proteínas concentradas y aisladas de suero de leche (WPC y WPI por sus siglas en inglés, respectivamente), son aquellas que permanecen solubles a pH de 4.6 y a 20 °C, después de que se remueve la caseína de la leche entera o descremada, siendo las principales proteínas en todos los tipos de suero de leche la:  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Bottomley et al., 1990; Moreau y Rosenberg, 1998).

La  $\alpha$ -lactoalbúmina es una proteína globular muy compacta y la  $\beta$ -lactoglobulina contiene aminoácidos de carácter ácido y básico con características hidrofóbicas e hidrofílicas, distribuidas uniformemente a lo largo de la cadena.

Existe un estudio en donde proteínas de suero de leche fueron utilizadas como materiales formadores de pared con las que se obtuvieron microcápsulas de forma esférica con superficies lisas y tersas, además de que mostró tener una menor capacidad de absorción de agua, resultados favorables que ratifican el uso de este agente encapsulante. (Espinoza-Herrera et al., 2002).

#### Carboximetilcelulosa

Se trata de un polímero aniónico derivado de la celulosa, el cual es soluble en agua (hidrofílico), presenta una alta viscosidad a bajas concentraciones y una buena propiedad para formar películas, tiene un excelente comportamiento como coloide protector y estabilizante en emulsiones. Entre sus principales

usos se encuentran los siguientes: agente espesante, producto de relleno, fibra dietética y emulsificante. La carboximetilcelulosa no es degradada por las enzimas digestivas, por lo tanto no se absorbe y no aporta nutrientes comportándose igual que una fibra natural (Raymond, 2001).

### Pectina

La pectina es un polisacárido natural, que en presencia de agua forma geles. Tiene una estabilidad máxima en torno a pH 4. Existen pectinas altamente metiladas (alto metoxilo) o pectinas de menor metilación (bajo metoxilo). Las pectinas de bajo metoxilo y las modificadas químicamente (pectinas amidadas), se emplean en tecnología alimentaria, sin embargo pueden perder grupos metoxilo, y en medio neutro o alcalino romperse por beta-eliminación, lo cual afecta su viscosidad y capacidad de formación de geles (Correa C. et al, 1999, Gierselmer, 1997).

### Inulina

La inulina es un polisacárido, que se encuentra en raíces y tubérculos y es muy abundante en la alcachofa y el maguey (Gerdes, 2005). Por su configuración química no puede ser hidrolizada por las enzimas digestivas, por lo que se comporta como fibra dietética (Gerdes, 2005; Fernandez, 2007; Madrigal y Sangronis, 2007).

Otro beneficio, es su capacidad de modular la flora intestinal. Estudios *in vivo* muestran que sólo 4 g/día de inulina o de sus compuestos relacionados son efectivos para incrementar el número de bacterias beneficiosas en el colon (Madrigal y Sangronis, 2007).

### Aguamiel

El aguamiel o miel de maguey se obtiene de los agaves mezcaleros y los pulqueros. Está compuesta por una considerable cantidad de carbohidratos

entre los que se encuentran la sacarosa, la fructosa, la melezitosa, la rafinosa, la melibiosa, los fructanos e inulinas (fibras solubles). Además de los compuestos anteriormente mencionados, cuenta con una diversidad bacteriana, especialmente de lactobacilos en una proporción de  $3.2 \times 10^8$  UFC/mL, por lo que es considerado como un prebiótico interesante (Escalante et al., 2008) y contiene un alto porcentaje de fibra (1.5 g) (Cruz-Guerrero, et al 2006; Villa M., 2008).

### Goma Arábica

Se trata de un polisacárido natural, que se extrae de la resina de los árboles *Acacia seval* y *Acacia senegal*. Junto con la goma mezquite, es única entre los hidrocoloides naturales debido a su extremadamente alta solubilidad en agua, ya que se pueden preparar soluciones del 50% p/v o superiores (Vernon-Carter, 1981). Es utilizada como emulsificante por sus propiedades para estabilizar emulsiones, pues no imparte altas viscosidades a bajas concentraciones, por lo que es un excelente emulsionante y estabilizante.

En general produce emulsiones estables en un amplio rango de pH y ha sido usada junto con goma de mezquite y maltodextrina en la microencapsulación de aceite esencial (Vernon et al, 1999, Krishnan et al., 2005).

### Goma Mezquite

Es un exudado gomoso seco obtenido de los tallos y ramas de *Prosopis juliflora* o *P. Laevigata*; químicamente es un polisacárido complejo, que contiene una pequeña cantidad de proteína en el centro de toda la estructura primaria la cual juega un papel crucial en la emulsificación (Vernon-Carter et al., 1996).

Al tratarse de una macromolécula con un gran número de grupos ionizables (polielectrolito), en dilución, sus moléculas se disocian y el grado de

disociación, determina su conformación en solución, además de que la viscosidad de estas soluciones se ve afectada por el pH, presentando en general viscosidades bajas, aún en concentraciones altas (Vernon-Carter et al., 2000).

Es utilizada como emulsificante o estabilizador en emulsiones, debido a su funcionalidad como coloide protector y a su habilidad para formar capas viscoelásticas en la interfase aceite-agua (Vernon-Carter et al., 1999). Junto con la goma arábica ha sido utilizada para la estabilización de emulsiones, por el efecto de sinergia que existe entre ellas (Vernon-Carter et al., 1996).

#### Maltodextrina

Es un polisacárido que se obtiene por hidrólisis del almidón, y que es usado como aditivo alimentario, es un polvo higroscópico blanco, fácilmente digerible, pues se absorbe a la misma velocidad que la glucosa. Se utiliza en la industria como humectante y espesante, para estabilizar alimentos con muchas grasas, para dispersar ingredientes secos, favorece el secado por aspersion de productos difíciles de secar (Calvo et al., 2010), además de que ha sido utilizada como material formador de pared para microencapsular aceites (Kishnan et al, 2005).

#### Alginato de sodio

Se trata de un hidrocoloide hidrofílico que desarrolla altas viscosidades y que se usa como agente espesante, pues las dispersiones que se generan con él, presentan una estabilidad elevada. Es recomendable hidratar totalmente la molécula por 8 horas mínimo antes de su utilización, para evitar variabilidad en la viscosidad de las dispersiones coloidales (McHugh D, 2000).

### 3. Justificación Académica

Como una alternativa al uso indiscriminado que se ha hecho de los antibióticos ya sea para la prevención o control de enfermedades que ha provocado resistencia a estos productos, se propone la adición de bacterias ácido lácticas microencapsuladas a los cultivos larvarios de *Litopenaeus vannamei*.

Hasta ahora los reportes utilizando lactobacilos son escasos y se han limitado a la evaluación de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* (Chiu et al., 2007) en peces y camarones y sólo un estudio con *Lactobacillus acidophilus* en tilapia.

En especial *L. acidophilus* es una especie ampliamente utilizada en alimentos y se cuenta con cepas resistentes a condiciones de proceso y condiciones ambientales, por lo que sería interesante evaluarla en el larvicultivo, suministrándola por dos métodos de microencapsulación.

### 4. Preguntas de investigación

¿Cómo afectan el tipo y las condiciones de encapsulación, la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus*?

¿Cuál es el comportamiento de las microcápsulas en un medio de cultivo simulado y cuál es la viabilidad de *L. acidophilus* una vez que se liberó al medio?

¿Qué efecto tiene la adición de cada tipo de microcápsulas de *L. acidophilus*, en los parámetros de crecimiento, supervivencia y calidad de las larvas de camarón blanco?

## 5. Hipótesis

No existe diferencia en la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado por efecto de tipo de microencapsulación.

No existe diferencia en los parámetros de crecimiento, supervivencia y calidad de las larvas de camarón blanco por el tipo de microcápsulas suministradas conteniendo el probiótico.

## 6. Objetivo General y Específicos

Objetivos: Evaluar el efecto del tipo de microencapsulación: Por emulsión múltiple o en una matriz de proteínas polisacáridos, secados por aspersion, en la viabilidad de *L. acidophilus* y su resistencia en condiciones de cultivo larvario simulado.

Determinar el efecto que ejerce cada tipo de microcápsula en los parámetros de crecimiento y supervivencia de las larvas de camarón blanco *Litopenaeaeus vannamei*.

Específicos:

1. Determinar las condiciones de elaboración y el tipo de emulsificantes para obtener una emulsión múltiple.
2. Determinar el efecto sobre la viabilidad del probiótico en emulsión múltiple, al ser secada por aspersion.
3. Evaluar la viabilidad de *L. acidophilus* microencapsulado en una matriz de proteínas-polisacáridos secado por aspersion.
4. Determinar el efecto de los probióticos microencapsulados en los parámetros de calidad del cultivo larvario.

## 7. Materiales y Métodos

Se realizó la microencapsulación de una dieta artificial para larvas de camarón (Gallardo, 2002), así como la microencapsulación del probiótico *Lactobacillus acidophilus* por dos métodos diferentes que se describen a continuación.

### 7.1 Microencapsulación del probiótico por emulsión múltiple.

#### 7.1.1 Materiales

Los materiales utilizados fueron: una cepa probiótica comercial liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* Florafit NCFM (Danisco México S. A. de C. V.) y como materiales encapsulantes: proteína aislada de suero de leche (WPI) con 95-97% de proteína (Bipro Davisco Foods International Inc., EUA), pectina cítrica (P) (Grindsted RS 400, Danisco Mexicana, S. A. de C. V., México) y carboximetilcelulosa sódica (CMC) (Aqualon Cellulose gum CMC, 7LF PH, Hércules Incorporated, EUA). Como prebióticos: Inulina y aguamiel concentrado. Como medios de cultivo se utilizaron: agar MRS (Difco Lactobacilli MRS broth y Difco Lactobacilli MRS agar, EUA); como fase continua: aceite de canola y mezclas de los emulsificantes Tween 80 y Grinsted RS 400 (Danisco México S.A. de C.V.).

#### 7.1.2 Formación de la emulsión

En esta técnica, un volumen de una suspensión de células de *L. acidophilus* (fase acuosa interna  $W_1$ ), fue añadida a un volumen de aceite vegetal que contenía tensoactivos (fase oleosa O), entonces, la mezcla fue homogeneizada para formar una emulsión agua en aceite ( $W_1/O$ ), esta emulsión primaria a su vez fue añadida y homogeneizada a un volumen definido de una mezcla de biopolímeros los cuales formaron la fase acuosa externa  $W_2$  y así finalmente obtener la emulsión múltiple ( $W_1/O/W_2$ ) la cual fue sometida a un secado por aspersion en un secador Mobile Minor (Niro atomiser Copenhagen, Denmark), equipado con un atomizador centrífugo rotatorio. La dispersión fue alimentada al secador por aspersion a una tasa de 20 mL/min, con una presión de 2 bar, y con una temperatura del aire de entrada de  $170 \pm 5$  °C. El tamaño de partícula

de las microcápsulas fue determinado con un analizador Malvern serie 2600 (Malvern Instruments, Malvern Works, UK.) (Pedroza-Islas et al., 1999). La cantidad de microorganismos en las microcápsulas fue de  $10^9$  UFC/g.

## 7.2 Microencapsulación de probióticos en una matriz de proteína-polisacáridos

Se preparó una dispersión acuosa al 25% de sólidos, con una mezcla de proteína aislada de suero de leche, pectina y carboximetilcelulosa (Villa M., 2008) a la que se le añadió un cultivo de *L. acidophilus*, esta dispersión fue alimentada a un secador por aspersión para obtener finalmente *L. acidophilus* microencapsulado con una concentración de  $10^9$  UFC/g de producto. El WPI se sometió a tratamiento térmico 80°C/30 min según lo sugerido por (McHugh y Krochta, 1994), antes de ser mezclado con los polisacáridos.

### 7.2.1 Formación de las microcápsulas

Las dispersiones probióticos-biopolímeros-prebióticos, fueron secadas en un secador por aspersión Niro Mobile Minor (Niro Atomizer Copenhagen Denmark) equipado con un disco rotatorio de 24 cavidades bajo las siguientes condiciones: Temperatura de entrada 170 °C, temperatura de salida 60 °C , presión de aire 3 bar y flujo de alimentación de 25 mL/min. La cantidad de microorganismos en las microcápsulas fue de  $10^9$  UFC/g.

### 7.2.2 Producción de biomasa del probiótico

El cultivo puro liofilizado se inoculó en leche y se mantuvo a 37°C por 72 horas en condiciones anaerobias, una vez activado el microorganismo se tomó una asada del cultivo y se sembró en placa de agar MRS, incubándolo a 37 °C por 24 horas en condiciones anaerobias. Posteriormente se realizó una siembra masiva en placa.

### 7.2.3 Preparación del inóculo y dispersión

Una vez producida la biomasa bacteriana, se tomaron asadas y se resuspendieron en un frasco de dilución con 75 mL de agua estéril, hasta lograr una dispersión con una absorbancia de 1.5 nm, equivalente a una concentración celular de  $10^9$  UFC/mL. Esta cantidad de bacterias, se corroboró por siembra en agar MRS. Ya preparado el inóculo, se adicionó a la dispersión de polisacáridos. La mezcla probióticos-biopolímeros-prebióticos, se homogeneizó dos veces y se tomó una muestra para cuantificar las UFC/mL en la mezcla.

### 7.2.4 Viabilidad antes del secado (inóculo)

Se determinó la viabilidad por medio de diluciones seriadas (hasta  $10^9$ ) y siembra en placa ( $37^\circ\text{C}$ , 24 h), se eligieron las placas con crecimiento del organismo para la adecuada cuantificación de las UFC y se procedió al conteo según la NOM-092-SSA1-1994.

### 7.2.5 Viabilidad bacteriana después del secado

Esta evaluación se realizó tomando 1 g de los polvos obtenidos y rehidratándolos en 100 mL de agua bidestilada estéril por 30 minutos. Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la solución y se realizaron diluciones seriadas y siembra en placa (100  $\mu\text{L}$ ) incubando a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas para determinar las UFC/ml.

### 7.2.6 Viabilidad por ensayo de fluorescencia.

Además se determinó la viabilidad de la bacteria después de un año en almacenamiento de las microcápsulas, por medio de un ensayo basado en fluorescencia, usando un kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L-13152, que tiñe a las células vivas y muertas de manera diferente, cuantificando con un lector de microplacas de fluorescencia BIO-TEK Synergy HT.

### 7.3 Microencapsulación de una dieta microparticulada para *L. vannamei*.

Se preparó una dieta artificial formulada de acuerdo con Gallardo (2002) con modificaciones (tabla 1).

Las microcápsulas fueron obtenidas utilizando una mezcla encapsulante de polisacáridos (Pedroza-Islas et al., 1999; Pedroza 2000.) En la tabla 1 se indican los porcentajes en peso (%p/p) así como la cantidad en gramos de cada material utilizado.

#### 7.3.1 Materiales

Tabla 1. Formulación basal de la dieta (%) y peso (g) para la elaboración de las microcápsulas con dieta para *L. vannamei*.

Ingredientes	% en peso	Gramos
Harina de Pescado	5.06	34.18
Harina de Camarón	5.58	25.4
CPSP	46.6	38.83
Levadura	3.77	3.1416
Harina de soya	3.89	3.241
Almidon de trigo	0.93	0.775
Aceite de hígado de bacalao	7.11	5.925
Colesterol	0.54	0.45
Vitaminas	2.23	1.858
Rovimix C	0.19	0.158
Lecitina de soya	2.12	1.766

Talco (relleno)	1.85	1.541
Materiales encapsulantes		
Goma Arábica	4.6596	7.766
Goma Mezquite	2.4	4.0
WPI	9.6996	16.16
Alginato de sodio	0.97	1.616
Maltodextrina	2.4	4.0

CPSP: Hidrolizado de pescado con 70% de proteína

WPI: Proteína aislada del suero de leche.

Se cambió la harina de pescado y camarón, por filete y camarón crudo considerando el cálculo de base seca a húmeda, para lo cual se determinó el porcentaje de humedad de dichos materiales. También se consideró para los cálculos la proporción 2:1 de materiales encapsulantes:dieta, con el fin de mantener el poder encapsulante de la dieta de acuerdo a Pedroza Islas et al.(2000).

Para la elaboración de las microcápsulas se adicionó el CPSP 70% en la mezcla de materiales encapsulantes con el fin de incrementar el contenido final de proteína en la dieta. El contenido de sólidos totales del líquido a secar se mantuvo en 25% y se usó un secador Niro Mobile Minor (Nitro Atomizer Copenhagen Denmark) equipado con un disco rotatorio de 24 cavidades y bajo las condiciones que se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones empleadas durante el secado para la obtención de las diferentes microcápsulas.

Tratamiento	D	DP1	DP2
Presión	2 bar	3 bar	3 bar
T entrada	180-185 °C	170 °C	175-180 °C
T salida	110 °C	60 °C	80°C
Vel de flujo	20-25 mL/min	25 mL/min	25 mL/min

D- Dieta microencapsulada

DP1- Probiótico micoencapsulado por método de coacervación

DP2-Probiótico micorencapsulado por emulsión múltiple

T- temperatura

### 7.3.2 Análisis fisico-químicos de las microcápsulas

#### 7.3.2.1 Estructura y forma

Para esta evaluación, las microcápsulas se cubrieron con grafito por medio de un evaporador de metales, las microcápsulas cubiertas se observaron a través de un microscopio electrónico de barrido SEM Jeol modelo. JSM-6030LV y el Metalizador es un Denton Vacuum mod. DESK-II COLD SPUTTER/ETCH.\*\*\*

#### 7.3.2.2 Flotabilidad

Los tiempos de sedimentación se evaluaron de acuerdo a Pedroza-Islas *et al.* (2000), registrando la cinética de flotabilidad, para lo cual se suspendió 0.1 g de microcápsulas en la superficie de 10 mL de agua de mar contenida en una celda para espectrofotómetro Spectronic 20 de Baush and Lomb y se tomaron

lecturas del porcentaje de transmitancia cada minuto, a una longitud de onda de 395 nm, hasta que los valores dejaron de disminuir o se obtuvieran valores menores al 10%.

La constante de tiempo de flotación no debe ser menor a 5 minutos. Hay que considerar que para su determinación se empleó una columna de agua estática, siendo que en la práctica la aireación permite una mayor disponibilidad de las microcápsulas favoreciendo la captura por las larvas de camarón. La cinética de flotabilidad así como la metodología para la determinación del porcentaje de flotabilidad se pueden observar en el Anexo 1.

Se realizaron curvas de % de transmitancia vs tiempo, las cuales se analizaron usando Excel Mac<sup>®</sup> 2008 para la determinación de la constante de tiempo de flotabilidad,  $\tau_f$  de acuerdo a la ecuación exponencial:

$$f = 100 e^{-t/\tau_f}$$

Donde:

$f$  = flotabilidad (porcentaje de transmitancia)

$t$  = tiempo (minutos)

Modelo de decaimiento cinético de primer orden (Pedroza-Islas *et al.*, 2000), Anexo 1.

#### 7.3.2.3 Solubilidad de las microcápsulas.

La disolución de las microcápsulas fue determinada al adicionar 0.3 g de microcápsulas en 6 tubos que contenían 25 mL de agua de mar (30 ppt, pH 8), los cuales se colocaron en baños de agua a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . Esta temperatura correspondió a la mantenida en las granjas comerciales de larvas de crustáceos. Posteriormente se fueron retirando tubo a tubo del baño de agua a los 15, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos y el contenido de los tubos fue

filtrado al vacío con un filtro Whatman No. 40. El papel fué secado a 60°C hasta peso constante (Jayaram y Shetty, 1981), y la cantidad de disolución de las microcápsulas fue calculado con base en un balance de materia. Las determinaciones se realizaron por duplicado (Pedroza-Islas, 2000).

#### 7.3.2.4 Tamaño de partícula

Las medidas volumétricas de los tamaños de partícula de las microcápsulas fueron determinadas con un analizador de tamaños de partícula serie 2600 (Malvern Instruments, Malvern, Worcs, UK.)

## 7.4 Bioensayos

Se realizó un bioensayo para la sustitución total del alimento vivo a partir del estadio Protozoa I hasta Mysis I, utilizando para la alimentación una dieta microencapsulada y probióticos microencapsulados por dos métodos diferentes. Se montó el experimento para la evaluación de los cuatro tratamientos siguientes:

Tratamiento 1: Dieta microencapsulada sin probióticos.	D
Tratamiento 2: Dieta microencapsulada con probióticos encapsulados por método 1 ( Matriz de proteínas polisacáridos)	DP1
Tratamiento 3: Dieta microencapsulada con probióticos microencapsulados por método 2 (Emulsión múltiple)	DP2
Tratamiento 4: Control de alimento vivo	C

Origen de las larvas y condiciones generales de cultivo.

Las larvas utilizadas para los experimentos se obtuvieron de reproductores cultivados en la UMDI-Sisal Yucatán México. Los animales fueron cosechados e inmediatamente aclimatados a 28°C que es la temperatura del agua de mar utilizada en el laboratorio. Tanto la temperatura como la salinidad se mantuvieron constantes, 28 °C y salinidad de 35.

Los nauplios fueron dotados de una dosis inicial de alimento vivo únicamente para el arranque de la alimentación y después a partir de PZ<sub>1</sub> los tratamientos D, DP1 y DP2 se continuaron para la sustitución total del alimento vivo y el control C fue llevado a cabo siguiendo el esquema de alimentación Granvil y Yates (1990) descrito en la tabla 3.

Tabla 3. Proporción de fitoplancton y zooplancton para alimentación larvaria de *L. vannamei*.

Estadio	<i>Chaetoceros gracilis</i>	<i>Tetraselmis chuii</i>	<i>Artemia</i> sp
	Cel /mL	Cel/mL	Cel/mL
PZ <sub>1</sub>	40 000	10 000	---
PZ <sub>2</sub>	75 000	10 000	---
PZ <sub>3</sub>	85 000	25 000	0.2
M <sub>1</sub>	60 000	25 000	1.0

Dosis de alimentación para la cría larvaria.

Diversos autores han propuestos distintas dosis de alimentación con dietas microencapsuladas las cuales van de 0.16 a 0.44 mg larva<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> tanto para sustitución parcial como total de alimento vivo, en este trabajo se estableció un esquema de alimentación derivado de los resultados obtenidos en los dos primeros experimentos (preliminares) y que fueron aplicados a los tratamientos D, DP1 y DP2 en el tercer experimento (tabla 4). La alimentación del control de alimento vivo se mantuvo siguiendo el esquema propuesto por Granvil y Yates (1990) descrito anteriormente en la Tabla 3.

Tabla 4. Dosis de alimentación propuestas para diferentes especies.

Estadio	Especie	Dosis (µg larva <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Dieta	Autor
PZ <sub>1</sub> a PL <sub>1</sub>	<i>P. monodon</i>	0.16	Microencapsulado	Bautista et al., 1989.
PZ <sub>1</sub> a PL <sub>1</sub>	<i>M. japonicus</i>	0.44	Microencapsulado	Jones et al., 1979b.
PZ <sub>1</sub> a PZ <sub>3</sub>	<i>M. japonicus</i>	0.025	Microencapsulado	Besbes, 1987.
PZ <sub>3</sub> a M <sub>3</sub>		0.043		

#### 7.4.1 Evaluación biológica (Parte Experimental)

Las larvas se colocaron en 32 contenedores de 2 L (ocho matraces de cada tratamiento) en donde se colocaron 100 larvas, éstos se sumergieron dentro de un baño de agua el cual se mantuvo controlado termostáticamente a  $28 \pm 1$  °C, además de que se equiparon con un tubo para la aereación. Los matraces, se llenaron con agua de mar a 35 ‰ la cual se filtró previamente a través de arena y filtros de cartucho de 20 y 5  $\mu\text{m}$  (Simões *et al*, 2002) y se esterilizó con luz ultravioleta y mantuvo a un pH de  $8.0 \pm 0.2$ .

Se mantuvo un fotoperiodo 12:12 luz: oscuridad. La frecuencia de alimentación de las dietas fue cada cuatro horas (8:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00 y 4:00)

#### 7.4.2 Indicadores zootécnicos

##### Crecimiento e Índice de desarrollo

El índice de desarrollo (ID) se evaluó en el desmante de tres de los ocho matraces de cada tratamiento en el subestadio  $\text{Mysis}_1$ , para lo cual se tomaron 10 individuos de cada unidad experimental, mismos con los que se determinó el crecimiento mediante la obtención de la longitud y peso. El ID está definido por Villegas y Kanazawa (1979) como:

$$\text{I.D.} = \Sigma A / N$$

Donde A es el número de organismos de cada subestadio multiplicado por el número asignado a cada subestadio y N es el número total de larvas

examinadas en cada muestra. El valor absoluto asignado fue: Protozoa<sub>1</sub>=1, Protozoa<sub>2</sub>=2, Protozoa<sub>3</sub>=3, Mysis<sub>1</sub>=4, Mysis<sub>2</sub>=5, Mysis<sub>3</sub>=6, Postlarva<sub>1</sub>=7.

### Supervivencia

La supervivencia fue determinada al final de los experimentos contando las postlarvas producidas para cada tratamiento con relación al número de nauplios en subestadio N<sub>V</sub>.

### Crecimiento

El crecimiento se determinó midiendo la longitud total de diez larvas de cada tanque experimental. Las mediciones de PZ<sub>3</sub> se realizarán desde el frente del rostro (escotadura post-orbital) hasta el final del telson sin incluir las espinas, y el Mysis se midió del borde anterior del cefalotórax al final del telson, usando un microscopio binocular calibrado. Para la determinación del peso los organismos fueron secados con la ayuda de un papel absorbente y su peso se determinó con una microbalanza CAHN con 0.0001 mg de precisión. La tasa de crecimiento específico se calculó con los datos de longitud y de peso de acuerdo a (Bureau 2000) o por la metodología Tacon 1990.

TEC (%dia) =  $(\ln PF - \ln PI/t) * 100$  porque logaritmo?ajusta valores pues los homogeniza Normalidad y homogeneidad Verificaste el ajuste del modelo lineal y exponencial?

Donde TEC= Tasa específica de crecimiento; PF= Peso final; PI= Peso inicial y t= tiempo en horas. La misma fórmula será aplicada para la obtención de la TEC en longitud. Menos aún. El modelo para crecimiento ln talla es invariablemente lineal

### 7.4.3 Ensayo enzimático

#### Obtención de muestras y homogeneizado

Se tomaron 50 larvas ( $M_1$ ) de cada matraz de cada tratamiento para un ensayo enzimático (Le Moullac *et al.*, 1994). Las muestras de larvas fueron lavadas en agua destilada, e inmediatamente congeladas a  $-70^\circ\text{C}$  en microtubos de 1mL hasta la realización de los ensayos enzimáticos. Las muestras congeladas fueron homogeneizadas en 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Los homogeneizados fueron centrifugados a 13200 rpm por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante (extracto crudo) se usó inmediatamente para el análisis enzimático.

#### 7.4.3.1 Actividad enzimática

##### Tripsina

La actividad enzimática de la tripsina se midió de los homogeneizados crudos por la hidrólisis del sustrato de N- $\alpha$ -benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilida como sustrato (BAPNA, Sigma B4875) en un amortiguador o buffer TRIS 0.1M, a pH 8 y  $20^\circ\text{C}$ . Los cambios en la absorbancia fueron medidos durante dos minutos a 405 nm. Una unidad de actividad de tripsina corresponden a 1  $\mu\text{M}$  de p-nitroanilida liberada por minuto, basado sobre el coeficiente de extinción  $\epsilon_{405}=1.02 \text{ Lmmol}^{-1}\text{mm}^{-1}$  (Geiger, 1988; Geiger y Fritz, 1988).

##### $\alpha$ -amilasa

La actividad  $\alpha$ -amilasa calculada por el método de Bernfeld (1955), utilizando el glicógeno (Merck, cat V- 502102) como sustrato en un amortiguador fosfatos 10 mM a pH 7 y se lee a 540 nm. Una unidad de actividad amilásica es definida como los mg de maltosa liberados por minuto a  $37^\circ\text{C}$  por mg de proteína.

##### Proteasas totales

Las proteasas totales fueron medidas por la hidrólisis de la caseína amarilla (1% en un amortiguador fosfato 10 mM pH 7) a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora. La reacción fue bloqueada por ácido tricloroacético (TCA) al 5% para precipitar las

proteínas solubles. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue recuperado y mezclado en partes iguales con una solución de NaOH 0.5M, y se midió la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro (SPECTRONIC modelo 21D)

#### 7.4.3.2 Metabolitos (Composición bioquímica)

##### Proteínas soluble

La proteína soluble contenida será medida del extracto crudo por el método Bradford (Bradford, 1976) usando el Sigma Micro Protein Determination Kit (Procedimiento No. 610). Las muestras fueron leídas en un lector de microplacas Bio-Rad modelo 550 a una longitud de onda de 495 nm.

##### Acilglicéridos

Los acilglicéridos se evaluaron después de colocar 10  $\mu$ L del extracto en una microplaca de ELISA y se adicionaron 200  $\mu$ L de solución reactiva del kit comercial Sera-Pak, Cat 6684. El análisis colorimétrico enzimático fue hecho sobre el extracto crudo. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se registró la absorbancia a 540 nm. La concentración de acilglicéridos (mg/mL) es calculada con una curva patrón utilizando el estándar comercial obtenido con el kit.

##### Colesterol

Para el análisis del colesterol se colocaron 10  $\mu$ L de extracto en una microplaca y se adicionó 200  $\mu$ L de solución reactiva del kit comercial Sera-Pak, Cat 6670. El análisis colorimétrico-enzimático fue hecho sobre la muestra. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se registra la absorbancia a 540 nm. La concentración de colesterol (mg/mL) fue calculada con una curva patrón utilizando el estandar comercial obtenido con el kit.

Se evaluarán los contenidos de proteína soluble, colesterol y acilglicéridos (AG) como indicadores de la calidad larvaria ante los diferentes tratamientos

(Palacios, 1999, Fraser, 1989) pues se sabe que en la primeras fases del ciclo larval de camarones peneidos las larvas dependen en gran medida de las reservas energéticas endógenas y la mayor parte de ésta energía está en forma de triacilglicerol, la cual a su vez es aportada por fuentes exógenas y cuando ésta energía excede las demandas metabólicas de las larvas es almacenada en forma de TAG, misma que es utilizada cuando la energía del alimento (exógena) es insuficiente (Fraser, 1989).

#### 7.4.3.3 Respirometría (Consumo de oxígeno)

El consumo de oxígeno se determinó como un indicador para la evaluación de los diferentes tratamientos y su efecto sobre el balance energético, lo que permitirá entender como la energía proveniente del alimento es canalizada a la respiración, crecimiento, etc.

Para la evaluación del consumo de oxígeno ( $\mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g de larva}^{-1}$ ) las mediciones fueron realizadas en un sistema cerrado de consumo de oxígeno. Se colocó un organismo en cada cámara respirométrica RC-300 de un oxímetro (Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK), con 0.5 mL de agua de mar con la salinidad de 35 y a 28° C. Se conectaron doce cámaras respirométricas a un recirculador de agua a una temperatura de 28 °C (Fisher Scientific Isotherm Refrigerated circulator, modelo 900). Las lecturas se empezaron a tomar después de 30 minutos de aclimatación de las larvas a las cámaras. Las lecturas de 10 cámaras con organismos fueron registradas para el subestadio Mysis I en cada uno de los cuatro tratamientos. También se realizaron las lecturas de dos cámaras sin larvas para la corrección de los valores de la variación de oxígeno disuelto sin consumo por parte de las larvas. Una vez realizadas las mediciones del consumo de oxígeno, las larvas fueron lavadas con agua destilada y secadas a 60 °C hasta obtener un peso constante, para después ser pesadas individualmente utilizando una microbalanza (0.1  $\mu\text{g}$  CAHN-33).

#### 7.4.4 Análisis estadístico

Con el fin de comparar los resultados obtenidos de los diferentes indicadores como crecimiento, índice de desarrollo y supervivencia (zootécnicos), consumo de oxígeno (fisiología energética), actividad de enzimas y concentración de metabolitos entre los diferentes tratamientos, se llevaron a cabo análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) ( $p < 0.05$ ). La ponderación de diferencias encontradas entre tratamientos se llevó a cabo mediante una prueba pos hoc de Tuckey, de acuerdo a Zar, (1996) y Underwood, (1997). Los indicadores expresados en porcentaje fueron previamente transformados a raíz cuadrada de su arco seno.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Microcápsulas de probióticos por emulsión múltiple.

#### Viabilidad

##### Inóculo

Se obtuvo una concentración de  $1.16 \times 10^9$  UFC/mL, lo cual corroboró que el inóculo contenía la carga microbiana deseada.

##### Microcápsulas

Se obtuvo una concentración de  $6 \times 10^7$  UFC/g de microcápsulas después del secado.

#### Características fisicoquímicas

##### Tamaño de partícula

El valor promedio de las microcápsulas obtenidas fue de 12.032  $\mu\text{m}$ . Los datos obtenidos por el equipo se presentan en el Anexo 1.

##### Flotabilidad

El tiempo de sedimentación de las microcápsulas se evaluó de acuerdo a Pedroza (2000) y se registró la cinética de flotabilidad cuyos datos se presentan en el Anexo 2.

La constante del tiempo de flotación fue de 250 min.

##### Disolución de microcápsulas

Los porcentajes de disolución aumentaron progresivamente de 8.9% hasta 10.2% a los 240 minutos que duró la medición.

## 8.2 Microcápsulas de probióticos en matriz de proteínas-polisacáridos

### Viabilidad

#### Inóculo

Se obtuvo una concentración de  $1.24 \times 10^9$  UFC/mL, lo cual corroboró que el inóculo contenía la carga microbiana deseada.

#### Microcápsulas

Se determinó una concentración de  $2.9 \times 10^8$  UFC/g de microcápsulas después del secado, con lo que se confirma que se mantiene la viabilidad de la bacteria dentro del rango adecuado para que pueda ejercer sus beneficios (Kurmán y Rasic, 1991).

#### Características fisicoquímicas

##### Tamaño de partícula

El diámetro medio volumétrico de las microcápsulas fue de 18.125  $\mu\text{m}$ . Los datos obtenidos por el equipo se presentan en el Anexo 2.

##### Flotabilidad

La constante del tiempo de flotación fue de 250 min.

##### Disolución de microcápsulas

Los porcentajes de disolución aumentaron progresivamente entre 10.5% y después de cada 15 minutos hasta 13.1 % a los diferentes tiempos los cuales se observan junto con los porcentajes de disolución del método anterior en la Tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de disolución (%) de microcápsulas con probióticos.

Minutos	Disolución (%)	
	Coacervación	Emulsión múltiple
15	10.5	8.9
30	11.2	9.1
60	11.3	9.4
120	11.5	9.6
180	12.2	9.9
240	13.1	10.2

### 8.3 Dieta microencapsulada

Características fisicoquímicas.

Tamaño de partícula

El valor promedio de las microcápsulas obtenidas fue de 29.472  $\mu\text{m}$ . Los datos obtenidos por el equipo se presentan en el Anexo 3.

Flotabilidad

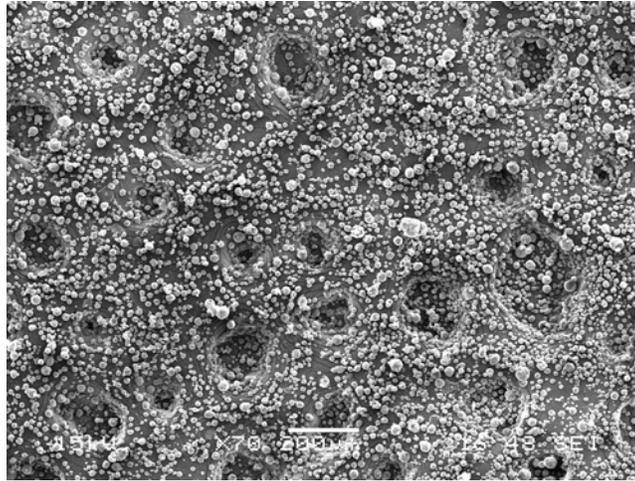
El tiempo de sedimentación de las microcápsulas se evaluó de acuerdo a Pedroza (2000) y se registró la cinética de flotabilidad la cual aparece en el Anexo 3.

Tabla 6. Características fisicoquímicas de las microcápsulas

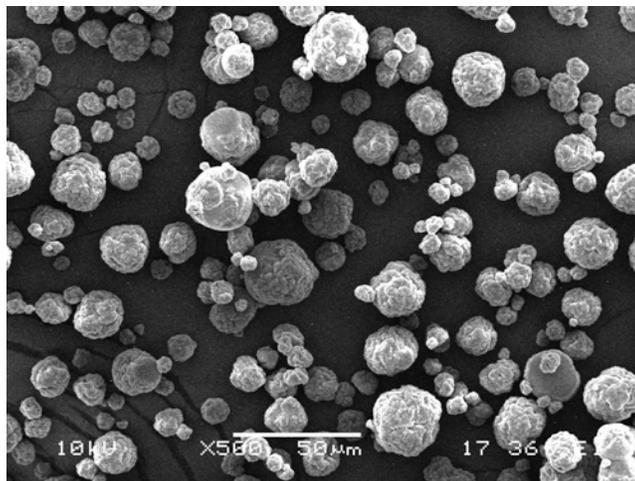
	Emulsión múltiple	Matriz proteínas polisacáridos	Dieta
Viabilidad antes del secado	1.16x10 <sup>9</sup> UFC/mL 100% viabilidad	1.24x10 <sup>9</sup> UFC/mL 100% viabilidad	---
Viabilidad después del secado	9.3x10 <sup>8</sup> UFC/mg 80% viabilidad	1.06x10 <sup>9</sup> UFC/g 85% viabilidad	---
Tamaño	12.032 µm	18.125 µm	29.472 µm
Flotabilidad	250 min	250 min	208.3 min
Solubilidad	---	13.1 %	10.2 %

Figura 1. Micrografías de microcápsulas suministradas a *Litopenaeus vannamei*

Microcápsulas de probiótico por método de coacervación.



COA 70X

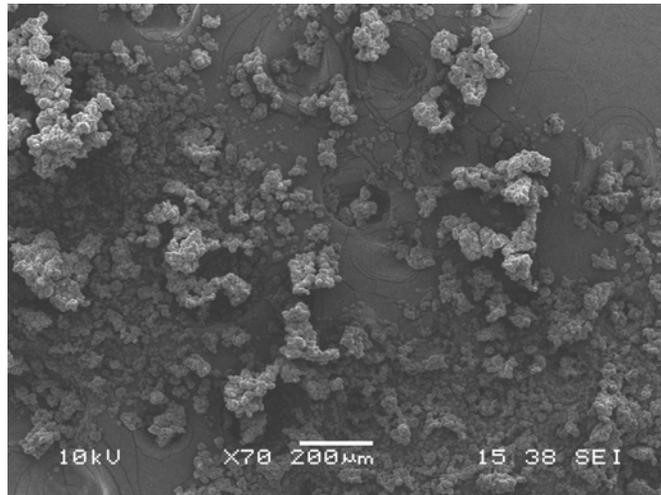


COA 500X

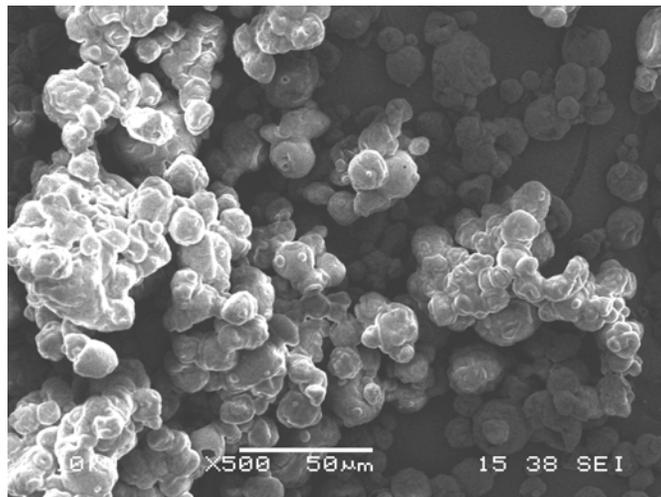


COA 3000X

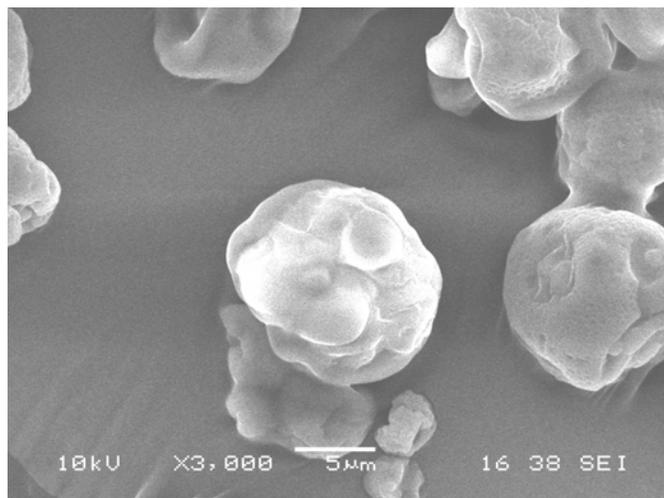
Microcápsulas por método de emulsión múltiple



EM 70X

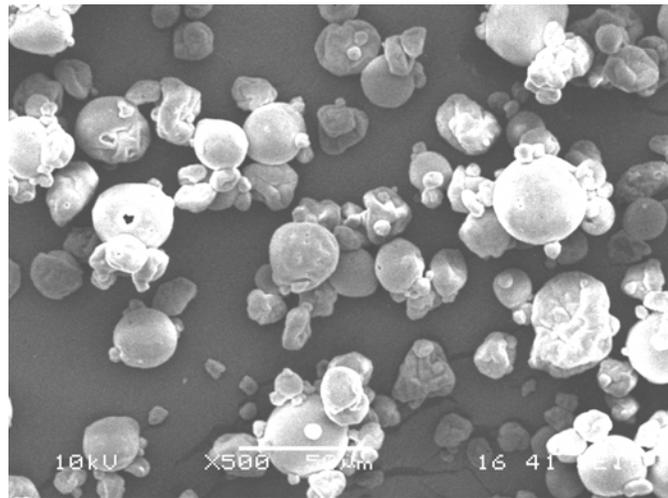
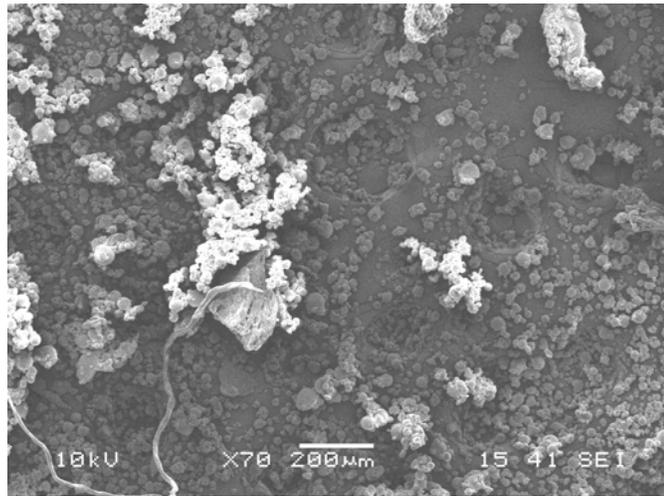


EM 500X



EM 3000X

# Microcápsulas de la Dieta



#### 8.4 Viabilidad del probiótico por ensayo de fluorescencia.

Se determinó la viabilidad de las microcápsulas con el probiótico mediante un ensayo de fluorescencia después de un periodo de almacenamiento de 10 meses en refrigeración.

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad del probiótico con los dos métodos de microencapsulación utilizados.

Microcápsulas	Emulsión múltiple	Matriz proteínas polisacáridos
Viabilidad inóculo	1.16x10 <sup>9</sup> UFC/mL	1.24x10 <sup>9</sup> UFC/mL
	100% Viabilidad	100% Viabilidad
Viabilidad microcápsulas	9.3x10 <sup>8</sup> UFC/g	1.06x10 <sup>9</sup> UFC/g
Cuenta en placa (2010)	80%	85%
Viabilidad por fluorescencia (%) 10 meses	2.9x10 <sup>8</sup> UFC/g (25%)	9.92x10 <sup>8</sup> UFC/g (80%)
Inóculo-2011		
Viabilidad cuenta en placa 10 meses	1x10 <sup>7</sup> UFC/g	6.4x10 <sup>7</sup> UFC/g
Inóculo-2011	10%	1%

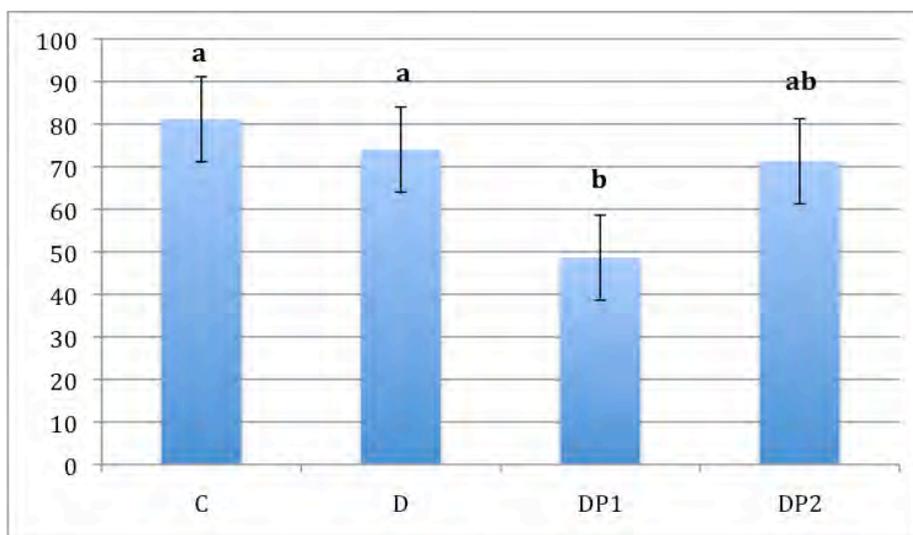
## 8.5 Bioensayos

Se llevaron a cabo tres experimentos para la evaluación de los diferentes tratamientos para la sustitución total de alimento vivo desde PZ<sub>1</sub> hasta PL<sub>1</sub>. Los tratamientos fueron la dieta microencapsulada (D), dieta microencapsulada con probiótico por el método de emulsión múltiple (DP1), dieta microencapsulada con probiótico por el método de coacervación (DP2), además del control con alimento vivo (C). Los resultados aparecen en el siguiente orden: Experimento 1, el cual se llevó a cabo hasta el estadio Mysis<sub>1</sub>, Experimento 2, llevado hasta la Postlarva<sub>1</sub> y finalmente el Experimento 3 el cual fue llevado también únicamente hasta el estadio de Mysis I.

### 8.5.1 Supervivencia

Experimento 1 ( de N<sub>5</sub> hasta M<sub>1</sub> )

El ANDEVA de una vía mostró que existieron diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia ( $P < 0.05\%$ ). Los mayores porcentajes de supervivencia fueron los obtenidos por las larvas mantenidas con los tratamientos D y C ( $P < 0.05\%$ ), y arrojando los valores mas bajos en la supervivencia los observados en el tratamiento DP1 mismos que se observan en la Gráfica 1.



Gráfica 1. % Supervivencia entre tratamientos en experimento 1 (llevado hasta Mysis 1)

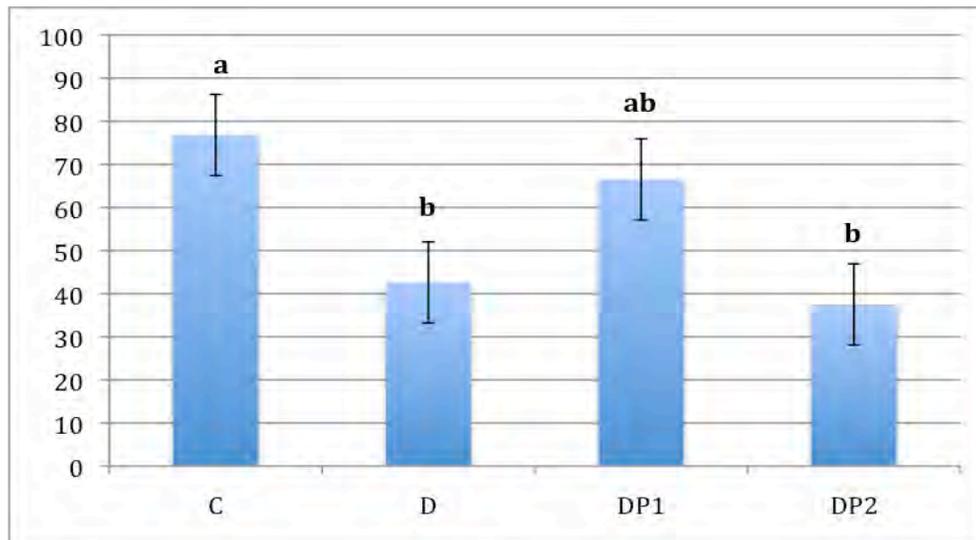
## Experimento 2 (llevado hasta la Postlarva 1)

### Supervivencia en Mysis 1

El ANDEVA de una vía arrojó que no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia ( $P > 0.05$ ) de las tres réplicas desmontadas para cada tratamiento al llegar al subestadio Mysis 1.

### Supervivencia en Postlarva 1

El ANDEVA de una vía mostró que existieron diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia de los diferentes tratamientos ( $P < 0.05\%$ ). El mayor porcentaje de supervivencia fue el obtenido por las larvas alimentadas con el tratamientos C, y observándose los valores más bajos en la supervivencia los obtenidos en el tratamiento DP2 Y D (Gráfica 2).

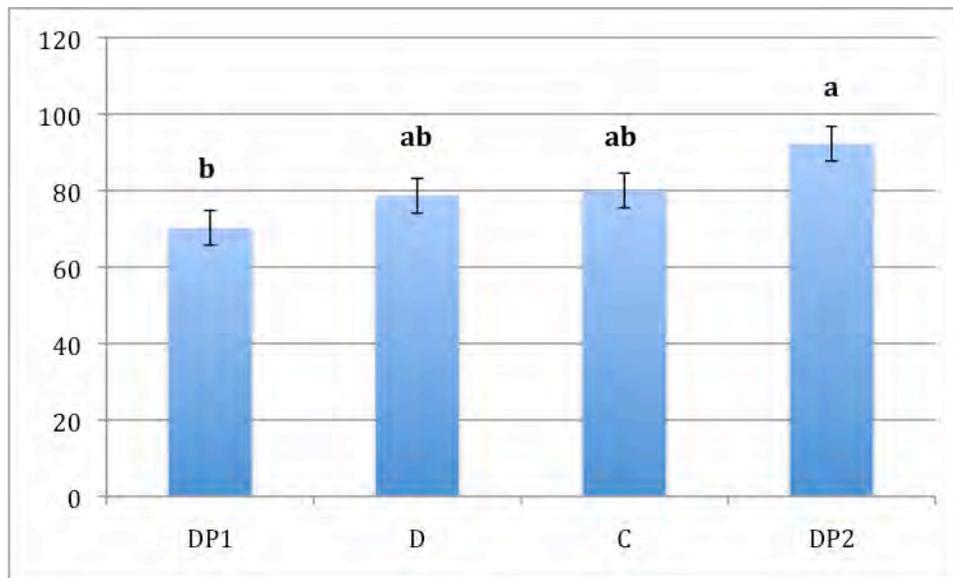


Gráfica 2. % Supervivencia entre tratamientos en experimento 2 (llevado hasta Postlarva 1)

## Experimento 3 (de N<sub>5</sub> hasta Mysis 1)

El ANDEVA de una vía mostró que existieron diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia ( $P < 0.05\%$ ). Los mayores porcentajes de

supervivencia fueron los obtenidos por las larvas mantenidas con los tratamientos DP2 y C ( $P < 0.05\%$ ), y arrojando los valores mas bajos en la supervivencia los observados en el tratamiento DP1 mismos que se observan en la Gráfica 3.



Gráfica 3. % Supervivencia entre tratamientos en experimento 3 (llevado hasta Mysis 1)

Tabla 8. Supervivencia de los tratamientos en los tres diferentes experimentos.

Tratamientos	D	DP1	DP2	C
Exp. 1 (M <sub>1</sub> )	74±30 <sup>a</sup>	48±25 <sup>b</sup>	71±11 <sup>a</sup>	81±12.6 <sup>a</sup>
Exp. 2 (M <sub>1</sub> )	47±18.52 <sup>a</sup>	56±34.6 <sup>a</sup>	63±26.4 <sup>a</sup>	82±12.2 <sup>a</sup>
Exp. 2 (PL <sub>1</sub> )	42.6±9.2 <sup>b</sup>	66±15.6 <sup>ab</sup>	37.5±19 <sup>b</sup>	76.8±9.4 <sup>a</sup>
Exp.3 (M <sub>1</sub> )	78.6±13.1 <sup>ab</sup>	70.25±24.8 <sup>b</sup>	92.25±4.4 <sup>a</sup>	80±11.3 <sup>ab</sup>

Medias±Desviación estandar y en supraíndice los resultados de las Anovas.

### 8.5.2 Índice de Desarrollo

#### Experimento 1

En cuanto al índice de desarrollo ID se observó un retraso significativo ( $P < 0.05$ ) en las larvas alimentadas con el tratamiento DP1 (ID de 3.03) que fué mayor a las 36 horas, respecto a las de los organismos de los tratamientos D (ID de 3.86) y C (ID de 4.4) que si llegó al subestadio  $M_1$ .

Tabla 9. Índice de desarrollo de los tratamientos en los diferentes experimentos.

Tratamiento	D	DP1	DP2	C
Exp. 1	3.86±0.49 <sup>ab</sup>	3.03±0.64 <sup>c</sup>	3.37±0.51 <sup>bc</sup>	4.44±0.4 <sup>a</sup>
( $M_1$ )	(146)	(158)	(150)	(122)
Exp. 2	4.06±0.11 <sup>ab</sup>	4.26±0.11 <sup>b</sup>	4±0 <sup>a</sup>	4±0 <sup>a</sup>
( $M_1$ )	(144)	(156)	(140)	(120)
Exp. 2	5.94±0.13 <sup>b</sup>	6.85±0.17 <sup>a</sup>	7±0 <sup>a</sup>	7±0 <sup>a</sup>
( $PI_1$ )	(204)	(210)	(200)	(194)
Exp.3	4.31±0.33 <sup>a</sup>	4.37±0.54 <sup>a</sup>	4.25±0.26 <sup>a</sup>	4±0 <sup>a</sup>
( $M_1$ )	(146)	(156)	(150)	(120)

Medias±Desviación estandar y en supraíndice los resultados de las Anovas. En paréntesis se muestra el tiempo en horas en que se realizó la medición.

## Experimento 2

### Indice de desarrollo en Mysis 1

Se observaron diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ ), presentando el mayor retraso el tratamiento DP1, respecto al tratamiento C, el cual osciló entre 24 y 36 horas siguientes a la medición del control, mismas que corresponden al inicio y final del paso de estadio.

### Indice de desarrollo en Postlarva 1

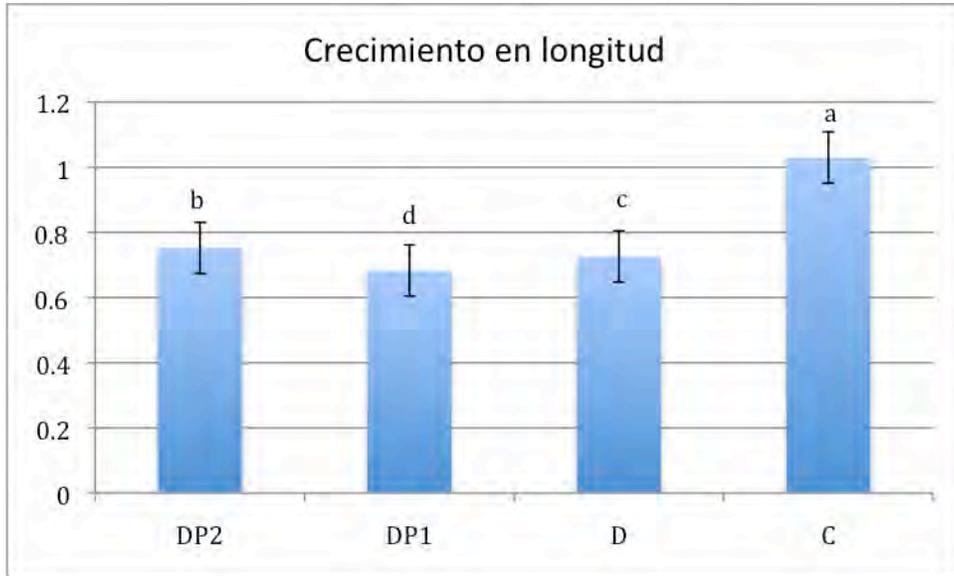
En cuanto al ID no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos DP1 y DP2 respecto al tratamiento C (control), sólo observándose por debajo de todos al tratamiento D, con un retraso de 10 horas respecto al control.

## Experimento 3

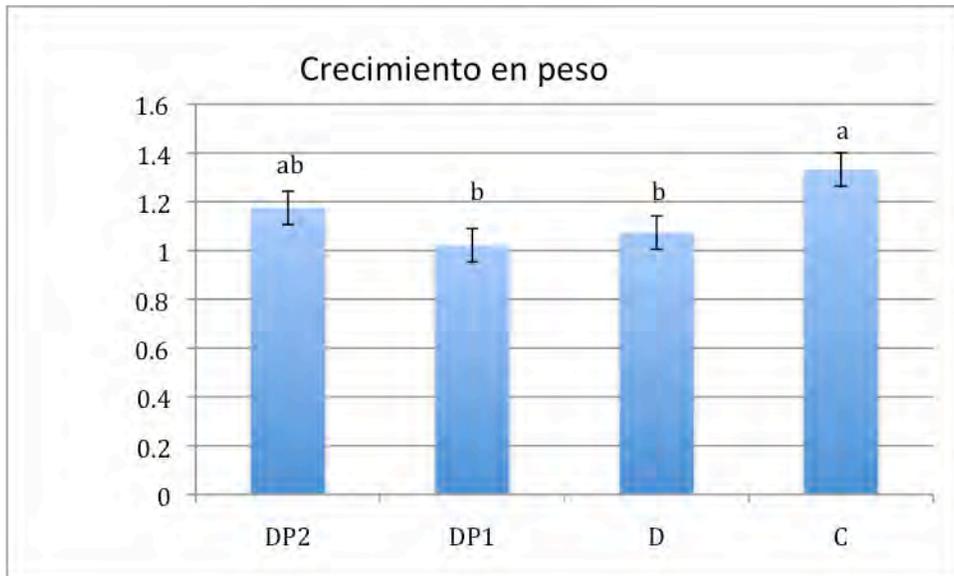
En este caso no se observó un retraso significativo en el índice de desarrollo ID entre las larvas alimentadas con los diferentes tratamientos ( $P < 0.05$ ), sin embargo se esperó entre 24 y 36 horas para hacer las mediciones del desarrollo, por lo que aún cuando el tratamiento estadístico no refleja diferencias en el ID, si existió una diferencia de tiempo para el cambio de estadio de los tratamientos DP1, DP2 y D respecto al Control.

### 8.5.3 Crecimiento

En cuanto al crecimiento en peso se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ) siendo los tratamientos D y DP1 los que obtuvieron los valores mas bajos. En cuanto al Crecimiento en longitud también se observaron diferencias significativas entre tratamientos, siendo el tratamiento DP1 el que obtuvo los valores mas bajos respecto al control.



Gráfica 4. % Crecimiento en longitud entre tratamientos en experimento 3 (llevado hasta M<sub>1</sub>)



Gráfica 5. % Crecimiento en peso entre tratamientos en experimento 3 (llevado hasta M<sub>1</sub>)

Tabla 10. Tasa de crecimiento absoluta (TCA), relativo (TCR) y específico (TCE) para el peso ( $\mu\text{g}$ ) de larvas de *L. vannamei* (Promedio  $\pm$  DS).

	Unidades	D	DP1	DP2	C
Peso inicial	$\mu\text{g}$	5 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0
Peso final	$\mu\text{g}$	23.54 $\pm$ 9.73	21.76 $\pm$ 14.17	29.1 $\pm$ 14.97	41.92 $\pm$ 15.46
CA	$\mu\text{g}$	28.54	26.76	34.1	36.92
TCA	$\mu\text{g}/\text{dia}$	3.62	3.34	4.47	5.68
CR	%	470	435	582	738
TCR	%/dia	72.43	66.95	89.53	113.6
TCE	%/dia	25.75	24.51	28.18	31.97

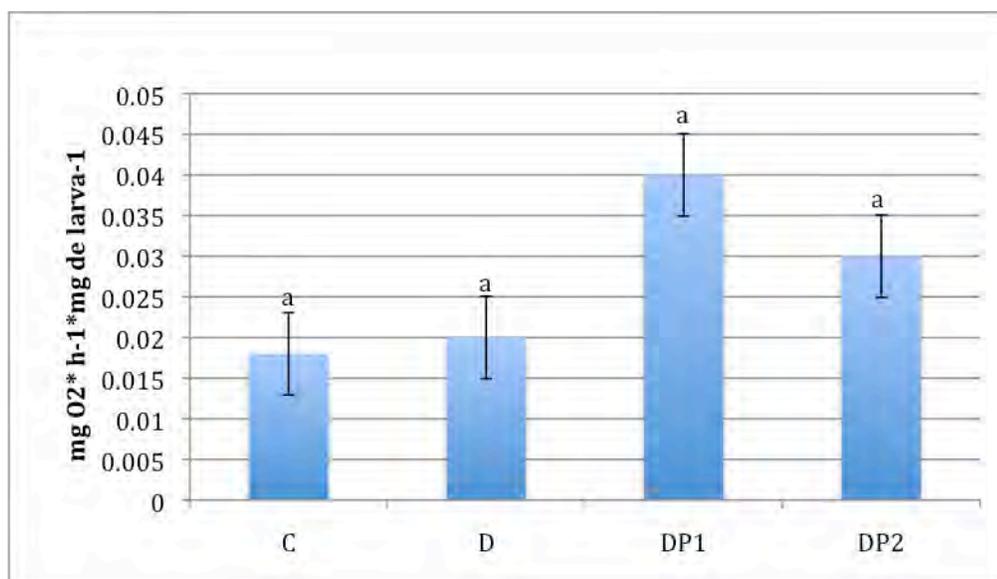
Tabla 11. Tasa de crecimiento absoluta (TCA), relativo (TCR) y específico (TCE) para la longitud (mm) de larvas de *L. vannamei* (Promedio  $\pm$  DS).

	Unidades	D	DP1	DP2	C
Longitud inicial	mm	0.85 $\pm$ 0	0.85 $\pm$ 0	0.85 $\pm$ 0	0.85 $\pm$ 0
Longitud final	mm	2.64 $\pm$ 0.17	2.48 $\pm$ 0.25	2.75 $\pm$ 0.17	2.98 $\pm$ 0.10
CA	mm	1.79	1.63	1.9	2.13
TCA	mm/dia	0.28	0.25	0.29	0.33
CR	%	211	192	224	251
TCR	%/dia	32.46	29.51	34.44	38.68
TCE	%/dia	17.42	16.39	18.05	19.32

#### 8.5.4 Fisiología energética de larvas de *Litopenaeus vannamei* (llevado a cabo únicamente en el Experimento 3)

##### Respirometría (consumo de oxígeno)

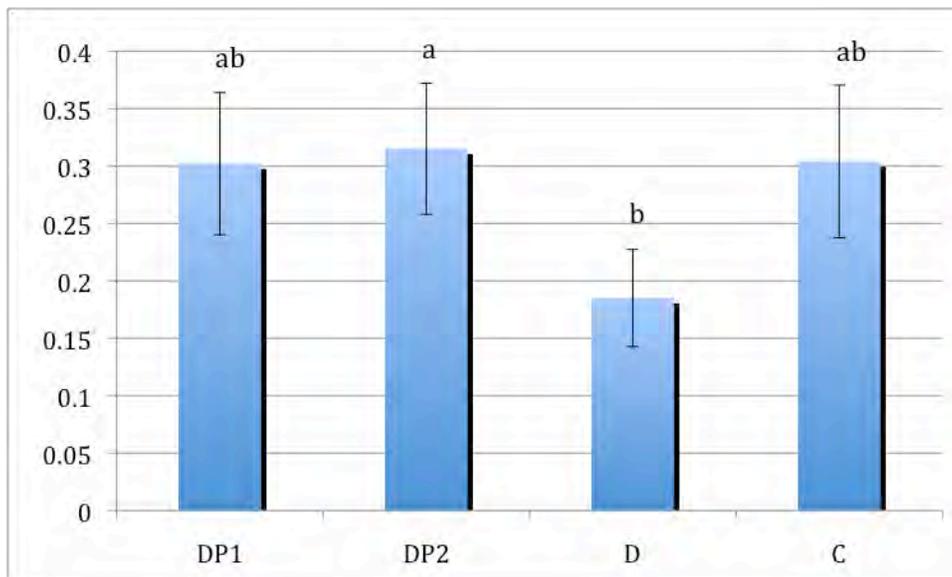
En el caso del consumo de oxígeno, éste no presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0.05$ ).  $\mu\text{g O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g de larva}^{-1}$



Gráfica 6. Metabolismo de las Mysis I de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con los diferentes tratamientos. Letras distintas representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N= 10 repeticiones por tratamiento.

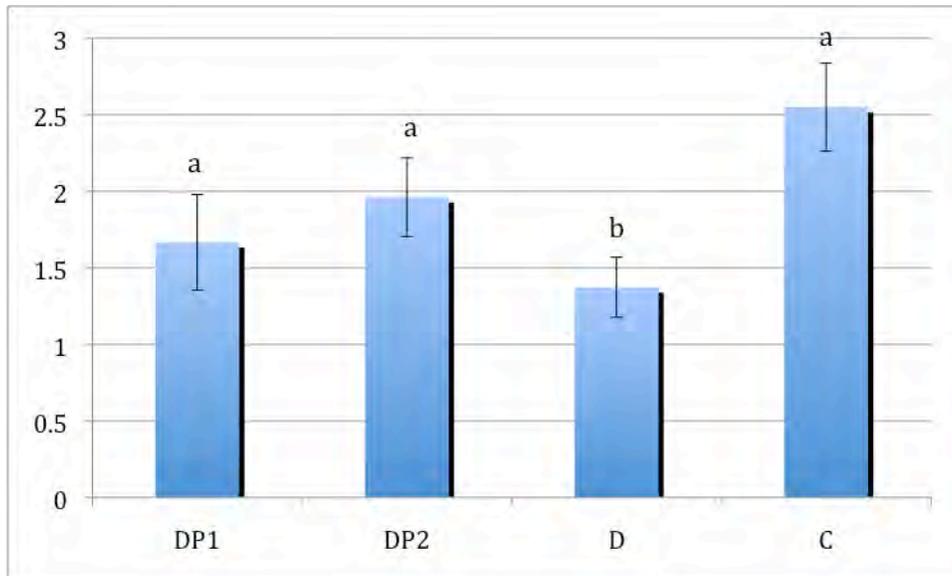
### 8.5.5 Actividad específica de enzimas digestivas

La actividad específica de las proteasas totales para el estadio de Mysis I presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de alimentación de acuerdo al análisis estadístico ( $P > 0.05$ ), presentando el valor más bajo en contenido de proteasas totales el tratamiento D y presentando el valor más alto el tratamiento DP2.



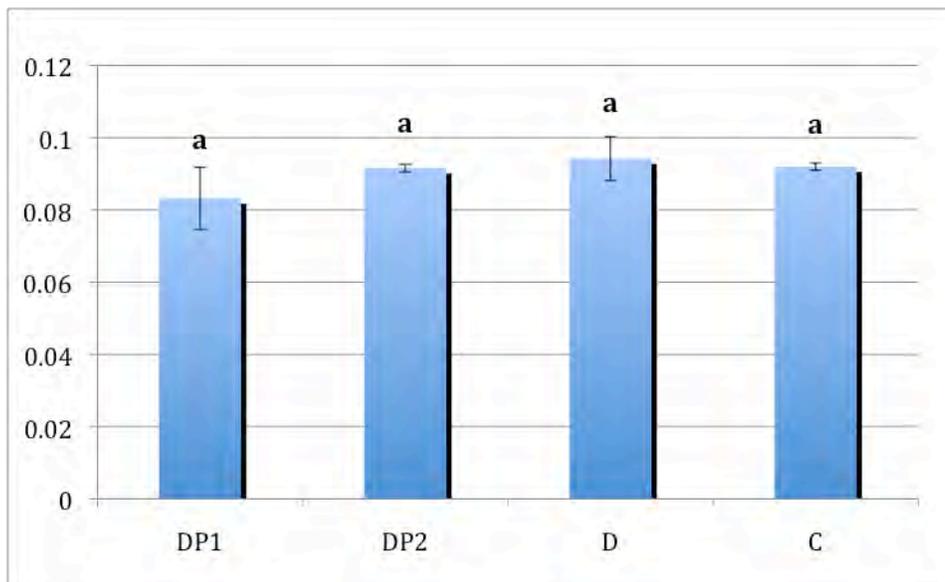
Gráfica 7. Actividad específica de las proteasas totales (mU/ larva) de las Mysis I de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con los diferentes tratamientos. Letras distintas representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N= 8 repeticiones por tratamiento.

Para la actividad específica de la Tripsina se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, siendo el tratamiento D el único diferente y menor que el control ( $P < 0.05$ ).



Gráfica 8. Actividad específica de la Tripsina (mU/larva) de las Mysis I de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con los diferentes tratamientos. Letras distintas representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N= 8 repeticiones por tratamiento.

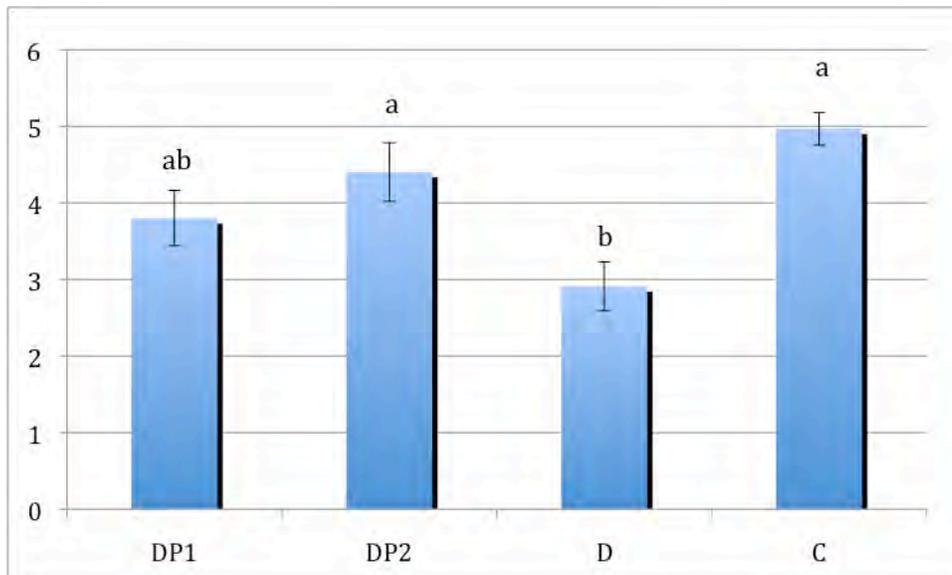
En el caso de la actividad específica de la amilasa se realizó un análisis no paramétrico con la transformación de datos y no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0.05$ ).



Gráfica 9. Actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa (U/larva) de las Mysis I de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con los diferentes tratamientos. Letras distintas representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N= 8 repeticiones por tratamiento.

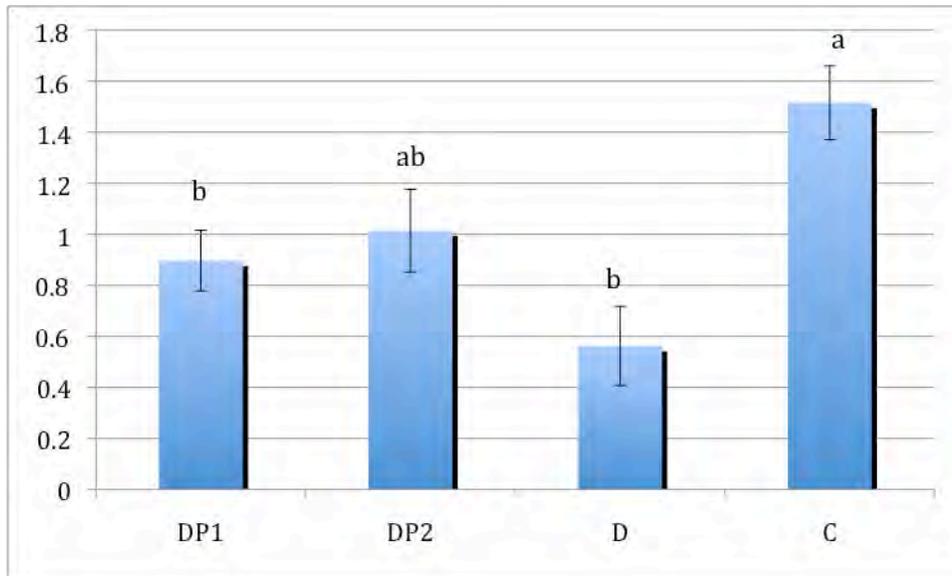
### 8.5.6 Contenido de proteína soluble, triglicéridos y colesterol.

Se encontraron diferencias en las concentraciones de proteína soluble por efecto del tipo de tratamiento ( $P < 0.05$ ), siendo el tratamiento D el que presentó significativamente el valor menor.



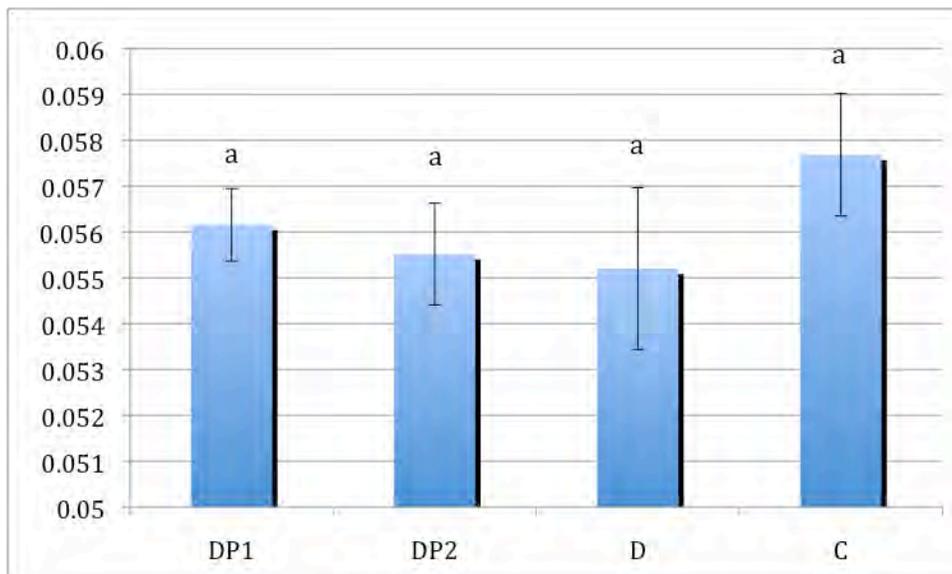
Gráfica 10. Contenido de proteína soluble ( $\mu\text{g/larva}$ ) de las Mysis I de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con los diferentes tratamientos. Letras distintas representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N= 8 repeticiones por tratamiento.

En el caso de los triglicéridos se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ), siendo el tratamiento D el que presentó el valor más bajo en contenido de acilglicéridos.



Gráfica 11. Contenido de Triglicéridos ( $\mu\text{g/larva}$ ) de las Mysis I de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con los diferentes tratamientos. Letras distintas representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N= 8 repeticiones por tratamiento.

Y finalmente mediante un análisis no paramétrico, con la transformación de datos, no se observaron diferencias significativas en el contenido de colesterol entre tratamientos ( $P > 0.05$ ).



Gráfica 12. Contenido de Colesterol ( $\mu\text{g/larva}$ ) de las Mysis I de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con los diferentes tratamientos. Letras distintas representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  E.S. N= 8 repeticiones por tratamiento.

## 9. Análisis de resultados

Viabilidad de las microcápsulas después del proceso y características fisicoquímicas.

Como se observa en la Tabla 6 se obtuvo la viabilidad en una concentración deseada antes y después del secado para ambas microcápsulas (emulsión múltiple y matriz de proteínas polisacáridos), pues en ambas la concentración del probiótico se mantuvo dentro del rango descrito en la literatura para que el probiótico pudiera multiplicarse en el tracto gastrointestinal y pueda ejercer los beneficios atribuidos a su presencia, pues aún cuando en el método de emulsión múltiple descendió un orden de magnitud ( $1 \cdot 10^8$ ), éste se encuentra en una concentración adecuada ( $10^6$ - $10^7$  bacterias/mL Kurmann y Rasic 1991, Bouhnik 1993).

Las microcápsulas obtenidas tuvieron tamaños adecuados para la alimentación en la etapa larvaria, semejantes a los tamaños del alimento vivo por lo que se asegura que éste podrá ser consumido por las larvas, recordando que las etapas larvarias van de PZ<sub>1</sub> a M<sub>1</sub> en dos experimentos y uno de PZ<sub>1</sub> a PL<sub>1</sub>. En éste último se observó que el tamaño de partícula de la dieta pudo ser inadecuado pues se observó un atraso en el desarrollo lo cual indicó que las larvas no estaban consumiendo el alimento por que necesitaban un tamaño de partícula mayor al suministrado pues hay que recordar que a partir del subestadio de Mysis éstas cambian de fitoplancton a zooplancton el cual tiene tanto un tamaño mayor como una fuente de proteína mayor y al no presentar un tamaño adecuado no estaban consumiendo el alimento aún cuando se ajustó la dosificación del alimento para esta etapa. Respecto al tiempo de Flotación observado para las tres microcápsulas (EM, Coacervación y dieta) en los tres casos fue satisfactorio y mucho mayor al esperado (250 min, 250 min y 208 min respectivamente) el cual es de 12 a 20 minutos pues el es tiempo que tarda desde que se consume el alimento y pasa por el tubo digestivo hasta que es desechado en forma de heces, lo que nos muestra que las microcápsulas son muy estables y se mantienen flotando en el medio con un tiempo adecuado para poder ser consumidas, además que hay que considerar

que la simulación fue en una columna de agua estática a comparación de las condiciones utilizadas en la práctica, donde la aereación permite una mayor disponibilidad de las microcápsulas al mantenerlas en movimiento, lo que favorece la captura de estas por las larvas de camarón.

Por último también se observa que ambas microcápsulas tienen una buena estabilidad en el agua, pues presentan porcentajes de disolución mínimos, manteniéndose estables a lo largo del experimento (240 min), pues se toma en cuenta que el tiempo estimado de la digestión de las larvas de camarón es de 12 a 20 minutos, y el porcentaje de disolución obtenido a los 240 minutos fue de apenas de 10.2 y 13.1% (Emulsión múltiple y matriz de proteínas polisacáridos respectivamente), lo que comprueba que las microcápsulas son estables en las condiciones de cultivo simuladas y se asegura que se le proporciona suficiente tiempo a la larva para un adecuado consumo del alimento con una pérdida mínima de nutrientes o materiales por disolución.

Viabilidad del probiótico por ensayo de fluorescencia a los diez meses de almacenamiento.

Como se puede observar en la Tabla 7 para ambas microcápsulas con el probiótico la concentración de éste se mantuvo adecuada después del secado, pues se obtuvieron concentraciones  $10^8$  para las microcápsulas por emulsión múltiple y  $10^9$  para las de matriz de proteínas polisacáridos, lo que indica que la viabilidad no es afectada por el proceso pues se mantiene en un 80 y 85% respectivamente. Los resultados obtenidos con el lector de microplacas de fluorescencia indicaron que después de 10 meses en almacenamiento, las microcápsulas por emulsión múltiple mantuvieron una viabilidad del 25% y las microcápsulas por matriz de proteínas polisacáridos mantuvieron un 80% de viabilidad, misma que traducida a UFC/g entra en la concentración buscada para la adición a las larvas de camarón.

Esta viabilidad, al ser comprobada por cuenta en placa, mostró resultados diferentes a las obtenidas por fluorescencia pues éstos sugieren que la

viabilidad del probiótico disminuyó dos órdenes de magnitud, de  $10^9$  a  $10^7$  en ambas microcápsulas lo que significa 1% de viabilidad, pero tanto la fluorescencia como el bioensayo demuestran que los datos obtenidos con las mediciones en placa no son 100% confiables ya que las larvas sobrevivieron mas en los tratamientos con probiótico (DP1 y DP2) que en el de sólo la dieta (D).

Ajuste de dosis de alimentación.

Partiendo de que *Litopenaeus vannamei* se alimenta de partículas de entre 5-50  $\mu\text{m}$  (Jones et al., 1979b) a diferencia de otras especies que aceptan tamaños de partícula menores (de 5 a 25  $\mu\text{m}$ ), para todas las especies el tamaño de partícula debe incrementarse con el desarrollo larval (Jones, 1998), y en especial cuando la alimentación cambia durante el inicio del estadio  $M_1$ , por eso, se decidió llevar el último experimento hasta Mysis y no hasta la postlarva, pues las microcápsulas elaboradas oscilaban entre 12-30 micrómetros, y si bien se sabe que las larvas son filtradoras y que necesitan de una densidad de partículas alimenticias en suspensión en el estadio de  $M_1$  son más selectivas y buscan alimentos con un mayor tamaño y pueden ser selectivos frente a diferentes alimentos (Kurmaly et al., 1989).

Ya tomada la decisión de llevar a cabo el tercer experimento hasta  $M_1$  tomando en cuenta tanto el tamaño de partícula de las microcápsulas así como el ajuste de la dosificación del alimento y probiótico, fué en éste en donde se llevaron a cabo todas las mediciones y determinaciones para poder definir si existieron diferencias entre tratamientos.

Tabla 10. Dosis propuestas para la alimentación del bioensayo, con ajustes entre ellos.

Estadio larval	mg de dieta/larva*día	mg de dieta/larva* día	Alícuota por toma (microlitros)	Alícuota por toma Probiótico (microlitros)
	Exp. 1	Ajuste**	Ajuste**	
		Exp. 2		
Zoea 1	.08	0.1	330 µL	260 µL
Zoea 2	0.1	0.2	660 µL	260 µL
Zoea 3	0.12	0.24	800 µL	260 µL
Mysis 1	0.32	0.32	1060 µL—2 alícuotas de 530 microlitros	400 µL

Efecto de los tratamientos sobre la supervivencia, índice de desarrollo, crecimiento y concentración de metabolitos, enzimas y consumo de oxígeno.

#### Supervivencia

Resultados en Tabla 8.

En cuanto a los resultados obtenidos hasta el estadio Mysis 1 para los Experimentos 1 y 2, se puede concluir que si existe una diferencia significativa en cuanto a supervivencia entre tratamientos, esto aún cuando se tuvo un gran cuidado en la manipulación, únicamente en el Experimento 2, no se presentaron éstas diferencias entre tratamientos hasta el desmonte de tres réplicas en el estadio de Mysis 1.

Para los Experimentos 1 y 3 (llevados hasta Mysis) el tratamiento que obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia fue el tratamiento C, sin embargo en el Experimento 3 además del tratamiento C el DP2 obtuvo los mayores porcentajes de supervivencia y en ambos experimentos el tratamiento DP1 fue el que obtuvo los menores porcentajes de supervivencia, lo cual puede indicar que los organismos alimentados con éste tratamiento no están asimilando la dieta o los probióticos con la misma efectividad que el tratamiento DP2.

Para el experimento 2 en el cual cinco réplicas de las ocho fueron llevadas hasta la Postlarva 1, se observó una diferencia significativa en cuanto a supervivencia entre tratamientos, mostrando la mejor supervivencia el tratamiento C y observándose la menor en el tratamiento DP2 misma que podría mejorarse si se controla más la calidad de agua, pues en este tratamiento se identificó una mayor contaminación del agua de los matraces con partículas suspendidas que dificultaban el nado de las larvas, por lo cual una medida para mejorar el resultado podría ser la realización de recambios de agua desde el subestadio Pz<sub>3</sub>.

Existen diversos reportes de sustitución total de alimento que indican altas supervivencias en larvas (mayores al 85%) utilizando dietas microencapsuladas (Jones et al., 1987; Amjad y Jones, 1992; Gallardo, 2005; Martínez, 2006), sin embargo un factor que puede ser determinante para éstos resultados y que debe ser tomado en cuenta es la calidad de las larvas, refiriéndose a esto en la calidad de los desoves u origen de los nauplios, pues la variabilidad en la calidad de éstos es determinante en la respuesta de los organismos afectando el crecimiento, desarrollo y supervivencia de estos. En el tercer experimento se obtuvieron las larvas de una sola hembra y se seleccionaron los organismos de mejor calidad mediante una prueba de fototaxia para intentar utilizar los organismos más sanos y de mejor calidad para el desarrollo del experimento, mismas precauciones que no fueron logradas en los primeros dos experimentos, de ahí que se decidió hacer un

tercer experimento para disminuir los factores que pudieran afectar el desarrollo y resultados del mismo.

### Indice de desarrollo

#### Resultados en Tabla 9

En los tres Experimentos el índice de desarrollo de los tratamientos D, DP1 y DP2 si presentó un retraso para llegar al estadio  $M_1$  respecto al control C, lo cual nos indicó que la alimentación o la manipulación fueron llevadas incorrectamente, aún cuando se hizo un ajuste en la dosificación de la alimentación y se controlaron mejor las condiciones para el Experimento 3, el desarrollo siguió siendo afectado por otros factores llegando a suponer que incluso la dieta pudo ser deficiente en cuanto a los requerimiento de las larvas.

En el Experimento 2, llevado hasta  $PL_1$  el ID obtuvo un resultado alentador, al no encontrar diferencias significativas entre los tratamientos DP1 y DP2 respecto al tratamiento C, mostrando un posible efecto del probiótico para lograr un desarrollo semejante al control del alimento vivo, pero únicamente hasta el desmonte en la  $PL_1$  lo que nos indica que el efecto del probiótico se logró hasta estadios mas avanzados y no se reflejaron en  $M_1$ .

En conclusión, se comprobó que en general hubo una supervivencia menor aún cuando se realizó un ajuste en la ración de alimentación, lo cual no nos explicó si los retrasos en el índice de desarrollo pudieron haber sido afectados por esto o tal vez sea necesario una reformulación de la dieta a microencapsular o quizás hasta mejorar la formulación de las microcápsulas para una mejor liberación de los materiales encapsulados.

### Crecimiento

Se determinó que existieron diferencias entre tratamientos en cuanto al crecimiento tanto en peso como en longitud, observando que en ambos casos

los tratamientos D y DP1 fueron los que presentaron los valores mas bajos en CA, TCA, CR, TCR y TCE de peso y longitud respecto al control lo cual confirma que estos tratamientos estan siendo afectados en su crecimiento (paso de PZ<sub>3</sub> avanzado hacia M<sub>1</sub>) lo cual ha sido confirmado en diversos trabajos y ha mostrado que la cuestión a resolver aún sigue siendo la concerniente al cambio de hábitos alimenticios de las larvas durante este periodo.

#### Concentración de metabolitos

Existió una respuesta de los organismos a los diferentes tratamietos en cuanto a concentración de los principales metabolitos, pues diferencias significativas fueron determinadas en el estadio M<sub>1</sub> para los contenidos de proteína soluble y triglicéridos, obteniendo los valores mas bajos el tratamiento D. Unicamente el colesterol no presentó diferencias de concentración entre tratamientos.

El bajo contenido observado de proteína soluble observado en el tratamiento D indica que los organismos recurrieron a las reservas proteicas para poder compensar el retraso o diferencia en crecimiento respecto al control y no fueron suficientes la utilización de las proteínas suministradas por la dieta aún aprovechando la alta actividad enzimática para la mayor utilización de éstas reservas proteicas.

Un suplemento adecuado de acilglicerones (AG) es esencial en la formulación de dietas balanceadas para larvas de camarón, pues éstos promueven el crecimiento, desarrollo y supervivencia durante su desarrollo (Anger 2001).

Los AG son la principal reserva de lípidos en las larvas, por lo que son necesarios para el mantenimiento de éstas, y fundamentalmente para la metamorfosis que ocurre en el cambio del estadio de PZ<sub>III</sub> a M<sub>I</sub>, pues en éste paso se agotan las reservas en los organismos.

La energía proveniente de las reservas endógenas es esencial durante las fases naupliares y primeros estadios de las larvas, el mayor depósito de ésta energía se encuentra en forma de triacilgliceroles (TAG) y durante esta etapa son consumidos hasta que el alimento exógeno cubre las demandas

energéticas del crecimiento y metabolismo, cuando la energía que proporciona ésta fuente de alimento excede las demandas de las larvas, se almacenan en forma de triacilgliceroles, sin embargo si el alimento es deficiente en éste tipo de energía, los triacilgliceroles son catabolizados para mantener el metabolismo basal de las larvas (Fraser, 1989).

Esto fue observado en el Experimento 3 pues se identificaron diferencias en el contenido de acilgliceroles entre tratamientos siendo el tratamiento D el que presentó los valores mas bajos, aún por debajo de los tratamientos DP1 y DP2 siendo que en éstos también fue proporcionada la misma cantidad de alimento solo con la inclusión del probiótico, lo que nos indica que aún cuando las larvas de éstos tratamientos estaban siendo afectadas por la falta de ésta fuente de energía para el cambio de estadio, estaba siendo reforzado por la inclusión de los probióticos que ayudaron a mantener los niveles de este componente de la dieta en el estadio M1.

Hasta aquí se pudiera decir que el retraso se deriva de una deficiencia en la calidad de la dieta, pues los tratamientos con probióticos presentaron diferencias significativas en el ID y únicamente hasta que se llevaron a postlarva no presentaron diferencias respecto al control, pues quiere decir que el probiótico está ayudando en el desarrollo más que el tratamiento con solo la dieta, por lo que se puede deducir que después del cambio de Zoea a Mysis que es el punto crucial para determinar los porcentajes de supervivencia las larvas que sobreviven están siendo beneficiadas por los efectos del probiótico al mejorar hasta casi igualar el desarrollo comparado respecto al control de alimento vivo confirmando con esto que el factor determinante sigue siendo el consumo de la dieta.

En el caso del colesterol, que no puede ser sintetizado por las larvas, debe ser aportado por el alimento pues deficiencias de éste metabolito tienen efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo de los organismos al ser un componente necesario para el metabolismo y ciclo de muda pues es precursor de las hormonas de muda y vitaminas (D), de ahí que afecte directamente el desarrollo de las larvas (Anger 2001). No se observaron diferencias entre los

tratamientos con respecto al control, lo que nos indica que la dieta no presenta deficiencias en la proporción de éste componente y que los niveles de éste en los organismos son los adecuados para mantener el metabolismo y ayudar en el proceso de muda.

### Enzimas digestivas

También se observó una respuesta de los organismos a los diferentes tratamientos en cuanto a concentración de enzimas digestivas, en el caso de la tripsina y proteasas totales se determinaron diferencias, siendo el tratamiento D el que presentó los valores mas bajos y para el caso de la amilasa, no se encontraron diferencias en concentración entre tratamientos respecto al control.

Existen cambios en la concentración de enzimas digestivas conforme se desarrolla las larvas de camarones peneidos (ontogenia), y existen cambios en la alimentación de éstas.

Durante los primeros estadios de PZ las larvas tienen un corto tiempo de retención del alimento, sin embargo presentan un tubo digestivo simple que secreta una gran cantidad de enzimas para llevar a cabo la digestión, aunque deben de ingerir gran cantidad de alimento, conforme la larva crece hacia M<sub>1</sub> la glándula digestiva se desarrolla y es el momento en donde cambia su alimentación de hervívora a carnívora, pues es en éste momento cuando tienen mayor tiempo de retención del alimento y lo asimilan mejor (Lovett y Felder, 1989; 1990a).

Se sabe que los mayores niveles de actividad enzimática se dan en los primeros estadios, que es cuando secretan una gran cantidad de enzimas para poder asimilar mejor su alimento (microalgas). Existen estudios donde se han obtenido tasas de crecimiento y supervivencia similares a las obtenidas con alimento vivo para *Litopenaeus vannamei* (Gallardo 2005; Shanga et al., 2000) cuando se suministran dosis pequeñas de microalgas al inicio de la cría

larval y en combinación con dietas microencapsuladas pues se ha comprobado que induce de manera significativa la actividad de las enzimas digestivas en los primeros estadios larvales (Jones *et al.*, 1997; Le Vay *et al.*, 1993).

En M<sub>1</sub> cuando se da el desarrollo de la glándula digestiva, las larvas son capaces de responder a cambios en la composición de las dietas, pero cuando algún nutriente está limitado en la dieta, ya sea por estar en baja concentración o ser indigerible para la larva, se induce una secreción enzimática con el objetivo de poder maximizar la hidrólisis de algún componente que esté limitado en la dieta o que posea una baja digestibilidad (Lovett y Felder, 1990<sup>a</sup>; Jones *et al.*, 1997).

Sin embargo en ningún caso se presentó la inducción significativa de alguna enzima, por el contrario se determinó una disminución en el tratamiento D en la concentración de la tripsina, enzima proteolítica necesaria para la hidrólisis del alimento, estando aún por debajo de los tratamientos DP1 y DP2, recordando que en éstos se suministró la misma dosis de alimentación que el tratamiento D únicamente con la adición extra de probióticos lo que demuestra que el probiótico si contribuye enzimáticamente para la digestión, el cual es un beneficio atribuido a esta bacteria (Farzanfar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Para los casos de las proteasas totales y amilasa no se presentaron diferencias respecto al control, lo que nos indica que los niveles son adecuados en este subestadio M<sub>1</sub> confirmando el posible efecto benéfico de los probióticos (contribución enzimática) para mantener los niveles de enzimas adecuados para una buena digestibilidad del alimento.

### Consumo de oxígeno

La medición del consumo de oxígeno bajo condiciones controladas en el desarrollo larval puede ser usado como un indicador de la condición fisiológica de las larvas en cultivo, reflejando el costo metabólico de la ingestión y absorción del alimento suministrado (Rosas *et al.*, 1995). La magnitud de éste

consumo de oxígeno depende de la calidad y tipo de alimento, así como de la condición fisiológica de las larvas utilizadas (Kurmaly et al., 1989). De esta manera un aumento en el consumo de oxígeno está relacionado a la acumulación de energía necesaria para los procesos involucrados en los cambios morfológicos durante el desarrollo larval.

En el caso de los valores obtenidos de consumo de oxígeno éstos no presentaron diferencias entre tratamientos ni respecto al control de alimento vivo, lo cual nos demuestra que la cantidad de energía o costo metabólico derivada del proceso de ingestión, digestión y asimilación del alimento consumido (microcápsulas) es similar a la requerida por las larvas del tratamiento control (alimento vivo).

## 10. Conclusiones

Se evaluó la estabilidad de las microcápsulas obtenidas por los dos diferentes métodos (Coacervación y Emulsión múltiple)

Se lograron características de estabilidad equivalentes entre ellas (Flotabilidad y porcentaje de disolución) por lo que se definió eran aptas para su uso en los bioensayos con las larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

En general se concluye que analizando los resultado de las características fisicoquímicas de las microcápsulas estas fueron adecuadas para poder ser suministradas a las larvas y realizar los bioensayos.

Las microcápsulas obtenidas por el método de coacervación fueron las menos afectadas en la viabilidad del probiótico por efecto del proceso.

Además mediante un método cuantitativo de fluorescencia se determinó que las microcápsulas que conservaron un mayor porcentaje de viabilidad del probiótico después de 10 meses en almacenamiento fueron las obtenidas mediante el método de coacervación (tratamiento DP1).

En conclusión se determina que ambas microcápsulas mantienen una viabilidad adecuada después del almacenamiento , sin embargo la que mejor mantiene esta viabilidad ya sea tanto por proceso como por almancenamiento son las microcápsulas obtenidas por matriz de proteínas polisacáridos, sin embargo aún cuando las microcápsulas obtenidas por emulsión múltiple conservan sólo un 25% de viabilidad ésta concentración del probiótico sigue siendo adecuada para poderse adicionar a las larvas de camarón.

Se determinó que ambas microcápsulas conservaron una concentración adecuada del probiótico para lograr los efectos atribuidos a éste.

Se evaluó el efecto del tipo de microencapsulación del probiótico en la supervivencia desarrollo y crecimiento de las larvas de camarón blanco *L. vannamei*.

El tratamiento que obtuvo los mejores porcentajes de supervivencia fue el que contenía las microcápsulas con probiótico obtenidas por el método de emulsión múltiple (DP2).

Se obtuvo un retraso general en el índice de desarrollo (de 24 a 36 horas) de los tratamientos probados ( D, DP1 y DP2) respecto al control, debido a una deficiencia en la formulación de la dieta.

Se obtuvo un resultado alentador en el desmorte del tratamiento DP2 (microcápsulas por método de Emulsión múltiple) en la PL<sub>1</sub>, pues en éste caso se logró un ID igual al tratamiento control, lo que comprobó un efecto benéfico del probiótico en las larvas que lograron pasar el cambio de estadio de PZ<sub>3</sub> a M<sub>1</sub>, pero que fue observado únicamente hasta los últimos estadios larvales, lo que indica que el efecto del probiótico tardó en verse reflejado hacia los primeros estadios.

La evaluación bioquímica de los tres experimentos reflejó que no existieron diferencias de actividad de la amilasa y proteasas respecto al control únicamente la actividad tripsina.

Los triglicéridos y proteínas totales si fueron diferentes al control, siendo el tratamiento D el menor respecto a éste, solo el colesterol no presentó diferencias significativas entre tratamientos.

Se comprueba en base a los resultados obtenidos de las evaluaciones de enzimas y metabolitos que la dieta está deficiente en lípidos a comparación del alimento vivo, el cual si les confiere a las larvas el aporte necesario de energía para lograr el cambio hacia M<sub>1</sub> y estando la dieta deficiente en este aporte se explica la dificultad de las larvas para lograr este cambio exitosamente.

Se propone una reformulación de la dieta, ajustando el aporte de lípidos en ella.

## 11. Referencias Bibliográficas

Ann E. Kim Y., Oh S., Imm J., Park D., Han K. Kim S. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International Journal of Food Science and Technology*. 2007, 42: 411-19.

Audet P., Lacroix C. y Paquin C. Continuous fermentation of a supplemented whey permeate medium with immobilized *Streptococcus salivarius* ssp. *Thermophilus*. *International Dairy Journal*. 1992, 2 (1), 1-15.

Balcázar J. Vendrell D., Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Muzquiz J., Girones O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 2008, 278: 188-191.

Balcázar J., Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz J. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 2006, 114: 173-186.

Bottomley R. C., Evans M. T. A., Perkinson C. J. Whey proteins. In: *Food Gels*, Ed. Elsevier, Havre. Peter. U.K. 1990, 435 pp.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976, 72, 248-254.

Briceño, A. Martínez, R., García, K. Viabilidad y actividad de la flora láctica (*Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*) del yogurth en Venezuela. *Acta Científica Venezolana* 2001, 52: 46-54.

Brito R., Chimal M., Gaxiola G. y Rosas D. Growth, metabolic rate and digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarvae fed different diets. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 2000, 255, 21-26.

Brito R., Rosas D., Chimal M.E. y Gaxiola G. Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early postlarvae. *Aquaculture Res.* 2001, 32, 1-10.

Buddington R., y Doroshov S.I. Development of digestive secretions in white sturgeon juveniles (*Acipenser transmontanus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1986, 83A: 233-238.

Calvo P., Hernández T., Lozano M., González D. Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray drying: Influence of wall material and olive quality. *Journal Lipid Science Technology.* 2010; 112, 852-858.

Chacón L. Villareal J. A., Villareal López J. Microencapsulating properties of trehalose and of its blends with sucrose and lactose. *Food Engineering and Physical Properties.* 2005, 70 (6): 401-408.

Chiu C., Guu Y., Liu C., Pan T., Cheng W. Immune responses and gene expression in White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology* 2007, 23: 364-377.

Correa C., Garza Y., Rodríguez J., Aguilar C., Contreras J. Geles de pectina de bajo metoxilo modificadas enzimáticamente. *Revista de la Sociedad Química de México.* 1999, Vol 43. Num 1.

Cruz-Guerrero, A., Olvera, J., García Garibay, Gómez-Ruiz,L. Inclinas-hyperproducing strain of *Kleyveromyces* sp. isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World Journal of Microbiology y Biotechnology.* 2006, 22: 115-17

Dalmin G., Kathiresam K., Purushothaman A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J.-Exp. Biol.* 2001, 39, 939-942.

De la Cruz E. Pruebas de resistencia a baja salinidad de las postlarvas de *Penaeus schmitti*. *Revista de Investigaciones Marinas.* 1992, 13, 152-158.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M., Gosset,

G., Bolivar, F. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 2008, 124: 126-34.

Espinoza Herrera N. L. Elaboración y caracterización de microcápsulas de pared compuesta (proteína-polisacárido) como alimento para acicultura. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México D. F. 2002. 60 pp.

Fernández, A. Inulina, Un gran prebiótico. *Cuerpo, Mente* 2007, 118.

Fuller R. Probiotic in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 1989, 66, 365-378.

Geiger, R. Chymotripsin. In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergemeyer, J. y Grab M. eds) Verlag Chemie, Weinheim. 1988, 99-104.

Geiger R. y Fritz H. Trypsin. In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergemeyer, J. y Grab M. eds) Verlag Chemie, Weinheim. 1988, 104-110.

Gerdes, S. Symbiotics synergy of pro-and prebiotics food product design. *Mundo lácteo y cárnico*, 2005, pag. 6-9.

Geirselmer K. Pectin and enzyme pectin in fruits. *Vegetable technology*. 1997.

Gomez-Gil B. Roque A. Turnbull J. The use and selection of probiotics bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 2000, 191, 259-270.

Granvil D. y Yates M. Laboratory Manual for the Culture of Penaeid Shrimp. *Marine Advisory Service Sea Grant College Program Texas A y M University*, college Station. TAMU-SG-88-202.

Jones D. A., Kamarudin M. S., Le Vay L. The potential for replacement of live feeds in larval culture. *J. World Aquacult. Soc.* 1993, 24, 199-210.

Jones D. A., Kumlu M., Le Vay L., Fletcher D. J. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. *Aquaculture*. 1997a, 155, 285-295.

Kurman J. A., Rasic J. L. The health potential of products containing bifidobacteria In R.K. Robinson (ed), Therapeutic properties of fermented milks. Elsevier Applied Food Science, London. 1991, pp. 117-158.

Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal 2003, 13: 3-13.

Krishnan S., Bhosale R., Singhal R. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum Arabic, maltodextrin and modified starch as wall materials. Carbohydrate Polymers. 2005, 61:95-102.

Lacroix C., Paquin C., y Arnauld J. Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. I. Optimization with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. I. Optimization of the rheological properties of the entrapment. Applied Microbiology and Biotechnology. 1990, 32 (4), 403-408.

Le Moullac G. Van Wormoudt A. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fiber levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). Aquat. Living Resour. 1994, 7, 203-210.

Le Vay L., Rodríguez A., Kamarudin M. S., Jones D. A. Influence of live and artificial diets on tissue composition and digestive enzyme activity in *Penaeus japonicus* larvae. Acuaculture. 1993, 118, 287-297.

Le Vay L., Jones D.A., Puello-Cruz A. C., Sangha R. S., Ngamphongsai C. Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. Comparative Biochem. and Physiol. Part A. 2001, 128, 623-630.

Lian W. C., Hsiao H., Chou C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated juice and bile solution. International Journal of Food Microbiology. 2003, 86: 293-301.

Lovett D. y Felder D. Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda Penaeidae). J. Morphol. 1989, 201: 252-272.

Lovett D. L. y Felder D. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaidae). Biol. Bull. 1990, 178: 144-159.

Lovett D. L. y Felder D. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaidae). Biol. Bull. 1990, 178: 160-174.

Madrigal, L., Sangronis, E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2007, 54(4): 1-13.

McHugh y Krotcha. Permeability properties of edible Films. In Edible coating and Films to improve food quality, Krotcha. 1994.

McHugh Dennis. Production, Properties and Uses of Alginates. Department of Chemistry, University College. University of New South Wales. Australian Defence Force Academy. Campbell, Australia 2000.

Meng X., Stanton C., Fitzgerald G., Daly C., Ross R. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotics cultures. Food Chemistry. 2008, 106: 1406-1416.

Moreau D. L., Rosenberg M. Porosity of whey protein-based microcapsules containing anhydrous Milkfat measured by gas displacement pycnometry. J. Food. Sci. 1998, 63: 819-822.

Murillo M. Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. Revista Medica Universal Navarra. 2001, 45 (4) 19-34.

Ozer D. Akin S., Ozer B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium Bifidum* BB-02 in *Acidophilus-Bifidus* Yoghurt. Food science Technology International. 2005, 11 (1): 19-24.

Parker R. B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health.* 1974, 29, 4-8.

Pedroza Islas R., Vernon-Carter E., Durán-Domínguez C. y Trejo-Martínez S. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation. I. Particle size, morphology and microstructure of microcapsules. *Food Re.* 1999, 32, 367-374.

Pedroza-Islas R., Alvarez-Ramírez J. y Vernon-Carter E. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation. II. Dissolution and flotability kinetics as selection criteria. *Food Res. International* 2000, 33, 119-124.

Pedroza-Islas R., Gallardo P., Vernon-Carter E., García-Galano T., Pascual C., Rosas C., Gaxiola G. Growth, survival, quality and digestive enzymes activities on larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquaculture Nutrition.* 2004, 10. 167-173.

Pérez Pérez D., y Ros M.. Descripción y desarrollo de los estadios postlarvales del camarón blanco *Penaeus schmitti* Burkenroad. Ciencias, serie 8 Centro de investigaciones marinas. Universidad de la Habana. 1975, No. 21. 114 p.

Picot A., Lacroix C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal condition in yoghurt. *International Dairy Journal.* 2004, 14:505-515.

Ramirez R., Dixon B. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from Oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture.* 2003, 227, 417-426.

Raymond W., Tadahisa S. Chemical Economics Handbook. CEH Marketing Research Report – Cellulose Ethers. November 2001.

Riquelme C., Avedaño-Herrera R. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y su uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural.* 2003, 76: 725-736.

Rodríguez A., Le Vay L., Mourente G., Jones D.A. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* (Bate), Turing herbivorous and carnivorous feeding. Mar. Biol. 1994, 118, 45-53.

Rodríguez-Huezo M.E., Pedroza-Islas R., Prado-Barragán L., Beristain C., Vernon-Carter E. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. Journal of Food Science 2004, Vol. 39, Nr7, 351-359.

Rodríguez-Huezo M., Durán-Lugo R., Prado-Barragán L., Cruz-sosa F., Lobato-Caballeros C., Alvarez-Ramírez J., Vernon-Carter E. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. Food Research international. 2007, 40: 1299-1306.

Sokal R. y Rohlf J. Biometry principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and company, N. Y. 1981, 2<sup>nd</sup> edn, pp. 1-843.

Todd e., Quantitative studies on the total plasmin and the trypsin inhibitor of human blood serum. J. Exp. Medicine. 1949, 89, 295-308.

Tinh N., Dierckens K., Sorgeloos P., Bossier P. A review of the functionality of probiotic in the larviculture food chain. Marine Biotechnology. 2008, 10: 1-12.

Tirunavukkarasu M. y Pries F. Synthesis of  $\alpha$ -amilase and  $\alpha$ -glucosidase by membrane bound ribosomes from *Bacillus licheniformis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983, 114, 677-682.

Vernon-Carter EJ, Gomez SA, Beristain CI, Mosqueira G, Pedroza-Islas R, Moreno-Terrazas RC. Color degradation and coalescence kinetics of aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. J Texture Stud. 1996, 27: 625-641.

Vernon-Carter EJ, Pedroza-Islas R, Beristain CI. Stability of *Capsicum annuum* oleoresin-in-water emulsions containing Prosopis and Acacia gums. Journal Texture Stud. 1998, 29: 553-567.

Vernon- Carter, Beristain C., García H. Mesquite gum (*Prosopis juliflora*) and maltodextrin blenda as wall materials for spray-dried encapsulated orange peel oil. *Food Science and Technology International*.1999, 5: 356-359.

Vernon-Carter EJ, Beristain CI, Pedroza-Islas R. 2000. Mesquite gum (*Prosopis gum*). En: Doxastakis G, Vernon-Carter EJ, Ponce-Palafox JT, Arredondo-Figueroa JL, Pedroza-Islas R. Development of microcapsules containing water and lipid soluble natural colorants for trout pigmentation. *Journal Aquatic Food Product Technology*. 2001, 10(2): 59-74.

Vershuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol.* 2000, 64, 655-671.

Villegas D., Kanazawa A. Relationship between diet composition and growth of the zoeal and Mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. *Fish. Res. J. Phillip.* 1979, 4, 32-40.

Walter H. E. Proteinases (protein as substrates) method with haemoglobin, casein and azocoll as sustrate. In. *Methods of enzymatic Analysis* (Bergemeyer, j. y Grab M. eds.) Verlag Chemie, Weinheim. 1988, 3<sup>rd</sup> edn, Vol V, pp. 270-277.

Wang Yan-Bo, Li Jian-Rong, Lin Junda. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*. 2008, 281:1-4.

Wickins J. F. Prawn biology and culture. *Ann Rev. Oceanogr. Mar Biol.* 1976, 14: 435-507.

Woomer P. Most probable number counts: Methods of soil Analysis Part 2. Microbiological and biochemical properties. E.E.U.U. Soil Science society of American. 1994. 60-80.

Anexo 1. Tamaño de partícula de probiótico microencapsulado.



MASTERSIZER



Result Analysis Report

**Sample Name:**  
MICROCAPSULAS 1  
**Sample Source & type:**  
LabUIA = PROTEINA  
**Sample bulk lot ref:**  
02/JULIO/2010

**SOP Name:**  
SOLIDOS IRIS  
**Measured by:**  
IRIS  
**Result Source:**  
Measurement

**Measured:**  
Viernes, 02 de Julio de 2010 01:43:27 p.m.  
**Analysed:**  
Viernes, 02 de Julio de 2010 01:43:29 p.m.

**Particle Name:**  
Default  
**Particle RI:**  
1.520  
**Dispersant Name:**

**Accessory Name:**  
Scirotco 2000  
**Absorption:**  
0.1  
**Dispersant RI:**  
1.000

**Analysis model:**  
General purpose  
**Size range:**  
0.020 to 2000.000 um  
**Weighted Residual:**  
0.295 %

**Sensitivity:**  
Enhanced  
**Obscuration:**  
0.95 %  
**Result Emulation:**  
Off

**Concentration:**  
0.0004 %Vol

**Span :**  
1.306

**Uniformity:**  
0.792

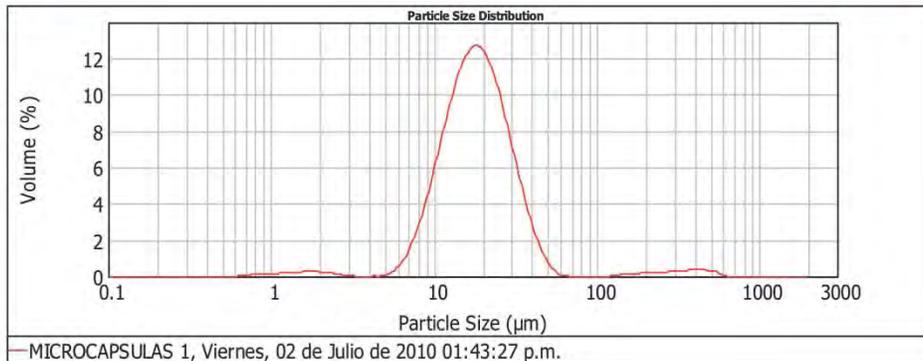
**Result units:**  
Volume

**Specific Surface Area:**  
0.424 m<sup>2</sup>/g

**Surface Weighted Mean D[3,2]:**  
14.141 um

**Vol. Weighted Mean D[4,3]:**  
26.993 um

**d(0.1): 9.802 um      d(0.5): 18.125 um      d(0.9): 33.480 um**



—MICROCAPSULAS 1, Viernes, 02 de Julio de 2010 01:43:27 p.m.

Size (µm)	Volume In %										
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.17	11.482	8.29	120.226	0.02	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.20	13.183	10.03	138.038	0.10	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.23	15.136	11.15	158.489	0.14	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	0.24	17.378	11.44	181.970	0.17	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	0.22	19.953	10.84	208.930	0.19	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	0.17	22.909	9.44	239.883	0.21	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	0.09	26.303	7.53	275.423	0.25	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	0.01	30.200	5.43	316.228	0.29	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	0.00	34.674	3.49	363.078	0.32	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	0.00	39.811	1.92	416.869	0.32	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.365	0.00	45.709	0.83	478.630	0.28	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.00	5.012	0.13	52.481	0.21	549.541	0.08	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.00	5.754	0.58	60.256	0.01	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.04	6.607	1.38	69.183	0.00	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.08	7.586	2.64	79.433	0.00	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.10	8.710	4.31	91.201	0.00	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.965	0.13	10.000	6.30	104.713	0.00	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	0.17	11.482	8.29	120.226	0.00	1258.925	0.00		

Operator notes:

## Metodología para la determinación de la cinética de flotabilidad

### Objetivo:

Determinar la cinética de flotabilidad de muestras de dietas microencapsuladas, así como la constante de tiempo de flotabilidad, la cual se define como el tiempo medio en que una micropartícula se encuentra en el seno del líquido antes de sedimentarse.

### Equipo e instrumentación

1 spectronic 20 D de Bausch and Lomb

2 celdas para espectrofotómetro

1 cronómetro

#### 1. Calibración del equipo Spectronica 20 de Bausch and Lomb

- Girar el botón que se encuentra en la parte superior derecha del panel de control del equipo para seleccionar la longitud de onda a la cual se efectuarán las mediciones.
- Girar el botón izquierdo, que se encuentra en la parte inferior del panel de control del equipo hasta que en la pantalla se lea 0.0% de transmitancia y esperar 10 minutos.
- Si la lectura que aparece en la pantalla es superior o inferior a 0.0% de transmitancia, girar el botón izquierdo hasta que nuevamente se lea 0.0%.
- En una celda se colocan 8 mL de agua destilada ( esta será el blanco o testigo) y se introduce la celda en el compartimento de la extrema izquierda superior del equipo.
- Con el botón derecho, que se encuentra en la parte inferior del panel de control, se calibra el equipo a 100% de transmitancia y se recomienda esperar de 10 a 15 minutos, ajustando durante este intervalo de tiempo la lectura a 100% de transmitancia si fuera necesario.

#### 2. Procedimiento

- Se pesa en la balanza analítica 0.10 gramos de muestra en un papelito de aluminio.
- Se colocan en otra celda 8 mL de agua destilada y se introduce parcialmente esta celda en el equipo.
- Con la ayuda de la espátula se introduce la muestra en la celda.
- De inmediato se baja la celda a su lugar, se cierra el compartimento y se empiezan a registrar las lecturas de % de transmitancia vs tiempo.

- El registro de las lecturas del % de transmitancia vs tiempo continúa hasta que se llega a un valor de 10% de transmitancia.

### 3. Determinación de la cinética de flotabilidad

- Usando Excel se construyen as gráficas de % de transmitancia vs tiempo; comparando la curva obtenida con el modelo de decaimiento cinético de primer orden que se propone, donde la flotabilidad medida como porcentaje de transmitancia comienza con un 100% (tiempo cero) y decrece monotónicamente a cero en periodos largos de tiempo.
- De acuerdo a este modelo matemático de ecuación diferencial de 1º orden por variables separables, se obtiene la ecuación exponencial que permite el cálculo de la constante de tiempo de flotabilidad  $\tau_f$

$$df / dt = - f / \tau_f$$

donde  $f$  = flotabilidad

$\tau$  = constante de tiempo de flotabilidad, el cual se define como el tiempo medio en que una micropartícula se encuentra en el seno del líquido antes de sedimentarse.

Separando variables de la ecuación anterior

$$df / f = - 1 / \tau_f (dt)$$

Integrando entre límites:

$$\ln f ]_{100}^f = - 1 / \tau_f t ]_0^t$$

Aplicando leyes de los logaritmos se obtiene la ecuación (1)

$$\ln f / 100 = - t / \tau_f$$

#### 3.1 Expresión matemática para determinar la flotabilidad

Media como porcentaje de transmitancia

$$\ln f - \ln 100 = - t / \tau_f$$

Multiplicando ambos miembros de la ecuación (1) por la base de los logaritmos neperianos o naturales ( $e$ ) y despejando  $f$  se obtiene la ecuación (2):

$$F = 100 e^{-t/\tau_f}$$

### 3.2 Expresión matemática para determinar la constante de tiempo de flotabilidad

De la ecuación (1) se despeja  $\tau_f$

$$\tau_f = -t / \ln(f/100)$$

Esta ecuación (3) se utiliza para obtener la constante de tiempo de flotabilidad  $\tau_f$ , para cada una de las muestras analizadas.

### 3.3 Método gráfico para determinar la constante de tiempo de flotabilidad

Se grafican los datos obtenidos experimentalmente, se obtiene la línea de regresión y el coeficiente de determinación existente entre el modelo matemático exponencial y el comportamiento de los datos y se analiza qué tan cerca están los datos del modelo matemático que se propone, con la obtención del coeficiente de determinación.

Comparando la ecuación obtenida con el modelo propuesto, se igualan exponentes y como  $x=t$  se eliminan y entonces la constante de tiempo de flotabilidad es igual al inverso del valor al cual está elevado la base de los logaritmos neperianos ( $e$ ).

Anexo 2. Tamaño de partícula de probiótico microencapsulado por emulsión múltiple.



MASTERSIZER



Result Analysis Report

**Sample Name:**  
DIETA 4  
**Sample Source & type:**  
LabUIA = GE 110%  
**Sample bulk lot ref:**  
16/07/2010

**SOP Name:**  
SOLIDOS IRIS  
**Measured by:**  
Samuel Macias  
**Result Source:**  
Measurement

**Measured:**  
Martes, 31 de Agosto de 2010 12:13:45 p.m.  
**Analysed:**  
Martes, 31 de Agosto de 2010 12:13:47 p.m.

**Particle Name:**  
New sample material  
**Particle RI:**  
1.500  
**Dispersant Name:**

**Accessory Name:**  
Scirocco 2000  
**Absorption:**  
0  
**Dispersant RI:**  
1.000

**Analysis model:**  
General purpose  
**Size range:**  
0.020 to 2000.000 um  
**Weighted Residual:**  
19.590 %

**Sensitivity:**  
Enhanced  
**Obscuration:**  
0.06 %  
**Result Emulation:**  
Off

**Concentration:**  
0.0000 %Vol

**Span :**  
1.569

**Uniformity:**  
0.473

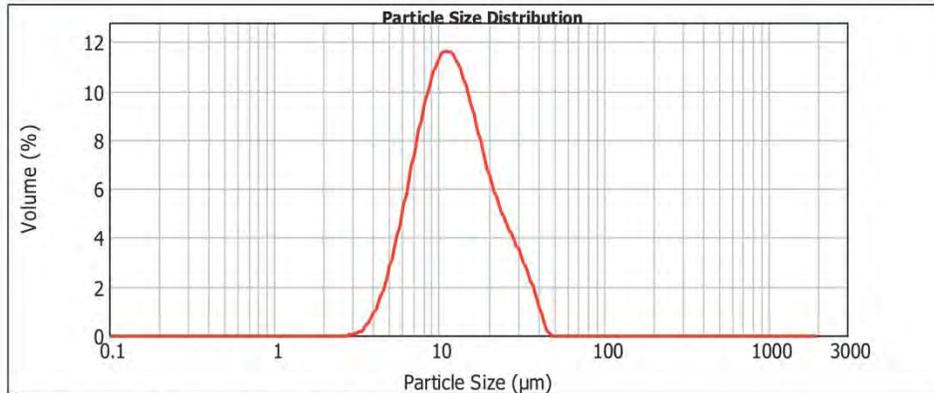
**Result units:**  
Volume

**Specific Surface Area:**  
0.551 m<sup>2</sup>/g

**Surface Weighted Mean D[3,2]:**  
10.882 um

**Vol. Weighted Mean D[4,3]:**  
14.128 um

d(0.1): 6.431 um                      d(0.5): 12.032 um                      d(0.9): 25.314 um

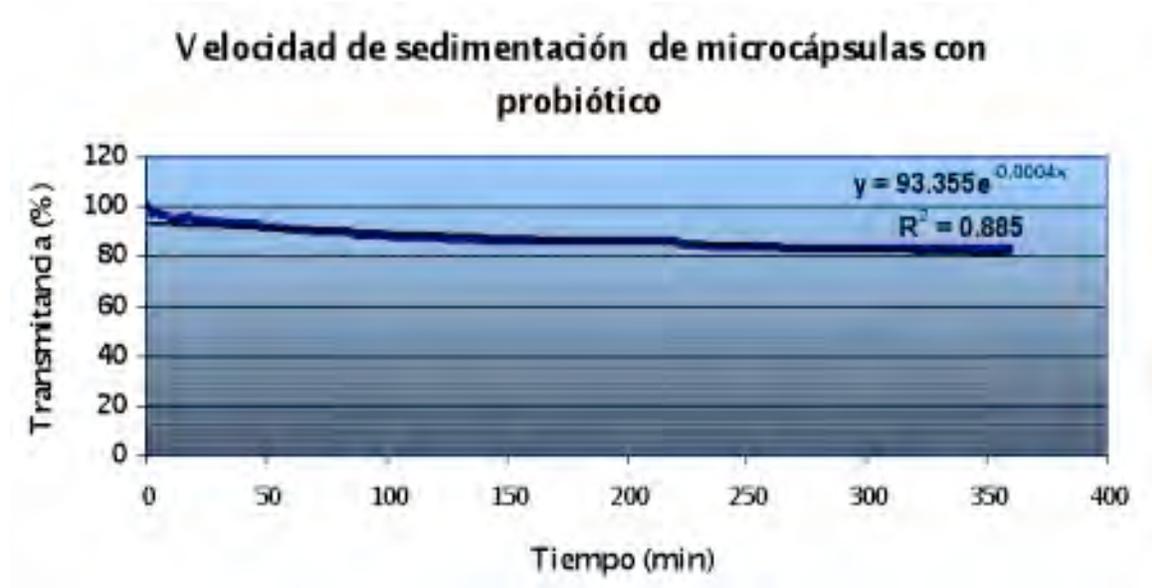


DIETA 4, Martes, 31 de Agosto de 2010 12:13:45 p.m.

Size (µm)	Volume In %										
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.00	11.482	10.34	120.226	0.00	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.00	13.183	9.49	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.00	15.136	8.49	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	0.00	17.378	8.20	181.970	0.00	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	0.00	19.953	6.76	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	0.00	22.909	5.47	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	0.00	26.303	4.44	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	0.00	30.200	3.61	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	0.06	34.674	2.77	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	0.29	39.811	1.80	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.385	0.89	45.709	0.68	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.00	5.012	1.83	52.481	0.00	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.00	5.754	3.17	60.256	0.00	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.00	6.607	4.85	69.183	0.00	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.00	7.586	6.68	79.433	0.00	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.00	8.710	8.44	91.201	0.00	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.00	10.000	9.77	104.713	0.00	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	0.00	11.482	10.46	120.226	0.00	1258.925	0.00		

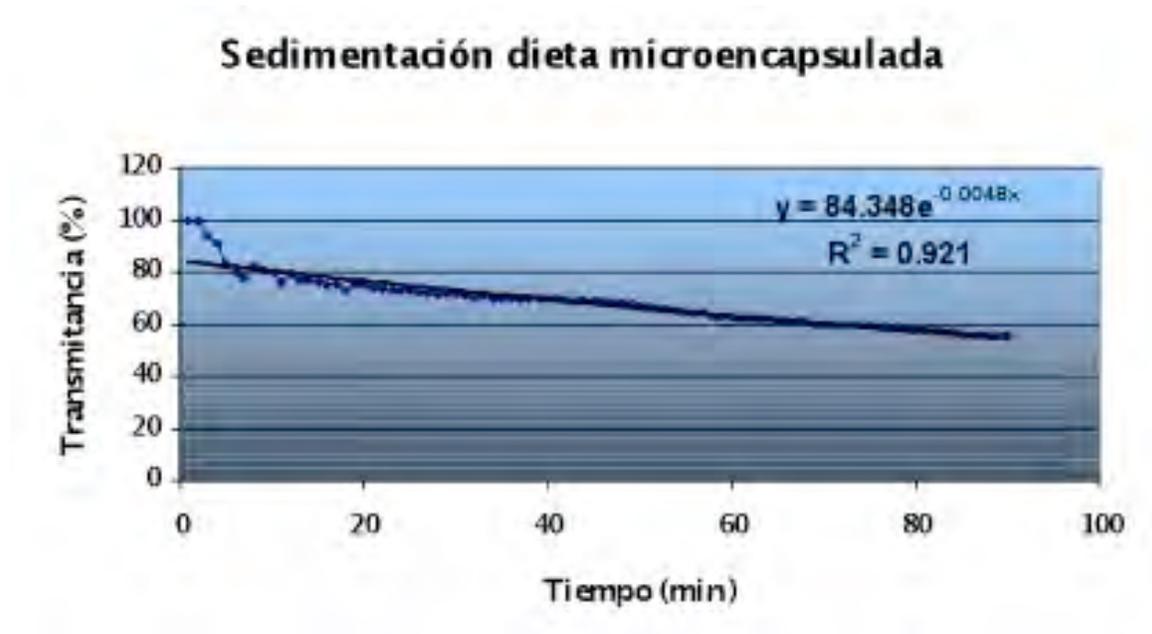
## Anexo 2

Cinética de Sedimentación de las microcápsulas con probiótico para la alimentación de larvas de *Litopenaeus vannamei*.



## Anexo 3

Cinética de Sedimentación de la dieta microencapsulada para la alimentación de las larvas de *Litopenaeus vannamei*.



Anexo 3. Tamaño de partícula de dieta microencapsulada.



MASTERSIZER



Result Analysis Report

**Sample Name:**  
DIETA 1  
**Sample Source & type:**  
LabUIA = M CAP  
**Sample bulk lot ref:**  
16/07/2010

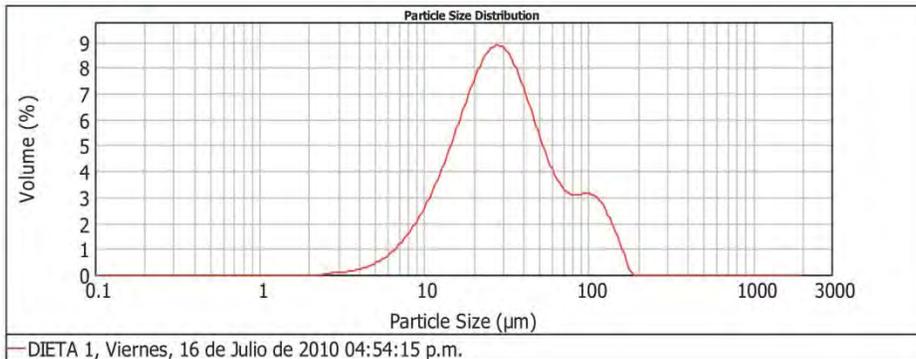
**SOP Name:**  
SOLIDOS IRIS  
**Measured by:**  
SAMUEL MACIAS  
**Result Source:**  
Measurement

**Measured:**  
Viernes, 16 de Julio de 2010 04:54:15 p.m.  
**Analysed:**  
Viernes, 16 de Julio de 2010 04:54:17 p.m.

<b>Particle Name:</b> New sample material	<b>Accessory Name:</b> Scirocco 2000	<b>Analysis model:</b> General purpose	<b>Sensitivity:</b> Enhanced
<b>Particle RI:</b> 1.500	<b>Absorption:</b> 0	<b>Size range:</b> 0.020 to 2000.000 um	<b>Obscuration:</b> 0.00 %
<b>Dispersant Name:</b>	<b>Dispersant RI:</b> 1.000	<b>Weighted Residual:</b> 9.932 %	<b>Result Emulation:</b> Off

<b>Concentration:</b> 0.0000 %Vol	<b>Span :</b> 2.632	<b>Uniformity:</b> 0.745	<b>Result units:</b> Volume
<b>Specific Surface Area:</b> 0.26 m <sup>2</sup> /g	<b>Surface Weighted Mean D[3,2]:</b> 23.104 um	<b>Vol. Weighted Mean D[4,3]:</b> 40.172 um	

d(0.1): 11.921 um                      d(0.5): 29.472 um                      d(0.9): 89.490 um



Size (µm)	Volume In %										
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.00	11.482	3.43	120.226	2.20	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.00	13.183	4.32	138.038	1.42	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.00	15.136	5.28	158.489	0.47	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	0.00	17.378	6.27	181.970	0.00	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	0.00	19.953	7.16	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	0.00	22.909	7.79	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	0.05	26.303	8.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	0.08	30.200	7.74	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	0.12	34.674	7.05	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	0.20	39.811	6.10	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.365	0.31	45.709	5.05	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.00	5.012	0.48	52.481	4.07	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.00	5.754	0.72	60.256	3.31	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.00	6.607	1.05	69.183	2.88	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.00	7.586	1.47	79.433	2.79	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.00	8.710	2.00	91.201	2.83	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.00	10.000	2.66	104.713	2.70	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	0.00	11.482	3.43	120.226	2.20	1258.925	0.00		

Operator notes:

