

00381



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

17

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

BIOENCAPSULACIÓN EN *Artemia* Y SU EFECTO  
EN LA ALIMENTACIÓN DE POSTLARVAS DE  
CAMARÓN, *Litopenaeus vannamei*.

25/09/01

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

**M. en C. ROLANDO GELABERT FERNÁNDEZ**

DIRECTORA DE IESIS DRA. THALIA CASTRO BARRERA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	7
AGRADECIMIENTOS .....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS.....	11
OBJETIVOS GENERALES .....	11
OBJETIVOS PARTICULARES .....	11
HIPÓTESIS.....	12
ANTECEDENTES.....	12
TÉCNICAS DE ENRIQUECIMIENTO .....	15
<i>Técnica Inglesa...</i> .....	15
<i>Técnica Japonesa.</i> .....	15
<i>Técnica Francesa...</i> .....	16
<i>Técnica Belga.</i> .....	16
<i>Bioencapsulación. Consideraciones generales.</i> .....	17
EMULSIONES .....	19
<i>Talla de partículas.</i> .....	20
<i>Estabilidad.</i> .....	20
<i>Preservación.</i> .....	21
<i>Emulsificación.</i> .....	21
PREPARACIÓN DE EMULSIONES PARA ORGANISMOS MARINOS EN CULTIVO. ....	22
IMPLICACIÓN DE LOS ACIDOS GRASOS EN LA ALIMENTACIÓN DE ORGANISMOS ACUÍCOLAS CULTIVADOS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
<i>Artemia</i> EMPLEADA .....	26
ESTABLECIMIENTO DE TÉCNICAS PARA LA MODIFICACIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE NAUPLIOS Y ADULTOS .....	26
<i>Determinación de la influencia del tamaño del alimento...</i> .....	26
<i>Efecto de la talla de los individuos y las concentraciones de partículas en el medio sobre el proceso de filtración realizado por Artemia.</i> .....	29
<i>Efecto del tiempo en el proceso de bioencapsulación.</i> .....	29
<i>Efecto de la densidad de individuos en el proceso de bioencapsulación.</i> .....	30
<i>Validación fisiológica de la incorporación de la emulsión en el proceso de enriquecimiento de Artemia.</i> .....	31
EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS EMULSIONES.....	32
EFECTO DEL SUMINISTRO DE <i>Artemia</i> ENRIQUECIDA EN POSTLARVAS DE <i>Litopenaeus vannamei</i> . ....	33
<i>Indicadores empleados para evaluar el efecto del alimento en las postlarvas.</i> .....	34
Crecimiento .....	34
Supervivencia.....	34
Resistencia al estrés. ....	35
Niveles de Colesterol, Triglicéridos y Proteínas Totales en tejidos. ....	35
RESULTADOS.....	35
<i>Determinación de la influencia del tamaño del alimento.</i> .....	35
<i>Efecto de la talla de los individuos y las concentraciones de partículas en el medio sobre el proceso de filtración realizado por Artemia.</i> .....	37
<i>Efecto del tiempo en el proceso de bioencapsulación.</i> .....	38
<i>Efecto de la densidad de individuos en el proceso de bioencapsulación.</i> .....	39

<b>Validación fisiológica de la incorporación de la emulsión en el proceso de enriquecimiento de Artemia</b> .....	40
EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS EMULSIONES.....	41
EFFECTO DEL SUMINISTRO DE ARTEMIA ENRIQUECIDA EN POSTLARVAS DE <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	42
<b>Ensayo con las postlarvas en los estadios de P110-P130.</b> .....	42
Crecimiento .. .. .	42
Supervivencia.....	43
Resistencia al estrés .. .. .	43
Colesterol .. .. .	43
Triglicéidos.....	43
Proteínas Totales .. .. .	43
<b>Ensayo con las postlarvas en los estadios de P15-P110.</b> .....	44
Crecimiento .. .. .	44
Supervivencia.....	44
Resistencia al estrés.....	44
Colesterol .. .. .	44
Triglicéidos.....	44
Proteínas Totales .. .. .	45
<b>Características nutricionales de Artemia empleada como alimento</b> .....	45
Colesterol .. .. .	45
Triglicéidos .. .. .	45
Proteínas Totales .. .. .	45
<b>DISCUSIÓN</b> .....	46
MODIFICACIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE NAUPLIOS Y ADULTOS DE <i>Artemia</i> .....	46
<b>Determinación del tamaño de partículas apropiado para su ingestión por parte de Artemia.</b> .....	46
<b>Efecto de la talla de los individuos y las concentraciones de partículas en el medio sobre el proceso de filtración por parte de Artemia.</b> ..	47
<b>Efecto del tiempo en el proceso de bioencapsulación</b> .....	48
<b>Efecto de la densidad de individuos en el proceso de bioencapsulación</b> .....	49
<b>Validación fisiológica de la incorporación de la emulsión en el proceso de enriquecimiento.</b> .....	50
EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS EMULSIONES .....	51
EFFECTO DEL SUMINISTRO DE ARTEMIA ENRIQUECIDA EN POSTLARVAS DE <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	51
<b>Ensayo con las postlarvas en los estadios de P110-P130 y P15-P110.</b> .....	51
Crecimiento.....	52
Supervivencia .....	52
Resistencia al estrés .. .. .	53
Colesterol .. .. .	53
Triglicéidos .. .. .	54
Proteínas Totales.....	54
CONSIDERACIONES GENERALES .....	55
<b>CONCLUSIONES</b> .....	57
<b>TABLAS Y FIGURAS</b> .....	58
TABLA 1. RESUMEN SOBRE ALGUNOS TRABAJOS DE BIOENCAPSULACIÓN.....	58
TABLA 2. VALORES DEL TAMAÑO DE MUESTRA (N), EL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R <sup>2</sup> ), EL VALOR DE F, Y LA PROBABILIDAD (P) PARA CADA LÍNEA DE REGRESIÓN.....	62
TABLA 3. NÚMERO DE INDIVIDUOS (N) CARACTERIZADOS PARA CADA CONCENTRACIÓN DE PARTÍCULAS Y PARA CADA CLASE DE LARGO ESTUDIADA.....	62
TABLA 4. NÚMERO DE INDIVIDUOS (N) CARACTERIZADOS PARA CADA TIEMPO ENSAYADO, PARA CADA CLASE DE LARGO ESTUDIADA CON LAS PARTÍCULAS DE 15 Y 5 µm.....	63
TABLA 5. RELACIÓN O.N DE ARTEMIA DE DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO.....	63

TABLA 6. NÚMERO DE GLÓBULOS CARACTERIZADOS EN CADA EMULSIÓN EXPERIMENTAL.....	64
Fig.1. Comparación de la presencia de partículas en el exterior e interior de los individuos.....	65
Fig.2. Distribución de frecuencias de tamaños de partículas de almidón en la suspensión. ....	65
Fig.3. Selectividad para los individuos de la clase de largo 1. ....	65
Fig.4. Selectividad para los individuos de la clase de largo 2 ....	65
Fig 5. Selectividad para los individuos de la clase de largo 3. ....	65
Fig.6. Selectividad para los individuos de la clase de largo 4 ....	65
Fig.7. Selectividad para los individuos de la clase de largo 5. ....	66
Fig.8. Selectividad para los individuos de la clase de largo 6 ....	66
Fig.9. Selectividad para los individuos de la clase de largo 7 ....	66
Fig 10. Selectividad para los individuos de la clase de largo 8. ....	66
Fig.11. Selectividad del alimento para <i>Artemia franciscana</i> de diferentes clases de largo.....	66
Fig.12. Llenado del tracto digestivo de los individuos de las tres clases de largo con las diferentes concentraciones de partículas. ....	67
Fig. 13. Tendencia del llenado del tracto digestivo con respecto al tiempo de tratamiento (partículas de 5 µm). ....	67
Fig. 14. Tendencia del llenado del tracto digestivo con respecto al tiempo de tratamiento (partículas de 15 µm). ....	67
Fig.15. Efecto de la densidad de individuos en los niveles de amonio (nauplios) ....	68
Fig.16. Niveles de oxígeno en el medio respecto a la densidad (nauplios). ....	68
Fig 17. Efecto de la densidad de individuos en los niveles de amonio (juveniles). ....	68
Fig.18. Niveles de oxígeno en el medio respecto a la densidad (juveniles). ....	68
Fig 19. Efecto de la densidad de individuos en los niveles de amonio (adultos). ....	68
Fig.20. Niveles de oxígeno en el medio respecto a la densidad (adultos) ....	68
Fig 21. Niveles de amonio interno en nauplios. ....	69
Fig 22. Niveles de amonio interno en juveniles ..	69
Fig.23. Niveles de amonio interno en adultos ..	69
Fig 24. Niveles de amonio interno en los diferentes estadios de <i>Artemia</i> analizados ..	69
Fig.25. Relación O.N con diferentes tipos de alimento en los diferentes estadios analizados ..	69
Evaluación de las características de las emulsiones (lectina/aceite/agua, 812 rpm). ....	70
Fig. 26 .....	70
Fig 27. ....	70
Fig. 28 .....	70
Fig 29. ....	70
Fig 30. ....	70
Fig. 31. Concentraciones de glóbulos en las emulsiones lectina/aceite/agua (812 rpm) .....	70
Evaluación de las características de las emulsiones (lectina/aceite/agua, 1625 rpm). ....	71
Fig.32. ....	71
Fig.33. ....	71
Fig 34 .....	71
Fig.35. ....	71
Fig 36. ....	71
Fig. 37. Concentraciones de glóbulos en las emulsiones lectina/aceite/agua (1625 rpm) .....	71
Fig.38- Evaluación de las características de la emulsión lka w3 (812 rpm) .....	72
Fig.39. Concentración de glóbulos en la emulsión lka w3 (812 rpm) .....	72
Fig. 40. Peso seco de las Pl. 30 de <i>L. vannamei</i> . ....	73
Fig 41. Supervivencias alcanzadas en los tratamientos de alimentación (Pl30). ....	73
Fig. 42. Resultados de supervivencia alcanzados con la prueba de estrés (Pl30) .....	73
Fig 43 Niveles de Colesterol en los tres tratamientos (PL30). ....	73
Fig 44- Niveles de Triglicéridos en los tres tratamientos (PL30). ....	73

Fig 45 Niveles de Proteínas en los tres tratamientos (PL30) .....	73
Fig. 46. Peso seco de las PL 10 de <i>L. vannamei</i> .....	74
Fig. 47. Supervivencias alcanzadas en los tratamientos de alimentación. (PL10) ..	74
Fig.48 Resultados de supervivencia alcanzados con la prueba de estrés PL10) .....	74
Fig 49. Niveles de Colesterol en los tres tratamientos (PL10). ..	74
Fig.50. Niveles de Triglicéridos en los tres tratamientos (PL10). .....	74
Fig. 51 Niveles de Proteínas en los tres tratamientos (PL10) .....	74
Fig.52. Niveles de Colesterol en los tres tratamientos ( <i>Artemia</i> ). ..	75
Fig.53. Niveles de Triglicéridos en los tres tratamientos ( <i>Artemia</i> ) .....	75
Fig. 54. Niveles de Proteínas en los tres tratamientos ( <i>Artemia</i> ) ..	75
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b> ....	76

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

## RESUMEN

En el presente trabajo se desarrollan una serie de experimentos dirigidos a establecer las condiciones adecuadas para la modificación del valor nutricional de las diferentes fases de crecimiento por las que atraviesa *Artemia* en su ciclo de vida. El trabajo fue engendrado teniendo en cuenta la gran diversidad de criterios que existen en la literatura respecto a este tema. En el mismo se persigue establecer un protocolo de enriquecimiento donde se manejen las condiciones bióticas y abióticas más relevantes relacionadas con el proceso de bioencapsulación en *Artemia*.

Para responder a las interrogantes sobre el tema se concibió desarrollar los siguientes objetivos:

- Determinación de la influencia del tamaño del alimento en el proceso de ingestión realizado por *Artemia*.
- Determinar el efecto de la talla de los individuos y de las concentraciones de partículas en el medio sobre el proceso de filtración realizado por *Artemia*.
- Determinación de la influencia del tiempo en el proceso de filtración realizado por *Artemia*.
- Establecimiento de la densidad de individuos adecuadas para realizar la bioencapsulación.
- Evaluación de las características de emulsiones, con vistas a su utilización en el enriquecimiento de las diferentes fases de crecimiento de *Artemia*.
- Realización de bioensayos con larvas de camarón para validar la efectividad del proceso de bioencapsulación.

Los resultados obtenidos indican que.

- Existe un consumo preferencial del alimento por parte de *Artemia* que está relacionado con el tamaño de las partículas que se encuentran en el medio. Durante todo el ciclo de vida, los rangos preferidos del alimento se encuentran entre los 6.8 y 27.5  $\mu\text{m}$ .
- Para llevar al cabo el proceso de bioencapsulación de forma eficiente debe tenerse en cuenta la talla de los organismos. Para individuos pequeños como metanauplios concentraciones de 12500 partículas/mL parecen ser adecuadas. Para organismos de mayor talla se garantiza el adecuado llenado del tracto digestivo con concentraciones de 200 000 partículas/mL o superiores.
- Respecto al tiempo de enriquecimiento, los resultados indican que dos horas de tratamiento es un período adecuado para realizar el proceso de bioencapsulación en *Artemia*.

- Las densidades a emplear en el proceso de enriquecimiento se recomienda que sean menores de 500 organismos/mL para el caso de nauplios. Para juveniles y adultos es factible trabajar con densidades de 40 organismos/mL, sin embargo, se recomienda no exceder de los 10 individuos/mL.
- Las concentraciones de los glóbulos formados en las emulsiones de elaboradas dependen de las velocidades de preparación, sin embargo, la velocidad no ejerce influencia en la distribución de tamaños de los glóbulos obtenidos. Para las diferentes emulsiones los glóbulos observados con mayor frecuencia son menores de 2.5  $\mu\text{m}$ .
- Cuando *Artemia* enriquecida con las emulsiones ensayadas es utilizada como alimento se obtiene un efecto significativamente superior en el crecimiento de las postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- El protocolo de enriquecimiento propuesto puede emplearse satisfactoriamente en el enriquecimiento de *Artemia*.

Se considera que trabajo aporta información importante y novedosa sobre las condiciones para transformar nutritivamente a *Artemia*. Los resultados encontrados indican que se puede ejercer una influencia sobre el medio y propiciar un entorno que permita que el proceso de bioencapsulación se realice eficazmente. Con los elementos abordados en el trabajo se contribuye a reducir el impacto de condiciones adversas que son fácilmente manipulables por el acuicultor en el proceso de bioencapsulación,

El establecimiento de los rangos de tamaños adecuados para la alimentación de *Artemia*, el simple hecho de confirmarse que el tiempo de enriquecimiento puede ser reducido, la propuesta de emplear concentraciones de alimentos definidas independientemente del tipo de alimento y donde se emplee una unidad fácilmente manejable por investigadores y acuicultores, la propuesta de perfilar los esquemas de alimentación teniendo en cuenta la posible incorporación de productos tóxicos como el amonio a través del alimento, pueden ser considerados como alguno de los aportes del presente trabajo. Se considera que los resultados obtenidos tiene un impacto considerable sobre la condición de los individuos y sobre aspectos económicos en la acuicultura.

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero dejar constancia de mis agradecimientos a la Dra. Thalía Castro Barrera por ser tutora de las actividades desarrolladas en México

De suma importancia ha sido el apoyo brindado por el Laboratorio de Biología Marina Experimental de la UNAM en Ciudad del Carmen, Campeche. Los Drs. Martha Gabriela Gaxiola y Carlos Rosas Vázquez han sido pilares para el desarrollo de varios de los temas abordados y objetivos desarrollados. Sus orientaciones y criterios han sido de gran valor en el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer a la familia Chimal Hernández, un símbolo y ejemplo a seguir y parte de mi familia en México

Quiero agradecer a la UNAM y a la Universidad de La Habana, la posibilidad y la confianza depositada para desarrollar una actividad no sólo de superación personal, sino, de profundización en el conocimiento de los organismos marinos cultivados. Brindarme la posibilidad de contribuir a incrementar el acervo cultural de la sociedad resulta una de las mayores satisfacciones que se me ha brindado.

No puedo dejar de mencionar a mis profesores y luego compañeros del Centro de Investigaciones Marinas, Dra. María Elena Ibarra, Dr. Eugenio Díaz, Dra. Laida Ramos y Dra. Tsai García, Dra. Elvira Alfonso, Dra. Sylvia Leal, Dr. Alfredo de la Cruz, quienes siempre contribuyeron con mi desarrollo profesional y me brindaron muy buenos consejos

A Roberto Bnto por el apoyo en la realización de parte los experimentos

A Nuno Simoes y Adolfo Sánchez por facilitarme algunos de los programas que se utilizaron para la confección de este documento.

A los integrantes del grupo de Artemia de la UAM Xochimilco por la interacción lograda entre nosotros, en particular a Aida Malpica por su apoyo

A los colegas pertenecientes al Grupo de Artemia del CYTED por los conocimientos recíprocamente compartidos.

Especial agradecimiento a mi esposa por su dedicación, comprensión y apoyo en todas las actividades relacionadas con este trabajo. A mi hija por estimularme a seguir adelante.

Escribir unos agradecimientos que reflejen a la totalidad de personas que han contribuido al desarrollo de este trabajo resulta comprometedor. La posible carencia de alguna persona no significa que se le reste peso a su colaboración. Mis disculpas para aquellos que se merecen estar aquí y por alguna razón han sido obviados.

En fin, a todos, muchas gracias.

## INTRODUCCIÓN.

*Artemia* es un pequeño crustáceo empleado ampliamente como alimento en la acuicultura. Aunque este organismo se conoce desde hace siglos y ha sido utilizado por el hombre en su alimentación, no es hasta después de los años 1930 cuando se reporta su empleo en la alimentación de larvas de peces (Seale, 1933) y en larvas de camarones (Hudinaga, 1942).

El desarrollo de la actividad acuícola a partir de los años 1960 y 1970 estimuló la explotación de los quistes de *Artemia* por las ventajas que demostraron poseer respecto a otros tipos de alimento. Aunque los nauplios, originados después de la eclosión de los quistes, no son una dieta natural de los organismos cultivados, el simple hecho contar con un producto aparentemente inactivo que en condiciones adecuadas para la eclosión puede dar origen a pequeñas larvas nadadoras en un período de 24 a 48 horas ha hecho de *Artemia* al organismo de mayor espectro de uso en la alimentación acuícola, suministrándose a más del 85% de las especies marinas cultivadas (Bhat 1992).

Sin embargo, se ha reportado que este organismo aparentemente excepcional no siempre resulta adecuado en la alimentación de sus depredadores. El valor nutritivo de *Artemia* se encuentra relacionado con determinadas condiciones geográficas y temporales en que se desarrolla (Sorgeloos et al 1998). El porcentaje de proteínas y carbohidratos presentes en los nauplios de diferentes cepas de *Artemia* no difieren considerablemente (Leger et al, 1986a), (Fernández-Reinz et al, 1991), sin embargo, se insiste en que las deficiencias nutrimentales están fundamentalmente enmarcadas en el bajo contenido de ácidos grasos polinsaturados presentes en algunas cepas (Leger et al., 1987a).

La alternativa viable que contribuye a solucionar esta deficiencia es la llamada Bioencapsulación o técnica de enriquecimiento.

El origen geográfico de especies de *Artemia*, las dietas enriquecedoras y las condiciones de enriquecimiento entre las que se incluyen el desarrollo inicial de los estadios naupliares, tiempo de enriquecimiento, dosis y tipos de emulsión, son los factores obvios y más conocidos que influyen en los resultados del enriquecimiento (Leger et al, 1987a).

Aunque aparentemente hay una vasta información referente al tema de la bioencapsulación en *Artemia* (Tabla 1.) se ha podido constatar que no existe un consenso con respecto a las condiciones adecuadas para llevar a cabo este proceso. Existe una amplia gama de alimentos empleados con este fin, los cuales son utilizados en dependencia de los objetivos que se proponga lograr cada investigador y de los requerimientos que sean necesarios satisfacer en cada depredador. Sin embargo, aspectos que deberían ser comunes para este tipo de manejo y que propicien las mejores condiciones para que la bioencapsulación se desarrolle eficientemente, no han sido establecidos con rangos de tolerancia.

## **OBJETIVOS.**

Los antecedentes incluidos en este trabajo reflejan una gran diversidad de métodos para establecer la modificación nutricional de *Artemia* como alimento en la acuicultura. Se considera que dichos métodos se han basado en conocimientos empíricos sobre *Artemia* debido a que no se ha encontrado información que refleje las condiciones más adecuadas para llevar a cabo el proceso de enriquecimiento. La diversidad de criterios respecto a los tipos de alimento a utilizar, la carencia de información sobre la concentración adecuada de dicho alimento, el empleo mayormente de nauplios en los trabajos sobre enriquecimiento, así como los tiempos tan variados y los rangos de densidades tan amplios empleados conducen a estudiar los elementos que están directamente relacionados con este proceso y a plantear un protocolo que permita realizar la bioencapsulación eficientemente.

Teniendo en cuenta estos elementos y para dar respuesta a estas interrogantes se proponen desarrollar ensayos que respondan a los siguientes objetivos.

### **Objetivos generales.**

1. -Establecimiento de técnicas para la modificación del valor nutritivo de nauplios, juveniles y adultos de *Artemia*.
2. -Determinar la influencia de *Artemia* bioencapsulada o enriquecida en la alimentación de postlarvas de camarones peneidos.

### **Objetivos particulares.**

- Determinación de la influencia del tamaño del alimento en el proceso de ingestión realizado por *Artemia*.
- Determinar el efecto de la talla de los individuos y de las concentraciones de partículas en el medio sobre el proceso de filtración en *Artemia*.
- Determinación de la influencia del tiempo en el proceso de filtración en *Artemia*.
- Establecimiento de la densidad de individuos adecuadas para realizar la bioencapsulación.
- Evaluación de las características de las emulsiones a partir de lecitina de soja y aceite de hígado de bacalao con vistas a su utilización en el enriquecimiento de las diferentes fases de crecimiento de *Artemia*.

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

- Evaluación de las características de la emulsión obtenida a partir del producto comercial IKA w3 que será empleado como contraste en los tratamientos de enriquecimiento de *Artemia*.
- Realización de bioensayos con larvas de camarón para validar la efectividad del proceso de bioencapsulación.

## HIPÓTESIS.

El proceso de bioencapsulación en *Artemia* puede verse afectado por las características de los productos empleados para el enriquecimiento, así como por las condiciones en que los organismos son tratados.

El proceso de bioencapsulación en *Artemia* modificará la composición nutritiva de la misma, trayendo como consecuencia que al ser suministrada como alimento se mejore el crecimiento, la supervivencia o la calidad de los individuos cultivados.

## ANTECEDENTES.

Según Leger *et al.*, 1986a, las primeras sugerencias del empleo de la técnica de bioencapsulación las realiza Morris, (1956) Una década más tarde, Forster, *et al.*, (1967) demuestran que el valor nutricional de los nauplios de *Artemia* puede incrementarse con la aplicación de esta técnica. Dichos experimentos indican, además, que la metamorfosis de larvas de *Palaemon serratus* se acelera por el enriquecimiento de *Artemia* con microalgas y no por la ingestión directa de las células del alga suministrada como alimento.

El desarrollo de la técnica de bioencapsulación se produce en las décadas de los años 1970, (Nordeng y Bratland 1971), (Kelly *et al.*, 1977), (Howell 1979) y durante los años 1980 por Watanabe *et al.*, (1980), Robin *et al.*, (1981), Gatesoupe, (1982), Robin, (1982), Watanabe *et al.*, (1982) Robin *et al.*, (1983), Watanabe *et al.*, (1983), Leger *et al.*, (1986b), Van-Ballaer *et al.*, (1985), entre otros.

A partir de 1990 se han desarrollado ensayos que han hecho de la bioencapsulación un proceso de manipulación de las características nutricionales de *Artemia*, (Merchie *et al.*, 1993), (Hontoria *et al.*, 1993), (Barclay y Zeller 1996), (Estevez y Kanazawa 1996), (McEvoy *et al.*, 1996), (Tocher *et al.*, 1997) También esta técnica ha sido empleada para utilizar *Artemia* como vector y hacer llegar a los depredadores determinadas concentraciones de fármacos o agentes profilácticos, (Mohncy *et al.*, 1990, Touraki *et al.*, 1991, Chair *et al.*, 1994, Dixon *et al.*, 1995, Chair *et al.*, 1996, Gapasin *et al.*,

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*

---

- Evaluación de las características de la emulsión obtenida a partir del producto comercial IKA w3 que será empleado como contraste en los tratamientos de enriquecimiento de *Artemia*.
- Realización de bioensayos con larvas de camarón para validar la efectividad del proceso de bioencapsulación

## HIPÓTESIS.

El proceso de bioencapsulación en *Artemia* puede verse afectado por las características de los productos empleados para el enriquecimiento, así como por las condiciones en que los organismos son tratados.

El proceso de bioencapsulación en *Artemia* modificará la composición nutritiva de la misma, trayendo como consecuencia que al ser suministrada como alimento se mejore el crecimiento, la supervivencia o la calidad de los individuos cultivados.

## ANTECEDENTES.

Según Leger *et al.*, 1986a, las primeras sugerencias del empleo de la técnica de bioencapsulación las realiza Morns, (1956) Una década más tarde, Forster, *et al.*, (1967) demuestran que el valor nutricional de los nauplios de *Artemia* puede incrementarse con la aplicación de esta técnica. Dichos experimentos indican, además, que la metamorfosis de larvas de *Palaemon serratus* se acelera por el enriquecimiento de *Artemia* con microalgas y no por la ingestión directa de las células del alga suministrada como alimento.

El desarrollo de la técnica de bioencapsulación se produce en las décadas de los años 1970, (Nordeng y Bratland 1971), (Kelly *et al.*, 1977), (Howell 1979) y durante los años 1980 por Watanabe *et al.*, (1980), Robin *et al.*, (1981), Gatesoupe, (1982), Robin, (1982), Watanabe *et al.*, (1982) Robin *et al.*, (1983), Watanabe *et al.*, (1983). Leger *et al.*, (1986b), Van-Ballaer *et al.*, (1985), entre otros.

A partir de 1990 se han desarrollado ensayos que han hecho de la bioencapsulación un proceso de manipulación de las características nutricionales de *Artemia*, (Merchie *et al.*, 1993), (Hontoria *et al.*, 1993), (Barclay y Zoller 1996), (Estevez y Kanazawa 1996), (McEvoy *et al.*, 1996), (Tocher *et al.*, 1997) También esta técnica ha sido empleada para utilizar *Artemia* como vector y hacer llegar a los depredadores determinadas concentraciones de fármacos o agentes profilácticos, (Mohney *et al.*, 1990, Touraki *et al.*, 1991, Chair *et al.*, 1994, Dixon *et al.*, 1995; Chair *et al.*, 1996, Gapasin *et al.*,

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

- Evaluación de las características de la emulsión obtenida a partir del producto comercial IKA w3 que será empleado como contraste en los tratamientos de enriquecimiento de *Artemia*
- Realización de bioensayos con larvas de camarón para validar la efectividad del proceso de bioencapsulación.

## HIPÓTESIS.

El proceso de bioencapsulación en *Artemia* puede verse afectado por las características de los productos empleados para el enriquecimiento, así como por las condiciones en que los organismos son tratados.

El proceso de bioencapsulación en *Artemia* modificará la composición nutritiva de la misma, trayendo como consecuencia que al ser suministrada como alimento se mejore el crecimiento, la supervivencia o la calidad de los individuos cultivados.

## ANTECEDENTES.

Según Leger *et al.*, 1986a, las primeras sugerencias del empleo de la técnica de bioencapsulación las realiza Morris, (1956) Una década más tarde, Forster, *et al.*, (1967) demuestran que el valor nutricional de los nauplios de *Artemia* puede incrementarse con la aplicación de esta técnica. Dichos experimentos indican, además, que la metamorfosis de larvas de *Palaemon serratus* se acelera por el enriquecimiento de *Artemia* con microalgas y no por la ingestión directa de las células del alga suministrada como alimento.

El desarrollo de la técnica de bioencapsulación se produce en las décadas de los años 1970, (Nordeng y Bratland 1971), (Kelly *et al.*, 1977), (Howell 1979) y durante los años 1980 por Watanabe *et al.*, (1980), Robin *et al.*, (1981), Gatesoupe, (1982), Robin, (1982), Watanabe *et al.*, (1982) Robin *et al.*, (1983), Watanabe *et al.*, (1983), Leger *et al.*, (1986b), Van-Ballaer *et al.*, (1985), entre otros.

A partir de 1990 se han desarrollado ensayos que han hecho de la bioencapsulación un proceso de manipulación de las características nutricionales de *Artemia*, (Merchie *et al.*, 1993), (Hontoria *et al.*, 1993), (Barclay y Zeller 1996), (Estevez y Kanazawa 1996), (McEvoy *et al.*, 1996), (Tocher *et al.*, 1997) También esta técnica ha sido empleada para utilizar *Artemia* como vector y hacer llegar a los depredadores determinadas concentraciones de fármacos o agentes profilácticos, (Mohney *et al.*, 1990, Touraki *et al.*, 1991, Chair *et al.*, 1994, Dixon *et al.*, 1995; Chair *et al.*, 1996. Gapsin *et al.*,

1996). En diversos organismos las técnicas de bioencapsulación se han empleado para hacer estudios de requerimientos nutricionales de larvas, lo cual hace de ella una herramienta más para los nutricionistas de organismos marinos cultivados. (Tackaert *et al.*, 1991, Furuta *et al.*, 1996; Merchie *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996 y Zheng *et al.*, 1996).

Actualmente se cuenta con una serie de productos comerciales para el enriquecimiento de *Artemia* y de rotíferos para su utilización en la alimentación de camarones y peces en cultivo. Estos productos por lo general presentan determinadas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados que son esenciales en la dieta de los depredadores y estimulan respuestas metabólicas relacionadas con el crecimiento y metamorfosis observándose también respuestas favorables relacionadas con la sobrevivencia de los organismos cultivados. Entre estos productos se encuentran el Selco, Super Selco, Protein Selco, Marila, de la firma *Artemia System*; se encuentran también los comercializados en México por la firma Acuasis tales como, Hufa enrichment, Hufa Booster enrichment, Salt Creek Pond Hufa Enrich, Salt Creek Ratio Hufa Enrich, Salt Creek Super Hufa Enrich, Salt Creek Hufa Enrich, Microfeast Plus L-10, IKA w3

El término de bioencapsulación implica entrapar a materiales biológicamente activos en microesferas de gel o en microcápsulas confinadas por membranas. Las microesferas resultantes pueden contener enzimas, DNA, vacunas, células viables o materiales activos farmacológicamente.

La bioencapsulación en el campo de la acuicultura puede ser definida como un proceso mediante el cual un organismo vivo incorpora un determinado producto vía oral, por fagocitosis, pinocitosis o endocitosis y modifica su composición original. De esta forma, dicho organismo se convierte a los efectos prácticos en una cápsula viva. La naturaleza del producto que se suministra puede variar en dependencia de los deseos del acuicultor y generalmente el proceso está dirigido a la incorporación de algún elemento esencial para la dieta del depredador.

Tocher *et al.*, (1997) plantean que la bioencapsulación en *Artemia* a veces es considerada como el simple llenado del tracto digestivo con una pequeña biotransformación del producto enriquecedor en el sistema digestivo.

Las técnicas de enriquecimiento se han empleado para suplir las deficiencias nutricionales del alimento vivo o con vistas a que el mismo sirva como agente portador de determinados compuestos como hormonas, vitaminas, agentes profilácticos o terapéuticos o elementos esenciales para un adecuado crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de los depredadores. Se considera que las mismas tienen actualmente una serie de seguidores por las ventajas que pueden aportar tanto a larvas como a los productores de organismos zoófagos. Entre las ventajas se pueden citar las siguientes:

-Se enriquece al alimento vivo y no deteriora la calidad del agua

## Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*

---

- Por los movimientos relativamente lentos de *Artemia*, se estimula al depredador para su captura.
- El alimento vivo tiene mejor calidad nutritiva.
- Se puede emplear una gama amplia de productos para satisfacer diversos requerimientos, tanto de los productores como de los consumidores.
- La preparación de los organismos enriquecidos no resulta complicada.

La técnica de enriquecimiento en *Artemia* también presenta desventajas.

- No se aprovecha totalmente el producto que se quiere incorporar en *Artemia* debido a la incapacidad de este organismo, de realizar un filtrado total del medio en que se encuentra.
- El producto puede ser metabolizado por *Artemia* y no ser suministrado al depredador
- Si se realiza de forma inadecuada puede provocar afectaciones en los organismos que se pretendan enriquecer o incorporarle a los mismo productos inadecuados (aceites oxidados o tóxicos).

En contraste con los trabajos relacionados con el empleo de nauplios de *Artemia* y la modificación de su valor nutricional no se ha encontrado información suficiente sobre el empleo de juveniles y adultos y su bioencapsulación. Esto se debe fundamentalmente a que es más fácil trabajar con los nauplios que con los adultos. El trabajo con nauplios requiere sólo de 24 a 72 horas después de ser colocados los quistes a eclosionar y una infraestructura poco compleja para que se efectúe la bioencapsulación, el trabajo con juveniles y adultos requiere de 15 a 30 días dependiendo de la cepa, las condiciones ambientales, el alimento utilizado y de una mayor infraestructura que permita la obtención de los organismos en etapas más avanzadas de crecimiento. Sin embargo, resulta interesante para los acuicultores contar con la disponibilidad de *Artemia* adulta o en crecimiento debido a lo siguiente.

- El contenido proteico de *Artemia* adulta es mayor que el de los nauplios y esta alrededor del 60%. Por otra parte, la calidad de la proteína de la misma es superior al estar constituida por todos los aminoácidos esenciales (Leger *et al* 1986a).
- Puede servir como alimento a depredadores de mayor talla que los consumidores de nauplios
- *Artemia* contiene además concentraciones significativas de vitaminas, hormonas, carotenoides, entre otros
- Con un menor número de individuos adultos se alcanza mayor biomasa que con nauplios, lo que repercute la alimentación de los depredadores.

Aunque no se ha reportado de forma evidente en la literatura la existencia de dos tendencias en las técnicas de bioencapsulación con respecto al tiempo empleado para llevarlas a cabo, se hace evidente que la bioencapsulación se puede realizar de forma tal que el organismo a bioencapsular

sólo llene su tracto digestivo con el producto de interés, y el mismo, sin haberse metabolizado totalmente, sea incorporado al depredador. Este es un proceso relativamente rápido pues sólo se debe esperar por el llenado de su tracto digestivo, hecho que depende entre otros aspectos del estado fisiológico del animal, de la concentración de producto en el medio, del tamaño de partículas presentes en la suspensión o emulsión que el mismo ingiere.

La otra tendencia conlleva a la utilización de un tiempo más prolongado que pasa de las dos horas de alimentación con el producto de interés y en ese tiempo se puede comenzar la degradación de dicho producto. De esta forma el organismo incorpora a tejidos ingredientes que pueden constituir precursores de los productos finales que se quiere hacer llegar al depredador. Esta tendencia requiere de un estudio sobre del metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas, de forma tal que se pueda dirigir la técnica hacia la incorporación de los elementos de interés después de haber sufrido un proceso catabólico.

#### **Técnicas de enriquecimiento**

En décadas pasadas se llevaron a cabo numerosas técnicas para el enriquecimiento de *Artemia*. Estas fueron según Leger *et al.*, (1986a) clasificadas en cuatro grupos.

- Técnica Inglesa. (enriquecimiento con algas).
- Técnica japonesa. (enriquecimiento con levaduras W o emulsiones)
- Técnica Francesa. (enriquecimiento con dietas compuestas).
- Técnica Belga. (enriquecimiento con partículas revestidas o con concentrados autoemulsificados).

#### **Técnica Inglesa.**

En esta técnica los nauplios son cultivados en una suspensión de algas, (*Isochrysis galbana*) a una concentración de 1000 células por microlitro. En otras ocasiones se han empleado concentraciones de algas de 300 células por  $\mu\text{L}$  con densidades de individuos de 10 000 nauplios por litro en un período de 24 horas. Este período parece adecuado para enriquecer *Artemia* que se dará a larvas de camarón. Esta técnica es aceptable cuando el fitoplancton empleado es necesario para la alimentación de las larvas cultivadas.

#### **Técnica Japonesa.**

Este método en sus inicios era similar al descrito como técnica Inglesa. Se utilizaba el alga marina *Chlorella minutissima* a densidades que oscilan entre 14 y 18 millones de células/mL. Los nauplios

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

empleados llevaban 48 horas de incubación y el tratamiento de enriquecimiento se realizaba en un lapso de 14 a 72 horas. Con la levadura W como sustituto de algas se utilizan 0.38 mg/mL ó 9000000 células/mL y los nauplios son alimentados durante 24 horas.

La ventaja de utilizar levadura W es que se conoce el contenido de ácidos grasos polinsaturados del tipo W3 presentes en el alimento. Los aceites de peces que se emplean junto a las levaduras son generalmente ricos en ácidos grasos del tipo 20.5W3 y 22.6W3 y son fácilmente absorbidos por ellas. La desventaja de esta técnica es que se requiere que la levadura empleada esté viva, lo que implica la cercanía a los centros de producción de la misma. En esta técnica también se han empleado aceites emulsificados de peces en combinación con levaduras, observándose la incorporación de los mismos con gran facilidad.

#### **Técnica Francesa.**

Esta técnica se basa en el enriquecimiento de los nauplios por un período de 2 días con dietas compuestas vanadas. Hay autores que han empleado polvo de *Spirulina*, levaduras, D.L. Metionina, Cloruro de Colina, D- glucosamina HCl, Colesterol, Aceite de Hígado de Bacalao y premezcla de vitaminas y minerales y algunos metales traza. Hay quien realiza un doble enriquecimiento con dietas compuestas y en diferentes ocasiones se han empleado drogas antibacterianas como agentes terapéuticos o profilácticos.

#### **Técnica Belga.**

Esta técnica de bioencapsulación en un principio consistió en la alimentación con micropartículas cubiertas con varios aceites de peces. La preparación de estas micropartículas se realizaba con técnicas similares a las empleadas en la preparación de las fases estacionarias de las columnas empaquetadas de la cromatografía gas-líquido. Los resultados obtenidos con estas partículas son buenos pero la preparación resulta compleja y costosa.

Otras dietas más efectivas han sido desarrolladas denominándolas concentrados enriquecedores autoemulsificados. Estos son mezclas de complejos autodispersantes principalmente de fuentes de ácidos grasos, vitaminas, carotenos, fosfolípidos y emulsificadores. Dichos compuestos, después de una simple dilución en agua aireada producen unos glóbulos finos y dispersos fácilmente incorporables por los nauplios. La ventaja de esta formulación es su fácil uso y su efectividad.

Para esta técnica Belga se han propuesto diversos procedimientos, donde los nauplios pueden ser enriquecidos antes o después de la separación de los desechos de la eclosión. Una primera opción consiste en la incubación de los quistes con un concentrado autoemulsificado por 36 horas a 28-30 °C. Después de esto los nauplios enriquecidos son cosechados y están listos para ser suministrados a los depredadores. Aplicando esta técnica la eclosión y enriquecimiento ocurre en el mismo tanque sin una manipulación extra.

Una segunda opción implica la adición del concentrado autoemulsificado en el tanque de eclosión después de las 24 horas de la eclosión a 28-30°C. La separación de los nauplios enriquecidos se realiza a las 36 horas y se observa que los niveles de ácidos grasos polinsaturados se han incrementado, pero la separación de los nauplios de los desechos resulta complicada.

La tercera opción se asemeja a la Francesa y Japonesa. Después de la eclosión y separación de los nauplios de los desechos de la eclosión, los nauplios son enriquecidos en un recipiente aparte. La densidad naupliar para el enriquecimiento es elevada (300 000 nauplios por litro) y la mortalidad después de las 24 horas resulta mínima.

La firma Belga *Artemia System* ha desarrollado varios productos para el enriquecimiento de nauplios. El (SUPAR) es el empleado en la primera opción descrita. Los productos SELCO y SUPERSELCO han sido ampliamente utilizados en el campo de las investigaciones científicas y se han utilizado empleando la segunda y tercera opción. Esta firma no ha pasado por alto el enriquecimiento de adultos para lo cual ha desarrollado el llamado MARILA concentrado autoemulsificado que incorporado en *Artemia* se utiliza como alimento para inducir la maduración de crustáceos como los camarones penidos.

#### **Bioencapsulación. Consideraciones generales.**

Un resumen de algunos trabajos donde se muestran detalles de esta técnica, se muestra en la [Tabla 1](#).

De acuerdo con Watanabe *et al.*, (1978), Leger *et al.*, (1986a) y Fernandez-Reinz *et al.*, (1991) la presencia de ácidos grasos  $\omega 3$  altamente insaturados (HUFAS) determinan el valor nutricional de nauplios de *Artemia* para larvas de peces marinos y crustáceos. Los quistes de *Artemia*, llamados de tipo manno, tienen aproximadamente el doble del total de lípidos por unidad de peso seco que la los quistes de *Artemia* del tipo de agua dulce.

Una vía de reducir la deficiente calidad de algunas cepas de *Artemia*, es empleando dietas enriquecidas para incrementar la calidad nutricional de los nauplios. Fernandez-Reinz, M.J. et al., (1991), estudiaron la composición bioquímica de nauplios de *Artemia* a las 24 y 48 horas de enriquecimiento con emulsiones conteniendo diferentes ácidos grasos polinsaturados (PUFA) y encontraron el mayor incremento de lípidos enriqueciendo con la concentración media de la emulsión probada en un período de 48 horas. Sin embargo, en la tabla mostrada en su trabajo, los valores del porcentaje de lípidos a las 24 horas parecen ser mayores que los reportados para las 48 h, a excepción de lo reportado con la concentración media ensayada. Esto induce a pensar que en 24 horas también ha existido un adecuado nivel de enriquecimiento e indica que no es necesario enriquecer por 48 horas.

Por otra parte McEvoy et al., (1997), realizan el enriquecimiento de *Artemia* con emulsiones conteniendo aceite orbital de Atún y fosfatidilcolina de soya. Los autores señalan que no hay un incremento significativo en los lípidos totales ni en la relación DHA:EPA cuando el enriquecimiento se extiende por más de 18 horas. Este planteamiento puede ser utilizado para cuestionarse el tiempo real necesario para efectuar el enriquecimiento de *Artemia*.

Kontara (1991) muestra en una tabla el crecimiento y la sobrevivencia de las postlarvas de *Penaeus monodon* alimentadas durante 15 días, con nauplios de *Artemia* enriquecida durante 12, 18 y 24 horas. El mayor incremento en talla se obtuvo con *Artemia* enriquecida por 18 horas, en segundo lugar con *Artemias* enriquecidas por 12 horas y muy retrasado de ambas se encuentran los resultados alcanzados con *Artemia* tratada por 24 horas. Este es un planteamiento que cuestiona el tiempo adecuado para enriquecer *Artemia*. El análisis de ácidos grasos revela que el contenido del 20:5W3 en los nauplios depende de la duración del enriquecimiento y de los niveles de aceites usados. El contenido del 20:5W3 en los nauplios de *Artemia* se incrementa después de las 18 horas de tratamiento, pero decrece después de las 24, tanto a 0,5 g/L como a niveles de 1g/L de los enriquecedores probados.

Dhont, et al (1991) desarrollaron una técnica para el enriquecimiento de juveniles de *Artemia*, trabajaron con aproximadamente 50 animales /mL y los productos enriquecedores que emplearon fueron Selco y Super Selco. Exponen que el enriquecimiento de juveniles de *Artemia* permite alcanzar niveles similares al alcanzado con los nauplios. Estos niveles, sin embargo, se alcanzan a un menor tiempo gracias al mejor desarrollo del aparato filtrador de los juveniles. Estos autores plantean que *Artemia* acumula HUFAS en sus tejidos corporales además del que presenta en su tracto digestivo y que dichos niveles de ácidos grasos se incrementan cuando se extiende el período de enriquecimiento. Plantean que los niveles de ácidos grasos disminuyen drásticamente una vez finalizado el enriquecimiento. Esto implica que parte de los HUFAS asimilados son directamente metabolizados. Como consecuencia, un incremento de los HUFAs sólo se llevará a cabo cuando el enriquecimiento excede el decremento producido por el propio metabolismo. Este equilibrio determina la dosis mínima efectiva para el

enriquecimiento, mientras que la dosis máxima la determina el efecto negativo del deterioro de la calidad de agua. Aparentemente la toma de alimento se ve afectada por la calidad del agua y la condición de los animales y el enriquecimiento resulta mayor a mayores dosis, pero la supervivencia disminuye. Estos autores plantean que los niveles de HUFA disminuyen a temperatura ambiente debido a que *Artemia* metaboliza menos cuando se baja la temperatura.

Tackaert et al (1991) realizaron estudios para verificar si los fosfolípidos, particularmente la fosfatidilcolina, podría acumularse en los nauplios de *Artemia* usando las técnicas de bioencapsulación y si tales dietas enriquecidas podían ser usadas para evaluaciones cuantitativas y cualitativas del efecto de los fosfolípidos en organismos marinos. Del estudio se desprende que las técnicas de bioencapsulación no pueden ser utilizadas para acumular fosfolípidos en *Artemia*. Este organismo no es una dieta satisfactoria para dilucidar el efecto de diferentes niveles o tipos de fosfolípidos purificados en peces marinos y camarones. Interpretaciones de estos resultados parecen indicar que los fosfolípidos son catabolizados para la obtención de intermedios del metabolismo y suplir ciertos requerimientos nutricionales de las larvas en crecimiento.

Como se ha planteado, la ubicación de individuos filtradores frente a una emulsión es una forma de modificar el valor nutricional de los mismos. La característica de filtrador permite que los pequeños glóbulos de la emulsión sean incorporados como cualquier otro alimento. Las características de los glóbulos son de importancia primordial para que el proceso se realice adecuadamente y vienen dadas por diferentes aspectos que a continuación se abordan con más detalles.

### **Emulsiones.**

La preparación de emulsiones es un proceso complicado debido a la diversidad de variantes que pueden surgir según los productos que se empleen y el equipamiento destinado para obtenerlas. El empleo de las emulsiones es amplio en la fabricación de alimentos, pinturas, fármacos y combustibles, entre otros.

Una emulsión es un sistema disperso en el cual ambas fases son líquidas, una de ellas generalmente es agua o una solución acuosa y la otra aceite u otro líquido no mezclable en agua. Las gotas del líquido disperso son conocidas como fase interna de la emulsión. El líquido que las rodea es llamado fase continua o fase externa. La dispersión puede ocurrir naturalmente o puede ser estimulada mediante métodos mecánicos al gotear lentamente uno de los ingredientes dentro del otro mientras se

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

agita vigorosamente. También se obtienen emulsiones como resultado de cualquier otro proceso de polimerización.

Para la formación de una emulsión estable con compuestos orgánicos debe estar presente un tercer componente llamado emulsificador o agente emulsificante, el cual forma una película alrededor de los glóbulos del fluido disperso lo cual previene la unión entre ellos. Un emulsificador común es el jabón, pero no es adecuado para su empleo en el campo de la acuicultura

Para la caracterización de las emulsiones se emplean, entre otros, los siguientes parámetros:

#### **Talla de partículas.**

La talla de las partículas usualmente se expresa como el diámetro de los glóbulos de la fase interna. Si la talla no es uniforme, el grupo de tallas más frecuente es el usado para denotar la talla de partículas de la emulsión. El recorrido entre los valores más pequeños y los más grandes son el rango de las partículas de la emulsión. Emulsiones que presentan partículas con tallas pequeñas son llamadas emulsiones finas y aquellas que contienen glóbulos grandes son llamadas emulsiones gruesas.

Las tallas de las partículas dependen del tipo y de la cantidad de emulsificador, de la cantidad de energía para preparar la emulsión y el orden de adición de los ingredientes.

La mayoría de las emulsiones comerciales tienen una talla de partículas entre 0.5 y 20.5  $\mu\text{m}$ . Aquellas emulsiones con partículas finas y uniformes tienden a ser emulsiones muy estables. Según (Kenneth 1974), la apariencia de las emulsiones a simple vista está relacionada con la talla de la fase interna y plantea que emulsiones con glóbulos mayores de 1  $\mu\text{m}$ . tienen apariencia lechosa, aquellas con glóbulos entre 0.1 y 1  $\mu\text{m}$ . tienen apariencia blanco azulosas, las de glóbulos entre 0.05 y 0.1  $\mu\text{m}$ . son de apariencia grises semitransparentes y las que presentan glóbulos menores de 0.05  $\mu\text{m}$ . son emulsiones transparentes.

#### **Estabilidad.**

La estabilidad de una emulsión se evidencia por la retención de la apariencia original, viscosidad y olor según las condiciones de almacenamiento. Un pobre equilibrio interno es generalmente causado por la unión de las partículas dispersas. La velocidad de unión depende de la viscosidad de la emulsión y de las fases componentes, del tamaño de los glóbulos dispersos, de la carga en las partículas y de las condiciones de almacenamiento de las emulsiones.

Uno de los factores involucrados en la sedimentación de los glóbulos, aunque no el más importante, es la viscosidad de la fase continua de la emulsión. Alta viscosidad reduce la tendencia de la emulsión a separarse en sus ingredientes componentes.

Por otra parte, mientras el tamaño de las partículas sea menor, la velocidad de sedimentación será menor y la estabilidad de la emulsión será mayor. Estos factores están directamente involucrados con el tipo y las concentraciones del agente emulsificante empleado en la confección de las emulsiones

En la preparación de alimentos los emulsificadores más empleados son, ésteres simples de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos modificados, éteres de ésteres de ácidos grasos ("polyoxyethylene o poliglicerol fatty acid ester") y éteres de alcoholes grasos.

### **Preservación.**

Las emulsiones están sujetas a la contaminación con microorganismos durante la preparación y su uso. Un crecimiento excesivo de microorganismos no es común en los productos comerciales ya que contienen agentes bacteriostáticos. Sin embargo, es esencial que las emulsiones estén protegidas con sistemas preservativos. Algunos de los preservativos que han sido usados en los productos alimenticios son ácido ascórbico, ácido benzoico, propionato de sodio y de calcio y "propylene glycol". Muchas compañías someten a tales productos a pruebas de putrefacción para determinar la efectividad de los sistemas preservativos.

### **Emulsificación.**

Como se ha mencionado, las emulsiones se estabilizan por la adición de un tercer componente, el agente emulsificante. Estos materiales pueden ser compuestos activos superficialmente (monoglicéridos y diglicéridos), gomas (goma de acacia, metilcelulosa), arcilla finamente dividida (cocoa). Aunque todos estos materiales funcionan de forma diferente en el sistema de la emulsión, bajo condiciones ideales, cada tipo es capaz de estabilizar emulsiones específicas.

Para el uso en la acuicultura se deben extremar las medidas para la selección de los emulsificantes y evitar el empleo de elementos nocivos.

Es importante señalar que una mezcla de emulsificadores resulta más efectiva que un material simple y cuando se utilizan emulsificadores naturales o de grado técnico los resultados pueden variar en cada lote dependiendo de la fuente y de la historia previa del emulsificador (Kenneth 1974)

### ***Preparación de emulsiones para organismos marinos en cultivo.***

Con respecto a la preparación práctica de emulsiones en el campo de la alimentación de organismos marinos en cultivo, se han descrito métodos que han mostrado la potencialidad de la utilización de las emulsiones formadas como dietas alternativas para el suplemento de las dietas de algas y como fuente de ácidos grasos esenciales y otros lípidos a organismos filtradores como los ostiones (Heras *et al.* 1994)

En uno de ellos, según los autores, la técnica de preparación es rápida, no laboriosa y emplea productos de bajo costo.

El método se lleva a cabo mediante la sonificación de una mezcla de aceites de peces, lecitina de soya, aceites vegetales y vitamina E, a razón de 50:20:29:1(w/w/w/w). Los aceites de peces pueden ser reemplazados satisfactoriamente por ácidos grasos, incrementando de esta forma la cantidad de ácidos grasos esenciales presentes en la dieta. Las microesferas formadas tienen una distribución logarítmica normal con tallas que oscilan entre 1 y 20  $\mu\text{m}$ ., tallas adecuadas para diversos organismos filtradores cultivados. Según los autores las microesferas son estables en sistemas de recirculación con temperaturas superiores a 21 °C. La estabilidad ante la oxidación de las soluciones "stock" no varía en un período de 8 días. El crecimiento bacteriano tampoco es una dificultad en este tratamiento de las emulsiones.

Además del empleo de sonificadores, también han empleado homogenizadores de tejidos y licuadoras domésticas para la preparación de emulsiones. El empleo del sonicador Biosonik brinda mejores resultados en cuanto a la mejor distribución de tamaños de las microesferas obtenidas. Por otra parte, se plantea que la variación en el tiempo de empleo del sonicador en las emulsiones permite el establecimiento de diferentes distribuciones de tamaños en los glóbulos formados, lo cual amplía las posibilidades de empleo de dichas emulsiones.

### ***Implicación de los ácidos grasos en la alimentación de organismos acuícolas cultivados.***

Recientes investigaciones sobre ácidos grasos esenciales (EFA) para peces han demostrado que para un normal crecimiento las especies marinas requieren ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) del tipo  $\omega 3$  tales como el eicosapentaenoico (EPA, 20:5 $\omega 3$ ) y el docosahexaenoico (DHA, 22:6 $\omega 3$ ). En algunas ocasiones estos requerimientos han sido determinados usando lípidos o metilésteres conteniendo tanto EPA como DHA, lo cual no brinda información sobre cual de ellos es más importante para diversas funciones fisiológicas.

En especies de agua dulce donde el ácido linoleico (18:2n-6) es convertido a DHA vía EPA puede que la presencia en la dieta de DHA no sea de mucha importancia, pero sí para especies marinas donde la posibilidad de conversión es bastante limitada. Según Watanabe, (1991) se desconoce si el DHA es utilizado como fuente de energía durante el desarrollo, o convertido a otras sustancias importantes tales como las prostaglandinas.

El 20:5n-3 se considera un factor de eclosión de los huevos de un molusco (Clare *et al.* 1982). La carencia de los ácidos grasos de la serie n-3 afecta la calidad de los huevos obteniendo bajos porcentajes de eclosión en *Litopenaeus vannamei*, Cahu *et al.*, (1987). Xu *et al.* (1994) demuestran que existe una correlación entre el contenido del 20:5n-3 en los huevos y la fecundidad y el del 22:6n-3 y la eclosión de *Fenneropenaeus chinensis*.

Se ha demostrado que el 20:5n-3 y el 22:6n-3 son los componentes fundamentales de los fosfolípidos que están presentes en las membranas de los ojos del camarón *Pandalus borealis* (Bell y Dick, 1990), indicando que estos ácidos grasos juegan un importante papel en los tejidos nerviosos de los crustáceos marinos. En peces, se ha comprobado que una dieta deficiente en 22:6n-3 ocasiona una deficiencia estructural en los ojos, teniendo dificultades para localizar las presas en bajas intensidades de luz bajas (Sargent *et al.*, 1994).

Los PUFA de la serie n-3 tienen un importante papel además del orden estructural en el desarrollo de la actividad del sistema nervioso del embrión y la futura larva, (Chapelle, 1986), de ahí la importancia de las reservas maternas en estos PUFA. Un 65% de los ácidos grasos de los lípidos totales del ovario son transferidos al huevo y embrión antes del desove, los principales el 20:5n-3 y el 22:6n-3 (Mourente *et al.*, 1990).

Altos niveles de DHA se correlacionan con grandes resistencias al estrés en tres especies de peces (*Coryphaena hippurus*, *Polydactylus sexfilis* y *Chanos chanos*), (Ako, *et al.*, 1991). Kraul, *et al.*, (1991) hacen el mismo planteamiento y añaden que el EPA no parece ser limitante en las pruebas de alimentación para el mahimahi (*Coryphaena hippurus*).

En camarones se han encontrado altos niveles de 20:4n-6 (Lilly y Botno, 1981) y se ha demostrado que la biosíntesis de éste ácido graso es mínima, esto infiere la importancia de su suministro a través de la dieta. Este PUFA no solo es importante como precursor de las prostaglandinas (PG) sino también en su función estructural asociada a la permeabilidad e integridad de las membranas para hacer posible la acción enzimática y el transporte iónico.

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

Además de la función de precursores de prostaglandinas, los ácidos grasos presentan una función energética, la oxidación de los mismos libera gran cantidad de ATP empleada para el desenvolvimiento del metabolismo integral de los organismos.

Otra función de los ácidos grasos está relacionada con el transporte de determinadas lipoproteínas a través de la hemolinfa.

En la lipovitelina o proteína del vitelo de los huevos, los ácidos grasos tienen función de reserva de nutrientes y energía del embrión y las futuras larvas.

Según Kanazawa *et al.*, (1985), aunque los fosfolípidos y en particular la fosfatidilcolina se han encontrado como estimuladores del crecimiento y la sobrevivencia en peneidos, es necesario establecer los requerimientos de los mismos.

En el ensayo realizado por Tackaert, W. *et al.*, (1991), cuando había presencia de fosfatidilcolina en la dieta los de organismos jóvenes, los resultados de sobrevivencia y crecimiento fueron mejores que cuando esta no estaba presente. La prueba al estrés realizada no mostraba diferencias significativas. En otra fase de cultivo, donde se trabajó con organismos de mayor talla se obtuvo que los mejores crecimientos y resistencia al estrés se alcanzaron cuando los animales eran alimentados con dietas deficientes en fosfatidilcolina. Esto indica que los requerimientos varían en dependencia de los estadios que se analicen. Además, se plantea que resulta de gran importancia la relación que existe entre los compuestos  $w_3$  y  $w_6$  presentes en la dieta.

Los requerimientos nutricionales de los camarones son diferentes para el crecimiento que para la reproducción. Diversa gama de calidades se obtienen en las descendencias de camarón cuando son alimentados con dietas artificiales aunque las mismas permitan un crecimiento favorable de los juveniles.

Actualmente para los reproductores se plantea un requerimiento elevado de ácidos grasos polinsaturados. Se incluye a la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) por su acción antioxidante de las membranas celulares. Las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en los huevos parecen estar relacionadas con las concentraciones del mismo en la dieta y parece que se requieren concentraciones mínimas para permitir el desarrollo, una adecuada eclosión y viabilidad de los huevos. Aunque la concentración de  $\alpha$ -tocoferol es baja en mejillones esta dieta asegura una buena deposición en huevos, de lo que se desprende que el  $\alpha$ -tocoferol de los huevos depende de las concentraciones de otros componentes tales como los ácidos grasos polinsaturados (Cahu, *et al.* 1991) y otros antioxidantes tales como el ácido ascórbico y pigmentos carotenoides.

Dhert, P. *et al.*, (1991), en un ensayo sobre el efecto de los ácidos grasos esenciales en la calidad de los huevos y la larvicultura de *Epinephelus tauvina*, plantean que cuando se enriquece el alimento suministrado se incrementa el contenido de lípidos en los huevos y aumenta la calidad de larvas. La calidad la miden por el aumento del tamaño de la gota de los lípidos y dicen que esta calidad también puede mejorarse por la presencia de vitamina C ó E en el alimento "Marila" empleado para enriquecer. Durante el desarrollo larval, la cantidad y calidad de los lípidos de la dieta claramente determina la supervivencia de las larvas. Las deficiencias de HUFAS resultan en altas mortandades en los segundos y terceros estadios del período larval. Las dietas fortificadas en ácidos grasos no incrementan la supervivencia en el primer estadio, pero el DHA disminuye la mortandad en los estadios posteriores, sin embargo, no hay influencia en el crecimiento. Los resultados los llevan a plantear que tanto el DHA y el EPA son esenciales en el desarrollo de *E. tauvina*.

Queda establecida entonces la importancia de los PUFA de las series w3 y w6, sin embargo, no sólo es importante el nivel óptimo de inclusión mismos en una dieta, sino que guarden una correcta proporción w3/w6 entre ellos.

Un exceso de alimentos ricos en w3 en la dieta de los reproductores puede tener un efecto negativo, trayendo como consecuencia un desbalance de la relación w3/w6. La conversión del 18:2w6 a cadenas de 20 y 22 átomos de carbono requiere de elongación y desaturación. La enzima desaturadora tiene una mayor afinidad por el 18:3w3 y sus derivados que por los ácidos grasos de la familia w6. Un exceso del 18:3w3 puede competir por la disponibilidad de la enzima y resultar en una inhibición competitiva de la conversión del 18:2w6 a la familia de los w6, lo cual puede reducir la síntesis del ácido araquidónico, precursor de las prostaglandinas en peces (*Scophthalmus maximus*). (Bell *et al.* 1994)

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### ***Artemia* empleada**

Todos los ensayos contemplados en este documento se realizaron con quistes de *Artemia franciscana* ("Argentemia certified brine shrimp eggs, grade II"). Dichos quistes eran eclosionados en agua de mar a 33 ‰, con suficiente aireación para mantener a todos los quistes en suspensión y con iluminación constante de aproximadamente 1000 lux

Para abarcar las diferentes fases del crecimiento de *Artemia* y poder realizar ensayos donde las diferentes clases de largo de estos individuos estuviesen representadas se montó un sistema de cría que permitiera obtener una población abundante que suplía los requerimientos de los experimentos

Días alternos se sembraban 0.6 g de quistes en recipientes de 1L de capacidad y a las 24 horas se realizaba la cosecha de los nauplios que eran trasladados al recipiente de engorde del sistema de cría.

El recipiente de engorde de 200 L de capacidad se encontraba conectado a través de una válvula y un filtro de malla a otro recipiente de iguales dimensiones donde se mantenía un cultivo continuo de la microalga marina *Tetraselmis chuii*, la cual servía de alimento a los organismos cnados. Diariamente se realizaba intercambio de agua del 50 % al tanque de cría de *Artemia* y mediante un sistema de "air water lift" se reponía su volumen desde el tanque de cultivo de microalgas. El volumen en el tanque de microalgas era devuelto a su volumen original con agua de mar filtrada y pasada por lámpara ultravioleta la cual se refertilizaba con nitrato de amonio y superfosfato simple a razón de 150 mg/L de y 15 mg/L para favorecer el crecimiento de las microalgas

### ***Establecimiento de técnicas para la modificación del valor nutritivo de nauplios y adultos.***

#### **Determinación de la influencia del tamaño del alimento.**

Para determinar la selección del alimento por parte de *Artemia* se realizaron ensayos que consistieron en comparar la distribución de frecuencias de tamaños de partículas en el interior del tracto digestivo

de los individuos, con la distribución de frecuencias de tamaños de partículas encontradas en el medio de cultivo.

En un primer experimento se empleó como alimento partículas de látex donadas por los laboratorios "Polymer" las cuales presentaban diámetros de 5 y 15  $\mu\text{m}$ . La concentración en el medio de las partículas de 5  $\mu\text{m}$  fue de 159 000 partículas/mL (68 %) y de 74 000 partículas/mL (32%) para las de 15  $\mu\text{m}$ . Fig 1. Alrededor de 50 individuos fueron colocados en la suspensión donde permanecieron durante 1 hora. Al recipiente experimental se le suministró aireación desde el fondo para mantener el nivel de oxígeno en el medio y las partículas en suspensión. Transcurrido el tiempo preconcebido, se procedió a la colecta de los organismos que fueron clasificados por clase de largo de 1 mm de longitud. En total se analizaron entre 6 y 7 organismos por cada clase de largo.

En otra serie de experimentos se empleó almidón con el cual se abarcó un rango entre 1 y 69  $\mu\text{m}$ . de ancho en las partículas del alimento.

En estos ensayos, se preparó una suspensión con 440 mg de almidón (reactivo "Starch" soluble de la DBH, ANALR<sup>+</sup> analytical reagent, product No. 10271) con 60 mg de almidón de trigo tamizada por malla de 71  $\mu\text{m}$ . Ambas cantidades fueron depositadas en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con agua de mar (35‰) filtrada y hervida donde fueron agitadas vigorosamente.

De esta suspensión de partículas se tomaron 25 mL y se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL para obtener una concentración de alimento en el medio de 50 mg/L. En este erlenmeyer se depositaron alrededor de 50 organismos de diferentes clases de largo que provenían del sistema de cultivo anteriormente descrito. El matraz erlenmeyer se invirtió cada 60 segundos procurando homogenizar el medio y evitar una selección preferencial de las partículas cuya sedimentación fuera más lenta.

Transcurridos 10 minutos los animales se concentraron en una malla de 400  $\mu\text{m}$ . y se enjuagaron con agua de mar filtrada y hervida para eliminar la posibilidad de que partículas que no hubieran sido ingeridas y se encontraran adheridas a los apéndices se midieran posteriormente. Los animales fueron colocados en una caja Petri donde se sacrificaron con una gota de solución "Lugol". Una vez que los organismos detenían sus movimientos eran colocados en portaobjetos con glicerina yodada para evitar la evaporación del agua y contribuir a la coloración de las partículas de almidón.

Se midieron 211 organismos y se agruparon en 8 clases de largo de 1 mm. Los ejemplares se midieron, desde el extremo anterior del cefalotórax hasta el final de la furca sin incluir las espinas, con la ayuda de un microscopio estereoscópico MBC-9 con micrómetro ocular acoplado y aumento de 16X.

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

Posteriormente, con un microscopio óptico (Karl Zeiss) con aumento de 500x y con ayuda de agujas de disección se seccionaron a los organismos para permitir la salida de las partículas. También se caracterizó el contenido del tracto digestivo constituido por las partículas de almidón ingestas y se estableció la distribución de frecuencias de tamaños de los gránulos. En total se realizó la medición de 6505 partículas agrupadas en todas las clases de largo.

En el primer ensayo se comparó la proporción de partículas en el exterior e interior de los organismos con una prueba de Chi cuadrado y se establecieron los valores de selectividad para cada talla.

El contraste de las proporciones de partículas en el interior y exterior de los organismos se llevó a cabo con la fórmula de selectividad de Ivlev, (Salazar y González, 1986), donde:

$$S = \frac{G - E}{G + E}$$

S: Índice de Selectividad

G: Porcentaje de partículas en el interior.

E: Porcentaje de partículas en suspensión.

Con dicha fórmula se compara la distribución porcentual de frecuencias de tamaños de partículas presentes en el medio exterior con la presente en el interior del organismo

Si la frecuencia de un tamaño de partículas en el interior del organismo era mayor que la frecuencia encontrada en el exterior, se deducía que dicho organismo seleccionaba positivamente las partículas de ese tamaño y si acontecía lo contrario la selección era negativa. En la ecuación se especifica como cociente la suma de los porcentajes de la frecuencia en el interior y exterior para una talla de partículas con el objetivo de enmarcar los resultados entre los valores de -1 y 1. Los valores de selectividad menores que 0 indican selectividad negativa o poca aceptabilidad, mientras que los valores mayores que 0 indican preferencia o aceptabilidad por el tamaño de partícula tratado.

Un procesamiento adicional para amortiguar las variaciones individuales de los resultados se realizó aplicando una regresión polinomial de orden 3 a los datos de selectividad con respecto al tamaño de las partículas ingestas por los individuos de las diferentes clases de largo. De esta forma se muestran los límites de ingestión para cada una de las clases de largo los individuos tratados.

### **Efecto de la talla de los individuos y las concentraciones de partículas en el medio sobre el proceso de filtración realizado por *Artemia*.**

Para establecer el comportamiento de las diferentes tallas de los individuos y concentraciones adecuadas de alimentos en el proceso de enriquecimiento de *Artemia*, se realizaron ensayos de alimentación con partículas de látex de 5  $\mu\text{m}$ . de diámetro.

Se evaluó la actividad filtradora de los individuos con tallas comprendidas entre los 0.8 y 3.2 mm, aquellos con tallas entre 3.21 y 5.6 mm y por último los de tallas comprendidas entre los 5.61 mm y los 8.0 mm.

Se prepararon medios de cultivo con 15 concentraciones de partículas de látex: (400 000, 200 000, 100 000, 50 000, 25 000, 12 500, 6 250, 3125, 1 562, 781, 390.6, 195.3, 97.5, 48.8 y 24.4 partículas/mL) donde se colocaron los organismos por un período de 60 minutos. Transcurrido este tiempo los individuos se fijaron en una solución de Lugol y se observaron en un microscopio estereoscópico con micrómetro ocular para la determinación de la talla. En ciertos individuos, la transparencia del exoesqueleto permitía observar el comportamiento de llenado del tracto digestivo, sin embargo, a cada individuo se le hizo la disección para establecer el desplazamiento de las partículas en el tracto digestivo. La disección se hizo en la región de la cabeza, en el quinto segmento torácico y en el quinto segmento abdominal de manera que permitió establecer el porcentaje de llenado del aparato digestivo. Se consideró que individuos con alimento en la parte del tracto digestivo correspondiente a la región cefálica presentaban el 33% del tracto lleno, con alimento en el tracto hasta el quinto segmento torácico presentaban el 66 %y con alimento en el tracto hasta el quinto segmento abdominal presentaban un 100% de llenado.

Con estos elementos se elaboraron gráficas que muestran la relación entre la concentración de alimento en el medio con la eficiencia filtradora de los individuos reflejada en el llenado de su aparato digestivo.

### **Efecto del tiempo en el proceso de bioencapsulación.**

Para el desarrollo de estos ensayos se emplearon partículas de látex de 5 y 15  $\mu\text{m}$ . Se estudió el comportamiento de llenado del tracto digestivo de los organismos, transcurridos 3, 6, 9, 12, 15, 30, 60 y 120 minutos de haber sido colocados en el medio enriquecedor. La concentración de alimento empleada fue de 200 000 partículas/mL.

Aunque fue concebido realizar el muestreo teniendo en cuenta las clases de largo establecidas (0.8-3.2, 3.21-5.6 y 5.61-8.00 mm) los resultados se analizaron agrupando a todos los organismos en un solo grupo y determinando el porcentaje de la población con los diferentes grados de llenura del tracto

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

digestivo. De esta forma se hace más evidente el efecto del tiempo en el comportamiento filtrador de la población.

#### **Efecto de la densidad de individuos en el proceso de bioencapsulación.**

Para dar respuesta a este aspecto se realizaron ensayos preliminares que utilizaban a la supervivencia como indicador del comportamiento de los diferentes tratamientos analizados. Resultados muy contradictorios llevaron a analizar el factor densidad de individuos en el proceso de bioencapsulación por métodos indirectos.

Dichos métodos indirectos consisten en la determinación de los niveles de amonio presente en el interior de los individuos para determinar niveles acumulados en tejidos y su relación con las diferentes densidades ensayadas.

Los ensayos con las diferentes densidades se llevaron al cabo por triplicado en recipientes de 250 mL de capacidad con 150 mL de medio de cultivo. En todos los recipientes se estableció un flujo de aire de 5 L/minuto, la salinidad empleada fue de 38 ‰ y se suministró como alimento la emulsión confeccionada a base de lecitina/aceite/agua en proporción de 0.5/4/100 quedando las diferentes unidades experimentales a una concentración de 200 000 glóbulos/mL.

Al igual que en los ensayos anteriores se trabajó con individuos agrupados en las tallas de 0.8 a 3.2 mm a quienes llamamos metanauplios, aquellos con tallas entre 2.31 y 5.6 mm (juveniles) y los mayores de 5.6 hasta 8.0 mm que se clasificaron como adultos.

Para el caso de los metanauplios las densidades ensayadas fueron: 250, 500, 750 y 1000 individuos/mL. Para el caso de los juveniles y adultos las densidades probadas fueron 5, 10, 20, 40, 60 individuos/mL.

En estos tratamientos se cuantificaron además, los niveles de oxígeno y los niveles de amonio en el medio de cultivo.

Para la determinación de las concentraciones de amonio interno en los individuos se tomaron muestras de animales de cada unidad experimental y se homogeneizaron con ayuda de un homogeneizador eléctrico de tejidos por un lapso de 5 minutos en 500  $\mu$ L de agua destilada. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 6 minutos (m) y se tomaron 200  $\mu$ L de sobrenadante que fueron diluidos en proporción 1/20 con agua destilada. Las muestras se fijaron en tubos Ependorff con yodo sublimado y fueron conservadas en congelación hasta su procesamiento, siempre antes de transcurridas doce horas.

Para el procesamiento de las muestras de amonio se utilizó la técnica de inyección de flujo/difusión de gases (Schmitt y Uglow 1993), que permite trabajar con muestras pequeñas que contienen bajas concentraciones de amonio. El equipo se acopió a una microcomputadora mediante una interfase, utilizándose un programa confeccionado por NAFRI S.A. de C.V.

Cada ensayo se realizó por triplicado y en total se analizó el comportamiento de 15 metanauplios, 17 juveniles y 15 adultos.

#### **Validación fisiológica de la incorporación de la emulsión en el proceso de enriquecimiento de *Artemia*.**

La validación fisiológica de la incorporación de la emulsión por parte de *Artemia* se realizó teniendo en cuenta la relación O:N. Esta relación permite conocer el sustrato metabólico empleado ante diferentes condiciones de alimentación.

Este indicador se obtuvo del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de *Artemias* de las diferentes tallas señaladas, las cuales fueron sometidas a una alimentación consistente en la microalga *Tetraselmis chuii*, otro tratamiento donde el alimento fue la emulsión experimental anteriormente citada y un tratamiento donde se sometió a los animales a condiciones de ayuno.

Para la determinación de la excreción de amonio las larvas permanecieron en las celdas respirométricas durante dos horas, determinándose la excreción de amonio por la diferencia de su concentración en el agua de las celdas entre el inicio y final de este periodo. Se colocaron entre 35 y 70 nauplios por cámara o entre 5 y 10 juveniles o adultos en celdas respirométricas de vidrio (RC-300) con un volumen de agua de 1 mL. A través de las cámaras respirométricas se hizo circular una corriente de agua a  $28 \pm 0.1$  °C proveniente de un termocirculador (Fisher Scientific Isotemp Refrigerated Circulator, modelo 900) con el fin de mantener la temperatura constante. Las larvas permanecieron 30 minutos en las cámaras para su adaptación y a partir de ese momento se comenzaron a realizar las determinaciones del consumo de oxígeno en un lapso de 10 minutos utilizando un microelectrodo de oxígeno (Strathkelvin Instrument, modelo 781).

Tanto para las determinaciones de consumo de oxígeno como para la excreción de amonio se utilizó una cámara control por cada 5 cámaras con larvas.

Para determinar el peso seco individual de las larvas al finalizar las mediciones de consumo de oxígeno y excreción de amonio éstas fueron lavadas con agua destilada, secadas en una estufa a 60

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

°C durante 24 horas y posteriormente pesadas en una microbalanza CAHN modelo C-33 con precisión de 0.001 mg.

Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados fueron analizados mediante pruebas estadísticas paramétricas.

### ***Evaluación de las características de las emulsiones.***

Los ensayos para el enriquecimiento de *Artemia* y su aplicación en la alimentación de postlarvas de camarón se llevaron al cabo con emulsiones lipídicas.

Se realizó el trabajo de caracterización de las emulsiones a base de lecitina de soya, aceite de hígado de bacalao y agua destilada en las proporciones de 0.5/2/100, 0.5/4/100, 0.5/8/100, 0.5/16/100, 0.5/32/100

Como emulsión control en los ensayos de alimentación de larvas de camarón se empleó el producto comercial IKA w3 el cual sólo se preparó y evaluó con la relación de aceite y agua igual a 4 mL de aceite por cada 100 mL de agua. Los ensayos se realizaron en ambiente de temperatura controlada de 28 °C.

La caracterización de las emulsiones se realizó por triplicado y consistió en el establecimiento de la distribución de frecuencias de los tamaños de los glóbulos presente en cada emulsión preparada. De cada emulsión se tomaron muestras que fueron diluidas en agua destilada para facilitar los conteos y la medición de los glóbulos. Las mediciones y conteos de estos glóbulos se realizaron colocando muestras en una cámara de Neubauer y efectuando observaciones directas con un microscopio óptico Micromaster® con micrómetro ocular acoplado y aumento de 400X.

Teniendo en cuenta la posible fluctuación de las características de las emulsiones según el método de preparación empleado se concibió hacer el análisis del comportamiento de las emulsiones preparadas con los productos anteriormente expuestos agitando vigorosamente a 1625 y 812 rpm en una licuadora por un periodo de total de 30 segundos (s), con lapsos intermedios de 10 s.

Los resultados se plasman en gráficos que reflejan la distribución de tamaños de los glóbulos obtenidos con las diferentes proporciones de los productos empleados y las diferentes velocidades de rotación utilizadas. Entre las emulsiones preparadas con los mismos ingredientes se realiza además una prueba de Chi cuadrado para comparar las distribuciones de frecuencias encontradas.

### **Efecto del suministro de *Artemia* enriquecida en postlarvas de *Litopenaeus vannamei*.**

Se realizaron dos ensayos para determinar el efecto de *Artemia* enriquecida con las emulsiones en las postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. En el primero se determinó la influencia del alimento en organismos en el estadio de PL 10 a PL30 y en el segundo en los estadios de PL5 a PL 10.

Los ensayos consistieron en la comparación de los resultados de crecimiento (peso seco final de las postlarvas), supervivencia y de resistencia a un estrés salino después de haber sometido a los animales a tres tratamientos de alimentación a base de *Artemia*. Para cada tratamiento se determinó, además, la concentración de triglicéridos, colesterol y proteínas totales de los tejidos de las postlarvas y del alimento empleado. Se analizaron tres unidades experimentales por tratamiento para cada uno de los indicadores señalados.

El primer tratamiento, concebido como control, conlleva el empleo de *Artemia* sin enriquecer. En el segundo tratamiento, para el enriquecimiento de *Artemia* se emplea una emulsión constituida por lecitina de soya, aceite de hígado de bacalao y agua destilada a razón de 0.5/4/100 g. El tercer tratamiento consiste en el empleo de la emulsión preparada con el producto comercial IKA W3 (aceite enriquecido de calamar) en las proporciones de 4g del producto/100 mL de agua destilada.

Los ingredientes para la confección de las emulsiones fueron agitados a 1625 rpm en una licuadora por un tiempo total de 30 segundos con dos lapsos intermedios de 10 segundos.

Los nauplios de *Artemia* eran cosechados después de un período de incubación de 24 horas y eran colocados en un recipiente de 10 L de capacidad donde eran alimentados con la microalga marina *Tetraselmis chuii* a una concentración de 200 000 células/mL durante 24 horas. Transcurrido el tiempo señalado los metanauplios eran cosechados y colocados a densidades de 250 por mL en los recipientes de enriquecimiento. El agente bioencapsulante era suministrado al medio enriquecedor en un volumen tal que se establecían concentraciones de 400 000 glóbulos de la emulsión/mL.

En estas condiciones *Artemia* era mantenida durante un período de dos horas y posteriormente era cosechada y lavada con agua de mar filtrada para ser suministrada a cada uno de los recipientes experimentales según el tratamiento correspondiente

Las unidades experimentales para los ensayos con camarón consistieron en recipientes plásticos rectangulares blancos de 40 L de capacidad con su respectiva fuente de aireación. Para el primer ensayo la densidad de siembra fue de 1.5 PL10/L (peso seco inicial medio  $\pm$  desviación estandar

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

$0.4383 \pm 0.1173$  mg, N= 197 ), mientras que para el segundo fue de 20 PL5/L. (peso seco inicial medio  $\pm$  desviación estándar,  $0.1361 \pm 0.1032$  mg, N= 31)

Diariamente se realizaba un intercambio de agua del 75% del volumen del recipiente extrayéndose las heces y restos del alimento remanente. El volumen de agua era repuesto con agua de mar pasada por filtros de arena, de cartuchos de 5  $\mu$ m y circulada a través de una lámpara de luz ultravioleta. Una vez ajustado el volumen era añadida la correspondiente ración de alimento a cada unidad experimental, estableciéndose concentraciones que oscilaron ente 5 y 7.5 metanauplios/mL en el recipiente de cultivo de larvas.

#### **Indicadores empleados para evaluar el efecto del alimento en las postlarvas.**

##### **Crecimiento.**

El crecimiento de los individuos se determinó por el incremento en peso seco alcanzado durante el período experimental contemplado para cada experimento

El peso seco se obtuvo después de individualizar muestras de cada unidad experimental y colocarlas en una estufa a 60 °C por un período de 24 horas. Los animales fueron pesados con ayuda de una microbalanza CAHN modelo C-33 con precisión de 0.001 mg.

Para el análisis de los resultados se consideró tomar como mínimo 10 muestras por unidad experimental, lo que significa al menos 30 muestras por tratamiento

Los resultados de los tratamientos fueron comparados mediante pruebas estadísticas paramétricas después de analizar que los datos se distribuían normalmente y tenían homogeneidad de varianza

##### **Supervivencia.**

Fue establecida por la proporción de individuos vivos cosechados al final de los experimentos con respecto al cantidad inicial de individuos sembrados.

Los resultados se compararon mediante la prueba no paramétrica de Chi cuadrado

### **Resistencia al estrés.**

Este indicador fue obtenido al someter a los individuos a un estrés salino producido por una reducción brusca de la salinidad del medio de 38 a 5‰. Transcurrido un tiempo de 1 hora se determinó la cantidad de individuos que se reponían a dicho estrés. Los individuos que no se habían recuperado en el lapso señalado se consideraron como muertos. Con esta información se establecieron porcentajes de supervivencia a la prueba de estrés que fueron comparados con la prueba no paramétrica de Chi cuadrado.

### **Niveles de Colesterol, Triglicéridos y Proteínas Totales en tejidos.**

Los valores de las concentraciones de estos productos metabólicos se determinaron en muestras de 3 individuos correspondientes a cada unidad experimental, lo que significa la evaluación de 9 ejemplares por tratamiento. La caracterización de los tejidos se efectuó con "Kits" diagnósticos para sueros humanos que tienen su fundamento en métodos colorimétricos. El procesamiento de las muestras se efectuó siguiendo los siguientes pasos.

- Con un homogeneizador de tejidos macerar la muestra de organismos con 400 µL de agua destilada en un tubo ependorff
- Centrifugar a 14 000 rpm durante 6 m
- De cada tubo tomar dos muestras de 10 µL de sobrenadante y depositarlas en los correspondientes pozos de la placa del Elisa.
- Utilizar 200 µL de reactivo según el "kit" diagnóstico para que se desarrolle la reacción de color
- Determinar la absorbancia en el lector de placas ELISA después de incubar según el tiempo indicado y longitud de onda propuesta según las recomendaciones del "Kit" diagnóstico.

Los resultados entre los tratamientos se comparan por medio de pruebas estadísticas paramétricas .

## **RESULTADOS.**

### **Determinación de la influencia del tamaño del alimento.**

En el ensayo en que se emplearon las partículas de látex, la concentración en el medio para las partículas de 5 µm fue de 158 750 part./mL y para las de 15 µm. de 73 750 part /mL Desde el punto de vista porcentual estas concentraciones representan el 68% y el 32 % del total de partículas

### **Resistencia al estrés.**

Este indicador fue obtenido al someter a los individuos a un estrés salino producido por una reducción brusca de la salinidad del medio de 38 a 5%. Transcurrido un tiempo de 1 hora se determinó la cantidad de individuos que se reponían a dicho estrés. Los individuos que no se habían recuperado en el lapso señalado se consideraron como muertos. Con esta información se establecieron porcentajes de supervivencia a la prueba de estrés que fueron comparados con la prueba no paramétrica de Chi cuadrado.

### **Niveles de Colesterol, Triglicéridos y Proteínas Totales en tejidos.**

Los valores de las concentraciones de estos productos metabólicos se determinaron en muestras de 3 individuos correspondientes a cada unidad experimental, lo que significa la evaluación de 9 ejemplares por tratamiento. La caracterización de los tejidos se efectuó con "Kits" diagnósticos para sueros humanos que tienen su fundamento en métodos colorimétricos. El procesamiento de las muestras se efectuó siguiendo los siguientes pasos.

- Con un homogeneizador de tejidos macerar la muestra de organismos con 400  $\mu$ L de agua destilada en un tubo ependorff
- Centrifugar a 14 000 rpm durante 6 m
- De cada tubo tomar dos muestras de 10  $\mu$ L de sobrenadante y depositarias en los correspondientes pozos de la placa del Elisa.
- Utilizar 200  $\mu$ L de reactivo según el "kit" diagnóstico para que se desarrolle la reacción de color.
- Determinar la absorbancia en el lector de placas ELISA después de incubar según el tiempo indicado y longitud de onda propuesta según las recomendaciones del "Kit" diagnóstico.

Los resultados entre los tratamientos se comparan por medio de pruebas estadísticas paramétricas .

## **RESULTADOS.**

### **Determinación de la influencia del tamaño del alimento.**

En el ensayo en que se emplearon las partículas de látex, la concentración en el medio para las partículas de 5  $\mu$ m fue de 158 750 part /mL y para las de 15  $\mu$ m de 73 750 part /mL. Desde el punto de vista porcentual estas concentraciones representan el 68% y el 32 % del total de partículas

presentes respectivamente. Las concentraciones de estas partículas en el interior de los individuos manifiestan un comportamiento inverso. Para las de 5  $\mu\text{m}$ . se observa que están presentes en un 37% mientras que las de 15  $\mu\text{m}$ . representan un 63 %. (Fig.1).

El valor de la probabilidad ( $P$ ) encontrado con la prueba Chi cuadrado que compara la distribución de partículas en el interior y exterior de los organismos es significativo para  $\alpha=0.05$  ( $P=0.0000$ )

El valor del índice de selectividad ( $S$ ) calculado para las partículas de 5  $\mu\text{m}$ . fue negativo ( $-0.295$ ) mientras que el valor obtenido para las partículas de 15  $\mu\text{m}$ . fue positivo. ( $0.326$ ). Estos resultados reflejan preferencia de las partículas de 15  $\mu\text{m}$ . sobre las de 5  $\mu\text{m}$ . en el proceso de ingestión del alimento.

En la Fig.2 se muestra la distribución de frecuencias de los tamaños de los gránulos de almidón encontrados en la suspensión preparada. Con una frecuencia de aparición muy baja se encuentran gránulos mayores de 36  $\mu\text{m}$ . de ancho.

En la Tabla 2. se muestran los valores del tamaño de muestra ( $n$ ), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el valor de  $f$ , y la probabilidad ( $P$ ) para cada línea de regresión, obtenidas de graficar las tallas de las partículas contra el índice de selectividad. Todos los modelos de regresión fueron significativos ( $P<0.05$ ).

Para los individuos de la clase de largo 1 (Fig. 3), los límites de ingestión positiva se enmarcan entre 4.1 y 17.7  $\mu\text{m}$ ., siendo las partículas de 10.0  $\mu\text{m}$ . las de mayor frecuencia de aparición en el tracto digestivo.

En la Fig. 4 se observa que individuos con tallas entre 2 y 2.99 mm (clase de largo 2) incorporan con mayor facilidad partículas con tamaños superiores a las 4.3  $\mu\text{m}$ . y menores de 22.5  $\mu\text{m}$ . Las partículas de 13.0  $\mu\text{m}$  de ancho son las de mayor incorporación.

Para los individuos de la clase de largo 3. (Fig. 5) el modelo de regresión polinomial no señala al intercepto menor, sin embargo, se observa que dicho punto pudiera encontrarse alrededor de las 7  $\mu\text{m}$ . El intercepto mayor se sitúa en 28.6  $\mu\text{m}$ . y las partículas con mayor frecuencia de aparición en el tracto digestivo, por lo tanto las de mayor aceptabilidad, son las de 21.0  $\mu\text{m}$ .

Los individuos de la clase de largo 4 (Fig. 6) ingieren con mayor preferencia las partículas entre 7.4 y 27.8  $\mu\text{m}$ ., siendo las de 16.4  $\mu\text{m}$ . las de mayor aceptación.

En la Fig. 7 la selectividad positiva se observa entre 8.8 y 32.0  $\mu\text{m}$ ., siendo 18.7  $\mu\text{m}$ . la talla de mayor aceptación por parte de los individuos de la clase de largo 5

Las partículas con tallas entre 7.7 y 30.4  $\mu\text{m}$ . son las de mayor aceptación para los individuos de 6 a 6.9 mm de longitud. En estos individuos las partículas con 18.0  $\mu\text{m}$ . son las que aparecen con mayor frecuencia en su tubo digestivo. (Fig. 8).

Para los individuos de la clase de largo 7 (Fig. 9) los límites de ingestión positiva se encuentran entre las 6.7 y 26.4  $\mu\text{m}$ . Las partículas con mayor aceptación son las de 15.7  $\mu\text{m}$ .

Para los individuos de la clase de largo mayor (8-8.9 mm) (Fig. 10) los límites de ingestión positivos se encuentran entre 8.0 y 28.0  $\mu\text{m}$ . La talla de partículas más ingerida es de 17.0  $\mu\text{m}$ .

En la Fig. 11, se observan los resultados de la fusión del comportamiento filtrador de los individuos de las diferentes clases de largo. Este análisis integral nos señala que los organismos tratados ingieren de forma satisfactoria partículas con tallas entre 6.8 y 27.5  $\mu\text{m}$ . De forma general para todas las clases de largo las partículas de 16.0  $\mu\text{m}$ . son las más ingeridas

Para las diferentes Figuras, el valor de N representa el número de organismos analizados y el valor de n representa la cantidad de partículas estudiadas.

### **Efecto de la talla de los individuos y las concentraciones de partículas en el medio sobre el proceso de filtración realizado por *Artemia*.**

En la Tabla 3, se muestra el número de individuos (N) caracterizado para cada concentración de partículas y para cada clase de largo estudiada. En total se estudió el comportamiento filtrador de 453 individuos agrupados en las diferentes clases de largo.

La Fig. 12 muestra el comportamiento de llenado del tracto digestivo de los individuos de las diferentes tallas en el lapso de una hora de tratamiento con cada una de las concentraciones de alimento ensayadas.

Resulta interesante señalar el comportamiento de los individuos de la talla menor (0.8-3.2 mm) que indica un elevado poder de filtración del alimento presente en el medio. Supuestamente el menor desarrollo del aparato filtrador de los primeros estadios haría pensar en una conducta diferente. En contraste con las restantes tallas estos organismos pequeños en el mismo lapso manifiestan porcentajes de llenado de su aparato digestivo superiores a los encontrados en las otras dos. Este comportamiento parece estar asociado a estructuras morfológicas de los individuos y estrategias de

filtrado características de esta primera etapa de desarrollo (Cohen, G. com. pers.). Concentraciones del alimento por debajo de 781 partículas/mL para los individuos pequeños provocan un comportamiento no deseado para el tratamiento de bioencapsulación al encontrarse a una parte de la población con el tracto digestivo vacío. Concentraciones superiores a las 12 500 partículas/mL permiten el llenado del tracto digestivo en el curso del tratamiento.

La tendencia de llenado de los individuos con tallas entre 3.21-5.6 mm también presenta un comportamiento esperado. Al disminuir la concentración de alimento en el medio disminuye el porcentaje de llenado del tracto digestivo para el período establecido.

El comportamiento encontrado en las concentraciones de 400 000 y 200 000 partículas/mL hace que se recomienden para individuos con estas tallas y que sean sometidos a una hora de tratamiento con un alimento como las partículas de látex con diámetros de 5µm

Para los individuos de mayor talla (5.6-8.0 mm) los resultados indican que las mayores concentraciones de alimento ensayadas (200 000 y 400 000 partículas/mL) son las más adecuadas para realizar la bioencapsulación. Ente el 77% y el 87% de los animales presentaban su tracto digestivo totalmente lleno con las partículas de látex, en el lapso de 1 hora de tratamiento .

#### **Efecto del tiempo en el proceso de bioencapsulación.**

En la Tabla 4. se muestra el número de individuos de cada clase de largo caracterizado para cada tiempo de tratamiento. En el ensayo con las partículas de 15 µm se observó el comportamiento de llenado de 427 individuos, mientras que en el ensayo realizado con partículas de látex de 5 µm se analizó el comportamiento de 379.

Los resultados del efecto del tiempo en el proceso de llenado del tracto digestivo de ejemplares de *Artemia* alimentados con partículas de látex se muestran en las Figs. 13 y 14.

El resultado más importante que se quiere resaltar de los ensayos realizados en este sentido es que con los dos tipos de alimentos ensayados todos los organismos muestreados presentan el tracto digestivo lleno de partículas de látex a las dos horas de tratamiento.

Por otra parte, se observa un comportamiento lógico en el proceso de ingestión del alimento al reflejarse la tendencia creciente de llenado del aparato digestivo de los individuos a medida que transcurre el tiempo.

Se considera interesante señalar que desde la primera observación realizada a los tres minutos, en ambos tratamientos parte de la población presenta el tracto digestivo con un considerable grado de llenura. Esto manifiesta la potente capacidad filtradora de estos individuos.

#### **Efecto de la densidad de individuos en el proceso de bioencapsulación.**

La supervivencia parecía ser el indicador más adecuado para analizar este proceso, sin embargo, las afectaciones debido a la manipulación de los individuos enmascaraban los resultados.

La evaluación de las concentraciones de amonio tanto en los organismos como en el medio de cultivo y su relación con las concentraciones de oxígeno presentes en el medio nos permitió integrar los resultados e interpretar el efecto de la densidad en los individuos en el proceso de enriquecimiento.

Se supone que al elevar la densidad de individuos se incrementarán los niveles de amonio en el medio y por lo tanto los individuos, además de incorporar la emulsión, pueden incorporar parte del amonio y convertirse en un alimento tóxico. Por otra parte una disminución de las concentraciones de oxígeno en un corto período puede tener efectos perjudiciales incluso para organismos oxireguladores como *Artemia*.

En la Fig. 15 se muestran los resultados de los niveles de amonio encontrados en el medio de cultivo debido a las diferentes densidades de nauplios ensayadas. Las leyendas 0H, 1H y 2H representan los tiempos en horas en los cuales se hicieron las determinaciones.

Es evidente que los niveles de amonio se incrementan con la densidad y con el tiempo hasta alcanzar la cifra cercana a los 2.5 mg/L con la densidad de 1000 organismos/mL a las 2 horas de tratamiento. Valores inferiores se observan a la hora de tratamiento. Este comportamiento era esperado debido a la paulatina acumulación de desechos metabólicos en el medio de cultivo.

En la Fig. 16 se presentan los niveles de oxígeno en el medio de cultivo donde se observa un comportamiento inverso a lo reflejado con el amonio. Tanto a una hora de tratamiento como a las 2 horas los valores registrados decrecen con el incremento de la densidad de individuos.

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*

---

Los niveles de amonio en el medio registrados en la etapa de juveniles (Fig.17), se incrementan con la densidad y con el transcurso del tiempo hasta alcanzar valores cercanos a los 7 mg/L en la densidad de 80 organismos/mL a las 2 horas de tratamiento. A la hora de tratamiento los valores están cercanos a los 5 mg/L.

Los niveles de oxígeno decrecen considerablemente reflejando valores inferiores a los 2.5 mg/L en la mayor densidad de individuos. (Fig.18)

El comportamiento del amonio y del oxígeno para los adultos (Fig. 19 y Fig. 20) es similar al descrito en los casos anteriores, se elevan los niveles de amonio en el medio con el transcurso del tiempo y al aumentar la densidad de individuos, mientras que los niveles de oxígeno decrecen y alcanzan valores peligrosamente bajos aún para *Artemia*, organismo oxiregulador por excelencia.

La evaluación de los niveles de amonio interno acumulados en el proceso de enriquecimiento en nauplios juveniles y adultos se muestran en las Figs. 21, 22 y 23.

Resulta interesante el comportamiento encontrado debido a que se observa una tendencia a mantenerse las concentraciones de amonio interno independientemente de la densidad tratada y por lo tanto de las concentraciones de amonio presentes en el medio. Por otra parte, no parece haber influencia del tiempo de tratamiento en los niveles de este elemento encontrado en los tejidos de los organismos analizados. Tal parece que existe un mecanismo fisiológico que permite la eliminación del amonio incorporado tal como sucede con el mecanismo de osmoregulación tan mencionado en *Artemia*.

La Fig. 24 refleja el contenido de los niveles de amonio y su error típico, expresados en mg de peso húmedo por gramo de individuos en los diferentes estadios. Se considera pertinente señalar los valores elevados registrados para los nauplios en contraste con los encontrados para juveniles y adultos.

#### **Validación fisiológica de la incorporación de la emulsión en el proceso de enriquecimiento de *Artemia*.**

La Tabla 5. muestra los grupos de individuos estudiados y la relación O:N con los valores medios, el error típico y el número de individuos analizados en cada tratamiento. Se señala con letras diferentes además, las diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos.

La Fig. 25 muestra que los valores significativamente mayores de la relación O:N se alcanzan cuando se emplea la emulsión como alimento. Estos resultados son un indicador de la preferencia del empleo de los lípidos como sustrato metabólico y por lo tanto que los ingredientes de la emulsión han sido incorporados en el tiempo de tratamiento.

Por los valores de la razón O:N reflejados en dicha figura se supone que cuando se emplean microalgas como alimento o los individuos permanecen sin alimentarse, la tendencia es a utilizar las proteínas del alimento vivo o de su propio cuerpo para suplir sus requerimientos nutricionales.

### ***Evaluación de las características de las emulsiones.***

En la Tabla 6, se expone el número de glóbulos caracterizados en cada emulsión experimental estudiada.

Los resultados de la distribución de frecuencias de las micelas formadas en la emulsión constituida por lecitina/aceite/agua y mezclados a una velocidad de 812 rpm, se muestran en las Figs. 26, 27, 28, 29 y 30.

Se puede observar claramente que el comportamiento de las diferentes emulsiones está caracterizado por la presencia de micelas de pequeño tamaño. En todos los casos el tamaño más frecuente es de 2.5  $\mu\text{m}$ . Se observa además la aparición de micelas mayores a medida que la relación lecitina / aceite disminuye, sin embargo, la representatividad de estos tamaños es relativamente pobre por lo que no hay un aporte significativo que incremente la talla media de la emulsión de manera notable.

En la Fig 31 se muestran las concentraciones medias de micelas, expresadas en glóbulos por milímetro cúbico, de cada una de las emulsiones preparadas. Se muestra además la variación de las estimaciones incluyendo al error estándar.

La prueba Chi cuadrado realizada para comparar las diferentes distribuciones de frecuencias de tamaños de micelas encontradas en cada emulsión refleja que entre las mismas no se observan diferencias significativas.

Una observación importante fue el comportamiento inestable de la emulsión preparada a razón de 0.5/32/100 en el cual se pudo constatar la fusión de las micelas pequeñas favoreciendo la formación de micelas mayores a medida que transcurre el tiempo. Este comportamiento de inestabilidad no favorece los propósitos del trabajo ya que no se garantiza la estabilidad del compuesto formado y con el transcurso del tiempo no se puede predecir la aparición de glóbulos o micelas de gran tamaño que no pueden ser incorporados por *Artemia*. Quizá este comportamiento inestable se deba a la pequeña

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

proporción de agente emulsificante utilizado con respecto a la cantidad de aceite empleado lo cual provoca la formación de una delgada y frágil película que rodea a la pequeña micela en la emulsión y que favorece la fusión de los glóbulos.

En las Figs de la 32 a la 36 se muestran las características de las emulsiones preparadas con los mismos componentes pero mezclados a una velocidad de 1625 rpm. El comportamiento respecto a la distribución de frecuencias de tamaños de los glóbulos es parecido al encontrado con la velocidad de 812 rpm, sin embargo, las concentraciones de glóbulos obtenidos (Fig. 37), difieren de las plasmadas en la Fig. 31. Evidentemente que este comportamiento es perfectamente explicable por las diferencias en el proceso de preparación de la emulsión.

Las características de la emulsión del producto comercial IKA w3 se muestra en la Fig. 38 y Fig 39.

De forma similar a los resultados de las emulsiones anteriores, aquí los glóbulos que aparecen con mayor frecuencia son los de diámetros menores. De igual manera, se reduce la frecuencia de aparición con el incremento de la talla de los mismos. Este comportamiento parece ser el típico de las emulsiones al manifestarse de forma análoga a lo reportado por otros autores (Kenneth, 1974).

#### ***Efecto del suministro de Artemia enriquecida en postlarvas de Litopenaeus vannamei.***

Los resultados para la validación del protocolo de enriquecimiento empleado en *Artemia* y su efecto en las larvas de camarón se exponen a continuación.

#### **Ensayo con las postlarvas en los estadios de P110-P130.**

##### **Crecimiento.**

Los resultados de crecimiento en peso seco alcanzados con los tres tratamientos de alimentación se muestran en la Fig. 40. El valor de N representa el número de organismos muestreados para cada tratamiento.

Se pone de manifiesto que en los tratamientos donde se empleó *Artemia* enriquecida los valores de crecimiento son superiores estadísticamente al alcanzado cuando se emplea *Artemia* sin enriquecer. Evidentemente se refleja la influencia del suministro de la emulsión y su incorporación al alimento vivo.

### **Supervivencia.**

La Fig. 41 refleja los resultados de la supervivencia alcanzada con los tres tratamientos de alimentación. Los valores se consideran adecuados y oscilan entre 79 y 81%. La comparación estadística no refleja diferencias entre los tratamientos.

### **Resistencia al estrés.**

Los resultados de la prueba de estrés realizada se muestran en la Fig. 42. Los valores ente 97 y 98 % de supervivencia alcanzados en los diferentes tratamientos ante la prueba no difieren ente sí y son indicadores de las condiciones favorables de cultivo a que estaban sometidos los organismos.

### **Colesterol.**

Los análisis de los niveles de colesterol encontrados en los tejidos de los organismos de cada tratamiento están plasmados en la Fig. 43. Los valores de N significan el número de animales analizados. Para los tres tratamientos las concentraciones de este producto se encuentran alrededor de los 2 mg/g de tejido y no difieren en los tres tratamientos ( $p < 0.05$ )

### **Triglicéridos.**

Los valores de los niveles de triglicéridos encontrados en las muestras de los tres tratamientos de alimentación de las PLs. 30 se muestran en la Fig. 44. N significan el número de organismos estudiados en cada tratamiento. La comparación estadística realizada indica que no existen diferencias entre los diversos tratamientos. ( $p < 0.05$ )

### **Proteínas Totales.**

Los valores de este indicador en los tres tratamientos se muestran en la Fig. 45. Las pruebas estadísticas no reflejan diferencias entre ellos, ( $p < 0.05$ ) (N=9 por tratamiento). Las proteínas si son sintetizadas por los organismos por lo que los niveles similares indican que el aporte de materia prima para su síntesis es similar en el caso de los tres tratamientos.

### **Ensayo con las postlarvas en los estadios de P15-P110.**

Los resultados obtenidos con P15 y P110 concuerdan con los encontrados en las postlarvas mayores (PL 10-PL30). Los resultados en detalles se muestran a continuación.

#### **Crecimiento.**

Los tratamientos donde se empleó como alimento *Artemia* enriquecida generan resultados de peso significativamente superiores a los obtenidos con *Artemia* sin enriquecer Fig. 46. Los resultados de los tratamientos donde se empleó *Artemia* tratada con las emulsiones son similares estadísticamente.

#### **Supervivencia.**

Estos valores van desde el 66% en el tratamiento donde se empleó *Artemia* sin enriquecer hasta el 75% donde *Artemia* fue enriquecida con IKA w3, (Fig. 47). Estadísticamente estos resultados no difieren entre sí, sin embargo, son menores a los encontrados en las postlarvas 30. Este efecto puede estar relacionado con la menor resistencia a la manipulación que tienen los individuos de tallas menores. (Rees et al. 1994) y el manejo a que fueron sometidos durante el montaje del ensayo.

#### **Resistencia al estrés.**

Los valores de supervivencias alcanzados con la prueba de estrés aplicada se encuentran entre el 82 y el 83 % de supervivencia para los tres tratamientos Fig. 48. Estos valores no difieren estadísticamente entre sí y, aunque no tan elevados como los encontrados en las PL 30, pueden ser considerados adecuados para las condiciones en que se desarrolló el experimento.

#### **Colesterol.**

Los valores de los niveles de colesterol se presentan en la Fig 49. Para los tres tratamientos las concentraciones están alrededor de 3.5 mg/g de tejido sin manifestar diferencias estadísticas entre ellos. Tal parece que los niveles presentes en las dietas utilizadas son adecuados para el desarrollo de las funciones metabólicas en las larvas.

#### **Triglicéridos.**

Los niveles de triglicéridos en los tres tratamientos son similares estadísticamente Fig. 50.

### **Proteínas Totales.**

Los niveles de este indicador tampoco reflejan diferencias en los tres tratamientos, comportamiento similar al observado en las postlarvas mayores ([Fig 51](#))

### **Características nutricionales de *Artemia* empleada como alimento.**

#### **Colesterol.**

Los niveles de colesterol encontrados en los individuos de cada tratamiento se presentan en la [Fig. 52](#), donde se observa que existen diferencias significativas entre los dos tratamientos donde se manipuló nutritivamente *Artemia*. Es interesante señalar que *Artemia* no tratada manifiesta valores estadísticamente similares a los encontrados en *Artemia* enriquecida tanto con aceite de hígado de bacalao como con la emulsión de IKA w3.

El hecho de manifestarse comportamientos similares respecto a crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés en los tratamientos donde *Artemia* fue manipulada nutritivamente indica que los bajos niveles de colesterol que aporta el hígado de bacalao no son una limitante para el adecuado desarrollo de los individuos. Por otra parte, tal parece que el colesterol tampoco está ejerciendo un efecto marcado en el crecimiento de los animales al reportarse valores de crecimientos menores en el tratamiento donde *Artemia* no fue manipulada nutritivamente.

#### **Triglicéridos.**

Los valores de triglicéridos encontrados en los individuos de cada tratamiento no difieren entre sí. [Fig. 53](#).

### **Proteínas Totales.**

Los valores de este indicador se plasman en la [Fig. 54](#). Las pruebas estadísticas no reflejan diferencias entre los tratamientos.

Si se considera que el período de enriquecimiento con aceites durante dos horas resulta un espacio breve para que el metabolismo de los individuos sintetice proteínas tomando como sustrato metabólico a los lípidos, los resultados son totalmente lógicos. Estos efectos se esperaban por tratarse de los mismos individuos manipulados o no nutritivamente con aceites de diferente origen.

## DISCUSIÓN.

### *Modificación del valor nutritivo de nauplios y adultos de Artemia*

#### **Determinación del tamaño de partículas apropiado para su ingestión por parte de *Artemia*.**

Según los resultados encontrados con estos tratamientos de alimentación, se corrobora la importancia que presenta el tamaño de las partículas alimenticias en el proceso de filtración de *Artemia franciscana*

El planteamiento de que *Artemia* es un filtrador no selectivo pudiera cuestionarse ya que los resultados indican que existe un consumo preferencial del alimento relacionado con el tamaño de las partículas que se encuentran en el medio. Es evidente que en una hora de tratamiento, en un medio donde estén presentes partículas de látex de 5 y de 15  $\mu\text{m}$ . de diámetro, *Artemia* incorpora mayor porcentaje de partículas 15  $\mu\text{m}$ . Este comportamiento es el mismo para las diferentes clase de largo de los individuos. Los ensayos realizados con las partículas de almidón reafirmaron esta conducta

Analizando la información referida en la literatura y los resultados obtenidos en este trabajo se puede afirmar que *Artemia* ingiere una amplia gama de alimentos con tallas que oscilan entre los nanómetros y las micras. En los muestreos realizados en este trabajo se observaron individuos con partículas de alimento en el tracto digestivo con tallas de 69.6  $\mu\text{m}$ ., sin embargo, estas no son abundantes

Contrastando con los resultados de este trabajo, Hontoria, et al., (1994) obtienen los niveles máximos de ingestión y acumulación liposomas en el tracto digestivo de *Artemia* a las 30 horas de haber sido ubicada las mismas en una suspensión de liposomas marcados. Dichos liposomas presentan tallas medias que oscilan entre 268 nm y 1314 nm. Evidentemente que los liposomas son incorporados por *Artemia*, sin embargo, se supone que dicha talla de alimento es de difícil incorporación por estos organismos, motivo por el cual se requiere un tiempo tan prolongado para alcanzar esos resultados. En contraste, varios de los ensayos realizados con Selco como agente bioencapsulante se extienden por período entre 12 horas y 24 horas (Leger et al., 1987b), (Cappellaro, et al. 1993), (Dixon et al., 1995), (McEvoy et al., 1995b), (Candreva et al., 1996), (Gapasin et al., 1996). Leger et al., (1987b) plantean que esta dieta es un líquido autodisperso que produce glóbulos finos de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ . De este planteamiento se infiere que el tamaño de 2  $\mu\text{m}$  de los glóbulos de Selco está permitiendo que el proceso de enriquecimiento se lleve a cabo en un período de 12 horas en contraste con las 30 horas necesarias cuando son empleados liposomas que presentan tamaños menores.

Southgate y Lou, (1995), usando microcápsulas de aceite de hígado de bacalao o aceite de calamar para el enriquecimiento de nauplios de *Artemia* notaron que las microcápsulas eran fácilmente ingeridas y eran visibles en el tracto digestivo pocos minutos después de haber comenzado el enriquecimiento. La ingestión de las microcápsulas producía un incremento significativo del contenido de ácidos grasos después de una hora de tratamiento. Es interesante señalar que el diámetro medio de las microcápsulas era de 4.85  $\mu\text{m}$ . ( $\pm 2.84$ ,  $n = 100$ ) o 5.07  $\mu\text{m}$ . ( $\pm 3.15$ ,  $n = 100$ ) dependiendo del aceite usado para su preparación. Este resultado en cierta medida coincide con lo reportado en el presente trabajo.

Como consecuencia de los ensayos realizados en este trabajo, se puede afirmar, entre otros aspectos, que para realizar la bioencapsulación eficientemente se requiere de un alimento de tamaño adecuado que repercuta positivamente en el proceso de llenado del tracto digestivo de los individuos. Teniendo en cuenta esta característica del alimento se puede reducir el tiempo necesario para el enriquecimiento y se supone que se reduzca el gasto energético implícito en la captura del alimento.

#### **Efecto de la talla de los individuos y las concentraciones de partículas en el medio sobre el proceso de filtración por parte de *Artemia*.**

Como se puede observar en la [Tabla 1](#) hasta el presente trabajo no hay evidencias precisas que permitan establecer concentraciones de alimento adecuadas para el proceso de enriquecimiento de *Artemia*.

Con los resultados de los ensayos realizados se pone de manifiesto que para realizar el enriquecimiento de *Artemia* se debe tener en cuenta la talla de los organismos y en dependencia de ella, se debe ajustar la concentración de alimento para aprovecharlo adecuadamente.

Si se entiende a la bioencapsulación como el simple proceso de llenado del tracto digestivo de los organismos tratados sin la incorporación a tejidos de los agentes bioencapsulantes, se puede inferir que no necesariamente concentraciones elevadas favorecen el enriquecimiento en individuos de tallas pequeñas. Este planteamiento tiene repercusiones económicas al permitir reducir el consumo del agente bioencapsulante cuando se trabaje con las primeras etapas naupliarias de *Artemia*.

Aunque no como fruto directo de los resultados del presente trabajo, y más bien debido a las consultas bibliográficas realizadas, se considera adecuado llamar la atención sobre lo variado que resultan las expresiones de las unidades en que se expresan las concentraciones de alimento. Por

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

este motivo, se considera oportuno proponer unidades que permitan estandarizar los reportes de las concentraciones de alimentos empleados para la bioencapsulación.

Si se tiene en cuenta que hasta la fecha, para realizar la bioencapsulación se necesita de un producto que conserve la integridad física al ser colocado en el agua, entendiéndose el concepto de integridad física como la forma, valor nutricional y determinadas características asociadas a ese producto o alimento, se puede decir que la concentración de dicho producto debe ser establecida según el tipo de alimento que se utilice. Para el caso en que el enriquecimiento se realice con algún tipo de alimento vivo como microalgas o levaduras se considera apropiado referirse a células por unidad de volumen. Si lo que se emplea como alimento son emulsiones se puede hablar de glóbulos o micelas por unidad de volumen y si se usa algún tipo de alimento microparticulado una opción puede ser hablarse de partículas por unidad de volumen. Las unidades de volumen más empleadas en este tipo de actividad son los  $\text{mm}^3$  o mL.

Con vitaminas y hormonas u otro producto soluble empleado para realizar la modificación del valor nutricional de organismos, las unidades pudieran ser algunas de las planteadas anteriormente ya que estos productos generalmente se emplean asociados o diluidos en aceites, comprendidos en microcápsulas, o como fase interna en liposomas. La mayoría de los productos resultantes pueden ser agrupados en alguna de las categorías referidas. La expresión de la concentración de los productos empleados en alguna de estas unidades facilitaría la comparación de los resultados de trabajos de diferentes autores y tener un mejor control sobre el proceso de enriquecimiento de *Artemia* al tener controlada la cantidad de producto enriquecedor suministrado.

#### **Efecto del tiempo en el proceso de bioencapsulación.**

Este asunto puede ser uno de los más debatidos o contradictorios del presente trabajo, debido a la variedad de artículos que presentan resultados bien fundamentados y que no corresponden con los aquí obtenidos.

Como se ha planteado anteriormente, gran parte de los trabajos relacionados con el enriquecimiento de *Artemia* se basan en protocolos que emplean tiempos iguales o mayores a las 12 horas de tratamiento. Se considera que las divergencias que se manifiestan entre estos trabajos y el presente pueden tener su explicación en los métodos de análisis de la información, ya que generalmente se evalúan los resultados basándose en los valores de acumulación de los agentes bioencapsulantes en los tejidos de los animales y no los niveles de llenado encontrados en el tracto digestivo. Como es evidente, en el primer caso está implícito el tiempo necesario del metabolismo del agente bioencapsulante, mientras que en el segundo no. Por otra parte, generalmente durante el proceso se espera a que se reflejen los mayores niveles de acumulación del agente bioencapsulante en los

tejidos del animal debido al metabolismo, sin embargo, se debe tener en cuenta que determinados agentes bioencapsulantes como fármacos u hormonas no deben ser metabolizados para que ejerzan su función. Además, generalmente no se conocen los requerimientos nutricionales de los depredadores, por lo que contar con una biocápsula con niveles elevados de un agente bioencapsulante a expensa de un tiempo que puede inducir su transformación o a la oxidación de los lípidos, puede que no tenga sentido.

### **Efecto de la densidad de individuos en el proceso de bioencapsulación.**

Como se ha podido constatar en los ensayos realizados, existe una relación inversamente proporcional entre la densidad de individuos y los niveles de oxígeno encontrados en el medio y una relación directamente proporcional de la densidad con los niveles de amonio manifestados en el medio de cultivo. De estos resultados se desprende la importancia de lo reflejado en los diversos protocolos de enriquecimiento propuestos en la literatura referente a estos indicadores, motivo por el cual se plantea que el proceso de enriquecimiento de *Artemia* se debe realizar con un suministro elevado de aire para favorecer el intercambio gaseoso con el medio enriquecedor y evitar disminuciones marcadas de los niveles de oxígeno.

En animales aclimatados a altas presiones parciales de oxígeno, un cambio a un ambiente bajo en oxígeno induce la producción de ácido láctico, el cual al elevarse en pocas horas, llega a alcanzar niveles letales (Vos, *et al.* 1979).

En los protocolos revisados también se evidencia la importancia de eliminar los desechos metabólicos acumulados en el medio enriquecedor mediante un lavado suficiente de los individuos antes de ser suministrados como alimento a sus depredadores. Los resultados encontrados en el presente trabajo se manifiestan a favor de esta manipulación de los individuos enriquecidos.

*Artemia*, en contraste con la mayoría de sus depredadores es altamente resistente a elevadas concentraciones de amonio en el medio. Los valores de LC 50 para nauplios varían entre 650 mg/L en 24 h a 399.1 mg/L en 96 horas, mientras que para adultos los rangos oscilan entre 1290 mg/L y 600.5 mg/L (Ostrensky, *et al.* 1992). Sin embargo, para *P. monodon* de 2 g de peso, niveles de 4.1 mg/L reducen el crecimiento en un 5%, si los individuos se someten a estas concentraciones durante 3 semanas (Allan, *et al.* 1990). Para otra especie de peneido, *Fenneropenaeus penicillatus*, Chen y Lin, 1992, plantean que 12.65 mg/L de amonio reducen el crecimiento en un 50 %.

Directamente puede que *Artemia* no se vea afectada en un ambiente con los niveles de amonio señalados, pero al incorporar este elemento y transmitirlo a sus depredadores se puede afectar

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

crecimiento, la resistencia a enfermedades y hasta provocar mortalidades masivas en sus depredadores

Los valores de acumulación amonio en tejidos encontrados para los nauplios, son superiores a los de juveniles y adultos, quizá debido al pobre desarrollo de estos individuos así como del mecanismo fisiológico involucrado en su control. Esta información resulta valiosa debido a que se puede inferir que por cada gramo de nauplios de *Artemia* que sea ingerido por un depredador se van a incorporar alrededor de 2.5 mg de amonio. Las implicaciones de este comportamiento para los depredadores van a estar en dependencia de los niveles tolerables por parte de los organismos cultivados. Por otra parte este resultado indica la necesidad de perfilar los esquemas de alimentación en donde estos individuos sean utilizados como alimento y evitar el empleo de cantidades excesivas.

De los resultados obtenidos en este trabajo se desprende que la densidad adecuada para realizar la bioencapsulación también está directamente relacionada con la talla de los organismos. Para todos los casos, trabajar con densidades bajas, favorece mantener condiciones más estables en el medio enriquecedor. Para el caso de nauplios no se recomienda trabajar con densidades mayores de 750 nauplios/mL y sí por debajo de 500 nauplios/mL. Para juveniles y adultos parece factible trabajar con densidades de hasta 40 organismos/mL, sin embargo, se recomienda no exceder los 10 individuos/mL.

#### **Validación fisiológica de la incorporación de la emulsión en el proceso de enriquecimiento.**

El uso de la razón atómica como índice metabólico en organismos zooplanctónicos requiere ser aclarado debido a la complejidad del metabolismo. El comportamiento de esta relación depende de diversos factores como las condiciones estacionales, la temperatura del medio de cultivo, el estado nutricional, la preferencia por un tipo de alimento, entre otros. Durante el ayuno la relación O:N está claramente ligada a la disponibilidad de reservas energéticas y al uso de las proteínas corporales. Usando el cálculo teórico, se puede mostrar que el catabolismo de proteínas puede producir valores en la relación O:N de 3 a 16, mientras que igual cantidad de lípidos y proteínas produce valores entre 50 y 60. (Mayzaud y Canover, 1988).

Los resultados de este trabajo muestran claramente los valores significativamente superiores alcanzados en la relación O:N cuando se emplea la emulsión para modificar el valor nutricional de *Artemia*. Tal parece que los individuos comienzan a utilizar a los lípidos como fuente energética para permitir a las proteínas mantener la integridad corporal de los individuos.

Desde el punto de vista práctico, los resultados indican que a las dos horas de tratamiento con la emulsión, los nauplios, juveniles y adultos se encuentran metabolizando a los lípidos presentes. Esto indica que los lípidos han sido satisfactoriamente ingeridos y dichos organismos se encuentran enriquecidos desde el punto de vista nutricional.

#### ***Evaluación de las características de las emulsiones.***

Los diversos ensayos y caracterizaciones realizadas a diferentes emulsiones señalan que al menos, con las condiciones al alcance, parece difícil obtener emulsiones con glóbulos que cubran precisamente los rangos propuestos para la alimentación adecuada de *Artemia*.

Aunque las concentraciones de los glóbulos en las emulsiones caracterizadas no son necesariamente una característica que las distingue entre sí, su importancia radica en que permite conocer el volumen de alimento necesario a suministrar. Desde el punto de vista práctico se evita que se suministre alimento en demasía o escasamente y por ellos se afecte la calidad del agua o los organismos resulten inadecuadamente alimentados.

Se considera que los resultados obtenidos en el proceso de enriquecimiento de *Artemia* pueden ser mejorados si en lugar de emplear emulsiones preparadas con licuadoras se emplea otro método de preparación u otro tipo de alimento que pueda ser preparado siguiendo la propuesta de tamaño señalada en este trabajo. Este planteamiento señala que el proceso de bioencapsulación en *Artemia* puede ser optimizado, sin embargo, el empleo de emulsiones tiene su mérito ya que la preparación resulta sencilla y barata además de ser una variante válida para modificar el valor nutricional de este tipo de alimento vivo, como se ha demostrado en el presente trabajo.

#### ***Efecto del suministro de Artemia enriquecida en postlarvas de Litopenaeus vannamei.***

##### **Ensayo con las postlarvas en los estadios de P10-P130 y P15-P110.**

La coincidencia del comportamiento de los organismos sometidos a los diversos tratamientos permite que la discusión de los resultados se aborde indistintamente para los diferentes estadios postlarvales estudiados.

### **Crecimiento.**

Algunos parámetros específicos de la biometría han sido empleados para discriminar y/o determinar la mezcla de poblaciones de individuos de la misma especie, (Triantaphyllidis et al. 1995). En el caso del presente trabajo, el crecimiento de las larvas ha permitido discriminar entre los tratamientos de alimentación.

El crecimiento ha sido considerado como un indicador de amplio espectro, debido a que refleja el efecto neto de las condiciones ambientales, incluido el alimento, sobre la respuesta fisiológica de los individuos (Beamish, et al. 1975), por lo tanto, se puede usar como un índice de adecuación de los organismos en un ambiente determinado (Vanegas, 1992). En el caso de los ensayos aquí presentados, se manifiesta que *Artemia* enriquecida resulta ser un alimento más adecuado, al reflejar crecimientos significativamente superiores.

Efectos similares a los obtenidos en el presente trabajo se han reportado por parte de Gatesoupe, (1982 y 1991), Somerton y Brown, (1991), Takeuchi, et al., (1992) en trabajos sobre la alimentación de larvas de peces y en camarones (Kontara y Nurdjana, 1992 y Narciso, 1993).

### **Supervivencia.**

La supervivencia de los organismos cultivados es un reflejo las condiciones en que son mantenidos. Supervivencias elevadas se relacionan directamente con adecuadas condiciones de cultivo. Para acuicultores e investigadores resulta ser un indicador de peso para la toma de decisiones relacionadas con las modificaciones de las condiciones de cultivo.

Resultados donde se manifiesta un efecto positivo del enriquecimiento de *Artemia* en la supervivencia de los organismos alimentados son reportados para *Macrobrachium rosenbergii* (Lunn y Htoo, 1997), para *Scophthalmus maximus* (Opstad, et al. 1993) y larvas de *Palaemon serratus* (Narciso 1993). Sin embargo, en ensayos con postlarvas de *Penaeus monodon*, empleando aceites de peces emulsionados con yema de huevo, Kontara y Nurdjana, (1992) no obtuvieron diferencias al analizar este indicador. Situación similar se reporta para los ensayos aquí realizados lo cual nos induce a pensar que las diferentes dietas empleadas garantizan el mantenimiento de las condiciones nutricionales mínimas requeridas en los estadios estudiados.

### Resistencia al estrés.

En algunos casos en que el período de ensayo es relativamente corto y el análisis del crecimiento y la supervivencia no arroja diferencias significativas entre los tratamientos, es necesario contar con otros métodos de evaluación para conocer el efecto de tratamientos en los organismos. Con esta finalidad se han empleado diversas herramientas entre las que se encuentra el índice de resistencia a baja salinidad. Sobre éste indicador influyen diversos factores, pero en un diseño donde se modifique una sola variable se desprende que las diferencias o similitudes encontradas entre los tratamientos se deban al efecto de dicha variable. Ese es el caso del presente experimento.

Según Dhert *et al.* (1992), el efecto beneficioso del suministro de ácidos grasos a través de las técnicas de bioencapsulación con *Artemia* como vector puede ser claramente demostrado a través de las pruebas de estrés, incluso aún antes de que ocurran mortalidades. Es por eso que argumenta sobre la necesidad de utilizar este indicador periódicamente para evaluar la condición diana de los animales y contar con elementos para realizar modificaciones en el manejo.

Los resultados del presente trabajo reflejan en primera instancia, que las tres dietas empleadas son adecuadas para las postlarvas de *P. vannamei*. Por otra parte, tal parece que los niveles de ácidos grasos polinsaturados presentes en ellas se encuentran en un rango adecuado y que en particular los niveles del ácido graso docosahexaenoico, uno de los responsables de conceder la característica de fortaleza a las larvas, se encuentra adecuadamente representado, (Kraul, *et al* 1993), .

### Colesterol.

El colesterol está involucrado en el mantenimiento del sistema de membranas, en el transporte de lípidos y como precursor de la vitamina D, ácido biliar y hormonas esteroideas como los andrógenos, estrógenos, hormonas adrenales y corticosteroides.

También juega un papel importante en la absorción de los ácidos grasos desde el intestino y su transporte en la sangre o hemolinfa. Aquí el colesterol se combina con los ácidos grasos para formar ésteres de colesterol los cuales son más solubles y emulsificables que las moléculas de los ácidos grasos libres.

En contraste con peces, los crustáceos son incapaces de sintetizar colesterol mediante la síntesis de novo partiendo de acetato y mevalonato. Por otra parte, se estima que el colesterol es esencial en la dieta de camarones marinos y de agua dulce. Según estudios de laboratorio realizados con *P*

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

*japonicus* los niveles de óptimos de colesterol en la dieta se reportan entre 0.5 y 2 % de peso seco. (citado por Tacon A. G.J., 1987).

En los experimentos realizados en este trabajo, el comportamiento similar de los niveles de colesterol encontrado en los tejidos de las larvas es un reflejo del aporte adecuado de este elemento debido a las tres dietas. Tal parece que el requerimiento de colesterol se satisfizo aún con los menores niveles encontrados en *Artemia* enriquecida con la emulsión de aceite de hígado de bacalao, lecitina de soya y agua.

#### **Triglicéridos.**

Las grasas y aceites que se encuentran normalmente en los alimentos y como depósitos en la mayoría de los animales se encuentran en la forma de triglicéridos, los cuales son ésteres de ácidos grasos y glicerol. Las características y propiedades de estas grasas o aceites estarán dadas por la composición de los diferentes ácidos grasos que las compongan.

Contrariamente a lo que sucede con el colesterol, debido a que estos son constituyentes de las membranas celulares deben ser sintetizados "in situ", se revela que la composición del alimento empleado aporta la suficiente cantidad de materia prima para la síntesis de triglicéridos. Desde este punto de vista, cualquiera de las dietas puede ser adecuada para la alimentación de las larvas.

#### **Proteínas Totales.**

Como se esperaba, la composición de las tres dietas respecto a este indicador no se diferencia significativamente. El período corto de enriquecimiento y el suministro solamente de compuestos lipídicos no permite que se manifieste una fluctuación de estos nutrientes.

Un comportamiento similar se observó en las larvas de camarón sometidas a los tratamientos de alimentación, lo cual indica que la composición de las proteínas solubles no se modificó por el aporte de lípidos en las dietas.

Quizá la técnica empleada para reflejar los niveles de proteínas solubles en sueros humanos no sea la más adecuada para hacer este tipo de análisis en larvas de camarón, pero si resulta ser un indicador adecuado cuando la comparación se realiza de la misma forma entre los tratamientos de un experimento

### **Consideraciones generales.**

Los resultados encontrados en los diferentes ensayos realizados brindan elementos para someter a consideración protocolos de enriquecimiento de *Artemia*.

Teniendo en cuenta que el tamaño de las partículas alimenticias que se propone utilizar no varía considerablemente entre las diferentes tallas de *Artemia*, ni tampoco varía el tiempo que se propone de enriquecimiento, se considera que las diferencias entre los protocolos de enriquecimiento deben estar basados en la talla de los organismos y en la densidad de individuos a emplear.

De manera común se propone que la bioencapsulación se realice con alimentos que presenten tallas ente 6.8 y 27.5  $\mu\text{m}$ . y durante un período de 2 horas. Esto permite el llenado del tubo digestivo y que el alimento que se incorpore pueda ser transmitido a los depredadores.

Para individuos pequeños como metanauplios la densidad recomendada puede llegar hasta 750 individuos/mL, mientras que para juveniles y adultos parece factible trabajar con densidades de hasta 40 individuos/mL. Para todos los casos, las densidades que se proponen han brindado resultados adecuados. Sin embargo, se recomienda evaluar el comportamiento de los individuos sometidos a otros tipos de agentes bioencapsulantes antes de establecer enriquecimientos masivos o a gran escala.

Un criterio a analizar, está relacionado con la necesidad o no de realizar el enriquecimiento de *Artemia* a tal punto que se propicie la incorporación a tejidos de los agentes bioencapsulantes. Este proceso implica la posibilidad de transformación del agente bioencapsulante en otro producto que quizá no sea el de interés del acuicultor. El período para este proceso, generalmente mayor de 12 horas, puede inducir a la oxidación del agente bioencapsulante y contrarrestarse el efecto beneficioso del enriquecimiento. Han *et al.*, (2000) a pesar de haber trabajado con cepas de *Artemia* del mismo origen y cosecha, que fueron eclosionadas, enriquecidas, muestreadas y analizadas bajo condiciones idénticas, encontraron discrepancias entre réplicas y atribuyen en sus resultados altas dosis de autoxidación que pueden reducir la disponibilidad de los ácidos grasos en el medio enriquecedor, incluso, a pesar de los antioxidantes presentes en la emulsión.

Por otra parte, lo más cuestionable es la carencia de información relacionada con los requerimientos nutricionales y la necesidad real de los depredadores de ingerir un alimento con niveles elevados de determinados productos enriquecedores. Quizá sea preferible que un depredador ingiera la misma cantidad de alimento medianamente enriquecido a esa misma cantidad totalmente saturada del agente enriquecedor.

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

Con respecto a las larvas de camarón, los valores encontrados en los indicadores analizados (colesterol, triglicéridos y proteínas totales) no permiten explicar a que se deben las diferencias halladas en los pesos de los organismos de los tres tratamientos. Quizá ninguno de estos indicadores sea una señal potente que manifieste el efecto de la dieta en los organismos. No es el caso de los perfiles de ácidos grasos y la relación que se establezca entre la serie w3 y w6, que pueden estar relacionados con el crecimiento, la supervivencia o resistencia al estrés en determinadas especies (Glencross y Smith, 1999), (Czesny, et al. 1999).

La imposibilidad de conocer los perfiles de ácidos grasos de las diferentes emulsiones y de las muestras de tejidos de los animales en los ensayos realizados, no permite teorizar sobre el efecto de los mismos en el crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés de los individuos. Sin embargo, evidentemente que el suministrar una *Artemia* tratada nutritivamente con una emulsión se ha ejercido un efecto similar o mejor en alguno de los elementos considerados en la comparación de los tres tratamientos.

El mayor crecimiento alcanzado en los tratamientos donde *Artemia* ha sido manipulada nutritivamente debe estar relacionado con el aporte de los lípidos ya que ha sido la única variable introducida en el diseño experimental.

Existen reportes de la influencia de los lípidos en el crecimiento de organismos cultivados y particularmente la repercusión de algunos ácidos grasos (Halfyard, et al. 1999), (Ishizaki, et al. 1998), (Lim, et al. 1997), (Deering, et al. 1997).

Por otra parte, según los resultados de sus experimentos, Kumlu, et al., (1998) plantean que no hay evidencias fuertes que manifiesten el efecto positivo de la influencia de los lípidos y pigmentos en el crecimiento y desarrollo de larvas de *Penaeus indicus*. Lo mismo sugieren Saihi, et al., (1994) como producto de un ensayo con larvas de *Sparus aurata*.

Los resultados aquí presentados ponen en evidencia ciertos aspectos sobre los cuales se debe profundizar para hacer más eficiente el proceso de bioencapsulación. La definición de los rangos de tallas propuestos para el alimento se espera que tengan repercusión en el proceso de enriquecimiento de *Artemia* así como en aspectos relacionados con su cultivo y obtención de biomasa.

Tanto los resultados encontrados en los experimentos de este trabajo como referencias de la literatura pueden servir de orientación para el desarrollo de investigaciones futuras que se encaminen a dilucidar y ejercer una influencia controlada sobre las condiciones de cultivo de organismos marinos.

## CONCLUSIONES.

Según las condiciones en que se realizaron los experimentos, así como los productos y larvas empleados para llevar al cabo los mismos se concluye que:

- Existe un consumo preferencial del alimento por parte de *Artemia* que está relacionado con el tamaño de las partículas que se encuentran en el medio. Durante todo el ciclo de vida, los rangos preferidos del alimento se encuentran entre los 6.8 y 27.5  $\mu\text{m}$ .
- Para llevar al cabo el proceso de bioencapsulación de forma eficiente debe tenerse en cuenta la talla de los organismos. Para individuos pequeños como metanauplios concentraciones de 12500 partículas/mL parecen ser adecuadas. Para organismos de mayor talla se garantiza el adecuado llenado del tracto digestivo con concentraciones de 200 000 partículas/mL o superiores.
- Respecto al tiempo de enriquecimiento, los resultados indican que dos horas de tratamiento es un período adecuado para realizar el proceso de bioencapsulación en *Artemia*.
- Las densidades a emplear en el proceso de enriquecimiento se recomienda que sean menores de 500 organismos/mL para el caso de nauplios. Para juveniles y adultos parece factible trabajar con densidades de 40 organismos/mL, sin embargo, se recomienda no exceder de los 10 individuos/mL.
- Las concentraciones de los glóbulos formados en las emulsiones dependen de las velocidades de preparación, sin embargo, esta no ejerce influencia en la distribución de tamaños obtenidos. Para las diferentes emulsiones preparadas los glóbulos observados con mayor frecuencia son menores de 2.5  $\mu\text{m}$ .
- *Artemia* enriquecida tiene un efecto significativamente superior en el crecimiento de las larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, alimentadas con ella.
- El protocolo de enriquecimiento propuesto puede emplearse satisfactoriamente en el enriquecimiento de *Artemia*.

Con los resultados obtenidos en los diferentes experimentos se confirman las hipótesis en que se ha basado el trabajo y se muestra que hay una influencia marcada de los productos y condiciones sobre el proceso de enriquecimiento de *Artemia*. Por otra parte se ha corroborado que la bioencapsulación del alimento vivo puede tener influencia sobre algún indicador como el crecimiento.

## TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Resumen sobre algunos trabajos de bioencapsulación.

TIEMPO	ALIMENTO	CONCENTRACION DEL ALIMENTO	DENSIDAD DE ORGANISMOS	AUTORES
24 h ó 4 días	l. galbana	300 ó 1000 c/mm <sup>3</sup>	10 000 n/l	Wickins (1972)
24 h hasta 72 h	Algas ( <i>Chlorella minutissima</i> )	14-18 x10 <sup>9</sup> c/mL		Watanabe, et al (1978), Watanabe et al., (1980), Watanabe et al., (1982), Watanabe et al., (1983)
24 h	levadura w (15% aceite de calamar en el medio de cultivo de las levaduras <i>S. cerevisiae</i> )	0.38 mg/mL ó 9x10 <sup>6</sup> c/mL		Imada et al., (1979)
6-12 h (máximo nivel de enriquecimiento)	15g de lípido + 0.3g de yema de huevo en 230 mL de agua de mar (batido 3 min) igual peso de levaduras que de nauplios para 30L de agua			Watanabe et al., (1983)
24h a 24-26°C	5:1:95 (lípidos:yema de huevo:agua) + 12 g de levadura, 1min batido para 60L de agua y			Watanabe et al., (1982)
48h	dieta compuesta <i>Spirulina</i> y levadura en polvo(J.F.P.) D.L. metonina, colina colina, D.L. glucosamina HCl, colesterol, aceite de hígado de bacalao y premezcla de vitaminas			Gatesoupe y Ricardez 1981 Citado por Leger
2 pasos 48h y 30 min	dieta compuesta			Robin et al., (1984). Citado por Leger
24h	micropartículas cubiertas con w3 HUFA	0.6g/l.	3x10 <sup>9</sup> n/L	Leger et al., (1986b)

TIEMPO	ALIMENTO	CONCENTRACION. DEL ALIMENTO	DENSIDAD ORGANISMOS	DE AUTORES
18h	-Super Selco -levadura panadera -aceite orbital de Tunidos + lípidos de huevas de arenque -aceite orbital de Tunidos + Tween 85 y ethoxiquin -Liposomas	0.3g/L a las 0 y 7 h  1g/L	200 000 n/L  650 000 n/L	McEvoy <i>et al.</i> , (1995b)
3-9h	Aceite de menhaden + xanthum (emulsificante)			Clawson y Lovell (1992)
12h?	<i>Euglena gracilis</i>	100 000c/mL		Hayashi <i>et al.</i> , (1993)
menor que en nauplios	Selco	0.6g/L	± 50 juveniles/L	Dhont <i>et al.</i> , (1991)
incorpora ción máxima a 30h	liposomas marcados	concentración que aporta entre 0.12 y 0.47 mg de lípidos/mL	500n/mL	Hontoria <i>et al.</i> , (1993)
12h 18h 24h	emulsión de aceite de pez, yema de huevo y agua destilada (7:1:2)	0.5-1g/L	300 000 n/L	Kontara, (1991)
12h	"Sulfadimethoxine sodium salt" "Erofloxacin"  Erofloxacin + Selco	300 ppm 200 ppm  1.5 mg/L + 150mg/L		Cappellaro <i>et al.</i> , (1993)
1-4h	micropartículas (gelatin-acacia) aceite de hígado de bacalao (4.85 µm.) o aceite de calamar 5.07 µm	300 mg/L	500 n/mL 500 ó 200 n/mL	Southgate y Lou, (1995)
0h 14h 18h 20h	fosfatidilcolina de soya + aceite orbital de Tunidos	0.3 g/L a las 0h y 12h	200 000 n/L	McEvoy <i>et al.</i> , (1997)

TIEMPO	ALIMENTO	CONCENTRACION. DEL ALIMENTO	DENSIDAD ORGANISMOS	DE	AUTORES
23h	-aceite de hígado de bacalao:Tween 80 - aceite orbital de Tunidos:Tween 80 -Super Selco	0.3 g/L a las 0h y 10h	200 000 n/mL		McEvoy <i>et al.</i> , (1995a)
0h 2h 4h 8h 16h 24h	medio enriquecido con lípidos conteniendo Microfeast Plus L-10 + 17 $\beta$ -oestradiol	0.8 g/50mL de agua y batido con 0.5, 10, y 20 mg/L	750 000 embriones		Martin-Robichaud <i>et al.</i> , (1994)
24H	micropartículas -polvo de arroz cubierto con cod liver oil -polvo de arroz cubierto con aceite de arroz -AA (micropartículas experimentales manufacturadas por <i>Artemia</i> System)	0.6g/L	25 n/mL		Leger <i>et al.</i> , (1987b)
12,24,48h 30, 36h	emulsiones Selco Supar	0.6 g/L 2g/L	300 n/mL		
20 h	DC Selco	2 g/1x 10 <sup>9</sup> indiv. (560 ppm)	280 ind/mL		Candrea <i>et al.</i> , (1996)
24 h	DHA7 + aceite de coco	0.6 g/l	200ind/mL		Dhert <i>et al.</i> , (1993)
2-24 h	Selco + "sarafloxacin hidrohloride"	0.6 + 1-40% del peso	300 ind/mL		Dixon <i>et al.</i> , (1995)
Se añade a las 0-6 h y hasta las 24 h	Selco + Agentes antibacterianos ("trimethoprim" y "sulfamethoxazole") en concentraciones de 20 y 40 %	Las drogas se añaden en conc. De 20 y 40%			Gapasin <i>et al.</i> , (1996)

TIEMPO	ALIMENTO	CONCENTRACION DEL ALIMENTO	DENSIDAD DE ORGANISMOS	AUTORES
24 h	Emulsiones + ácido ascórbico	20% HUFA + 0, 10, 20 % ascorbyl palmitate		Merchie <i>et al.</i> , (1995)
0, 6, 12, 24, 48 h	Emulsiones de Triglicéridos de aceites de peces (90 mg) + (22.5 mg) de lecitina de yema de huevo + 1.8 mL agua destilada	1.8 mL de emulsión	100 ind/mL	Ando <i>et al.</i> , (1997)
24-48 h	Concentrados emulsificados	0.3 g/l cada 12 h	100-300 ind/mL	Sorgeloos <i>et al.</i> , (1998)
12 y 24 h	Emulsiones experimentales isolipídicas con 30% n3 y relación DHA/EPA = 4		200 ind/mL	(Coutteau y Sorgeloos, (1997)
9, 24, 33, 48 h	Aceites de plantas (Aceites de lino, peanut girasol); de animales calamar, sardina, bacalao y emulsión Selco.	1.5g Goma "Xanthum" + 5 mL de aceites + 100 mL de agua	250 ind/mL	Narciso <i>et al.</i> , (1999)
24h	<i>Schizochytrium</i> sp. spray dried 3-18 µm	0-400 mg/L	100 n/mL	(Barclay y Zeller, (1996)
24h	Emulsiones	10mL/90mL/0.25g aceite/agua de mar/lecitina de soya		Izquierdo <i>et al.</i> , (1992)
12-24h	Microcápsulas de gelatina acacia con menhaden oil, emulsión de levaduras con menhaden oil y otro tratamiento con <i>Chlorella</i> sp	<i>Chlorella</i> 15x10 <sup>8</sup> cel/mL Emulsión de levaduras y menhaden oil(0.1/0.1) en 50 mL de agua destilada. Microcápsulas 5-20µm 10 x10 <sup>3</sup> caps/mL.		Ozkizilcik y Chu, (1994)

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*

Tabla 2. Valores del tamaño de muestra ( $n$ ), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el valor de  $f$ , y la probabilidad ( $P$ ) para cada línea de regresión.

Clase de largo	$n$	$R^2$	$f$	$P$
1	13	0.86	18.73	3.28 <sup>-1</sup>
2	20	0.68	11.48	2.89 <sup>-4</sup>
3	17	0.61	6.78	5.00 <sup>-3</sup>
4	25	0.61	11.29	1.27 <sup>-4</sup>
5	27	0.47	6.99	1.64 <sup>-3</sup>
6	24	0.43	5.05	9.10 <sup>-3</sup>
7	27	0.36	4.37	1.41 <sup>-2</sup>
8	24	0.79	25.56	4.78 <sup>-7</sup>
Todas	27	0.61	12.00	6.21 <sup>-5</sup>

Tabla 3. Número de individuos ( $N$ ) caracterizados para cada concentración de partículas y para cada clase de largo estudiada.

Concentración (partículas/mL)	Talla (0.8-3.2)	Talla (3.21-5.6)	Talla (5.61-8.0)	N Total
	N	N	N	
400 000	12	10	8	30
200 000	11	11	9	31
100 000	8	12	10	30
50 000	10	8	12	30
25 000	10	13	7	30
12 500	12	12	7	31
6 250	7	13	10	30
3125	6	16	8	30
1562	9	16	5	30
781	14	9	7	30
390.6	10	10	10	30
195.3	11	13	6	30
97.5	7	13	10	30
48.8	13	9	8	30
24.4	11	13	7	31

**Tabla 4** Número de individuos (N) caracterizados para cada tiempo ensayado, para cada clase de largo estudiada con las partículas de 15 y 5 µm.

Tiempo de tratamiento (m.)	Talla (0,8-3,2)	Talla (3,21-5,6)	Talla (5,61-8,0)
	N	N	N
Partículas de 15µm			
3	23	13	8
6	19	13	13
9	17	7	10
12	29	9	15
15	25	20	7
30	18	13	17
60	45	41	27
120	15	9	14
Partículas de 5 µm			
3	20	9	11
6	15	13	15
9	17	12	10
12	18	13	10
15	34	10	15
30	29	17	24
60	21	13	12
120	11	10	20

**Tabla 5.** Relación O:N de artemia de diferentes estadios de desarrollo.

		sin alimento	con emulsión	con algas	F (p)
nauplios	media	12.91 <sup>b</sup>	32.75 <sup>a</sup>	13.03 <sup>b</sup>	5.73 (0.008)
	error	1.751	9.053	2.916	
	n	17	8	6	
juveniles	media	23.07 <sup>b</sup>	66.09 <sup>a</sup>	5.99 <sup>c</sup>	84.81 (<0.001)
	error	1.972	6.166	0.401	
	n	15	11	14	
adultos	media	8.22 <sup>b</sup>	20.11 <sup>a</sup>	2.00 <sup>c</sup>	36.38 (<0.001)
	error	0.876	2.665	0.236	
	n	13	12	14	

letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas.

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

Tabla 6. Número de glóbulos caracterizados en cada emulsión experimental.

Proporción de ingredientes en la emulsión	Velocidad de preparación de las emulsiones (rpm)	
	1625	812
	Lecitina/aceite/agua	
0.5/2/100	834	564
0.5/4/100	784	1042
0.5/8/100	744	1071
0.5/16/100	672	707
0.5/32/100	749	463
	IKA w3	
0.5/4/100		1255

Fig.1. Comparación de la presencia de partículas en el exterior e interior de los individuos (N=50)

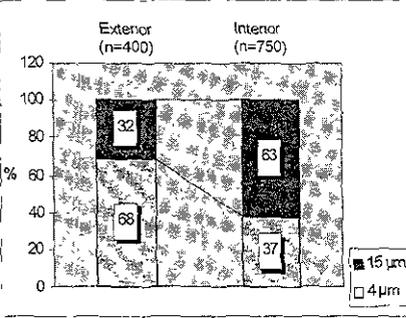


Fig.2. Distribución de frecuencias de tamaños de partículas de almidón en la suspensión.

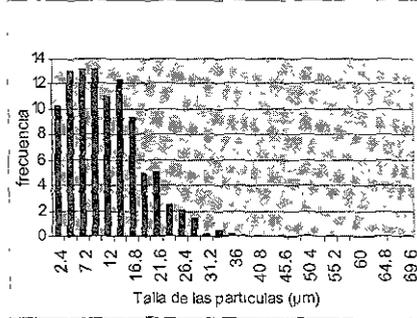


Fig.3. Selectividad para los individuos de la clase de largo 1.

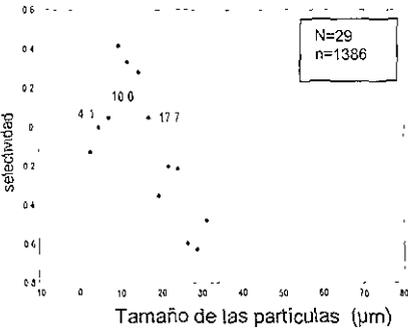


Fig.4. Selectividad para los individuos de la clase de largo 2

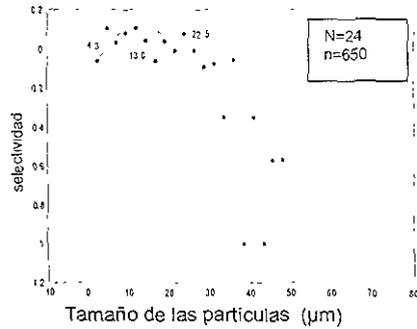


Fig.5. Selectividad para los individuos de la clase de largo 3

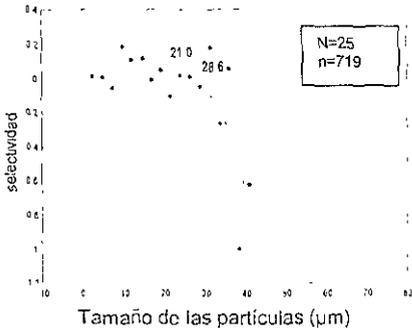


Fig.6. Selectividad para los individuos de la clase de largo 4

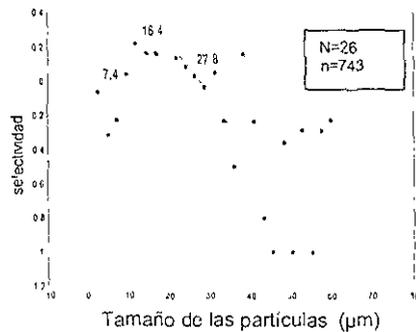


Fig 7. Selectividad para los individuos de la clase de largo 5

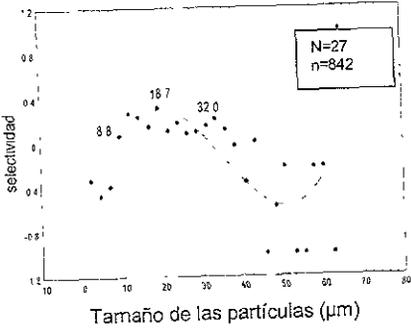


Fig.8. Selectividad para los individuos de la clase de largo 6

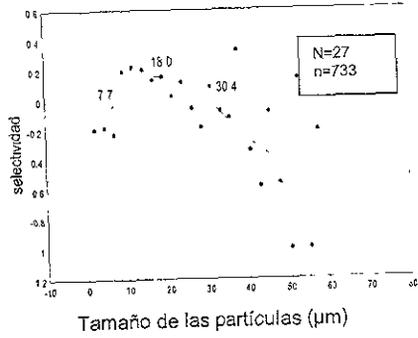


Fig 9. Selectividad para los individuos de la clase de largo 7

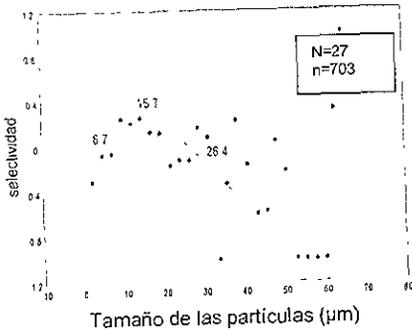


Fig.10. Selectividad para los individuos de la clase de largo 8

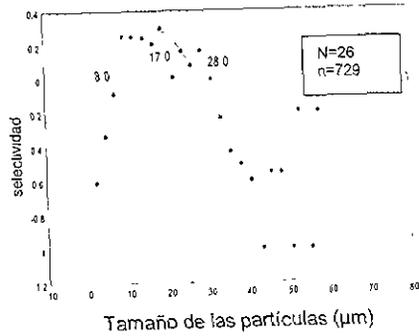


Fig.11. Selectividad del alimento para todas las clases de largo agrupadas

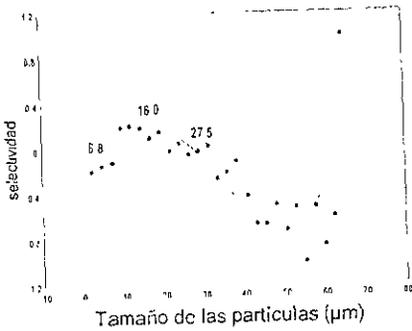


Fig 12 Llenado del tracto digestivo de los individuos de las tres clases de largo con las diferentes concentraciones de partículas

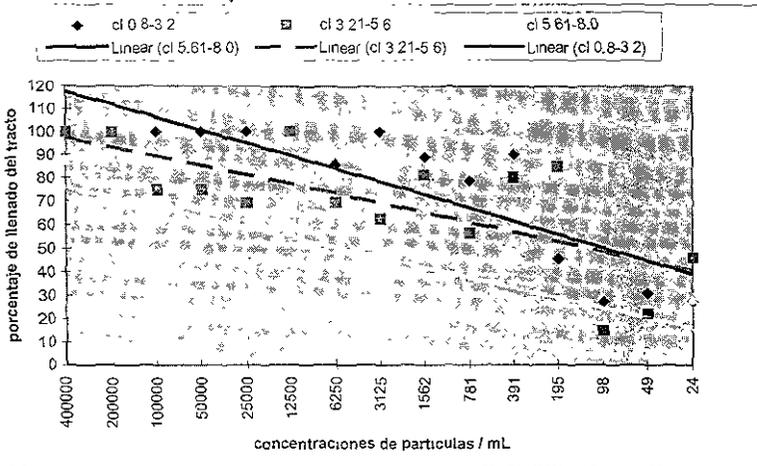


Fig. 13. Tendencia del llenado del tracto digestivo con respecto al tiempo de tratamiento (partículas de 5 µm)

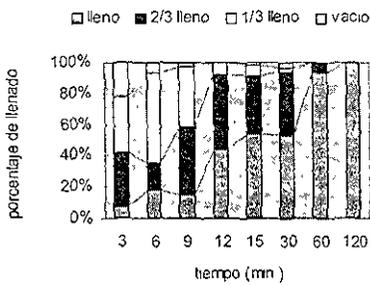


Fig 14 Tendencia del llenado del tracto digestivo con respecto al tiempo de tratamiento (partículas de 15 µm)

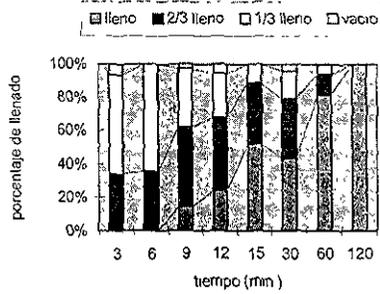


Fig.15. Efecto de la densidad de individuos en los niveles de amonio (nauplios)

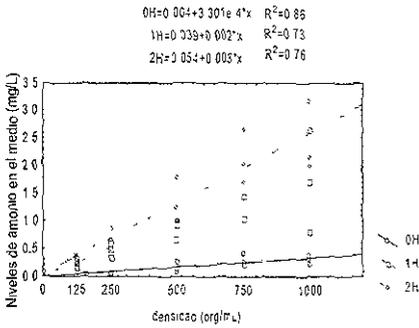


Fig.16. Niveles de oxígeno en el medio respecto a la densidad (nauplios)

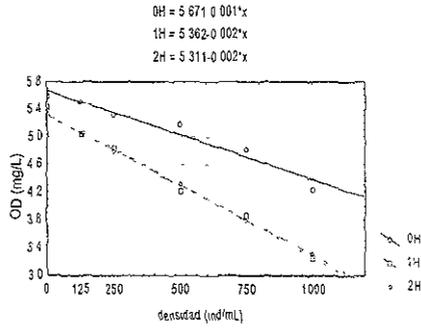


Fig 17 Efecto de la densidad de individuos en los niveles de amonio (juveniles)

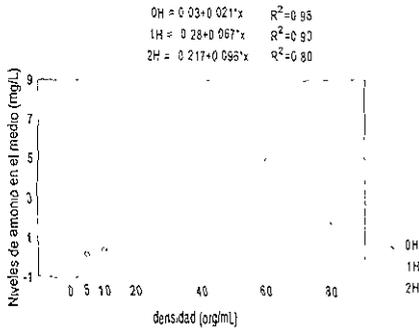


Fig.18. Niveles de oxígeno en el medio respecto a la densidad (juveniles)

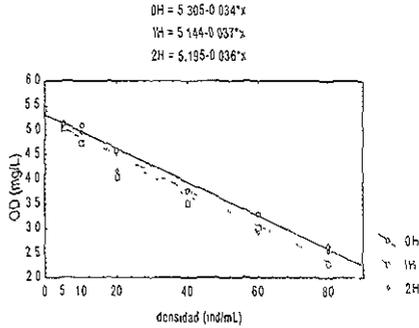


Fig 19. Efecto de la densidad de individuos en los niveles de amonio (adultos)

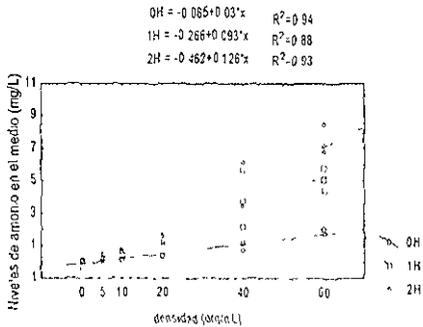


Fig.20. Niveles de oxígeno en el medio respecto a la densidad (adultos)

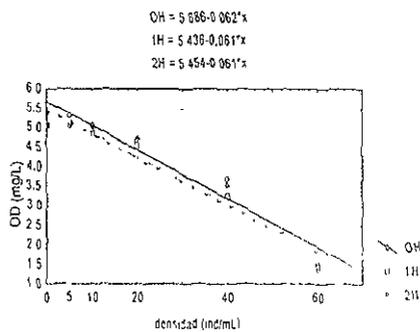


Fig.21 Niveles de amonio interno en nauplios

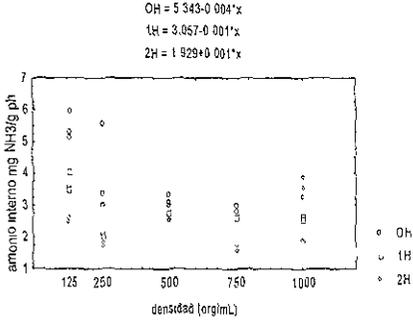


Fig 22 Niveles de amonio interno en juveniles

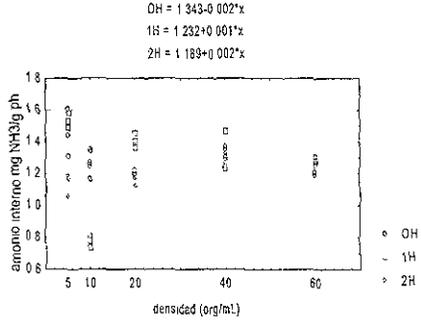


Fig.23. Niveles de amonio interno en adultos

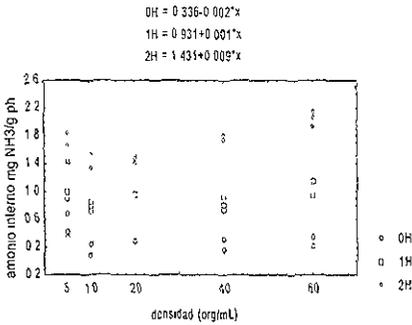


Fig 24. Niveles de amonio interno en los diferentes estadios de Artemia analizados

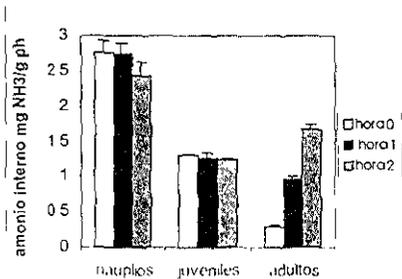
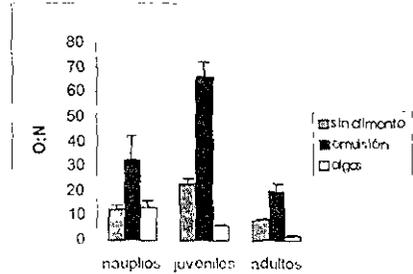


Fig.25. Relación O:N con diferentes tipos de alimento en los diferentes estadios analizados.



Evaluación de las características de las emulsiones (lecitina/aceite/agua, 812 rpm).

Fig 26

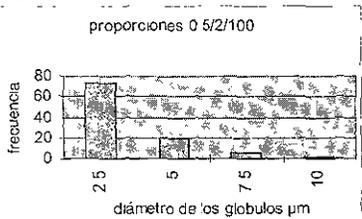


Fig.27

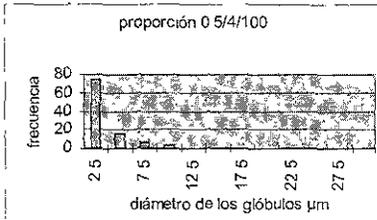


Fig.28

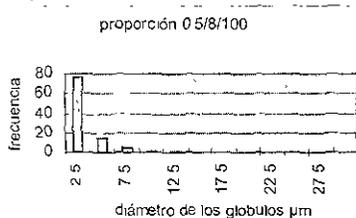


Fig.29

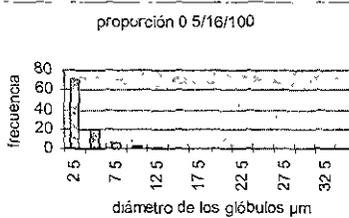


Fig 30

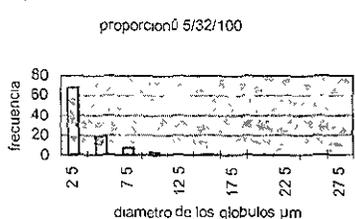
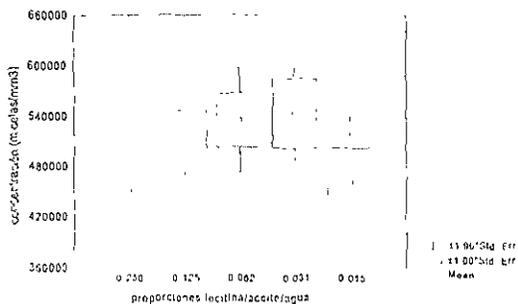


Fig. 31. Concentraciones de glóbulos en las emulsiones lecitina/aceite/agua (812 rpm)



Evaluación de las características de las emulsiones (lectina/aceite/agua, 1625 rpm)

Fig 32

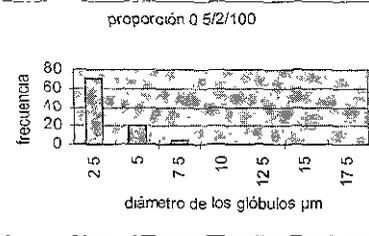


Fig.33.

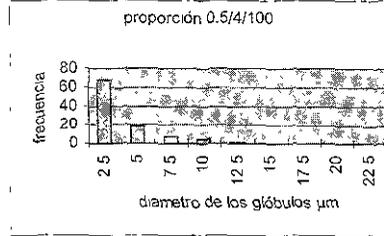


Fig 34.

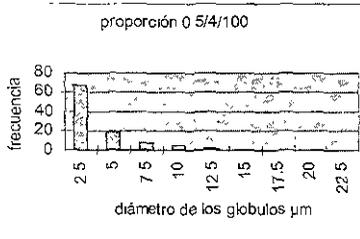


Fig 35.

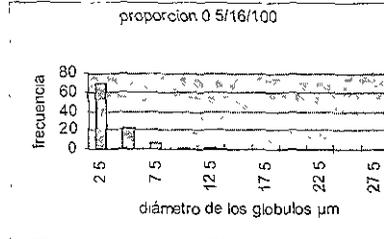
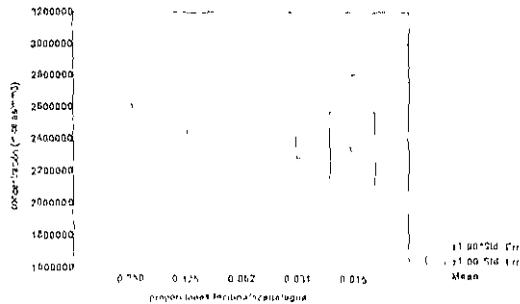


Fig 36



Fig 37. Concentraciones de glóbulos en las emulsiones lectina/aceite/agua (1625 rpm)



Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

Fig 38- Evaluación de las características de la emulsión Ika w3 (812 rpm) .

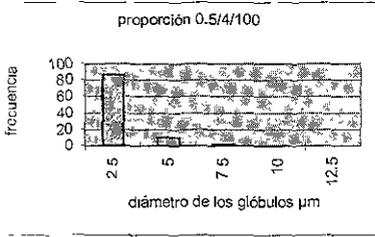


Fig 39 Concentración de glóbulos en la emulsión IKA w3 (812 rpm)

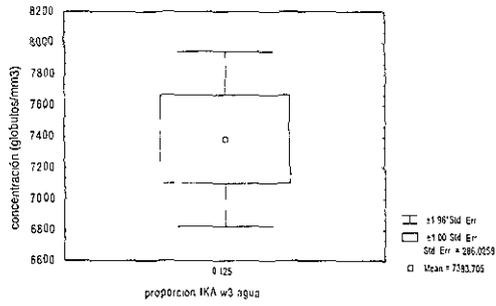


Fig. 40. Peso seco de las PI. 30 de *L. vannamei*

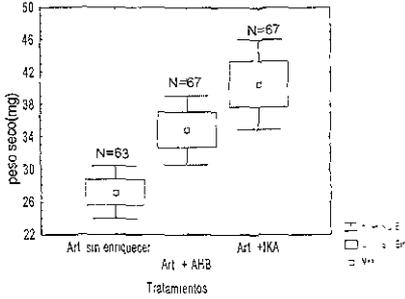


Fig 41 Supervivencias alcanzadas en los tratamientos de alimentación (PI30)

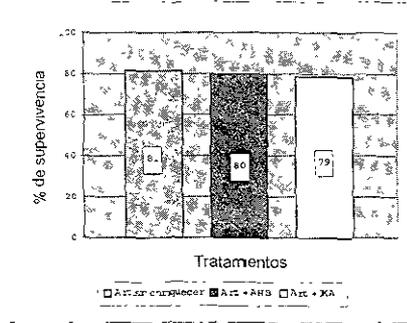


Fig. 42 Resultados de supervivencia alcanzados con la prueba de estrés (PI30)

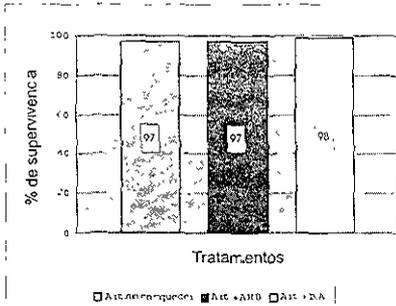


Fig 43 Niveles de Colesterol en los tres tratamientos (PL30)

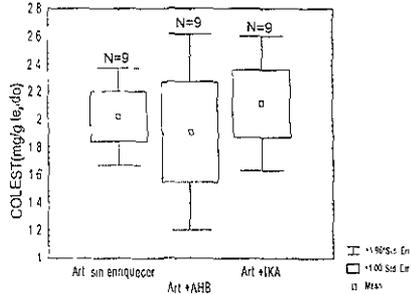


Fig.44- Niveles de Triglicéidos en los tres tratamientos (PL30)

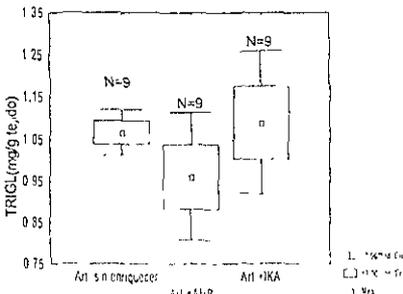


Fig 45. Niveles de Proteínas en los tres tratamientos (PL30)

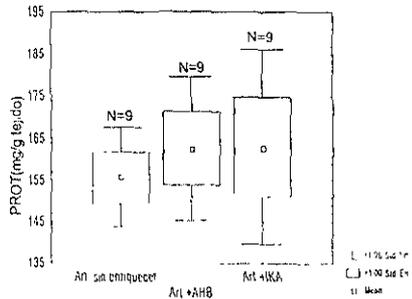


Fig. 46. Peso seco de las PL10 de L

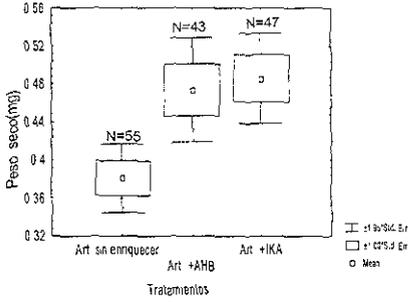


Fig. 47. Supervivencias alcanzadas en los tratamientos de alimentación. (PL10)

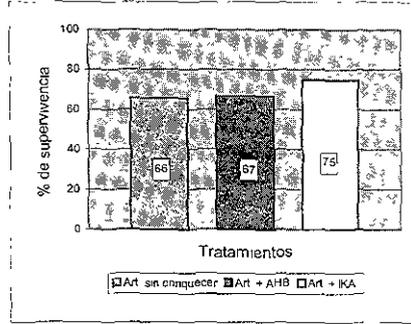


Fig 48. Resultados de supervivencia alcanzados con la prueba de estrés PL10)

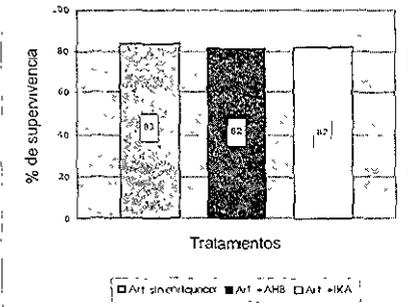


Fig 49 Niveles de Colesterol en los tres tratamientos (PL10)

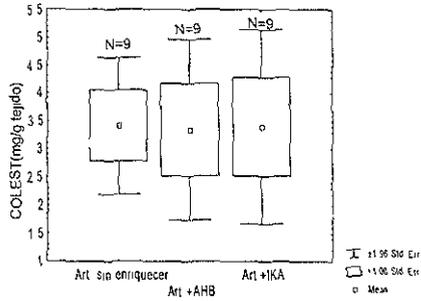


Fig.50. Niveles de Triglicéridos en los tres tratamientos (PL10)

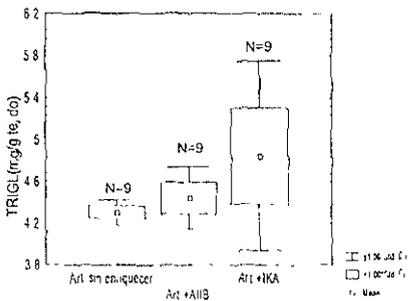


Fig 51 Niveles de Proteínas en los tres tratamientos (PL10)

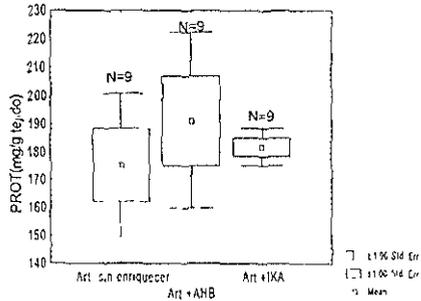


Fig.52 Niveles de Colesterol en los tres tratamientos (*Artemia*.)

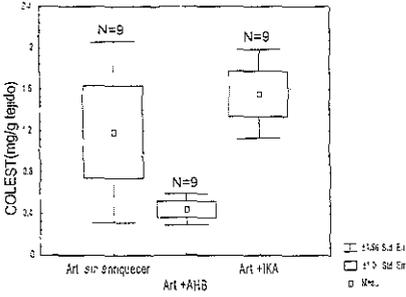


Fig.53. Niveles de Triglicéridos en los tres tratamientos (*Artemia*)

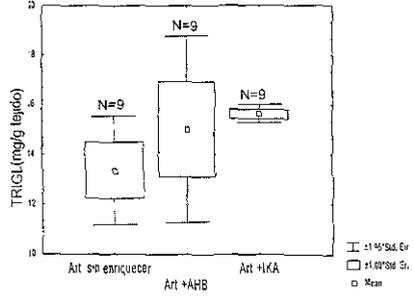
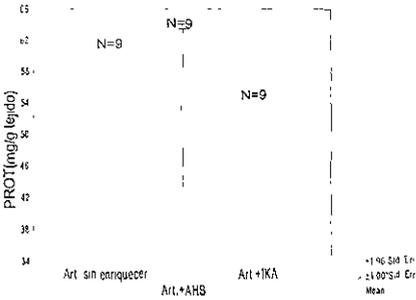


Fig 54. Niveles de Proteínas en los tres tratamientos (*Artemia*)



## BIBLIOGRAFÍA.

- Ako, H., S.Kraul., and C.Tmaru. 1991. Pattern of fatty acids loss in several warmwater fish species during early development. *Symposium on fish and crustacean larviculture Larvi 91. Fish and crustacean larviculture symposium. P.Lavens, P.Sorgeloos, E. Jaspers, and F.Oliver (Eds).* 23-25.
- Allan, G L., G B Maguire, and S. J Hopkins. 1990. Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved-oxygen levels. *Aquaculture* 91 3-4.
- Ando, Y., M. Kotake, and T. Ota. 1997. Lipids and fatty acids in *Artemia* nauplii enriched with fish oil triacylglycerols containing docosahexaenoic acid in different positional distribution patterns. *Fish. Sci.* 63: 605-609
- Barclay, W., and S. Zeller. 1996. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J World Aquacult. Soc* 27: 314-322.
- Beamish, F. W. H., A. J. Mimi, and P. I. K. P. Leet. 1975. Bioenergetic of Teleost fishes. Environmental influence. *En. L.H.P. Bols Madreef y K Schmidt-Nielsen (eds.) Comparative Functional Aspects of Structural Materials North Holland Publications Company, Amsterdam.* 600 pp
- Bell, M. V., and J. R. Dick. 1990. The fatty acid composition of phospholipids from the eyes of the northern deepwater prawn, *Pandalus borealis*. *Trans. Biochem Soc.* 18 907-908.
- Bell, J. G., D. R. Tocher, F. M. Macdonald, and J. R. Sargent. 1994. Effects of diets rich in linoleic (18:2n - 6) and alpha-linolenic (18:3n - 3) acids on the growth, lipid class and fatty acid compositions and eicosanoid production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *FISH-PHYSIOL-BIOCHEM* 13 105-118
- Bhat, B. V. 1992. Potentials and prospects for an *Artemia* aquabusiness in India. *Seafood-Export-J.* 24: 27-31.
- Cahu, C. 1987. Besoins nutritionnels des larves de crevettes penaeides: Techniques actuelles de production en eclosure. *DIX-ANS-DE-RECHERCHE-EN-AQUACULTURE.-2.-PARTIE.-LES-CRUSTACES.- Laubler,-L -ed.* 13 167-177.
- Cahu, C., M. Fakhfakh, and P. Quazugué. 1991. Effect of dietary alpha-tocopherol level on reproduction of *Penaeus indicus*. *Larvi* 242-244
- Candrea, P., P. Dhert, A. Novelli, and D. Briss. 1996. Potential gains through alimentation/nutrition improvements in the hatchery. *In Scabass and Seabream culture: Problems and Prospects.*

- An International Workshop, Verona, Italy, October 16-18, 1996. B. Chatain, M. Saroglia, J. Sweetman, and P. Lavens (Eds). *European aquaculture society, Oostende, Belgium*, 388 pp : 145-159.
- Cappellaro, H., L. Gennari, L. Achene, and G. Brambilla 1993. : *Artemia salina* as medicated feed for marine fry. *Bollettino Societa Italiana di Patologia Ittica (Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica)* 5: 29
- Clare, -. A. S., -. G. Walker, -. D. L. Holland, and -. D. J. Crisp. 1982. : Barnacle egg hatching A novel role for a prostaglandin-like compound. *MAR.-BIOL.-LETT.* 3: 113-120.
- Clawson, J. A., and R. T. Lovell. 1992. Improvement of nutritional value of *Artemia* for hybrid striped bass/white bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) larvae by n-3 HUFA enrichment of nauplii with menhaden oil. : *Aquaculture* 108: 1-2.
- Coutteau, P., and P. Sorgeloos. 1997. Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures. : *Freshwat Biol* 38: 501-512.
- Czesny, S., S. Kolkowski, K. Dabrowski, and D. Culver 1999. Growth, survival, and quality of juvenile walleye *Stizostedion vitreum* as influenced by n-3 HUFA enriched *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 178: 103-115.
- Chair, M., R. S. J. Gapasin, M. Dehasque, and P. Sorgeloos 1994. : Vaccination of European sea bass fry through bioencapsulation of *Artemia* nauplii. : *Aquacult Int.* 2: 254-261
- Chair, M., H. J. Nelis, P. Leger, P. Sorgeloos, and A. P. De-Leenheer. 1996. : Accumulation of trimethoprim, sulfamethoxazole, and N-acetylsulfamethoxazole in fish and shrimp fed medicated *Artemia franciscana*. : *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1649-1652
- Chen, J.-C., and C.-Y. Lin. 1992. Effect of ammonia on growth of *Penaeus penicillatus* juveniles. : *Comp. Biochem Physiol, C* 443-447
- Deering, M. J., D. R. Fielder, and D. R. Hewitt. 1997. : Growth and fatty acid composition of juvenile leather prawns, *Penaeus monodon*, fed different lipids. : *Aquaculture* 151: 1-4.
- Dhert, P., L. C. Lim, P. Lavens, T. M. Chao, R. Chou, and P. Sorgeloos. 1991. Effect of dietary essential fatty acids on egg quality and larviculture success of the greasy grouper (*Epinephelus tauvina*, F.). Preliminary results. : *Larvi* : 58-62.
- Dhert, P., P. Lavens, and P. Sorgeloos. 1992. : Stress evaluation: A tool for quality control of hatchery-produced shrimp and fish fry. *Aquacult Eur.* 17: 6-10.
- Dhert, P., P. Sorgeloos, and B.-Y. Devresse 1993. : Contributions towards a specific DHA enrichment in the live food *Brachionus plicatilis* and *Artemia* sp.: 109-115 In : *Fish Farming Technology H Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jorgensen, K. Tvinnereim (Eds) Balkema, Rotterdam, Netherlands*, : 482

- Dhont, J., P. Lavens, and P. Sorgeloos. 1991. : Development of a lipid-enrichment technique for *Artemia* juveniles produced in an intensive system for use in marine larviculture. : *Larvi ' 91 Lavens,-P, Sorgeloos,-P, Jaspers,-E., Ollevier,-F. pp* : 51-55.
- Dixon, B. A., S. O. Van-Poucke, M. Chair, M. Dehasque, H. J. Nelis, P. Sorgeloos, and A. P. De-Leenheer. 1995. . Bioencapsulation of the antibacterial drug sarafloxacin in nauplii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. : *J. Aquat. Anim. Health* 7. 42-45.
- Estevez, A., and A. Kanazawa. 1996. . Fatty acid composition of neural tissues of normally pigmented and unpigmented juveniles of Japanese flounder using rotifer and *Artemia* enriched in n-3 HUFA. : *Fish. Sci* 62: 88-93.
- Fernández-Reiriz, M. J., M. J. Ferreira, M. Planas, U. Labarta, and J. L. Garido. 1991. : Nutritional quality of *Artemia* during enrichment and starvation. : *Larvi ' : 48-50.*
- Forster, J.R.M. y J.F. Wickins. 1967 ICES, Maricult. Committee E: 13, 9pp. (citado por Leger et al., 1986).
- Furuta, H., T. Takeuchi, M. Toyota, and T. Watanabe. 1996. : EPA and DHA requirements in early juvenile red sea bream using HUFA enriched *Artemia* nauplii. : *Fish Sci* 62: 246-251
- Gapasin, R. S. J., H. J. Nelis, M. Chair, and P. Sorgeloos. 1996. : Drug assimilation in the tissue of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fry delivered orally through bioencapsulation. *J Appl Ichthyol. Z. Angew Ichthyol* 12: 39-42.
- Gatesoupe, F. J. 1982. : Nutritional and antibacterial treatments of live food organisms. The influence on survival, growth rate and weaning success of turbot (*Scophthalmus maximus*) . *Ann. Zootech.* 31 353-368.
- Gatesoupe, F. J. 1991. : Managing the dietary value of *Artemia* for larval turbot, *Scophthalmus maximus* : The effect of enrichment and distribution techniques. : *Aquacult. Eng.* 10: 111-119.
- Glencross, B. D., and D. M. Smith. 1999. The dietary linoleic and linolenic fatty acids requirements of the prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition [Aquacult. Nutr.]* 5: 53-63.
- Halfyard, L. C., D. Drover, C. C. Parrish, and K. Jauncey. 1999. Growth, survival, lipid and amino acid composition in striped wolffish, *Anarhichas lupus*, fed commercial marine starter diets.
- Han, K., Geurden, and P. Sorgeloos. 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n y 3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183 335-347.
- Hayashi, M., K. Toda, T. Yonci, O. Sato, and S. Kitaoka. 1993. : Dietary value of rotifers and *Artemia* enriched with *Euglena gracilis* for red sea bream . *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci Fish* 59: 1051-1058.

# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Rolando Gelabert Fernández

---

- Heras, H., J Kean-Howie, R G Akaman. (1994) The potential use of lipid microspheres as nutritional supplements for *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 123 :309-322.
- Hontoria, F, J H. Crowe, L M. Crowe, and F Amat. 1993. : Bioencapsulation of liposomes in *Artemia nauplii*. Potential use as delivery system in larviculture. : *ACTAS DEL IV CONGRESO NACIONAL DE ACUICULTURA*. Cervino, A. . 497-502.
- Hontoria, F, J. H Crowe, L M. Crowe, and F Amat 1994. · Potential use of liposomes in larviculture as a delivery system through *Artemia nauplii* : *Aquaculture* 127: 2-3.
- Howell, B. R. 1979. : Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus*- L. . *Aquaculture* 18: 215-225.
- Hudinaga, M. 1942. : Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* Bate *Japanese Journal of Zoology* 10 304-393.
- Imada, O., Y. Kageyam, T. Watanabe, C. Kitajima, S. Fujita, and Y. Y one. 1979. Bull. Jap.Soc cient. Fish., 45, 955-959 Citado por Leget *et al.*, 1986. .
- Ishizaki, Y., T. Takeuchi, T. Watanabe, M. Anmoto, and K. Shimizu. 1998. A preliminary experiment on the effect of *Artemia* enriched with arachidonic acid on survival and growth of yellowtail. *Fish Sci.* 64: 295-299.
- Izquierdo, M S., T Arakawa, T. Takeuchi, R Haroun, and T. Watanabe. 1992. · Effect of N-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus* ). . *Aquaculture* 105: 73-82.
- Kanazawa, A., S. I Teshima, and M Sakamoto 1985. · Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus* ) larvae. : *Aquaculture* 50: 1-2
- Kelly, R. O., A. W. Haseltine, and E. E. Ebert. 1977. · Mariculture potential of the spot prawn, *Pandalus platyceros* Brandt. : *Aquaculture* 10: 1-16.
- Kenneth, J. L. 1974. Emulsion and emulsion technology. 6. Part I. Kenneth, J. Lissant (ed) . Surfactant Series.: 440.
- Kontara, E. K. 1991. · Growth and survival of *Penaeus monodon* postlarvae fed with *Artemia* nauplii enriched with (n-3) highly unsaturated fatty acids. Symposium on fish and crustacean larviculture Larvi 91 P Lavens, P Sorgeloos, E. Jaspers, and F.Oliverr (Eds) . : 74-75.
- Kontara, E. K., and M. L. Nurdjana. 1992 : Growth and survival of *Penaeus monodon* postlarvae fed with *Artemia* nauplii enriched with n3-HUFA . *Bull. Brackishwat. Aquacult. Dev. Cent. Jepara* 9: 1-2

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

- Kraul, S., H. Ako, K. Brittain, A. Ogasawara, R. Cantrelli, and T. Nagao. 1991. : Comparison of copepods and enriched *Artemia* as feeds for larval mahimahi, *Coryphaena hippurus*. : *Larv* 45-47.
- Kraul, S., K. Brittain, R. Cantrelli, T. Nagao, H. Ako, A. Ogasawara, and H. Kitagawa. 1993. : Nutritional factors affecting stress resistance in the larval mahimahi *Coryphaena hippurus*. : *J. World Aquacult. Soc.* 24: 186-193.
- Kumlu, M., D. J. Fletcher, and C. M. Fisher. 1998. Larval pigmentation, survival and growth of *Penaeus indicus* fed the nematode *Panagrellus redivivus* enriched with astaxanthin and various lipids. *Aquaculture Nutrition [Aquacult. Nutr.]* 4: 193-200
- Leger, P., D. A. Bengtson, K. L. Simpson, and P. Sorgeloos. 1986a. :The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann.Rev.* 24: 521-623.
- Leger, P., G. F. Bieber, and P. Sorgeloos. 1986b : International study on *Artemia* . 33. Promising results in larval rearing of *Penaeus stylirostris* using a prepared diet as algal substitute and for *Artemia* enrichment . *J. World Maricult. Soc.* 16: 354-367.
- Leger, P., D. Bengtson, P. Sorgeloos, K. L. Simpson, and A. D. Beck. 1987a. : Nutritional value of *Artemia* A review. *Artemia research and its application* . vol. 3. *Ecology, Culturing, Use in aquaculture* P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Declair y E. Jasper (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. : 359-370
- Leger, P., E. Naessens-Foucquaert, and P. Sorgeloos. 1987b International study on *Artemia* XXXV Techniques to manipulate the fatty acid profile in *Artemia* nauplii and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysidopsis bahia* M . *Artemia Research and its Applications* 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 411-424.
- Lilly M.L. y Bottino, N.R, 1981 Identification of arachidonic acidin Gulf of Mexico shrimp and degree of biosynthesis in *Penaeus setiferus* Lipids 16:871-875.
- Lim, C., H. Ako, C. L. Brown, and K. Hahn. 1997. : Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. : *Aquaculture* 151: 1-4.
- Lunn, U. Z., and D. T. T. Htoo. 1997. *Bioencapsulation technology used in the larval rearing of Macrobrachium rosenbergii* Fao, Bangkok (Thailand)
- Martin-Robichaud, D. J., R. H. Peterson, T. J. Benfey, and L. W. Crim. 1994. : Direct feminization of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) using 17 beta -oestradiol-enriched *Artemia* as food . *Aquaculture* 123: 1-2

- Mayzaud, P., and R. J. Canover. 1988. O.N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45: 289-302
- McEvoy, L. A., J. C. Navarro, J. G. Bell, and J. R. Sargent. 1995a. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture* 134: 1-2.
- McEvoy, L. A., J. C. Navarro, F. Hontoria, F. Amat, and J. R. Sargent. 1995b. PUFA enhancement in *Artemia* nauplii: A multivariate approach to fatty acid analysis. *Larvi 95 - Fish & Shellfish Larviculture Symposium. P. Lavens, E. Jaspers y J. Roelants (Eds). European Aquaculture Society, Special Publication No. 24, Gent, Belgium: 145-148 pp.*
- McEvoy, L. A., J. C. Navarro, F. Hontoria, F. Amat, and J. R. Sargent. 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture* 144: 339-352.
- McEvoy, L. A., J. C. Navarro, F. Amat, and J. R. Sargent. 1997. Application of soya phosphatidylcholine in tuna orbital oil enrichment emulsions for *Artemia*. *Aquacult. Int.* 5: 517-526.
- Merchie, G., P. Lavens, P. Dhert, R. Pector, A. F. Mai-Soni, H. Nelis, F. Ollevier, A. De Leenheer, and P. Sorgeloos. 1995. Live food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus labrax* and *Clarias gariepinus*. *J. Appl. Ichthyol. Z. Angew. Ichthyol.* 11: 3-4.
- Merchie, G., P. Lavens, H. Nelis, P. Sorgeloos, and A. De-Leenheer. 1993. Effect of feeding vitamin C-enriched live food on the hatchery production of *Macrobrachium rosenbergii*. *FROM DISCOVERY TO COMMERCIALIZATION. Carrillo, M.: 149.*
- Merchie, G., P. Lavens, V. Storch, U. Uebel, H. Nelis, A. De-Leenheer, and P. Sorgeloos. 1996. Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages. *Comp. Biochem. Physiol., A* 117-121
- Mohney, L. L., D. V. Lightner, R. R. Williams, and M. Bauerlein. 1990. Bioencapsulation of therapeutic quantities of the antibacterial Romet-30 in nauplii of the brine shrimp *Artemia* and in the nematode *Panagrellus redivivus*. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 186-191.
- Morris, R. W. 1956. *Bull. Mus. océanogr.*, No. 1082, 62 pp (citado por Leger *et al.*, 1986).
- Mourente, G., and A. Rodriguez. 1991. Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Mar. Biol.* 110: 21-28.
- Narciso, L. 1993. Growth and survival of *Palaemon serratus* larvae fed eight live feeds. *ACTAS DEL IV CONGRESO NACIONAL DE ACUICULTURA. Cervino, A.: 263-268.*
- Narciso, L., P. Pousao-Ferreira, A. Passos, and O. Luis. 1999. HUFA content and DHA/EPA improvements of *Artemia* sp. with commercial oils during different enrichment periods. *Aquaculture Research [Aquacult. Res.]* 30: 21-24

Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*.

---

- Nordeng, H., and P. Bratland. 1971. J. Coms. perm Int Explor Mer.34. 51-57.(citado por Leger et al , 1986).
- Opstad, I., K Boxaspen, and O. Bergh 1993 · Studies on the use of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia*, enriched on different mixtures, as start-feed for turbot larvae (*Scophthalmus maximus*). : FISH NUTRITION IN PRACTICE Kanshik, S.J. . 633-638.
- Ostrensky, A., W. Wasielecky, Jr., and D Pestana. 1992. : Acute toxicity of ammonia to *Artemia* sp · An. Acad. Bras. Cienc. 64: 391-395.
- Ozkizilcik, S., and F.-L. -. E. Chu. 1994. : Evaluation of omega-3 fatty acid enrichment of *Artemia* nauplii as food for striped bass *Morone saxatilis* Walbaum larvae. : J. World Aquacult. Soc. 25 147-154.
- Rees, J. F., K.Curé., S.Piyatratitivorakul., P Menasveta, and P.Sorgeloos. 1994. :Osmotic stress resistance as a quality diagnostic for penaeid postlarvae. *The third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila Philippines Chou L.M., Munro A.D., Lam T.J, Chen T.W., Cheon I K K., Ding J.K , Hooi K.K , Khooi H W , Phang V.P.E., Shim K F & Pan C.H. (editors) . 1025-1028.*
- Robin, J. H., F. J. Gatesoupe, and R Ricardez 1981 · Production of brine shrimp (*Artemia salina* ) using mixed diet: Consequences on rearing of sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax* ) . J. World Maricult. Soc. 12 119-120.
- Robin, J. H 1982. · Comparison of two methods of improving the dietary value of *Artemia salina* for sea-bass larvae (*Dicentrarchus labrax* ). · Copenhagen Denmark Ices 11.
- Robin, J. H., F J. Gatesoupe, G. Stephan, H. le-Delliou, and G. Salaun. 1983. : Production methods of prey-filterers and their improvement in quality as food. : *Proceedings Of Marine Aquariology Of The Oceanographical Institute* 10. 497-504
- Salazar, O., and M. A. González. 1986. Intensidad de la alimentación diaria en postlarvas de *Litobus cyprinellus*. *Boletín Técnico, Ministerio de la Industria Pesquera, Empresa Nacional de Acuicultura, Cuba* . 31: 1-4
- Salhi, M., M S. Izquierdo, C. M Hernandez-Cruz, M. Gonzalez, and H. Fernandez-Palacios 1994. . Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*) *Aquaculture* 124: 1-4.
- Sargent, J. R., R. S. Batty, M. V. Bell, K Fretwell, and J. C. Navarro. 1994. : Docosahexaenoic acid, 22,6(n-3), and development of the retina in marine fish larvae. . 3RD INTERNATIONAL MARINE BIOTECHNOLOGY CONFERENCE: PROGRAM, ABSTRACTS AND LIST OF

*PARTICIPANTS. International Advisory Comm. of the Int. Marine Biotechnology Conference* 95: 95.

- Schmitt, A. S. C., and R. F. Uglow. 1993. : Nitrogen efflux rates in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) submitted to temperature changes · *FROM DISCOVERY TO COMMERCIALIZATION. Carrillo, M.* : 168.
- Seale, A. 1933. :The brine shrimp *Artemia* as satisfactory live food for fishes *Am. Fish. Soc.* 63: 129-130.
- Somerton, D. C., and J. A. Brown. 1991 : A comparison of the effect of two *Artemia* enrichment diets on growth and survival of young ocean pout and Atlantic lumpfish. 91: 81-82.
- Sorgeloos, P., P. Coutteau, P. Dhert, G. Merchie, and P. Lavens. 1998. :Use of Brine Shrimp, *Artemia* spp., in Larval Crustacean Nutrition: A Review *Reviews in Fisheries Science* 6: 55-68.
- Southgate, P. C., and D.-C. Lou. 1995 . Improving the n-3 HUFA composition of *Artemia* using microcapsules containing marine oils. : *Aquaculture* 134 1-2
- Tackaert, W., M. R. Camara, and P. Sorgeloos 1991. . The effect of dietary phosphatidylcholine in postlarval penaeid shrimp. 1 Diet preparation. *Larvi* : 76-79.
- Tacon G.J., A. 1987. The nutritional and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual 1. The essential nutrients. *Brasília, Brazil, FAO. GCP/IRLA/I075/ITA. Field Document 2/E.*
- Takeuchi, T., M. Toyota, and T. Watanabe. 1992 Dietary value of *Artemia* enriched with various types of oil for larval striped knifejaw and red sea bream. . *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 58: 283-289.
- Takeuchi, T., R. Masuda, Y. Ishizaki, T. Watanabe, M. Kanematsu, K. Imaizumi, and K. Tsukamoto. 1996. : Determination of the requirement of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia* nauplii . *Fish. Sci* 62: 760-765
- Tocher, D. R., G. Mourente, and J. R. Sargent. 1997 · The use of silages prepared from fish neural tissues as enrichers for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. : *Aquaculture* 148. 2-3.
- Touraki, M., P. Rigas, P. Pergantas, T. Abatzopoulos, and C. Kastntsis. 1991. : Optimizing bioencapsulation of the antibiotics trimethoprim and sulfamethoxazole in *Artemia* nauplii. : *Larvi* : 415-418.
- Trontaphyllidis, G. V , K. Pouloupoulou, T. J. Abatzopoulos, C. A. Pinto-Perez, and P. Sorgeloos. 1995 : International study on *Artemia* 49. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics,

- reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of *Artemia*. : *Hydrobiologia* 302: 215-227.
- Van-Ballaer, E., F. Amat, F. Hontoria, P. Leger, and P. Sorgeloos. 1985. : Preliminary results on the nutritional evaluation of omega 3-HUFA-enriched *Artemia* nauplii for larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. : *Aquaculture* 49: 3-4.
- Vanegas, C. 1992. Efecto de la salinidad y la temperatura sobre el balance energético de juveniles de camarón café *Penaeus aztecus* (Crustacea Decápoda). *Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.* · 85 pp
- Vos, J., F. Bernaerts, I. Gabriels, and W. Decler. 1979. : Aerobic and anaerobic respiration of adult *Artemia salina*- L acclimated to different oxygen concentrations. : *Comp Biochem. Physiol. A* 62: 545-548.
- Watanabe, T., F. Oowa, C. Kitajima, and S. Fujita 1978 : Nutritional quality of brine shrimp, *Artemia salina*-, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 44: 1115-1121.
- Watanabe, T., F. Oowa, C. Kitajima, and S. Fujita 1980. . Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia salina* and their content of omega 3 highly unsaturated fatty acids. : *Bull. Jap Soc. Sci. Fish.* 46: 35-41.
- Watanabe, T., M. Ohta, C. Kitajima, and S. Fujita. 1982 : Improvement of dietary value of brine shrimp *Artemia salina* for fish larvae by feeding them on omega 3 highly unsaturated fatty acids : *Bull Jap. Soc. Sci. Fish* 48: 1775-1782.
- Watanabe, T., T. Tamiya, A. Oka, M. Hirata, C. Kitajima, and S. Fujita. 1983. : Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on omega 3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish Nussuishi.* 49: 471-479.
- Watanabe, T. 1991. : Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. : *Larvi'* : 91.
- Wickins, J. F. 1972. · The food value of brine shrimp, *Artemia salina* L., to larvae of the prawn, *Palaemon serratus* Pennant. . *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 10: 151-170.
- Xu, X. L., W. J. Ji, J. D. Castell, and R. K. O'Dor 1994. : Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. · *Aquaculture* 119: 359-370.
- Zheng, F., T. Takeuchi, K. Yoseda, M. Kobayashi, J. Hirokawa, and T. Watanabe. 1996 : Requirement of larval cod for arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia* nauplii. · *Nippon Suisan Gakkaishi* 62: 669-676.