

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, CULTIVO Y
PATOLOGÍA DE ESPECIES MARINAS

DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LIPOSOMAS PARA SU USO
COMO SISTEMA DE SUMINISTRO DE NUTRIENTES A
LARVAS DE PECES MARINOS

ÓSCAR MONROIG MARZÁ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 9 de Novembre de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Francisco Castelló Orvay
- D^a. Alicia Estévez García
- D. Miquel Planas Oliver
- D^a. Covadonga Rodríguez González
- D. Javier Díaz Mayans

Va ser dirigida per:
D. Francisco Hontoria Danés

©Copyright: Servei de Publicacions
Óscar Monroig Marzá

Depòsit legal:
I.S.B.N.:978-84-370-6672-1
Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

*DEPARTAMENT DE BIOLOGIA I ANTROPOLOGIA
FÍSICA*



**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LIPOSOMAS
PARA SU USO COMO SISTEMA DE
SUMINISTRO DE NUTRIENTES A LARVAS DE
PECES MARINOS**

Memoria presentada por Óscar Monroig Marzá para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Fdo.: Óscar Monroig Marzá

Valencia, Noviembre 2006

LA PRESENTE TESIS DOCTORAL HA SIDO DIRIGIDA POR EL
DOCTOR FRANCISCO HONTORIA, CIENTÍFICO TITULAR DEL
INSTITUTO DE ACUICULTURA DE TORRE DE LA SAL
(CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS),
Y CUMPLE CON TODOS LOS REQUISITOS EXIGIDOS POR LA
LEGISLACIÓN VIGENTE.

Fdo.: Francisco Hontoria Danés

Índice de Tablas.....	V
Índice de Figuras.....	VII
Abreviaturas.....	X
PRÓLOGO.....	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1.1. Larvicultura de peces marinos. Importancia de la alimentación.....	6
1.2. Carencias nutricionales de las presas vivas.....	14
1.3. Uso de liposomas como sistema de suministro de nutrientes.....	19
2. MATERIAL Y MÉTODOS COMUNES.....	25
2.1. Preparación de liposomas.....	26
2.2. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i>.....	31
2.2.1. Eclósión de quistes de <i>Artemia</i>	31
2.2.2. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i>	33
2.2.3. Supervivencia de nauplios de <i>Artemia</i> durante el enriquecimiento...	34
2.3. Cría larvaria de lubina y dorada.....	34
2.4. Análisis de nutrientes.....	35
2.4.1. Análisis de lípidos totales: método de Folch.....	35
2.4.2. Análisis de clases de lípidos por HPTLC.....	36
2.4.3. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases.....	38
2.4.3.1. Transmetilación de ácidos grasos.....	38
2.4.3.2. Condiciones cromatográficas.....	39
2.4.4. Análisis de vitamina A por HPLC.....	40
2.4.4.1. Extracción de vitamina A y derivados.....	40
2.4.4.2. Condiciones cromatográficas.....	40
2.4.5. Análisis de vitamina C por HPLC.....	41
2.4.5.1. Extracción de ácido ascórbico.....	41
2.4.5.2. Condiciones cromatográficas.....	41
2.4.6. Análisis de aminoácidos por HPLC.....	42
2.4.6.1. Extracción de aminoácidos libres.....	42
2.4.6.2. Derivatización de aminoácidos.....	43
2.4.6.3. Condiciones cromatográficas.....	43
2.5. Análisis estadísticos.....	45
3. COMPORTAMIENTO DE LIPOSOMAS COMO ENRIQUECEDORES DE NAUPLIOS DE <i>Artemia</i>.....	46
3.1. Introducción.....	47
3.2. Material y métodos.....	49
3.2.1. Capacidad de retención de sustancias disueltas.....	49
3.2.2. Peroxidación lipídica de los productos enriquecedores durante el enriquecimiento.....	53
3.2.3. Conservación del tamaño inicial de las vesículas.....	55
3.3. Resultados.....	56
3.3.1. Capacidad de retención de sustancias disueltas.....	56
3.3.2. Peroxidación lipídica de los productos enriquecedores durante el enriquecimiento.....	57
3.3.3. Conservación del tamaño inicial de las vesículas.....	60
3.4. Discusión.....	64

4. ENRIQUECIMIENTO DE NAUPLIOS DE <i>Artemia</i> EN ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES Y FOSFOLÍPIDOS.....	71
4.1. Introducción.....	72
4.2. Material y métodos.....	76
4.2.1. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> con diferentes tipos de liposomas: efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos.....	76
4.2.2. Efecto de la aireación aplicada durante el enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales.....	78
4.2.3. Efecto de la densidad naupliar durante el enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales.....	79
4.2.4. Efecto de la concentración de liposomas durante el enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales.....	80
4.2.5. Efecto de la dosificación de liposomas durante el enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales.....	81
4.3. Resultados.....	82
4.3.1. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> con diferentes tipos de liposomas: efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos.....	82
4.3.2. Efecto de la aireación aplicada durante el enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales.....	89
4.3.3. Efecto de la densidad naupliar durante el enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales.....	96
4.3.4. Efecto de la concentración de liposomas durante el enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales.....	96
4.3.5. Efecto de la dosificación de liposomas durante el enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales.....	101
4.4. Discusión.....	102
5. ENRIQUECIMIENTO DE NAUPLIOS DE <i>Artemia</i> EN OTROS NUTRIENTES ESENCIALES: VITAMINA A, VITAMINA C Y METIONINA.....	114
5.1. Introducción.....	115
5.2. Material y métodos.....	118
5.2.1. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> en vitamina A.....	119
5.2.2. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> en vitamina C.....	120
5.2.3. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> en metionina.....	121
5.3. Resultados.....	123
5.3.1. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> en vitamina A.....	123
5.3.2. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> en vitamina C.....	124
5.3.3. Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> en metionina.....	125
5.4. Discusión.....	125

6. EXPERIMENTOS DE ALIMENTACIÓN LARVARIA CON NAUPLIOS DE <i>Artemia</i> ENRIQUECIDOS.....	131
6.1. Introducción.....	132
6.2. Material y métodos.....	133
6.2.1. Bioencapsulación 1: administración de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos a larvas de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	135
6.2.2. Bioencapsulación 2: administración de nutrientes liposolubles (vitamina A) e hidrosolubles (ascorbato sódico y metionina) a larvas de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	137
6.2.3. Bioencapsulación 3: administración de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos a larvas de dorada (<i>Sparus aurata</i>).....	139
6.3. Resultados.....	142
6.3.1. Bioencapsulación 1: administración de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos a larvas de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	142
6.3.2. Bioencapsulación 2: administración de nutrientes liposolubles (vitamina A) e hidrosolubles (ascorbato sódico y metionina) a larvas de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	147
6.3.3. Bioencapsulación 3: administración de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos a larvas de dorada (<i>Sparus aurata</i>).....	152
6.4. Discusión.....	160
7. EXPERIMENTOS DE SUMINISTRO DIRECTO DE NUTRIENTES A LARVAS DE PECES: BAÑOS DE LIPOSOMAS.....	167
7.1. Introducción.....	168
7.2. Material y métodos.....	170
7.2.1. Baño 1: inmersión de larvas de lubina en liposomas con EFAs.....	172
7.2.2. Baño2: inmersión de larvas de lubina en liposomas con ascorbato sódico.....	174
7.2.3. Baño3: inmersión de larvas de lubina en liposomas con metionina	175
7.2.4. Baño 4: inmersión de larvas lecitotróficas de dorada en liposomas con metionina.....	176
7.2.5. Baño 5: inmersión de larvas de dorada en liposomas con metionina.....	177
7.3. Resultados.....	179
7.4. Discusión.....	183
8. RESUMEN.....	188
CONCLUSIONES.....	194
BIBLIOGRAFÍA.....	197
ANEXO.....	225
Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, I., González, P., Amat, F., Hontoria, F., 2003. Enrichment of <i>Artemia</i> nauplii in PUFA, phospholipids, and water-soluble nutrients using liposomes. <i>Aquacult. Int.</i> 11, 151-161.	
Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, F., González, P., Bermejo, A., Hontoria, F., 2006. Enrichment of <i>Artemia</i> in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (<i>Sparus aurata</i>) larvae. <i>Aquaculture</i> 251, 491-508.	
Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, F., González, P., Hontoria, F., 2006. Effect of aeration on the efficiency of <i>Artemia</i> enrichment with EFA-rich emulsion and liposomes. <i>Aquaculture</i> 257, 382-392.	
Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, F., González, P., Hontoria, F., 2006. Effect of nauplii density, product concentration and product dosage on survival of the nauplii and EFA incorporation during <i>Artemia</i> enrichment with liposomes. <i>Aquaculture</i> (en prensa).	

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Capturas de quistes de *Artemia* de *Great Salt Lake* (Utah, EE.UU.) desde el año 1988 hasta 1999.

Tabla 2.1. Perfil típico de ácidos grasos y clases de lípidos de la emulsión lipídica usada como control y las cuatro fuentes fosfolipídicas utilizadas en la preparación de los liposomas (KPL, SPC, EPC y DPPC).

Tabla 2.2. Selección de ácidos grasos analizados en quistes comerciales EG (Inve).

Tabla 2.3. Programa de elución en gradiente seguido en el análisis de aminoácidos libres.

Tabla 3.1. Concentración de peróxidos lipídicos medidos en medios de enriquecimiento con productos enriquecedores al inicio y después de 21 h de incubación bajo condiciones de enriquecimiento.

Tabla 4.1. Composición de clases de lípidos y lípidos totales de nauplios enriquecidos en los puntos de muestreo de 18, 21 y 24 h.

Tabla 4.2. Selección de ácidos grasos de nauplios enriquecidos en los puntos de muestreo 18, 21 y 24 h.

Tabla 4.3. Selección de ácidos grasos y lípidos totales de nauplios enriquecidos con una emulsión lipídica y con liposomas LUVdet bajo las diferentes combinaciones de tres niveles de flujo de aire (0,6, 1,0 y 3,0 lpm) y dos sistemas de difusión de aire (varilla y piedra).

Tabla 4.4. Selección de ácidos grasos y lípidos totales de nauplios enriquecidos con una emulsión comercial y con liposomas LUVdet a tres densidades naupliares diferentes (100, 300 y 700 nauplios ml⁻¹).

Tabla 4.5. Selección de ácidos grasos y lípidos totales de nauplios enriquecidos con una emulsión lipídica comercial y con liposomas LUVdet a tres concentraciones lipídicas diferentes (0,25, 0,5 y 0,75 g lípido l⁻¹).

Tabla 4.6. Selección de ácidos grasos y lípidos totales de nauplios enriquecidos con una emulsión lipídica comercial y con liposomas LUVdet dispensados mediante tres modos de dosificación diferentes.

Tabla 4.7. Contenidos de lípidos polares de nauplios enriquecidos expresados como porcentajes del total de lípidos y en términos absolutos (mg g PS⁻¹).

Tabla 6.1. Composición de clases de lípidos y contenido total de lípidos de los nauplios usados como dieta de larvas de lubina de la Bioencapsulación 1.

Tabla 6.2. Selección de ácidos grasos de nauplios usados como dieta de larvas de lubina de la Bioencapsulación 1.

Tabla 6.3. Supervivencia, talla y peso de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 1.

Tabla 6.4. Composición de clases de lípidos y contenido total de lípidos de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 1.

Tabla 6.5. Selección de ácidos grasos de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 1.

Tabla 6.6. Contenido de retinol, ascorbato y metionina libre de los nauplios usados como dieta de larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 2.

Tabla 6.7. Selección de ácidos grasos de nauplios usados como dieta de larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 2.

Tabla 6.8. Supervivencia, talla y peso de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 2.

Tabla 6.9. Contenidos de retinol, ascorbato y metionina libre de los nauplios usados como dieta de larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 2.

Tabla 6.10. Selección de ácidos grasos de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 2.

Tabla 6.11. Composición de clases de lípidos y contenido total de lípidos de los nauplios usados como dieta de larvas de dorada del experimento Bioencapsulación 3.

Tabla 6.12. Selección de ácidos grasos de nauplios usados como dieta de larvas de dorada del experimento Bioencapsulación 3.

Tabla 6.13. Supervivencia, talla y peso de las larvas de dorada del experimento Bioencapsulación 3.

Tabla 6.14. Composición de clases de lípidos y contenido total de lípidos de las larvas de dorada del experimento Bioencapsulación 3.

Tabla 6.15. Selección de ácidos grasos de larvas de dorada del experimento Bioencapsulación 3.

Tabla 7.1. Detalles de los experimentos de suministro directo de nutrientes a larvas de peces mediante baños de liposomas.

Índice de Figuras

Figura 1.1. Estadios de desarrollo y modos de nutrición durante la vida de los peces.

Figure 1.2. Rutas de síntesis de ácidos grasos de 20 y 22 carbonos desde sus precursores C18 en las series n-3, n-6 y n-9.

Figura 1.3. Régimen alimenticio general seguido en la alimentación de larvas de peces marinos.

Figura 1.4. Esquema de la estructura de una micela de emulsión, un liposoma unilamelar y otro multilamelar.

Figura 1.5. Posición ocupada por el colesterol en una membrana fosfolípida.

Figura 2.1. Procedimiento de preparación de liposomas multilamelares y liposomas unilamelares de extrusión.

Figura 2.2. Extrusionador Liposofast (Avestin Inc.).

Figura 2.3. Liposomat (Dianorm).

Figura 2.4. Separación de las clases lipídicas de muestras de nauplios enriquecidos con la emulsión comercial Super Selco y larvas alimentadas con nauplios enriquecidos con la misma emulsión y aplicadas en placas de HPTLC de dos marcas comerciales diferentes (Panreac y Merck).

Figura 2.5. Separación de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante una técnica de GC con una columna tubular abierta y detección por ionización de llama de un patrón comercial (Supelco).

Figura 2.6. Separación de compuestos estándar implicados en el metabolismo de la vitamina A mediante una técnica de HPLC con una columna de fase reversa y detección espectrofotométrica a 325 nm.

Figura 2.7. Separación de ascorbato mediante una técnica de HPLC con una columna de fase reversa y detección espectrofotométrica a 325 nm.

Figura 2.8. Separación de PTC-aminoácidos (derivados feniltiocarbamil) mediante una técnica de HPLC con una columna de fase reversa C18 y detección espectrofotométrica a 254 nm.

Figura 3.1. Estructura de un triglicérido, un éster etílico de ácido graso y un fosfolípido.

Figura 3.2. Curvas de retención de marcador fluorescente 5(6)-carboxifluoresceína en la fase acuosa interna de varias preparaciones de liposomas formuladas con KPL, SPC, EPC y DPPC sometidas a condiciones de enriquecimiento.

Figura 3.3. Distribución de tamaños de varias formulaciones de liposomas LUVext y LUVdet evaluadas a lo largo de un periodo de 22 h en presencia y ausencia de nauplios de *Artemia*.

Figura 4.1. Contenidos de lípidos totales de nauplios de *Artemia* enriquecidos en los tiempos de muestreo de 18, 21 y 24 h.

Figura 4.2. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) de nauplios enriquecidos con la emulsión comercial y con tres tipos de liposomas en los tiempos de muestreo de 18, 21 y 24 h.

Figura 4.3. Porcentajes de supervivencia de nauplios tras 21 h de enriquecimiento con la emulsión comercial Super Selco y con liposomas LUVdet y sometidos a diferentes modos de aireación.

Figura 4.4. Apariencia de tres nauplios de *Artemia* después de ser sometidos a una incubación durante 21 h con liposomas LUVdet a 3,0 lpm y utilizando piedras difusoras como sistema de difusión de aire.

Figura 4.5. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) de nauplios enriquecidos con la emulsión comercial y liposomas LUVdet bajo las diferentes combinaciones de tres niveles de flujo de aire (0,6, 1,0 y 3,0 lpm) y dos sistemas de difusión de aire (varilla y piedra).

Figura 4.6. Porcentajes de supervivencia de nauplios tras 21 h de enriquecimiento con la emulsión comercial Super Selco y con liposomas LUVdet.

Figura 4.7. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) de nauplios enriquecidos con la emulsión comercial y liposomas LUV detergente a tres densidades naupliares diferentes (100, 300 y 700 nauplios ml^{-1}).

Figura 4.8. Porcentajes de supervivencia de nauplios tras 21 h de incubación con la emulsión comercial Super Selco y con liposomas LUV detergente a diferentes concentraciones lipídicas.

Figura 4.9. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) en nauplios enriquecidos con la emulsión comercial y liposomas LUV detergente a tres concentraciones lipídicas diferentes.

Figura 4.10. Porcentajes de supervivencia de nauplios tras 21 h de incubación con la emulsión comercial Super Selco y con liposomas LUVdet dispensados mediante diferentes modos de dosificación.

Figura 4.11. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) en nauplios enriquecidos con la emulsión comercial y liposomas LUV detergente dispensados mediante tres modos de dosificación diferentes.

Figura 5.1. Contenido de retinol ($\mu\text{g g PS}^{-1}$) de nauplios de *Artemia* incubados con los productos enriquecedores.

Figura 5.2. Contenido de ascorbato ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$) de nauplios de *Artemia* incubados con los productos enriquecedores.

Figura 5.3. Contenido de metionina libre ($\mu\text{g g PS}^{-1}$) de nauplios de *Artemia* incubados con los productos enriquecedores.

Figura 6.1. Dispositivo empleado en los experimentos de alimentación larvaria con nauplios de *Artemia* enriquecidos.

Figura 6.2. Esquema del procedimiento seguido en los experimentos de alimentación larvaria con nauplios de *Artemia* enriquecidos.

Figura 6.3. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) de nauplios enriquecidos durante el experimento Bioencapsulación 1.

Figura 6.4. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 1.

Figura 6.5. Contenido de peróxidos en grupos de larvas de lubina alimentadas con las diferentes dietas experimentales de Bioencapsulación 1.

Figura 6.6. Contenido de peróxidos en grupos de larvas de lubina alimentadas con las diferentes dietas experimentales de Bioencapsulación 2.

Figura 6.7. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) de nauplios enriquecidos durante el experimento Bioencapsulación 3.

Figura 6.8. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) de las larvas de dorada del experimento Bioencapsulación 3.

Figura 6.9. Contenido de peróxidos expresado como la concentración de tetraetoxipropano (TEP) en grupos de larvas de dorada alimentadas con las diferentes dietas experimentales de Bioencapsulación 3.

Figura 7.1. Dispositivo empleado en los experimentos de suministro directo de nutrientes a larvas de peces mediante baños de liposomas.

Figura 7.2. Selección de ácidos grasos y grupos de ácidos grasos de las larvas de lubina sometidas a inmersiones en tratamientos ricos en EFAs.

Figura 7.3. Contenido de ascorbato de las larvas de lubina sometidas a inmersiones en tratamientos ricos en ascorbato.

Figura 7.4. Contenido de metionina libre de las larvas de lubina sometidas a una única inmersión en tratamientos ricos en metionina.

Figura 7.5. Contenido de metionina libre de las larvas lecitotróficas de dorada sometidas a baños con tratamientos ricos en metionina.

Figura 7.6. Contenido de metionina libre de las larvas de dorada sometidas a baños con tratamientos ricos en metionina.

ANOVA: análisis de varianza
ARA: ácido araquidónico (20:4n-6)
BHT: hidroxitolueno butilado
CF: 5(6)-carboxifluoresceína
CHO: colesterol
CL: cardioplipina
DAG: diglicérido
DHA: ácido docosahexaenoico (22:6n-3)
DPA: ácido docosapentaenoico (22:5n-3)
DPE: días *post*-eclosión
DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina
EFA: ácido graso esencial
EG: *enrichment grade*
EPA: ácido eicosapentaenoico (20:5n-3)
EPC: fosfatidilcolina de huevo
FAEE: éster etílico de ácido graso
FAME: éster metílico de ácido graso
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FFA: ácido graso libre
GC: cromatografía de gases
GSL: *Great Salt Lake* o Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.)
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
HPTLC: cromatografía en capa fina de alta resolución
HUFA: ácido graso poliinsaturado de cadena larga (20 o más carbonos) y con más de dos insaturaciones
KPL: fosfolípidos de krill
LA: ácido linoleico (18:2n-6)
LN: lípido neutro
LNA: ácido linolénico (18:3n-3)
LP: lípido polar
LPM: litros por minuto
LUV: vesículas unilamelares grandes
MAG: monoglicérido
Met: metionina
MDA: malondialdehído
MLV: vesícula multilamelar
MPA: ácido metafosfórico
PA: ácido fosfatídico
PC: fosfatidilcolina
PE: fosfatidiletanolamina
PI: fosfatidilinositol
PITC: fenilisotiocianato
PS: peso seco

PUFA: ácido graso poliinsaturado
SDS: dodecil sulfato de sodio
SUV: vesículas unilamelares pequeñas
SE: ésteres de esteroles
SM: esfingomielina
SPC: fosfatidilcolina de soja
TAG: triglicérido
TBA: ácido tiobarbitúrico
T_c: temperatura de transición de fase gel a fase líquido cristalina de
fosfolípidos
TCA: ácido tricloroacético
TEP: 1,1,3,3-tetraetoxipropano
vitA: vitamina A
vitC: vitamina C
vitE: vitamina E

PRÓLOGO

El término acuicultura abarca todas aquellas actividades que tienen por objeto la producción, crecimiento (desarrollo) y comercialización de organismos acuáticos, animales o vegetales, de aguas dulces, salobres o saladas (Barnabé, 1991). Según esta definición, pueden distinguirse tres tipos de acuicultura en función del medio en el que tienen lugar: 1) acuicultura en agua dulce, la que tiene lugar con especies originarias de biotopos continentales de escasa salinidad; 2) acuicultura en aguas salobres, con especies propias de aguas de salinidades intermedias; 3) la acuicultura marina, correspondiente a especies de origen marino. A nivel global, la mayor parte de la producción acuícola de pescado, crustáceos y moluscos proviene de la acuicultura en agua dulce, representando el 57,7% de la producción total en peso en el año 2002. Por otro lado, la producción procedente de la acuicultura marina alcanzó el 36,5% de la producción total. El resto de producción, un 5,8%, correspondió a la cría de especies en aguas salobres.

Esta actividad industrial, explotada en todos los continentes del planeta, ha experimentado un desarrollo espectacular en los últimos años. Durante las tres últimas décadas la acuicultura ha crecido, se ha diversificado e intensificado y ha registrado grandes adelantos tecnológicos. El potencial que estos avances representan para el crecimiento económico, la activación del comercio, la mejora de los niveles de vida y el incremento de la seguridad alimentaria, fue reconocido por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en su Declaración y Estrategia de Bangkok, la cual subraya la importancia de continuar con su desarrollo hasta ofrecer todo su potencial a la humanidad (NACA/FAO, 2001). Según el último informe sobre el Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura conocido como SOFIA¹ (FAO, 2004), la contribución de la acuicultura al suministro global de peces, crustáceos y moluscos ha ido creciendo progresivamente en las últimas décadas, pasando de un 3,9% del peso total de capturas en 1970, hasta el 29,9% en 2002. Además, la acuicultura ha registrado un crecimiento más acelerado que el resto de sectores de producción animal. En este sentido, la actividad acuícola ha experimentado, a escala global, una tasa media de crecimiento anual de 8,9% desde 1970, muy superior al 1,2% correspondiente a la pesca extractiva y al 2,8% de actividades dedicadas a la producción de animales terrestres. En 2002, la producción total procedente de la acuicultura, incluida la de algas acuáticas, se cifró en 51,4 millones de toneladas métricas (Tm), con un rendimiento económico asociado de 60.000 millones

¹ Acrónimo de “*State of World Fisheries and Aquaculture*”.

dólares americanos. La mayor parte de esta producción acuícola tiene lugar en países asiáticos como China, India, Indonesia, Japón, Bangla Desh y Tailandia, representando el 91,2% de la producción total en peso. Mención a parte merece el caso de China, con una producción en peso del 71,2% de la total mundial. En cualquier caso, la tasa de crecimiento que el sector de la acuicultura ha venido experimentando en las últimas décadas del Siglo XX parece haberse ralentizado durante el comienzo del tercer milenio. A pesar de esta deceleración, durante el periodo que va desde 2000 a 2002, el sector acuícola ha mantenido la tendencia al crecimiento, con la única excepción de Europa donde la actividad ha sufrido un ligero retroceso del 0,1% en la tasa media de crecimiento anual.

En Europa los principales productos de la acuicultura son peces de alto valor comercial y moluscos. La producción europea representa sólo el 3% de la producción mundial, pero es líder en algunas especies como el salmón atlántico, la trucha, la lubina, la dorada, el rodaballo o el mejillón (FAO, 2004). En España, según la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos (APROMAR), la producción acuícola en 2001 fue superior a las 313.000 Tm, de las que 257.000 correspondieron a producción de moluscos, 56.000 Tm a peces y una parte pequeña a crustáceos. Sin embargo, al hacer referencia al valor económico tras la comercialización, la producción de peces, con 260 millones de euros en 2001, es prácticamente el doble que la de moluscos con 137 millones de euros.

La diversidad de la costa española queda reflejada en el tipo de cultivo predominante en cada región. Mientras que en la cornisa cantábrica y la región noroeste predominan el cultivo del rodaballo en granjas en tierra, de mejillón en bateas, y de forma emergente, el de besugo, pulpo y abadejo, las zonas mediterránea y suratlántica, de aguas más templadas, han desarrollado principalmente el cultivo de dorada y lubina, tanto en granjas en tierra (Bahía de Cádiz, principalmente), como en jaulas flotantes. Además, los cultivos del lenguado, la corvina o el dentón se hallan en una fase de desarrollo incipiente y sus niveles productivos están todavía muy por debajo de los de dorada y lubina. Por otra parte, Canarias produce dorada y lubina en jaulas flotantes aprovechando sus aguas templadas durante todo el año.

En definitiva, el potencial de desarrollo del sector de la acuicultura en las próximas décadas, unido al agotamiento de los recursos pesqueros debido a la actividad extractiva, justifica el enorme esfuerzo científico y técnico dedicado a este sector industrial. En este

contexto queda enmarcado el presente trabajo de investigación, el cual centra su atención en aspectos sobre alimentación larvaria de peces marinos como elemento básico en el desarrollo del cultivo de cualquier especie. Hasta la finalización de esta memoria, los resultados obtenidos durante el estudio han generado la publicación de los artículos incluidos en el Anexo.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Larvicultura de peces marinos. Importancia de la alimentación.

El cultivo de un organismo acuático requiere la obtención de crías o semilla, cuyo desarrollo está dirigido, en último término, a la obtención de individuos de talla comercial. La obtención de semilla puede acometerse mediante la captura en el medio natural de crías de la especie cultivada, aunque esta práctica lleva implícitos problemas de sobreexplotación como ha ocurrido en la pesca de postlarvas de camarón con destino a la acuicultura en la costa ecuatoriana (Olsen y Figueroa, 1989), o en la pesca de angulas para su engorde. La estabulación de animales reproductores, a partir de los cuales se puede obtener la descendencia con la que iniciar el cultivo, constituye una alternativa a la anterior estrategia. De hecho, la mayor parte de las plantas dedicadas a la cría larvaria de especies marinas con mayor interés económico han adoptado esta segunda posibilidad y disponen de instalaciones dedicadas al mantenimiento de animales reproductores.

La alimentación de los reproductores representa un elemento determinante en la obtención de puestas de calidad. La importancia de la composición de la dieta de los reproductores y su influencia sobre algunos criterios de calidad de las puestas han sido revisadas recientemente por Izquierdo y cols. (2001) y Watanabe y Vassallo-Agius (2003). En estas revisiones se recogen estudios que ponen de manifiesto la importancia de nutrientes de naturaleza muy diversa presentes en la dieta de reproductores de diversas especies de peces teleósteos. Así, los contenidos de lípidos y proteínas (Tandler y cols., 1995; Fernández-Palacios y cols., 1997), las vitaminas A, C y E (Blom y Dabrowski, 1995; Fernández-Palacios y cols., 1998; Furuita y cols., 2003) y algunos carotenoides (Harris, 1984) han demostrado jugar un papel decisivo en la calidad de las puestas. A pesar de la importancia de estos nutrientes, la gran mayoría de estudios sobre calidad de dietas para reproductores centran su atención en la fracción lipídica y, más concretamente, en la composición de ácidos grasos esenciales (EFAs) presentes en el alimento (Fernández-Palacios y cols., 1995; Pickova y cols., 1997; Rodríguez y cols., 1998a; Bruce y cols., 1999; Mazorra y cols., 2003; Bell y cols., 2005). De esta forma, se considera que la dieta ideal para un reproductor, desde el punto de vista de la composición lipídica, es aquella que permite obtener huevos con un contenido lipídico, en clases de lípidos y de ácidos grasos, igual al perfil que tienen los huevos procedentes de ejemplares salvajes (Sargent y cols., 2002). Por todo esto, la alimentación de reproductores suele acometerse mediante dietas de mayor calidad

nutricional que la de los animales destinados al consumo. Así, de forma complementaria al empleo de piensos compuestos, las dietas de los reproductores suelen completarse con moluscos o pastas de pescado en momentos determinados del ciclo reproductivo, con objeto de obtener puestas de mejor calidad. Por su parte, el uso exclusivo de dietas formuladas inertes suele descartarse por la baja calidad de las puestas obtenidas con este alimento (Thrush y cols., 1993; Bell y cols., 1997).

En la mayoría de especies cultivadas, las hembras y los machos reproductores liberan los gametos al medio externo durante la época de maduración sexual. Tras la fecundación de los huevos, éstos son recogidos mediante colectores situados en los desagües de los tanques de reproductores y, posteriormente, se trasvasan a un recipiente donde son decantados. La fracción de huevos viables, seleccionada según su flotabilidad, se transfiere a tanques donde tiene lugar la cría larvaria. La eclosión de los huevos se produce tras un periodo variable de pocos días, dependiendo de la temperatura de incubación en los tanques de cría larvaria, dando paso a un segundo estadio embrionario en el que el organismo sigue provisto de la mayor parte de reservas vitelinas y posee, además, cierta capacidad natatoria (Figura 1.1). Aunque se trata de embriones (Balon, 1985; Gatesoupe y cols., 2001), los organismos que se hallan en este estadio de desarrollo son habitualmente denominados “larvas lecitotróficas²”. Las reservas vitelinas existentes durante la fase embrionaria están constituidas principalmente por lipoproteínas (una porción proteica y fosfolípidos) y, en algunas especies (p. ej., dorada, lubina, dentón, rodaballo, etc.), por una gota lipídica compuesta por lípidos neutros de reserva (triglicéridos, ésteres de esteroles y/o ésteres de ceras) (Sargent y cols., 2002). Durante la fase embrionaria, la porción vitelina es consumida básicamente en procesos de formación de tejidos, mientras que el glóbulo lipídico es reabsorbido más lentamente para acometer el gasto energético derivado, principalmente, de la natación.

La fase embrionaria termina cuando tiene lugar la apertura del esófago (Figura 1.1), comenzando la fase larvaria en la que el animal tiene capacidad para ingerir alimento exógeno a pesar de existir restos de vitelo y gran parte de la gota lipídica (en caso de poseerla originalmente). Esta primera ingestión de alimento exógeno supone una de las etapas más críticas en la cría larvaria y ocasiona una mortandad importante. En el cultivo de la mayoría de especies marinas, el alimento administrado a las larvas como primera fuente

² De aquí en adelante, se utilizará esta denominación en referencia al estadio embrionario que va de la eclosión del huevo hasta la apertura del esófago.

exógena está basado en organismos planctónicos vivos debido a la

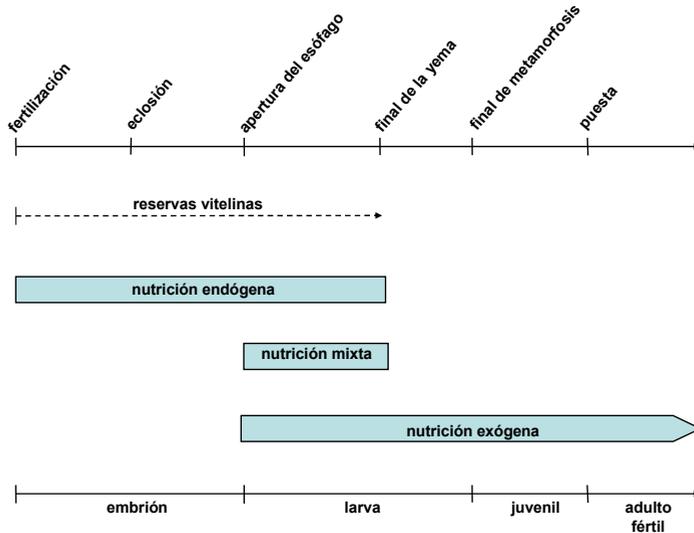


Figura 1.1. Estadios de desarrollo y modos de nutrición durante la vida de los peces (Tomado de Gatesoupe y cols., 2001).

baja aceptabilidad de las dietas inertes. Algunos de los motivos que explican esta escasa aceptación de las dietas inertes son la baja capacidad digestiva de las larvas, el desconocimiento de sus requerimientos nutricionales y su comportamiento en el medio de cultivo (flotabilidad, pérdida de nutrientes, color, etc.) (Langdon, 2003). Los organismos usados en la alimentación de las fases larvarias de peces y crustáceos son conocidas mediante el término de presas vivas, y de su utilización depende el éxito de la fase de cría larvaria en la mayoría de especies marinas.

Las presas vivas constituyen un conjunto heterogéneo de organismos pertenecientes a grupos taxonómicos muy diversos dentro del fitoplancton (microalgas) y del zooplancton. En el caso de especies carnívoras, grupo al que pertenecen las especies cultivadas de mayor interés comercial, la base de la alimentación natural está constituida por el zooplancton. El zooplancton marino comprende diversos estadios de desarrollo (larvas, juveniles y adultos) de especies pertenecientes a varios grupos filogenéticos de crustáceos (cladóceros, copépodos, etc.), moluscos (bivalvos, gasterópodos, cefalópodos, etc.), protozoos, etc.

La provisión de presas vivas destinadas a la alimentación de las larvas en cultivo es afrontada en los criaderos de larvas mediante distintas alternativas. En primer lugar, el plancton marino puede ser recolectado del medio natural mediante la utilización de redes de plancton. Una vez recolectado, el zooplancton se ofrece directamente a las larvas (McEvoy y cols., 1998; Helland y cols., 2003) o bien se somete a un proceso de proliferación en sistemas semi-controlados al aire libre (Støttrup y Norsker, 1997). Esta posibilidad trae consigo inconvenientes relacionados con la estacionalidad de los “*blooms*” zooplanctónicos, una alta variabilidad del perfil nutricional y problemas de sobreexplotación (Shields y cols., 1999; Støttrup, 2000). Una segunda estrategia la constituye el cultivo de especies zooplanctónicas en condiciones controladas. En este sentido, los copépodos marinos han sido objeto de estudio debido a su alta calidad nutricional (McEvoy y cols., 1998; Shields y cols., 1999; Helland y cols., 2003) y a la idoneidad de tamaño que sus fases larvarias representan para larvas de especies con tamaño de boca especialmente pequeño (Doi y cols., 1997a, b; Toledo y cols., 1997; Lee, 2003). A pesar de todo esto, su utilización en sistemas intensivos de producción larvaria es esporádica ya que su cultivo, en el caso de estar estandarizado, ofrece un rendimiento productivo que puede ser insuficiente para satisfacer la enorme demanda de presas que tiene una planta de cría larvaria (Støttrup, 2000). Otros organismos usados como presas vivas han sido los cladóceros del género *Moina* (He y cols., 2001) y larvas trocóforas de moluscos bivalvos, muy comunes en los criaderos de Asia (Liao y cols., 2001).

A pesar de las ventajas presentadas, la baja rentabilidad económica derivada de la adopción de las anteriores estrategias, así como los problemas de disponibilidad y comodidad de manejo, han contribuido a que la mayoría de empresas dedicadas a la producción de larvas utilicen los llamados cultivos auxiliares como primera fuente de alimento. A este grupo pertenecen algunas especies de fitoplancton, los rotíferos del género *Brachionus* y los estadios naupliares del crustáceo *Artemia*. Esta alternativa permite reducir el número de eslabones tróficos, simplificándose la enorme complejidad de la cadena trófica natural de las larvas de peces marinos presentada anteriormente.

Las microalgas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica. A pesar de que la mayoría de especies cultivadas de peces marinos son zooplanctívoras, el uso de microalgas es una práctica común en la cría de numerosas especies de peces marinos durante los estadios de desarrollo más tempranos (Reitan y cols., 1997). Algunas de las ventajas que aporta la adición de microalgas en los tanques de

cría larvaria se relacionan con el aporte nutritivo que proporcionan al ser ingeridas por las larvas (Reitan y cols., 1994) o al enriquecer los rotíferos con los que suele combinarse su administración (Howell, 1979; Scott y Middleton, 1979; Lubzens, 1987). Además, se cree que la adición de microalgas mejora las condiciones lumínicas del medio de cultivo y el comportamiento predador de las larvas (Naas y cols., 1992).

El siguiente eslabón de la cadena trófica está representado por los rotíferos mixohalinos del género *Brachionus*. El término “rotífero”, cuyo uso en larvicultura se extiende a todo el mundo, incluye tres tipos que difieren entre sí en el tamaño: tipo-L, tipo-S y tipo-SS (del inglés *large*, *small* y *super small*, respectivamente). De esta forma, el rotífero referido como tipo-L corresponde a la especie *Brachionus plicatilis*, con longitudes de la lóriga³ comprendidas entre 130 y 340 μm . La especie *Brachionus rotundiformis* corresponde al llamado tipo-S, con tamaños ligeramente inferiores a *B. plicatilis* (100-210 μm). Los rotíferos pertenecientes al tipo-SS tienen tamaños aun menores (90-150 μm) que sus congéneres y han sido hallados en cuerpos de aguas tropicales y subtropicales. Diversos estudios sitúan a estos organismos como una variedad geográfica de *B. rotundiformis* (Hagiwara y cols., 1995; Kotani y cols., 1997). El tamaño de los diferentes tipos de rotíferos y la sencillez de su cultivo masivo han convertido a este organismo en el alimento vivo más utilizado para las larvas que acaban de abrir el esófago, especialmente en aquellas especies cuyas fases larvarias con tamaños particularmente pequeños. El cultivo masivo de rotíferos, estandarizado desde hace décadas, se basa en la enorme tasa reproductiva desarrollada por estos organismos en la fase partenogénica de su ciclo vital, favorecida por un abundante aporte de alimento, habitualmente formado por microalgas, levaduras de panificación o productos comerciales basados en microalgas secas pulverizadas ricas en nutrientes esenciales. Con estos últimos, se consiguen cultivos con densidades que superan, en ocasiones, los 1000 individuos ml^{-1} (Moretti y cols., 1999).

La administración de rotíferos se prolonga durante varios días en función de la especie cultivada y de la temperatura a la que se realiza el cultivo, hasta que las larvas crecen y son capaces de ingerir presas de mayor tamaño. Entonces entran en juego los estadios naupliares de *Artemia*, crustáceo branquiópodo que tiene su hábitat natural en cuerpos de agua de salinidad elevada como los lagos salados y las salinas.

³ Estructura adyacente al pie que alberga los órganos vitales de los rotíferos.

Uno de los aspectos más destacados de la biología de *Artemia* es su reproducción, la cual puede ser anfígónica o zigogenética, con presencia de machos y de hembras, o partenogenética, donde la presencia de machos es testimonial (Amat, 1985). A diferencia de otros branquiópodos, *Artemia* no experimenta una sucesión cíclica de ambos modos de reproducción, por lo que ambos tipos se excluyen mutuamente. De esta forma, todas las poblaciones con reproducción partenogenética se agrupan taxonómicamente bajo una única especie (*Artemia parthenogenetica*), mientras que las poblaciones con reproducción zigogenética están representadas por seis especies (*A. franciscana*, *A. persimilis*, *A. salina*, *A. sinica*, *A. tibetiana* y *A. urmiana*). En ambos tipos de reproducción, las hembras pueden dar lugar a dos tipos de huevos: a) los que completan el desarrollo embrionario en el interior del útero, por lo que resultan en un nauplio completamente formado (proceso ovovivíparo); b) los que detienen su desarrollo en el estado de blástula avanzada o gástrula incipiente, cubriéndose de un corion resistente procedente de las glándulas de la cáscara y quedando en forma de quiste o huevo cístico, de duración o de "invierno". Los quistes son puestos por las hembras adultas de este crustáceo en condiciones críticas para la supervivencia de la población, tanto tróficas como físico-químicas de los lagos salados y explotaciones salineras donde habitan.

Los embriones de *Artemia* presentes en los quistes se hallan en estado de diapausa con el metabolismo detenido. En este estado de diapausa, los quistes no eclosionan y deben pasar a un estado de quiescencia en el que los embriones quedan activados para su ulterior eclosión. Entre los mecanismos responsables de esta activación del embrión se halla la deshidratación del quiste. En el hábitat natural este proceso de deshidratación tiene lugar por el choque osmótico que el quiste sufre al hallarse en fuertes salmueras, además de la acción desecadora del viento y el sol. Los quistes deshidratados y, por tanto, activados, pueden dar lugar a la eclosión de un nauplio completamente formado si entran en contacto con agua de baja salinidad, en adecuados niveles de aireación e iluminación. De esto puede deducirse la fácil disponibilidad de nauplios de *Artemia* recién eclosionados a partir de un material (los quistes) fácilmente manipulable y que puede ser almacenado durante periodos de tiempo de varios años sin una merma apreciable en la viabilidad del embrión. Son precisamente los quistes de *Artemia* el recurso que acapara una atención preferente en el mundo de la acuicultura. En los medios hipersalinos, salinas y lagos salados, los quistes de *Artemia* se acumulan formando extensas manchas flotantes en la superficie del agua o en las orillas gracias a la acción del viento y de las corrientes. Una vez recolectados, los quistes se procesan,

eliminando impurezas y cáscaras vacías, hasta obtener un producto limpio que es deshidratado y empaquetado para su comercialización, y posterior utilización en las plantas de cría larvaria.

La explotación de quistes de *Artemia* suscita un enorme interés económico, no sólo a nivel local en las empresas dedicadas a su recolección y/o procesado, sino que además de ellos depende la producción mundial acuícola de larvas de peces (especialmente de las especies marinas) y, sobre todo, de crustáceos. Esta dependencia ha provocado la proliferación de empresas dedicadas a la explotación de estos quistes en lagos salados de gran extensión donde la actividad resulta rentable (Tabla 1.1). En este sentido es importante destacar la existencia de cuerpos de agua con una producción de quistes de miles de toneladas métricas de producto fresco. Entre ellos merece una mención destacada el *Great Salt Lake* (GSL) de Utah (EE.UU.), lago salado con una extensión de 2900 km² en su brazo Sur y 1750 km² en el brazo Norte. La producción media anual de quistes en este lago es de aproximadamente 4000 Tm de producto bruto húmedo, de las cuales se obtienen unas 1200 Tm de quistes procesados (Tabla 1.1).

A partir del desarrollo mundial de la acuicultura marina a finales de los años sesenta, la demanda de quistes de *Artemia* ha ido aumentando progresivamente desde unas pocas toneladas métricas (Tm) hasta las 2000 Tm anuales requeridas en la actualidad. Esto representa el 40% del total de alimento necesario para la cría larvaria a nivel mundial (Sorgeloos y cols., 2001). Durante el último cuarto de siglo, el GSL (Utah, EE.UU.) ha sido la principal fuente de quistes destinados al mercado acuícola mundial. Sin embargo, la producción de quistes de *Artemia* en GSL ha sufrido crisis periódicas originadas por la alteración de las condiciones ambientales óptimas en las que *Artemia* se reproduce principalmente a través de la vía ovípara. Concretamente, en los últimos años del Siglo XX las enormes precipitaciones derivadas del fenómeno de El Niño provocaron fuertes descensos de la salinidad hasta situarla en niveles inferiores al rango óptimo para la producción de quistes (entre 100 y 150‰). Este proceso tuvo lugar entre 1982 y 1984, y de nuevo al final de la década de los 90 (Tabla 1.1), registrándose la cosecha más baja de la Historia entre 1999-2000, la cual no satisfacía ni el 20% de la demanda mundial de quistes. Estas crisis en la producción de quistes en GSL han impulsado la búsqueda de fuentes alternativas de los mismos para cubrir las demandas de la acuicultura. De esta forma, en la década de los años 80 se adoptaron políticas de inoculación de quistes de *A. franciscana* en salinas de Asia (Jumalon y cols., 1987; Tarnchalanukit y Wongrat, 1987) y en América (Camara y Rocha, 1987; Naegel, 1987). En la actualidad, la búsqueda de alternativas a GSL continúa y algunos estudios científicos recientes valoran la capacidad productora de quistes

Tabla 1.1. Capturas de quistes de *Artemia* (Tm de producto bruto húmedo) de *Great Salt Lake* (Utah, EE.UU.) desde el año 1988 hasta 1999 (Lavens y Sorgeloos, 2000).

<u>Temporada</u>	<u>Nº Compañías</u>	<u>Licencias</u>	<u>Capturas</u>
1988/1989	7	-	2170
1989/1990	12	-	5020
1990/1991	190	24	4860
1991/1992	11	26	5870
1992/1993	12	20	4900
1993/1994	12	18	4030
1994/1995	14	29	2680
1995/1996	21	63	6640
1996/1997	32	79 ^a	6600
1997/1998	32	79	2020
1998/1999	39	79	<2000

^aMoratoria de la *Utah Division of Wildlife Resources*.

de lagos salados en América del Sur (Cohen y cols., 1999) y en Asia (van Stappen, 2005).

El empleo de nauplios de *Artemia* ofrece, respecto a otras presas vivas, la ventaja de una rápida y sencilla disponibilidad. En el caso de los rotíferos, su uso implica el mantenimiento de un cultivo en sentido estricto, el cual, además de necesitar infraestructuras propias, puede requerir la utilización de instalaciones para la producción masiva de fitoplancton con el que alimentar los rotíferos. En cambio, los nauplios de *Artemia* se obtienen de forma muy sencilla a partir de los quistes. Basta con una incubación de los mismos durante un periodo aproximado de 24 h en agua de salinidad cercana a la marina, en un sistema provisto con agitación-oxigenación e iluminación, destinado a la activación del embrión. Así se obtienen nauplios vivos recién eclosionados a razón de unos 200.000 individuos por gramo de quistes deshidratados (van Stappen, 1996).

Después de la eclosión, el nauplio tiene la capacidad de nadar libremente y se alimenta de las reservas vitelínicas que posee en el órgano nupal y con las que está dotado al nacer (estadio Instar I). Su talla varía entre 400 y 600 μm en función de la especie y de la población de procedencia. Tras la primera muda se pasa a los estadios

metanaupliares (Schrehardt, 1987), ya con alimentación exógena, tras los cuales se accede a las fases juvenil y adulta. Además de la fácil disponibilidad ya adelantada, los nauplios de *Artemia* cumplen gran parte de las características exigidas en una presa viva, como son una buena digestibilidad, delgada cutícula, movimiento constante, ausencia de respuesta de escape, color llamativo y buena palatabilidad. Esta versatilidad es la que sitúa al nauplio de *Artemia* como la presa viva más utilizada en la acuicultura.

1.2. Carencias nutricionales de las presas vivas

La utilización de presas vivas en larvicultura marina no está exenta de problemática. A mediados de los años sesenta y principios de los setenta, comenzaron a aparecer en la bibliografía especializada numerosos trabajos relacionados con mortalidades masivas de larvas de diferentes especies de peces y crustáceos, cuando se empleaban nauplios de *Artemia* de determinadas razas o variedades como único alimento (Shelbourne, 1968; Reeve, 1969; Bookhout y Costlow, 1970; Wickins, 1972; Matsuoka, 1975; Provenzano y Goy, 1976). Esta problemática no se centraba exclusivamente en una única población de *Artemia* sino en varias de diverso origen geográfico (Watanabe y cols., 1978; Watanabe, 1979; Fujita y cols., 1980). Estos hechos, unidos a la enorme demanda de quistes necesarios para el desarrollo de la acuicultura, impulsaron el interés por conocer el valor nutritivo de los nauplios destinados a alimentar formas larvianas en cultivo.

Paralelamente, algunos estudios comenzaron a resaltar la importancia de la utilización de ciertas microalgas en el cultivo de algunos crustáceos. Concretamente, la administración de microalgas en los tanques de cría larvaria de *Palaemon serratus*, o su utilización en incubaciones con nauplios de *Artemia* con los que posteriormente se alimentarían las larvas, logró reducir la ocurrencia de malformaciones y de mudas imperfectas en algunos cultivos de crustáceos como *Palaemon serratus* (Wickins, 1972). En este mismo sentido, la incubación de rotíferos con el alga *Chlorella*, como sustituto de la levadura de panificación, lograba mejorar la supervivencia y otros síntomas de malnutrición de los cultivos larvianos de *Pagrus major* (Kitajima y Koda, 1976; Kitajima y cols., 1979). Todo ello acabó relacionándose con la presencia de determinados ácidos grasos en las algas, los cuales estaban ausentes en las levaduras y en las presas vivas (Fujita y cols., 1980; Schauer y cols., 1980; Léger y cols., 1985a, b). En el caso de *Artemia*, Léger y cols. (1986) pusieron de manifiesto la escasez de ciertos ácidos grasos esenciales (EFAs) para animales marinos en la composición lipídica

de los nauplios de *Artemia*, hallándose diferencias de composición entre las diferentes especies estudiadas y entre distintas muestras o recolecciones de una misma población en diferentes épocas del año (Schauer y cols., 1980). Todo esto desembocó en la aceptación de la clasificación propuesta por Watanabe y cols. (1978) en la que se distinguen dos grandes tipos de *Artemia* según el contenido en ciertos ácidos grasos: el tipo dulceacuícola ("*fresh water Artemia*"), con altos niveles de ácido linolénico (LNA o 18:3n-3) y ausencia o escasa presencia de ácido eicosapentaenoico (EPA o 20:5n-3); y el tipo marino ("*marine Artemia*") con menores contenidos del primero y presencia apreciable del segundo.

A partir de estas evidencias, los estudios sobre nutrición larvaria en especies marinas han focalizado su atención en los ácidos grasos esenciales (EFAs) (Koven y cols., 1990, 1992; Sargent y cols., 1997; Izquierdo y cols., 2000). En especies de peces de agua dulce, los ácidos grasos que ocupan la categoría de esenciales son el ácido linolénico (LNA o 18:3n-3) y el ácido linoleico (LA o 18:2n-6), a partir de los cuales pueden sintetizarse otros ácidos grasos mediante elongaciones de la cadena hidrocarbonada (catalizada por elongasas) e insaturaciones (catalizadas por desaturasas) (Figura 1.2). Sin embargo, la capacidad enzimática necesaria para esta síntesis es reducida o nula en peces marinos y las dietas de éstos deben incluir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (HUFAs) necesarios para realizar sus funciones vitales (Sargent y cols., 1997). Esta situación parece ser el resultado lógico de la adaptación de las especies de peces marinos a presas con elevados contenidos de ácidos grasos poliinsaturados en su dieta (Sargent y cols., 2002). De esta forma, los EFAs de peces marinos son el ácido eicosapentaenoico (EPA o 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA o 22:6n-3), ambos de la serie (n-3), y el ácido araquidónico (ARA o 20:4n-6) perteneciente a la serie (n-6). En cuanto al nivel de estos EFAs en nauplios de *Artemia*, el EPA se presenta en ciertos niveles sólo en quistes de *Artemia* de tipo marino y no se halla en los de tipo dulceacuícola, y el DHA nunca aparece o lo hace en cantidades traza. Por su parte, los niveles de ARA son escasos en nauplios de *Artemia* y pueden determinar el éxito de la cría larvaria de especies con requerimientos mayores (Estévez y cols., 1999; Bell y cols., 2003).

Con el fin de corregir estas carencias nutricionales de las presas vivas se han venido desarrollando diversos procedimientos. Éstos coinciden en el aprovechamiento de la condición de filtradores pasivos de rotíferos y *Artemia*, de forma que estos organismos son incubados en medios ricos en sustancias nutritivas cuyo tamaño hace posible su incorporación en su tracto digestivo (p. ej.,

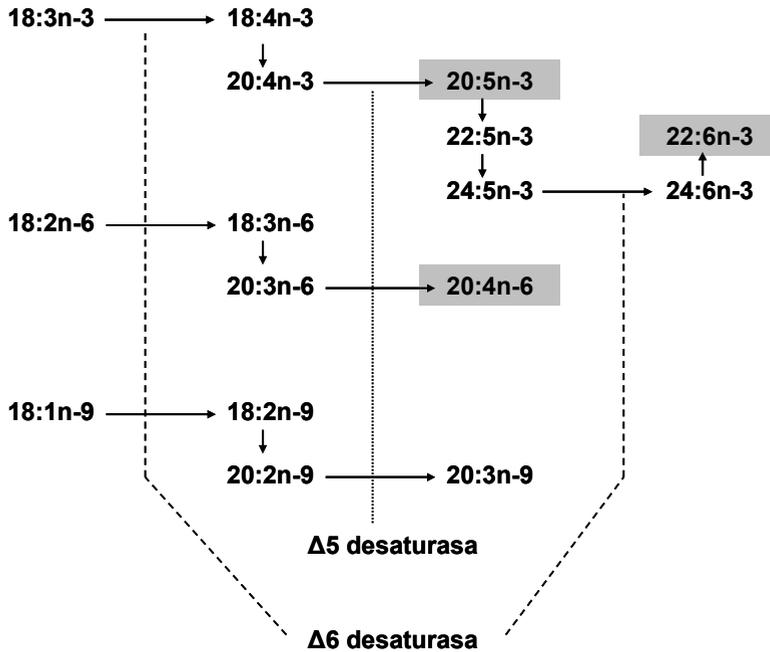


Figura 1.2. Rutas principales de síntesis de ácidos grasos de 20 y 22 carbonos desde sus precursores C18 en las series n-3, n-6 y n-9. Las flechas hacia abajo representan elongaciones de la cadena hidrocarbonada. Las flechas horizontales representan reacciones de desaturación. La flecha vertical hacia arriba representa el acortamiento de la cadena que tiene lugar en los peroxisomas. El enzima $\Delta 6$ desaturasa actúa en dos pasos, mientras que $\Delta 5$ desaturasa lo hace en uno solo.

microemulsiones, micropartículas, microorganismos, etc.). Este proceso se conoce por bioencapsulación ya que implica la incorporación de sustancias en el interior de organismos vivos. En la práctica, la mayoría de los productos enriquecedores utilizados en las plantas dedicadas a la cría larvaria son complejos autoemulsionantes compuestos, principalmente, por aceites de pescado y, por tanto, ricos en los EFAs con los que se pretende enriquecer los nauplios. A estos aceites se les suele añadir ésteres etílicos de ácido graso (FAEEs), derivados sintéticos destinados a mejorar el perfil de ácidos grasos del aceite de pescado original. Además, los productos enriquecedores

basados en emulsiones suelen contener otros tipos de compuestos liposolubles con efecto antioxidante y nutricional entre los que destacan las vitaminas A (vitA) y E (vitE), y algunos carotenos. Como alternativa al uso de productos basados en emulsiones de aceites de pescado, existe otro tipo de productos que utilizan organismos marinos unicelulares con contenidos muy altos en DHA. Entre éstos, destaca el dinoflagelado heterótrofo *Cryptocodinium cohnii*, que, además de su empleo para producir aceite rico en DHA destinado a la alimentación infantil humana, también ha sido utilizado en el enriquecimiento de nauplios de *Artemia* (Kashiwakura y cols., 1994). Otro tipo de producto muy utilizado en el enriquecimiento de presas vivas consiste en copos secos pulverizados del hongo *Schizochytrium* sp., con alto contenido en EFAs, aminoácidos y vitaminas (Barclay y Zeller, 1996). Estos organismos son sometidos a condiciones que impulsan procesos fisiológicos conducentes a una síntesis elevada de triglicéridos con alto contenido en DHA.

Es preciso observar que la incubación de los nauplios recién eclosionados en el medio de enriquecimiento, que habitualmente se prolonga por un periodo de 21 a 24 h, hace que éstos lleguen a aumentar considerablemente su tamaño al finalizar el proceso (van Stappen, 1996). Esta circunstancia limita la utilización de nauplios de *Artemia* enriquecidos a la alimentación de larvas con un tamaño de boca suficientemente grande. En realidad, el régimen alimenticio (Figura 1.3) seguido en la cría larvaria pasa por la utilización de nauplios de *Artemia* de tipo marino (ricos en EPA) recién eclosionados y sin enriquecer después de la administración de rotíferos. A continuación, y como paso previo al uso a dietas inertes (destete), se administran nauplios enriquecidos cuyo tamaño ya no implicaría ningún impedimento para las larvas. Pero, además del uso de nauplios recién eclosionados y nauplios enriquecidos, los estadios juveniles y adultos de *Artemia* también son utilizados en determinadas fases de algunos cultivos de peces (Kim y cols., 1996; Cook y cols., 2003) y crustáceos (Tlustý y cols., 2005). Además, los quistes descapsulados⁴, aunque de uso menos frecuente que los nauplios, han sido utilizados en la cría larvaria de especies de peces de agua dulce (*Clarias gariepinus* y *Cyprinus carpio*) y crustáceos marinos (van Stappen, 1996). Su utilización comporta ventajas de tipo práctico como el de poseer un tamaño menor que los nauplios y una flotabilidad adecuada, además de ventajas nutricionales relacionadas con el contenido intacto de las reservas embrionarias y el

⁴ La descapsulación consiste en la eliminación de la cubierta lipoproteica externa del quiste (corion) mediante su tratamiento con una solución de hipoclorito sódico.

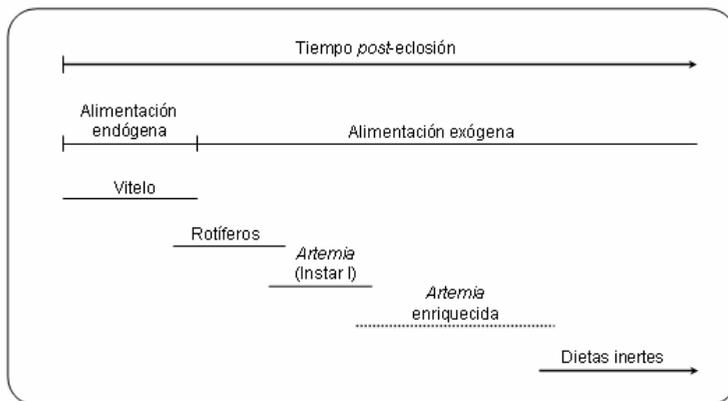


Figura 1.3. Régimen alimenticio general seguido en la cría de larvas de peces marinos.

escaso lavado de nutrientes al medio debido a la protección que ofrece la cutícula embrionaria.

Además del importante papel de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la dieta, existen otros nutrientes cuyo contenido en la dieta puede ser limitante respecto a los requerimientos de las larvas. En este sentido, el contenido de lípidos polares (Coutteau y cols., 1997; Izquierdo y cols., 2001), vitaminas (Sandnes, 1991; Merchie y cols., 1997; Rønnestad y cols., 1998a; Furuita y cols., 2003) y aminoácidos (Cowey, 1994, 1995; Rønnestad y cols., 2003) han sido motivo de estudio como compuestos de gran relevancia para asegurar el crecimiento normal de las larvas en cultivo y para garantizar el éxito del cultivo. El papel de cada uno de estos nutrientes será detallado en los próximos capítulos de esta memoria.

A pesar del uso generalizado de las presas vivas en larvicultura marina, su empleo constituye un gasto económico importante derivado de la necesidad de infraestructura, mano de obra, consumo energético, etc. (Person Le Ruyet y cols., 1993; Koven y cols., 2001). Por estos motivos, en los últimos años se han venido realizando numerosos estudios dirigidos a reducir la dependencia hacia las presas vivas. De esta forma, algunas prácticas han demostrado que la utilización de presas vivas puede minimizarse a través de su administración simultánea con dietas inertes (co-alimentación) (Salhi y cols., 1994; Kolkovski y cols., 1997b; Dhert y cols., 1999; Lazo y cols., 2000; Chang y cols., 2006) o bien

adelantando el destete a dietas inertes (Cahu y Zambonino Infante, 1994) e, incluso, llega a ser obviada totalmente con resultados de supervivencia aceptables (Fernández-Díaz y Yúfera, 1997; Cahu y cols., 1998a; Takeuchi y cols., 1998a; Gisbert y cols., 2005). Sin embargo, la aceptación de las dietas formuladas por parte de las larvas sigue siendo escasa debido a varias razones, entre las que destacan la baja capacidad digestiva de las larvas (Hamlin y cols., 2000; Kolkovski, 2001), el desconocimiento de los requerimientos nutricionales de las mismas (Sargent y cols., 1997) y el comportamiento hidrodinámico anómalo de las partículas en el medio de cultivo (Backhurst y Harker, 1988). De esta forma, la utilización de presas vivas en larvicultura marina sigue siendo una pieza fundamental para asegurar la producción rentable de alevines de la mayoría de especies cultivadas de peces marinos.

1.3. Uso de liposomas como sistema de suministro de nutrientes

Los liposomas son vesículas sencillas en las que una membrana formada por moléculas lipídicas, mayoritariamente fosfolípidos, encierra un compartimento acuoso interno (Figura 1.4). Los liposomas se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos que forman la membrana se dispersan en un medio acuoso, dando lugar a una suspensión de vesículas con diámetros que pueden oscilar entre decenas de nanómetros y algunas micras. Los fosfolípidos no son moléculas solubles en el sentido estricto del término y, en medios acuosos, se alinean unas junto a otras formando bicapas que minimizan las interacciones desfavorables entre las cadenas hidrocarbonadas apolares y el medio acuoso circundante. Estas interacciones son eliminadas totalmente cuando las bicapas se encierran sobre sí mismas formando vesículas cerradas. Además de los fosfolípidos, los esteroides, y más concretamente el colesterol, constituyen otro grupo de componentes estructurales característicos en la formulación de liposomas. Aunque las moléculas de colesterol son incapaces de formar bicapas por sí mismas, se incluyen habitualmente en la preparación de liposomas con el fin de aportar estabilidad a la estructura de la vesícula. Al ser una molécula anfipática, el colesterol se inserta en el seno de la membrana con su grupo hidroxilo orientado hacia la fase acuosa, mientras que la cadena alifática se alinea paralelamente a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos (Figura 1.5). Junto a los fosfolípidos y al colesterol, la membrana de los liposomas permite la inclusión de otros compuestos anfipáticos y apolares sin necesidad de grandes disrupciones en la estructura básica del liposoma. Esto es posible gracias a que el interior de la membrana es un medio alifático fluido, compuesto por moléculas asociadas mediante interacciones de carácter no covalente y, por tanto, débiles (New, 1990;

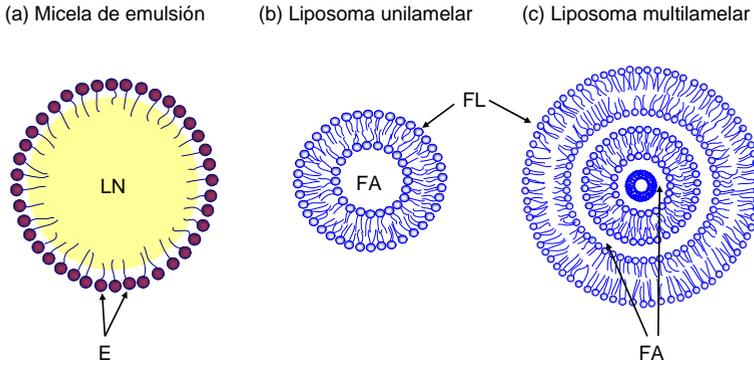


Figura 1.4. Esquema de la estructura de una micela de emulsión (a), un liposoma unilamelar (b) y multilamelar (c).
LN: lípidos neutros; E: emulgente; FL: fosfolípidos, FA: fase acuosa interna.

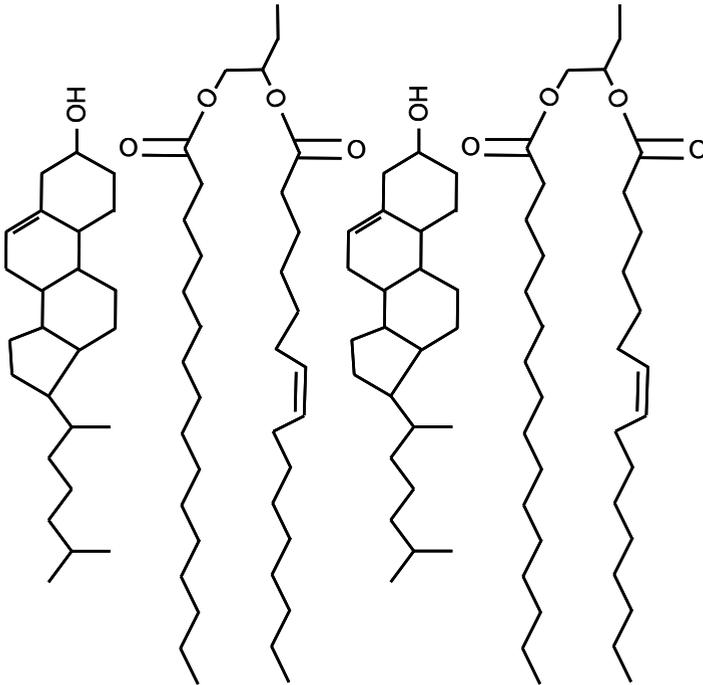


Figura 1.5. Posición ocupada por el colesterol en una membrana fosfolipídica. Tomado de New (1990).

p. 22). Entre los compuestos que pueden incluirse en la formulación de liposomas, destacamos las vitaminas liposolubles (A y E) debido a sus implicaciones en la nutrición larvaria de peces marinos. Además, la estructura cerrada de las membranas liposomales deja un espacio acuoso en el que pueden disolverse moléculas de naturaleza hidrosoluble, como son la vitamina C y los aminoácidos libres. La importancia de todos estos nutrientes (fosfolípidos, ácidos grasos esenciales, vitaminas A y C, y aminoácidos) en larvicultura de peces marinos se tratará con mayor profundidad en los capítulos siguientes.

Además de los componentes químicos de la membrana, los cuales determinan propiedades tales como su fluidez y permeabilidad, los liposomas se caracterizan por su tamaño y por su forma. El tamaño puede variar desde el mínimo teórico de unas pocas decenas de nanómetros, determinado por la máxima curvatura que permitirían las moléculas de fosfolípidos, hasta tamaños superiores a 1 μm . Por otra parte, la organización de las bicapas de un liposoma es una propiedad característica denominada lamelaridad, por la que se distinguen vesículas con una única bicapa (liposomas unilamelares) de vesículas con muchas bicapas (liposomas multilamelares) (Figura 1.4). La lamelaridad y el tamaño de los liposomas representan el criterio más habitual para la caracterización de los liposomas. La terminología empleada a lo largo de la presente memoria se basa en la siguiente clasificación:

- 1) Vesículas multilamelares o MLVs (*“multilamellar vesicles”*). Son vesículas con tamaños heterogéneos entre 100 nm y más de 1 μm , cada una de las cuales está formada por varias bicapas, normalmente concéntricas entre sí.
- 2) Vesículas unilamelares pequeñas o SUVs (*“small unilamellar vesicles”*). Son liposomas de una sola bicapa, cuyo tamaño se encuentra cercano al límite mínimo teórico. Este mínimo varía según la fuerza iónica del medio acuoso y de los componentes de la membrana. Por ejemplo, los SUVs compuestos de lecitina pura de huevo tienen diámetros sobre 15 nm, mientras que los compuestos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) estarían alrededor de 25 nm. Las suspensiones de SUVs están compuestas por vesículas con una distribución de tamaños muy homogénea.
- 3) Vesículas unilamelares grandes o LUVs (*“large unilamellar vesicles”*). Este término abarca aquellas vesículas formadas por una sola bicapa de diámetro superior al límite teórico de los SUVs. Las preparaciones de LUVs usadas en este estudio tenían un diámetro aproximado entre 150 y 200 nm. Como en el caso de las SUVs, las suspensiones de LUVs tienen tamaños muy homogéneos.

A partir de su descubrimiento por Bangham y cols. (1965), el interés por los liposomas no ha cesado. Así, industrias tan importantes como la farmacéutica, la cosmética y la alimentaria utilizan estas vesículas para mejorar las propiedades terapéuticas y cosméticas de las moléculas encapsuladas en ellas, y también para mejorar la sensibilidad y rapidez de las reacciones bioquímicas. De esta forma, aunque la inclusión de estos fármacos en liposomas no siempre es necesaria, su encapsulación en estas vesículas los hace más atractivos debido a que su estructura análoga a las membranas celulares ofrece una gran biocompatibilidad y biodisponibilidad. Además de su uso en estos campos, los liposomas también han sido utilizados en varios trabajos de investigación sobre nutrición de larvas marinas en acuicultura.

Como se ha dicho anteriormente, las características estructurales de los liposomas permiten su formulación con nutrientes liposolubles en el ambiente lipofílico que dejan las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, y compuestos nutritivos hidrosolubles encapsulados en la fase acuosa. En este sentido, los estudios llevados a cabo por Hontoria y cols. (1994) y Ozkizilcik y Chu (1994) demostraron la capacidad de los liposomas para vehicular ambos tipos de sustancias a larvas en cultivo, a través de su bioencapsulación en nauplios de *Artemia*. Además, McEvoy y cols. (1996) demostraron que la utilización de liposomas como enriquecedores de nauplios de *Artemia* permitía aumentar la fracción de lípidos polares (LPs) de los nauplios enriquecidos con ellos. Más recientemente, Barr y cols. (2005) han obtenido incrementos de la fracción de LPs en rotíferos y nauplios de *Artemia* sometidos a incubaciones con liposomas. En cuanto a nutrientes hidrosolubles, Tonheim y cols. (2000) realizaron un estudio en el que se emplearon liposomas cargados con metionina para enriquecer nauplios de *Artemia*. Además del uso de liposomas en el suministro de nutrientes a través de su bioencapsulación en presas vivas, Langdon (2003) considera que estas partículas tienen unas propiedades adecuadas para ser directamente utilizadas como alimento de larvas de peces. En este sentido, los trabajos de Fox y cols. (1990) y Koven y cols. (1999) demostraron la ingestión activa de liposomas por larvas de peces marinos cuando éstas eran incubadas en medios con presencia de liposomas.

De lo expuesto anteriormente se deduce que los liposomas constituyen una herramienta de gran versatilidad para la administración de nutrientes a larvas de peces marinos. Con esta premisa y en el marco de los proyectos de investigación “Reevaluación de las especies auxiliares empleadas en acuicultura marina: estudio de los factores determinantes del valor nutritivo de los nauplios de *Artemia*, empleo de nuevas técnicas de enriquecimiento y

nuevas especies candidatas” (Ref. MAR98-0871-C02-01) y “Desarrollo de técnicas alternativas de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos mediante liposomas y su bioencapsulación en presas vivas” (Ref. AGL2000-0135-P4-03), financiados por el Programa Nacional de Ciencia y Tecnología Marinas (CYTMAR) y el Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias, respectivamente, se realizaron una serie de experimentos que forman parte de la presente memoria de Tesis Doctoral, y cuyos **objetivos fundamentales** son:

1. **Preparación de formulaciones liposomales con nutrientes esenciales para larvas de peces marinos.** Los liposomas, preparados mediante tres técnicas diferentes, se formularon con cuatro fuentes de fosfolípidos combinados, en ocasiones, con otros compuestos tales como colesterol, vitaminas (A, C y E) y aminoácidos (metionina).
2. **Evaluación del comportamiento de los liposomas en condiciones de enriquecimiento de nauplios de *Artemia*.** Las propiedades escogidas para describir el comportamiento de los liposomas sometidos a condiciones de enriquecimiento fueron: su capacidad para retener sustancias disueltas en la fase acuosa, la alteración del tamaño original de las vesículas durante la incubación y el grado de oxidación química de las membranas.
3. **Estudio del proceso de enriquecimiento de nauplios de *Artemia* en nutrientes esenciales de naturaleza liposoluble e hidrosoluble.** Se llevaron a cabo enriquecimientos de nauplios de *Artemia* con diferentes formulaciones liposomales ricas en nutrientes esenciales para larvas de peces marinos (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, vitaminas y aminoácidos). Los liposomas ricos en ácidos grasos esenciales fueron objeto de un estudio más profundo encaminado a determinar el protocolo óptimo para su uso.
4. **Estimación de la calidad de las dietas basadas en nauplios enriquecidos mediante la realización de pruebas de alimentación larvaria.** Se emplearon liposomas formulados con nutrientes esenciales para enriquecer nauplios de *Artemia*, los cuales sirvieron con posterioridad como dieta en experimentos de alimentación con larvas de lubina y dorada (experimentos de bioencapsulación).
5. **Valoración de la eficacia de los liposomas como sistema para la vehiculación directa de nutrientes esenciales a**

larvas de peces marinos. Se realizaron inmersiones de larvas de lubina y dorada en suspensiones de liposomas con el fin de evaluar su eficacia para administrar nutrientes a las larvas sin su incorporación en presas vivas (experimentos de baños).

CAPÍTULO 2
MATERIAL Y MÉTODOS COMUNES

2.1. Preparación de liposomas

La elaboración de las preparaciones liposomales utilizadas en los distintos experimentos del presente estudio se llevó a cabo utilizando cuatro productos comerciales de fosfolípidos:

1. Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, pureza >99%), fosfolípido sintético compuesto por dos cadenas de ácido palmítico (16:0).
2. Fosfatidilcolina de yema de huevo de gallina (EPC, pureza >95%).
3. Fosfatidilcolina de soja (SPC, pureza >95%).
4. Extracto de fosfolípido de krill (KPL, pureza >99%), mezcla de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) con alto contenido de PUFAs de la serie n-3.

El perfil de ácidos grasos y de clases de lípidos de las cuatro fuentes de fosfolípidos utilizadas se presenta en la Tabla 2.1. Todos los fosfolípidos se obtuvieron de Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, EE.UU.). Estos fosfolípidos, componentes mayoritarios de las membranas de los liposomas, se combinaron con otras moléculas de naturaleza liposoluble como el colesterol (CHO), la vitamina E (α -tocoferol) o un derivado del retinol (palmitato de retinol), además de otros de naturaleza hidrosoluble como metionina (Met) o el ascorbato sódico (vitamina C). Todos estos compuestos se compraron a Sigma-Aldrich, S.A. (Alcobendas, España). Además de estos compuestos de carácter nutritivo, los liposomas formulados para el estudio sobre la capacidad de retención de sustancias disueltas en la fase acuosa (Capítulo 3) se prepararon incluyendo la molécula fluorescente 5(6)-carboxifluoresceína (Eastman Kodak Company, Rochester, Nueva York, EE.UU.) disuelta en la fase acuosa.

Los métodos de preparación de liposomas seguidos en el presente estudio se describen a continuación:

1. Hidratación simple. En un tubo de cristal de base redondeada, se mezclaban las disoluciones en cloroformo de los compuestos que constituirían la membrana del liposomas (fosfolípidos, colesterol y vitaminas liposolubles) (Figura 2.1). Las proporciones de éstos se indicarán en cada caso. A continuación, se procedía a la evaporación total del disolvente (cloroformo) mediante la aplicación de un flujo de gas nitrógeno seco (N_2), hasta conseguir una fina película de los

Tabla 2.1. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) y clases de lípidos (porcentaje del total de lípidos) de la emulsión lipídica usada como control y de las cuatro fuentes fosfolipídicas utilizadas en la preparación de los liposomas (fosfolípidos de krill, KPL; fosfatidilcolina de soja, SPC; fosfatidilcolina de huevo, EPC; dipalmitoilfosfatidilcolina, DPPC).

	Emulsión comercial	KPL	SPC	EPC	DPPC
<i>Ácido graso</i>					
16:0	3,3	25,5	15,1	39,0	100,0
18:0	3,0	1,0	3,0	11,8	0,0
18:1n-9	10,8	5,4	13,6	32,4	0,0
18:2n-6	6,1	1,8	60,6	9,8	0,0
18:3n-3	1,4	1,4	3,6	0,0	0,0
20:4n-6	1,6	0,7	0,0	0,0	0,0
20:5n-3	19,8	29,7	0,0	1,0	0,0
22:5n-3	4,8	0,8	0,0	0,0	0,0
22:6n-3	25,4	18,4	0,0	0,0	0,0
Saturados	8,0	28,6	18,7	51,7	100,0
Monoinsaturados	25,4	13,2	15,8	33,6	0,0
Poliinsaturados	63,0	55,8	64,5	11,2	0,0
Total n-3	53,8	52,5	3,8	0,0	0,0
Total n-6	9,7	3,2	60,7	12,1	0,0
HUFA n-3	51,4	49,3	0,2	0,0	0,0
HUFA n-6	2,8	1,4	0,1	1,5	0,0
DHA/EPA	1,3	0,6	0,0	0,0	0,0
<i>Clase de lípido</i>					
FAEE/TAG	91,1	0,0	0,0	0,0	0,0
PC	0,4	67,0	95,0	95,0	100,0
PE	0,0	9,0	0,0	0,0	0,0
Otros	8,4	24,0	5,0	5,0	0,0

HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos; DHA/EPA: relación de porcentajes de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico; FAEE/TAG: fracción combinada de ésteres etílicos de ácido graso y triglicéridos; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina.

componentes de la membrana en la base del tubo de cristal. La adición de agua de mar filtrada (0,45 μm), disoluciones de nutrientes hidrosolubles o carboxifluoresceína disueltos en agua de mar (esta última sólo en estudios de capacidad de retención de sustancias disueltas) iniciaba el proceso de hidratación de los componentes de la membrana. La hidratación se favorecía mediante la agitación de los tubos con la mezcla de compuestos de la membrana y el medio de hidratación. Durante un tiempo aproximado de 2 h los tubos eran agitados periódicamente hasta lograr una completa resuspensión de la película en la fase acuosa. Este sencillo procedimiento da como resultado la formación de una suspensión de liposomas multilamelares (MLVs) (Bangham y cols., 1965).

2. Extrusión. Una segunda metodología de preparación de liposomas consiste en hacer pasar suspensiones liposomales obtenidas por hidratación simple y, por tanto, MLVs, a través de un dispositivo que recibe el nombre comercial de Liposofast (Avestin Inc., Ottawa, Ontario, Canadá) (Figura 2.2). El sistema consta de dos jeringas de precisión tipo Hamilton sujetas a sendos difusores, los cuales quedan encarados uno frente al otro, y separados por una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm. Los difusores y la membrana quedan fijados mediante un sistema de tornillería que mantiene todas las piezas unidas. El proceso, denominado extrusión, genera una suspensión de liposomas unilamelares grandes (LUVs) que, en adelante, aparecerán con la abreviatura “LUVext” (New, 1990). La fase acuosa de la suspensión de liposomas LUVext consistió en agua de mar filtrada (0,45 μm), al igual que las suspensiones de MLVs originales (Figura 2.1).
3. Solubilización por detergente. El tercer procedimiento utilizado para preparar liposomas consistió en una metodología perteneciente al grupo de técnicas de solubilización por detergente (New, 1990). Todas las suspensiones liposomales preparadas mediante esta técnica fueron elaboradas en los laboratorios de Transtechnics, S.L. (Barcelona, España). El sistema empleado (Liposomat, Dianorm, Munich, Alemania) (Figura 2.3) consta de dos bombas peristálticas que permiten la circulación de dos disoluciones distintas: 1) una disolución de hidratación, consistente en suero fisiológico (cloruro sódico disuelto a 0,9%, p/v) y, que en ocasiones, contenía nutrientes disueltos

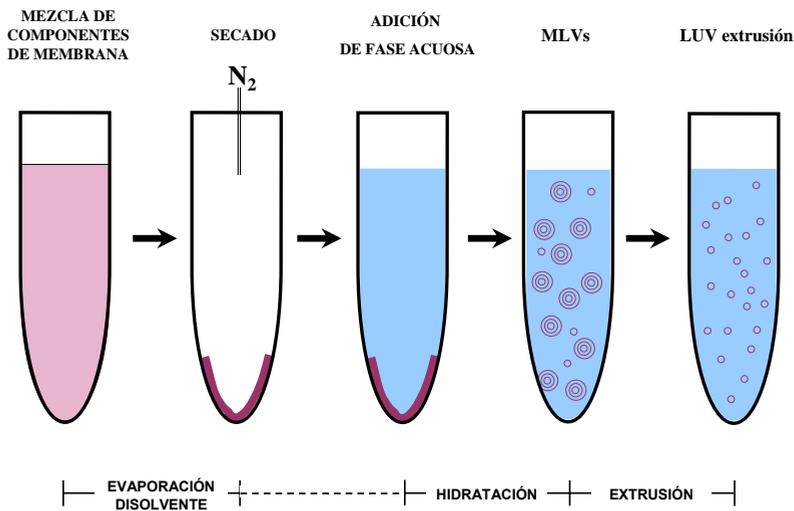


Figura 2.1. Procedimiento de preparación de liposomas multilamelares (MLVs) y liposomas unilamelares de extrusión (LUVextrusión).

(metionina o ascorbato sódico); y 2) una suspensión de micelas formadas por la acción de las moléculas del detergente colato sódico (Sigma, Alcobendas, España) sobre los componentes de membrana (fosfolípidos y vitaminas liposolubles). El bombeo de ambas disoluciones permite su entrada en los dos dializadores que forman la cámara de mezcla. A través de una membrana semipermeable que separaba ambos dializadores, tiene lugar un proceso de diálisis que retira el exceso de detergente (flechas de D1 a D2 en Figura 2.3), a la vez que la disolución de hidratación entra al D1 a través de la membrana y se mezcla con los fosfolípidos formándose bicapas cerradas. Los liposomas formados se recogen en el recipiente de las micelas, de forma que la concentración de detergente va disminuyendo en cada ciclo a través de este circuito. Este sistema origina una población de liposomas unilamelares de tamaño homogéneo (en adelante “LUVdet”). Según Lasch y cols. (2003) el tamaño de los liposomas obtenidos por estas metodologías viene determinado por el tipo de detergente utilizado, mientras que la velocidad de bombeo y, por tanto, de eliminación del

detergente durante la diálisis determina el grado de dispersión de tamaño de las vesículas formadas. Los liposomas obtenidos en nuestro laboratorio utilizando colato sódico (Sigma, Alcobendas, España) como agente detergente tenían un tamaño homogéneo entorno a 150 nm.



Figura 2.2. Extrusor Liposofast (Avestin Inc.).

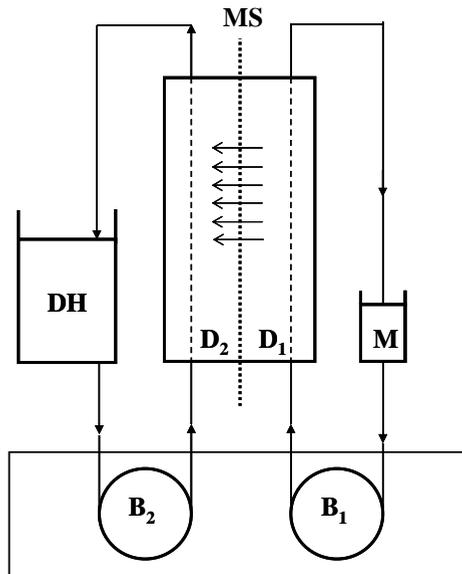


Figura 2.3. Liposomat de Dianorm (vista esquemática).

Las flechas de D_1 (dializador 1) a D_2 (dializador 2) indican el flujo de detergente. La disolución acuosa (DH) fluye en sentido contrario.

B_1 : bomba 1 para la circulación de la suspensión de micelas; B_2 : bomba 2 (disolución acuosa de hidratación); M: suspensión de micelas; MS: membrana semipermeable.

La preparación de liposomas mediante cualquiera de las tres técnicas detalladas arriba se llevó a cabo a temperatura ambiente, a excepción de las suspensiones preparadas con DPPC, en cuyo caso la mezcla de componentes de membrana se calentaba por encima de 45°C. Esta temperatura es la temperatura de transición de fase gel a fase líquido cristalina del fosfolípido (T_c) y determina la temperatura por encima de la cual la membrana pasa de una fase casi sólida o gel a una fase líquido-cristalina con una mayor libertad de movimiento de las moléculas de fosfolípidos. El valor de T_c depende principalmente de la longitud y del grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos. De esta forma, cuanto mayor sea la longitud de estas cadenas y mayor sea su grado de saturación, más alta es la T_c (New, 1990, p. 9). Es precisamente la saturación de las cadenas de ácido palmítico (16:0) lo que confiere al DPPC un estado prácticamente sólido a temperatura ambiente y, por lo tanto, su reordenamiento en forma de bicapas cerradas sólo se consigue calentando la mezcla de componentes hasta superar la T_c . Todas las suspensiones de liposomas se prepararon a una concentración lipídica (fosfolípidos más colesterol) de 100 mg ml⁻¹.

2.2. Enriquecimiento de nauplios de Artemia

2.2.1. Eclosión de quistes de Artemia

Los quistes de *Artemia* utilizados en todos los experimentos procedieron de lotes comerciales (grado EG⁵, Inve, Gante, Bélgica), con bajo contenido en HUFAs (Tabla 2.2). La obtención de nauplios se llevó a cabo tras la incubación de los quistes en agua de mar sujeta a una agitación vigorosa por medio de aireación continua. La temperatura de incubación se fijó en $28 \pm 1^\circ\text{C}$, mediante la disposición de los tubos de eclosión semisumergidos en el interior de un baño termostatzado. La densidad de quistes en esta fase de eclosión fue de 4 g l⁻¹, por debajo del máximo de 5 g l⁻¹ recomendado en la bibliografía (van Stappen, 1996). Tras periodos de incubación que variaron alrededor de 24 h se detenía la aireación y, con ello, se conseguía la separación entre las cáscaras y los nauplios recién eclosionados por simple decantación, después de la migración de estos últimos al fondo del recipiente de eclosión. Después de la retirada de la fracción superficial con las cáscaras vacías, el resto del contenido del tubo de eclosión se hacía pasar a través de una malla de plancton de luz de 100 μm . Los nauplios retenidos en la malla eran enjuagados

⁵“EG” hace referencia a las iniciales del término inglés “*Enrichment grade*”.

Tabla 2.2. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) analizados en quistes comerciales EG (Inve, Bélgica). Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3).

<i>Ácido graso</i>	<u>Quistes EG (Inve)</u>
16:0	12,0 (0,1)
18:0	3,4 (0,0)
18:2n-6	5,2 (0,0)
18:3n-3	21,8 (0,2)
20:4n-6	1,0 (0,0)
20:5n-3	3,3 (0,1)
22:5n-3	N.D.
22:6n-3	N.D.
Total identificados	92,9 (0,1)
Saturados	17,8 (0,1)
Monoinsaturados	40,5 (0,2)
Poliinsaturados	34,6 (0,3)
Total n-3	28,3 (0,3)
Total n-6	6,4 (0,0)
HUFAn-3	3,7 (0,1)
HUFAn-6	1,1 (0,0)
% Lípido (PS)	18,8 (0,8)

HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos; N.D.: no detectado ($\leq 0,05\%$).

con abundante agua corriente para eliminar los metabolitos de eclosión. A continuación, los nauplios eran transferidos a probetas de 1-2 l de capacidad, donde se llevaban a cabo dos decantaciones consecutivas (una en agua corriente y otra en agua de mar) con el fin de eliminar la mayor cantidad de quistes sin eclosionar que permanecían junto a los nauplios recién eclosionados.

Los nauplios de *Artemia* recién eclosionados se mantenían en una probeta en agua de mar con aireación vigorosa, para asegurar la dispersión homogénea de los nauplios. En este momento, se procedía a la estimación de los nauplios recién eclosionados disponibles en la probeta tomando seis alícuotas de 100 μ l con una pipeta automática. Los nauplios vivos eran contabilizados, obteniéndose la media de todas las alícuotas, tras desestimar los conteos máximo y mínimo. Con

la estimación de la densidad de nauplios, se calculaba el volumen que debía ser transferido a cada tubo de enriquecimiento para conseguir la densidad de nauplios deseada. En caso de no especificarse lo contrario, la densidad de nauplios aproximada a la que se realizaron todos los enriquecimientos fue de 300 nauplios ml⁻¹.

2.2.2. Enriquecimiento de nauplios de Artemia

El proceso de enriquecimiento consiste en la incubación de los nauplios recién eclosionados en agua de mar con el producto enriquecedor. En el trabajo que nos ocupa, los productos enriquecedores utilizados fueron preparaciones de liposomas ricos en nutrientes esenciales, los cuales se compararon con un tratamiento control consistente en la emulsión lipídica comercial Super Selco (Inve, Gante, Bélgica). La concentración de producto enriquecedor en el medio de enriquecimiento se fijó en 0,50 g lípido l⁻¹, exceptuando el caso del experimento realizado para determinar la eficacia de incorporación de ácidos grasos esenciales bajo distintas concentraciones de producto enriquecedor (Apartado 4.2.4). La concentración de enriquecedor está expresada en términos de la masa de la fracción lipídica por unidad de volumen del medio de enriquecimiento. En el caso de la emulsión, se considera como material lipídico el peso total del producto una vez corregido el peso de la fracción de humedad (30%), mientras que en los enriquecimientos con liposomas sólo se ha tenido en cuenta la masa de la fracción lipídica de la suspensión (fosfolípidos y colesterol), descartando la masa de otros nutrientes disueltos en la fase acuosa (p.ej., ascorbato o metionina) o inmersos en la membrana (p. ej., palmitato de retinol o α -tocoferol).

Los productos enriquecedores eran dispensados en los tubos de enriquecimiento con los nauplios recién eclosionados utilizando pipetas automáticas en el caso de los liposomas o pesándose previamente la cantidad deseada de producto enriquecedor, en el caso de la emulsión control, que, posteriormente, se dispersaba en un pequeño volumen de agua de mar mediante una batidora doméstica antes de añadirla a los tubos de enriquecimiento. Dichos tubos se rellenaban entonces con agua de mar hasta completar el volumen final en el que se llevaba a cabo el enriquecimiento (entre 700 y 1000 ml). La temperatura de enriquecimiento se fijó en $28 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando un baño idéntico al utilizado para la eclosión de quistes. La incubación de los nauplios en el medio con enriquecedor se prolongaba durante un tiempo nunca superior a 24 h, aunque la duración de las incubaciones cambió de unos experimentos a otros (se especificará en cada caso). Los tubos de enriquecimientos estuvieron iluminados mediante tubos

fluorescentes bajo una intensidad de 1500-2000 lux. Tras el periodo de incubación, los nauplios de *Artemia* eran recogidos en una malla de plancton de luz de 100 μm , donde se enjuagaban con agua corriente abundante para eliminar restos de enriquecedor en el agua intersticial. En los ensayos de alimentación larvaria (Capítulo 6), los nauplios enriquecidos se dejaban en agua de mar con aireación hasta ser administrados a las larvas. Durante este periodo, se estimaban los nauplios de cada tratamiento y se preparaban los enriquecimientos para el siguiente día. En cambio, los nauplios correspondientes a experimentos de enriquecimiento (Capítulos 4 y 5) eran enjuagados una segunda vez con agua destilada para eliminar restos de sal y, a continuación, se congelaban a -20°C .

2.2.3. Supervivencia de nauplios de Artemia durante el enriquecimiento

La estimación de la supervivencia de los nauplios durante el proceso de enriquecimiento fue incorporada al protocolo habitual tras la constatación de la existencia ocasional de importantes mortalidades. Esta estimación se llevaba a cabo contando los nauplios vivos presentes en seis alícuotas de 100 μl tomadas del tubo de enriquecimiento al inicio y al final del proceso, de forma muy similar al procedimiento explicado en la estimación de la densidad de nauplios recién eclosionados presentes tras la eliminación de las cáscaras vacías y quistes sin eclosionar (Apartado 2.2.1). Durante la toma de las alícuotas, el medio de enriquecimiento se mantenía homogeneizado mediante la aplicación de aireación continua. Tras desechar los conteos máximo y mínimo, se obtenía la densidad de nauplios (nauplios ml^{-1}) con el promedio de los cuatro conteos restantes, calculándose el porcentaje de supervivencia por comparación entre las densidades inicial y final. La evaporación sufrida por efecto de la temperatura y la aireación a lo largo de toda la incubación fue tenida en cuenta y compensada en los cálculos al estimar la densidad final de nauplios. Esta concentración de los nauplios por efecto de la evaporación fue especialmente importante en los enriquecimientos con liposomas, debido a la formación de espumas que evacuan una cantidad importante de agua del medio.

2.3. Cría larvaria de lubina y dorada

Los experimentos de alimentación larvaria recogidos en esta memoria se llevaron a cabo con ejemplares provenientes de huevos obtenidos de reproductores mantenidos en cautividad mediante procedimientos estándares como los descritos en el Capítulo 1. Los

huevos viables se incubaron en tanques de 500 l con agua de mar a una temperatura aproximada de 14°C y oxigenada por medio de aireadores. La eclosión de los huevos tuvo lugar tras un periodo de incubación aproximado de 48-72 h. Las larvas lecitotróficas se mantuvieron sin alimentación exógena durante un periodo que varió entre 7 y 10 d en función de la temperatura del agua de mar. Una vez transcurrido este periodo en el que las larvas consumieron gran parte de sus reservas vitelinas, se administraron rotíferos (*Brachionus plicatilis*) cultivados con microalgas ricas en PUFAs (*Scenedesmus obliquus*, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis suecica* o *Isochrysis galbana*). Durante esta fase del cultivo, el agua de mar del tanque de cultivo larvario contenía cierta cantidad de las microalgas usadas en el cultivo de rotíferos, siguiendo la metodología denominada “agua verde” (Shields, 2001). Cuando las larvas alcanzaron el tamaño suficiente para ingerir presas de mayor tamaño, los rotíferos fueron sustituidos progresivamente por nauplios de *Artemia* recién eclosionados obtenidos a partir de quistes comerciales ricos en PUFAs (grado AF⁶, Inve, Gante, Bélgica). Después de algunos días, se combinaban los nauplios AF sin enriquecer con nauplios de *Artemia* de baja calidad nutricional (grado EG, Inve, Gante, Bélgica) enriquecidos con el producto comercial Super Selco (Inve, Gante, Bélgica), hasta administrar únicamente nauplios enriquecidos. El régimen alimenticio descrito queda esquematizado en la Figura 1.3. Esta dieta se mantuvo hasta que las larvas fueron empleadas para la realización de diferentes experimentos. En todas las etapas de alimentación exógena descritas, la densidad de presas en el tanque de cría larvaria se mantuvo entre 3 y 10 presas ml⁻¹.

2.4. Análisis de nutrientes

2.4.1. Análisis de lípidos totales: método de Folch

La extracción de los lípidos totales en muestras de enriquecedores (liposomas y emulsiones), nauplios de *Artemia* y larvas de peces de los distintos experimentos se realizó mediante una modificación del método propuesto por Folch y cols. (1957). Las muestras, previamente pesadas con una precisión de centésimas de mg (Mettler Toledo, L'Hospitalet de Llobregat, España), eran homogeneizadas mecánicamente en homogeneizadores tipo Potter con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) que contenía el antioxidante BHT (Sigma, Alcobendas España) a una concentración

⁶ “AF” hace referencia a “*Artemia franciscana*” y se utiliza en quistes de alto valor nutritivo.

de 0,01% (p/v). Al volumen total de homogeneizado, se le añadía una cuarta parte de una disolución acuosa 0,88% KCl (p/v). Tras la agitación de la mezcla y posterior centrifugación durante 2 min a 600 g, se retiraba el sobrenadante, filtrando la fase orgánica infranadante a través de un filtro de papel (Whatman, Maidstone, Gran Bretaña). Se repetía el mismo proceso con el *pellet*, con el fin de maximizar la extracción de lípido de la muestras. La suma de las dos fases orgánicas filtradas en ambas extracciones se secaba bajo flujo de N₂ seco. El extracto de lípido se trasvasaba a un vial de vidrio previamente pesado en el que se realizaba el secado completo con N₂ seco. Las muestras se mantenían en un desecador hasta el día siguiente, momento en el que realizaba la nueva pesada. La masa de lípidos totales obtenidos de la muestra inicial se obtenía por gravimetría. Las muestras de extractos lipídicos se conservaron disueltas a una concentración conocida en una mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v) que contenía 0,01% (p/v) de BHT. Además, el aire presente en el vial era desplazado con N₂ seco con el fin de minimizar la oxidación de las muestras durante su almacenamiento.

2.4.2. Análisis de clases de lípidos por HPTLC

Las clases de lípidos fueron analizados por cromatografía de capa fina de alta resolución (*High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC) según el método descrito por Olsen y Henderson (1989). Los extractos lipídicos de las muestras (15 µg) se aplicaron en placas de gel de sílice G 20 de 10x10 cm (Merck, Darmstadt, Alemania; Panreac, Castellar del Vallés, España) mediante jeringas tipo Hamilton, procediendo a una elución doble. El primer solvente, compuesto por acetato de metilo, isopropanol, cloroformo, metanol y una disolución acuosa de KCl 0,25% (p/v) en la proporción 25:25:25:10:9 (v/v/v/v/v) eluía las muestras hasta una distancia de 5 cm por encima del punto de aplicación. Esto permite la separación de los LPs, mientras que los LN son arrastrados con el frente de elución. Tras el secado de la placa, una segunda elución, llevada a cabo hasta el borde superior de la placa con una mezcla de hexano:éter dietílico:ácido acético (85:15:1,5, v/v/v), separaba las clases de LN. En este momento, las placas eran colocadas en un desecador por vacío hasta lograr la evaporación total del disolvente. A continuación, las placas eran rociadas con una disolución acuosa 3% de (CH₃CO)₂Cu (p/v) conteniendo 8% de H₃PO₄ (v/v) (Fewster y cols., 1969), tras lo cual se introducían en un horno a 160°C donde se carbonizaban las distintas fracciones de la muestra. La densidad óptica de las distintas clases de lípidos se cuantificó mediante un densitómetro de imágenes

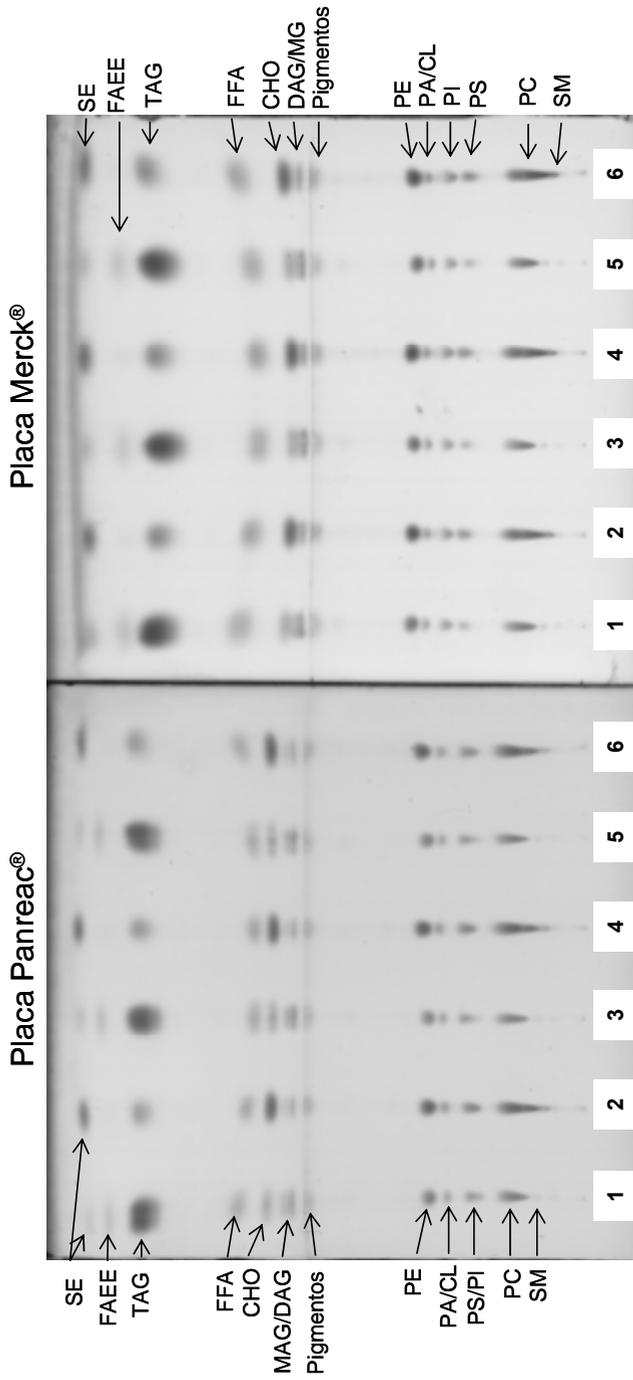


Figura 2.4. Separación de las clases lipídicas de muestras de nauplios enriquecidos con la emulsión comercial Super Selco (carreras con número impar) y larvas alimentadas con nauplios enriquecidos con la misma emulsión (carreras con número par) y aplicadas en placas de HPTLC de dos marcas comerciales diferentes. (Panreac y Merck). Nótese la diferencia en el patrón de separación visible en las fracciones de fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) que no son separadas por las placas Panreac y sí lo son por las placas Merck (ver abreviaturas en la página XI).

calibrado (Bio-Rad, Alcobendas, España), y los resultados se expresaron en términos de porcentaje de cada clase lipídica en relación al total. A modo de ejemplo, la Figura 2.4 muestra la separación de las clases lipídicas de muestras de nauplios enriquecidos con el enriquecedor comercial Super Selco (Inve, Gante, Bélgica) y larvas de lubina alimentadas con estos nauplios, utilizando placas de dos marcas comerciales diferentes (Panreac y Merck).

2.4.3. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases

2.4.3.1. Transmetilación de ácidos grasos

El análisis de ácidos grasos se realizó por cromatografía gaseosa a partir de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) obtenidos por derivatización de las muestras de extracto lipídico. Concretamente, este proceso de derivatización que se conoce por transmetilación catalizada por ácido (Christie, 1982) consiste en incubar una cantidad conocida de extracto lipídico en 1 ml de tolueno y 2 ml de una disolución 1% H₂SO₄ en metanol a 50°C durante un periodo aproximado de 16 h. Tras esta digestión, los FAMES se recuperaban mediante dos extracciones líquido:líquido consecutivas. La primera se realizaba sobre la muestra incubada, añadiendo 5 ml de agua destilada y 5 ml de una disolución de hexano:éter dietílico (1:1, v/v). Tras la agitación de la mezcla y centrifugación durante 2 min a 600 g, se recogía la fase sobrenadante, sobre la cual se llevaba a cabo la segunda extracción. Para ello, se añadía 1,5 ml de una disolución acuosa 2% (p/v) de KHCO₃, se agitaba y se centrifugaba durante 2 min a 600 g. La fase sobrenadante era trasvasada a otro tubo donde se secaba con N₂ seco. Finalmente la muestra era transferida a viales, donde se conservaba disuelta en un volumen aproximado de 140 µl de hexano:éter dietílico, como paso previo a la purificación de los FAMES.

La purificación se llevaba a cabo mediante cromatografía de capa fina en placas de gel de sílice G 60 de 20x20 cm (Merck, Darmstadt, Alemania), eluidas con un solvente compuesto por hexano:éter dietílico:ácido acético glacial (85:15:1,5, v/v/v). La elución de un estándar en la misma placa y su posterior revelado con una disolución de yodo resublimado 1% (p/v) en cloroformo, permitía estimar la posición de la fracción de los FAMES de las muestras. La fracción correspondiente a cada muestra era recuperada mediante el rascado del gel de sílice correspondiente al área donde se hallaba la fracción de ésteres metílicos. Los FAMES presentes en el gel de sílice se resuspendían en hexano:éter dietílico mediante agitación y posterior centrifugación de 2 min a 600 g. La fracción líquida se trasvasaba a

otro tubo donde se llevaba a cabo el secado completo con N₂ seco. Finalmente, los ésteres metílicos purificados se trasvasaban a viales de vidrio mediante su resuspensión con hexano que contenía BHT (0,01%, p/v). De esta forma, las muestras se hallaban en disposición de ser inyectadas en el cromatógrafo de gases.

2.5.3.2. Condiciones cromatográficas

Los ácidos grasos fueron analizados en un cromatógrafo Fisons Instruments (GC 8000 Series, Fisons Instruments, Rodano, Italia) equipado con una columna tubular abierta de 30 m x 0,25 mm (Tracer, TRWAX, espesor de capa: 0,25 µm, Teknokroma, Barcelona, España). Las muestras, inyectadas en frío por el sistema de inyección en columna, se eluyeron con helio como único componente de la fase móvil, bajo un gradiente térmico de 50 a 220°C. Los datos procedentes de un detector de llama (Fisons Instruments, Rodano, Italia) se recogían en un sistema informático equipado con la aplicación *Chrom-Card for Windows* (CE Instruments, Milán, Italia), durante los 40 min que duraba la elución de las muestras. La identificación de los diferentes ácidos grasos se realizó por comparación de los cromatogramas de las muestras con estándares conocidos como el que aparece en la Figura 2.5.

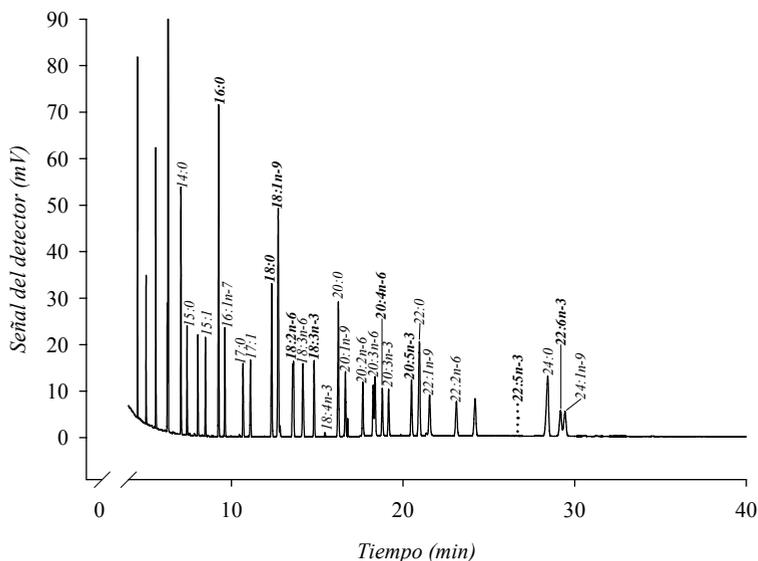


Figura 2.5. Separación de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante una técnica de GC con una columna tubular abierta y detección por ionización de llama de un patrón comercial (37 Component FAME Mix de Supelco).

2.4.4. Análisis de vitamina A por HPLC

Los análisis de vitamina A se llevaron a cabo según una modificación del método seguido por Takeuchi y cols. (1998b).

2.4.4.1. Extracción de vitamina A y derivados

En primer lugar, se realizaron las extracciones de los lípidos totales presentes en las muestras mediante el método descrito en el Apartado 2.4.1. Los extractos lipídicos, conservados en viales ámbar para evitar la degradación de la vitamina A durante su manejo, se hallaban disueltos a una concentración de 10 mg lípido ml⁻¹ en una disolución de acetato de retinol (3,0 µg ml⁻¹), empleado como estándar interno, en metanol:acetona (1:1, v/v).

2.4.4.2. Condiciones cromatográficas

Las muestras de extractos lipídicos (20 µl) se inyectaron en un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). El sistema de HPLC (Thermo Separation Products, San José, California, EE.UU.) se componía de una bomba cuaternaria de gradiente P4000 usada en condiciones isocráticas, un desgasificador y un detector UV-VIS UV6000LP configurado a una longitud de onda de 325 nm. El horno

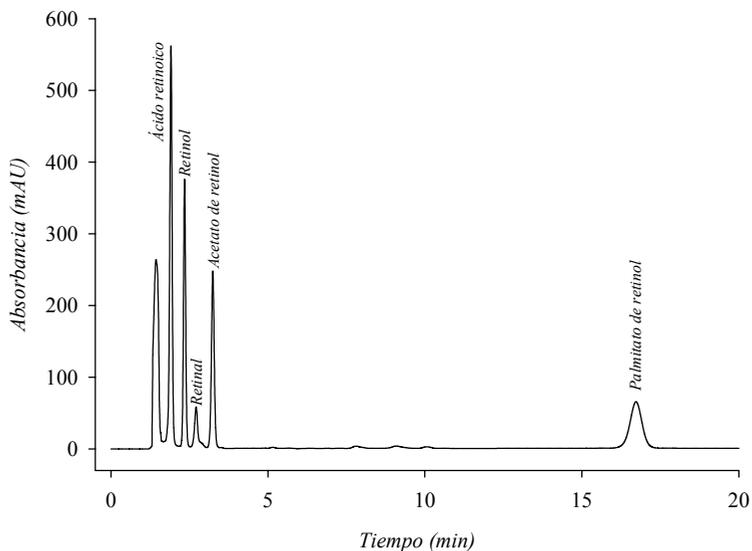


Figura 2.6. Separación de compuestos estándar implicados en el metabolismo de la vitamina A mediante una técnica de HPLC con una columna de fase reversa y detección espectrofotométrica a 325 nm.

Croco-Cil (Cluzeau, Sainte-Foy-la-Grande, Francia) mantenía la columna de fase reversa C-18 Lichrospher (Merck, Darmstadt, Alemania) a una temperatura de 30°C. La integración de los picos se llevó a cabo mediante la aplicación informática *ChromQuest Software* (Thermo Quest, San José, California, EE.UU.). La fase móvil utilizada estuvo compuesta de una mezcla de disolución 98% de metanol conteniendo 0,5% (p/v) de acetato de amonio y cloroformo (85:15, v/v). Los solventes utilizados en la composición de la fase móvil fueron de calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania). El flujo era de 1,5 ml min⁻¹ y la elución duraba 25 min. La identificación de los picos se realizó por comparación con la separación conseguida en una mezcla de patrones de gran pureza (Sigma, Alcobendas, España) como se muestra en la Figura 2.6. Cada uno de los compuestos se cuantificó a partir de la relación de sus factores de respuesta con el del estándar interno acetato de retinol.

2.4.5. Análisis de vitamina C por HPLC

El análisis de ascorbato (vitamina C) se realizó siguiendo el método descrito por Shiau y Hsu (1994).

2.4.5.1. Extracción de ácido ascórbico

La extracción de ácido ascórbico de las muestras se realizó mediante la homogeneización de éstas en una disolución fría de ácido metafosfórico (MPA) 5% (p/v) (Sigma, Alcobendas, España), utilizando un disruptor de tejidos (Ika Labor Technik, Staufen, Alemania) durante 30 s en un baño de hielo. El peso de muestra procesada fue de unos 5 o 10 mg PS ml⁻¹ de MPA 5% para nauplios o larvas, respectivamente. Tras una centrifugación de las muestras durante 5 min a 3000 g, las fracciones sobrenadantes se hicieron pasar por un filtro de jeringa de fibra de vidrio y nylon con un tamaño de poro de 0,45 µm (Whatman, Clifton, New Jersey, EE.UU.). Tras el filtrado de la muestra, se inyectaba un volumen de 20 µl en el cromatógrafo.

2.4.5.2. Condiciones cromatográficas

Se utilizó el mismo cromatógrafo descrito en el Apartado 2.4.4 equipado con una columna de fase reversa C-18 Lichrospher (Merck, Darmstadt, Alemania) idéntica a la mencionada anteriormente. La elución se llevó a cabo en condiciones isocráticas a un flujo de 0,9 ml min⁻¹, utilizando una fase móvil consistente en una disolución acuosa 0,05 M de KH₂PO₄ ajustada a pH 2,8 con ácido H₃PO₄. La temperatura de elución fue la ambiental, y la detección se realizó con un detector UV-VIS UV6000LP (Apartado 2.4.4.2)

configurado a una longitud de onda de 254 nm. La cuantificación de ascorbato se realizó por el método del estándar externo, utilizando la respuesta espectrofotométrica a 254 nm del patrón de ácido ascórbico (Sigma, Alcobendas, España) (Figura 2.7).

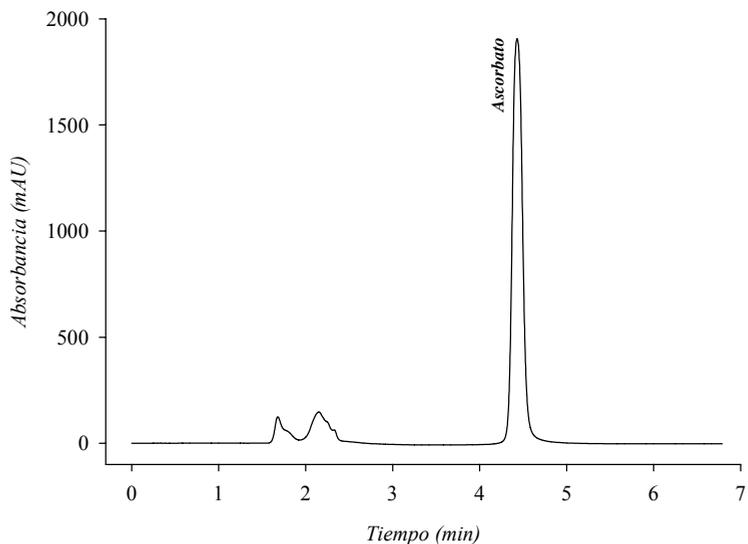


Figura 2.7. Separación de ascorbato mediante una técnica de HPLC con una columna de fase reversa y detección espectrofotométrica a 254 nm.

2.4.6. Análisis de aminoácidos por HPLC

Los análisis de aminoácidos libres se realizaron mediante una modificación del método original de Koop y cols. (1982), basado en una derivatización pre-columna con fenilisotiocianato (*phenylisothiocyanate*, PITC).

2.4.6.1. Extracción de aminoácidos libres

La extracción de los aminoácidos libres se llevó a cabo mediante la homogeneización de las muestras en una disolución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) (Panreac, Castellar del Vallés, España) al 6% (p/v), utilizando un disruptor de tejidos (Ika Labortechnik, Staufen, Alemania). En función de la muestra biológica, la cantidad procesada varió entre 5 y 15 mg PS ml⁻¹ de TCA 6%. Las

muestras permanecían 24 h a 4 °C, periodo tras el cual se centrifugaban durante 20 min a 10.000 g. Las fracciones sobrenadantes se filtraron a través de filtro de fibra de vidrio y nylon (Whatman, Clifton, New Jersey, EE.UU.) antes de someterlos a la reacción de derivatización.

2.4.6.2. *Derivatización de aminoácidos*

En un tubo de reacción se mezclaban 125 µl del sobrenadante filtrado y 25 µl de disolución 2 mM de patrón interno norleucina (Sigma, Alcobendas, España). Tras su secado en un evaporador centrífugo, se añadían 20 µl del reactivo de secado compuesto por metanol:agua:trietilamina (2:2:1, v/v/v), y se volvía a secar. Por último, se añadían 15 µl del reactivo de derivatización compuesto por metanol:agua:trietilamina:PITC (7:1:1:1, v/v/v/v) preparado momentos antes a la derivatización, y se incubaban a temperatura ambiente durante 20 min, periodo tras el cual se procedía al secado definitivo hasta la inyección en el cromatógrafo. En este punto, las muestras se conservaron a -20°C hasta su inyección en el cromatógrafo.

2.4.6.3. *Condiciones cromatográficas*

La inyección de las muestras se realizó después de disolver las muestras derivatizadas en 200 µl de una disolución 5 mM de Na₂HPO₄ tamponado a pH 7,4 y 5% de acetonitrilo. Tras centrifugación a 10.000 g durante 3 min, se inyectaron 20 µl de sobrenadante en el sistema de HPLC (Apartado 2.4.4). La elución de las muestras se llevó a cabo a través de un gradiente de mezcla de dos fases móviles: fase móvil A, consistente en una disolución 70 mM de acetato sódico tamponado a pH 6,55 y 2,5% de acetonitrilo; y fase móvil B, mezcla de acetonitrilo:agua:metanol (45:40:15, v/v/v). Los solventes utilizados en la composición de ambas fases móviles fueron de calidad HPLC gradiente (Merck, Darmstadt, Alemania). La elución tuvo lugar a un flujo de 1 ml min⁻¹, a una temperatura de 52°C, bajo el programa de gradiente descrito en la Tabla 2.3. La detección espectrofotométrica se realizó mediante un detector UV-VIS UV6000LP (Apartado 2.4.4.2) configurado a una longitud de onda de 254 nm. Los picos se identificaron por comparación con estándares comerciales (Sigma, Alcobendas, España), y se cuantificaban a través de la relación entre los factores de respuesta de los distintos solutos con el patrón interno norleucina (Figura 2.8).

Tabla 2.3. Programa de elución en gradiente seguido en el análisis de aminoácidos libres.

<u>Tiempo (min)</u>	<u>% fase A</u>	<u>% fase B</u>
0,0	100,0	0,0
13,5	97,0	3,0
16,5	97,0	3,0
19,0	96,5	3,5
21,0	95,5	4,5
24,0	94,0	6,0
25,0	93,0	7,0
26,5	92,0	8,0
28,5	91,0	9,0
30,0	91,0	9,0
50,0	66,0	34,0
65,0	30,0	70,0

Fase A: fase móvil compuesta por disolución 70 mM de acetato sódico tamponado a pH 6,55 y 2,5% de acetonitrilo.

Fase B: fase móvil compuesta por una mezcla de acetonitrilo:agua:metanol (45:40:15, v/v/v).

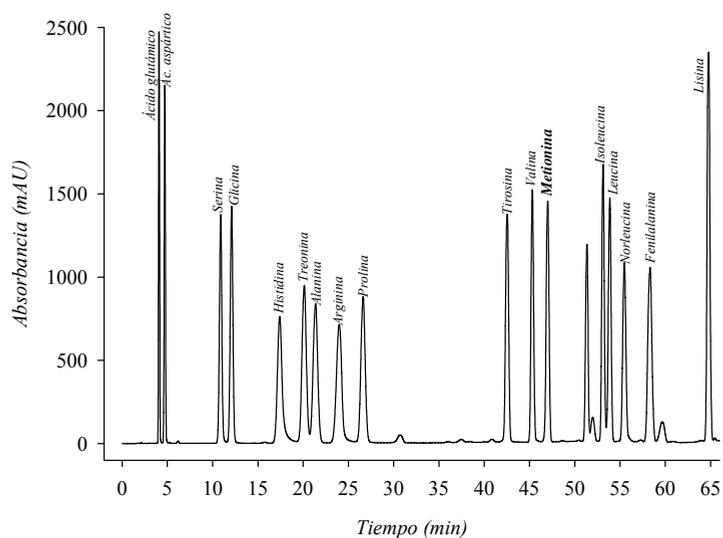


Figura 2.8. Separación de PTC-aminoácidos (derivados feniltiocarbamil) mediante una técnica de HPLC con una columna de fase reversa C18 y detección espectrofotométrica a 254 nm. Patrón de aminoácidos de Sigma (Ref. AA-S-18) y Norleucina (patrón interno).

2.5. Análisis estadísticos

Los datos biológicos y analíticos se expresan en toda la memoria en términos de medias \pm desviaciones típicas. El número de réplicas determinadas en cada caso se especifica mediante el valor de “n”. La condición de normalidad fue asumida en todas las variables estudiadas, mientras que la homogeneidad de las variancias (homocedasticidad) se comprobó en cada caso mediante la prueba de Barlett. Las diferencias entre medias de variables evaluadas en dos tratamientos experimentales (dos niveles del factor de variación) se comprobaron mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Una vez comprobada la homocedasticidad de los datos, en las comparaciones realizadas con más de dos tratamientos (más de dos niveles de variación del factor), las diferencias entre medias de los distintos tratamientos se determinaron mediante el análisis de la varianza (*analysis of variance*, ANOVA), seguido de la prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias (Sokal y Rohlf, 1981). Sin embargo, en el caso de existir heterogeneidad de varianzas, se usaron las pruebas robustas de Welch para determinar diferencias entre medias, y de Games-Howell para el establecimiento de diferencias entre grupos (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.). Estas dos última pruebas estadísticas no exigen la condición de homogeneidad de varianzas como es preceptivo en las pruebas ANOVA y la de Tukey. El nivel de significación de todas las pruebas estadísticas descritas arriba se fijó en 0,05. Todos los análisis estadísticos realizados en este trabajo se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.).

CAPÍTULO 3

***COMPORTAMIENTO DE LIPOSOMAS
COMO ENRIQUECEDORES DE
NAUPLIOS DE Artemia***

3.1. Introducción

La mejora del valor nutritivo de las presas vivas usadas en la cría de larvas de peces marinos se resuelve mediante la utilización de productos comerciales con alto contenido en nutrientes esenciales, principalmente ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (HUFAs). Como se ha comentado en el Capítulo 1, los liposomas poseen unas características estructurales y de composición que les convierten en productos con gran potencial para su utilización como enriquecedores de presas vivas. De forma sencilla, los liposomas pueden definirse como vesículas fosfolipídicas que encierran un espacio acuoso en el interior y con un tamaño variable desde varias decenas de nanómetros hasta varias micras. Así pues, la existencia del compartimento acuoso interno a la vesícula, su composición a base de fosfolípidos y su pequeño tamaño son tres propiedades básicas de los liposomas que, además de caracterizarlos, les distinguen de otros productos enriquecedores comerciales como las emulsiones lipídicas empleadas como producto de referencia en los experimentos presentados en esta memoria.

Los productos enriquecedores basados en emulsiones lipídicas forman gotículas o micelas cuya estructura posee un núcleo interno de moléculas insolubles en agua rodeadas por moléculas de emulgente que dispersan a las primeras en medios acuosos como el agua de mar (Figura 1.4a). Al observar esta estructura, es obvio deducir la dificultad de incluir nutrientes hidrosolubles en la formulación de las emulsiones. En cambio, los liposomas poseen un espacio acuoso donde pueden disolverse compuestos solubles en agua (Figura 1.4b y c). De esta forma, algunos estudios, relacionados con la acuicultura de distintos organismos, han utilizado liposomas en cuyo compartimento acuoso se han vehiculado sustancias hidrosolubles con fines nutricionales (Ozkizilcik y Chu, 1994; Tonheim y cols., 2000), terapéuticos (Rodgers, 1990, Touraki y cols., 1995; Irie y cols., 2005), etc. En cualquier caso, la capacidad de los liposomas para retener sustancias disueltas en el interior de la fase acuosa depende de múltiples factores, entre los que destacan aquéllos relacionados con la composición de la membrana. En este sentido, la composición de clases lipídicas (tipos de fosfolípidos, colesterol, etc.) y el grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos presentes en ellas puede determinar la fluidez de la membrana y, en consecuencia, el grado de estanqueidad.

Un segundo elemento que distingue a los liposomas de las emulsiones lipídicas es la composición de clases lipídicas de estos productos. Mientras que las emulsiones presentan un perfil lipídico a

base de lípidos neutros como los triglicéridos (TAGs) y los ésteres etílicos de ácido graso (FAEEs), los liposomas se componen básicamente de lípidos polares como los fosfolípidos (Figura 3.1). Este hecho puede suponer otra ventaja añadida ya que las dietas suplementadas con fosfolípidos traen consigo efectos beneficiosos de carácter nutricional (Koven y cols., 1993a; Teshima y cols., 1993; Coutteau y cols., 1997; Geurden y cols., 1998; Gisbert y cols., 2005), antiestresante (Kanazawa, 1997), etc. Además, las propiedades antioxidantes atribuidas a los fosfolípidos (King y cols., 1992a, b; McEvoy y cols., 1997; Song y cols., 1997) pueden jugar un papel muy importante a la hora de minimizar la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados durante el proceso de enriquecimiento (McEvoy y cols., 1995). La formación de estos compuestos, denominados peróxidos lipídicos, puede llevar consigo su acumulación en las presas vivas sometidas a procedimientos de enriquecimiento y provocar efectos nocivos en las larvas alimentadas con estas presas vivas (McEvoy y cols., 1995; Hipkiss y cols., 1997; Tesoriere y cols., 2002; Del Rio y cols., 2005).

Por último, el tamaño de partícula es una característica de gran importancia en un producto enriquecedor, ya que determina la eficacia de bioencapsulación de la presa viva (Gelabert-Fernández, 2001; Han y cols., 2005). En términos generales, las partículas que forman los productos enriquecedores convencionales, con tamaños de varias micras, son mayores que los liposomas (Léger y cols., 1987; Southgate y Lou, 1995; Han y cols., 2005, Wille y cols., 2005). En éstos últimos, el rango de tamaños puede ser muy amplio y depende del método de preparación. En el caso que nos ocupa, el diámetro de vesícula va de los 150-200 nm de las preparaciones unilamelares a algo más de 1 μm en las multilamelares (Hontoria y cols., 1994). Sin embargo, la aparición de procesos de degradación, de fusión y de agregación de vesículas durante el proceso de enriquecimiento puede cambiar la distribución de tamaños original (New, 1995) y, en consecuencia, la efectividad del proceso de enriquecimiento.

Todas estas diferencias en las propiedades físico-químicas de los liposomas con respecto a los productos habitualmente utilizados en el enriquecimiento de presas vivas exigen un estudio preliminar para describir el comportamiento de estas vesículas fosfolipídicas en las condiciones propias del enriquecimiento y poder valorar de forma más precisa el potencial de las distintas preparaciones. Con este objetivo, los tres experimentos realizados estudiaron la capacidad de varias formulaciones liposomales para retener sustancias en su fase acuosa, el grado de oxidación química de las membranas y el cambio de tamaño durante su incubación en condiciones de enriquecimiento.

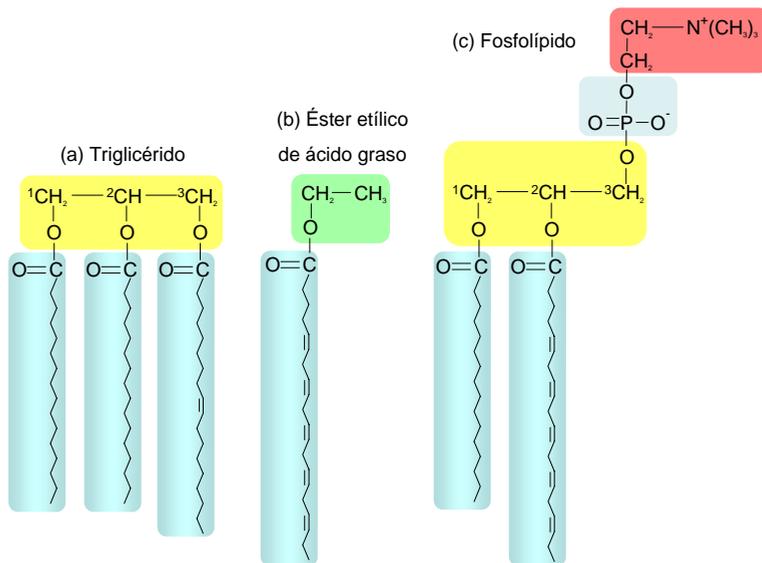


Figura 3.1. Estructura de tres moléculas lipídicas. Las cadenas de ácidos grasos (azul) se esterifican a los grupos hidroxilo del glicerol (amarillo) en el caso de los triglicéridos (a) y fosfolípidos (c), o al hidroxilo del etanol (verde) en el caso de los ésteres etílicos de ácidos grasos (b). Los fosfolípidos tienen una cabeza polar compuesta por un grupo fosfato (gris) y un compuesto hidrosoluble (rojo).

3.2. Material y métodos

3.2.1. Capacidad de retención de sustancias disueltas

Se evaluó la capacidad de varias formulaciones de liposomas para retener sustancias disueltas en la fase acuosa interna de la vesícula bajo condiciones propias del enriquecimiento. Para ello, se prepararon suspensiones de liposomas con distinta composición de fosfolípidos, distintas proporciones fosfolípido:colesterol y varios contenidos de vitamina E en la bicapa. La vitamina E fue incluida con el fin de mejorar la estabilidad de las preparaciones de liposomas (Urano y cols., 1987). De esta forma, las formulaciones sometidas a esta prueba fueron las siguientes, clasificadas según la fuente fosfolipídica básica de su composición:

1. Fosfolípidos de krill (KPL):

- a. LUVext (KPL:CHO): liposomas unilamelares de extrusión (LUVext) compuestos de una membrana de KPL y colesterol (CHO) en una proporción 4:1 (p/p).
- b. LUVext (KPL:CHO:vitE): LUVext compuestos de una membrana de KPL, CHO y vitamina E en una proporción 80:20:1 (p/p/p).
- c. LUVdet (KPL): liposomas unilamelares preparados mediante el método de solubilización por detergente (LUVdet) y compuestos de una membrana de KPL (100%).
- d. MLV (KPL:CHO) (4:1): liposomas multilamelares (MLVs) compuestos de membranas de KPL y CHO en una proporción 4:1 (p/p).
- e. MLV (KPL:CHO) (2:1): MLVs compuestos de membranas de KPL y CHO en una proporción 2:1 (p/p).

2. Fosfatidilcolina de soja (SPC):

- a. LUVext (SPC:CHO): LUVext compuestos de una membrana de SPC y CHO en una proporción 4:1 (p/p).
- b. LUVext (SPC:CHO:vitE): LUVext compuestos de una membrana de SPC, CHO y vitamina E en una proporción 80:20:1 (p/p/p).
- c. LUVdet (SPC): LUVdet formulados con una membrana compuesta exclusivamente por SPC.

3. Fosfatidilcolina de huevo (EPC):

- a. LUVext (EPC:CHO): LUVext compuestos de una membrana de EPC y CHO en una proporción 4:1 (p/p).
- b. LUVext (EPC:CHO:vitE): LUVext compuestos de una membrana de EPC, CHO y vitamina E en una proporción 80:20:1 (p/p/p).
- c. LUVext (EPC:CHO:vitE): LUVext compuestos de una membrana de EPC, CHO y vitamina E en una proporción 80:20:10 (p/p/p).

4. Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC):

- a. LUVext (DPPC:CHO): LUVext compuestos de una membrana de DPPC y CHO en una proporción 4:1 (p/p).

- b. LUVext (DPPC:CHO:vitE): LUVext compuestos de una membrana de DPPC, CHO y vitamina E en una proporción 80:20:1 (p/p/p).
- c. LUVext (DPPC:CHO:vitE): LUVext compuestos de una membrana de DPPC, CHO y vitamina E en una proporción 80:20:10 (p/p/p).

La técnica utilizada en el seguimiento de la capacidad de retención de sustancias disueltas por parte de las distintas formulaciones liposomales se basó en el método descrito por Weinstein y cols. (1984). El procedimiento permite medir la liberación del marcador fluorescente 5(6)-carboxifluoresceína (CF). En el momento de preparación de los liposomas (MLV, LUVext y LUVdet) por los métodos descritos en el Apartado 2.1, la CF se hallaba disuelta en la fase acuosa (interna y externa a las vesículas) a una concentración superior a 100 nM. Este compuesto sólo presenta fluorescencia a concentraciones inferiores a 100 mM (Weinstein y cols., 1984), debido a que la interacción entre las propias moléculas de CF impide su fluorescencia (efecto *self-quenching*). Una vez concluida la preparación, se procedió a la eliminación del marcador fluorescente presente en el espacio externo a las vesículas, hasta obtener una suspensión de liposomas en la que el marcador fluorescente concentrado se encontraba sólo en la fase acuosa interna. La forma de eliminar el marcador del espacio externo al liposoma varió en función de la lamelaridad de las preparaciones. De esta forma, las preparaciones unilamelares (LUVext y LUVdet) se hacían pasar por una columna empaquetada con Sephadex G-50 Fine (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia) hidratada con agua de mar (LUVext) o suero fisiológico (NaCl al 0,9%, p/v) (LUVdet). La fracción de liposomas era recogida para su posterior utilización en las pruebas de capacidad de retención de sustancias disueltas. En el caso de los MLVs, el exceso de marcador se eliminó por centrifugaciones (3000 g durante 3 min) sucesivas realizadas sobre las preparaciones con CF concentrada en la fase acuosa interna y externa de las vesículas. De esta forma, mientras que los MLVs con CF en su interior se concentraban en el fondo del tubo, el sobrenadante con el exceso de CF se retiraba con una pipeta, añadiendo, seguidamente, el mismo volumen de agua de mar. Tras varias repeticiones se lograba eliminar la mayor parte de CF presente en el espacio externo a las vesículas. El resultado final del proceso de retirada de CF por cualquiera de los dos métodos era una suspensión de liposomas cuyas fases acuosas internas contenían marcador concentrado y, por tanto, no fluorescente, y el medio acuoso externo estaba libre del mismo.

La capacidad de retener sustancias disueltas fue evaluada utilizando las preparaciones liposomales en las condiciones propias del enriquecimiento. De esta forma, la concentración de liposomas en el medio de enriquecimiento fue fijada en 0,50 g lípido l⁻¹, y la densidad naupliar en 300 nauplios ml⁻¹. En este experimento se utilizaron tubos cilindro-cónicos de 200 ml de capacidad, que se colocaron sumergidos parcialmente en un baño termostático a temperatura de 28 ± 1°C, y se iluminaron mediante tubos fluorescentes que daban una intensidad aproximada de 1500-2000 lux. Cada tubo de enriquecimiento disponía de un sistema de aireación individual. El nivel de aireación se fijó con la intención de reproducir la agitación que normalmente se observa en los tubos de 1 l de capacidad donde se realizan la mayor parte de experimentos presentados en esta memoria. Bajo estas condiciones, la prueba comenzaba cuando se añadían los liposomas al medio de enriquecimiento (t=0). En ese momento se tomaba una alícuota del medio (1 ml) y se filtraba a través de una malla de plancton (100 µm de luz) que retenía los nauplios y dejaba pasar la fracción líquida a una cubeta de espectrofluorimetría. Este procedimiento se repitió 3 o 4 veces a lo largo del periodo de duración de un enriquecimiento convencional (hasta 24 h). En cada uno de estos puntos temporales se estimó el porcentaje de vesículas con el contenido acuoso interno intacto. Ello se obtenía de la diferencia entre la fluorescencia medida directamente en la muestra filtrada recogida en la cubeta (medía la CF que se ha liberado espontáneamente) y la fluorescencia estimada tras la adición de un agente detergente que provocaba la evacuación al medio de la CF contenida en las vesículas aún intactas. La CF liberada, tanto espontánea, como obligadamente, sufre una dilución que provoca la desaparición del efecto *self-quenching* y, por tanto, se torna fluorescente. De este modo, la diferencia entre ambas medidas de fluorescencia, antes y después de la adición del detergente, es proporcional al número de vesículas con el contenido acuoso intacto. La diferencia de las dos medidas en el inicio del ensayo (t=0) se consideró como la referencia correspondiente al 100% de vesículas intactas. A medida que las vesículas presentes en el medio de enriquecimiento liberaban el marcador para convertirse en fluorescente, la diferencia entre las dos medidas de fluorescencia disminuía y, en consecuencia, también el porcentaje de vesículas intactas en la preparación. La desestabilización completa de las membranas se lograba mediante la adición de 20 µl de disolución 1% (p/v) de detergente Triton X-100 (Sigma, Alcobendas, España). La fluorescencia de las muestras se midió configurando unas longitudes de onda de excitación y de emisión a 492 y 520 nm, respectivamente, en un espectrofluorímetro F-2500 Hitachi (Tokio, Japón).

La gran diferencia observada en los patrones de liberación del marcador CF de las diferentes formulaciones impidió fijar los mismos puntos de muestreo en todas las formulaciones y, en consecuencia, la comparación estadística entre las distintas preparaciones de liposomas.

3.2.2. Peroxidación lipídica de los productos enriquecedores durante el enriquecimiento

Este experimento evaluó la susceptibilidad a la peroxidación del enriquecedor comercial usado como control en gran parte de los experimentos realizados en el presente estudio y, además, la de nueve preparaciones de liposomas diferentes. De esta forma, las muestras analizadas contenían diferentes fuentes fosfolípídicas (KPL, SPC y DPPC), colesterol (CHO) o vitamina A (vitA), y todas ellas fueron utilizadas con posterioridad en enriquecimientos de nauplios de *Artemia* incluidos en los Capítulos 4, 5 y 6. Concretamente, las formulaciones de liposomas estudiadas fueron:

1. MLV (KPL): liposomas multilamelares (MLVs) compuestos de una membrana de fosfolípidos de krill (KPL) (100%).
2. LUVext (KPL): liposomas unilamelares de extrusión (LUVext) compuestos de una membrana de KPL (100%).
3. LUVdet (KPL): liposomas unilamelares preparados mediante el método de solubilización por detergente (LUVdet) y compuestos de KPL (100%).
4. LUVext (KPL:vitA): LUVext compuestos de una membrana de KPL y palmitato de retinol (vitA) (100:1, p/p).
5. LUVdet (KPL:vitA): LUVdet con una membrana de fosfolípidos de krill y palmitato de retinol (100:1, p/p).
6. MLV (SPC:CHO): MLVs compuestos de membranas de fosfatidilcolina de soja (SPC) y colesterol (CHO) (4:1, p/p).
7. LUVext (SPC:CHO): LUVext compuestos de una membrana de SPC y CHO (4:1, p/p).
8. LUVdet (SPC): LUVdet compuestos de una membrana de SPC (100%).
9. LUVext (DPPC:CHO): LUVext compuestos de una membrana de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y CHO (4:1, p/p).

Todos estas suspensiones de liposomas se prepararon según las metodologías descritas en el Apartado 2.1.

Los productos enriquecedores detallados arriba (liposomas y emulsión comercial) fueron incubados por triplicado en tubos cilíndricos de vidrio de 1 l de capacidad en las condiciones habituales de enriquecimiento de nauplios de *Artemia*. De esta forma, los tubos de enriquecimiento contenían agua de mar con el producto enriquecedor correspondiente a una concentración de 0,50 g lípido l⁻¹. Los tubos se colocaron en un baño termostatzado a una temperatura de 28 ± 1°C y una iluminación de 1500-2000 lux. La aireación del medio de enriquecimiento fue aplicada utilizando tubos de vidrio con una sección interna de 0,5 cm de diámetro, con un flujo de aire fijado individualmente en cada tubo en un valor de 1,0 lpm (litros por minuto) mediante rotámetros Key Instruments (Trevose, Pennsylvania, EE.UU.). El sistema de difusión de aire (tubo de vidrio con sección de 0,5 cm de diámetro) y el flujo aplicado (1,0 lpm) fueron escogidos tras estudiar el comportamiento de los liposomas como enriquecedor de nauplios de *Artemia* bajo distintas condiciones de aireación (Capítulo 4). Cabe señalar que, a diferencia de los otros dos experimentos incluidos en este capítulo (Apartados 3.2.1 y 3.2.3), la formación de peróxidos lipídicos durante los procesos de enriquecimiento se determinó en ausencia de nauplios de *Artemia* debido que su inclusión, a pesar de reproducir de forma más fiel las condiciones del enriquecimiento, lleva consigo inconvenientes que pueden falsear los resultados. En este sentido, la diferencia en la eficacia filtradora del nauplio con los diferentes tipos de liposomas puede condicionar la cantidad de producto enriquecedor restante al final de la incubación y, por tanto, los peróxidos lipídicos cuantificables al final del proceso. Además, la entrada de microorganismos que actúan sobre el sustrato (McEvoy y cols., 1995) y la presencia de restos de exoesqueletos procedentes de la muda pueden contribuir a medidas erróneas. La toma de muestras se realizó extrayendo un volumen del medio de enriquecimiento en el momento inicial de la incubación (t=0 h) y después de 21 h (t=21 h). Estas muestras se congelaron inmediatamente a -20°C hasta el análisis de los peróxidos.

La determinación de peróxidos presentes en las muestras se llevó a cabo mediante una variación del método denominado genéricamente como del ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS) propuesta por Ohkawa y cols. (1979). Este método analítico se basa en la determinación espectrofluorimétrica de los compuestos formados en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con aquellas sustancias análogas al malondialdehído (MDA) presentes en una muestra, bajo condiciones controladas de temperatura y pH. Concretamente, en tubos de

polipropileno de 2 ml de capacidad se dispensaron 160 μ l de la muestra de medio de enriquecimiento, 40 μ l de una disolución acuosa 8,1% (p/v) de SDS y 0,05% (p/v) de BHT, 300 μ l de una disolución 20% (v/v) de ácido acético glacial tamponada a pH 3,5 con una disolución saturada de NaOH, y 300 μ l de una disolución 0,8% de TBA (p/v) en agua destilada preparada diariamente. Los tubos se cerraron herméticamente y se incubaron durante 60 min en un baño termostático a 95°C. Tras este periodo, la reacción se interrumpió sumergiendo los tubos de ensayo durante 3 min en un baño con hielo. A continuación, se procedió a la extracción líquido-líquido de los peróxidos, añadiendo 200 μ l de agua destilada y 1 ml de una disolución de n-butanol:piridina (15:1, v/v). Tras la agitación vigorosa de los tubos para favorecer la mezcla de ambas fases, los tubos se centrifugaron a 10.000 g durante 3 min a 4°C de temperatura. La fluorescencia de la fracción sobrenadante orgánica fue medida en un espectrofluorímetro F-2500 Hitachi (Tokio, Japón) a longitudes de onda de excitación y emisión de 515 y 553 nm, respectivamente. La concentración de peróxidos se calculó a través de una curva patrón obtenida con disoluciones de concentraciones crecientes del compuesto 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) que fueron sometidas a las mismas condiciones descritas para las muestras.

El análisis estadístico se realizó separadamente en cada una de los productos estudiados, comparando la concentración de peróxidos al inicio y después de 21 h de incubación en las condiciones descritas anteriormente (prueba *t* de Student, $P \leq 0,05$).

3.2.3. Conservación del tamaño inicial de las vesículas

Este experimento evaluó el cambio del tamaño original de seis formulaciones de liposomas en condiciones de enriquecimiento. De ellas, cuatro formulaciones se prepararon mediante la técnica de extrusión (Apartado 2.1), en las cuales las cuatro fuentes fosfolípídicas (KPL, SPC, EPC y DPPC) se combinaron con colesterol en una proporción fosfolípido:colesterol 4:1 (p/p). Por otra parte, las dos formulaciones restantes, preparadas por el método de solubilización por detergente (Apartado 2.1), fueron: LUVdet (KPL), formulada exclusivamente por fosfolípidos de krill, y LUVdet (SPC), liposomas formulados por fosfatidilcolina de soja. Como se ha detallado en el Apartado 2.1, la fase acuosa de las preparaciones LUVext consistió en agua de mar filtrada (0,45 μ m), mientras que los liposomas LUVdet tienen una fase acuosa consistente en una disolución de cloruro sódico 0,9% (p/v).

La distribución del tamaño de partícula de cada formulación fue evaluada en presencia y ausencia de nauplios, con tres réplicas para cada una de las dos situaciones. Las condiciones experimentales establecidas fueron las descritas anteriormente, esto es, temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, iluminación (1500-2000 lux), concentración lipídica de $0,50 \text{ g l}^{-1}$ y, cuando correspondió, presencia de nauplios de *Artemia* a una densidad de $300 \text{ nauplios ml}^{-1}$. Al igual que en los experimentos del Apartado 3.2.1, se emplearon tubos de 200 ml de capacidad y un nivel de aireación reducido para intentar reproducir las condiciones de turbulencia de los enriquecimientos llevados a cabo en tubos de 1 l de capacidad. Se tomaron muestras de los medios de enriquecimientos de los distintos tratamientos al inicio y después de 12, 17 y 22 h. La primera toma de muestras no se realizó hasta las 12 h de incubación debido a que no se observaron cambios de tamaño importantes en la realización de ensayos preliminares. La toma de muestras se realizó tomando 1 ml de medio que era trasvasado a una cubeta de espectrofotometría, directamente en las muestras procedentes de incubaciones sin nauplios, y a través de una malla de plancton de $100 \mu\text{m}$ de luz en caso de muestras procedentes de incubaciones con nauplios. La estimación del tamaño medio de partícula de cada muestra se realizó con un medidor de partículas Nanosizer Coulter N4 Plus (Coulter Coultronics, Margency, Francia). El sistema de medida de este instrumento se basa en el patrón de dispersión que exhibe una muestra cuando un haz de luz láser se hace incidir sobre ella. El tamaño medio de partícula inferido se obtiene de la media de tres medidas realizadas durante 3 min. El ángulo de incidencia del láser sobre la muestra fue de 90° y la temperatura durante las medidas fue de 20°C . El tamaño de partículas de los liposomas MLVs y las gotículas de emulsión lipídica comercial no fue estudiado por que la gran dispersión de tamaños mostrada impide una estimación fiable.

El análisis estadístico se llevó a cabo separadamente en cada una de las seis formulaciones estudiadas, comparando el efecto de la presencia o ausencia de nauplios sobre el diámetro estimado de las vesículas en cada uno de los cuatro puntos temporales considerados: 0, 12, 17 y 22 h (prueba *t* de Student, $P \leq 0,05$).

3.3. Resultados

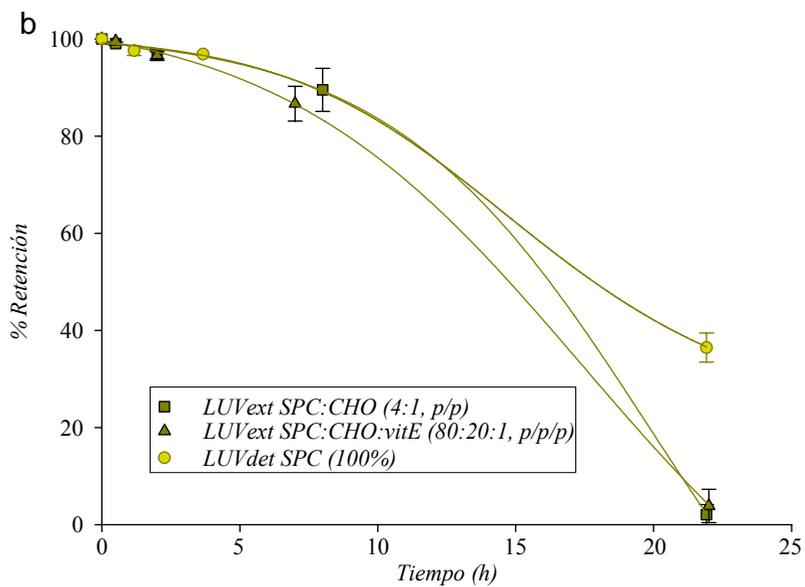
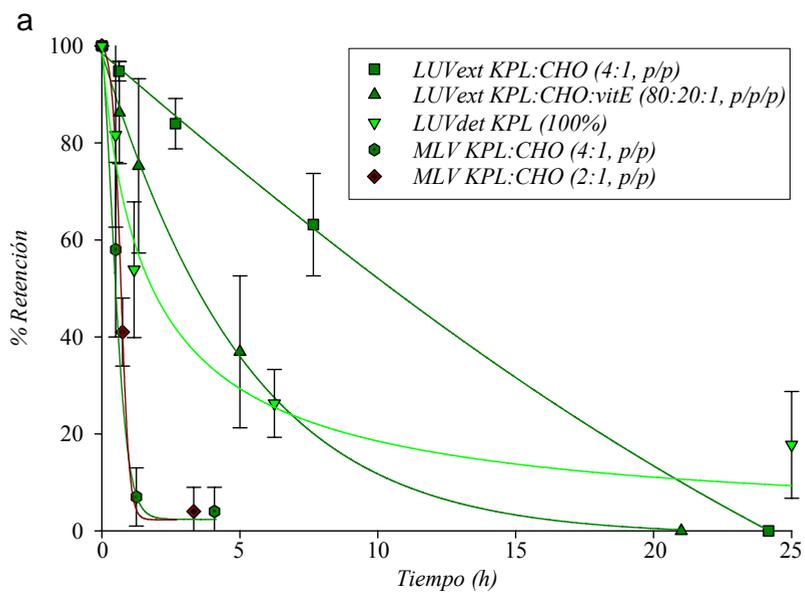
3.3.1. Capacidad de retención de sustancias disueltas

La liberación del marcador CF de las formulaciones evaluadas con cada uno de los cuatro fosfolípidos utilizados como componentes básicos queda patente en la Figura 3.2. En el caso de los liposomas constituidos de fosfolípido de krill (Figura 3.2a), la formulación que

exhibe los mayores porcentajes de vesículas con el contenido acuoso intacto fue KPL:CHO (4:1, p/p) preparada por extrusión. Con esta composición, aproximadamente la mitad de las vesículas conservaban su fase acuosa intacta tras 10 h de incubación. En cambio, la inclusión de vitamina E en esta formulación dio lugar a un patrón de liberación distinto, observándose una evacuación de CF más acelerada. Esta rápida liberación del marcador fluorescente también se dejó sentir en las formulaciones LUVdet y MLV, donde la evacuación de CF al medio extravésicular fue prácticamente total tras pocas horas. Las vesículas formuladas con SPC demostraron un mejor comportamiento en términos de retención de CF (Figura 3.2b). Las tres formulaciones muestran porcentajes de retención similares durante los dos primeros tercios de la incubación, aunque casi el 40% del contenido de las vesículas LUVdet (SPC, 100%) se mantuvo intacto al final del experimento, a diferencia de las otras dos formulaciones ensayadas. Las preparaciones de EPC (Figura 3.2c) presentan resultados comparables a los de soja, aunque, en este caso, la práctica totalidad de las vesículas de las tres formulaciones estudiadas liberaron el marcador al final de la incubación (22h). Sin embargo, las preparaciones de DPPC (Figura 3.2d) presentan un comportamiento más estable que los liposomas de SPC y EPC, con un porcentaje alrededor de un 50% de vesículas intactas al final del ensayo en la formulación DPPC:CHO (4:1, p/p) preparada por extrusión. Este porcentaje disminuyó al aumentar la cantidad de vitamina E, circunstancia también visible en las formulaciones a base de EPC (Figura 3.2c).

3.3.2. Peroxidación lipídica de los productos enriquecedores durante el enriquecimiento

La Tabla 3.1 muestra la formación de peróxidos lipídicos producida por la incubación de diferentes productos enriquecedores bajo las condiciones habituales en las que se llevan a cabo los enriquecimientos de nauplios de *Artemia*. La mayoría de productos, a excepción de la formulación LUVdet (SPC, 100%) y la LUVext (DPPC:CHO, 4:1, p/p) sufrieron un proceso de peroxidación tras la aplicación de las condiciones experimentales. Sin embargo, este



(Continúa en la página siguiente)

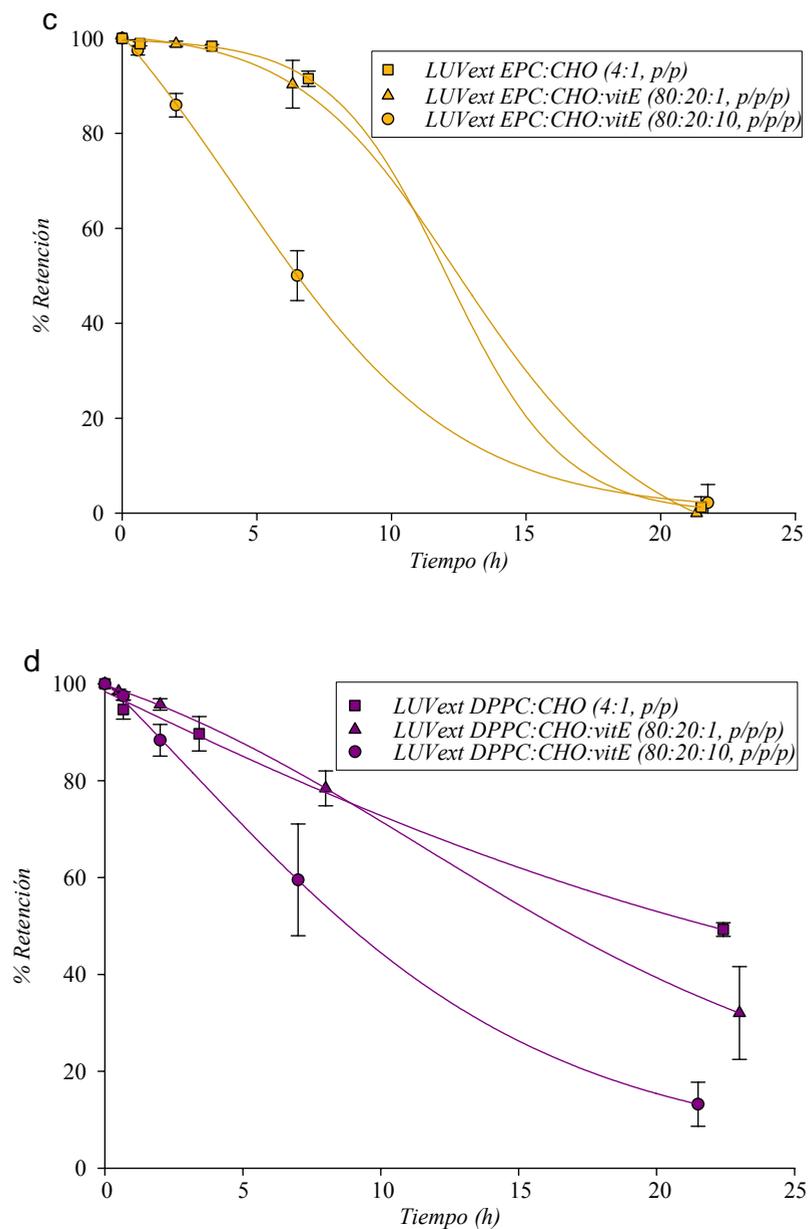


Figura 3.2. Curvas de retención de marcador fluorescente 5(6)-carboxifluoresceína en la fase acuosa interna de varias preparaciones de liposomas formuladas con KPL (a), SPC (b), EPC (c) y DPPC (d) sometidas a condiciones de enriquecimiento. Los valores son medias y las barras de error representan desviaciones típicas (n=3).

Tabla 3.1. Concentración de peróxidos lipídicos (μM TEP) medidos en medios de enriquecimiento con productos enriquecedores al inicio y después de 21 h de incubación bajo condiciones de enriquecimiento de nauplios de *Artemia*. Los datos se presentan como medias (desviación típica) ($n=3$). Los tratamientos con superíndices distintos en una misma fila son significativamente diferentes (prueba t de Student, $P \leq 0,05$).

	Concentración inicial de peróxidos lipídicos (μM TEP)	Concentración final de peróxidos lipídicos (μM TEP)
Emulsión comercial	0,71 (0,15) ^a	98,13 (6,53) ^b
MLV (KPL, 100%)	0,30 (0,04) ^a	1,07 (0,03) ^b
LUVext (KPL, 100%)	0,24 (0,02) ^a	1,03 (0,01) ^b
LUVdet (KPL, 100%)	0,24 (0,02) ^a	0,52 (0,02) ^b
LUVext (KPL: vitA, 100:1)	0,27 (0,06) ^a	1,39 (0,06) ^b
LUVdet (KPL: vitA, 100:2)	0,15 (0,01) ^a	0,41 (0,07) ^b
MLVs (SPC: CHO, 4:1)	0,14 (0,05) ^a	0,50 (0,02) ^b
LUVext (SPC: CHO, 4:1)	0,11 (0,04) ^a	0,46 (0,02) ^b
LUVdet (SPC, 100%)	0,01 (0,01)	0,21 (0,12)
LUVext (DPPC: CHO, 4:1)	0,02 (0,00)	0,08 (0,03)

MLVs: vesículas multilamelares; LUVext: liposomas unilamelares preparados por extrusión; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente.

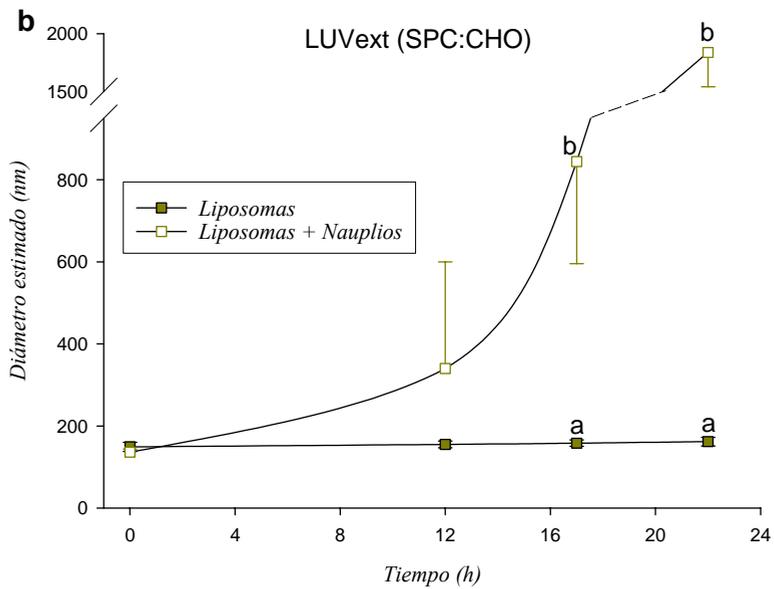
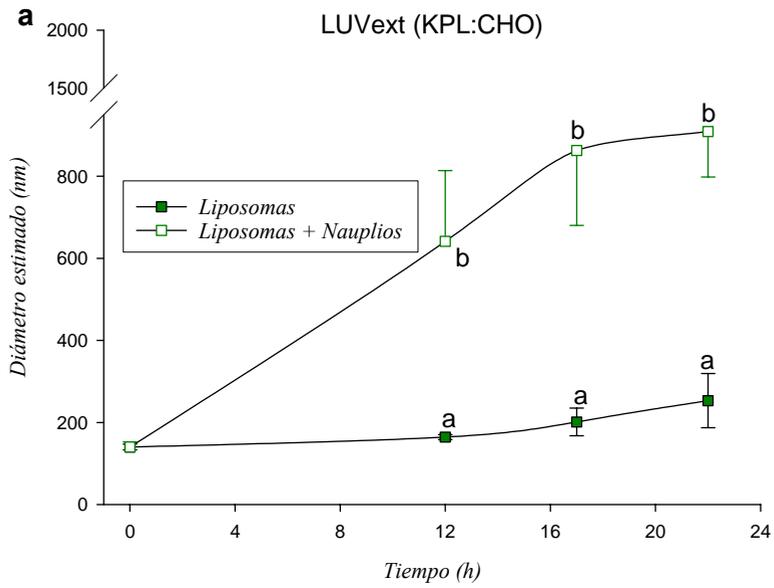
KPL: extracto de fosfolípidos de krill; SPC: fosfatidilcolina de soja; DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina; CHO: colesterol; vitA: vitamina A en forma de palmitato de retinol.

TEP: 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

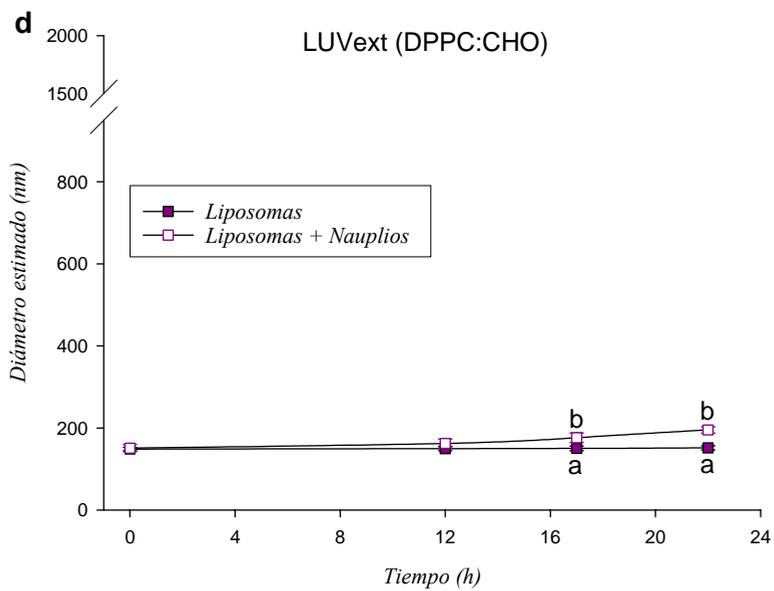
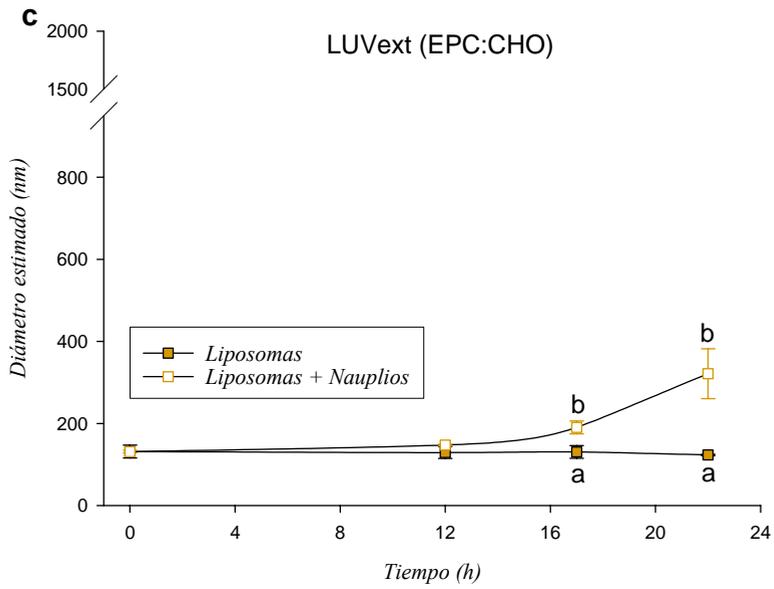
aumento fue especialmente acusado en el tratamiento correspondiente a la emulsión comercial Super Selco, con concentraciones finales de peróxidos que llegaron a superar por dos órdenes de magnitud a gran parte de las formulaciones liposomales. Entre éstas, los enriquecimientos con formulaciones ricas en ácidos grasos poliinsaturados muestran, en general, mayores niveles de peroxidación que las saturadas.

3.3.3. Conservación del tamaño inicial de las vesículas

En la Figura 3.3 se representa la evolución de la distribución de tamaños determinada en seis formulaciones de liposomas sometidas a incubaciones de 22 h de duración. Como puede observarse, las preparaciones conservaron el tamaño medio original



(Continúa en la página siguiente)



(Continúa en la página siguiente)

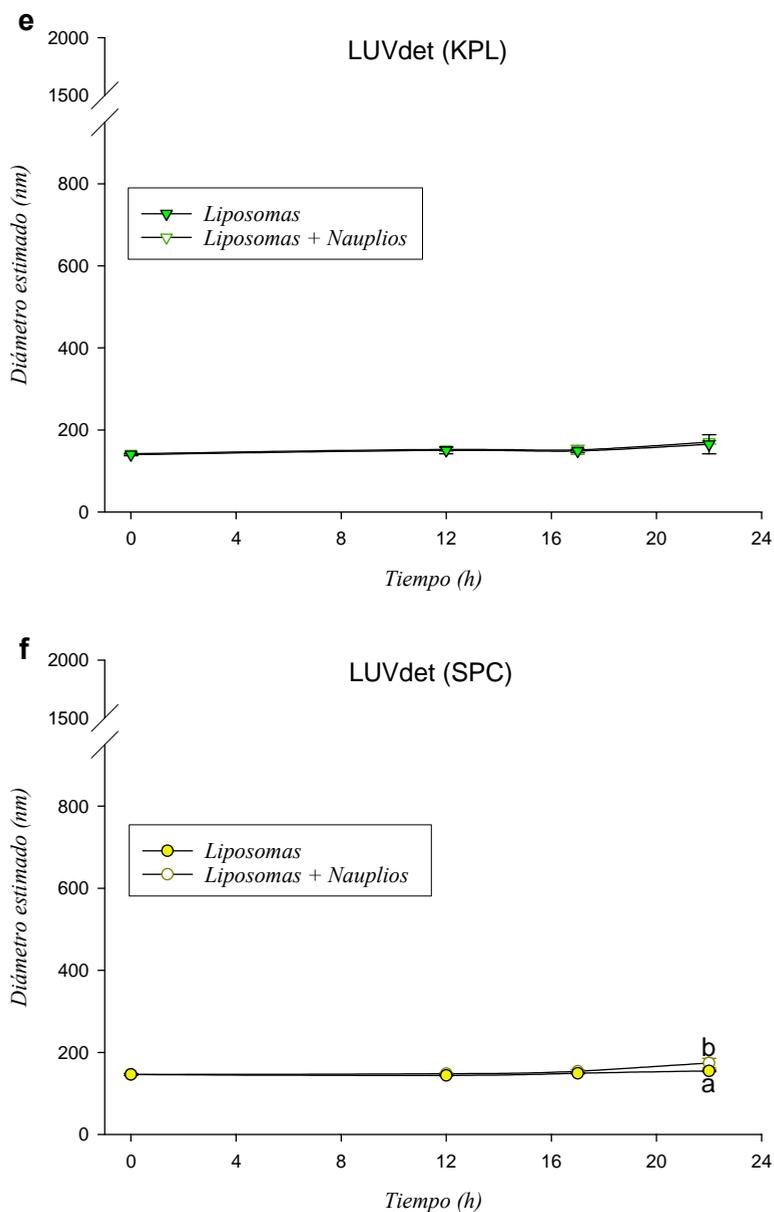


Figura 3.3. Distribución de tamaños de varias formulaciones de liposomas LUVext (a, b, c y d) y LUVdet (e y f) evaluadas a lo largo de un periodo de 22 h en presencia y en ausencia de nauplios de *Artemia*. Los valores son medias y las barras de error representan desviaciones típicas (n=3). En cada punto de muestreo, las letras diferentes indican diferencias significativas entre el tamaño de los liposomas medido en ausencia y presencia de nauplios (t de Student, $P \leq 0,05$).

de las vesículas a lo largo del periodo de estudio, cuando las incubaciones se realizaron sin nauplios de *Artemia*. La única formulación que experimentó un aumento apreciable de tamaño en ausencia de nauplios fue LUVext KPL:CHO (Figura 3.3a). Sin embargo, la inclusión de nauplios hizo que todas las preparaciones experimentaran, en general, un aumento de tamaño con respecto al tamaño observado sin nauplios en algunos de los puntos de muestreo. Concretamente, las suspensiones de liposomas preparadas por extrusión (LUVext) (Figuras 3.3a, b, c, d) fueron las que sufrieron un mayor aumento de tamaño y sólo la formulada con el fosfolípido saturado DPPC y CHO conservó el tamaño original en mayor medida. Por su parte, los liposomas preparados mediante la metodología de solubilización por detergente (LUVdet) se vieron afectados en menor medida por la presencia de nauplios (Figuras 3.3e, f) hasta el punto de no observarse diferencias significativas entre las dos situaciones (ausencia y presencia de nauplios) en los tamaños de vesícula de la formulación LUVdet KPL ($P \leq 0,05$).

3.4. Discusión

La utilización de liposomas como enriquecedores de presas vivas implica el sometimiento de estas vesículas lipídicas a condiciones particularmente agresivas que pueden modificar sus propiedades originales. La pérdida de la capacidad de retención de sustancias disueltas puede ser una de las consecuencias más relevantes, dada la importancia que esta característica otorga a los liposomas. Así pues, los resultados del estudio realizado indican que, contrariamente a los resultados obtenidos por Hontoria y cols. (1998) en los que se comprobó que la retención de compuestos hidrosolubles en liposomas sometidos a condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente y ausencia de agitación) se prolongaba durante varios días, la totalidad de formulaciones evaluadas en este estudio mostraron una liberación del marcador fluorescente en las primeras horas de incubación. Sin embargo, la tasa de liberación del marcador hidrosoluble no fue igual en todas las preparaciones y parece marcada por la composición de la membrana. De esta forma, los liposomas con mayor grado de insaturación (KPL, SPC y EPC) presentaron menores porcentajes de retención que las formulaciones a base de DPPC. Este resultado puede deberse a que las membranas insaturadas exhiben una alta permeabilidad a compuestos hidrosolubles por la gran fluidez conferida por los pliegues en las cadenas hidrocarbonadas en los dobles enlaces. Éstos dificultan su empaquetamiento y, como consecuencia, las membranas permanecen fluidas. De esta forma, se permite el desplazamiento lateral (difusión) de las moléculas de

fosfolípidos a lo largo de la monocapa y la rotación de los fosfolípidos sobre su eje longitudinal (Alberts y cols., 1996, pp. 512-513). Otro factor que puede dificultar el ordenamiento de los fosfolípidos es la diferencia de longitud entre las dos cadenas hidrocarbonadas. Esta diferencia hace que durante el empaquetamiento de los fosfolípidos queden huecos en la confluencia de las cadenas de ambas monocapas (New, 1990, p. 10). Mientras que la DPPC es un fosfolípido sintético con cadenas hidrocarbonadas de 16 C (ácido palmítico, 16:0), los fosfolípidos de fuentes naturales, como son KPL, SPC y EPC suelen presentar una distribución de longitud de cadenas mucho más heterogénea (New, 1990). Por otro lado, la utilización de fuentes fosfolípídicas en las que coexisten fosfolípidos con distinto tamaño de cabeza polar puede implicar el desarrollo de irregularidades en la membrana. Este es el caso del extracto del KPL, cuya composición está constituida por una mezcla de moléculas de cabeza polar de gran tamaño (PC) y otras de menor tamaño (PE) (Tabla 2.1). Todas estas circunstancias (alta insaturación, posible diferencia de longitud de las dos cadenas de ácido graso en el mismo fosfolípido, presencia de cabezas polares de distinto tamaño) podrían explicar la baja capacidad de retención del marcador fluorescente de los liposomas de KPL. Sin embargo, la inclusión de colesterol en la bicapa parece tener un efecto estabilizador según se desprende de la diferencia de comportamiento observado en una formulación LUVdet (KPL, 100%) y otra que contiene colesterol (LUVext, KPL:CHO, 4:1). El carácter anfipático de la molécula de colesterol, con un grupo polar 3 β -hidroxilo, unos anillos esteroides y una cadena alifática apolar, permite su inserción en la membrana, de forma que sus grupos hidroxilo quedan próximos a la cabeza polar de las moléculas de fosfolípidos; sus anillos esteroides, planos y rígidos, interactúan y, en parte, inmovilizan las regiones de las cadenas hidrocarbonadas más cercanas a los grupos polares de la cabeza (9 o 10 C desde el carboxilo terminal), dejando el resto más flexible (Figura 1.5). Al disminuir la movilidad de los fosfolípidos, el colesterol aumenta la rigidez de la bicapa en esa región y de ese modo disminuye la permeabilidad a compuestos hidrosolubles (Alberts y cols., 1996, p. 513). Por otro lado, la inclusión de vitamina E en algunas formulaciones resultó en una disminución importante en la retención del marcador. Este compuesto es muy utilizado para la estabilización de membranas fosfolípídicas debido a las propiedades antioxidantes (Urano y cols., 1987; Fukuzawa y cols., 1993a, b). Sin embargo, su carácter lipofílico hace que ocupe un espacio entre las cadenas hidrocarbonadas que puede originar un aumento de las discontinuidades y, por tanto, de la permeabilidad de solutos hidrosolubles (Fukuzawa y cols., 1993a, b).

En relación a la lamelaridad de los liposomas, las preparaciones MLV a base de fosfolípidos de krill (KPL) mostraron una baja capacidad para retener el marcador fluorescente en comparación con las unilamelares formuladas con la misma fuente fosfolipídica. Sin embargo, los resultados del Capítulo 5 indican que las suspensiones MLV a base de fosfatidilcolina de soja (SPC) pueden ofrecer buenos niveles de enriquecimiento de sustancias hidrosolubles (metionina) en nauplios de *Artemia*. Esta diferencia de eficiencia de los liposomas MLV en ambos experimentos puede estar relacionada con la composición fosfolipídica de membrana de ambas suspensiones (KPL y SPC en los Capítulos 3 y 5, respectivamente) ya que, como se ha argumentado en el párrafo anterior para el caso de liposomas unilamelares, las formulaciones a base de soja retienen sustancias hidrosolubles de forma más eficientemente que las de krill. Además, es preciso resaltar el hecho que las preparaciones MLV utilizadas en los ensayos sobre capacidad de retención de sustancias hidrosolubles fueron sometidas a una serie de centrifugaciones para eliminar el marcador presente en el espacio extravésicular (Apartado 3.2.1). Este proceso, innecesario cuando los liposomas MLV son usados en enriquecimientos de *Artemia* en sentido estricto (Capítulo 5), puede cambiar las propiedades reales de la suspensión original de liposomas MLV y, en consecuencia, su capacidad para enriquecer nauplios de *Artemia* en nutrientes hidrosolubles.

A la luz de los resultados obtenidos, la bioencapsulación de sustancias disueltas en nauplios de *Artemia* puede afrontarse mediante liposomas empleados según dos estrategias. Por una parte, la utilización de liposomas LUVext (KPL:CHO) permitiría la administración simultánea de EFAs y nutrientes hidrosolubles en su fase acuosa. Según el patrón de liberación del marcador fluorescente, la administración de estos liposomas en dos dosis al inicio y después de 10 h permitiría que durante un periodo de unas 20 h un 60-70% de vesículas presentes en el medio de enriquecimiento tuvieran el contenido acuoso intacto. Una segunda estrategia consistiría en el empleo de una mezcla de liposomas con dos tipos de vesículas: una formulada con alto contenido en nutrientes liposolubles (EFAs, vitaminas liposolubles, etc.) y en la que no importara su capacidad de retención de nutrientes hidrosolubles; y otra preparación de liposomas más estancos (p. ej. formulados con SPC) que estarían destinados al aporte de moléculas hidrosolubles. A pesar de estos resultados, la elección de cualquiera de estas dos opciones debe apoyarse en resultados de eficacia de bioencapsulación de nutrientes en los nauplios (Capítulos 4, 5 y 6).

El estudio sobre la degradación química (formación de peróxidos lipídicos) de los enriquecedores durante el proceso de enriquecimiento revela la importancia de este fenómeno estudiado con anterioridad por McEvoy y cols. (1995). El proceso tiene lugar a través de un mecanismo, caracterizado por la presencia de radicales libres, en el que se distinguen tres etapas (Gurr y Harwood, 1991):

1. Iniciación: la oxidación de los ácidos grasos insaturados empieza cuando un radical $X\cdot$ toma un átomo de hidrógeno de un grupo metileno del sustrato RH (PUFA) y produce la formación de un radical carbonado $R\cdot$.



2. Propagación: el radical carbonado $R\cdot$ se reajusta para formar un dieno conjugado, el cual reacciona con oxígeno molecular para dar lugar a radicales peroxi ($ROO\cdot$).



Los radicales $ROO\cdot$ pueden reaccionar con otro PUFA y formar hidroperóxidos ($ROOH$) y otro radical carbonado que permite la propagación de la reacción.



3. Terminación: el proceso termina cuando dos radicales $ROO\cdot$ reaccionan entre sí generando un producto no reactivo (aldehídos y cetonas) o bien a través de la participación de especies antioxidantes que atrapan los radicales libres (vitaminas antioxidantes y carotenoides).

Las condiciones bajo las que tiene lugar el enriquecimiento de presas vivas (luz, temperatura y oxígeno) son muy favorables para la formación de estos peróxidos a partir de los PUFAs presentes en los productos enriquecedores (McEvoy y cols., 1995). Aunque esto parece confirmarse en la mayoría de enriquecedores incluida gran parte de los liposomas, la formación de este tipo de compuestos tóxicos es claramente superior en la emulsión comercial en comparación a la registrada en los liposomas. En este sentido, los fosfolípidos han sido descritos como moléculas con propiedades autoprotectoras que les hacen menos susceptibles a la peroxidación en comparación con lípidos de tipo neutro como los FAEEs y los TAGs. El mecanismo de la acción antioxidante de los fosfolípidos no ha sido establecido de forma definitiva, pero se han propuesto algunos postulados que incluyen mecanismos sinérgicos con la vitamina E, acción quelante de los grupos fosfatos sobre moléculas prooxidantes y

efecto de barrera sobre el oxígeno en interfases aceite-agua (King y cols., 1992a). Esta mayor formación de peróxidos lipídicos en la emulsión comercial quedará confirmada en los análisis realizados en las larvas alimentadas con nauplios enriquecidos con la emulsión comercial empleada en este estudio como tratamiento control (Capítulo 6). Además de la diferencia de susceptibilidad frente a la peroxidación de los diferentes tipos lípidos, la calidad de los PUFAs parece ser la clave para explicar el diferente grado de peroxidación observado entre las distintas formulaciones de liposomas. De esta manera, Frankel (1998, p. 19) presentó las diferentes tasas de oxidación de ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados con diferente longitud de cadena, concluyendo que la susceptibilidad de estos compuestos está directamente relacionada con la longitud de la cadena hidrocarbonada. Esto podría explicar la mayor formación de peróxidos en los liposomas formulados con KPL frente a los de SPC por presencia de ácidos grasos de cadena más larga (ver niveles de HUFAs en la Tabla 2.1). Por su parte, el elevado contenido de ácidos grasos saturados de cadena más corta (16 C) y totalmente saturada del DPPC de la formulación LUVext de (DPPC:CHO) reduciría el grado de oxidación de éstos durante la incubación (Tabla 2.1).

En cuanto al estudio del cambio del tamaño original de los liposomas durante el enriquecimiento, los resultados indican que la presencia de nauplios en el medio de enriquecimiento lleva asociado un aumento de tamaño de los liposomas LUVext, mientras que este efecto es poco importante en preparaciones LUVdet. De forma natural, las suspensiones de liposomas tienden a registrar un aumento de tamaños como consecuencia de fenómenos de tipo físico como la fusión y la agregación. Concretamente, la fusión es la combinación de dos vesículas para formar una sola de mayor tamaño, mientras que la agregación es la unión de dos membranas suficientemente grandes como para que muestren una zona plana en la que se establecen fuerzas de van der Waals débiles que los mantiene unidos (New, 1995, p. 17). En este sentido, Koven y cols. (1999) propusieron el mecanismo de agregación de liposomas por presencia de cationes divalentes en el agua de mar para dar lugar a partículas entre 20 y 30 μm . Sin embargo, este mecanismo parece no representar un papel importante ya que en ausencia de nauplios de *Artemia*, la distribución de tamaños no varió apreciablemente. Los motivos de este hecho pueden hallarse en el gran dinamismo del proceso de enriquecimiento de nauplios, el cual hace poco probable el establecimiento de estas interacciones entre vesículas. Sin embargo, Hontoria y cols. (1994) constataron que liposomas sometidos a condiciones de reposo formaron agregados en los momentos posteriores a su preparación.

De todo lo expuesto puede deducirse que el aumento de tamaño de partículas registrado con algunos liposomas LUVext, cuando estos son incubados con nauplios, estaría motivado por otros fenómenos que no ocurren ni en liposomas LUVdet, ni en liposomas LUVext formulados con DPPC y CHO. En este último caso, el grado de compactación de las moléculas fosfolipídicas de DPPC favorecido por su estado sólido o gel en condiciones de enriquecimiento (la temperatura de 28 °C está por debajo de la T_c) podría explicar este comportamiento. En cambio, las razones por las que las formulaciones LUVdet no experimentaron cambios importantes ante la presencia de nauplios no parecen claras, aunque podrían relacionarse con una mayor estabilidad otorgada por el método de preparación. En cualquier caso, el aumento de tamaño de las vesículas no debe implicar una pérdida de sus capacidades enriquecedoras, a menos que esté asociado con otro tipo de inestabilidad como la evacuación de sustancias disueltas desde la fase acuosa. En realidad, algunos estudios sitúan el tamaño óptimo de partículas de enriquecedor en valores superiores al de los liposomas unilamelares evaluados en este experimento (Caers y cols., 2000; Gelabert-Fernández, 2001; Han y cols., 2005). Por tanto, los experimentos de enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con liposomas (Capítulos 4 y 5) podrán complementar los resultados del presente capítulo y esclarecer los mecanismos implicados.

A modo de resumen, se puede decir que los liposomas con altos contenidos en PUFAs exhiben una baja capacidad de retención de sustancias hidrosolubles, aunque la combinación de fosfolípidos de krill y colesterol puede paliar esta deficiencia. Además, otras formulaciones demostraron ser muy eficientes como vehículos de este tipo de nutrientes, principalmente formulaciones compuestas de SPC, EPC y DPPC. Una formulación que merece ser destacada es la LUVdet (SPC) que, a pesar de no aportar EFAs, demostró una gran capacidad para albergar sustancias disueltas en la fase acuosa interna. En cuanto a la formación de peróxidos, los liposomas compuestos por fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos largas y altamente insaturadas mostraron una mayor formación de estos compuestos tóxicos. Sin embargo, la degradación experimentada en la emulsión comercial usada como producto control en gran parte de los experimentos de este estudio fue mucho más importante que en los liposomas. Esta circunstancia puede tener implicaciones graves en las larvas alimentadas con nauplios con alto contenido en peróxidos. Por último, el estudio sobre el cambio en el tamaño de vesícula indica que, en ausencia de nauplios, los liposomas conservan su tamaño original. Sin embargo, la presencia de nauplios en el medio lleva consigo la

aparición de partículas de gran tamaño en algunas formulaciones de liposomas LUVext debido posiblemente a procesos de desestabilización que no afectarían a formulaciones LUVdet y LUVext (DPPC:CHO).

CAPÍTULO 4

ENRIQUECIMIENTO DE NAUPLIOS DE Artemia EN ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES Y FOSFOLÍPIDOS

4.1. Introducción

La baja capacidad de elongación y desaturación enzimática de los peces marinos convierte a los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en nutrientes esenciales (Sargent y cols., 2002). De esta forma, los ácidos grasos esenciales (EFAs) en peces marinos no son el ácido linolénico (18:3n-3, LNA) ni el ácido linoleico (18:2n-6, LA) como ocurre en especies dulceacuícolas, sino que esta categoría la ocupan el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y el ácido docosapentaenoico (22:6n-3, DHA) en la serie n-3, y el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) en la serie n-6. Como se explica en el Capítulo 1, los problemas derivados de la utilización de nauplios de *Artemia* en la alimentación de larvas de peces y crustáceos marinos se relacionan con las deficiencias en EFAs de nauplios de *Artemia*. En los 80 la atención se centró en la cantidad de EPA existente en los quistes de *Artemia* como garantía para la producción exitosa de larvas de peces y crustáceos marinos (Watanabe y cols., 1983; Léger y cols., 1985a). Sin embargo, a finales de los 80 y principios de los 90, los estudios sobre la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en las dietas para larvas marinas se dirigieron hacia el papel que el DHA y, más concretamente, la proporción DHA/EPA de las dietas tenía sobre el crecimiento, la resistencia al estrés y la correcta pigmentación de algunas especies marinas (Koven y cols., 1993b; Mourente y cols., 1993; Devresse y cols., 1994; Reitan y cols., 1994; Lavens y cols., 1995; Rodríguez y cols., 1997, 1998b). En los últimos años, el ARA ha sido considerado un ácido graso de gran importancia en la composición de la dieta de larvas de peces (Estévez y Kanazawa, 1996; Bessonart y cols., 1999; Estévez y cols., 1999; Estévez y cols., 2001). Concretamente, el ARA parece mejorar el crecimiento y pigmentación de las larvas de algunas especies de peces marinos, como consecuencia de su papel como precursor de eicosanoides (Estévez y cols., 1999; Bell y cols., 2003) y como modulador de la pigmentación de larvas de peces planos (Estévez y Kanazawa, 1996; Estévez y cols., 2001).

Además del contenido de EFAs, la clase lipídica en la que se incluyen en las dietas de larvas de peces marinos tiene especial importancia, siendo los fosfolípidos la forma molecular más apropiada para la administración de los EFAs a las larvas en cultivo (Sargent y cols., 1997). El efecto beneficioso de los fosfolípidos como componente de dietas de larvas de peces marinos fue descrito por primera vez por Kanazawa y cols. (1981). El hecho llamativo de este resultado radica en que la capacidad de síntesis de fosfolípidos *de*

novo ha sido descrita en peces a través de vías metabólicas de esterificación, como ocurre en mamíferos (Henderson y Tocher, 1992) y, por tanto, los fosfolípidos no deberían ser considerados nutrientes esenciales. A pesar de la atención prestada a resolver esta aparente discrepancia, los mecanismos implicados en el requerimiento nutricional de fosfolípidos en larvas de peces siguen siendo desconocidos. En este sentido, el estudio de los requerimientos de fosfolípidos en larvas de especies marinas es muy complicado debido, entre varios motivos, a la dificultad de modificar el contenido de lípidos polares (LPs) de las presas vivas utilizadas como primer alimento exógeno (Tackaert y cols., 1991; Camara, 1994; Rainuzzo y cols., 1994a, b). En cualquier caso, las deficiencias en fosfolípidos de la dieta de larvas de peces pueden conllevar consecuencias drásticas (Kanazawa y cols., 1983; Szlaminska y cols., 1993; Radünz-Neto y cols., 1994; Geurden y cols., 1995a, b). Por otra parte, los efectos beneficiosos de los fosfolípidos han sido descritos desde diferentes puntos de vista. Como se ha adelantado arriba, Sargent y cols. (1997) consideran a los fosfolípidos como la forma molecular óptima bajo la cual presentar los EFAs a larvas marinas. Estos autores sostienen que las larvas de peces marinos ingieren los PUFA n-3 en forma de fosfolípidos, más que en la de TAGs, argumentado esta consideración desde la sencilla premisa de que la composición de la dieta ideal para larvas de peces marinos estaría constituida por la de los huevos de los que proceden. Otro aspecto beneficioso de los fosfolípidos está basado en sus propiedades antioxidantes (King y cols., 1992a, b; McEvoy y cols., 1997) tal y como se descrito en el Capítulo 3. Este aspecto adquiere mucha importancia en los enriquecimientos de presas vivas en ácidos grasos poliinsaturados debido a la susceptibilidad de estos compuestos a la peroxidación. Además, algunos estudios resaltan la importancia de los fosfolípidos en las dietas de larvas marinas por su capacidad moduladora de la absorción y transporte lipídico (Koven y cols., 1993a; Teshima y cols., 1993; Coutteau y cols., 1997; Geurden y cols., 1998), como promotores del crecimiento (Kanazawa y cols., 1985; Gisbert y cols., 2005) y como agentes que aumentan la tolerancia al estrés (Kanazawa, 1997).

Los liposomas formulados con fosfolípidos de origen marino (ricos en EFAs) representan un producto con unas buenas perspectivas para su uso en el enriquecimiento de presas vivas. Su utilización fue probada por primera vez por McEvoy y cols. (1996), demostrando su capacidad para aumentar la fracción de LPs y el contenido de EFAs de nauplios de *Artemia*. A pesar de estos resultados preliminares, la puesta en funcionamiento de un producto enriquecedor basado en liposomas exige un estudio más minucioso que establezca el

procedimiento óptimo de utilización. Además, las características estructurales y de composición que distinguen a los liposomas de otros productos enriquecedores disponibles en el mercado y que han sido planteadas en el Apartado 3.1, exigen una adecuación de los protocolos de enriquecimientos seguidos. Con estas premisas, el presente capítulo tiene por objeto el estudio del enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con diferentes tipos de liposomas compuestos por fosfolípidos marinos ricos en PUFAs, abordando puntos como el efecto del tiempo de incubación, de la calidad y cantidad de aireación, de la densidad naupliar, de la concentración de producto enriquecedor y de su dosificación sobre la eficacia de los liposomas como producto enriquecedor. Para ello, se llevaron a cabo cinco experimentos, los cuales se describen a continuación:

1. El primer experimento evaluó la capacidad enriquecedora de tres tipos de liposomas formulados con krill con el objetivo de determinar la formulación más idónea. Simultáneamente, se valoró el grado de enriquecimiento en función del tiempo de incubación ya que esta variable se relaciona directamente con la cantidad de material enriquecedor que el nauplio es capaz de incorporar (Rodríguez y cols., 1996). Los nauplios recién eclosionados (estadio Instar I) poseen una cutícula que cierra la abertura bucal e impide que su actividad filtradora tenga continuidad con el paso de los materiales filtrados al tracto digestivo. Éste comienza después de la primera muda con la que el nauplio pasa a la primera fase metanaupliar (Schrehardt, 1987), unas 7-8 h después de la eclosión. A partir de ese momento, el nauplio incorpora cualquier partícula presente en el medio con tamaños comprendidos entre decenas de nanómetros y algunas micras. Por esta razón, la cantidad de material enriquecedor incorporado es teóricamente proporcional al tiempo que, a partir de la primera muda, el nauplio pasa en el medio de enriquecimiento. Sin embargo, ciertas consideraciones exigen el ajuste del tiempo de incubación para optimizar la eficiencia del enriquecimiento. En primer lugar, los nauplios experimentan un aumento de tamaño durante el proceso de enriquecimiento, pasando de 400-600 μm en el momento de la eclosión (Léger y cols., 1986) a unos 900 μm al cabo de 24 h (Olsen y cols., 1999). Esto puede acarrear problemas relacionados con la imposibilidad de ser ingeridos por larvas con un tamaño de boca demasiado pequeño. Por otra parte, la reducción del tiempo de incubación disminuye el tiempo durante el cual los nauplios metabolizan los productos enriquecedores. En este sentido, la actividad metabólica de las presas vivas transformando fosfolípidos en TAGs (Tackaert y cols., 1991; Camara, 1994; Rainuzzo y cols., 1994a, b), así como la conversión de DHA a EPA (Navarro y cols.,

1999) sugieren la aplicación de tiempos de incubación cortos para reducir, así, actividades metabólicas indeseadas. Por último, la susceptibilidad de los PUFAs a la peroxidación, especialmente favorecida en las condiciones en las que tienen lugar los enriquecimientos, se reduciría con tiempos de incubación cortos. La ingestión de nauplios con alto contenido en este tipo de compuestos nocivos podría comportar efectos negativos para las larvas en cultivo (Hipkiss y cols., 1997; Tesoriere y cols., 2002; Del Rio y cols., 2005).

2. Un segundo experimento centró la atención en el efecto de la aireación sobre la calidad del enriquecimiento en EFAs, además del efecto sobre la supervivencia final de los nauplios. La aireación tiene un doble papel durante el procedimiento de enriquecimiento de presas vivas. En primer lugar, actúa como fuente de oxígeno disuelto necesario para satisfacer las necesidades respiratorias de los nauplios. En este sentido, los fabricantes de productos enriquecedores suelen aconsejar el uso de sus productos con valores de oxígeno disuelto por encima de 4 mg l^{-1} . Por otra parte, la aireación actúa como sistema de agitación, haciendo que los nauplios se repartan homogéneamente en el recipiente de enriquecimiento y puedan abastecerse de producto enriquecedor en todo momento, evitando además su deposición en el fondo del recipiente. La aplicación de aireación, aunque necesaria por lo explicado anteriormente, puede conllevar efectos negativos de origen muy diverso. Primero, la integridad física de las partículas puede verse alterada por la calidad (tamaño de burbujas) y la cantidad (flujo de aire) de la aireación aplicada en un enriquecimiento, determinando a la efectividad de filtración de los nauplios. En segundo lugar, los niveles elevados de oxígeno disuelto en el medio de enriquecimiento pueden comportar la producción de peróxidos lipídicos cuya toxicidad ha sido descrita anteriormente. Otro efecto negativo derivado de la aireación ha sido observado en enriquecimientos con liposomas, en los cuales se han registrado casos de baja supervivencia de los nauplios, relacionada aparentemente con procesos resultantes de la tensoactividad de los fosfolípidos. Así, la aplicación de aireación sobre agua de mar con liposomas produce una espuma persistente cuya formación acaba retirando parte de los nauplios atrapados en ella hacia fuera de la columna de agua. Además, un segundo efecto inherente al empleo de liposomas parece deberse a las propiedades detergentes de los fosfolípidos sobre el contenido corporal del nauplio. En este sentido, la incubación de nauplios en suspensiones con liposomas tiene asociada la aparición de compuestos de naturaleza lipofílica en el medio y pegados a las paredes del recipiente donde se lleva a cabo la incubación. El análisis de estos productos señala una procedencia de los nauplios.

3. Se planteó un tercer experimento para determinar la calidad del enriquecimiento al variar la densidad naupliar en el medio de incubación con el producto enriquecedor. En la mayoría de trabajos que aparecen en la bibliografía los enriquecimientos de nauplios de *Artemia* se llevan a cabo a densidades que varían de 100 a 300 nauplios ml^{-1} (McEvoy y cols., 1996; van Stappen, 1996). Sin embargo, en los trabajos publicados en los que se efectúan enriquecimientos de nauplios de *Artemia* con liposomas la densidad naupliar se fija en valores muy superiores a éstos (Hontoria y cols., 1994; Ozkizilcik y Chu, 1994; McEvoy y cols., 1996). En este experimento también se estimó la supervivencia naupliar observada en los diferentes tratamientos.

4. Un cuarto experimento evaluó la eficacia del enriquecimiento y la supervivencia naupliar resultante en función de la concentración de liposomas en el medio. Mientras que en los enriquecimientos llevados a cabo con emulsiones se fija, generalmente, la cantidad de enriquecedor entre 0,4 y 0,60 g l^{-1} (van Stappen, 1996), los datos disponibles en la bibliografía acerca de la concentración de producto enriquecedor basado en liposomas son más variables. Ozkizilcik y Chu (1994) realizaron incubaciones de nauplios en medios con liposomas, donde la concentración lipídica resultó de 1,20 g l^{-1} . Por otra parte, la concentración de lípidos en forma de liposomas fue de 1,0 g l^{-1} en el estudio realizado por McEvoy y cols. (1996).

5. Por último, el capítulo se completa con un quinto experimento dirigido a determinar la incorporación de EFAs bajo diferentes modos de dosificación de los liposomas. Los fabricantes de productos enriquecedores aconsejan dispensar el enriquecedor en dos dosis separadas en el tiempo, de forma que los nutrientes que los componen no sufran durante tanto tiempo la agresividad de las condiciones del enriquecimiento. Por ello, se comprobó si el empleo de liposomas como producto enriquecedor en EFAs también muestra el mismo comportamiento que otros productos comerciales.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Enriquecimiento de nauplios de Artemia con diferentes tipos de liposomas: efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos

La capacidad enriquecedora de tres tipos distintos de liposomas (MLV, LUVext y LUVdet) fue evaluada en términos de incorporación de EFAs y fosfolípidos. La preparación de las tres

formulaciones se llevó a cabo según las metodologías descritas en el Apartado 2.1. Los tres tipos de liposomas fueron formulados con extracto de fosfolípidos de krill (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EE.UU.) como único componente de membrana.

La obtención de los nauplios de *Artemia* se llevó a cabo a partir de quistes comerciales EG (Inve, Gante, Bélgica) (Apartado 2.2.1). Una vez dispuestos en los tubos de enriquecimiento a densidades de 300 individuos ml^{-1} , los nauplios fueron incubados en agua de mar con las tres formulaciones de liposomas y un cuarto tratamiento control consistente en la emulsión comercial Super Selco (Inve, Gante, Bélgica). La concentración de producto enriquecedor fue de 0,50 g lípido l^{-1} y la temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Los tubos de enriquecimiento estuvieron iluminados con tubos fluorescentes bajo una intensidad lumínica en la superficie del medio de enriquecimiento de unos 1500-2000 lux. El flujo de aire fue aproximadamente de 1,0 lpm, aplicado mediante varillas de vidrio de 0,5 cm de sección interna. Las muestras de nauplios enriquecidos se tomaron tras 18 y 21 h de incubación en los medios con enriquecedor. Parte de los nauplios se dejó a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ en agua de mar sin enriquecedor durante un periodo adicional de 3 h. Estas últimas muestras informan sobre la transformación de los nutrientes bioencapsulados (EFAs y fosfolípidos) por la acción metabólica de los nauplios cuando éstos permanecen varias horas en los tanques de cría larvaria sin ser ingeridos por las larvas.

Tras el periodo de incubación correspondiente (18, 21 o 24 h), los nauplios de *Artemia* eran recogidos en una malla de plancton de luz de 100 μm , donde se enjuagaban, primero con agua corriente abundante y, después, con agua destilada para eliminar restos de enriquecedor y de sales del agua intersticial (Apartado 2.2.2). Las muestras de nauplios fueron inmediatamente congeladas a -20°C y, seguidamente, liofilizadas hasta su posterior análisis.

La extracción de los lípidos totales y los análisis de clases de lípidos y ácidos grasos se realizaron según las metodologías descritas en el Apartado 2.4. Cabe apuntar que la presentación de las clases de lípidos en fracciones combinadas (Apartado 4.3.1) obedece a la diferente resolución ofrecida por placas de HPTLC de dos marcas comerciales distintas (Merck y Panreac) y, en consecuencia, la comparación entre muestras analizadas en ambos tipos de placas sólo es posible mediante esta combinación (Figura 2.4).

El análisis estadístico se realizó siguiendo el procedimiento previsto en el Apartado 2.5. Concretamente, el estudio estadístico comparó los valores de las variables biológicas de los cuatro

productos enriquecedores (factor de variación: producto enriquecedor) en cada uno de los tres puntos de muestreo. Adicionalmente, los contenidos de lípidos totales de los nauplios enriquecidos fueron tratados estadísticamente desde otro punto de vista basado en la comparación de esta variable entre los distintos puntos de muestreo (factor de variación: tiempo de incubación) de cada producto enriquecedor. Este enfoque permite estimar la dinámica de incorporación del enriquecedor a lo largo del tiempo (Figura 4.1).

4.2.2. Efecto de la aireación aplicada durante el enriquecimiento de nauplios de Artemia sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales

Para el estudio del efecto de la calidad (tamaño de burbuja) y de la cantidad (flujo) de la aireación sobre la incorporación de EFAs en nauplios, se realizaron seis series de enriquecimientos resultantes de la combinación de tres niveles de flujo de aire (0,6, 1,0 y 3,0 litros por minuto, lpm) y dos sistemas difusión de aire. Los dos sistemas de difusión de aire empleados fueron: varillas de vidrio tubulares (“varillas”) con una sección interior de diámetro 0,5 cm y que generaban burbujas grandes; y piedras difusoras (“piedras”), consistentes en elementos muy porosos que producían burbujas de pequeño tamaño. Cada una de estas series se llevó a cabo con nauplios recién eclosionados procedentes de seis lotes distintos de 10 g de quistes EG (Inve, Gante, Bélgica). Los procedimientos de eclosión y separación de los nauplios, así como su posterior disposición en los tubos de enriquecimiento, fueron los mismos que los descritos en el Apartado 2.2. Cada combinación de flujo de aire y de sistema de difusión fue evaluada utilizando liposomas LUVdet y la emulsión comercial Super Selco, estableciendo triplicados independientes en cada caso (tubos de enriquecimiento diferentes). Entre las formulaciones de liposomas empleadas en el experimento anterior (Apartado 4.2.1), los liposomas LUVdet de KPL fueron escogidos como modelo de liposoma por los buenos resultados alcanzados en dicho experimento en comparación con las preparaciones MLV y LUVext. El flujo de aire se controló en cada tubo de enriquecimiento de forma individualizada mediante rotámetros (Key Instruments, Trevese, Pennsylvania, EE.UU.). Las incubaciones se llevaron a cabo con una concentración de producto enriquecedor de 0,50 g lípido l⁻¹, una temperatura de incubación de 28 ± 1°C y una densidad de nauplios de 300 nauplios ml⁻¹, valores habituales en la mayoría de experimentos del presente estudio (Apartado 2.2). En esta ocasión, la incubación de los nauplios en el medio de enriquecimiento se prolongó durante 21 h, tiempo en el que los liposomas LUVdet

registraron un perfil lipídico óptimo. Tras este periodo de incubación, los nauplios fueron recogidos, lavados e inmediatamente congelados a -20°C . A partir de muestras liofilizadas, se procedió al análisis de los lípidos totales y de los ácidos grasos (Apartado 2.4). El análisis de las clases lipídicas de los nauplios fue obviado en este experimento y en los siguientes (Apartados 4.2.3, 4.2.4 y 4.2.5) debido a las escasas y, en ocasiones, nulas diferencias entre los contenidos de lípidos polares de los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial y los tratados con liposomas LUVdet del experimento del Apartado 4.2.1 (Tabla 4.1). De esta forma, el único criterio para el establecimiento de los parámetros óptimos de enriquecimiento con liposomas LUVdet fue el nivel de EFAs obtenidos en los nauplios.

En este experimento se estimó la supervivencia de los nauplios tras 21 h de incubación bajo los distintos modos de aireación planteados (Apartado 2.2.3), como consecuencia de la observación de mortandades apreciables en el experimento anterior.

El análisis estadístico de las variables biológicas se realizó mediante el procedimiento descrito en el Apartado 2.5, considerando separadamente los dos productos enriquecedores evaluados (emulsión lipídica comercial y LUV detergente). De esta forma, el estudio dirige su atención al efecto de los diferentes modos de aireación (factor de variación) sobre la eficacia de ambos enriquecedores por separado.

4.2.3. Efecto de la densidad naupliar durante el enriquecimiento de nauplios de Artemia sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales

Este experimento estudió la incorporación de EFAs utilizando como modelo de liposoma vesículas LUVdet formuladas únicamente con fosfolípidos de krill y la emulsión comercial Super Selco como tratamiento control. Ambos productos fueron evaluados en tres series de enriquecimientos correspondientes a tres densidades naupliar distintas: 100, 300 y 700 individuos ml^{-1} , utilizando tres réplicas independientes (tubos de enriquecimiento diferentes) para cada producto y en cada una de las series. Los nauplios fueron obtenidos de la eclosión de 3, 10 y 20 g de quistes Inve EG para las densidades de 100, 300 y 700 nauplios ml^{-1} , respectivamente. La densidad de quistes durante las tres eclosiones se mantuvo aproximadamente constante con el fin de obtener nauplios con unas condiciones de vitalidad similares al inicio de los enriquecimientos. La aireación aplicada en este experimento fue de 1 lpm, utilizando como sistema de difusión de aire las mismas varillas descritas en el apartado anterior. La concentración de enriquecedor (0,50 g lípido l^{-1}), el tiempo de

incubación (21 h), la temperatura de incubación ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) y la iluminación de los tubos de enriquecimiento (1500-2000 lux) se mantuvieron iguales con respecto al experimento del apartado anterior. Las muestras de nauplios enriquecidos bajo las diferentes densidades fueron recolectadas según el procedimiento descrito en el Apartado 2.2.2, congeladas a -20°C y liofilizadas para su conservación hasta el análisis de lípidos totales y ácidos grasos (Apartado 2.4).

La supervivencia de los nauplios correspondientes a los seis tratamientos (dos enriquecedores x tres densidades de nauplios) se estimó tras 21 h de incubación (Apartado 2.2.3).

Con el mismo planteamiento que en el apartado anterior, los datos biológicos se analizaron estadísticamente mediante el procedimiento que se detalla en el Apartado 2.5, comparando los tres tratamientos establecidos para cada uno de los dos productos enriquecedores (emulsión comercial y liposomas) y con la densidad naupliar como único factor de variación.

4.2.4. Efecto de la concentración de liposomas durante el enriquecimiento de nauplios de Artemia sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales

Este experimento consistió en la realización de enriquecimientos de nauplios de *Artemia* bajo tres concentraciones distintas de liposomas LUVdet formulados con fosfolípidos de krill. Un cuarto tratamiento consistente en nauplios enriquecidos con la emulsión Super Selco se estableció como control. Las concentraciones de liposomas fueron de 0,25, 0,50 y 0,75 g lípido l^{-1} correspondientes a los tratamientos LUVdet 0.25, LUVdet 0.50 y LUVdet 0.75, respectivamente. Como se explica en el Apartado 2.2.2, la concentración de enriquecedor se determinó considerando únicamente la masa de la fracción lipídica de los liposomas o de la emulsión, sin tener en cuenta el peso del agua y de otros compuestos disueltos en ella. Los nauplios de *Artemia* obtenidos de quistes comerciales EG de Inve (Gante, Bélgica) fueron trasvasados a los tubos de enriquecimiento para obtener una densidad naupliar de 300 nauplios ml^{-1} . La temperatura de incubación se fijó en $28 \pm 1^\circ\text{C}$, mientras que la aireación fue de 1,0 lpm aplicada mediante las varillas descritas en el Apartado 4.2.2. La incubación de los nauplios con el producto enriquecedor (liposomas o emulsión) se prolongó durante 21 h, periodo después del cual se recolectaron las muestras de nauplios. Tras ser enjuagadas en agua corriente y agua destilada, las muestras se congelaron a -20°C antes de ser liofilizadas. Los análisis de los lípidos

totales, ácidos grasos y la estimación de la supervivencia naupliar se realizaron siguiendo los procedimientos detallados en el Capítulo 2.

Las variables biológicas obtenidas con los cuatro tratamientos se sometieron al análisis estadístico mediante el procedimiento detallado en el Apartado 2.5 con un único factor de variación (concentración de enriquecedor).

4.2.5. Efecto de la dosificación de liposomas durante el enriquecimiento de nauplios de Artemia sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales

Se establecieron tres tratamientos con liposomas LUVdet formulados con fosfolípidos de krill, además del tratamiento control de emulsión Super Selco. De entre los tratamientos con liposomas, dos de ellos, LUVdet 2x0.25 y LUVdet 2x0.375, consistieron en enriquecimientos con dos dosis de 0,25 y 0,375 g lípido l⁻¹, dispensadas al inicio (t=0) y tras 7 h (t=7), respectivamente. El tercer tratamiento de liposomas (LUVdet R0.5) consistió en una sola dosis de 0,50 g lípido l⁻¹ dispensada 7 h después de dar comienzo la incubación de los nauplios recién eclosionados. Este último tratamiento permitió comprobar si el periodo de incubación de los nauplios durante el paso por el estadio Instar I (aproximadamente 7-8 h) puede ser obviada, dado que en esta etapa los nauplios están dotados de una cutícula en la abertura bucal que impide la incorporación del material filtrado al tracto digestivo. El tratamiento control (Super Selco) también fue dispensado en dos dosis de 0,25 g lípido l⁻¹ siguiendo el mismo horario que los tratamientos LUVdet 2x0.25 y LUVdet 2x0.375. Todos los tratamientos enriquecedores se evaluaron por triplicado en tres tubos de enriquecimiento independientes. El resto de condiciones de los enriquecimientos no varió con respecto a los experimentos correspondientes a este capítulo y, así, la temperatura de incubación fue de 28 ± 1°C, la densidad de nauplios de 300 nauplios ml⁻¹, la iluminación entre 1500-2000 lux y la aireación de 1,0 lpm aplicada mediante las varillas de vidrio usadas en los experimentos anteriores. La toma de muestras, su procesado y posterior análisis se realizó según los procedimientos ya descritos anteriormente (Capítulo 2).

La estimación de la supervivencia naupliar se llevó a cabo por los procedimientos habituales (Apartado 2.2.3). En los tubos correspondientes a la emulsión, la estimación de la densidad final fue corregida con respecto a la dilución que tenía lugar al añadir la segunda dosis dispersada en 100 ml de agua de mar.

Las variables biológicas se sometieron al análisis estadístico mediante el procedimiento detallado en el Apartado 2.5 con un único factor de variación (dosificación del enriquecedor).

4.3. Resultados

4.3.1. Enriquecimiento de nauplios de Artemia con diferentes tipos de liposomas: efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos

La dinámica de bioencapsulación de los distintos productos enriquecedores (emulsión comercial, MLV, LUVext y LUVdet) a lo largo del tiempo de incubación puede inferirse a partir del contenido de lípidos totales de los nauplios (Figura 4.1). En los tratamientos MLV y LUVext, la cantidad máxima de la fracción lipídica se obtiene

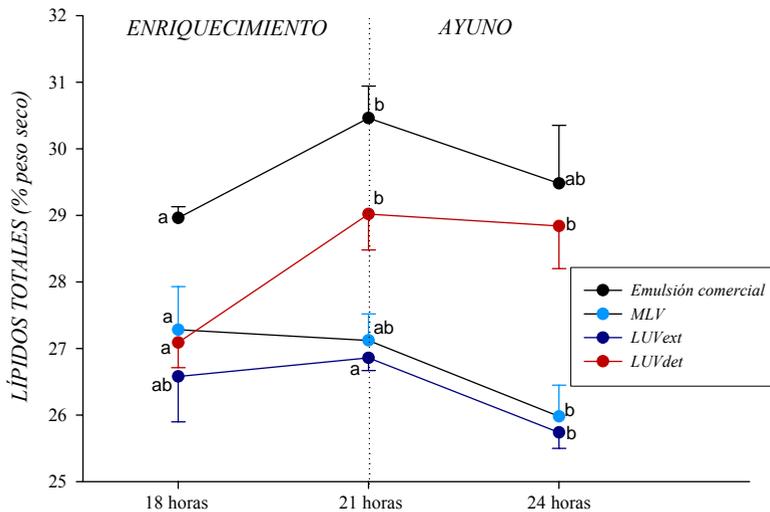


Figura 4.1. Contenidos de lípidos totales (porcentaje del peso seco) de nauplios de *Artemia* enriquecidos. Las muestras de 24 h corresponden a nauplios mantenidos durante 3 h en agua de mar tras 21 h de incubación con el producto enriquecedor. Se han representado las medias de tres replicados y las barras de error son las desviaciones típicas. Para cada enriquecedor, los puntos de muestreo que comparten una misma letra son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

tras 18 h de enriquecimiento, sin observarse mayores incrementos durante las 3 h siguientes (punto de 21 h). El porcentaje de lípidos parece describir un descenso durante el periodo de ayuno (de 21 a 24 h) en estos dos tratamientos de liposomas, aunque no se pueden establecer diferencias a nivel estadístico ($P \leq 0,05$). Por otro lado, los nauplios enriquecidos con LUVdet y la emulsión comercial aumentaron su contenido lipídico hasta las 21 h, manteniendo este máximo durante el periodo de ayuno hasta las 24 h.

Los contenidos de lípidos totales de los nauplios se presentan en la Tabla 4.1, que muestra, además, los perfiles de las clases de lípidos en los puntos de muestreo de 18, 21 y 24 h. El análisis estadístico realizado en esta ocasión indica que el nivel de los lípidos totales de los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial es mayor en los puntos de muestreo de 18 y 21 h, en comparación con el de los nauplios de los tratamientos con liposomas. Sin embargo, los nauplios LUVdet igualan a los nauplios control en el punto de muestreo de 24 h, ya que mantienen los niveles de lípidos totales a diferencia de los nauplios control que experimentan un ligero descenso. En cuanto a las clases de lípidos, la fracción de LPs de los nauplios enriquecidos con MLVs y LUVext es significativamente superior a la de LUVdet y la emulsión control en los tres puntos de muestreo (Tablas 4.1a, b y c). Con respecto a los nauplios control, la fracción combinada PE/CL/PG/PA (ver abreviaturas en el pie de tabla) de los nauplios enriquecidos con MLV y LUVext muestra niveles significativamente superiores en los tres puntos de muestreo. Sin embargo, otras fracciones combinadas de lípidos polares (PS/PI y PC/SM) no contribuyen en igual medida a aumentar la diferencia observada en el porcentaje total de LPs. En cualquier caso, las fracciones PE/CL/PG/PA y PS/PI son, en general, mayores en nauplios enriquecidos con LUVdet respecto a los nauplios control para los puntos de muestreo de 18 y 24 h, respectivamente. Los nauplios control y LUVdet presentan una fracción lipídica con un porcentaje de TAGs cercano al 60% en los tres puntos de muestreo, significativamente superior al medido en los nauplios MLV y LUVext (50-56%). Por su parte, los FAEEs, componentes principales de la emulsión comercial Super Selco y ausentes en la composición de los liposomas, presentan niveles altos en los nauplios control enriquecidos durante 18 y 21 h (Tabla 4.1a y b, respectivamente), aunque el periodo de ayuno (desde 21 h a 24 h) hizo que su porcentaje disminuyera.

Los perfiles de ácidos grasos de los nauplios tratados con los diferentes productos enriquecedores se detallan en la Tabla 4.2. Además, la Figura 4.2 destaca gráficamente los contenidos de ARA, EPA y DHA medidos en los puntos de muestreo de 18 (a), 21(b) y 24

Tabla 4.1. Composición de clases de lípidos (porcentaje del total de lípidos) y lípidos totales (porcentaje del peso seco) de nauplios de *Artemia* enriquecidos en los puntos de muestreo de 18 h (a), 21 h (b) y 24 h (c). Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Clase de lípido (a)	EC	MLV	LUVext	LUVdet
	SE	3,0 (0,1) ^a	2,9 (0,2) ^a	3,2 (0,1) ^a
FAEE	6,0 (0,3) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b	N.D. ^b
Desconocido1	N.D. ^a	2,5 (0,2) ^b	2,9 (0,4) ^b	2,4 (0,0) ^b
TAG	57,7 (0,7) ^a	55,5 (1,0) ^b	52,7 (0,5) ^c	57,9 (0,5) ^a
Desconocido2	N.D. ^a	0,6 (0,1) ^b	0,7 (0,0) ^b	0,5 (0,1) ^b
FFA	1,8 (0,1) ^a	2,3 (0,4) ^{ab}	3,0 (0,6) ^b	2,6 (0,1) ^{ab}
CHO	6,4 (0,3) ^a	8,2 (0,6) ^{bc}	9,2 (0,1) ^b	7,6 (0,4) ^c
MAG/DAG	2,5 (0,1) ^a	2,6 (0,1) ^a	1,7 (0,1) ^b	2,5 (0,1) ^a
Pigmentos	1,1 (0,3) ^a	1,5 (0,1) ^a	1,0 (0,1) ^a	1,2 (0,4) ^a
PE/CL/PG/PA	8,9 (0,2) ^a	10,2 (0,2) ^b	10,9 (0,2) ^c	9,7 (0,2) ^b
PS/PI	3,6 (0,1) ^a	3,8 (0,4) ^{ab}	4,3 (0,2) ^b	3,9 (0,1) ^{ab}
PC/SM	8,9 (0,3) ^a	10,0 (0,3) ^b	10,3 (0,1) ^b	8,8 (0,5) ^a
Lípidos polares	21,4 (0,4) ^a	23,9 (0,6) ^b	25,6 (0,4) ^c	22,4 (0,7) ^a
% Lípido (PS)	29,0 (0,2) ^a	27,3 (0,7) ^b	26,6 (0,7) ^b	27,1 (0,4) ^b

Clase de lípido (b)	EC	MLV	LUVext	LUVdet
	SE	2,0 (0,2) ^a	2,6 (0,3) ^a	2,5 (0,2) ^a
FAEE	5,7 (2,1) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b	N.D. ^b
Desconocido1	N.D. ^a	3,4 (0,2) ^b	3,2 (0,2) ^b	3,3 (0,2) ^b
TAG	58,1 (1,5) ^a	55,4 (0,8) ^b	54,7 (0,7) ^b	59,8 (0,4) ^a
Desconocido2	N.D. ^a	0,7 (0,3) ^b	0,9 (0,2) ^b	0,7 (0,2) ^b
FFA	2,1 (1,0) ^a	1,5 (0,3) ^a	1,7 (0,5) ^a	1,3 (0,2) ^a
CHO	7,3 (0,6) ^a	8,2 (0,8) ^{ab}	9,4 (0,3) ^b	7,5 (0,2) ^a
MAG/DAG	2,1 (0,1) ^a	2,3 (0,3) ^a	1,2 (0,1) ^b	2,0 (0,0) ^a
Pigmentos	0,8 (0,1) ^a	1,4 (0,1) ^b	0,7 (0,2) ^a	0,9 (0,1) ^a
PE/CL/PG/PA	8,9 (0,5) ^a	10,5 (0,3) ^b	10,8 (0,1) ^b	9,5 (0,3) ^a
PS/PI	3,6 (0,2) ^a	3,9 (0,1) ^a	4,3 (0,1) ^b	3,7 (0,1) ^a
PC/SM	9,5 (0,3) ^{ab}	10,0 (0,5) ^a	10,5 (0,2) ^a	8,8 (0,6) ^b
Lípidos polares	22,0 (0,9) ^a	24,4 (0,5) ^b	25,6 (0,4) ^b	21,9 (0,8) ^a
% Lípido (PS)	30,5 (0,5) ^a	27,1 (0,4) ^b	26,9 (0,2) ^b	29,0 (0,5) ^c

(Continúa en la página siguiente)

Clase de lípido (c)				
	EC	MLV	LUVext	LUVdet
SE	2,4 (0,3) ^a	2,3 (0,0) ^a	2,2 (0,2) ^a	2,3 (0,4) ^a
FAEE	2,2 (0,8) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b	N.D. ^b
Desconocido1	N.D. ^a	3,3 (0,1) ^b	3,9 (0,2) ^b	3,4 (0,8) ^b
TAG	60,7 (0,4) ^a	51,6 (1,7) ^b	52,6 (1,1) ^b	57,8 (1,0) ^a
Desconocido2	N.D. ^a	1,2 (0,4) ^b	0,9 (0,1) ^b	1,0 (0,3) ^b
FFA	1,4 (0,4) ^a	1,2 (0,5) ^a	0,9 (0,2) ^a	0,8 (0,1) ^a
CHO	7,5 (0,2) ^a	9,8 (0,3) ^b	10,1 (0,6) ^b	8,2 (0,1) ^a
MAG/DAG	2,1 (0,2) ^a	1,8 (0,3) ^a	1,8 (0,1) ^a	2,0 (0,2) ^a
Pigmentos	1,1 (0,3) ^a	0,9 (0,2) ^a	0,9 (0,0) ^a	1,1 (0,2) ^a
PE/CL/PG/PA	9,0 (0,3) ^a	11,5 (0,2) ^c	11,1 (0,5) ^{bc}	10,1 (0,5) ^{ab}
PS/PI	3,9 (0,1) ^a	4,6 (0,0) ^b	4,6 (0,1) ^b	4,1 (0,1) ^c
PC/SM	9,8 (0,4) ^a	11,8 (0,4) ^b	10,9 (0,2) ^{ab}	9,3 (1,3) ^a
Lípidos polares	22,7 (0,8) ^a	27,9 (0,5) ^b	26,6 (0,8) ^b	23,5 (1,8) ^a
% Lípido (PS)	29,5 (0,9) ^a	26,0 (0,5) ^b	25,7 (0,2) ^b	28,8 (0,6) ^a

EC: emulsión comercial; MLV: liposomas multilamelares; LUVext: liposomas unilamelares preparados por extrusión; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente.

N.D.: no detectado (<0,05%); PC/SM: fracción conjunta de fosfatidilcolina y esfingomielina; PS/PI: fracción conjunta de fosfatidilserina y fosfatidilinositol; PE/CL/PG/PA: fracción conjunta de fosfatidiletanolamina, cardioplipina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico; MAG/DAG: fracción conjunta de monoglicéridos y diglicéridos; FFA: ácidos grasos libres; TAG: triglicéridos; FAEE: ésteres etílicos de ácido graso; SE: ésteres de esteroles.

h (c). Tras 18 h de incubación, los nauplios enriquecidos con la emulsión control presentan porcentajes superiores de DHA y DPA al resto de tratamientos, aunque no de EPA (Tabla 4.2a). Sin embargo, el total de HUFA n-3 no muestra diferencias significativas en comparación con los nauplios tratados con liposomas, a excepción del tratamiento MLV que presenta un contenido inferior de HUFA n-3. El contenido de ARA también muestra niveles superiores en los nauplios control en relación al hallado en los tratamientos con liposomas, haciendo que el total de HUFA n-6 sea también superior en este tratamiento control. Por otro lado, los niveles de ácido palmítico (16:0), constituyente muy importante del extracto de fosfolípido de krill (Tabla 2.1), contribuye a que el total de ácidos grasos saturados de los nauplios enriquecidos con liposomas presente porcentajes superiores a los nauplios control. A las 21 h (Tabla 4.2b y Figura 4.2b) las diferencias en el perfil de ácidos grasos entre el tratamiento control y los tratamientos MLV y LUVext empiezan a ponerse de manifiesto. En este sentido, el total de ácidos grasos poliinsaturados de ambos

Tabla 4.2. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de nauplios de *Artemia* enriquecidos en los puntos de muestreo 18 h (a), 21 h (b) y 24 h (c). Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

<i>Ácido graso (a)</i>				
	Emulsión comercial	MLV	LUVext	LUVdet
16:0	9,2 (0,2) ^a	11,8 (0,2) ^b	11,5 (0,1) ^b	12,1 (0,5) ^b
18:0	4,3 (0,0) ^a	4,3 (0,1) ^a	4,3 (0,1) ^a	4,3 (0,1) ^a
18:1n-9	25,4 (0,3) ^a	25,6 (0,2) ^a	25,3 (0,4) ^a	25,1 (0,2) ^a
18:2n-6	4,2 (0,1) ^a	3,7 (0,0) ^b	3,7 (0,1) ^b	3,6 (0,1) ^b
18:3n-3	14,3 (0,3) ^a	15,5 (0,1) ^b	15,4 (0,3) ^b	14,7 (0,6) ^{ab}
20:4n-6	1,3 (0,1) ^a	1,1 (0,0) ^b	1,1 (0,0) ^b	1,1 (0,0) ^b
20:5n-3	10,7 (0,6) ^a	10,4 (0,6) ^a	11,4 (0,9) ^a	11,8 (0,2) ^a
22:5n-3	1,1 (0,0) ^a	0,3 (0,0) ^b	0,2 (0,0) ^b	0,3 (0,0) ^b
22:6n-3	5,6 (0,5) ^a	4,3 (0,3) ^b	4,3 (0,1) ^b	4,5 (0,2) ^b
Total identificados	95,4 (0,5) ^a	95,7 (0,1) ^a	95,6 (0,1) ^a	95,6 (0,3) ^a
Saturados	15,6 (0,4) ^a	18,2 (0,3) ^b	17,7 (0,1) ^b	18,3 (0,6) ^b
Monoinsaturados	39,5 (0,5) ^a	39,2 (0,4) ^a	38,9 (0,7) ^a	38,6 (0,7) ^a
Poliinsaturados	40,3 (0,9) ^a	38,2 (0,7) ^a	39,1 (0,7) ^a	38,7 (1,0) ^a
Total n-3	34,3 (0,8) ^a	33,1 (0,7) ^a	34,0 (0,8) ^a	33,8 (0,9) ^a
Total n-6	6,4 (0,2) ^a	5,3 (0,1) ^b	5,2 (0,1) ^b	5,0 (0,1) ^b
HUFA n-3	18,0 (1,2) ^a	15,6 (0,9) ^b	16,5 (1,0) ^{ab}	17,1 (0,2) ^{ab}
HUFA n-6	1,8 (0,1) ^a	1,4 (0,0) ^b	1,4 (0,0) ^b	1,3 (0,0) ^b
DHA/EPA	0,5 (0,0) ^a	0,4 (0,0) ^b	0,4 (0,0) ^b	0,4 (0,0) ^b

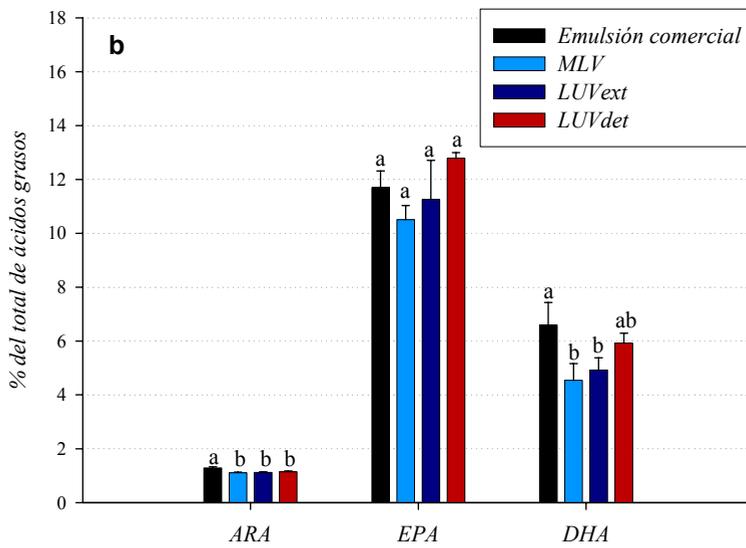
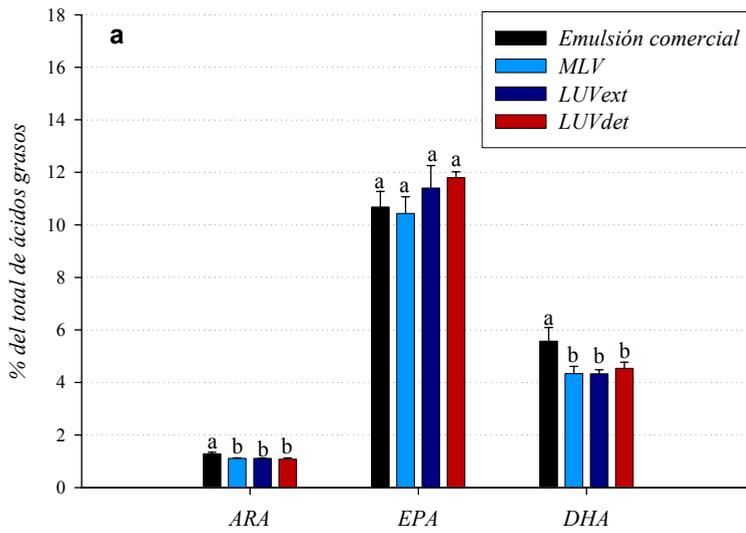
<i>Ácido graso (b)</i>				
	Emulsión comercial	MLV	LUVext	LUVdet
16:0	8,8 (0,2) ^a	11,9 (0,3) ^b	11,5 (0,3) ^b	11,6 (0,0) ^b
18:0	4,3 (0,4) ^a	4,5 (0,1) ^a	4,4 (0,1) ^a	4,3 (0,0) ^a
18:1n-9	24,6 (0,8) ^a	25,3 (0,3) ^a	25,1 (0,6) ^a	24,0 (0,1) ^a
18:2n-6	3,9 (0,1) ^a	3,7 (0,0) ^a	3,6 (0,1) ^a	3,5 (0,0) ^a
18:3n-3	13,8 (0,8) ^a	15,1 (0,2) ^{ab}	15,1 (0,6) ^b	14,2 (0,0) ^{ab}
20:4n-6	1,3 (0,0) ^a	1,1 (0,0) ^b	1,1 (0,0) ^b	1,1 (0,0) ^b
20:5n-3	11,7 (0,6) ^a	10,5 (0,5) ^a	11,3 (1,5) ^a	12,8 (0,2) ^a
22:5n-3	1,3 (0,1) ^a	0,3 (0,1) ^b	0,3 (0,0) ^b	0,3 (0,0) ^b
22:6n-3	6,6 (0,8) ^a	4,5 (0,6) ^b	4,9 (0,5) ^{ab}	5,9 (0,4) ^a
Total identificados	95,6 (0,2) ^a	95,6 (0,3) ^a	95,7 (0,1) ^a	95,7 (0,1) ^a
Saturados	15,0 (0,4) ^a	18,6 (0,6) ^b	17,9 (0,4) ^b	18,0 (0,2) ^b
Monoinsaturados	39,0 (0,6) ^a	39,0 (0,6) ^a	38,8 (0,8) ^a	37,5 (0,5) ^a
Poliinsaturados	41,6 (0,7) ^a	38,0 (0,9) ^b	39,0 (1,2) ^b	40,2 (0,7) ^{ab}
Total n-3	35,8 (0,7) ^a	32,8 (0,9) ^b	34,1 (1,3) ^{ab}	35,3 (0,7) ^a
Total n-6	6,2 (0,1) ^a	5,3 (0,0) ^b	5,2 (0,1) ^{bc}	5,0 (0,1) ^c
HUFA n-3	20,2 (1,5) ^a	15,9 (1,0) ^b	17,0 (1,8) ^{ab}	19,2 (0,7) ^{ab}
HUFA n-6	1,8 (0,0) ^a	1,4 (0,0) ^b	1,4 (0,0) ^b	1,4 (0,0) ^b
DHA/EPA	0,6 (0,0) ^a	0,4 (0,1) ^b	0,4 (0,0) ^b	0,5 (0,0) ^{ab}

(Continúa en la página siguiente)

<i>Ácido graso (c)</i>				
	Emulsión comercial	MLV	LUVext	LUVdet
16:0	9,1 (0,2) ^a	11,9 (0,3) ^b	11,4 (0,2) ^b	11,4 (0,1) ^b
18:0	4,4 (0,3) ^a	4,6 (0,1) ^a	4,6 (0,2) ^a	4,4 (0,0) ^a
18:1n-9	25,5 (0,6) ^{ab}	25,9 (0,7) ^a	25,3 (0,6) ^{ab}	24,1 (0,3) ^b
18:2n-6	4,0 (0,1) ^a	3,6 (0,1) ^b	3,6 (0,0) ^b	3,5 (0,0) ^b
18:3n-3	13,8 (0,6) ^a	14,9 (0,4) ^{ab}	15,0 (0,2) ^b	14,3 (0,3) ^{ab}
20:4n-6	1,3 (0,0) ^a	1,1 (0,0) ^a	1,1 (0,0) ^a	1,1 (0,0) ^a
20:5n-3	11,4 (0,7) ^{ab}	10,5 (0,3) ^a	11,8 (1,0) ^{ab}	13,5 (1,0) ^b
22:5n-3	1,1 (0,0) ^a	0,3 (0,0) ^b	0,3 (0,0) ^{bc}	0,3 (0,0) ^c
22:6n-3	5,4 (0,4) ^a	4,0 (0,7) ^b	4,4 (0,4) ^{ab}	5,5 (0,4) ^a
Total identificados	95,0 (0,6) ^a	95,5 (0,3) ^a	95,8 (0,1) ^a	95,7 (0,2) ^a
Saturados	15,4 (0,5) ^a	18,6 (0,5) ^b	17,9 (0,4) ^b	17,7 (0,0) ^b
Monoinsaturados	39,7 (0,5) ^a	39,9 (1,0) ^a	39,0 (1,0) ^{ab}	37,3 (0,3) ^b
Poliinsaturados	39,9 (1,3) ^a	37,0 (1,3) ^b	38,9 (1,2) ^{ab}	40,8 (0,5) ^a
Total n-3	34,9 (1,4) ^{ab}	32,6 (0,7) ^a	34,5 (1,0) ^{ab}	36,6 (1,0) ^b
Total n-6	5,5 (0,8) ^a	4,6 (0,5) ^a	4,6 (0,6) ^a	4,4 (0,7) ^a
HUFA n-3	18,6 (1,2) ^a	15,3 (1,1) ^b	17,0 (1,3) ^{ab}	19,8 (0,9) ^a
HUFA n-6	1,8 (0,0) ^a	1,4 (0,1) ^b	1,4 (0,1) ^b	1,4 (0,1) ^b
DHA/EPA	0,5 (0,0) ^a	0,4 (0,1) ^a	0,4 (0,0) ^a	0,4 (0,1) ^a

HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos; DHA/EPA: relación de porcentajes de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico.

tratamientos de liposomas presenta un porcentaje menor con respecto a los nauplios control. En cambio, los nauplios LUVdet muestran un porcentaje de poliinsaturados sin diferencias significativas respecto al control (Tabla 4.2b). A pesar de que algunos ácidos grasos importantes (ARA y DPA) de los nauplios enriquecidos con liposomas presentan porcentajes inferiores a los de los nauplios control, en los niveles de EPA y DHA no hay diferencias significativas entre los nauplios control y nauplios enriquecidos con LUVdet (Figura 4.2b). El ayuno durante 3 h (punto de muestreo 24 h) provocó una mejora en el perfil de ácidos grasos de los nauplios LUVdet, igualándose al de los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial (Tabla 4.2c y Figura 4.2c). En este punto de muestreo, los porcentajes de EPA y DHA de los nauplios LUVdet no difieren del control, mientras que los nauplios MLV y LUVext exhiben niveles ligeramente inferiores. Además, los contenidos de EPA y DPA muestran diferencias entre los tratamientos de liposomas, con porcentajes significativamente superiores de ambos ácidos grasos en nauplios enriquecidos con LUVdet en comparación a nauplios MLV. Todos estos resultados se reflejan de forma global en el contenido



(Continúa en la página siguiente)

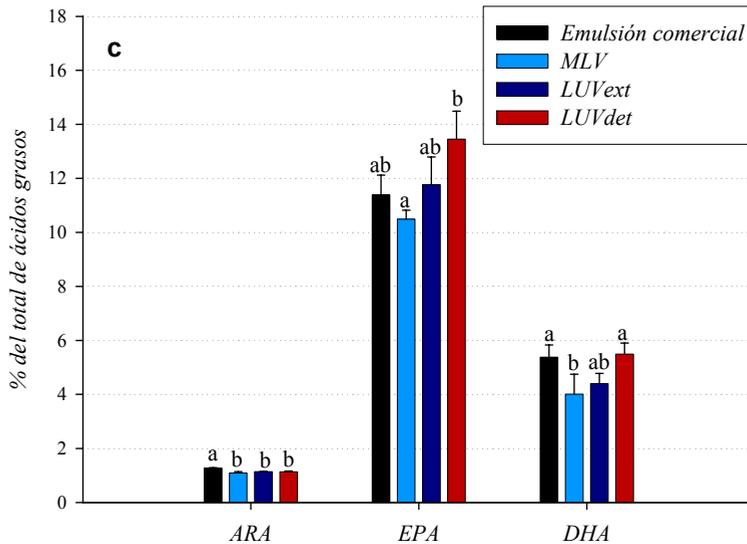


Figura 4.2. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (porcentaje del total de ácidos grasos) de nauplios de *Artemia* enriquecidos con la emulsión comercial y con tres tipos de liposomas en los tiempos de muestreo de 18 (a), 21 (b) y 24 h (c). Las barras de error representan desviaciones típicas. Los tratamientos que comparten una misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

total de ácidos grasos n-3 de los nauplios enriquecidos con LUVdet, los cuales igualan estadísticamente a los nauplios control. Por otra parte, los niveles de ARA no presentan diferencias significativas entre los nauplios tratados con los distintos tipos de liposomas (Figura 4.2).

4.3.2. Efecto de la aireación aplicada durante el enriquecimiento de nauplios de *Artemia* sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales

La supervivencia de los nauplios de *Artemia* incubados durante 21 h con los dos productos enriquecedores evaluados bajo los distintos regimenes de aireación se presenta en la Figura 4.3. En el caso de la emulsión comercial (Figura 4.3a), no se observan diferencias significativas en la supervivencia de los nauplios

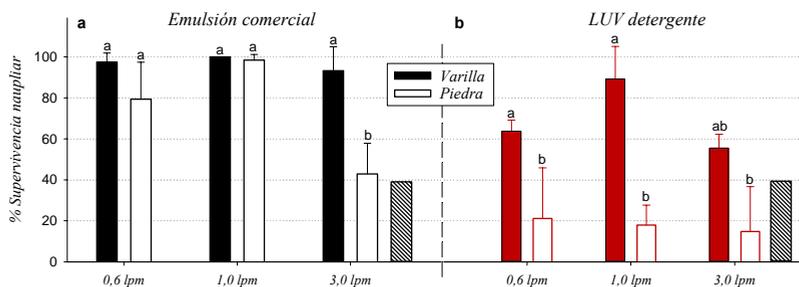


Figura 4.3. Porcentajes de supervivencia de nauplios de *Artemia* tras 21 h de enriquecimiento con la emulsión comercial Super Selco (a) y con liposomas LUV detergente (b), sometidos a diferentes modos de aireación. Las barras rayadas representan el porcentaje de supervivencia de nauplios sometidos a una incubación a 28 °C sin producto enriquecedor y con un flujo de aire de 3 lpm aplicado mediante piedras difusoras. Las barras de error indican la desviación típica de los datos (n=3). Los tratamientos que comparten una misma letra en cada figura (a y b) no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

enriquecidos con los distintos modos de aireación, a excepción del tratamiento consistente en la combinación de flujo de aire alto (3,0 lpm) y piedras difusoras, en el que la supervivencia disminuyó significativamente en comparación a los restantes tratamientos. Por otro lado, los enriquecimientos con LUVdet (Figura 4.3b) registraron, en situaciones concretas, mortandades masivas de nauplios. Así, la utilización de piedras difusoras produjo una mayor mortandad para flujos de aire de 0,6 y 1,0 lpm, en comparación con los resultados hallados con el mismo flujo de aire pero utilizando varillas como sistema de difusión. En general, la supervivencia naupliar registró valores máximos cuando la aireación fue aplicada mediante varillas de vidrio huecas y un flujo de aire bajo (0,6 o 1,0 lpm), aunque no se han podido establecer diferencias significativas con nauplios enriquecidos con el mismo sistema de difusión y un flujo de aire de 3,0 lpm (Figura 4.3b). La apariencia de tres nauplios de *Artemia* incubados durante 21 h con LUVdet se muestra en la Figura 4.4. Como puede observarse, el individuo normal (a) muestra unas estructuras filtradoras y una organización tisular alrededor del tubo digestivo con la apariencia habitual. Por el contrario, los nauplios alterados (b y c) tienen los apéndices filtradores parcialmente rotos y una pérdida apreciable de componentes de los tejidos que rodean el digestivo. La Figura 4.3 también muestra el bajo porcentaje de supervivencia de nauplios

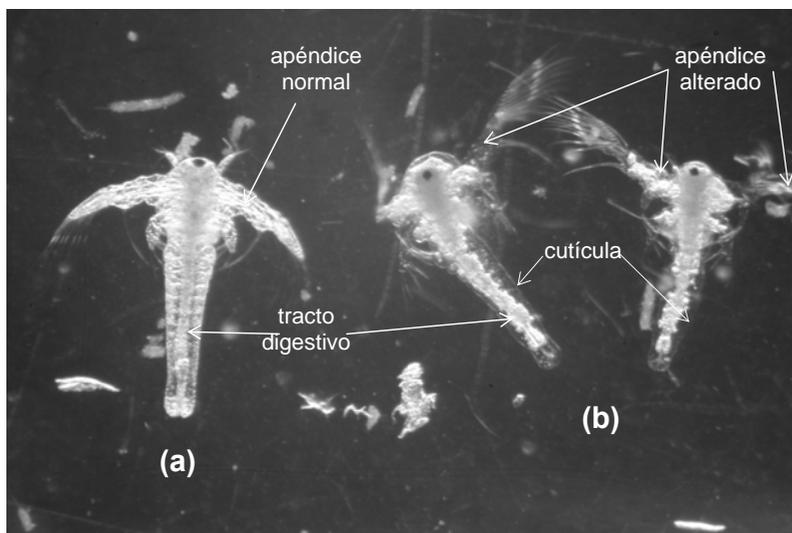


Figura 4.4. Apariencia de tres nauplios de *Artemia* después de ser sometidos durante 21 h a una incubación con liposomas LUVdet bajo un flujo de aire de 3,0 lpm y utilizando piedras difusoras como sistema de difusión: (a) nauplio normal; (b) dos nauplios con estructuras corporales alteradas. Es preciso destacar la pérdida de rigidez en las antenas y la pérdida de componentes corporales especialmente aparentes en el tórax de los nauplios alterados, donde la cutícula se hace visible.

incubados en condiciones extremas de aireación (flujo de aire de 3,0 lpm y alta difusión de aire obtenida con piedras difusoras) y en ausencia de producto enriquecedor.

La Tabla 4.3 muestra los perfiles de ácidos grasos y los porcentajes de lípidos de nauplios enriquecidos bajo las distintas condiciones de aireación, utilizando como productos enriquecedores la emulsión comercial (Tabla 4.3a) y liposomas LUVdet (Tabla 4.3b). Los contenidos de lípidos totales de los nauplios enriquecidos con la emulsión lipídica tienen niveles similares en los diferentes tratamientos, a excepción del tratamiento con un flujo de aire de 3,0 lpm aplicado con piedras difusoras en el que se registra un descenso importante. Los nauplios enriquecidos con liposomas LUVdet, por su parte, no presentan niveles de lípidos totales diferentes al ser sometidos a los diferentes modos de aireación.

Los nauplios incubados con la emulsión lipídica no muestran variaciones importantes en el contenido de ácidos grasos entre los

Tabla 4.3a. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) y lípidos totales (porcentaje de peso seco) de nauplios de *Artemia* enriquecidos con liposomas LUV-det (KPL) bajo las diferentes combinaciones de tres niveles de flujo de aire (0,6, 1,0 y 3,0 lpm) y dos sistemas de difusión de aire (varilla y piedra). Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Ácido graso	Emulsión comercial (0,6 lpm)			Emulsión comercial (1,0 lpm)			Emulsión comercial (3,0 lpm)		
	Varilla	Piedra	Varilla	Piedra	Varilla	Piedra	Varilla	Piedra	
16:0	9,6 (0,3) ^{ab}	9,2 (0,0) ^a	9,4 (0,3) ^a	9,3 (0,4) ^a	9,5 (0,1) ^{ab}	10,4 (0,2) ^b			
18:0	4,9 (0,1) ^a	4,3 (0,0) ^a	4,4 (0,1) ^a	4,4 (0,1) ^a	5,4 (0,1) ^c	4,7 (0,0) ^b			
18:1n-9	22,1 (0,6) ^{ab}	21,6 (0,2) ^a	22,1 (0,5) ^{ab}	22,1 (0,6) ^{ab}	21,1 (0,2) ^a	23,2 (0,2) ^b			
18:2n-6	4,7 (0,2) ^a	4,4 (0,0) ^{bc}	4,5 (0,0) ^{ab}	4,3 (0,1) ^{bc}	4,2 (0,1) ^c	4,4 (0,1) ^{bc}			
18:3n-3	17,1 (0,3) ^a	16,5 (0,1) ^a	16,9 (0,4) ^a	16,4 (0,9) ^d	16,1 (0,0) ^a	18,7 (0,4) ^b			
20:4n-6	1,3 (0,0) ^{ab}	1,2 (0,0) ^{abc}	1,2 (0,0) ^{bc}	1,2 (0,0) ^{bc}	1,3 (0,0) ^a	1,2 (0,0) ^c			
20:5n-3	9,9 (0,0) ^{ab}	10,9 (0,2) ^a	10,0 (0,5) ^a	10,3 (0,8) ^d	11,3 (0,1) ^a	7,7 (1,2) ^b			
22:5n-3	1,0 (0,1) ^a	1,0 (0,0) ^a	0,9 (0,1) ^a	1,0 (0,1) ^a	1,0 (0,1) ^a	0,5 (0,1) ^b			
22:6n-3	4,9 (0,4) ^b	5,5 (0,3) ^{ab}	5,0 (0,7) ^b	5,5 (0,4) ^{ab}	6,9 (0,1) ^a	2,6 (0,6) ^c			
Total identificados	94,5 (1,8)	95,4 (0,0)	95,1 (0,2)	95,0 (0,7)	96,0 (0,7)	94,7 (0,3)			
Saturados	15,9 (0,8)	15,4 (0,0)	15,7 (0,6)	15,5 (0,7)	16,8 (0,1)	17,2 (0,5)			
Monoinsaturados	38,7 (0,7) ^{ab}	37,6 (0,4) ^a	38,1 (0,7) ^{ab}	38,1 (0,9) ^{ab}	37,8 (0,4) ^a	40,1 (0,6) ^b			
Polinsaturados	39,9 (0,3) ^{ab}	42,3 (0,4) ^a	41,3 (1,0) ^a	41,4 (1,0) ^a	41,4 (0,2) ^a	37,4 (1,4) ^b			
Total n-3	34,0 (0,1) ^{ab}	36,2 (0,6) ^a	35,0 (0,9) ^a	35,4 (1,0) ^a	36,0 (0,2) ^a	31,6 (1,4) ^b			
Total n-6	5,9 (0,2) ^{ab}	6,4 (0,1) ^c	6,5 (0,1) ^a	6,3 (0,1) ^{ab}	5,5 (0,1) ^d	6,1 (0,0) ^{bc}			
HUFA n-3	15,1 (0,3) ^{ab}	18,1 (0,6) ^a	16,4 (1,3) ^a	17,4 (1,3) ^a	18,2 (0,2) ^a	11,1 (1,8) ^b			
HUFA n-6	1,3 (0,0) ^a	1,7 (0,1) ^b	1,6 (0,1) ^b	1,7 (0,1) ^b	1,3 (0,0) ^a	1,4 (0,1) ^{ab}			
DHA/EPA	0,5 (0,0) ^b	0,5 (0,0) ^{ab}	0,5 (0,1) ^b	0,5 (0,0) ^{ab}	0,6 (0,0) ^a	0,3 (0,0) ^c			
% Lípido (PS)	25,4 (0,8) ^a	23,5 (0,8) ^{ab}	24,3 (0,8) ^a	24,5 (0,5) ^a	25,4(0,7) ^a	21,5 (1,1) ^b			

HUFA n-3: ácidos grasos de la serie n-3, con cadenas de 20 o más átomos de C y con dos o más insaturaciones; EPA: ác. eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ác. docosahexaenoico (22:6n-3).
de C y con dos o más insaturaciones; EPA: ác. eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ác. docosahexaenoico (22:6n-3).

Tabla 4.3b. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) y lípidos totales (porcentaje de peso seco) de nauplios de *Artemia* enriquecidos con liposomas LUV-det (KPL) bajo las diferentes combinaciones de tres niveles de flujo de aire (0,6, 1,0 y 3,0 lpm) y dos sistemas de difusión de aire (varilla y piedra). Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Ácido graso	0,6 lpm		1,0 lpm		3,0 lpm	
	Varilla	Piedra	Varilla	Piedra	Varilla	Piedra
16:0	12,4 (0,2) ^a	12,3 (0,1) ^a	12,1 (0,2) ^a	12,1 (0,4) ^a	12,4 (0,5) ^a	12,2 (0,3) ^a
18:0	5,3 (0,1) ^b	4,4 (0,1) ^b	4,5 (0,1) ^b	4,3 (0,1) ^b	5,2 (0,0) ^a	4,3 (0,3) ^b
18:1n-9	21,7 (0,2) ^{ab}	20,7 (0,5) ^a	20,9 (0,2) ^{ab}	21,3 (0,5) ^{ab}	21,5 (0,2) ^{ab}	24,5 (0,3) ^c
18:2n-6	4,3 (0,1) ^b	3,9 (0,1) ^d	4,0 (0,1) ^d	4,0 (0,1) ^{cd}	4,3 (0,1) ^{bc}	4,6 (0,2) ^a
18:3n-3	18,1 (0,5) ^{bc}	16,4 (0,7) ^a	17,6 (0,2) ^{ab}	17,1 (0,6) ^{ab}	18,0 (0,4) ^b	20,6 (0,7) ^c
20:4n-6	1,1 (0,0) ^{ab}	1,0 (0,0) ^c	1,1 (0,0) ^{bc}	1,1 (0,0) ^{bc}	1,2 (0,0) ^a	1,0 (0,0) ^c
20:5n-3	10,1 (0,8) ^b	13,0 (1,2) ^a	11,6 (0,3) ^{ab}	11,6 (1,6) ^{ab}	9,7 (0,5) ^b	5,0 (0,8) ^c
22:5n-3	N.D. ^b	0,2 (0,0) ^a	0,1 (0,1) ^{ab}	0,2 (0,0) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b
22:6n-3	2,9 (0,6) ^b	4,0 (0,3) ^a	3,9 (0,2) ^{ab}	3,9 (0,4) ^{ab}	3,7 (0,1) ^{ab}	0,6 (0,6) ^c
Total identificados	95,7 (0,5) ^{ab}	95,3 (0,1) ^{bc}	95,1 (0,1) ^{bc}	95,2 (0,1) ^{bc}	96,0 (0,1) ^a	94,7 (0,2) ^c
Saturados	19,8 (0,2) ^a	18,7 (0,1) ^{bc}	18,4 (0,3) ^c	18,4 (0,4) ^c	19,7 (0,8) ^{ab}	18,7 (0,2) ^{abc}
Monoinsaturados	37,5 (0,4) ^{bc}	35,8 (0,9) ^a	36,0 (0,5) ^{ab}	36,7 (0,9) ^{abc}	37,7 (0,2) ^c	41,6 (0,1) ^d
Polinsaturados	38,4 (0,7) ^b	40,8 (1,0) ^a	40,7 (0,6) ^{ab}	40,2 (1,4) ^{ab}	38,6 (0,6) ^{ab}	34,4 (0,4) ^c
Total n-3	32,9 (0,8) ^b	35,7 (1,0) ^d	35,4 (0,7) ^{cd}	34,9 (1,4) ^{bcd}	33,1 (0,5) ^{bc}	28,6 (0,5) ^a
Total n-6	5,4 (0,1) ^a	5,3 (0,1) ^a	5,4 (0,1) ^a	5,4 (0,1) ^a	5,5 (0,1) ^a	6,0 (0,1) ^b
HUFA n-3	13,0 (1,3) ^b	17,7 (1,6) ^a	16,0 (0,6) ^{ab}	16,1 (2,0) ^{ab}	13,4 (0,5) ^b	6,0 (1,4) ^c
HUFA n-6	1,1 (0,0) ^a	1,2 (0,0) ^b	1,2 (0,0) ^b	1,2 (0,0) ^b	1,2 (0,0) ^{ab}	1,2 (0,1) ^{ab}
DHA/EPA	0,3 (0,0) ^a	0,3 (0,0) ^a	0,3 (0,0) ^a	0,3 (0,0) ^a	0,4 (0,0) ^a	0,1 (0,1) ^b
% Lípido (PS)	23,5 (0,6) ^a	24,4 (0,7) ^a	23,0 (0,6) ^a	24,7 (1,5) ^a	22,9 (0,6) ^a	23,3 (1,0) ^a

HUFA n-3: ácidos grasos de la serie n-3, con cadenas de 20 o más átomos de C y con dos o más insaturaciones; HUFA n-6: ácidos grasos de la serie n-6, con cadenas de 20 o más átomos de C y con dos o más insaturaciones; N.D.: no detectado (porcentaje inferior a 0,05); EPA: ác. eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ác. docosahexaenoico (22:6n-3).

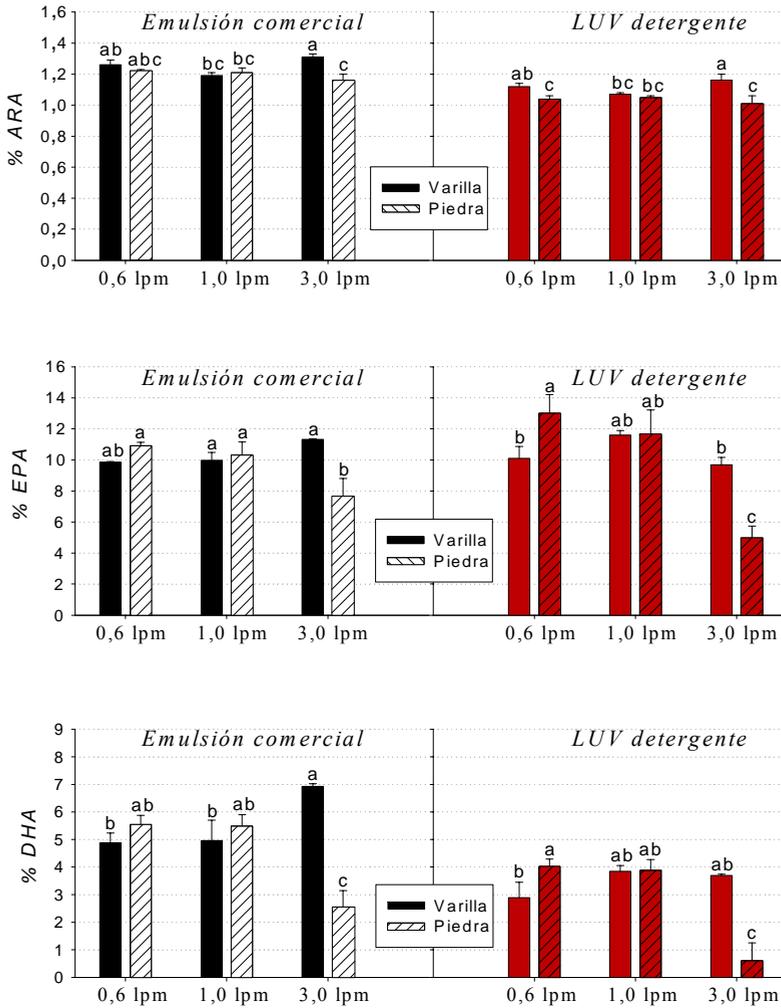


Figura 4.5. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (porcentaje del total de ácidos grasos) de nauplios de *Artemia* enriquecidos con la emulsión comercial y liposomas LUV detergente bajo las diferentes combinaciones de tres niveles de flujo de aire (0,6, 1,0 y 3,0 lpm) y dos sistemas de difusión de aire (varilla y piedra). Los valores representados son medias de tres réplicas y las barras de error son las desviaciones típicas. Los tratamientos que comparten una misma letra dentro de cada una de las seis figuras no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

distintos tratamientos (Tabla 4.3a y Figura 4.5). De nuevo, sólo el enriquecimiento llevado a cabo bajo un flujo de aire de 3,0 lpm aplicado por medio de piedras difusoras muestra un descenso significativo en los contenidos de EPA y DHA y de la relación DHA/EPA. En cuanto a los resultados obtenidos con liposomas (Tabla 4.3b y Figura 4.5), el tipo de sistema de difusión empleado tuvo efectos diferentes en función del flujo de aire aplicado. De esta forma, el porcentaje de ARA de los nauplios enriquecidos a 0,6 y 3,0 lpm disminuyó cuando se emplearon piedras como sistema de aireación (Figura 4.5). En el caso de los ácidos grasos esenciales EPA y DHA, la utilización de piedras difusoras actuó de forma diferente en función del flujo de aire. Los enriquecimientos llevados a cabo con un flujo de aire bajo (0,6 lpm) resultaron en una mayor incorporación de ambos ácidos grasos con respecto a los enriquecimientos realizados con varillas. Sin embargo, los niveles de EPA y DHA experimentaron un descenso significativo cuando se emplearon piedras difusoras a flujos de 3,0 lpm. Por otra parte, no se observan efectos del tipo de aireación a flujos intermedios (1,0 lpm). Además, la relación DHA/EPA muestra valores constantes en los distintos tratamientos con LUVdet, a excepción de los nauplios enriquecidos bajo flujo de aire alto (3,0 lpm) aplicado con piedras.

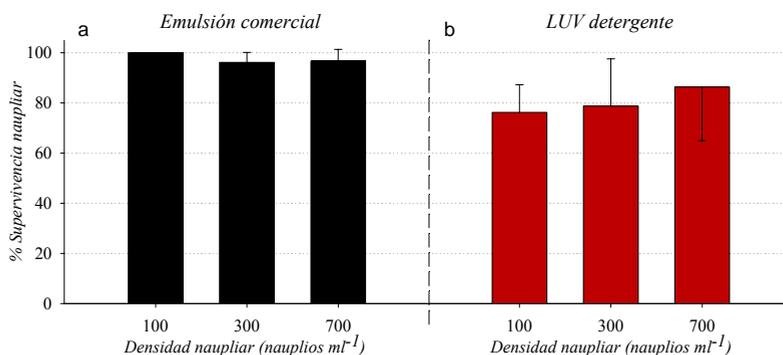


Figura 4.6. Porcentajes de supervivencia de nauplios de *Artemia* tras 21 h de enriquecimiento con la emulsión comercial Super Selco (a) y con liposomas LUVdetergente de krill (b). Las barras de error indican la desviación típica de los datos (n=3). No existen diferencias significativas entre los tres tratamientos planteados con cada producto enriquecedor ($P \leq 0,05$).

4.3.3. Efecto de la densidad naupliar durante el enriquecimiento de nauplios de Artemia sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales

Los resultados de supervivencia de nauplios incubados con los dos productos enriquecedores bajo las tres densidades naupliares evaluadas se muestran en la Figura 4.6. El análisis estadístico no revela ningún efecto de la densidad naupliar en la supervivencia observada en los dos productos. Sin embargo, los resultados indican una menor supervivencia en los tratamientos de liposomas en comparación con los de la emulsión lipídica comercial.

El contenido de lípidos totales de los nauplios se recoge en la Tabla 4.4. En el caso de la emulsión comercial, los resultados indican que no hay diferencias significativas en los nauplios enriquecidos bajo las tres densidades naupliares evaluadas, con valores promedio superiores en los nauplios enriquecidos a una densidad de 300 nauplios ml^{-1} . Por su parte, los nauplios enriquecidos con LUVdet mostraron niveles significativamente superiores cuando la densidad de nauplios fue de 300 ind ml^{-1} en comparación a 100 ind ml^{-1} ($P \leq 0,05$).

El perfil de ácidos grasos de los nauplios se expone en la Tabla 4.4, resaltándose los contenidos de ARA, EPA y DHA en la Figura 4.7. Los resultados muestran que la incorporación de estos EFAs fue más efectiva en nauplios incubados a densidades entorno a 300 individuos ml^{-1} , tanto en el caso de los tratamientos con emulsión lipídica como en el de liposomas LUVdet. Aunque no se hallaron diferencias significativas en los niveles de ARA, los niveles de EPA y DHA aumentaron de forma significativa a densidades de 300 individuos ml^{-1} en nauplios enriquecidos con ambos productos en comparación con los niveles medidos en nauplios incubados a densidades de 100 o 700 individuos ml^{-1} (Figura 4.7). Para los dos productos enriquecedores, la relación DHA/EPA presenta valores significativamente superiores ($P \leq 0,05$) en enriquecimientos realizados a densidades de 300 nauplios ml^{-1} en comparación a 100 y 700 nauplios ml^{-1} (Tabla 4.4).

4.3.4. Efecto de la concentración de liposomas durante el enriquecimiento de nauplios de Artemia sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales

La supervivencia naupliar observada en los distintos tratamientos no muestra diferencias significativas entre ellos (Figura 4.8). Sin embargo, cabe destacar que la supervivencia estimada en los tratamientos con liposomas LUVdet tiende a disminuir al aumentar la concentración de liposomas en el medio de enriquecimiento.

Tabla 4.4. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) y lípidos totales (porcentaje de peso seco) de nauplios de *Artemia* enriquecidos con la emulsión comercial (Super Selco) y con liposomas LUVdet de krill a tres densidades naupliares diferentes (100, 300 y 700 nauplios ml⁻¹). Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes (P≤0,05).

Ácido graso	Emulsión comercial			LUV detergente		
	100 nauplios ml ⁻¹	300 nauplios ml ⁻¹	700 nauplios ml ⁻¹	100 nauplios ml ⁻¹	300 nauplios ml ⁻¹	700 nauplios ml ⁻¹
16:0	10,8 (0,3) ^a	9,2 (0,5) ^b	10,5 (0,2) ^b	13,6 (0,3) ^a	13,2 (0,4) ^a	12,0 (0,2) ^b
18:0	4,7 (0,0) ^a	4,5 (0,1) ^a	4,6 (0,3) ^a	5,0 (0,1) ^a	4,8 (0,1) ^a	5,0 (0,2) ^a
18:1n-9	24,5 (0,1) ^a	22,0 (0,6) ^b	23,9 (0,4) ^a	23,4 (0,2) ^a	21,7 (0,3) ^b	24,0 (0,4) ^a
18:2n-6	5,2 (0,1) ^a	4,6 (0,1) ^b	4,9 (0,2) ^{ab}	4,4 (0,1) ^{ab}	4,1 (0,0) ^a	4,6 (0,1) ^b
18:3n-3	19,5 (0,1) ^a	16,8 (0,8) ^b	20,3 (1,0) ^a	19,6 (0,2) ^a	17,7 (0,2) ^b	20,7 (0,6) ^a
20:4n-6	1,1 (0,0) ^a	1,3 (0,0) ^b	1,1 (0,1) ^a	1,0 (0,0) ^a	1,0 (0,0) ^a	1,0 (0,0) ^a
20:5n-3	7,1 (0,4) ^a	12,3 (0,9) ^b	6,9 (1,0) ^a	6,7 (0,0) ^d	10,0 (0,2) ^b	5,6 (0,3) ^c
22:5n-3	0,3 (0,1) ^a	0,7 (0,6) ^a	0,3 (0,1) ^a	0,1 (0,0) ^a	0,1 (0,0) ^a	0,1 (0,0) ^a
22:6n-3	1,6 (0,2) ^a	5,5 (1,0) ^b	1,9 (0,5) ^a	1,1 (0,1) ^a	3,3 (0,1) ^b	1,1 (0,3) ^a
Total identificados	95,6 (0,0) ^a	96,1 (0,4) ^a	94,4 (1,0) ^a	95,5 (0,3) ^a	95,6 (0,1) ^a	97,0 (2,9) ^a
Saturados	17,4 (0,4) ^a	15,3 (0,7) ^b	16,8 (0,3) ^a	20,5 (0,4) ^a	19,9 (0,5) ^a	19,0 (0,4) ^a
Monoinsaturados	40,9 (0,3) ^a	37,1 (1,1) ^b	39,6 (0,8) ^{ab}	39,7 (0,4) ^a	37,2 (0,6) ^a	40,7 (0,5) ^a
Polinsaturados	37,3 (0,7) ^a	43,7 (1,7) ^a	38,0 (0,1) ^a	35,4 (0,5) ^a	38,4 (0,0) ^a	37,3 (3,6) ^a
Total n-3	30,8 (0,7) ^a	37,4 (1,7) ^a	31,7 (0,2) ^a	29,7 (0,4) ^a	33,0 (0,2) ^a	31,6 (3,6) ^a
Total n-6	6,7 (0,1) ^a	6,6 (0,0) ^a	6,4 (0,1) ^a	5,8 (0,2) ^a	5,6 (0,1) ^a	5,9 (0,0) ^a
HUFA n-3	9,4 (0,7) ^a	19,0 (2,5) ^b	9,4 (1,4) ^a	8,2 (0,1) ^a	13,7 (0,3) ^a	8,9 (2,9) ^a
HUFA n-6	1,3 (0,0) ^a	1,7 (0,1) ^b	1,3 (0,1) ^a	1,2 (0,0) ^d	1,3 (0,1) ^a	1,2 (0,0) ^a
DHA/EPA	0,2 (0,0) ^a	0,4 (0,1) ^b	0,3 (0,1) ^a	0,2 (0,0) ^a	0,3 (0,0) ^b	0,2 (0,0) ^a
% Lípido (PS)	24,7 (0,2) ^a	27,3 (0,8) ^a	25,2 (1,3) ^a	21,9 (0,6) ^d	24,4 (0,1) ^b	24,2 (0,9) ^{ab}

HUFA n-3: ácidos grasos de la serie n-3, con cadenas de 20 o más átomos de C y con dos o más insaturaciones; HUFA n-6: ácidos grasos de la serie n-6, con cadenas de 20 o más átomos de C y con dos o más insaturaciones; EPA: ác. eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ác. docosahexaenoico (22:6n-3).

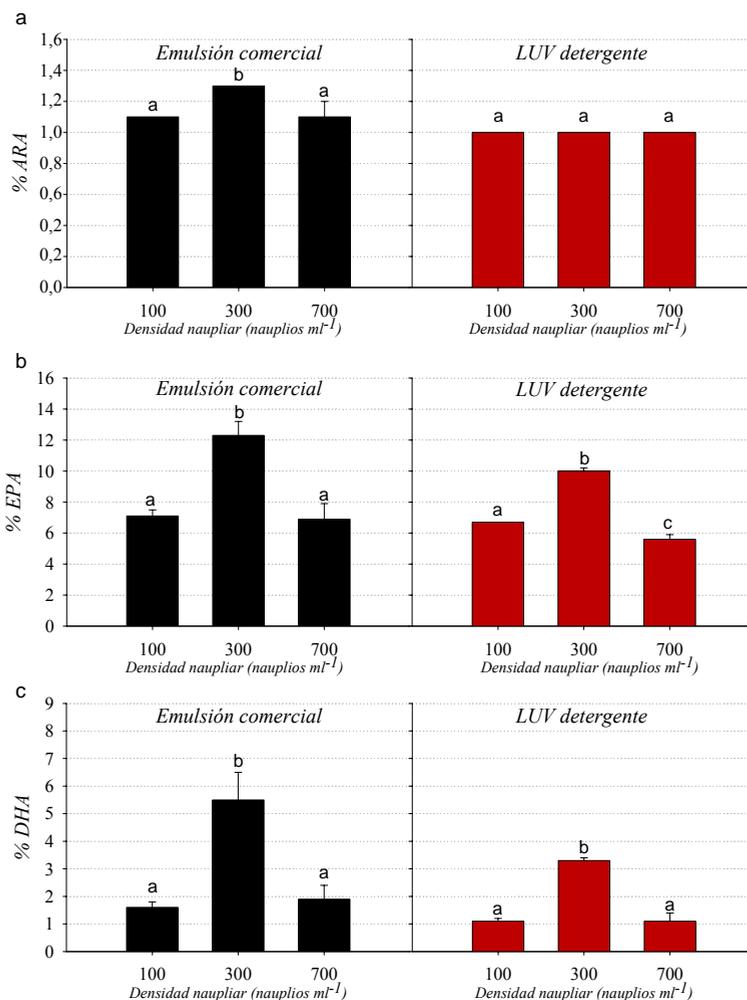


Figura 4.7. Contenidos de ácido araquidónico (ARA) (a), ácido eicosapentaenoico (EPA) (b) y ácido docosahexaenoico (DHA) (c) (porcentaje del total de ácidos grasos) de nauplios de *Artemia* enriquecidos con la emulsión comercial y liposomas LUV detergente de krill a tres densidades naupliares diferentes (100, 300 y 700 nauplios ml⁻¹). Los valores representados son medias de tres réplicas y las barras de error son las desviaciones típicas. Los tratamientos que comparten una misma letra dentro de cada una de las seis figuras no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

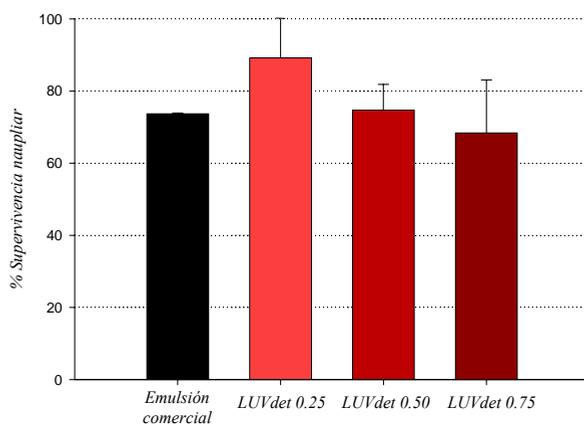


Figura 4.8. Porcentajes de supervivencia de nauplios de *Artemia* tras 21 h de incubación con la emulsión comercial Super Selco y con liposomas LUVdet de krill a diferentes concentraciones lipídicas. Las barras de error indican la desviación típica de los datos (n=3). No existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos ($P \leq 0,05$).

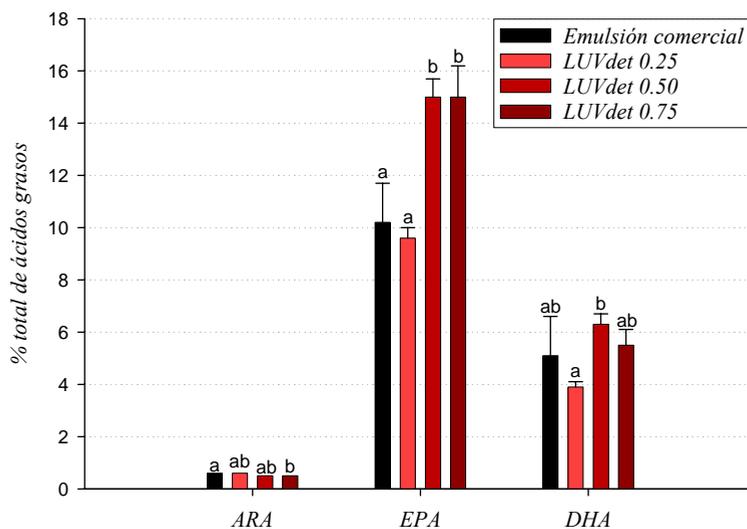


Figura 4.9. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (porcentaje del total de ácidos grasos) en nauplios de *Artemia* enriquecidos con la emulsión comercial y liposomas LUVdet de krill a tres concentraciones lipídicas diferentes. Los valores representados son medias de tres réplicas y las barras de error son las desviaciones típicas. Los tratamientos que comparten una misma letra en cada ácido graso no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Tabla 4.5. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) y lípidos totales (porcentaje de peso seco) de nauplios de *Artemia* enriquecidos a tres concentraciones lipídicas diferentes. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son diferentes ($P \leq 0,05$).

Ácido graso	Emulsión control			
	LUVdet 0.25	LUVdet 0.50	LUVdet 0.75	
16:0	9,2 (0,5) ^a	12,5 (0,1) ^b	13,0 (0,3) ^b	13,5 (0,6) ^b
18:0	5,2 (0,2) ^a	5,9 (0,1) ^b	5,1 (0,0) ^a	5,2 (0,1) ^a
18:1n-9	19,3 (3,8) ^a	16,1 (0,4) ^a	14,4 (0,4) ^a	14,9 (0,4) ^a
18:2n-6	5,5 (0,3) ^a	4,6 (0,1) ^b	4,2 (0,1) ^c	4,3 (0,1) ^{bc}
18:3n-3	23,7 (1,6) ^a	24,6 (0,3) ^a	20,9 (0,6) ^b	20,7 (0,5) ^b
20:4n-6	0,9 (0,1) ^a	0,8 (0,0) ^{ab}	0,8 (0,0) ^{ab}	0,8 (0,0) ^b
20:5n-3	10,2 (1,5) ^a	9,6 (0,4) ^a	15,0 (0,7) ^b	15,0 (1,2) ^b
22:5n-3	1,1 (0,1) ^a	N.D. ^b	0,2 (0,1) ^b	0,2 (0,1) ^b
22:6n-3	5,1 (1,5) ^{ab}	3,9 (0,2) ^a	6,3 (0,4) ^b	5,5 (0,6) ^{ab}
Total identificados	95,8 (0,4) ^a	95,6 (0,2) ^a	95,9 (0,1) ^a	96,2 (0,2) ^a
Saturados	15,7 (0,8) ^a	19,9 (0,3) ^b	19,4 (0,3) ^b	20,0 (0,9) ^b
Monoinsaturados	29,5 (1,1) ^a	28,1 (0,1) ^a	25,4 (0,3) ^b	25,9 (0,6) ^b
Poliinsaturados	50,6 (1,7) ^a	47,6 (0,2) ^b	51,1 (0,5) ^a	50,3 (1,4) ^{ab}
Total n-3	43,8 (1,9) ^{ab}	42,0 (0,1) ^a	45,9 (0,5) ^b	44,9 (1,4) ^{ab}
Total n-6	7,1 (0,3) ^a	6,0 (0,1) ^b	5,5 (0,0) ^c	5,7 (0,1) ^{bc}
HUFA n-3	17,4 (3,6) ^{ab}	14,7 (0,1) ^a	22,5 (0,8) ^b	21,7 (1,9) ^b
HUFA n-6	1,2 (0,2) ^a	1,0 (0,0) ^a	1,1 (0,1) ^a	1,1 (0,1) ^a
DHA/EPA	0,5 (0,1) ^a	0,4 (0,0) ^{ab}	0,4 (0,0) ^{ab}	0,4 (0,0) ^b
% Lípido (PS)	23,3 (1,4) ^a	20,0 (0,5) ^a	22,4 (1,3) ^a	22,2 (1,9) ^a

HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos; DHA/EPA: relación de porcentajes de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico; N.D: no detectado (<0,05%).

Los perfiles lipídicos (lípidos totales y ácidos grasos) de los nauplios enriquecidos con los distintos tratamientos experimentales se presentan en la Tabla 4.5. Mientras que el contenido de lípidos totales no muestra diferencias significativas entre tratamientos, la concentración de liposomas sí determina el contenido en HUFAs n-3 de los nauplios. De esta forma, los porcentajes de EPA y DHA aumentaron al incrementar la concentración de liposomas en el medio de enriquecimiento de 0,25 a 0,50 g lípido l⁻¹ (tratamientos LUVdet

0.25 y LUVdet 0.50). Sin embargo, los niveles de estos ácidos grasos correspondientes al tratamiento LUVdet 0.75 (0,75 g lípido l⁻¹) no experimentaron un incremento significativo con respecto al tratamiento LUVdet 0.50 (0,50 g l⁻¹). Otros parámetros indicativos de la eficacia del enriquecimiento, como el contenido de ARA y la relación DHA/EPA no muestran diferencias significativas entre los tres tratamientos con liposomas. En comparación con el control, los tratamientos LUVdet 0.50 y LUVdet 0.75 muestran diferencias significativas en el contenido de EPA e igualan el nivel de DHA medido en los nauplios enriquecidos con la emulsión.

4.3.5. Efecto de la dosificación de liposomas durante el enriquecimiento de nauplios de Artemia sobre la supervivencia naupliar y la incorporación de ácidos grasos esenciales

Los datos de supervivencia naupliar estimada en los diferentes tratamientos no reflejan diferencias estadísticamente significativas (Figura 4.10), aunque la tendencia observada parece relacionar una mayor supervivencia de los nauplios con una menor cantidad de liposomas en el medio. De esta forma, el tratamiento LUVdet 2x0.25 muestra un mayor porcentaje de supervivencia que LUVdet 2x0.375, tratamiento en el que se dispensó una mayor cantidad de liposomas. Por otro lado, el tratamiento LUVdet R0.50, en el que la cantidad total de liposomas, administrada en una sola dosis, igualó a la de LUVdet 2x0.25, registró la supervivencia media menor, aunque con una apreciable variabilidad asociada (ver barras de error en Figura 4.10).

La Tabla 4.6 recoge los porcentajes de ácidos grasos y de lípidos totales obtenidos en los nauplios de los diferentes tratamientos. Entre los tratamientos con liposomas no se hallaron diferencias significativas en el contenido de lípidos totales, los cuales quedaron por debajo del tratamiento control. En términos generales, la ausencia de diferencias entre los tres tratamientos con liposomas se mantiene en todos los ácidos grasos seleccionados. Como se muestra en la Figura 4.11, sólo el porcentaje de EPA del tratamiento LUVdet 2x0.375 está por debajo del medido en los otros dos tratamientos a base de liposomas. A pesar de la ausencia de diferencias estadísticas, parece claro que los porcentajes medios de DHA y de HUFA n-3 obtenidos en los tratamientos LUVdet 2x0.25 y LUVdet R0.50 son más elevados que los correspondientes al tratamiento LUVdet 2x0.375, pese a que la cantidad final de liposomas administrada fue mayor en este último tratamiento. La relación DHA/EPA de los nauplios de los tres tratamientos con liposomas no difiere entre sí, y se sitúa por debajo de los obtenidos en el tratamiento control. A pesar de este último resultado, los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial no

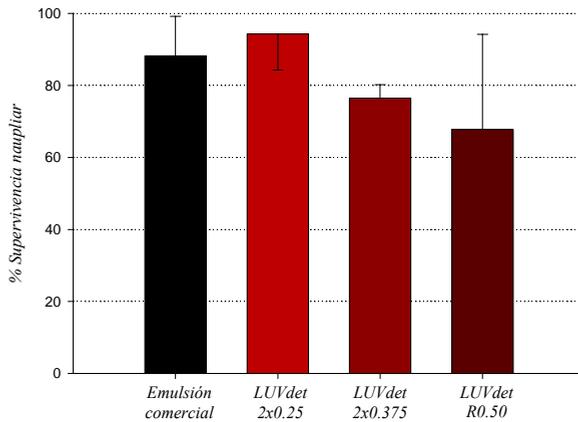


Figura 4.10. Porcentajes de supervivencia de nauplios de *Artemia* tras 21 h de incubación con la emulsión comercial Super Selco y con liposomas LUVdet dispensados mediante diferentes modos de dosificación (ver Apartado 4.2.5). Las barras de error indican la desviación típica de los datos (n=3). No existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos ($P \leq 0,05$).

reflejan contenidos significativamente superiores de ácidos grasos importantes en comparación con los tratamientos LUVdet 2x0.25 y LUVdet R0.50. Este es el caso del porcentaje de EPA, de DHA, así como el del total de poliinsaturados.

4.4. Discusión

El lanzamiento comercial de nuevos productos requiere de estudios preliminares dirigidos a caracterizar su comportamiento en las condiciones en las que será utilizado, con el fin último de determinar los parámetros óptimos bajo los que el producto exhibe su máxima eficacia. Como se ha mencionado en el Capítulo 1, los liposomas poseen unas propiedades que los convierten en elementos con gran potencial para su utilización en el enriquecimiento de presas vivas. Concretamente, los liposomas formulados con extracto de fosfolípidos de krill, que contienen un elevado porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, pueden constituir un complemento a los productos enriquecedores actualmente usados en larvicultura marina.

En primer lugar, el estudio sobre la capacidad enriquecedora de tres tipos diferentes de liposomas evidencia diferencias en las tres

Tabla 4.6. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) y lípidos totales (porcentaje de peso seco) de nauplios de *Artemia* enriquecidos con una emulsión lipídica comercial o con liposomas LUVdet de krill dispensados mediante tres modos de dosificación diferentes (Apdo. 5.2.5). Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten el mismo superíndice en una misma fila no son diferentes ($P \leq 0,05$).

Ácido graso	Emulsión comercial	LUVdet 2x0.25	LUVdet 2x0.375	LUVdet R0.50
16:0	9,4 (0,5) ^a	13,5 (0,2) ^b	13,7 (0,3) ^b	14,1 (0,6) ^b
18:0	5,2 (0,2) ^a	5,6 (0,1) ^{ab}	6,1 (0,0) ^b	5,5 (0,3) ^b
18:1n-9	17,5 (0,5) ^a	15,5 (0,3) ^b	16,6 (0,1) ^c	15,2 (0,3) ^b
18:2n-6	5,6 (0,2) ^a	4,6 (0,1) ^b	4,9 (0,0) ^c	4,6 (0,1) ^b
18:3n-3	24,2 (1,4) ^{ab}	23,6 (0,9) ^{ab}	25,7 (0,5) ^a	23,1 (0,9) ^b
20:4n-6	0,9 (0,1) ^a	0,7 (0,0) ^b	0,7 (0,0) ^b	0,7 (0,0) ^b
20:5n-3	9,7 (1,6) ^{ab}	11,3 (1,2) ^b	7,8 (0,3) ^a	12,0 (1,7) ^b
22:5n-3	0,9 (0,2) ^a	0,1 (0,0) ^b	0,1 (0,0) ^b	0,1 (0,1) ^b
22:6n-3	4,5 (1,4) ^a	3,8 (0,6) ^{ab}	2,0 (0,2) ^b	3,7 (0,8) ^{ab}
Total identificados	95,8 (0,3) ^a	96,0 (0,3) ^a	96,2 (0,3) ^a	96,3 (0,3) ^a
Saturados	15,8 (0,9) ^a	20,4 (0,4) ^b	21,9 (0,5) ^b	21,2 (0,9) ^b
Monoinsaturados	29,6 (0,9) ^a	27,3 (0,6) ^b	29,0 (0,2) ^a	27,0 (0,7) ^b
Poliinsaturados	50,4 (1,8) ^a	48,2 (0,8) ^{ab}	45,3 (0,1) ^b	48,1 (1,7) ^{ab}
Total n-3	43,4 (1,8) ^a	42,7 (0,9) ^{ab}	39,6 (0,1) ^b	42,6 (1,8) ^{ab}
Total n-6	7,3 (0,0) ^a	5,8 (0,1) ^b	6,1 (0,0) ^c	5,8 (0,1) ^b
HUFA n-3	16,4 (3,3) ^a	16,3 (1,8) ^a	10,9 (0,6) ^a	16,8 (2,5) ^a
HUFA n-6	1,3 (0,1) ^a	1,0 (0,0) ^b	0,9 (0,0) ^b	1,0 (0,1) ^b
DHA/EPA	0,5 (0,1) ^a	0,3 (0,0) ^b	0,3 (0,0) ^b	0,3 (0,0) ^b
% Lípido (PS)	26,1 (0,9) ^a	21,9 (1,2) ^b	20,7 (0,8) ^b	23,3 (1,2) ^b

HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos; DHA/EPA: relación de porcentajes de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico.

preparaciones evaluadas. Estas diferencias se manifiestan en la dinámica de incorporación de lípidos a lo largo del tiempo de incubación ya que ésta difiere no sólo con respecto a la emulsión comercial, sino también entre los distintos tipos de liposomas preparados con diferentes metodologías. Así, mientras que los nauplios enriquecidos con liposomas LUVdet presentan un patrón de incorporación lipídica similar al de la emulsión control, los nauplios enriquecidos con liposomas MLV y LUVext alcanzan su contenido

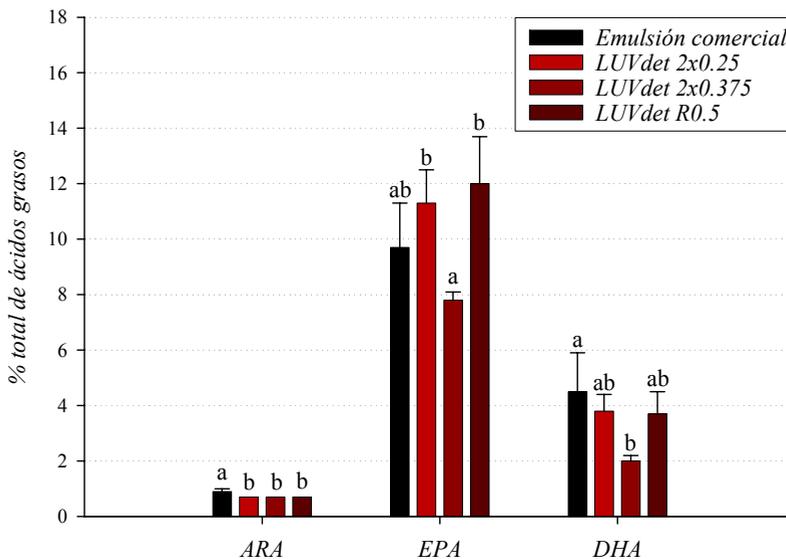


Figura 4.11. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (porcentaje del total de ácidos grasos) en nauplios enriquecidos con la emulsión comercial y liposomas LUVdet dispensados mediante tres modos de dosificación diferentes. Los valores representados son medias de tres réplicas y las barras de error son las desviaciones típicas. Los tratamientos que comparten una misma letra en cada ácido graso no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

lipídico máximo en un tiempo más breve. Una posible explicación a esta diferencia de comportamiento de los distintos tipos de liposomas puede hallarse en la integridad de las diferentes preparaciones utilizadas. Los defectos de organización y empaquetamiento de los fosfolípidos durante el proceso de preparación de los liposomas (New, 1990, p. 101) pueden propiciar irregularidades en su membrana. Este hecho, unido a las condiciones agresivas en las que tiene lugar el enriquecimiento (aireación vigorosa, presencia de nauplios, temperatura de 28 °C), puede conllevar una pérdida de integridad de las vesículas manifestada en un aumento de la heterogeneidad de tamaños de las mismas. A su vez, la elevada dispersión del tamaño de los liposomas puede acabar limitando la capacidad filtradora del nauplio. En este sentido, los resultados presentados en el Capítulo 3 confirman un aumento del tamaño medio y una elevada dispersión en

liposomas LUVext cuando éstos son incubados con nauplios. Este hecho indicaría una mayor inestabilidad de los liposomas LUVext en comparación a los liposomas LUVdet, que no sufren estos efectos. Por otra parte, la preparación de vesículas multilamelares por el método de hidratación simple de una película de fosfolípido origina una población de vesículas con una distribución de tamaños muy heterogénea y, por tanto, se comportaría como una suspensión LUVext deteriorada desde el momento inicial de la incubación.

En cuanto a la incorporación de fosfolípidos, McEvoy y cols. (1996) obtuvieron contenidos absolutos de algunas fracciones de LPs (PC y fracción combinada de CL/PG/PA) mayores en nauplios enriquecidos con liposomas formulados con una mezcla de fosfatidilcolina purificada de huevas de arenque, DPPC y CHO (2:2:1, p/p/p) cuanto éstos se compararon con los registrados en nauplios enriquecidos con una emulsión comercial (Super Selco, Inve, Bélgica). Estos autores apuntaron la posibilidad de que los niveles superiores de LPs registrados en los nauplios tratados con estos liposomas se debían a la presencia de DPPC solidificado en el sistema digestivo del nauplio, ya que a la temperatura a la que se realizó la incubación (27 °C) este fosfolípido se halla en estado sólido y, por tanto, su digestibilidad es limitada. Otros autores, sin embargo, han planteado la dificultad para modificar la fracción de LPs de los nauplios de *Artemia* aduciendo mecanismos metabólicos de los nauplios sobre el producto enriquecedor dirigidos a la conservación de la fracción fosfolipídica (Tackaert y cols., 1991; Camara, 1994; Rainuzzo y cols., 1994a). Además de la conversión de los fosfolípidos en otras clases lipídicas, la bibliografía especializada incluye varios estudios sobre otras acciones metabólicas de los nauplios sobre los lípidos del producto enriquecedor. Entre ellos pueden destacarse los estudios realizados por McEvoy y cols. (1996) en los que se describió la síntesis de TAGs a partir de FAEEs y el de Navarro y cols. (1999), cuyo estudio se dirigió al seguimiento de la transformación de ácidos grasos. Como ya hicieron McEvoy y cols. (1996), el presente trabajo confirma la posibilidad de aumentar la fracción fosfolipídica de los nauplios mediante el uso de liposomas y que este aumento tiene lugar de forma simultánea a la incorporación de EFAs en la composición bioquímica de los nauplios enriquecidos. Sin embargo, esta afirmación exige una matización debido al hecho de que los niveles de clases de lípidos del presente estudio se muestran en términos relativos (porcentajes respecto al total de lípidos) y no absolutos (mg g⁻¹ de peso seco) como hicieron McEvoy y cols. (1996). Esta circunstancia hace que las diferencias observadas en los niveles de LPs existentes entre los tratamientos con liposomas y la emulsión lipídica se atenúen

cuando son expresados en términos absolutos⁷, debido a que, en general, los nauplios con mayor contenido lipídico presentan porcentajes de LPs inferiores (Tablas 4.1a, b y c). Esto se ilustra en la Tabla 4.7, donde se recogen los valores de LPs de los nauplios correspondientes al enriquecimiento del Apartado 4.2.1, pero expresados, no sólo como porcentajes del total de lípido (como en la Tabla 4.1), sino también en unidades absolutas. Como puede comprobarse, mientras que en el punto de muestreo de 18 h (Tabla 4.7a) los contenidos de LPs muestran diferencias entre tratamientos (p. ej., el tratamiento LUVext muestra niveles significativamente

Tabla 4.7. Contenidos de lípidos polares de nauplios enriquecidos (emulsión comercial o liposomas) expresados como porcentajes del total de lípidos y en términos absolutos (mg g PS⁻¹). Los valores corresponden a nauplios recogidos en los puntos de muestreo de 18 (a), 21 (b) y 24 h (c) (Apartado 4.2.1). Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

<i>(a)</i>				
	EC	MLV	LUVext	LUVdet
LP (% total de lípidos)	21,4 (0,4) ^a	23,9 (0,6) ^b	25,6 (0,4) ^c	22,4 (0,7) ^a
LP (mg g PS ⁻¹)	62,1 (1,2) ^{ab}	65,4 (1,5) ^{bc}	68,1 (1,1) ^c	60,6 (2,0) ^a
<i>(b)</i>				
	EC	MLV	LUVext	LUVdet
LP (% total de lípidos)	22,0 (0,9) ^a	24,4 (0,5) ^b	25,6 (0,4) ^b	21,9 (0,8) ^a
LP (mg g PS ⁻¹)	67,2 (2,7) ^{ab}	66,2 (1,3) ^{ab}	68,8 (1,2) ^a	63,5 (2,4) ^b
<i>(c)</i>				
	EC	MLV	LUVext	LUVdet
LP (% total de lípidos)	22,7 (0,8) ^a	27,9 (0,5) ^b	26,6 (0,8) ^b	23,5 (1,8) ^a
LP (mg g PS ⁻¹)	66,8 (2,4) ^a	72,4 (1,4) ^a	68,4 (2,1) ^a	67,6 (5,3) ^a

EC: emulsión comercial; MLV: liposomas multilamelares; LUVext: liposomas unilamelares preparados por extrusión; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente; LP: total de lípidos polares.

⁷ La expresión del contenido de una fracción de clases lipídicas en unidades absolutas (mg g PS⁻¹) se obtiene con: % lípidos (PS) x % clase lipídica A x 10⁻¹ = mg A g PS⁻¹

superiores a los nauplios enriquecidos con la emulsión; $P \leq 0,05$), estas diferencias se atenúan a las 21 h (Tabla 4.7b) y desaparecen en el punto de 24 h (Tabla 4.7c). A la vista de estos resultados, puede concluirse que los contenidos absolutos de los LPs de los nauplios experimentan pequeñas variaciones a pesar de la gran diferencia de composición de clases lipídicas de los productos enriquecedores (Tabla 2.1). Según esto, la entrada de producto enriquecedor (liposomas) estaría seguida de un proceso de bioconversión de los fosfolípidos en TAGs. Un ejemplo claro que apoya esta hipótesis viene dado en los nauplios enriquecidos con LUVdet, ya que presentan niveles de TAGs superiores a los otros tratamientos con liposomas y, sin embargo, no presentan niveles absolutos de LPs superiores (Tabla 4.7). Esta rápida transformación de los fosfolípidos a TAGs ha sido explicada a través de las propiedades emulsionantes de los fosfolípidos tanto en rotíferos (Rainuzzo y cols., 1994b) como en nauplios de *Artemia* (Rainuzzo y cols., 1994a; McEvoy y cols., 1996). En cualquier caso, estas mínimas diferencias en el contenido total de fosfolípidos de los nauplios enriquecidos con liposomas pueden ser suficientes para ofrecer las ventajas nutricionales atribuidas a estos compuestos (Kanazawa y cols., 1983; Koven y cols., 1993a; Szlaminska y cols., 1993; Teshima y cols., 1993; Geurden y cols., 1995a, b; Coutteau y cols., 1997; Sargent y cols., 1997; Geurden y cols., 1998; Gisbert y cols., 2005).

La diferencia de comportamiento de los liposomas LUVdet y los liposomas MLV y LUVext también se pone de manifiesto en la incorporación de EFAs a lo largo del tiempo de incubación. En este sentido, el porcentaje de DHA en los nauplios enriquecidos con liposomas LUVdet fue significativamente superior a los obtenidos en nauplios tratados con MLV y LUVext, igualando, además, al tratamiento control tras 21 y 24 h de incubación. Este resultado merece ser destacado ya que el contenido de DHA de la emulsión comercial es notablemente superior al del extracto de fosfolípido de krill (Tabla 2.1). El motivo puede relacionarse con una degradación del DHA presente en las moléculas de TAGs y FAEEs que componen la emulsión comercial, ya que los ácidos grasos poliinsaturados incluidos bajo estas formas moleculares son más susceptibles a la peroxidación que los que conforman los fosfolípidos de los liposomas. (King y cols., 1992a, b; McEvoy y cols., 1997; Song y cols., 1997). Además, el DHA presente en los fosfolípidos estaría protegido no sólo por la propia estructura del fosfolípido (King y cols., 1992a), sino también por la presencia de cantidades traza de vitamina E presente en el extracto de krill utilizado para la manufactura de los liposomas, el cual actuaría como protector frente a la oxidación de las cadenas

hidrocarbonadas (Urano y cols., 1987; Fukuzawa y cols., 1993a, b). Esta hipótesis queda apoyada por los resultados obtenidos en el Capítulo 3, donde se puede observar que la incubación del producto enriquecedor en las condiciones habituales provoca un aumento de peróxidos lipídicos mucho mayor en la emulsión lipídica comercial en comparación con los liposomas. Otra posibilidad para explicar por qué el contenido de DHA del tratamiento control no difiere del de los nauplios enriquecidos con LUVdet podría relacionarse con la actividad de retroconversión del DHA a EPA realizada por los nauplios y que ya ha sido descrita en la bibliografía (Barclay y Zeller, 1996; Furuita y cols., 1996; Navarro y cols., 1999; Han y cols., 2001). Este proceso metabólico, aunque también tendría lugar en los nauplios tratados con liposomas, estaría más favorecido en los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial, de forma que los niveles de DHA en los nauplios acaban igualándose al descender los de los nauplios control. Esta última hipótesis podría justificarse por la existencia de un mecanismo regulador que limitara el contenido máximo de DHA en el nauplio. En efecto, resultados recientes obtenidos de un proyecto de investigación sobre desarrollo de prototipos enriquecedores con alto contenido en DHA (Ref.: PTR 1995-0714-OP-02-01) apuntan a la existencia de un nivel de saturación de DHA en los nauplios de *Artemia* a partir del cual, el incremento de DHA en el enriquecedor no se refleja en los nauplios (Navarro, comunicación personal). En cualquier caso, la retroconversión de DHA a EPA en los nauplios enriquecidos con la emulsión parece evidente, ya que el contenido de EPA de éstos también se iguala a pesar de ser menos abundante en la composición de la emulsión comercial (Tabla 2.1).

Todas estas consideraciones en cuanto a los patrones de enriquecimiento observados con los diferentes tipos de liposomas deben ser tomados con cautela. El enriquecimiento de presas vivas es un proceso muy variable, hecho que queda recogido en la bibliografía (Lavens y cols., 1995; Furuita y cols., 1996; van Stappen, 1996; Coutteau y Sorgeloos, 1997; Narciso y cols., 1999; Navarro y cols., 1999; Han y cols., 2000; Han y cols., 2005). Furuita y cols. (1996) trataron de explicar esta variabilidad por diferencias en el grado de desarrollo de los nauplios y, en consecuencia, por los distintos grados de capacidad metabólica. En otro estudio, van Stappen (1996) presentó la inconsistencia de las eficiencias de enriquecimiento en HUFAs n-3 cuando se comparaban los enriquecimientos de nauplios de *Artemia* enriquecidos por la misma persona o por varias distintas. Además, los resultados de un estudio de campo presentado en el mismo trabajo (van Stappen, 1996) indicaron que los niveles medios

de HUFAs n-3 de los nauplios enriquecidos también variaban de unas empresas a otras. En otro sentido, Navarro y cols. (1999) apuntaron otra posible fuente de variación proveniente de diferencias en las condiciones del régimen de aireación aplicado durante el proceso de enriquecimiento. En este sentido, los resultados del estudio sobre el efecto de la aireación recogidos en este capítulo indican un distinto efecto de la aireación en función de la naturaleza del producto enriquecedor, existiendo diferencias en el comportamiento entre la emulsión y los liposomas. Esta diferencia reforzaría la hipótesis de partida de este capítulo en la que se establecía la necesidad de adecuar las condiciones de enriquecimiento usadas con productos comerciales al empleo de liposomas. En primer lugar, los distintos modos de aireación estudiados tuvieron una baja influencia en la eficiencia del enriquecimiento cuando se utilizó la emulsión comercial como producto enriquecedor. Sólo se pudo observar un descenso importante en la incorporación de EFAs cuando el régimen hidrodinámico del medio de enriquecimiento fue muy turbulento (alta difusión combinada con un flujo de aire alto). Esta elevada turbulencia podría interferir con la natación normal de los nauplios, así como producir un efecto dañino en las estructuras filtradoras de los mismos, contribuyendo ambos factores a una baja incorporación de EFAs. En el caso de los liposomas, la eficacia de éstos como producto enriquecedor parece estar muy influida por el régimen de aireación aplicado. Así parece confirmarlo la gran variabilidad en el contenido de EFAs encontrada en los nauplios sometidos a los distintos modos de aireación. Como ya se ha descrito en las emulsiones, los bajos niveles de EFAs correspondientes a enriquecimientos llevados a cabo con flujos de aire altos aplicados con difusores también podrían explicarse por los inconvenientes ya mencionados derivados de la alta turbulencia del medio de enriquecimiento. Sin embargo, el uso de piedras difusoras permitió mejorar la incorporación de EPA y DHA cuando el flujo fue de 0,6 lpm en relación a la obtenida con varillas como sistema de difusión. Esta mejora derivada del uso de piedras difusoras observada a flujos de aire bajos (0,6 lpm) puede deberse a una mayor oxigenación del medio, circunstancia que evitaría posibles situaciones de hipoxia que limitarían la actividad respiratoria de los nauplios. Por el contrario, las varillas de vidrio forman burbujas de mayor tamaño, reduciéndose la superficie de intercambio, hecho que puede limitar la disponibilidad de oxígeno en el medio de enriquecimiento. Esta carencia de oxígeno disuelto acarrearía una disminución de las funciones biológicas de los nauplios, incluyendo su capacidad filtradora. Este déficit de oxígeno puede alcanzar niveles críticos en enriquecimientos con liposomas debido a la presencia de nauplios muertos en el medio de enriquecimiento, circunstancia que

aceleraría la reducción del oxígeno disponible debido a la actividad de los microorganismos. La ocurrencia de estas mortalidades en los enriquecimientos se discute a continuación.

En la bibliografía aparecen muy pocos trabajos en los que se muestran datos sobre supervivencia de presas vivas durante el proceso de enriquecimiento (Touraki y cols., 1995; Rodríguez y cols., 1996; Harel y cols., 1999). A la vista de los resultados reunidos en el presente capítulo, este fenómeno cobra una especial relevancia cuando los liposomas son utilizados como producto enriquecedor. En el experimento sobre el efecto de la aireación durante el enriquecimiento, la utilización de piedras difusoras provocó un descenso en la supervivencia naupliar para los tres flujos de aire considerados y, aunque la utilización de varillas de vidrio también tuvo asociada una mortalidad notable, ésta fue menor. Esta circunstancia puede tener su origen en dos procesos relacionados con las características físico-químicas de los liposomas. En primer lugar, la aplicación de aireación en un medio que contiene elementos tensoactivos como los liposomas, provoca la formación de espuma, la cual va retirando nauplios embebidos en su fracción líquida hasta dejarlos pegados en la pared del tubo de enriquecimiento donde mueren. Este efecto es más importante cuanto más espuma se forma, circunstancia que ocurre con flujos de aire elevados y alto grado de difusión del aire (uso de piedras difusoras). En segundo lugar, un proceso que puede causar mortalidad de nauplios al ser incubados con liposomas es la transferencia intermembrana de componentes lipídicos, mecanismo que tiene lugar por una aproximación entre las bicapas de liposomas y células (New, 1990). De esta forma, la matriz hidrocarbonada de las membranas fosfolipídicas puede actuar de colector de componentes lipídicos procedentes del nauplio, produciendo un efecto de “lavado” de componentes vitales del nauplio, similar al de los detergentes (ver Figura 4.4). En este sentido, los crustáceos de la Clase *Branchiopoda*, grupo taxonómico al que pertenece *Artemia*, se caracterizan por la presencia de una cutícula fina que ofrecería una protección muy débil frente a este proceso. En efecto, los análisis realizados sobre los lípidos presentes en el medio de enriquecimiento confirman la presencia de cantidades elevadas de compuestos carotenoides (cantaxantina, principalmente; Nelis y cols., 1988; van der Meeren, 2001) en muestras correspondientes a enriquecimientos con liposomas, mientras que la presencia de estos pigmentos es despreciable en el medio de enriquecimiento correspondiente a los tratamientos con emulsiones. En cualquier caso, la aplicación de flujos de aire altos en combinación con el uso de piedras difusoras provoca importantes mortalidades de nauplios

incluso cuando se utiliza la emulsión comercial como producto enriquecedor. La altísima turbulencia presentada con anterioridad como posible causa de la disminución de la actividad filtradora del nauplio puede también conllevar una importante mortalidad de los mismos. Este hecho se confirma en los datos de supervivencia naupliar obtenidos en condiciones de alta turbulencia y sin ningún producto enriquecedor en el medio (barras rayadas en Figura 4.3). Las tasas de supervivencia naupliar de los ensayos en los que se evaluó el efecto de la densidad de nauplios, la concentración de liposomas y su dosificación, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, incluidos los tratamientos control con la emulsión lipídica como enriquecedor. Pese a ello, se observa una tendencia al aumento de la mortalidad naupliar asociada a la presencia de mayor cantidad de liposomas ya que esto comportaría mayor probabilidad de ocurrencia del efecto letal planteado anteriormente.

En términos generales, los experimentos sobre el efecto de la densidad naupliar y la concentración de liposomas sobre la eficacia de éstos como producto enriquecedor muestran unos resultados óptimos en condiciones similares a las que normalmente se establecen con productos basados en emulsiones lipídicas, es decir, 300 nauplios ml^{-1} de densidad naupliar y 0,50 g lípido l^{-1} de concentración de enriquecedor. Efectivamente, la mayoría de estudios sobre enriquecimiento de nauplios de *Artemia* fijan estos dos parámetros en valores cercanos a los mencionados (Léger y cols., 1986; Koven y cols., 2003; Bransden y cols., 2005). Sin embargo, otros estudios en los que se han empleado liposomas para enriquecer nauplios de *Artemia* varían notablemente estos dos parámetros. De esta forma, Ozkizilcik y Chu. (1994) usaron liposomas MLV para enriquecer nauplios de *Artemia* a una densidad de 450 nauplios ml^{-1} y una concentración de enriquecedor de 1,2 g lípido l^{-1} , mientras que McEvoy y cols. (1996) lo hicieron a una densidad de 650 nauplios ml^{-1} y una concentración de 1,0 g lípido l^{-1} . En ambos casos, los liposomas mostraron una eficacia enriquecedora evidente. A pesar de la aparente discrepancia entre el planteamiento de estos dos estudios y el aquí presentado, los resultados del presente trabajo confirman que tanto la densidad naupliar y la concentración de enriquecedor deben ser fijados, en el caso de liposomas LUVdet de krill, en valores análogos a los de las emulsiones lipídicas. La ocurrencia de mortalidades naupliares elevadas podría haber aconsejado, en los citados estudios (Ozkizilcik y Chu, 1994; McEvoy y cols., 1996), un aumento de la densidad naupliar en los enriquecimientos con liposomas, aunque en ningún caso se mencionan los motivos para tal decisión. Otro resultado importante del experimento en el que se

evalúa el efecto de la concentración de liposomas es que la incorporación de EFAs en los nauplios no es proporcional a la cantidad de enriquecedor disponible durante la incubación. De esta forma, la mejora en la bioencapsulación de EFAs desde 0,25 a 0,50 g lípido l⁻¹ no se manifiesta cuando la concentración se aumenta hasta 0,75 g lípido l⁻¹. Esto puede deberse a que la filtración pasiva del nauplio provoca el llenado completo del tracto digestivo. En estas circunstancias, la continuación de la batida de los apéndices sigue incorporando más partículas del medio al tracto digestivo, pero provoca la evacuación de otras partículas no asimiladas en forma de heces. Este mecanismo fue planteado para explicar el bajo crecimiento que experimenta *Artemia* cuando se mantiene en medios con alta concentración de células fitoplanctónicas, ya que las células incorporadas desde el medio desplazan las presentes en el tracto digestivo sin poder ser asimiladas (Reeve, 1963; Nimura, 1980).

En cuanto al estudio de la dosificación del enriquecedor, los fabricantes de estos productos aconsejan la utilización de sus productos en dos dosis separadas. Esta estrategia tiene como fin minimizar el tiempo en el que el producto enriquecedor está sometido a condiciones físico-químicas agresivas. En este sentido, la degradación química de productos enriquecedores ha sido descrita en la bibliografía (McEvoy y cols., 1995) y, además, ha sido confirmada en el Capítulo 3. A pesar de que no se estimó ningún parámetro indicativo de degradación en los experimentos incluidos en este capítulo (p. ej., formación de peróxidos) y, por tanto, no es posible comprobar una menor producción de los mismos cuando el enriquecedor se dispensa en dos dosis separadas, la bioencapsulación de EFAs en los nauplios sí puede informar sobre la eficacia de esta estrategia. Así, la comparación del contenido de EFAs entre los dos tratamientos con la misma cantidad final de enriquecedor pero ofrecidos en una o dos dosis (p. ej., los tratamientos LUVdet 0.50 y LUVdet 2x0.25 de los Apartados 4.2.4 y 4.2.5, respectivamente) no revela diferencias importantes. Este resultado cuestionaría la eficacia de la administración de los liposomas en dos dosis como estrategia para mejorar su rendimiento como enriquecedor y, en consecuencia, la degradación, presentada como principal motivo para el establecimiento de una administración en dos dosis, no parece ser un proceso demasiado severo en liposomas LUVdet. Asimismo, los resultados registrados por esta formulación en los ensayos sobre cambios de la distribución de tamaños y de formación de peróxidos presentados en el Capítulo 3 confirman la escasa importancia de ambos procesos degradativos.

En resumen, los resultados indican que la capacidad enriquecedora de los liposomas varía en función del tipo de vesícula, siendo los liposomas preparados por el método de solubilización por detergente (LUVdet) los que lograron mayores niveles de bioencapsulación de EFAs. Los nauplios enriquecidos con estos liposomas alcanzaron niveles de enriquecimiento similares a los obtenidos en nauplios enriquecidos con la emulsión comercial, pese a que este último producto presenta una composición con niveles muy superiores de DHA comparados con los del extracto de fosfolípidos de krill con el que se formularon los liposomas. Además, los resultados aconsejan prolongar el proceso de enriquecimiento de *Artemia* con estos liposomas durante 21 h, mientras que en los nauplios tratados con las otras preparaciones no se refleja un aumento de lípidos totales a partir de 18 h. En cuanto a los fosfolípidos, los nauplios enriquecidos con liposomas presentan contenidos porcentuales superiores a los enriquecidos con la emulsión comercial rica en lípidos neutros. A pesar de que los liposomas se componen únicamente de fosfolípidos, las diferencias son mínimas debido posiblemente a una transformación del nauplio sobre el producto enriquecedor.

En cualquier caso, los resultados de enriquecimiento de nauplios deben considerarse con cautela debido a la existencia de una variabilidad inherente al proceso y que puede depender de diversos factores. Un parámetro que juega un papel esencial en los enriquecimientos con liposomas es la aireación aplicada durante la incubación. Su efecto se manifiesta, no sólo en términos de niveles de EFAs de los nauplios enriquecidos, sino que también tiene una influencia determinante en la supervivencia de los mismos. Según se ha constatado en los experimentos de este capítulo, la mortalidad de nauplios en enriquecimientos con liposomas es un fenómeno habitual que debe ser minimizado en la medida de lo posible empleando las condiciones de enriquecimiento más favorables. En este sentido, las mortandades de nauplios asociadas al uso de liposomas pueden minimizarse utilizando recipientes de diámetro grande (p. ej., 0,5 m) donde la espuma formada por la aireación no puede canalizarse, ni salir del recipiente. Esta medida, combinada con el uso de piedras difusora y un flujo de aire bajo aseguraría un rendimiento óptimo de liposomas LUVdet formulados con fosfolípidos de krill. El protocolo óptimo de uso de este producto enriquecedor consistiría en una incubación de unas 21 h, una aireación de 1,0 lpm aplicada mediante varillas huecas, una densidad naupliar de 300 ind ml⁻¹ y una concentración de material enriquecedor de 0,50 g lípido l⁻¹ administrado en una única dosis al inicio de la incubación.

CAPÍTULO 5

ENRIQUECIMIENTO DE NAUPLIOS DE Artemia EN OTROS NUTRIENTES ESENCIALES: VITAMINA A, VITAMINA C Y METIONINA

5.1. Introducción

La mayoría de los estudios sobre nutrición larvaria de especies marinas centran su atención en la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como nutrientes esenciales. Sin embargo, existen otros compuestos cuya inclusión en la dieta es necesaria para el desarrollo pleno de todas las funciones biológicas de las larvas en cultivo. Entre éstos destacan las vitaminas y los aminoácidos libres, nutrientes cuya importancia en acuicultura ha sido ampliamente descrita en la bibliografía.

Las vitaminas constituyen un grupo de sustancias química y funcionalmente heterogéneas que pueden dividirse en dos grandes grupos en función de sus propiedades físicas: vitaminas liposolubles y vitaminas hidrosolubles (Gouillou-Coustans y Guillaume, 2001). Entre las liposolubles, la vitamina A representa un nutriente esencial para peces debido a que éstos no son capaces de sintetizarla y, por tanto, su inclusión en la dieta es imprescindible para el crecimiento del organismo (Halver, 2002). La vitamina A es el término genérico con el que se denominan todos aquellos compuestos con las mismas propiedades biológicas que el todo-*trans*-retinol (Beare-Rogers y cols., 2001; Furr y McGrane, 2003), entre las que se incluyen el mantenimiento del tejido epitelial y la visión. De esta forma, la vitamina A puede hallarse en los tejidos corporales de los animales bajo la forma de alcohol (retinol), aldehído (retinal) y ésteres de retinol (*National Research Council*, 1993; Combs, 1998). Además, también se encuentra como ácido retinoico que, a pesar de no estar implicado en mecanismos de la función visual, representa un metabolito activo con muchas funciones propias de la vitamina A (Furr y McGrane, 2003). Entre las funciones más importantes de la vitamina A en peces, la visión tiene un interés destacado debido a que la mayoría de las especies de peces marinos cultivadas son predadores visuales y requieren una retina funcional al inicio de la fase de alimentación exógena (Hunter, 1981). En este sentido, el retinal forma parte del grupo prostético fotorreactivo de las opsinas⁸ presentes en la retina (Voet y Voet, 1992, p. 311; Rønnestad y cols., 1998b). Las carencias de esta vitamina pueden afectar al correcto funcionamiento de los órganos de visión de la larva, mermando su capacidad predadora. En el caso específico de larvas de peces marinos, la vitamina A ha suscitado además un gran interés en la cría de especies

⁸ Proteínas presente en la retina con un residuo de lisina con el que se une al retinal formando el complejo denominado rodopsina.

del orden pleuronectiformes como el fletán o *halibut* atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), el rodaballo (*Psetta maxima*) y la platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*). En estas especies, la carencia de vitamina A en la dieta se ha relacionado con la aparición de pseudoalbinismo, síndrome caracterizado por la ausencia de pigmentación en la totalidad o parte de la superficie corporal (Seikai y cols., 1987; Estévez y Kanazawa, 1995). Además, el bajo contenido de vitamina A en nauplios de *Artemia* usados en la alimentación de larvas de estas especies puede acarrear una migración del ojo incompleta durante la metamorfosis de estos peces planos (Saele y cols., 2003). Por el contrario, el exceso de vitamina A en la dieta produce malformaciones óseas como la fusión de vértebras observada en la platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*) (Dedi y cols., 1995; Dedi y cols., 1997), así como la deformación de la mandíbula (Haga y cols., 2003). La aparición de tales deformidades lleva implícita una pérdida de valor económico del producto y, en consecuencia, una pérdida de la productividad del cultivo.

En cuanto a las vitaminas hidrosolubles, la vitamina C o ácido ascórbico⁹ ocupa un lugar destacado en nutrición de peces dado su carácter esencial. Ello es debido a la carencia del enzima gulonolactona oxidasa, necesaria en la síntesis de dicha vitamina, y que, por tanto, los peces deben conseguir a través de la dieta. El *Nacional Research Council* (1993) recomienda entre 25 y 50 mg vitC kg⁻¹dieta como los niveles mínimos seguros para peces juveniles. Los niveles inferiores son deficientes y pueden ser causantes de malformaciones óseas, como el síndrome de la espina rota. Además, Dabrowski (1991) sugirió que los requerimientos en vitamina C dependían principalmente de la tasa metabólica del organismo. De esta forma, el crecimiento acelerado de las larvas de peces aumentaría, si cabe, los requerimientos de ácido ascórbico (Dabrowski y cols., 1988; Dabrowski, 1990). Además de su carácter esencial, la vitamina C tiene propiedades antioxidantes (Hwang y Lin, 2002), inmunoestimulantes (Cuesta y cols., 2002; Lee y Shiau, 2002) y antiestrés (Henrique y cols., 2002) que hacen que las dietas destinadas a la acuicultura contengan megadosis de este nutriente.

Los aminoácidos, por su parte, constituyen otro grupo de nutrientes de gran importancia para las larvas de peces marinos. Concretamente, los aminoácidos libres se hallan en cantidades muy altas en los huevos de peces, así como en algunas presas vivas pertenecientes a su red trófica natural (Rønnestad, 1992; Fyhn y cols., 1993; Rønnestad

⁹ En el presente estudio se utilizó el compuesto ascorbato sódico como fuente del ión ascorbato que resultaría de la disociación del ácido ascórbico en disolución.

y cols., 1999). Esto lleva a pensar que los aminoácidos son nutrientes de gran importancia en los primeros estadios de desarrollo larvario, y que su inclusión en la dieta puede contribuir a un mayor éxito en la producción final de larvas. Los aminoácidos libres cumplen tres funciones en la dieta de larvas de peces: 1) como compuesto nutricional necesario para el crecimiento (formación de nuevos tejidos); 2) como fuente de energía (Rønnestad y cols., 1999); y 3) como atrayente organoléptico (Kolkovski y cols., 1997a, b; Hara, 2006).

A pesar de que los nauplios de *Artemia* contienen vitamina A, vitamina C y aminoácidos libres (Fyhn y cols., 1993; Merchie y cols., 1997; Takeuchi y cols., 1998b; Helland y cols., 2000), muchos productos enriquecedores incorporan estos compuestos para complementar el contenido natural del nauplio y para aprovechar las citadas propiedades antioxidantes de algunos de ellos (vitamina A y vitamina C). Sin embargo, la inclusión de estos nutrientes en la dieta queda dificultada, en ocasiones, por la polaridad del compuesto y la del producto enriquecedor. En el caso de las emulsiones, las gotículas o micelas formadas cuando el producto se dispersa en medios acuosos poseen una estructura con un núcleo liposoluble que limita la inclusión de compuestos hidrosolubles (Figura 1.5a). La administración de algunos nutrientes importantes en larvicultura marina con naturaleza hidrosoluble se ha resuelto mediante la utilización de derivados liposolubles. Este es el caso de la vitamina C, cuyo derivado liposoluble palmitato ascórbico ha sido utilizado exitosamente para enriquecer presas vivas en vitamina C (Merchie y cols., 1995a, b). Los aminoácidos, por otro lado, son compuestos muy solubles en el agua pero muy insolubles en los disolventes orgánicos (Voet y Voet, 1992, p. 64) y, en consecuencia, su inclusión en emulsiones lipídicas parece complicada. No obstante, en los últimos años han aparecido productos comerciales basados en emulsiones cuya descripción informa sobre la presencia de aminoácidos. A pesar de esto, las firmas comerciales no detallan si los aminoácidos se hallan en su forma libre, o bien forman parte de proteínas, en cuyo caso podrían resultar ineficaces para larvas con baja capacidad proteolítica (Langdon y Önal, 2005). Esto mismo ocurre con el otro gran grupo de productos enriquecedores como son los basados en microalgas secadas por atomización (*spray-dried*), donde la descripción del producto incluye también vitaminas.

Los liposomas son vesículas constituidas por una membrana lipídica que encierra un compartimento acuoso en su interior (Figura 1.5b, c) que permite formularlos con nutrientes hidrosolubles difícilmente incorporables en productos enriquecedores convencionales. Algunos trabajos previos han estudiado la capacidad de

los liposomas para vehicular sustancias de naturaleza distinta en presas vivas (Hontoria y cols., 1994; Ozkizilcik y Chu, 1994; Touraki y cols., 1995; McEvoy y cols., 1996; Tonheim y cols., 2000). A la vista de lo expuesto, este capítulo aborda el estudio sobre la capacidad de varias formulaciones de liposomas para enriquecer nauplios de *Artemia* en vitamina A, vitamina C y metionina, nutrientes escogidos como modelos de vitamina liposoluble, vitamina hidrosoluble y aminoácido, respectivamente. La elección de metionina responde al hecho de que su contenido en nauplios de *Artemia* presenta niveles traza y, en consecuencia, puede actuar como nutriente limitante para las larvas en cultivo (Fyhn y cols., 1993; Helland, 2000).

5.2. Material y métodos

Los liposomas utilizados en los experimentos de este capítulo se escogieron en función de la naturaleza liposoluble (palmitato de retinol) o hidrosoluble (ascorbato y metionina) del nutriente vehiculado. De esta forma, los liposomas seleccionados para el enriquecimiento de vitamina A (liposoluble) fueron formulados, además de palmitato de retinol como fuente de vitamina A, con fosfolípidos de krill (KPL) como único componente estructural de membrana. El criterio de selección prevaleciente en la elección de esta combinación se basó en la posibilidad de administrar simultáneamente nutrientes esenciales lipofílicos (HUFAs contenidos en los fosfolípidos de krill y vitamina A), en detrimento de la nutrientes hidrosolubles. Como apuntan los resultados obtenidos en el Capítulo 3 (Apartado 3.3.1), la inclusión de vitaminas liposolubles en la formulación de liposomas reduce la capacidad de éstos para retener las sustancias acuosas presentes en la fase hidrofílica intravesicular (Apartado 3.3.1). En consecuencia, si la incorporación de la vitamina lipofílica es preceptiva, la estrategia más recomendable pasa por la utilización de liposomas formulados con fosfolípidos altamente insaturados, los cuales, a pesar de mostrar una escasa retención de nutrientes hidrosolubles en la fase acuosa interna (Apartado 3.3.1), ofrecen la posibilidad de incluir vitamina A y, simultáneamente, los EFAs del fosfolípido de krill.

En el caso de nutrientes hidrosolubles (ascorbato y metionina), las formulaciones liposomales más adecuadas para vehicular este tipo de moléculas son aquéllas compuestas por SPC y DPPC, según se desprende de los resultados obtenidos en el Capítulo 3. El criterio de selección del tipo de liposomas (MLV, LUVdet o LUVext) seguido en ambos enriquecimientos (Apartados 5.2.2 y 5.2.3) se basó en la disponibilidad de tipologías en el momento de realización de cada experimento y en los resultados previos obtenidos hasta el momento. Además, la composición de membrana de las preparaciones empleadas

coincidió con la composición evaluada en las pruebas de capacidad de retención de sustancias hidrosolubles (Capítulo 3). De esta forma, las formulaciones LUVext empleadas en el enriquecimiento en metionina (Apartado 5.2.3) contienen colesterol (CHO), compuesto que no fue incluido en las suspensiones preparadas mediante el método de solubilización por detergente (LUVdet) escogidas en el enriquecimiento en ascorbato (Apartado 5.2.2). Por su parte, a pesar de la baja capacidad de retención de sustancias disueltas de las suspensiones multilamelares (MLVs), se decidió incluir una suspensión de MLVs en el enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con metionina (Apartado 5.2.3) con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en el Capítulo 3 (Apartado 3.3.1).

Además de la composición de membrana, los liposomas destinados a vehicular sustancias hidrosolubles pueden mejorar su eficacia mediante su administración en dos dosis separadas en el tiempo debido a la mayor disponibilidad de liposomas con el contenido acuoso intacto (Capítulo 3). Para comprobar estos resultados, los enriquecimientos en ascorbato y metionina incluyeron tratamientos en los que los liposomas se administraron en dos dosis diferentes. Los detalles del diseño experimental seguido en cada uno de los tres experimentos se amplían a continuación.

5.2.1. Enriquecimiento de nauplios de *Artemia* en vitamina A

El enriquecimiento de nauplios de *Artemia* en vitamina A se realizó utilizando dos preparaciones de liposomas y la emulsión control Super Selco (Inve, Gante, Bélgica) cuya composición incluye palmitato de retinol como fuente de vitamina A ($1,9 \mu\text{g mg}^{-1}$ producto). Los dos tipos de liposomas empleados se formularon con fosfolípido de krill (KPL) y palmitato de retinol en una proporción 100:2 (p/p) en los liposomas preparados mediante la metodología de solubilización por detergente (LUVdetVitA) y 100:1 (p/p) en los liposomas de extrusión (LUVextVitA). El procedimiento de preparación de estas suspensiones de liposomas fue el detallado en el Apartado 2.1.

Los enriquecimientos se llevaron a cabo con nauplios de *Artemia* procedentes de la eclosión de quistes EG (Inve, Gante, Bélgica). Una vez separados de las cáscaras y dispuestos en los respectivos tubos de enriquecimiento a densidades de unos $300 \text{ nauplios ml}^{-1}$, los nauplios fueron incubados con los tres productos enriquecedores por triplicado en tubos separados, a la concentración habitual de $0,50 \text{ g lípido l}^{-1}$. La concentración de palmitato de retinol en el medio de enriquecimiento fue de $1,3$, $5,0$ y $10,0 \text{ mg l}^{-1}$ en los tratamientos de Emulsión comercial, LUVextVitA y LUVdetVitA,

respectivamente. La temperatura de incubación fue de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y la intensidad lumínica en la superficie del medio de enriquecimiento de unos 1500-2000 lux. Las muestras de nauplios enriquecidos se tomaron tras 18 y 21 h de incubación, dejando parte de los nauplios en agua de mar sin enriquecedor durante 3 h más (24 h) a la misma temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Al igual que en experimentos anteriores, este último punto de muestreo informa sobre la dinámica de la vitamina A en nauplios que permanezcan un tiempo en el tanque de cría larvaria sin ser consumidos. Las muestras de nauplios se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis. El análisis de retinol se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Takeuchi y cols. (1998b) y detallado en el Apartado 2.4.4.

Los contenidos de retinol de los nauplios tratados con los diferentes productos enriquecedores se compararon entre sí en cada uno de los tres puntos de muestreo planteados. Las pruebas utilizadas en este análisis se describen en el Apartado 2.5.

5.2.2. Enriquecimiento de nauplios de Artemia en vitamina C

Este experimento evaluó el enriquecimiento en ascorbato (vitamina C) obtenido con cuatro tratamientos enriquecedores. Además del tratamiento control consistente en la emulsión lipídica comercial Super Selco (Inve, Gante, Bélgica),¹⁰ se emplearon liposomas LUVdet cuya membrana se componía únicamente por SPC y cuya fase acuosa contenía ascorbato sódico disuelto a una concentración de 100 mg ml^{-1} , administrados de dos maneras distintas. El método de preparación de estos liposomas ha sido el descrito en el Apartado 2.1. El cuarto tratamiento consistió en ascorbato sódico (100 mg ml^{-1}) disuelto en una disolución acuosa equivalente a la fase acuosa de los liposomas LUVdet (disolución en 0,9% de NaCl, p/v).

Los nauplios obtenidos de la eclosión de quistes EG (Inve, Gante, Bélgica) se incubaron con los cuatro enriquecedores a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. En el primer tratamiento de liposomas (LUVdetAsc1), el enriquecedor se dispensó en una sola dosis al inicio de la incubación, de forma que la concentración de lípido y ascorbato en el medio de enriquecimiento fue de $0,50 \text{ g l}^{-1}$. En el segundo tratamiento de liposomas (LUVdetAsc2), el enriquecedor se administró en dos dosis, una al inicio y otra 7 h después, para dar una

¹⁰ La descripción del producto comercial indica la presencia de vitaminas, aunque no se explicita la presencia de vitamina C. En cualquier caso, la naturaleza lipofílica del palmitato ascórbico permite su inclusión en productos enriquecedores basados en emulsiones lipídicas como fuente de vitamina C (Merchie y cols., 1997).

concentración final acumulada equivalente al tratamiento LUVdetAsc1. El cuarto tratamiento (Disolución) fue dispensado en una única dosis al inicio de la incubación, resultando en una concentración de ascorbato sódico equivalente a la de los dos tratamientos con liposomas (0,50 g l⁻¹). El tiempo de incubación de los nauplios con los productos enriquecedores fue de 18 y 21 h, estableciendo un tercer punto de muestreo en el que los nauplios se dejaron durante 3 h más (24 h) en agua de mar sin ascorbato a la misma temperatura (28 ± 1°C). El flujo de aire aplicado en el medio de enriquecimiento fue de aproximadamente 1,0 lpm. Las condiciones de iluminación y densidad de nauplios fueron las habituales (Apartado 2.2.2). Cada tratamiento se evaluó por triplicado en tubos de enriquecimiento independientes. Las muestras de nauplios correspondientes a los tres puntos de muestreo se recolectaron mediante el procedimiento habitual y se conservaron a -20 °C. El análisis de ascorbato se realizó a partir de las muestras liofilizadas siguiendo el procedimiento descrito por Shiau y Hsu (1994) y que se ha detallado en el Capítulo 2 (Apartado 2.4.5).

El enriquecimiento de nauplios de *Artemia* en vitamina C presentado en este capítulo también fue evaluado en términos de supervivencia de nauplios a las 18 h de incubación (Apartado 2.2.3). La supervivencia naupliar no fue determinada en los otros dos experimentos que completan este capítulo debido a que en el momento de su realización no se consideraba un fenómeno que afectara al proceso de forma importante.

Como en el experimento del apartado anterior, los contenidos de ascorbato de los nauplios pertenecientes a los distintos tratamientos se compararon entre sí en cada uno de los tres puntos de muestreo planteados. Las pruebas estadísticas utilizadas se describen en el Apartado 2.5.

5.2.3. Enriquecimiento de nauplios de *Artemia* en metionina

El enriquecimiento de nauplios de *Artemia* se realizó con cinco productos enriquecedores, de los cuales, cuatro se basaron en liposomas cuya fase acuosa contenía metionina disuelta a una concentración de 40 mg ml⁻¹. Concretamente, los tratamientos LUVextMet1 y LUVextMet2 se llevaron a cabo con liposomas preparados mediante el método de extrusión y formulados con SPC y CHO (4:1, p/p). Mientras que la administración de LUVextMet1 se hizo en una única dosis al inicio de la incubación, el tratamiento LUVextMet2 fue dispensado en dos dosis, la primera al inicio y la segunda 8 h después del comienzo de la incubación. El tercer

tratamiento de liposomas (LUVextMet3), consistió en una incubación con vesículas preparadas por extrusión y compuestas de DPPC y CHO (4:1, p/p). La hidratación de la mezcla DPPC:CHO con la disolución de metionina se realizó en un baño termostatzado a una temperatura de 45°C, por encima de la temperatura de transición de fase líquido cristalina-gel (T_c) de este fosfolípido (Apartado 2.1). La última preparación de liposomas (MLVMet4) empleada estaba constituida de vesículas multilamelares obtenidas por hidratación simple de una mezcla de SPC y CHO (4:1, p/p) con una disolución de metionina en agua de mar (Apartado 2.1). Por último, el quinto producto enriquecedor probado fue una disolución de metionina en agua de mar a una concentración de 40 mg ml⁻¹ (Disolución).

Los enriquecimientos se llevaron a cabo con nauplios recién eclosionados de quistes EG (Inve, Gante, Bélgica). En los cinco tratamientos, la concentración final de metionina en el tubo de enriquecimiento fue de 0,2 g l⁻¹, mientras que la concentración lipídica inicial de los enriquecimientos con liposomas fue de 0.5 g l⁻¹. A diferencia de la mayoría de experimentos presentados en esta memoria, el tratamiento control consistente en la emulsión lipídica comercial (Super Selco) fue obviado por carecer de aminoácidos en su composición. Las incubaciones se realizaron en tubos cilindro-cónicos de 1 l de capacidad, en condiciones de iluminación y temperatura habituales (Apartado 2.2.2). La aireación del medio de enriquecimiento fue aproximadamente de 1,0 lpm y se aplicó mediante varillas huecas como las usadas en otros experimentos anteriores.

Las muestras de nauplios se tomaron tras 18 y 21 h de incubación con los diferentes productos. Como en otros experimentos, parte de los nauplios se mantuvieron en agua de mar libre de metionina durante 3 h más (24 h) hasta ser finalmente muestreados. Las muestras se congelaron a -20°C y posteriormente fueron liofilizadas hasta la realización del análisis de aminoácidos libres (Apartado 2.4.6).

El análisis estadístico realizado se basó en una comparación de los contenidos de metionina de los nauplios tratados con los diferentes productos enriquecedores en cada uno de los tres puntos de muestreo previstos en el diseño experimental. Las pruebas empleadas para este análisis se detallan en el Apartado 2.5.

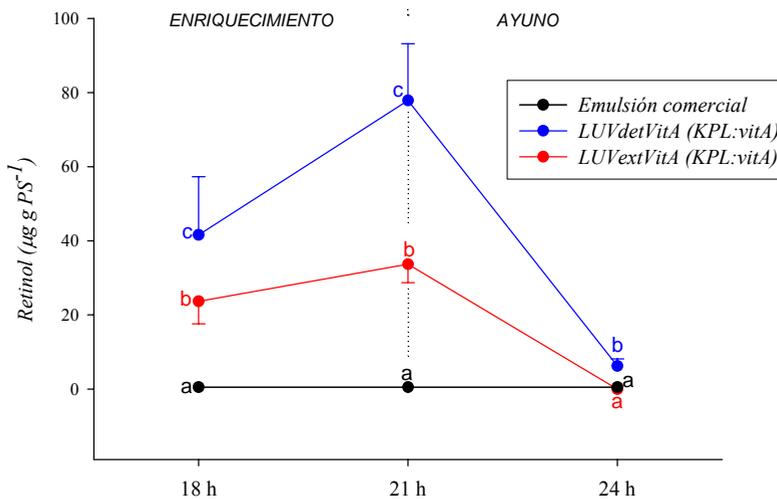


Figura 5.1. Contenido de retinol ($\mu\text{g g PS}^{-1}$) de nauplios de *Artemia* incubados con los productos enriquecedores durante 18 y 21 h. Las muestras de 24 h corresponden a nauplios que se dejaron durante 3 h más en agua de mar sin enriquecedor. Los valores son medias y las barras de error representan desviaciones típicas ($n=3$). En cada punto de muestreo, los tratamientos que comparten una misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

5.3. Resultados

5.3.1. Enriquecimiento de nauplios de Artemia en vitamina A

Los análisis del retinol (Figura 5.1) presente en los nauplios enriquecidos muestran una relación directa con el contenido de palmitato de retinol del producto enriquecedor. De esta forma, los nauplios enriquecidos con liposomas LUVdetVitA muestran niveles superiores de retinol en los tres puntos de muestreo en comparación a los otros dos tratamientos. A su vez, los nauplios tratados con LUVextVitA presentan contenidos mayores de retinol que los tratados con la emulsión lipídica comercial tras 18 y 21 h de incubación, igualándose en el punto de muestreo de 24 h. Debe señalarse que los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial, cuya composición tiene el nivel menor de palmitato de retinol de entre los tres enriquecedores evaluados, muestran niveles de retinol por debajo del

umbral de detección de la técnica analítica. En cuanto a la incorporación de retinol a lo largo del tiempo de incubación, los niveles medidos en los nauplios enriquecidos con liposomas formulados con palmitato de retinol no experimentaron cambios importantes en el periodo desde 18 a 21 h. Sin embargo, el periodo de ayuno provocó un descenso marcado en el contenido de retinol de los nauplios de ambos tratamientos, situándose por debajo del umbral de detección en los nauplios enriquecidos con liposomas LUVextVitA (Figura 5.1).

5.3.2. Enriquecimiento de nauplios de *Artemia* en vitamina C

Los análisis de ascorbato (Figura 5.2) muestran que los nauplios tratados con la emulsión comercial tienen, en términos generales, niveles de ascorbato inferiores a los de los otros tratamientos. Esta diferencia es significativa en el punto de muestreo de 18 h. Cabe destacar la ausencia de diferencias significativas entre

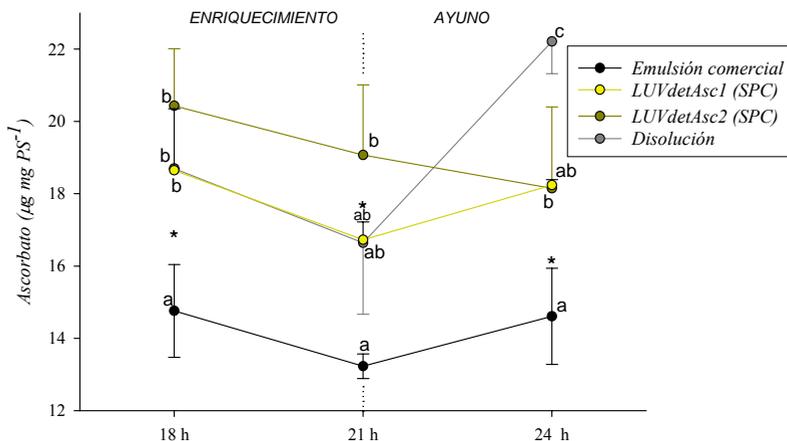


Figura 5.2. Contenido de ascorbato ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$) de nauplios de *Artemia* incubados con los productos enriquecedores durante 18 y 21 h. Las muestras de 24 h corresponden a nauplios que se dejaron durante 3 h más en agua de mar sin enriquecedor. Los valores son medias y las barras de error representan desviaciones típicas ($n=3$). En cada punto de muestreo, los tratamientos que comparten una misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

* Contenido de ascorbato ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$) medido en nauplios incubados sin enriquecedor ($n=1$).

los niveles de ascorbato hallados en nauplios enriquecidos con liposomas administrados en una o dos dosis (LUVdetAsc1 y LUVdetAsc2, respectivamente) en los tres puntos de muestreo. Los nauplios incubados con la disolución acuosa de ascorbato, por otra parte, no sólo presentan contenidos iguales a los nauplios tratados con liposomas sino que, tras el periodo de ayuno, muestran un nivel de ascorbato superior al resto de tratamientos. Además, la figura también muestra el contenido de ascorbato de nauplios incubados sin enriquecedor en las mismas condiciones que los nauplios tratados (indicado con el signo “*”). Como puede apreciarse, el contenido de ascorbato en estos nauplios se halla en valores similares a los de los nauplios enriquecidos. En cuanto a la incorporación de ascorbato a lo largo del tiempo, ninguno de los tratamientos experimentó cambios claros durante el periodo de estudio, a excepción del incremento observado en el periodo de ayuno en los nauplios incubados con la disolución (Figura 5.2).

La supervivencia de los nauplios de los distintos tratamientos no registró diferencias significativas, superando en todos los casos el 90% tras 21 h de incubación.

5.3.3. Enriquecimiento de nauplios de Artemia en metionina

En la Figura 5.3 se representan los contenidos de metionina libre medidos en los nauplios de los distintos tratamientos. Tras 18 h de incubación, los nauplios enriquecidos con MLVs registran contenidos de metionina libre significativamente superiores al resto de tratamientos. Esta diferencia se mantiene en el punto de muestreo de 21 h, aunque los nauplios LUVextMet2 (2 dosis) no muestran diferencias respecto a los nauplios enriquecidos con MLVs. Esta tendencia continúa en el punto de muestreo de 24 h, aunque el mayor contenido de metionina libre de los nauplios tratados con MLVs sólo supera al tratamiento LUVextMet1 y Disolución. Por su parte, la dinámica de incorporación de metionina a lo largo del tiempo apunta a variaciones poco importantes durante el periodo que va de 18 a 21 h, a excepción del los nauplios LUVextMet1 que parecen experimentar un aumento en el contenido de metionina libre. Por el contrario, el periodo de ayuno en el que los nauplios se mantuvieron sin metionina (de 21 a 24 h) se traduce en un aparente descenso en los niveles de metionina libre en los cinco tratamientos.

5.4. Discusión

La capacidad de los liposomas para vehicular sustancias de naturaleza hidrosoluble y liposoluble ha sido empleada para mejorar la

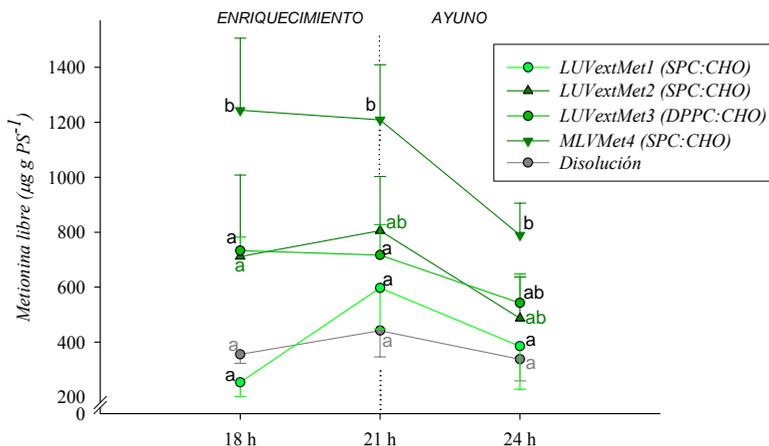


Figura 5.3. Contenido de metionina libre ($\mu\text{g g PS}^{-1}$) de nauplios de *Artemia* incubados con los productos enriquecedores durante 18 y 21 h. Las muestras de 24 h corresponden a nauplios que se dejaron durante 3 h más en agua de mar sin enriquecedor. Los valores son medias y las barras de error representan desviaciones típicas ($n=3$). En cada punto de muestreo, los tratamientos que comparten una misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

calidad nutricional de las presas vivas utilizadas como alimento en la cría de larvas de peces marinos (Ozkizilcik y Chu, 1994; McEvoy y cols., 1996; Tonheim y cols., 2000). Los resultados obtenidos en este capítulo aportan nuevos datos sobre la eficacia de estas vesículas lipídicas como productos enriquecedores de presas vivas y amplían los estudios preliminares realizados por Hontoria y cols. (1997, 1998) sobre la vehiculación de vitaminas en presas vivas mediante liposomas. En concreto, el presente estudio constituye la primera ocasión en la que se realiza un enriquecimiento de presas vivas con vitamina A mediante el uso de liposomas. Algunos estudios previos sobre nutrición larvaria de peces planos han utilizado distintos compuestos con actividad de vitamina A (retinol, ésteres de retinol, etc.) incluidos en el seno de emulsiones lipídicas y administrados a nauplios de *Artemia* (Dedi y cols., 1995; Estévez y Kanazawa, 1995; Takeuchi y cols., 1998b; Haga y cols., 2004). A pesar de que las diferencias en los productos utilizados y en el diseño experimental de estos estudios dificultan la comparación, los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian la eficacia de los liposomas formulados

con palmitato de retinol para aumentar el contenido de retinol de los nauplios de *Artemia*. Además, la cantidad de retinol medida en los nauplios sigue una relación de proporcionalidad con la cantidad del éster palmitato utilizado como fuente de vitamina A en la formulación de los liposomas, indicando una conversión metabólica por parte del nauplio como ya describieron Takeuchi y cols. (1998b). De esta forma, la entrada del palmitato incluido en los liposomas viene acompañado de una hidrólisis enzimática que da lugar a la formación de retinol, compuesto que es absorbido por los enterocitos (Furr y McGrane, 2003). Esta acción metabólica del nauplio también se refleja en el descenso del nivel de retinol durante la fase de ayuno de 21 a 24 h. Un resultado llamativo viene determinado por los bajos contenidos de retinol hallados en los nauplios enriquecidos con la emulsión lipídica comercial en cuya composición se incluye el palmitato de retinol como fuente de vitamina A. Los bajos niveles de bioencapsulación de retinol en estos nauplios pueden obedecer al efecto que la temperatura, la iluminación y la oxigenación propias de los enriquecimientos de *Artemia* ejerce sobre productos altamente sensibles como el palmitato de retinol, dado que estas condiciones agresivas pueden provocar una degradación importante (Woollard y Indyk, 2003). En este sentido, Moren y cols. (2005) han descrito recientemente que la exposición simulada de un producto comercial (DC-DHA Selco, Inve, Gante, Bélgica) a las condiciones físico-químicas del enriquecimiento impide la detección de vitamina A después de 12 h de incubación. Aunque el palmitato de retinol presente en los liposomas pudo también sufrir el mismo proceso de degradación, el resultado pudo no ser tan evidente como en la emulsión debido al mayor contenido de palmitato presente en los liposomas.

Además de la vitamina A, este estudio representa la primera ocasión en la que se evalúa la capacidad de los liposomas para enriquecer nauplios de *Artemia* en vitamina C. Los resultados revelan una mayor incorporación de ascorbato en los nauplios incubados con liposomas y con la disolución en comparación a nauplios tratados con la emulsión comercial. La relevancia de este resultado tiene difícil valoración debido a que la cantidad de vitamina C disponible en los distintos tratamientos no es la misma. Mientras que los nauplios tratados con liposomas y con la disolución fueron incubados a la misma concentración de ascorbato, la cantidad de vitamina C presente en los nauplios tratados con la emulsión comercial depende del contenido del derivado liposoluble palmitato ascórbico del producto enriquecedor (no especificada por el fabricante), así como de la eficacia del sistema enzimático del nauplio para convertir este

derivado en ascorbato (Merchie y cols., 1995a). En cualquier caso, los contenidos de ascorbato medidos en nauplios incubados en las mismas condiciones experimentales, pero sin ningún enriquecedor, son muy similares a los de los nauplios enriquecidos. Esta mínima diferencia en el contenido de ascorbato de nauplios enriquecidos y no enriquecidos puede indicar una baja eficacia de los productos enriquecedores utilizados en este experimento, explicable, en parte, por la susceptibilidad del ascorbato a la degradación. La preservación de este nutriente por medio de compuestos antioxidantes como la vitamina E incluida en la bicapa fosfolipídica (Urano y cols., 1987; Fukuzawa y cols., 1993a, b) o la utilización de derivados menos lábiles (Schüep y cols., 1989; Shiau y Hsu, 1994; Smith y cols., 2004; Yoshitomi, 2004) podrían mejorar el rendimiento de los liposomas como vehículos de vitamina C en nauplios de *Artemia*. Otro factor que también pudo limitar la eficacia de los liposomas LUV empleados fue la turbulencia del medio durante la incubación. Este factor se discute a continuación en relación al enriquecimiento en metionina incluido también en este capítulo.

Los resultados del enriquecimiento de nauplios en metionina evidencian la utilidad de los liposomas para mejorar el contenido de aminoácidos libres en los nauplios de *Artemia*. Concretamente, los nauplios enriquecidos con liposomas MLV alcanzaron niveles de metionina libre más altos que los tratamientos con liposomas LUV. Las formulaciones LUV son consideradas como la tipología óptima para encapsular sustancias hidrosolubles en liposomas debido a su elevada proporción entre el volumen interno y la cantidad de lípidos de membrana (New, 1990, p. 28). Sin embargo, en condiciones de elevada turbulencia como las existentes en el medio de enriquecimiento, las formulaciones MLV pueden ser más útiles ya que, al poseer un gran número de bicapas (entre 5 y 20), ofrecen mayor resistencia a la liberación de sustancias disueltas en comparación a las LUV. De esta forma, mientras que la turbulencia del medio provocaría la liberación de la metionina disuelta en los espacios acuosos situados entre las bicapas más externas, la metionina disuelta entre las membranas más internas permanecería encapsulada y acabaría entrando en el nauplio tras la incorporación de la vesícula. Por su parte, los liposomas unilamelares tienen un único compartimento acuoso y, según el argumento anterior, liberarían más rápidamente las sustancias disueltas en su fase acuosa interna.

A la luz de estos resultados, los liposomas unilamelares no parecen ser la alternativa más favorable para encapsular metionina u otras sustancias hidrosolubles como el ascorbato, a pesar de haber mostrado buena capacidad para retener sustancias disueltas en los

experimentos recogidos en el Capítulo 3. Esta aparente desavenencia de resultados podría estar relacionada con diferencias en el régimen hidrodinámico existente en ambos experimentos (Apartados 3.2.1 y 5.2.3). En este sentido, mientras que los enriquecimientos del presente capítulo se realizaron en tubos de 1 l de capacidad y con un flujo de aire relativamente elevado (1,0 lpm, aproximadamente), el flujo de aire aplicado en las pruebas del Capítulo 3 fue reducido apreciablemente para intentar reproducir, en tubos de 200 ml, el mismo grado la turbulencia existente en los tubos de 1.l de capacidad. En este intento de igualar las condiciones de turbulencia, la agitación del medio pudo acabar siendo mayor en los enriquecimientos en ascorbato y metionina que en los experimentos con el marcador fluorescente (Capítulo 3) y, en consecuencia, las vesículas estuvieron sometidas a condiciones más desfavorables que acelerarían la liberación del compuesto disuelto al medio extravesicular.

La entrada de metionina a través de la ingestión de medio de enriquecimiento no debe, sin embargo, ser descartada, ya que los nauplios utilizan este mecanismo en procesos osmorregulatorios (Navarro y cols., 1993). Si se tiene en cuenta el contenido de los nauplios recién eclosionados ($88,4 \mu\text{g g PS}^{-1}$) como nivel basal de metionina libre, los niveles medidos en los nauplios incubados con la disolución acuosa de metionina (entre 300 y $400 \mu\text{g g PS}^{-1}$) indicarían, en efecto, una incorporación de este aminoácido a través de la ingestión de medio. Esta entrada directa ya fue demostrada por métodos radioactivos en un estudio sobre enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con metionina (Tonheim y cols., 2000). Además, estos autores, que también usaron liposomas como vehículo para la administración de metionina libre, obtuvieron unos niveles de este aminoácido superiores en nauplios tratados con liposomas en comparación a los niveles medidos en los nauplios incubados por el método directo (disolución). Esta tendencia también se observa en los resultados aquí presentados, aunque solamente se detectan diferencias significativamente superiores en nauplios enriquecidos con vesículas multilamelares. En el estudio de Tonheim y cols. (2000), los autores explicaron este mejor comportamiento de los liposomas aduciendo la incorporación de liposomas por los nauplios más allá de la simple ingestión de medio por la bebida. Esto demostraría la ventaja de administrar sustancias hidrosolubles a través de liposomas, aprovechando que las estructuras filtradoras del nauplio están adaptadas a la captación de partículas discretas que constituyen su alimento natural (halobacterias y microalgas). En cuanto a la evolución temporal, los análisis no revelan grandes cambios durante el periodo de 18 a 21 h de incubación, hecho que sería explicado a través

de procesos de asimilación de la metionina en la estructura de proteínas, o bien su transformación en otros aminoácidos (cisteína y taurina) o su oxidación hasta la producción de sulfatos, etc. La falta de aporte de este aminoácido durante el periodo de ayuno impediría mantener los niveles de metionina libre, produciéndose el ligero descenso observado. Esta actividad metabólica del nauplio sobre la metionina bioencapsulada ya fue demostrada con metionina marcada radioactivamente en el estudio citado anteriormente (Tonheim y cols., 2000) donde se determinó que la metionina absorbida (total marcada) correspondía al doble de metionina que permanecía libre.

En resumen, los liposomas representan un sistema eficaz en el enriquecimiento de nauplios de *Artemia* en retinol. Además, la incorporación de retinol en los nauplios se relaciona con la cantidad de palmitato de retinol incluido en la formulación del liposoma. Este hallazgo abre la posibilidad de utilizar estos liposomas para facilitar un aporte simultáneo de vitamina A y de EFAs procedentes del fosfolípido de krill que conforma la membrana. Esta posibilidad será valorada en un experimento de alimentación larvaria incluida en el Capítulo 6 (Apartado 6.2.2). En cuanto a la vehiculación de sustancias hidrosolubles, los resultados no pudieron demostrar la eficacia de los liposomas para incorporar vitamina C en nauplios de *Artemia* debido posiblemente a procesos degradativos del producto durante las incubaciones. La utilización de derivados más estables, así como la incorporación de compuestos antioxidantes en la membrana podría mejorar los resultados. Adicionalmente, la utilización de liposomas multilamelares también facilitaría la encapsulación de ascorbato en los nauplios de *Artemia*, tal y como se comprobó en los enriquecimientos en metionina. En este experimento, los nauplios enriquecidos con liposomas MLV registraron contenidos de metionina libre superiores a los de otros tipos de vesículas. Este resultado puede deberse al mayor grado de protección conferido por las múltiples bicapas existentes en las suspensiones MLV.

CAPÍTULO 6

EXPERIMENTOS DE ALIMENTACIÓN LARVARIA CON NAUPLIOS DE Artemia ENRIQUECIDOS

6.1. Introducción

La producción acuícola de peces está supeditada al éxito de la fase de cría larvaria que depende, a su vez, de la calidad de las dietas administradas. A pesar de los avances realizados durante los últimos años para eliminar o reducir el uso de presas vivas en larvicultura marina (Person Le Ruyet y cols., 1993; Salhi y cols., 1994, 1997; Fernández-Díaz y Yúfera, 1997; Zambonino Infante y cols., 1997; Takeuchi y cols., 1998b; Gisbert y cols., 2005) su utilización constituye todavía una práctica común e ineludible en el cultivo de la mayoría de especies de interés comercial. Como ha sido adelantado en el Capítulo 1, el empleo de presas vivas lleva implícitos problemas relacionados con deficiencias en ciertos nutrientes, entre los que destacan los ácidos grasos esenciales (EFAs), las vitaminas y los aminoácidos. Dada la importancia de estos nutrientes esenciales en la nutrición de larvas de peces (Capítulos 4 y 5), la rutina habitual seguida en las plantas de cría larvaria busca paliar las carencias nutricionales de las presas vivas mediante procedimientos de enriquecimiento. Este proceso de enriquecimiento implica la encapsulación de productos ricos en nutrientes esenciales en presas vivas usadas como dieta de larvas de peces (bioencapsulación).

Las propiedades bioquímicas y estructurales de los liposomas los convierten en un producto susceptible de ser utilizado para enriquecer presas vivas. De forma complementaria al estudio realizado en los Capítulos 3, 4 y 5, la eficacia de los liposomas como producto enriquecedor de nauplios de *Artemia* puede verificarse en ensayos prácticos de alimentación con larvas mantenidas en condiciones controladas. Así, este capítulo presenta los resultados obtenidos en tres experimentos realizados con larvas de lubina y dorada alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos con diferentes tipos de liposomas y una emulsión comercial usada como control. La elección de una u otra especie obedeció a criterios de disponibilidad en el momento de realización de los experimentos. Los experimentos Bioencapsulación 1 y 3 evalúan el rendimiento de liposomas formulados con fosfolípidos de krill (KPL) para la vehiculación de EFAs y lípidos polares (LPs), análogos a los empleados en los experimentos del Capítulo 4. Ambos experimentos ejemplifican la importancia del control de las condiciones fijadas durante el enriquecimiento para optimizar el comportamiento de los liposomas como productos enriquecedores. Concretamente, los nauplios de *Artemia* utilizados en Bioencapsulación 1 fueron enriquecidos en condiciones poco controladas y, por tanto, inadecuadas. Por su parte,

el experimento Bioencapsulación 3 se realizó con un control mayor de las condiciones de enriquecimiento. Por otra parte, el experimento Bioencapsulación 2 fue planteado para evaluar la eficacia de algunos enriquecedores basados en liposomas para la vehiculación simultánea de EFAs y vitamina A, vitamina C o metionina. En los tres experimentos, la calidad de las dietas usadas se valora en términos de incorporación de los nutrientes liposomados en el nauplio, así como en términos de supervivencia, crecimiento y presencia de los nutrientes esenciales en las larvas cultivadas. Además, debido a la labilidad de los ácidos grasos poliinsaturados frente a la oxidación, se determinó el contenido de peróxidos lipídicos presente en las larvas alimentadas con las distintas dietas experimentales.

6.2. Material y métodos

Los tres experimentos de alimentación larvaria se realizaron con ejemplares de lubina (Bioencapsulación 1 y 2) o dorada (Bioencapsulación 3) criados según el procedimiento descrito en el Apartado 2.3. Cuando las larvas se hallaban en un estadio de desarrollo en el que únicamente se alimentaban de nauplios de *Artemia* enriquecidos (Figura 1.3), eran estabuladas en número conocido en cada uno de los contenedores de PVC de la Figura 6.1. Como puede observarse, los contenedores se hallaban colgados del borde de tanques de 150 l llenos de agua de mar filtrada (1 μm), dejando un volumen de agua aproximado de 4 l que abarcaba desde la superficie del agua hasta la base del contenedor en la que se colocó una malla de plancton de luz de 160 μm . Esta malla conseguía, además del confinamiento de las larvas, el intercambio del agua que entraba a cada contenedor desde la parte superior mediante un aporte continuo con el agua circundante del tanque que entraba a través de la malla de plancton. El sistema permitía la renovación efectiva del contenido total de cada contenedor cada 10 min.

Tras su estabulación en el dispositivo experimental, las larvas se aclimataron durante algunos días durante los que los ejemplares muertos eran repuestos por larvas del tanque principal. El experimento de alimentación larvaria daba comienzo cuando la frecuencia en la mortalidad de larvas durante la aclimatación era mínimo (≤ 2 larvas d^{-1} contenedor $^{-1}$).

Las dietas, basadas en nauplios enriquecidos con varias formulaciones de liposomas o una emulsión comercial usada como control, eran administradas diariamente a las larvas según el procedimiento esquematizado en la Figura 6.2 para dos productos enriquecedores. A partir de una única eclosión de quistes, los nauplios



Figura 6.1. Dispositivo empleado en los experimentos de alimentación larvaria con nauplios de *Artemia* enriquecidos.

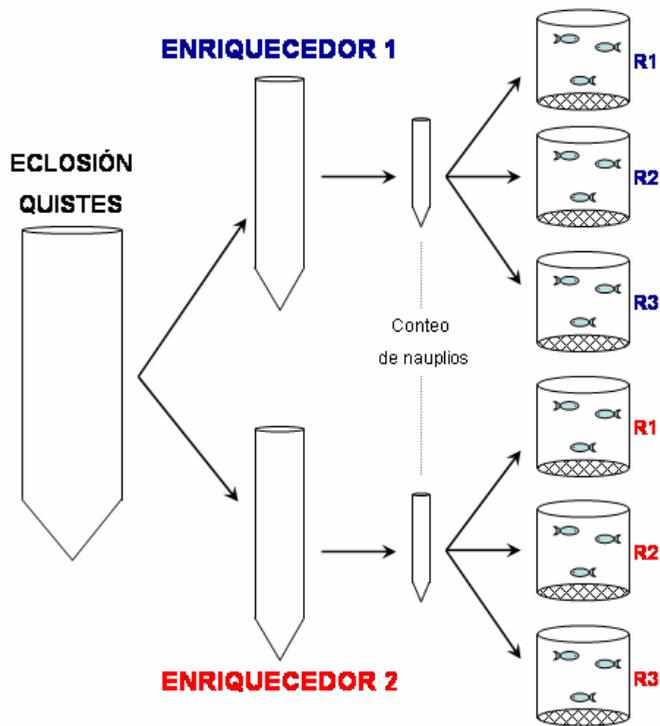


Figura 6.2. Esquema del procedimiento seguido en los experimentos de alimentación larvaria con nauplios de *Artemia* enriquecidos. Se muestra un ejemplo del método seguido para dos tratamientos enriquecedores.

recién eclosionados se trasvasaban a tubos cilindro-cónicos donde se realizaba una única incubación con cada uno de los productos enriquecedores evaluados. Al finalizar la incubación en el medio con enriquecedor, los nauplios se recogían a través de una malla de luz de 100 μm y se trasvasaban a tubos de 200 ml de capacidad donde se estimaba la densidad siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 2.2. Los nauplios enriquecidos con cada producto eran administrados a las larvas de los tres contenedores (tres réplicas) dispensando el volumen pertinente del tubo de 200 ml donde se había estimado la densidad. La ración diaria de nauplios enriquecidos varió en función de la edad de las larvas y el número de individuos supervivientes en cada momento y, además, se corregía diariamente en función de la cantidad sobrante de nauplios del día anterior, evaluada visualmente al comienzo de cada jornada.

A partir de este procedimiento, los detalles de cada una de los tres experimentos se explican a continuación.

6.2.1. Bioencapsulación 1: administración de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos a larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*)

Se establecieron cuatro tratamientos experimentales constituidos por larvas de lubina alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos con:

1. Emulsión comercial: emulsión lipídica Super Selco (Inve, Gante, Bélgica).
2. MLV (KPL): vesículas multilamelares preparadas con extracto de fosfolípidos de krill (KPL) como único componente de membrana.
3. LUVext (KPL): vesículas unilamelares preparadas mediante el método de extrusión con KPL como único componente de membrana.
4. LUVdet (KPL): vesículas unilamelares preparadas por el método de solubilización por detergente con KPL como único componente de membrana.

Las metodologías seguidas en la preparación de los tres tipos de liposomas se han descrito en el Apartado 2.1. La composición de clases de lípidos y ácidos grasos de la emulsión lipídica Super Selco y del extracto de krill usado en la formulación de los tres liposomas se detalla en la Tabla 2.1.

Siguiendo el procedimiento esquematizado en la Figura 6.2, los nauplios de *Artemia* recién eclosionados fueron incubados con

cada uno de los productos enriquecedores durante periodos que variaron entre 21 y 24 h. La concentración de enriquecedor fue de 0,50 g lípido l⁻¹ para todos los productos evaluados. El flujo de aire de los enriquecimientos de los nauplios se estimó en unos 1,2 lpm durante los dos primeros días, aunque se decidió aumentar este aporte de aire al doble en los enriquecimientos con liposomas tras la ocurrencia de algunos episodios con mortalidad masiva de nauplios. Las incubaciones se llevaron a cabo bajo las condiciones estándar de temperatura (28 ± 1°C), iluminación (1500-2000 lux) y densidad de nauplios (300 nauplios ml⁻¹) (Apartado 2.2). Al finalizar la incubación, los nauplios enriquecidos eran recogidos en una malla, donde se enjuagaban con agua corriente. El periodo de tiempo que los nauplios permanecían en agua sin alimento hasta que eran administrados a las larvas fue variable entre 1 y 2 h. Tras estimar la densidad naupliar de cada tratamiento, se administraba la ración diaria que, en este experimento, varió entre 250 y 350 nauplios larva⁻¹ en función de la cantidad de nauplios restantes del día anterior y el número de larvas supervivientes en cada momento. Una vez administrada la ración de nauplios a las larvas de los tres recipientes correspondientes a las tres réplicas de cada tratamiento (Figura 6.2), los nauplios sobrantes se congelaron a -20°C y se liofilizaron antes de su análisis.

En cada uno de los 12 recipientes del dispositivo descrito anteriormente (Figura 6.1), correspondientes a las tres réplicas de cada una de las cuatro dietas experimentales, se estabularon 70 larvas de lubina procedentes del tanque de cría larvaria principal. Durante un periodo de aclimatación de cuatro días, las larvas muertas fueron sustituidas por individuos del tanque principal. Al inicio del experimento, las larvas tenían 47 días *post*-eclosión (dpe), con una talla (media en mm ± desviación típica) de 12,5 ± 1,0 y un peso seco individual (media en mg ± desviación típica) de 1,1 ± 0,2. Tras 16 d de administración de las dietas, las larvas se mantuvieron un día más en ayunas para permitir la evacuación del contenido del tracto digestivo. Durante este periodo la temperatura del agua fue de 18,0 ± 2,0 °C. El control se llevó a cabo al decimoctavo día y consistió en un conteo de las larvas supervivientes para determinar la supervivencia final de cada tratamiento. Tras sacrificar los animales en un baño con hielo, se realizó la medición de la talla de 15 larvas de cada cubilete. Estas 15 larvas se colocaron en un microtubo de polipropileno de 1,5 ml de volumen con masa conocida después de ser escurridas, para ser pesadas, posteriormente. Cada lote de 15 larvas se liofilizó, proceso después del cual se volvieron a pesar los microtubos obteniéndose el

peso seco individual promedio. Las muestras de larvas liofilizadas se conservaron a -20°C hasta su análisis.

El análisis de clases de lípidos y de ácidos grasos se llevó a cabo a partir de los extractos lipídicos realizados sobre las muestras de nauplios y larvas (Apartado 2.4). Cabe señalar que las extracciones de lípidos de las larvas se realizaron sobre grupos de 5 individuos en cada réplica. Además, se determinó el contenido de peróxidos en las larvas mediante una modificación de la metodología descrita en el Apartado 3.2.2. Concretamente, se homogeneizaron grupos de 5-6 larvas en 2 ml de tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7,4) con un disruptor de tejidos (Ika Labortechnik, Staufen, Alemania). Tras la centrifugación durante 5 min a 10.000 g, se tomaron alícuotas de 160 µl de sobrenadante, que se sometieron al análisis con el resto de reactivos detallados en el Apartado 3.2.2, siguiendo el mismo procedimiento descrito.

Las variables biológicas determinadas en nauplios y en larvas tratados con los diferentes productos enriquecedores se compararon mediante el análisis estadístico realizado con las pruebas descritas en el Apartado 2.5.

6.2.2. Bioencapsulación 2: administración de nutrientes liposolubles (vitamina A) e hidrosolubles (ascorbato sódico y metionina) a larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*)

En este experimento, llevada a cabo con larvas de lubina procedentes de la misma puesta que las larvas del experimento Bioencapsulación 1, se evaluaron cinco productos enriquecedores:

1. Emulsión comercial: emulsión lipídica Super Selco (Inve, Gante, Bélgica).
2. LUVextVitA (KPL:vitA): vesículas unilamelares preparadas por extrusión y formuladas con KPL y palmitato de retinol (100:1, p/p).
3. LUVdetVitA (KPL:vitA): vesículas unilamelares preparadas por solubilización con detergente y formuladas con KPL y palmitato de retinol (100:2, p/p).
4. LUVdetMix Asc (KPL+SPC): mezcla (1:1, v/v) de liposomas LUVdet (100% KPL) y liposomas LUVdet (100% SPC) con ascorbato sódico disuelto a una concentración de 100 mg ml⁻¹.
5. LUVdetMix Met (KPL+SPC): mezcla (1:1, v/v) de liposomas LUVdet (100% KPL) y liposomas LUVdet

(100% SPC) con metionina disuelta a una concentración de 20 mg ml⁻¹.

La metodología de preparación de estas suspensiones de liposomas se detalla en el Apartado 2.1.

Los nauplios procedentes de una única eclosión diaria de quistes de *Artemia* EG (Inve, Gante, Bélgica) fueron incubados con los cinco productos enriquecedores evaluados. Los enriquecimientos de los nauplios con liposomas se llevaron a cabo con una aireación alta (unos 2,4 lpm) para evitar la mortandad masiva de nauplios registrada en los primeros días del experimento Bioencapsulación 1 (Apartado 6.2.1). Por su parte, los enriquecimientos con la emulsión control se realizaron a un flujo de aire de unos 1,2 lpm. Las concentraciones en el medio de enriquecimiento de palmitato de retinol fueron de 5 y 10 mg l⁻¹ para los tratamientos 2 y 3, respectivamente, mientras que las de ascorbato sódico (tratamiento 4) y metionina libre (tratamiento 5) fueron de 250 y 50 mg l⁻¹, respectivamente. Las condiciones de temperatura, iluminación y densidad naupliar establecidas en los enriquecimientos fueron las habituales (Apartado 2.2). Como en Bioencapsulación 1, la incubación de los nauplios con los diferentes productos enriquecedores se prolongó entre 21 y 24 h. Seguidamente, los nauplios se procesaron de forma idéntica a la explicada en el Apartado 6.2.1 hasta determinar la densidad naupliar de cada tratamiento y poder fijar, así, la ración de nauplios. En esta ocasión, la ración diaria varió entre 500 y 600 nauplios larva⁻¹. Tras la administración del alimento, los nauplios sobrantes se congelaron a -20°C y se liofilizaron como paso previo a su análisis.

Las larvas de lubina se estabularon en grupos de 50 individuos en cada uno de los 15 cubiletos de PVC (Figura 6.1) correspondientes a triplicados de las cinco dietas. Tras un periodo de aclimatación de tres días, se inició el experimento con larvas de edad 70 dpe, talla media \pm desviación típica de 11,6 \pm 0,9 mm y un peso seco promedio individual (media en mg de peso seco \pm desviación típica) de 1,5 \pm 0,2. Las dietas fueron administradas a las larvas durante 14 d, ayunando un día más. El decimosexto día se realizó el control del mismo modo que el descrito para el experimento Bioencapsulación 1. La temperatura del agua fue de 20,0 \pm 2,0 °C a lo largo del periodo de experimentación.

El análisis del contenido total de lípidos y ácidos grasos de las muestras de nauplios y larvas de los cinco grupos experimentales se llevó a cabo mediante las metodologías descritas en el Apartado 2.4.

Por otra parte, los análisis de retinol, ascorbato y metionina libre se realizaron en aquellas muestras de nauplios y larvas correspondientes a tratamientos con liposomas ricos en el nutriente estudiado y, además, en las muestras correspondientes a tratamientos de referencia, con presencia del nutriente evaluado o ausencia del mismo. De esta forma, la emulsión comercial sirvió como referencia en la determinación de vitamina A y vitamina C (contiene derivados de ambos compuestos), mientras que los tratamientos LUVdetMix Met y LUVextVitA sirvieron como controles negativos en los análisis de vitamina A y C, respectivamente. En el caso de la metionina, el tratamiento con la emulsión comercial funcionó como control negativo por carecer de metionina libre en su composición. Las metodologías seguidas para la realización de estos análisis son las descritas en el Apartado 2.4. La determinación de peróxidos se llevó a cabo en todos los tratamientos experimentales a partir de grupos de 5-6 larvas (ver procedimiento en el Apartado 6.2.1). Debe señalarse que los análisis de retinol no pudieron ser realizados sobre los nauplios correspondientes a este experimento de alimentación larvaria ya que no se dispuso de muestra suficiente después de realizar los otros análisis. En consecuencia, los datos presentados corresponden a los de nauplios del experimento del Apartado 5.2.1 para un tiempo de incubación de 21 h.

Las variables biológicas obtenidas con los diferentes productos enriquecedores evaluados se compararon mediante el análisis estadístico realizado con las pruebas descritas en el Apartado 2.5.

6.2.3. Bioencapsulación 3: administración de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos a larvas de dorada (*Sparus aurata*)

Las larvas de dorada utilizadas en este experimento fueron facilitadas por la empresa Piscicultura Marina, S.L. (Burriana, España). Como se ha mencionado anteriormente (Apartado 6.1), el estudio fue realizado con el objetivo de comprobar la mejora en la eficacia de los liposomas de krill, cuando son usados bajo condiciones de incubación más controladas e intentar, así, explicar los bajos rendimientos que estos liposomas mostraron en experimentos previos. Los productos enriquecedores empleados fueron:

1. Emulsión comercial: emulsión lipídica Super Selco (Inve, Gante, Bélgica).
2. MLV (KPL): vesículas multilamelares preparadas con KPL como único componente de membrana.

3. LUVdet (KPL): vesículas unilamelares preparadas por el método de solubilización con detergente con KPL como único componente de membrana.

La metodología seguida en la preparación de los liposomas fue la descrita en el Apartado 2.1. Cabe señalar que los tres productos enriquecedores evaluados en Bioencapsulación 3 coinciden con los utilizados en el experimento Bioencapsulación 1.

En esta ocasión, la incubación de los quistes de *Artemia* para su eclosión se realizó en un tiempo exacto de 23 h, con objeto de obviar posibles efectos derivados de la recolección de los nauplios en distintas fases de desarrollo de un día a otro. Tras este periodo, se procedió a la separación de los nauplios recién eclosionados y a su disposición en los tubos de enriquecimiento durante los 60 min posteriores. En ese momento, 24 h después del inicio de la incubación de los quistes, comenzaban los enriquecimientos propiamente dichos, que duraron 22 h exactas. La concentración de enriquecedor fue de 0,50 g lípido l⁻¹ como en el experimento Bioencapsulación 1. En esta ocasión, el flujo de aire aplicado en el proceso de enriquecimiento fue de 1,2 lpm para todos los productos evaluados sin que se observaran mortalidades importantes durante la realización del experimento. Las condiciones de temperatura, iluminación y densidad naupliar establecidas en los enriquecimientos fueron las habituales. El procesado de los nauplios antes de ser administrados a las larvas de dorada fue igual al descrito en el Apartado 6.2.1, con la única excepción del tiempo en el que los nauplios permanecían en agua de mar hasta ser administrados a las larvas que, en esta ocasión, fue de 1 h exacta. La ración diaria de nauplios varió entre 250 y 300 nauplios larva⁻¹. El alimento restante fue congelado a -20°C y posteriormente liofilizado para su análisis.

Cincuenta larvas de dorada se aclimataron durante tres días en cada uno de los cubiletes del dispositivo experimental de la Figura 6.1. Al inicio del experimento, las larvas tenían 37 dpe, con un tamaño (media en mm \pm desviación típica) de $9,8 \pm 1,5$ y un peso (media en mg de peso seco \pm desviación típica) de $1,0 \pm 0,1$. Después de 17 d de administración de las dietas, las larvas se mantuvieron un día más en ayunas para permitir la evacuación del contenido del digestivo. El control final, llevado a cabo el decimonoveno día fue igual que el detallado en el Apartado 6.2.1 para el experimento Bioencapsulación 1. La temperatura del agua durante el periodo experimental fue de $17,5 \pm 1,5$ °C.

El análisis de las clases lipídicas y de ácidos grasos de los nauplios y las larvas se realizó siguiendo las metodologías descritas en el Apartado 2.4. Al igual que en los experimentos Bioencapsulación 1 y 2, también se determinó el contenido de peróxidos presentes en las larvas de los tres tratamientos (ver procedimiento en el Apartado 6.2.1).

Los valores de las variables biológicas obtenidos con los diferentes productos enriquecedores se compararon a través del análisis estadístico realizado mediante las pruebas detalladas en el Apartado 2.5.

Tabla 6.1. Composición de clases de lípidos (porcentajes del total de lípidos) y contenido total de lípidos (porcentaje del peso seco) de los nauplios enriquecidos de Bioencapsulación 1. Los datos son medias (desviación típica) (n=3 para las clases de lípidos y n=5 para los lípidos totales). Los tratamientos que comparten el mismo superíndice en una misma fila no son diferentes ($P \leq 0,05$).

Clase de lípido	Emulsión	MLV	LUVext	LUVdet
	comercial	(KPL)	(KPL)	(KPL)
SE	3,4 (2,0) ^a	3,8 (1,1) ^a	3,9 (1,1) ^a	4,3 (2,3) ^a
FAEE	2,8 (0,4) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b	N.D. ^b
TAG	48,8 (1,1) ^a	34,8 (5,4) ^b	31,2 (2,8) ^b	30,9 (3,7) ^b
FFA	7,2 (0,9) ^a	8,7 (4,5) ^{ab}	10,7 (1,2) ^{ab}	13,5 (4,4) ^b
CHO/MAG/DAG	13,4 (2,4) ^a	17,8 (2,2) ^a	15,6 (5,8) ^a	15,5 (7,1) ^a
Pigmentos	3,7 (0,7) ^a	3,2 (0,8) ^a	3,3 (1,0) ^a	3,6 (0,9) ^a
PE/CL/PG/PA	8,7 (0,8) ^a	14,5 (1,5) ^b	16,0 (0,6) ^b	14,9 (0,8) ^b
PS/PI	3,1 (0,9) ^a	4,9 (0,7) ^b	5,6 (1,1) ^b	4,8 (1,8) ^{ab}
PC/SM	9,0 (1,0) ^a	12,3 (0,6) ^b	13,7 (1,5) ^b	12,6 (1,7) ^b
Total polares	20,8 (2,5) ^a	31,7 (2,3) ^b	35,2 (2,7) ^b	32,2 (4,8) ^b
% Lípido (PS)	26,7 (1,1) ^a	21,8 (2,2) ^b	19,8 (1,7) ^b	20,7 (2,0) ^b

MLV: liposomas multilamelares; LUVext: liposomas unilamelares preparados por extrusión; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente. N.D.: no detectado (<0,05%); PC/SM: fracción conjunta de fosfatidilcolina y esfingomiélna; PS/PI: fracción conjunta de fosfatidilserina y fosfatidilinositol; PE/CL/PG/PA: fracción conjunta de fosfatidiletanolamina, cardiolipina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico; MAG/DAG: fracción conjunta de monoglicéridos y diglicéridos; FFA: ácidos grasos libres; TAG: triglicéridos; FAEE: ésteres etílicos de ácido graso; SE: ésteres de estero.

6.3. Resultados

6.3.1. Bioencapsulación 1: administración de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos a larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*)

Los análisis de las clases lipídicas y el contenido total de lípidos de los nauplios usados como dieta para las larvas de lubina de Bioencapsulación 1 se recogen en la Tabla 6.1. Los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial registran porcentajes de lípidos superiores a los de los nauplios tratados con liposomas. En cuanto a las clases lipídicas, los análisis revelan que los nauplios enriquecidos con los tres tipos de liposomas presentan un porcentaje de LPs superior a los nauplios enriquecidos con la emulsión lipídica. Esta diferencia se refleja también en las tres

Tabla 6.2. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de nauplios enriquecidos durante el experimento Bioencapsulación 1. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=5). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Ácido graso	Emulsión comercial	MLV (KPL)	LUVext (KPL)	LUVdet (KPL)
16:0	9,6 (0,5) ^a	11,3 (1,2) ^b	12,2 (0,5) ^b	12,2 (0,2) ^b
18:0	4,4 (0,2) ^a	4,8 (0,2) ^b	5,1 (0,2) ^b	5,0 (0,1) ^b
18:1n-9	27,2 (1,3) ^a	28,5 (1,7) ^{ab}	30,5 (0,3) ^b	30,6 (0,7) ^b
18:2n-6	4,0 (0,1) ^a	4,1 (0,2) ^a	4,2 (0,2) ^a	4,1 (0,1) ^a
18:3n-3	14,5 (0,6) ^a	16,1 (1,8) ^{ab}	17,7 (0,4) ^{bc}	17,8 (0,2) ^c
20:4n-6	1,2 (0,1) ^a	1,3 (0,1) ^a	1,2 (0,0) ^a	1,3 (0,3) ^a
20:5n-3	10,5 (1,6) ^a	7,9 (2,9) ^a	5,0 (0,3) ^b	4,7 (0,4) ^b
22:5n-3	0,9 (0,2) ^a	0,3 (0,5) ^b	0,0 (0,0) ^b	0,0 (0,0) ^b
22:6n-3	4,9 (1,0) ^a	2,8 (2,3) ^a	0,4 (0,3) ^b	0,4 (0,3) ^b
Total identificados	96,7 (0,5) ^a	96,7 (0,7) ^a	96,7 (0,8) ^a	96,5 (0,3) ^a
Saturados	15,9 (0,9) ^a	18,2 (1,6) ^b	19,4 (0,5) ^b	19,3 (0,2) ^b
Monoinsaturados	41,1 (1,8) ^a	42,7 (1,7) ^a	45,2 (0,6) ^b	45,2 (0,7) ^b
Poliinsaturados	39,8 (2,7) ^a	35,8 (3,4) ^{ab}	32,1 (0,6) ^b	32,0 (0,4) ^b
Total n-3	33,2 (2,6) ^a	29,6 (3,6) ^{ab}	25,6 (0,6) ^{bc}	25,3 (0,5) ^c
Total n-6	6,2 (0,2) ^a	5,7 (0,6) ^a	5,9 (0,5) ^a	6,3 (0,3) ^a
HUFA n-3	17,0 (2,7) ^a	11,5 (5,6) ^{ab}	5,8 (0,4) ^b	5,5 (0,6) ^b
HUFA n-6	1,8 (0,2) ^a	1,4 (0,2) ^a	1,4 (0,2) ^a	1,7 (0,1) ^a
DHA/EPA	0,5 (0,0) ^a	0,3 (0,0) ^a	0,1 (0,0) ^b	0,1 (0,0) ^b

MLV: liposomas multilamelares; LUVext: liposomas unilamelares preparados por extrusión; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente. HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos; DHA/EPA: relación de porcentajes de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico.

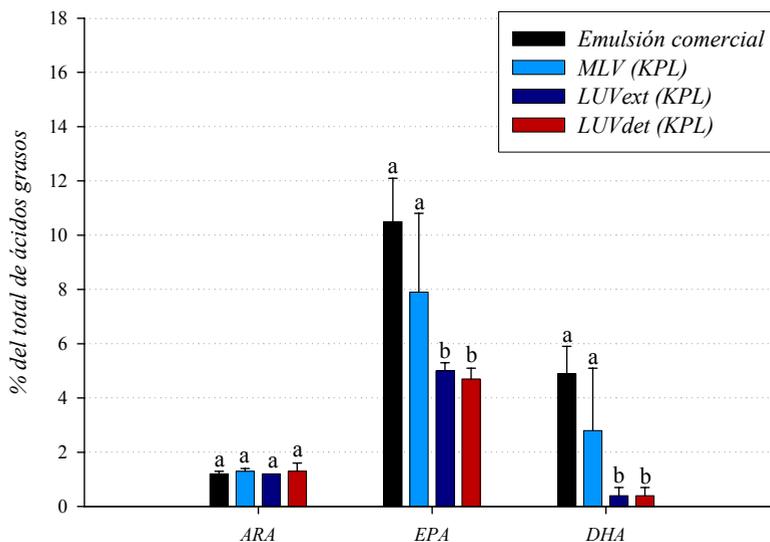


Figura 6.3. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (porcentaje del total de ácidos grasos) de nauplios enriquecidos recolectados durante el experimento Bioencapsulación 1. Las barras de error representan desviaciones típicas (n=5). Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

fracciones consideradas (PE/CL/PG/PA, PS/PI y PC/SM). Por el contrario, los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial presentan un mayor porcentaje de TAGs, además de contener cierta cantidad de FAEEs procedentes del enriquecedor.

La diferencia de clases lipídicas existente entre los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial y los enriquecidos con los liposomas también queda patente en la composición de ácidos grasos (Tabla 6.2 y Figura 6.3). Así, los nauplios tratados con liposomas contenían porcentajes de ácidos grasos saturados superiores al de los nauplios control que presentaron una composición rica en ácidos grasos poliinsaturados. También son destacables las diferencias de rendimiento entre los tres tipos de liposomas evaluados con respecto al enriquecimiento en HUFAs. Concretamente, los nauplios enriquecidos con liposomas MLVs igualan estadísticamente los niveles de HUFAs n-3 obtenidos en los nauplios enriquecidos con la

Tabla 6.3. Supervivencia, talla y peso de las larvas de lubina correspondientes a los diferentes grupos experimentales del experimento Bioencapsulación 1. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). No existen diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$).

	Emulsión comercial	MLV (KPL)	LUVext (KPL)	LUVdet (KPL)
Supervivencia (%)	68,9 (20,3)	73,2 (14,0)	78,6 (11,7)	76,9 (11,7)
Talla final (mm)	18,8 (0,2)	18,8 (0,5)	18,3 (0,3)	18,2 (0,5)
Peso seco (mg)	5,5 (0,2)	5,7 (0,5)	5,4 (0,4)	5,2 (0,8)

MLV: liposomas multilamelares; LUVext: liposomas unilamelares preparados por extrusión; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente.

Tabla 6.4. Composición de clases de lípidos (porcentajes del total de lípidos) y contenido total de lípidos (porcentaje del peso seco) de las larvas de Bioencapsulación 1. Los datos son medias (desviación típica) de tres réplicas. Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Clase de lípido	Emulsión comercial	MLV (KPL)	LUVext (KPL)	LUVdet (KPL)
SE	9,2 (2,2) ^a	11,2 (0,9) ^a	13,1 (1,9) ^a	13,5 (1,6) ^a
FAEE	N.D. ^a	N.D. ^a	N.D. ^a	N.D. ^a
TAG	26,1 (4,2) ^a	16,0 (0,2) ^b	17,1 (0,7) ^b	16,4 (2,4) ^b
FFA	3,4 (0,3) ^a	3,5 (0,9) ^a	3,2 (0,1) ^a	3,8 (0,9) ^a
CHO/MAG/DAG	20,0 (0,8) ^a	22,7 (0,3) ^b	21,8 (0,8) ^b	21,7 (0,2) ^b
Pigmentos	2,1 (0,4) ^a	2,5 (0,3) ^{ab}	2,8 (0,2) ^{ab}	3,0 (0,3) ^b
PE/CL/PG/PA	13,5 (0,4) ^a	17,0 (0,6) ^b	15,2 (0,1) ^b	14,9 (0,8) ^{ab}
PS/PI	4,4 (0,5) ^a	5,4 (0,2) ^a	5,1 (0,1) ^a	5,1 (0,1) ^a
PC/SM	21,3 (0,4) ^a	21,7 (0,7) ^a	21,6 (1,0) ^a	21,6 (0,8) ^a
Total polares	39,3 (1,2) ^a	44,1 (1,5) ^b	41,9 (1,1) ^{ab}	41,6 (0,7) ^{ab}
% Lípido (PS)	19,0 (0,5) ^a	14,9 (0,8) ^c	16,0 (0,7) ^{bc}	17,3 (0,4) ^b

MLV: liposomas multilamelares; LUVext: liposomas unilamelares preparados por extrusión; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente; N.D., no detectado ($<0,05\%$); PC/SM, fracción conjunta de fosfatidilcolina y esfingomiolina; PS/PI, fracción conjunta de fosfatidilserina y fosfatidilinositol; PE/CL/PG/PA, fracción conjunta de fosfatidiletanolamina, cardiolipina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico; MAG/DAG, fracción conjunta de monoglicéridos y diglicéridos; FFA, ácidos grasos libres; TAG, triglicéridos; FAEE, ésteres etílicos de ácido graso; SE, ésteres de esteroles.

Tabla 6.5. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 1. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten el mismo superíndice en una misma fila no son diferentes ($P \leq 0,05$).

Ácido graso	Emulsión comercial	MLV (KPL)	LUVext (KPL)	LUVdet (KPL)
16:0	12,3 (0,3) ^a	14,1 (0,1) ^b	14,2 (0,3) ^b	14,4 (0,3) ^b
18:0	6,9 (0,2) ^a	8,2 (0,1) ^b	8,1 (0,2) ^b	8,4 (0,3) ^b
18:1n-9	22,8 (0,4) ^a	23,5 (0,7) ^a	23,3 (0,3) ^a	23,3 (0,4) ^a
18:2n-6	3,3 (0,1) ^a	3,5 (0,0) ^a	3,4 (0,1) ^a	3,4 (0,0) ^a
18:3n-3	9,8 (0,6) ^a	10,3 (0,1) ^b	10,2 (0,2) ^{ab}	10,1 (0,3) ^{ab}
20:4n-6	2,5 (0,1) ^a	3,3 (0,1) ^b	3,1 (0,1) ^b	3,2 (0,2) ^b
20:5n-3	11,8 (0,2) ^a	10,8 (0,6) ^b	10,9 (0,2) ^{ab}	11,1 (0,4) ^{ab}
22:5n-3	1,5 (0,1) ^a	0,6 (0,0) ^b	0,6 (0,0) ^b	0,6 (0,1) ^b
22:6n-3	7,5 (0,5) ^a	2,6 (0,3) ^b	3,0 (0,4) ^b	2,8 (0,2) ^b
Total	97,4 (0,2) ^a	96,5 (0,6) ^a	96,1 (0,7) ^a	96,4 (0,6) ^a
Saturados	21,0 (0,5) ^a	24,3 (0,1) ^b	24,4 (0,5) ^b	24,8 (0,6) ^b
Monoinsaturados	36,5 (0,6) ^a	37,3 (0,9) ^a	37,0 (0,6) ^a	37,0 (0,8) ^a
Poliinsaturados	39,9 (0,2) ^a	34,8 (1,0) ^b	34,7 (0,2) ^b	34,6 (0,6) ^b
Total n-3	32,1 (0,1) ^a	25,9 (1,0) ^b	26,1 (0,3) ^b	26,0 (0,3) ^b
Total n-6	7,4 (0,1) ^a	8,3 (0,1) ^b	7,9 (0,2) ^b	8,0 (0,3) ^b
HUFA n-3	21,2 (0,7) ^a	14,4 (0,9) ^b	14,8 (0,4) ^b	14,8 (0,7) ^b
HUFA n-6	3,3 (0,2) ^a	4,0 (0,1) ^b	3,8 (0,1) ^b	3,8 (0,3) ^b
DHA/EPA	0,6 (0,0) ^a	0,2 (0,0) ^b	0,3 (0,0) ^b	0,3 (0,0) ^b

MLV: liposomas multilamelares; LUVext: liposomas unilamelares preparados por extrusión; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente. HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos; DHA/EPA: relación de porcentajes de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico.

emulsión lipídica. Dentro de esta categoría de HUFAs n-3, los contenidos en ácidos grasos esenciales EPA y DHA de los nauplios tratados con MLVs tampoco muestran porcentajes diferentes a los de los nauplios control. Por el contrario, los niveles de estos ácidos grasos en los nauplios enriquecidos con liposomas LUVext o LUVdet son inferiores al control (Figura 6.3). Otra característica de los nauplios enriquecidos con liposomas de krill viene dada por el contenido total de ácidos grasos saturados, debido al alto contenido de ácido palmítico (16:0) del extracto de fosfolípido de krill (Tabla 2.1). En cualquier caso, merece ser destacada la elevada variabilidad observada en los análisis de ácidos grasos correspondientes a los nauplios enriquecidos con MLVs.

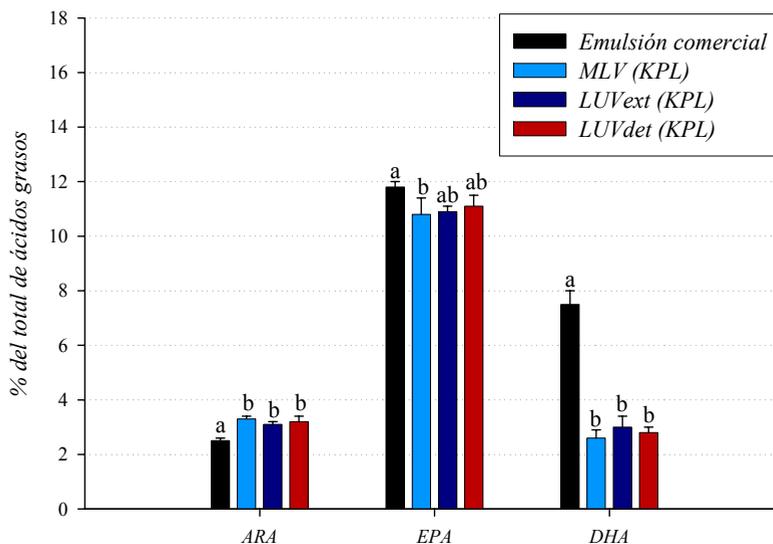


Figura 6.4. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (porcentaje del total de ácidos grasos) de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 1. Las barras de error representan desviaciones típicas ($n=3$). Los tratamientos que comparten una misma letra no muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

La supervivencia y el crecimiento de las larvas alimentadas con las diferentes dietas experimentales no registraron diferencias significativas al final del experimento (Tabla 6.3). Sin embargo, las clases lipídicas y los contenidos de lípidos totales de las larvas muestran diferencias apreciables entre las larvas alimentadas con la dieta control y las tratadas con los nauplios enriquecidos con las tres preparaciones de liposomas (Tabla 6.4). Concretamente, las larvas control presentan un mayor contenido de lípidos totales que las larvas de los tratamientos con liposomas. Además, estas últimas presentan mayores porcentajes de LPs que las larvas control. En este caso, la fracción combinada de PE/CL/PD/PA es la que más contribuye a esta diferencia. Las larvas alimentadas con nauplios enriquecidos con la emulsión comercial presentan un mayor porcentaje de TAGs, tal como ocurre en las dietas (nauplios).

Las diferencias entre los tratamientos con liposomas y el de la emulsión lipídica también quedan reflejadas en el perfil de ácidos grasos de las larvas (Tabla 6.5 y Figura 6.4). Así, las larvas alimentadas con nauplios enriquecidos con la emulsión lipídica

contenían mayores porcentajes de HUFA n-3 y HUFA n-6, grupos en los que se incluyen los ácidos grasos esenciales EPA, DHA y ARA

Por otra parte, el análisis de peróxidos realizado en las larvas de lubina muestra un contenido significativamente superior de estos compuestos en las larvas correspondientes al tratamiento con la emulsión lipídica que en las larvas alimentadas con nauplios tratados con liposomas (Figura 6.5).

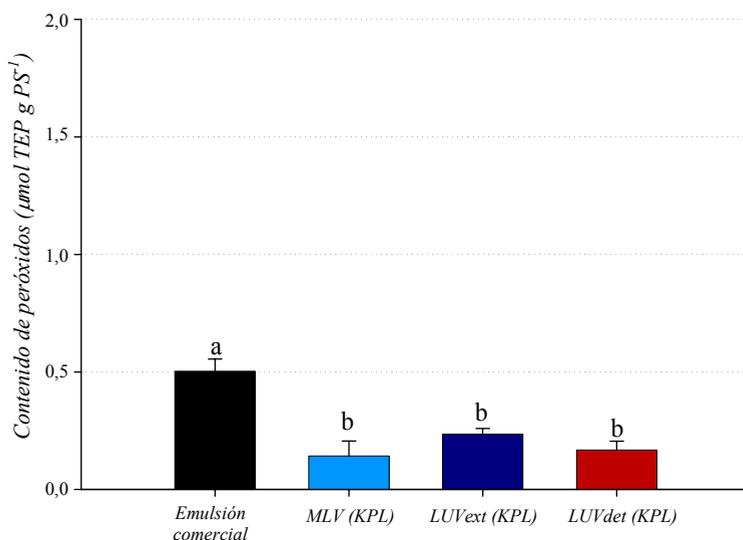


Figura 6.5. Contenido de peróxidos expresado como la concentración de tetraetoxipropano (TEP) en µmol equivalentes por gramo de peso seco en larvas de lubina alimentadas con las diferentes dietas estudiadas en Bioencapsulación 1. Los valores son medias de tres réplicas. Las barras de error representan desviaciones típicas. Los tratamientos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

6.3.2. Bioencapsulación 2: administración de nutrientes liposolubles (vitamina A) e hidrosolubles (ascorbato sódico y metionina) a larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*)

El contenido de retinol, ascorbato y metionina libre de los nauplios usados como dietas en este experimento de alimentación larvaria se presentan en la Tabla 6.6. Los análisis de retinol indican una incorporación significativamente superior de este compuesto en nauplios enriquecidos con liposomas formulados con palmitato de

Tabla 6.6. Contenido de retinol, ascorbato y metionina libre de los nauplios usados como dieta en larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 2. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son diferentes ($P \leq 0,05$).

<i>Nutriente</i>	Emulsión comercial	LUVdet VitA (KPL:VitA)	LUVextVitA (KPL:VitA)	LUVdetMix Asc	LUVdet Mix Met
Retinol ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$)	N.D. ^a	77,9(15,3) ^c	33,7(2,5) ^b	N.A.	N.D. ^a
Ascorbato ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$)	9,1(1,3) ^a	12,6(2,3) ^a	N.A.	14,0(1,9) ^a	N.A.
Metionina ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$)	0,31(0,07) ^a	N.A.	N.A.	N.A.	0,45(0,09) ^a

LUVdetVitA: liposomas unilamelares con palmitato de retinol y preparados por solubilización por detergente; LUVext: liposomas unilamelares con palmitato de retinol y preparados por extrusión; LUVdetMixAsc: mezcla de liposomas LUVdet formulados con KPL y SPC con ascorbato; LUVdetMixMet: mezcla de liposomas LUVdet formulados con KPL y SPC con metionina.

N.D.: no detectado ($<0,05$); N.A.: no analizado.

retinol (LUVdetVitA y LUVextVitA) con respecto a los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial y con liposomas LUVdetMix Asc, ambos tratamientos con niveles traza de retinol. Es necesario destacar que mientras que el tratamiento LUVdetMix Asc no contenía palmitato de retinol, este compuesto, con actividad de vitamina A, sí forma parte de la composición del enriquecedor comercial Super Selco ($1,9 \mu\text{g mg}^{-1}$ producto). Los contenidos de ascorbato, por otra parte, no registran diferencias significativas entre los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial, los liposomas sin ascorbato (LUVextVitA) (control negativo) y los liposomas con ascorbato (LUVdetMix Asc). En cuanto a la metionina libre, los dos tratamientos evaluados (Emulsión comercial y LUVdetMix Met) tampoco muestran diferencias significativas en el contenido de metionina.

Aunque el objetivo principal de Bioencapsulación 2 se centra en la vehiculación de vitamina A, vitamina C y metionina, los fosfolípidos que conforman los liposomas posibilitan la administración simultánea de los anteriores compuestos con EFAs. De esta forma, el perfil lipídico de los nauplios usados como dieta en este experimento de alimentación larvaria (Tabla 6.7) indican una baja

Tabla 6.7. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de nauplios enriquecidos durante el experimento Bioencapsulación 2. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son diferentes ($P \leq 0,05$).

Ácido graso	Emulsión comercial	LUVdetVitA (KPL.vitA)	LUVextVitA (KPL.vitA)	LUVdetMix		LUVdetMix Met
				Asc	Met	
16:0	9,0(0,2) ^a	10,2(1,4) ^b	12,1(0,3) ^b	12,2(0,2) ^b	11,7(0,3) ^b	
18:0	4,1(0,1) ^a	4,6(0,4) ^a	5,0(0,3) ^a	4,9(0,2) ^a	4,8(0,3) ^a	
18:1n-9	26,1(0,3) ^a	27,7(1,9) ^a	28,9(2,0) ^a	28,2(1,2) ^a	28,2(2,0) ^a	
18:2n-6	4,1(0,2) ^a	4,1(0,2) ^a	3,9(0,3) ^a	6,8(2,7) ^a	8,8(4,9) ^a	
18:3n-3	14,4(0,3) ^a	15,6(1,8) ^a	17,0(0,9) ^a	16,5(0,3) ^a	16,1(1,4) ^a	
20:4n-6	1,2(0,0) ^a	1,3(0,1) ^a	1,2(0,1) ^a	1,1(0,1) ^a	1,1(0,2) ^a	
20:5n-3	11,1(0,4) ^a	9,3(3,3) ^{ab}	6,8(1,7) ^{ab}	6,2(2,4) ^{ab}	5,6(1,4) ^b	
22:5n-3	1,2(0,0) ^a	0,8(0,7) ^a	0,1(0,1) ^a	0,1(0,1) ^a	0,1(0,0) ^a	
22:6n-3	6,3(0,3) ^a	4,4(3,2) ^{ab}	1,5(1,2) ^{ab}	1,4(1,4) ^{ab}	0,9(0,7) ^b	
Total identificados	95,7(0,2) ^a	96,3(1,1) ^a	95,7(0,3) ^a	95,8(0,4) ^a	95,6(0,4) ^a	
Saturados	14,9(0,2) ^a	16,6(2,1) ^{ab}	19,3(0,2) ^b	19,3(0,3) ^b	18,7(1,0) ^{ab}	
Monoinsaturados	39,5(0,5) ^a	41,6(2,3) ^a	43,1(2,5) ^a	41,5(1,1) ^a	41,4(3,4) ^a	
Polinsaturados	41,3(0,9) ^a	38,1(5,3) ^{ab}	33,4(2,2) ^{ab}	35,0(1,1) ^b	35,5(4,5) ^{ab}	
Total n-3	35,4(0,7) ^a	32,9(5,6) ^{ab}	28,2(2,7) ^{ab}	27,6(3,7) ^{ab}	25,5(1,0) ^b	
Total n-6	6,1(0,2) ^a	5,3(0,4) ^a	5,4(1,1) ^a	7,6(2,6) ^a	10,2(4,4) ^a	
HUFA n-3	19,3(0,5) ^a	15,6(7,6) ^{ab}	9,1(3,7) ^{ab}	9,1(4,0) ^{ab}	7,2(2,4) ^b	
HUFA n-6	1,7(0,0) ^a	1,4(0,1) ^a	1,4(0,2) ^a	1,4(0,1) ^a	1,4(0,2) ^a	
DHA/EPA	0,6(0,0) ^a	0,4(0,3) ^{ab}	0,2(0,1) ^{ab}	0,2(0,1) ^{ab}	0,1(0,1) ^b	
% Lípido (PS)	26,7(0,8) ^a	19,0(0,2) ^b	19,7(1,4) ^b	20,9(0,1) ^b	20,5(2,1) ^b	

HUFA n-3: ácidos grasos de la serie n-3, con cadenas de 20 o más átomos de C y con dos o más insaturaciones.

HUFA n-6: ácidos grasos de la serie n-6, con cadenas de 20 o más átomos de C y con dos o más insaturaciones.

EPA: ác. eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ác. docosahexaenoico (22:6n-3).

Tabla 6.8. Supervivencia, talla y peso de las larvas de lubina correspondientes a los diferentes grupos experimentales (Bioencapsulación 2). Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). No existen diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$).

<i>Nutriente</i>	<i>Nutriente</i>				
	Emulsión comercial	LUVdetVitA (KPL: vitA)	LUVextVitA (KPL: vitA)	LUVdetMix Asc	LUVdet Mix Met
Supervivencia (%)	97,3(1,1)	95,7(3,2)	96,7(4,2)	92,5(4,2)	94,4(1,2)
Talla (mm)	19,0(0,6)	19,2(0,3)	18,8(1,2)	18,5(0,5)	18,8(0,7)
Peso seco (mg)	7,3(1,2)	7,5(0,9)	6,8(1,7)	6,8(0,6)	6,8(1,2)

LUVdetVitA: liposomas unilamelares con palmitato de retinol y preparados por solubilización por detergente; LUVext: liposomas unilamelares con palmitato de retinol y preparados por extrusión; LUVdetMixAsc: mezcla de liposomas LUVdet formulados con KPL y SPC con ascorbato; LUVdetMixAsc: mezcla de liposomas LUVdet formulados con KPL y SPC con metionina.

Tabla 6.9. Contenidos de retinol, ascorbato y metionina libre de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 2. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). No existen diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$).

<i>Nutriente</i>	<i>Nutriente</i>				
	Emulsión comercial	LUVdetVitA (KPL: vitA)	LUVextVitA (KPL: vitA)	LUVdetMix Asc	LUVdetMix Met
Retinol ($\mu\text{g g PS}^{-1}$)	2,3(1,0)	2,0(0,3)	1,4(0,3)	N.A.	1,6 (0,1)
Ascorbato ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$)	1,7(0,1)	1,8(0,2)	N.A.	1,9(0,1)	N.A.
Metionina ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$)	0,20(0,1)	N.A.	N.A.	N.A.	0,17(0,08)

LUVdetVitA: liposomas unilamelares con palmitato de retinol y preparados por solubilización por detergente; LUVext: liposomas unilamelares con palmitato de retinol y preparados por extrusión; LUVdetMixAsc: mezcla de liposomas LUVdet formulados con KPL y SPC con ascorbato; LUVdetMixAsc: mezcla de liposomas LUVdet formulados con KPL y SPC con metionina.

N.A.: no analizado

Tabla 6.10. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de las larvas de lubina del experimento Bioencapsulación 3. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son diferentes ($P \leq 0,05$).

Ácido graso	Emulsión comercial	LUVdetVitA	LUVextVitA	LUVdetMix	LUVdetMix
		(KPL.vitA)	(KPL.vitA)	Asc	Met
16:0	13,0(0,4) ^a	15,0(0,2) ^b	15,0(0,4) ^b	14,9(0,5) ^b	14,2(0,5) ^b
18:0	7,2(0,2) ^a	8,8(0,1) ^b	8,7(0,3) ^b	8,9(0,4) ^b	8,4(0,2) ^b
18:1n-9	21,7(0,4)	23,1(0,3)	22,4(0,7)	23,2(0,3)	22,9(1,5)
18:2n-6	2,9(0,1) ^a	3,2(0,1) ^b	4,4(0,2) ^c	7,0(0,7) ^{cd}	7,3(0,5) ^d
18:3n-3	8,2(0,1)	8,9(0,3)	8,5(0,6)	8,7(0,5)	8,8(1,0)
20:4n-6	2,8(0,1)	3,5(0,2)	3,3(0,2)	3,3(0,3)	3,1(0,4)
20:5n-3	12,4(0,3) ^a	10,8(0,5) ^{ab}	10,8(0,3) ^b	9,1(0,3) ^c	9,7(1,1) ^{bc}
22:5n-3	1,8(0,1) ^a	0,9(0,1) ^b	0,9(0,2) ^b	0,7(0,1) ^b	0,7(0,1) ^b
22:6n-3	10,3(0,7) ^a	4,4(0,3) ^{bc}	5,2(0,7) ^b	3,3(0,1) ^c	4,1(0,5) ^{bc}
Total identificados	97,1(0,2)	96,7(0,6)	96,5(0,3)	96,2(0,3)	96,4(0,4)
Saturados	22,0(0,5) ^a	26,1(0,2) ^b	25,7(0,8) ^b	26,0(1,0) ^b	24,7(0,9) ^b
Monoinsaturados	33,4(0,5) ^a	35,6(0,2) ^b	34,5(0,9) ^{ab}	35,0(0,3) ^{ab}	34,7(1,9) ^{ba}
Polinsaturados	41,8(0,9) ^d	35,1(0,6) ^b	36,3(0,8) ^b	35,3(1,0) ^b	37,1(0,7) ^b
Total n-3	36,9(0,7) ^a	29,8(0,7) ^b	29,8(1,1) ^b	25,9(0,3) ^c	27,6(1,1) ^{bc}
Total n-6	4,5(0,2) ^a	4,8(0,0) ^a	6,1(0,2) ^b	9,3(0,7) ^c	9,5(0,5) ^c
HUFA n-3	27,6(0,7) ^a	20,0(1,0) ^b	20,4(1,2) ^b	16,4(0,3) ^{bc}	17,9(2,1) ^c
HUFA n-6	1,0(0,1) ^{ab}	0,9(0,0) ^a	0,9(0,1) ^{ab}	1,1(0,1) ^b	1,1(0,0) ^b
DHA/EPA	0,8(0,1) ^a	0,4(0,0) ^{bc}	0,5(0,1) ^b	0,4(0,0) ^c	0,4(0,0) ^{bc}
% Lípido (PS)	17,7(3) ^a	14,4(0,0) ^b	14,4(0,2) ^b	15,3(1,1) ^b	16,0(0,5) ^b

HUFA n-3: ácidos grasos de la serie n-3, con cadenas de 20 o más átomos de C y con dos o más insaturaciones.

HUFA n-6: ácidos grasos de la serie n-6, con cadenas de 20 o más átomos de C y con dos o más insaturaciones.

EPA: ác. eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ác. docosahexaenoico (22:6n-3).

eficacia de los enriquecedores con liposomas. Esto se manifiesta en términos del contenido total de lípidos donde los nauplios enriquecidos con liposomas muestran niveles significativamente inferiores al control, tal y como ocurría en Bioencapsulación 1. Los contenidos de algunos EFAs (p. ej., EPA y DHA) de los nauplios enriquecidos con liposomas no fueron inferiores a los del control, aunque esto parece estar motivado por la elevada variabilidad asociada (ver desviaciones típicas en Tabla 6.7). Los perfiles de EFAs de los tratamientos LUVdetMix Asc y LUVdetMix Met, ambos consistentes en una mezcla de liposomas de krill y liposomas de soja con ascorbato y metionina respectivamente, no son diferentes de los tratamientos con liposomas con mayor contenido en EFAs (LUVdetVitA y LUVextVitA).

Como ocurrió en Bioencapsulación 1, los datos de supervivencia y crecimiento no muestran diferencias entre los distintos grupos experimentales (Tabla 6.8). Además, la ausencia de diferencias entre los distintos tratamientos también se refleja en los contenidos en retinol, ascorbato y metionina libre de las larvas (Tabla 6.9). En cambio, el contenido total de lípidos y el perfil de ácidos grasos de las larvas (Tabla 6.10) muestra diferencias entre el tratamiento control y los tratamientos basados en liposomas. De esta forma, las larvas pertenecientes a los tratamientos con liposomas muestran niveles lipídicos inferiores a los de las larvas control. Esta diferencia también se refleja en los contenidos de EFAs de las larvas, los cuales fueron, en general, inferiores en las larvas alimentadas con dietas basadas en liposomas sin que, entre éstas, se observaran grandes diferencias.

Por último, los análisis de peróxidos lipídicos realizados en las larvas registraron un contenido menor de estos compuestos en las larvas alimentadas con nauplios enriquecidos con liposomas en comparación a las larvas control (Figura 6.6) como en Bioencapsulación 1.

6.3.3. Bioencapsulación 3: administración de ácidos grasos esenciales y fosfolípidos a larvas de dorada (Sparus aurata)

La Tabla 6.11 muestra el contenido total de lípidos y las clases lipídicas de los nauplios usados como dietas en el experimento Bioencapsulación 3. El porcentaje de lípidos totales de los nauplios no muestra diferencias entre los tratamientos. En cuanto a las clases de lípidos, el porcentaje total de lípidos polares de los nauplios enriquecidos con liposomas fue superior al de los nauplios enriquecidos con la emulsión, aunque sólo los nauplios pertenecientes

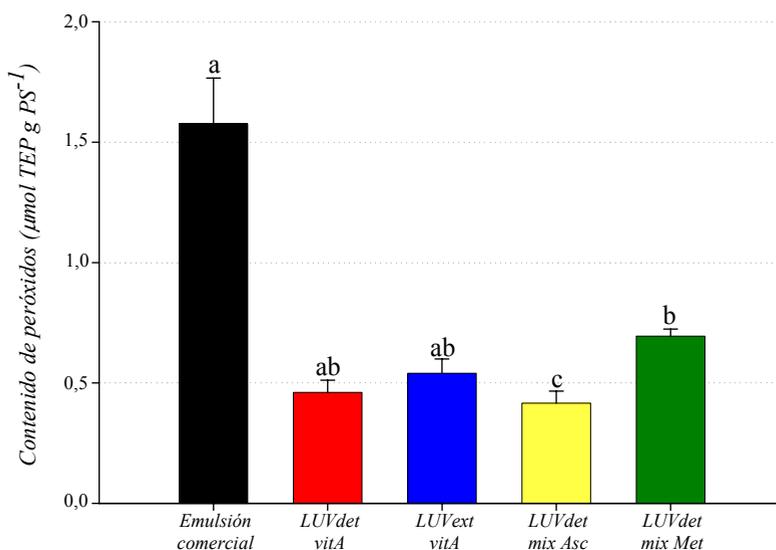


Figura 6.6. Contenido de peróxidos expresado como la concentración de tetraetoxipropano (TEP) en μmol equivalentes por gramo de peso seco en larvas de lubina alimentadas con las diferentes dietas de Bioencapsulación 2. Los valores son medias de tres réplicas. Las barras de error representan desviaciones típicas. Los tratamientos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

al tratamiento MLV presentaron diferencias significativas respecto a los nauplios control. La combinación de PE/CL/PG/PA es la fracción que más contribuyó a esta diferencia, con contenidos significativamente superiores en los dos tratamientos con liposomas.

La Tabla 6.12 y la Figura 6.7 representan los perfiles de ácidos grasos de los nauplios tratados con los tres productos enriquecedores. El contenido de EPA de los nauplios enriquecidos con liposomas varió según el tipo de vesícula. Así, mientras que los nauplios MLV mostraron niveles significativamente inferiores a los control, los nauplios enriquecidos con liposomas LUVdet no registraron tales diferencias. Por otra parte, el contenido de DHA no presenta diferencias significativas entre tratamientos. De esta forma, el contenido total de HUFA n-3 es ligeramente inferior en nauplios enriquecidos con liposomas, pudiéndose establecer diferencias estadísticas entre los nauplios control y los nauplios MLV. Por otra parte, los niveles de ácido araquidónico (ARA) de los nauplios

Tabla 6.11. Composición de clases de lípidos (porcentajes del total de lípidos) y contenido total de lípidos (porcentaje del peso seco) de los nauplios enriquecidos durante el experimento Bioencapsulación 3. Los datos son medias (desviación típica) (n=3 para las clases de lípidos y n=8 para los lípidos totales). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en la misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

<i>Clase de lípido</i>	Emulsión	MLV (KPL)	LUVdet (KPL)
	comercial		
SE	3,2(0,3) ^a	2,1(0,4) ^b	2,2(0,3) ^b
FAEE	6,1(1,3) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b
Desconocido1	N.D. ^a	2,3(0,2) ^b	1,9(0,3) ^b
TAG	52,4(0,8) ^a	51,6(2,6) ^a	52,6(3,6) ^a
Desconocido2	N.D. ^a	0,1(0,2) ^b	0,1(0,2) ^b
FFA	1,9(0,3) ^a	1,2(0,2) ^b	1,3(0,2) ^{ab}
CHO	7,9(0,1) ^a	9,7(0,5) ^b	9,4(0,5) ^b
MAG/DAG	2,3(0,4) ^a	2,0(0,5) ^a	1,8(0,2) ^a
Pigmentos	1,2(0,3) ^a	1,0(0,4) ^a	1,0(0,3) ^a
PE/CL/PG/PA	10,6(0,4) ^a	13,0(0,2) ^b	12,6(0,1) ^b
PS/PI	4,1(0,5) ^a	4,8(0,6) ^a	5,1(0,5) ^a
PC/SM	10,2(1,5) ^a	12,2(1,4) ^a	11,9(1,6) ^a
Total polares	24,9(2,3) ^a	30,0(1,7) ^b	29,6(2,0) ^{ab}
% Lípido (PS)	26,1(1,2) ^a	24,5(2,3) ^a	24,5(2,0) ^a

MLV: liposomas multilamelares; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente.

N.D.: no detectado (<0,05%); PC/SM: fracción conjunta de fosfatidilcolina y esfingomiélna; PS/PI: fracción conjunta de fosfatidilserina y fosfatidilinositol; PE/CL/PG/PA: fracción conjunta de fosfatidiletanolamina, cardiolipina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico; MAG/DAG: fracción conjunta de monoglicéridos y diglicéridos; FFA: ácidos grasos libres; TAG: triglicéridos; FAEE: ésteres etílicos de ácido graso; SE: ésteres de estero.

tratados con liposomas son inferiores a los de los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial, contribuyendo, de esta forma, a la diferencia en el contenido total de HUFA n-6. Como ya se ha descrito en el experimento Bioencapsulación 1, el contenido de ácidos grasos saturados presente en los nauplios tratados con liposomas de

Tabla 6.12. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de nauplios enriquecidos durante el experimento Bioencapsulación 3. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=8). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

<i>Ácido graso</i>	Emulsión comercial	MLV (KPL)	LUVdet (KPL)
16:0	9,8 (0,5) ^a	12,1 (0,9) ^b	12,8 (0,6) ^b
18:0	4,3 (0,3) ^a	4,7 (0,2) ^b	4,5 (0,2) ^{ab}
18:1n-9	26,0 (1,6) ^a	26,4 (1,8) ^a	25,6 (1,8) ^a
18:2n-6	4,1 (0,2) ^{ab}	3,9 (0,2) ^a	4,2 (0,1) ^b
18:3n-3	15,4 (0,8) ^a	16,5 (0,7) ^a	15,4 (1,2) ^a
20:4n-6	1,2 (0,1) ^a	1,1 (0,0) ^b	1,1 (0,0) ^b
20:5n-3	9,9 (1,8) ^a	7,5 (1,2) ^b	8,7 (0,8) ^{ab}
22:5n-3	0,8 (0,2) ^a	0,2 (0,1) ^b	0,2 (0,1) ^b
22:6n-3	4,0 (1,3) ^a	2,9 (0,8) ^a	3,4 (0,5) ^a
Total identificados	95,0 (0,7) ^a	94,8 (0,3) ^a	94,9 (0,5) ^a
Saturados	15,8 (0,8) ^a	18,9 (0,8) ^b	19,4 (0,5) ^b
Monoinsaturados	40,8 (1,6) ^a	41,2 (1,6) ^a	39,9 (1,7) ^a
Poliinsaturados	38,3 (2,6) ^a	34,7 (1,8) ^b	35,6 (1,7) ^b
Total n-3	32,6 (2,5) ^a	29,5 (1,8) ^b	30,1 (1,7) ^{ab}
Total n-6	6,1 (0,2) ^a	5,4 (0,2) ^b	5,7 (0,1) ^b
HUFA n-3	15,3 (3,3) ^a	11,0 (2,1) ^b	12,7 (1,3) ^{ab}
HUFA n-6	1,6 (0,1) ^a	1,4 (0,1) ^b	1,3 (0,1) ^b
DHA/EPA	0,4 (0,1) ^a	0,4 (0,1) ^a	0,4 (0,0) ^a

MLV: liposomas multilamelares; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente.

HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos; DHA/EPA: relación de porcentajes de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico.

krill fue significativamente superior al de los nauplios control, por la contribución del ácido palmítico (16:0) presente en el extracto de fosfolípidos de krill (Tabla 2.1).

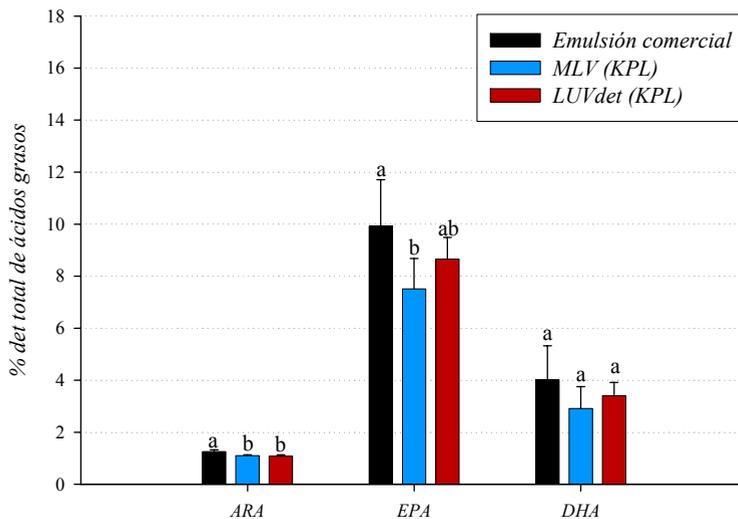


Figura 6.7. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (porcentaje del total de ácidos grasos) de nauplios enriquecidos recolectados durante el experimento Bioencapsulación 3. Las barras de error representan desviaciones típicas (n=8). Los tratamientos que comparten una misma letra no muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Tabla 6.13. Supervivencia, talla y peso de las larvas de dorada correspondientes a los diferentes grupos experimentales de Bioencapsulación 3. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). No existen diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$).

	Emulsión comercial	MLV (KPL)	LUVdet (KPL)
Supervivencia (%)	98,5 (1,3)	97,9 (2,2)	96,3 (2,5)
Talla final (mm)	15,7 (0,6)	15,7 (0,4)	15,6 (0,3)
Peso seco (mg)	4,8 (0,4)	4,9 (0,3)	4,6 (0,5)

MLV: liposomas multilamelares; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente.

Tabla 6.14. Composición de clases de lípidos (porcentajes del total de lípidos) y contenido total de lípidos (porcentaje del peso seco) de las larvas de dorada alimentadas con las dietas del experimento Bioencapsulación 3. Los datos son medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

<i>Clase de lípido</i>	Emulsión comercial	MLV (KPL)	LUVdet (KPL)
SE	8,7(1,7) ^a	8,7(1,7) ^a	9,4 (1,8) ^a
FAEE	N.D.	N.D.	N.D.
Desconocido1	N.D.	N.D.	N.D.
TAG	23,8(2,1) ^a	21,8(3,0) ^a	20,5 (1,2) ^a
Desconocido2	N.D.	N.D.	N.D.
FFA	0,8(0,8) ^a	0,7(0,5) ^a	0,6 (0,4) ^a
CHO	22,6(3,5) ^a	23,3(2,4) ^a	23,9 (3,7) ^a
MAG/DAG	1,0(0,7) ^a	0,9(0,5) ^a	0,7 (0,7) ^a
Pigmentos	0,7(0,2) ^a	0,8(0,4) ^a	0,6 (0,4) ^a
PE/CL/PG/PA	15,0(0,5) ^a	15,1(0,6) ^a	15,8 (0,0) ^a
PS/PI	5,1(1,7) ^a	5,1(1,7) ^a	5,3 (1,9) ^a
PC/SM	22,5(0,6) ^a	22,9(1,2) ^a	23,1 (0,9) ^a
Total polares	42,6(2,5) ^a	43,0(3,2) ^a	44,2 (2,8) ^a
% Lípidos (PS)	20,0(0,3) ^a	18,1(0,9) ^b	18,5 (0,2) ^b

MLV: liposomas multilamelares; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente.

N.D.: no detectado (<0,05%); PC/SM: fracción conjunta de fosfatidilcolina y esfingomielina; PS/PI: fracción conjunta de fosfatidilserina y fosfatidilinositol; PE/CL/PG/PA: fracción conjunta de fosfatidiletanolamina, cardiolipina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico; MAG/DAG: fracción conjunta de monoglicéridos y diglicéridos; FFA: ácidos grasos libres; TAG: triglicéridos; FAEE: ésteres etílicos de ácido graso; SE: ésteres de estero.

Los datos de supervivencia y crecimiento de las larvas de dorada de los tres grupos experimentales se recogen en la Tabla 6.13. La supervivencia de las larvas se situó por encima del 95% en todos los grupos experimentales, sin que se registraran diferencias significativas. Por otro lado, tampoco hubo diferencias en el crecimiento final de las larvas de los distintos tratamientos, igual que ocurrió en los experimentos Bioencapsulación 1 y 2.

Tabla 6.15. Selección de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de larvas de dorada del experimento Bioencapsulación 3. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3). Los tratamientos que comparten un mismo superíndice en una misma fila no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

<i>Ácido graso</i>	Emulsión comercial	MLV (KPL)	LUVdet (KPL)
16:0	12,3 (0,2) ^a	13,7 (0,3) ^b	13,9 (0,5) ^b
18:0	7,4 (0,1) ^a	8,2 (0,3) ^b	8,2 (0,3) ^b
18:1n-9	21,0 (0,1) ^a	22,0 (0,5) ^b	21,6 (0,3) ^{ab}
18:2n-6	3,8 (0,1) ^a	4,2 (0,0) ^b	4,3 (0,1) ^b
18:3n-3	9,3 (0,2) ^a	10,2 (0,6) ^a	10,1 (0,5) ^a
20:4n-6	2,6 (0,1) ^a	2,7 (0,2) ^a	2,6 (0,1) ^a
20:5n-3	10,9 (0,3) ^a	8,4 (0,2) ^b	8,7 (0,5) ^b
22:5n-3	2,3 (0,0) ^a	1,2 (0,1) ^b	1,3 (0,1) ^b
22:6n-3	6,5 (0,4) ^a	4,6 (0,5) ^b	5,9 (0,0) ^a
Total identificados	94,9 (0,1) ^a	94,6 (0,2) ^a	94,9 (0,4) ^a
Saturados	21,5 (0,2) ^a	23,8 (0,6) ^b	23,9 (0,7) ^b
Monoinsaturados	35,0 (0,4) ^a	36,2 (0,8) ^a	35,5 (0,5) ^a
Poliinsaturados	38,4 (0,3) ^a	34,6 (0,2) ^b	35,5 (0,5) ^b
Total n-3	30,9 (0,3) ^a	26,5 (0,0) ^b	27,8 (0,9) ^b
Total n-6	7,9 (0,1) ^a	8,4 (0,2) ^a	8,1 (0,3) ^a
HUFA n-3	20,7 (0,5) ^a	15,6 (0,7) ^b	17,0 (0,4) ^c
HUFA n-6	3,6 (0,0) ^a	3,8 (0,2) ^a	3,4 (0,3) ^a
DHA/EPA	0,6 (0,0) ^{ab}	0,5 (0,0) ^a	0,7 (0,0) ^b

MLV: liposomas multilamelares; LUVdet: liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente.

HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos; DHA/EPA: relación de porcentajes de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico.

En cuanto al contenido lipídico, la Tabla 6.14 recoge los análisis de clases lipídicas y el contenido total de lípidos obtenidos en las larvas de dorada alimentadas con las tres dietas experimentales. Las larvas control mostraron un porcentaje de lípidos totales superior al de los dos tratamientos con liposomas. Por su parte, las clases de lípidos de las larvas exhiben patrones muy similares entre los distintos tratamientos y no se observan diferencias significativas en el

contenido total de lípidos polares ni en ninguna de las fracciones consideradas. En cuanto a los ácidos grasos, los perfiles de las larvas (Tabla 6.15 y Figura 6.8) reflejan la composición de las dietas administradas durante todo el periodo experimental. De esta forma, las larvas correspondientes a los tratamientos con liposomas mostraron niveles de ácidos grasos saturados superiores a las larvas control y, en general, niveles de ácidos grasos insaturados de la serie n-3 inferiores. Así pues, los niveles de DPA y EPA del tratamiento control quedaron por encima de los de los tratamientos con liposomas, al igual que en los nauplios usados como dieta. En cuanto al DHA de las larvas, el tratamiento LUVdet presentó niveles iguales al control y superiores al grupo MLV. Debe recordarse que esta diferencia en el contenido de DHA de las larvas no se observa en las correspondientes dietas (nauplios enriquecidos).

La prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 6.9) realizada en las larvas de dorada muestra, de nuevo, un menor contenido de peróxidos lipídicos en los grupos tratados con liposomas en comparación al control.

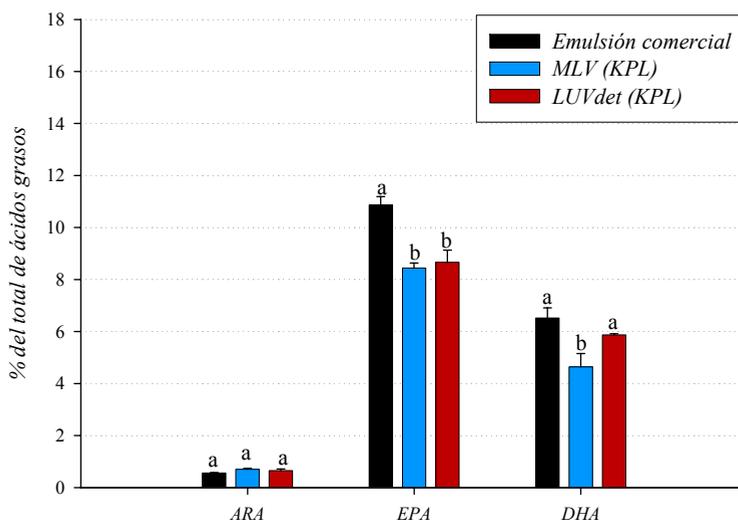


Figura 6.8. Contenidos de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (porcentaje del total de ácidos grasos) de las larvas de dorada del experimento Bioencapsulación 3. Las barras de error representan desviaciones típicas. Los tratamientos con la misma letra no muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

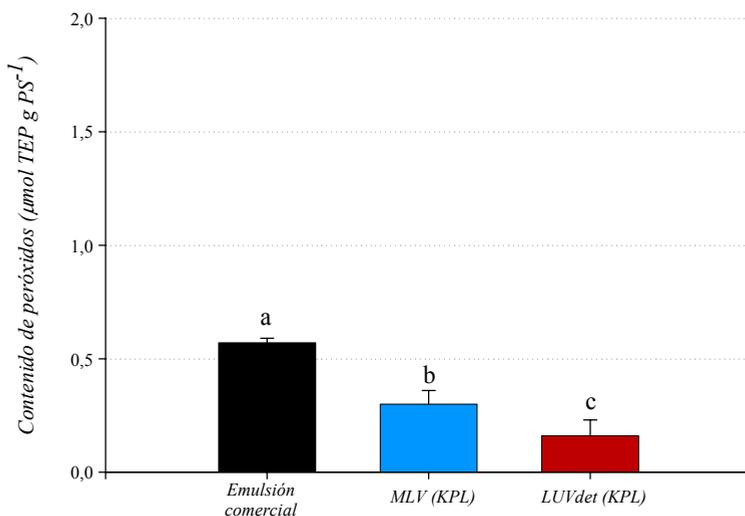


Figura 6.9. Contenido de peróxidos expresado como la concentración de tetraetoxipropano (TEP) en μmol equivalentes por gramo de peso seco en larvas de dorada alimentadas con las diferentes dietas experimentales (Bioencapsulación 3). Los valores son medias de tres réplicas. Las barras de error representan desviaciones típicas. Los tres tratamientos son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

6.4. Discusión

Los experimentos de alimentación larvaria recogidos en este capítulo confirman la posibilidad de utilizar nauplios de *Artemia* enriquecidos con liposomas de distinta formulación para alimentar larvas de lubina y dorada. Entre las preparaciones evaluadas, los liposomas formulados con fosfolípidos de krill (KPL) han demostrado ser un sistema eficaz para la vehiculación de EFAs y fosfolípidos a larvas de peces marinos. Como se ha adelantado en la introducción de este capítulo, los experimentos Bioencapsulación 1 y 3 se presentan como dos ejemplos que ilustran la importancia del control de las condiciones del enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con liposomas de krill. De esta forma, la pobre eficacia enriquecedora que los liposomas mostraron en Bioencapsulación 1 fue claramente mejorada en Bioencapsulación 3, experimento en el que se controlaron de forma más precisa algunos procedimientos del enriquecimiento de nauplios de *Artemia*. Como se explica en el Apartado 6.2, los

enriquecimientos correspondientes a Bioencapsulación 3 se llevaron a cabo bajo un control estricto del tiempo de eclosión de los quistes (23 h y 1 h de separación de las cáscaras), de la duración de las incubaciones de los nauplios con el producto enriquecedor (22 h) y del tiempo que los nauplios permanecían en tubos para el cálculo de la densidad (1 h). Además, estos enriquecimientos se realizaron con un flujo de aire menor (1,0 lpm) que no originó las altas mortalidades de nauplios observadas durante los primeros días de Bioencapsulación 1. En cualquier caso, la mejora de comportamiento de los dos tipos de liposomas empleados en Bioencapsulación 3 (MLV y LUVdet, ambos formulados únicamente con KPL) con respecto al experimento Bioencapsulación 1 queda reflejada en varios indicadores del perfil lipídico de las dietas. El primer signo de mejora viene dado en términos del contenido total de lípidos de los nauplios. Así, mientras que los lípidos totales de los nauplios control de ambos experimentos fueron muy similares (validación de su condición de controles), los nauplios tratados con liposomas de krill muestran, respecto a sus respectivos controles, niveles inferiores en Bioencapsulación 1 e iguales en Bioencapsulación 3. Este mayor contenido lipídico de los nauplios enriquecidos con liposomas según las condiciones de Bioencapsulación 3 indicaría una entrada más eficiente de producto enriquecedor en el nauplio y, por tanto, una mayor calidad nutricional. En cuanto a las larvas, el aumento del contenido de lípido de los nauplios tratados con liposomas en Bioencapsulación 3 no impidió que las larvas alimentadas con dietas basadas en liposomas mostraran niveles de lípidos totales inferiores a las larvas control. Este resultado puede explicarse por las pequeñas diferencias de contenidos lipídicos de las dietas, que acaban reflejándose en las larvas. En este sentido, los nauplios tratados con la emulsión comercial tienen, en general, contenidos de lípidos totales superiores a los nauplios tratados con liposomas como puede verse a lo largo de esta memoria.

Además del contenido total de lípidos, el cambio en las condiciones de enriquecimiento trajo consigo cambios evidentes en la composición de tipos de lípidos y en la incorporación de EFAs en las dietas. En cuanto a las clases lipídicas, los porcentajes de lípidos polares (LPs) de los nauplios enriquecidos con liposomas de Bioencapsulación 1 muestran valores claramente superiores a los del tratamiento control. Este mayor contenido porcentual de LPs en los nauplios tratados con liposomas no resulta tan evidente en las dietas pertenecientes a Bioencapsulación 3, aunque también se observan en ellos niveles superiores respecto al control (estadísticamente superiores en nauplios enriquecidos con MLV). Aunque este resultado puede hacer pensar en una pérdida de calidad nutricional de las dietas

de Bioencapsulación 3 por el descenso en el porcentaje de LPs, es preciso recordar que los niveles de las distintas clases lipídicas están expresados en términos relativos a la fracción lipídica. Por tanto, el porcentaje menor de LPs en las dietas de Bioencapsulación 3 está referida a una fracción (lípidos totales) más abundante que en Bioencapsulación 1 (ver contenidos de lípidos totales de nauplios de Bioencapsulación 1 y 3 en las Tablas 6.1 y 6.11, respectivamente). Como ha sido argumentado en el Capítulo 4 (Apartado 4.4) una mayor entrada de liposomas en *Artemia* reduce los niveles porcentuales de las fracciones de LPs porque viene acompañada de un aumento del contenido de TAGs como producto final de la acción metabólica del nauplio (Rainuzzo y cols., 1994a; McEvoy y cols., 1996). De hecho, el aumento de TAGs asociado se manifiesta claramente en las dietas de Bioencapsulación 3, con niveles muy superiores a los de Bioencapsulación 1. En cuanto a los análisis de las larvas, las alimentadas con nauplios tratados con liposomas (Bioencapsulación 1) muestran, con respecto al tratamiento control, porcentajes elevados de LPs y bajos de TAGs. En cambio, las larvas de dorada (Bioencapsulación 3) tienen un perfil de clases lipídicas más homogéneo en comparación al control, con perfiles de LPs muy similares, a pesar de las pequeñas diferencias en el contenido de los mismos halladas en los nauplios de este experimento. Este resultado refuerza el carácter conservativo de los lípidos polares (Corraze, 2001; Sargent y cols., 2002), cuya fracción no evidencia la influencia de la dieta como ocurre en los lípidos neutros (Ibeas y cols., 1996; Robin y cols., 2003; Skalli y Robin, 2004). La acumulación de lípidos de reserva como los TAGs, a consecuencia del efecto de la dieta, ha sido considerada como índice de condición nutricional en larvas de peces porque da idea de la disponibilidad de energía del animal (Fraser, 1989; Ferron y Leggett, 1994). Por tanto, el mayor contenido de TAGs de las larvas de dorada (Bioencapsulación 3) con respecto a las de lubina (Bioencapsulación 1) significaría otro signo de mejora en la calidad de las dietas basadas en liposomas.

El cambio de las condiciones de enriquecimiento adoptadas del experimento Bioencapsulación 1 a Bioencapsulación 3 también queda demostrado en los perfiles de ácidos grasos de las dietas. En el experimento Bioencapsulación 1 (condiciones inadecuadas) los contenidos de EFAs de los nauplios enriquecidos con liposomas LUVext y LUVdet son muy escasos y sólo los nauplios enriquecidos con liposomas MLV alcanzaron niveles comparables al tratamiento control aunque acompañados de una notable variabilidad. En cambio, la composición en EFAs de los nauplios incubados con liposomas

correspondientes a Bioencapsulación 3 es comparable a la exhibida por los nauplios control.

A la vista de estos resultados, la mejora de la eficacia enriquecedora de los liposomas de krill puede relacionarse con los cambios adoptados en el protocolo de enriquecimiento. Entre éstos, la aireación puede haber jugado un papel importante por el efecto sobre la incorporación de EFAs durante los enriquecimientos de nauplios de *Artemia* con liposomas (Capítulo 4). De esta forma, la moderación del flujo de aire adoptada en Bioencapsulación 3 reduciría el efecto negativo de la turbulencia sobre el rendimiento del proceso de enriquecimiento (Capítulo 4). Por otra parte, la reducción del tiempo que los nauplios permanecían sin alimento hasta ser administrados a las larvas en Bioencapsulación 3 también ayudaría a la mejora de la calidad de los nauplios de este experimento ya que, en condiciones de ayuno, los nauplios metabolizan el producto enriquecedor incorporado durante el enriquecimiento (Navarro y cols., 1999). Otros cambios, sin embargo, podrían tener menor incidencia en la mejora nutricional de los nauplios de Bioencapsulación 3. Por ejemplo, la fijación de un tiempo exacto de incubación de los nauplios con el producto enriquecedor (22 h) no explicaría la mejora con respecto a los nauplios de Bioencapsulación 1, los cuales fueron enriquecidos durante periodos variables entre 21 y 24 h. Según los resultados obtenidos en el Capítulo 4 (Apartado 4.3.1), los liposomas de krill consiguen niveles de enriquecimiento notables en un tiempo de incubación de 18 h. De esta forma, más que mejorar el enriquecimiento, esta medida permitiría reducir parcialmente la variabilidad de la eficacia del proceso, aunque este fenómeno parece persistir a pesar de la atención prestada en controlar las condiciones de enriquecimiento de los nauplios durante la realización de Bioencapsulación 3. Esto indica que el proceso de enriquecimiento tiene un carácter intrínsecamente variable tal y como apuntaron Lavens y cols. (1995), Furuita y cols. (1996), van Stappen (1996), Navarro y cols. (1999) y Han y cols. (2000).

En el experimento Bioencapsulación 2 se adoptó la estrategia propuesta en el Capítulo 3 sobre la utilización de dos tipos de liposomas como solución a la administración simultánea de nutrientes esenciales de naturaleza liposoluble e hidrosoluble. Sin embargo, la turbulencia del medio podría haber impedido, de nuevo, comprobar la eficacia de los liposomas para vehicular alguno de los nutrientes estudiados en el experimento Bioencapsulación 2. Este experimento se llevó a cabo inmediatamente después de la realización de Bioencapsulación 1. Durante el mismo se continuó aplicando una fuerte aireación como estrategia más recomendable para evitar las

mortandades masivas de nauplios observados en los primeros días de Bioencapsulación 1. Así, el empleo de liposomas cargados de nutrientes hidrosolubles (ascorbato y metionina) no resultó muy eficaz según se desprende de los análisis realizados en los nauplios de Bioencapsulación 2. Además del efecto depresor sobre la capacidad filtradora de los nauplios, la agitación vigorosa puede favorecer la evacuación de estos nutrientes hidrosolubles desde la fase acuosa intravesicular hacia el medio extravascular, perdiéndose así las ventajas atribuidas a la administración de compuestos hidrosolubles encapsulados mediante liposomas en comparación a su presentación en disolución. Además, en el caso del ascorbato, la elevada oxigenación del medio podría acelerar su degradación, reduciéndose aún más la eficacia de los liposomas para vehicular este nutriente. Estas hipótesis han sido discutidas en los enriquecimientos recogidos en el Capítulo 5.

Con respecto al retinol, la eficacia de los liposomas formulados con palmitato de retinol como fuente de vitamina A queda evidenciada en el enriquecimiento presentado en el Capítulo 5, donde las dos formulaciones de liposomas consiguieron un aumento evidente de este compuesto en los nauplios. Sin embargo, la imposibilidad de analizar las dietas enriquecidas en vitamina A recolectadas durante la realización de Bioencapsulación 2, impide conocer su comportamiento en las condiciones turbulentas en las que se llevaron a cabo los enriquecimientos de nauplios en este caso. Este rendimiento puede inferirse, sin embargo, a partir de los análisis obtenidos en las larvas. De esta forma, la ausencia de diferencias en el nivel de retinol de las larvas alimentadas con las distintas dietas indicaría, de nuevo, un bajo rendimiento de los liposomas ricos en palmitato de retinol ya que las mismas formulaciones usadas en condiciones de incubación menos agresivas (Capítulo 5) demostraron una gran eficacia para bioencapsular vitamina A en nauplios de *Artemia*. En cualquier caso, la falta de diferencias en los análisis realizados en las larvas no debe descartar la posibilidad de una transformación metabólica de las larvas sobre los nutrientes que llegan a través de la dieta tal y como se ha discutido con los lípidos. Esta hipótesis se podría comprobar de forma directa mediante el seguimiento de los nutrientes administrados por técnicas de marcaje radioactivo o bien indirectamente a través de la determinación de parámetros fisiológicos que describan la condición nutricional de la larva (Ferron y Leggett, 1994). Dichas pruebas formarán parte de futuros proyectos, dado que se alejan de los objetivos planteados en el presente trabajo.

Los resultados de supervivencia y crecimiento obtenidos en los tres experimentos de cultivo larvario confirman, en cualquier caso,

la posibilidad de criar larvas de lubina y dorada usando dietas basadas en nauplios de *Artemia* enriquecidos con liposomas de muy variada composición. En consecuencia, las dietas evaluadas demostraron poseer una calidad nutricional suficiente a pesar de la moderada eficacia de los liposomas exhibida en los experimentos Bioencapsulación 1 y 2. Así pues, estas hipotéticas deficiencias de los nauplios enriquecidos con liposomas en condiciones inadecuadas podrían estar compensadas por dos hechos. En primer lugar, los nauplios tratados con liposomas en Bioencapsulación 1 y 2 tenían porcentajes de LPs superiores a los nauplios enriquecidos con la emulsión lipídica comercial. Esta circunstancia podría compensar las posibles carencias de EFAs de esos nauplios ya que, como se ha venido exponiendo a lo largo de esta memoria, los fosfolípidos son compuestos con propiedades nutricionales ventajosas ampliamente descritas (Kanazawa y cols., 1985; Koven y cols., 1993a; Teshima y cols., 1993; Coutteau y cols., 1997; Geurden y cols., 1998; Gisbert y cols., 2005). En segundo lugar, el efecto tóxico de los peróxidos (Hipkiss y cols., 1997; Tesoriere y cols., 2002; Del Rio y cols., 2005) podría ser menor en las larvas alimentadas con dietas basadas en liposomas debido a la menor acumulación de estos compuestos en sus tejidos corporales. Este mayor contenido de peróxidos en las larvas control puede tener su origen en la mayor susceptibilidad a la oxidación de los lípidos neutros que componen la emulsión lipídica comercial (Tabla 2.1) en relación a los polares (King y cols., 1992a, b; McEvoy y cols., 1997; Song y cols., 1997), y que ha sido comprobada en condiciones de enriquecimiento en el Capítulo 3. Esta mayor labilidad de la emulsión lipídica comercial también se manifiesta en el mayor contenido de peróxidos lipídicos en las larvas de lubina de Bioencapsulación 2 en comparación a los otros dos experimentos de alimentación. Las larvas utilizadas en Bioencapsulación 2 tenían una edad mayor y fueron alimentadas con la dieta de mantenimiento (nauplios enriquecidos con Super Selco) durante un periodo más prolongado hasta ser utilizadas en el experimento de alimentación. En cualquier caso, bajo nuestras condiciones analíticas los beneficios nutricionales esperables por el uso de liposomas como enriquecedor de presas vivas no han podido ser evidenciados en términos de supervivencia y crecimiento. Por este motivo, la determinación de otros indicadores de condición nutricional de larvas permitirá, de nuevo, resaltar las ventajas presumibles en la administración de nutrientes a través de liposomas.

Como resumen de este capítulo puede resaltarse la necesidad de controlar las variables biológicas y fisico-químicas implicadas en los enriquecimientos de nauplios de *Artemia*, para la obtención de un

rendimiento óptimo en términos de incorporación de nutrientes. Entre estas variables, la turbulencia asociada a la aireación y la reducción del tiempo que los nauplios se mantienen sin alimento hasta que se ofrecen a las larvas, pueden jugar un papel importante en la mejora de la calidad del enriquecimiento con liposomas observado de Bioencapsulación 1 a Bioencapsulación 3. Además de mejorar la eficacia enriquecedora de los liposomas, el control de las variables podría minimizar la variabilidad del enriquecimiento y, en consecuencia, permitiría controlar mejor la calidad de las dietas. Por su parte, los experimentos incluidos en este capítulo demuestran la posibilidad de alimentar larvas de lubina y dorada con nauplios de *Artemia* enriquecidos con liposomas, sin que se observen diferencias con los resultados de supervivencia y crecimiento obtenidos usando un producto comercial de eficacia contrastada.

CAPÍTULO 7

EXPERIMENTOS DE SUMINISTRO DIRECTO DE NUTRIENTES A LARVAS DE PECES: BAÑOS DE LIPOSOMAS

7.1. Introducción

El éxito del cultivo larvario de la mayoría de especies de peces marinos depende del suministro de presas vivas. Sin embargo, las carencias nutricionales de éstas, su calidad nutricional variable (Sorgeloos, 1980; Watanabe y cols., 1983) y los inconvenientes de carácter económico derivados de la necesidad de infraestructuras, mano de obra y suministro energético necesarios para la producción masiva de estos organismos (Koven y cols., 2001; Person Le Ruyet y cols., 1993) ha motivado la proliferación de estudios sobre nutrición de larvas de peces dirigidos a la sustitución de las dietas vivas por dietas inertes (Salhi y cols., 1994, 1997, 1999; Bessonart y cols., 1999; Yúfera y cols., 2000; Cahu y Zambonino Infante, 2001; Koven y cols., 2001; Langdon, 2003; Langdon y Önal, 2005; Kvåle y cols., 2006).

En los últimos años, se han desarrollado varios tipos de partículas destinadas a la alimentación de organismos acuáticos, los cuales se detallan a continuación siguiendo la clasificación propuesta por Langdon (2003):

1. Partículas *microbound*: partículas sin recubrimiento exterior, en las que una matriz polimérica de proteína o almidón atrapa los nutrientes. Asimismo, se pueden utilizar otros compuestos para formar la matriz, como son la zeína, el alginato, el agar o la gelatina.
2. Cápsulas de pared proteica (*cross-linked protein-walled capsules*): son partículas cubiertas con una pared proteica destinada a la retención de los nutrientes incluidos en ella.
3. Microcápsulas de pared lipídica (*lipid-walled microcapsules*): son cápsulas producidas por un proceso de doble emulsión. Una emulsión primaria de la solución de nutrientes en lípido, seguida de una segunda con una disolución acuosa con un agente emulsionante, para dar lugar a gotículas que se endurecen por enfriamiento.
4. Gotas lipídicas pulverizadas (*lipid spray beads*): están compuestas de partículas de un material nuclear embebido en perlas lipídicas. Estas partículas no tienen una pared continua alrededor y pueden llegar a sobresalir de la superficie de la perla lipídica.
5. Liposomas: vesículas fosfolipídicas cerradas con un espacio interno acuoso.

Así pues los liposomas, además de usarse para vehicular sustancias a larvas mediante su bioencapsulación en presas vivas (Hontoria y cols., 1994; McEvoy y cols., 1996; Tonheim y cols., 2000), pueden ser utilizados como sistemas para la administración directa de nutrientes a larvas de peces. Esta posibilidad ofrece, a su vez, dos alternativas en función de que la incorporación se efectúe de forma activa o pasiva. De esta forma, la primera vía de entrada de liposomas puede deberse a la ingestión de liposomas del medio circundante en procesos de osmorregulación (Evans, 1993) al ingerir activamente agua del medio, además, de la captura selectiva de liposomas como presas. Esta alternativa fue utilizada en un estudio en el que se emplearon liposomas para alimentar larvas de arenque (*Clupea harengus*) y cuyo objetivo era desarrollar un método radioactivo para estudiar los requerimientos en PUFAs de las larvas de peces marinos (Fox y cols., 1990). En un estudio más reciente, Koven y cols. (1999) evaluaron el empleo de liposomas como complemento nutritivo en los primeros estadios de alimentación exógena de larvas de dorada (*Sparus aurata*) y cherna de ley (*Epinephelus aeneus*), comprobando la incorporación activa de liposomas en ambas especies.

Además de la ingestión activa de liposomas planteada en el párrafo anterior, una segunda vía de incorporación de nutrientes en el que la larva juega un papel más pasivo, está relacionada con la analogía estructural entre los liposomas y las membranas celulares. De esta forma, cualquier tejido de la larva que se halle en contacto con suspensiones de liposomas se convierte en un tejido diana donde los liposomas pueden liberar su contenido. New (1990, p. 221) propone los siguientes mecanismos de interacción entre liposomas y células:

1. Transferencia intermembrana: implica un intercambio de componentes lipídicos (fosfolípidos, colesterol, etc.) entre las membranas de los liposomas y las células.
2. “Contacto-liberación”: mecanismo por el que la aproximación del liposoma a la célula provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana liposómica y la sustancia disuelta en su compartimento acuoso se libera a la inmediaciones del punto de contacto y puede acabar penetrando en el citoplasma celular.
3. Adsorción: unión estable entre un liposoma y una célula sin intercambio de componentes de membrana ni de compuestos disueltos en el compartimento acuoso.
4. Fusión: mecanismo por el que tiene lugar una unión completa de las dos membranas y la liberación del contenido acuoso al

citoplasma celular. La presencia de detergentes en el liposoma puede favorecer este mecanismo. En el caso de liposomas MLV, este proceso implica la entrada de bicapas internas que pueden interactuar a su vez con membranas de orgánulos celulares.

5. Fagocitosis: proceso por el que células fagocíticas incorporan liposomas tras una invaginación de su membrana citoplasmática. En el citoplasma, el endosoma formado se fusiona con un lisosoma y se produce la digestión de éste.

Según los mecanismos descritos, los procesos de transferencia intermembrana, el de “contacto-liberación” y la fusión pueden tener un interés relevante para la administración de nutrientes a larvas de peces mediante liposomas.

Con estos precedentes, este capítulo tiene como objetivo valorar la eficacia de varias formulaciones liposomales para vehicular nutrientes de forma directa a las larvas sin acudir a su bioencapsulación en presas vivas.

7.2. Material y métodos

La administración directa de nutrientes a larvas de peces mediante la exposición de éstas a baños de liposomas fue probada en ejemplares de lubina y dorada con distinto grado de desarrollo y criados según los procedimientos descritos en el Apartado 2.3. Se realizaron un total de cinco experimentos, utilizando liposomas de fosfolípidos de krill (KPL) y de fosfatidilcolina de soja (SPC) para la administración de EFAs y nutrientes hidrosolubles (ascorbato y metionina), respectivamente. Aunque se detalla más ampliamente en cada apartado, la Tabla 7.1 recoge algunos datos relevantes sobre los cinco ensayos realizados. El dispositivo experimental utilizado en todos los experimentos constó de 15 recipientes de vidrio de 1 l de capacidad, correspondientes a tres réplicas de cinco tratamientos distintos (Figura 7.1). En los baños de nutrientes hidrosolubles (ascorbato y metionina), los tratamientos evaluados fueron los siguientes: un tratamiento control en el que las larvas no estaban expuestas al nutriente administrado, dos tratamientos de liposomas a dos concentraciones distintas, y dos tratamientos con disoluciones acuosas de los nutrientes administrados en concentraciones equivalentes a los dos tratamientos con liposomas. En el caso de la administración de PUFAs (Baño 1), junto al tratamiento control se establecieron dos tratamientos con liposomas ricos en PUFAs a dos concentraciones lipídicas distintas, y otros dos tratamientos en los que

Tabla 7.1. Detalles de los experimentos de suministro directo de nutrientes a larvas de peces mediante baños de liposomas.

Experimento	Especie	Nutriente	Edad (DPE)
Baño 1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	PUFA	45
Baño 2	<i>D. labrax</i>	Ascorbato	58
Baño 3	<i>D. labrax</i>	Metionina	30
Baño 4	<i>Sparus aurata</i>	Metionina	0*
Baño 5	<i>S. aurata</i>	Metionina	25

DPE: días *post* eclosión.

(*) larvas lecitotróficas recién eclosionadas.



Figura 7.1. Dispositivo empleado en los experimentos de suministro directo de nutrientes a larvas de peces mediante baños de liposomas.

se administró la emulsión comercial Super Selco (Inve, Gante, Bélgica) en concentraciones lipídicas equivalentes a las de los dos tratamientos de liposomas. En cada uno de los recipientes (Figura 7.1) se estableció un número conocido de larvas que fueron sometidas a los distintos tratamientos de cada experimento, con la única excepción del

experimento Baño 4, en el que la densidad de larvas lecitotróficas se estimó paralelamente a partir de conteos realizados en recipientes distintos a los experimentales para, así, evitar la manipulación de los animales. Las condiciones establecidas en cada experimento (duración de la exposición, días de ensayo, régimen de alimentación, etc.) se detallarán a continuación. En todos los casos, a excepción del experimento Baño 4, las larvas fueron mantenidas en ayunas durante las últimas 24 h con el fin de que evacuaran el contenido del aparato digestivo antes de ser muestreadas. Al final del experimento se determinó la supervivencia final y, a continuación, las larvas fueron sacrificadas en un baño con hielo. Las muestras biológicas fueron congeladas a -20°C hasta ser analizadas.

En los cinco experimentos realizados, las variables biológicas obtenidas fueron analizadas estadísticamente comparando simultáneamente los cinco tratamientos planteados. El procedimiento seguido en este análisis queda detallado en el Apartado 2.5.

7.2.1. Baño 1: inmersión de larvas de lubina en liposomas con EFAs

En este experimento se realizaron inmersiones de larvas de lubina en suspensiones de liposomas y en una emulsión lipídica comercial (Super Selco, Inve, Gante, Bélgica), además del establecimiento de un tratamiento control en el que las larvas no fueron tratadas con ningún producto rico en EFAs. Los liposomas empleados en este experimento se prepararon por el método de solubilización por detergente (LUVdet), utilizando KPL como componente principal de la membrana. Los cinco tratamientos planteados fueron los siguientes:

1. Control: larvas no tratadas con productos ricos en EFAs.
2. LUVdet 1 (KPL): larvas tratadas con LUVdet de KPL a baja concentración (50 mg lípido ml⁻¹).
3. LUVdet 2 (KPL): larvas tratadas con LUVdet de KPL a alta concentración (100 mg lípido ml⁻¹).
4. EC 1: larvas tratadas con emulsión comercial Super Selco a baja concentración (50 mg lípido ml⁻¹).
5. EC 2: larvas tratadas con emulsión comercial Super Selco a alta concentración (100 mg lípido ml⁻¹).

Se utilizaron larvas de lubina que, tras un periodo de ayuno de 24 h, fueron estabuladas en lotes de 40 individuos en cada uno de los 15 recipientes del dispositivo experimental (triplicados de cinco tratamientos) (Figura 7.1). La edad de las larvas al inicio del

experimento era de 45 dpe. Los 15 recipientes contenían agua de mar filtrada (0,45 μm) hasta un volumen total de 800 ml. La aireación, suministrada individualmente en cada recipiente a través de una varilla de vidrio de sección con diámetro de 0,5 cm, se fijó en un flujo mínimo (0,2 lpm) que aseguraba una concentración de oxígeno disuelto superior a 5 mg l⁻¹. El experimento se realizó en condiciones de temperatura constante de 20,0 \pm 0,5°C.

Una vez estabuladas, las larvas se dejaron aclimatar durante un periodo de 1 h, reponiendo las larvas muertas al final de este periodo. En ese momento, las larvas fueron alimentadas con la primera ración de nauplios de bajo valor nutritivo recién eclosionados (Inve EG, Bélgica). La densidad de presas en cada recipiente era de 3 nauplios ml⁻¹, aproximadamente. Después de 7 h, se administró la primera dosis de liposomas o de emulsión lipídica, dependiendo del tratamiento, resultando una concentración de lípido de 50 mg ml⁻¹ (tratamientos LUVext 1 y EC 1) ó 100 mg l⁻¹ (tratamientos LUVext 2 y EC 2). La inmersión de las larvas en las suspensiones de liposomas o micelas de emulsión se prolongó durante 17 h, periodo tras el cual se retiraban las larvas muertas y se vaciaba el 75% del medio de cada recipiente. Inmediatamente, se rellenaba el recipiente con agua de mar filtrada. Los procesos de vaciado y llenado de cada recipiente se realizaban por sifonado, extremando la precaución para evitar daños a las larvas. Este ciclo de 24 h se repitió durante dos días más, de modo que al final del experimento se llegaron a realizar un total de tres inmersiones de 17 h en los productos ricos en EFAs. El cuarto día se renovó el 75% del medio y las larvas se mantuvieron en ayuno para que evacuaran el contenido de su tracto digestivo hasta ser muestreadas al quinto día. Cabe señalar que la concentración lipídica indicada fue aumentando progresivamente a medida que se sucedían los días de ensayo, como consecuencia de la permanencia del producto restante en el 25% del medio que no se renovaba. Al final del experimento, las larvas de los distintos tratamientos fueron sacrificadas sumergiéndolas en un baño con hielo. Tras su conteo para estimar la supervivencia, las larvas se enjuagaban abundantemente con agua destilada para eliminar restos de los productos ricos en EFAs y sales antes de ser congeladas a -20°C. A partir de las muestras de larvas liofilizadas, se procedía a la extracción de los lípidos totales (Apartado 2.4.1) sobre los que, más tarde, se analizaron los ácidos grasos mediante el procedimiento descrito en el Apartado 2.4.3. Aunque el análisis de fosfolípidos también podría evidenciar la eficacia de los liposomas para vehicular EFAs mediante baños, sólo se analizaron los ácidos grasos por considerarse un indicador

concluyente para comprobar la incorporación de liposomas de krill en las larvas.

7.2.2. Baño 2: inmersión de larvas de lubina en liposomas con ascorbato sódico

Este experimento se realizó sometiendo a las larvas a inmersiones con ascorbato sódico liposomado o disuelto. Como en Baño 1, se estableció un tratamiento control en el que las larvas no fueron expuestas al nutriente. Los liposomas utilizados se prepararon por la metodología de solubilización por detergente (LUVdet), con una bicapa compuesta únicamente por fosfatidilcolina de soja (SPC) y con una fase acuosa consistente en ascorbato sódico disuelto en suero fisiológico (disolución 0,9% de NaCl, p/v) (Apartado 2.1). La concentración de ascorbato sódico de la suspensión de liposomas fue de 100 mg ml^{-1} . Por su parte, la disolución de ascorbato sódico empleada en los tratamientos con ascorbato disuelto consistió en suero fisiológico con ascorbato disuelto a 100 mg ml^{-1} . En el tratamiento control, se administró un volumen de suero fisiológico equivalente al administrado en los tratamientos con liposomas y disoluciones. Los cinco tratamientos establecidos fueron los siguientes:

1. Control: larvas tratadas con un volumen de suero fisiológico equivalente al volumen dispensado en los tratamientos 3 y 5.
2. LUVdet 1: larvas tratadas con baja concentración de ascorbato (50 mg l^{-1}) sódico mediante LUVdet.
3. LUVdet 2: larvas tratadas con alta concentración de ascorbato (100 mg l^{-1}) sódico mediante LUVdet.
4. Disolución 1: larvas tratadas con baja concentración de ascorbato sódico (50 mg l^{-1}) mediante una disolución en suero fisiológico.
5. Disolución 2: larvas tratadas con alta concentración de ascorbato sódico (100 mg l^{-1}) mediante una disolución en suero fisiológico.

Se emplearon larvas de lubina del mismo lote usado en el experimento previo, con una edad inicial de 58 d. Tras mantenerse en ayunas 24 h, se establecieron un total de 40 larvas en cada uno de los 15 recipientes del dispositivo experimental. Como en el experimento anterior, el sistema experimental consistió en 15 recipientes (triplicados de los cinco tratamientos) llenos de agua de mar filtrada ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$) hasta un volumen total de 800 ml. El nivel de aireación fue

aproximadamente el del experimento previo. Asimismo, se realizó en la misma cámara termostatzada a $20,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Tras el periodo de aclimatación (1 h), las larvas fueron alimentadas con la primera ración de nauplios de bajo valor nutritivo recién eclosionados (Inve EG, Gante, Bélgica). La densidad de presas en cada recipiente se estimó entre 5-7 nauplios ml^{-1} . El protocolo cíclico de administración de nauplios, inmersión en los tratamientos y renovación del medio, fue exactamente el mismo descrito en el Apartado 7.2.1, con un total de tres inmersiones de 17 h en los diferentes productos analizados. La concentración inicial de ascorbato sódico y de lípido fue de 50 mg l^{-1} (tratamientos LUVdet 1 y Disolución 1) y de 100 mg l^{-1} (tratamientos LUVdet 2 y Disolución 2), pudiendo aumentar en los días siguientes por los restos presentes en el 25% del medio de cultivo que no se renovaba. Al igual que en el experimento anterior, las larvas no tuvieron ración de nauplios el cuarto día, con el fin de permitir el vaciado del tracto digestivo. Al final del experimento, se contaron las larvas supervivientes y, a continuación, se sacrificaron en un baño con hielo. Tras ser enjuagadas en agua destilada abundante para retirar los restos de ascorbato y sales, las muestras de larvas se congelaron a -20°C . Los análisis de ascorbato, realizados sobre muestras liofilizadas, se llevaron a cabo como se detalla en el Apartado 2.4.5.

7.2.3. Baño 3: inmersión de larvas de lubina en liposomas con metionina

Los liposomas utilizados en este experimento se prepararon por la metodología de extrusión (Apartado 2.1), y fueron formulados por una mezcla SPC:CHO (4:1, p/p) en su membrana y metionina disuelta en la fase acuosa de la suspensión a una concentración de 40 mg ml^{-1} . En los tratamientos Disolución 1 y Disolución 2, la metionina fue administrada disuelta en agua de mar filtrada ($0,45 \mu\text{m}$) a una concentración de 40 mg ml^{-1} . Los cinco tratamientos fueron:

1. Control: larvas no tratadas con metionina.
2. LUVext 1: larvas tratadas con baja concentración de metionina (10 mg l^{-1}) mediante liposomas LUVext.
3. LUVext 2: larvas tratadas con alta concentración de metionina (30 mg l^{-1}) mediante liposomas LUVext.
4. Disolución 1: larvas tratadas con baja concentración de metionina (10 mg l^{-1}) mediante una disolución en agua de mar.

5. Disolución 2: larvas tratadas con alta concentración de metionina (30 mg l^{-1}) mediante una disolución en agua de mar.

En este experimento se utilizaron larvas de lubina de 30 dpe, cultivadas por procedimientos convencionales como los descritos en el Apartado 2.4.1. Tras ser mantenidas en ayunas durante 24 h, las larvas se estabularon en lotes de 80 individuos en cada uno de los 15 recipientes idénticos a los utilizados en Baño 1 y Baño 2 (triplicados de los cinco tratamientos). Las condiciones de aireación y temperatura fueron iguales a las citadas anteriormente. La exposición de las larvas se prolongó durante un único periodo de 24 h, sin que se administrara alimento. En los tratamientos con metionina, la concentración inicial fue de 10 mg l^{-1} (LUVext 1 y Disolución 1) y 30 mg l^{-1} (LUVext 2 y Disolución 2). Por su parte, la concentración de lípido en el medio de enriquecimiento fue de 25 y 75 mg l^{-1} para los tratamientos LUVext 1 y LUVext 2, respectivamente. Tras el periodo de incubación, se contaron las larvas vivas para estimar la supervivencia y, posteriormente, se sacrificaron colocándolas en un baño con hielo. Las muestras de larvas se congelaron tras ser enjuagadas en abundante agua destilada. Una vez liofilizadas, se procedió a la determinación del contenido de metionina libre (Apartado 2.4.6).

7.2.4. Baño 4: inmersión de larvas lecitotróficas de dorada en liposomas con metionina

La incorporación de metionina en larvas lecitotróficas de dorada fue evaluada bajo un diseño experimental similar a los planteados en los experimentos Baño 2 y Baño 3. En esta ocasión, los liposomas utilizados fueron LUVdet de SPC como único componente de la bicapa, además de metionina disuelta en la fase acuosa de la suspensión (20 mg ml^{-1}). La disolución utilizada en los tratamientos Disolución 1 y Disolución 2 consistía en metionina disuelta en suero fisiológico a una concentración de 20 mg ml^{-1} . Los cinco tratamientos planteados en este experimento fueron:

1. Control: larvas tratadas con un volumen de suero fisiológico equivalente al volumen dispensado en los tratamientos 3 y 5.
2. LUVdet 1: larvas tratadas con baja concentración de metionina ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$) mediante liposomas LUVdet.
3. LUVdet 2: larvas tratadas con alta concentración de metionina ($12,5 \text{ mg l}^{-1}$) mediante liposomas LUVdet.

4. Disolución 1: larvas tratadas con baja concentración de metionina ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$) mediante una disolución en suero fisiológico.
5. Disolución 2: larvas tratadas con alta concentración de metionina ($12,5 \text{ mg l}^{-1}$) mediante una disolución en suero fisiológico.

Las larvas lecitotróficas con las que se realizó el experimento, se obtuvieron a partir de la eclosión de huevos obtenidos de reproductores mantenidos en cautividad en las instalaciones de Piscicultura Marina, S.L. (Burriana, España). Con el fin de evitar la manipulación de las larvas durante su estabulación, cada uno de los 15 recipientes se llenó hasta un volumen total de 800 ml sumergiéndolo en el tanque donde se hallaban las larvas recién eclosionadas. Durante este proceso, las larvas presentes en el tanque fueron dispersadas homogéneamente mediante aireadores colocados en diversos puntos del tanque, con el objetivo de asegurar una densidad de larvas constante en todos los recipientes. La densidad de larvas, estimada tras el conteo de tres alícuotas, fue de unas 290 larvas l^{-1} en cada recipiente del dispositivo experimental. Al inicio de la exposición, la concentración de metionina fue de $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ (LUVdet 1 y Disolución 1) y $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ (LUVdet 2 y Disolución 2). En los tratamientos con liposomas, la concentración de lípido fue de $12,5$ y $62,5 \text{ mg l}^{-1}$ en LUVdet 1 y LUVdet 2, respectivamente. La exposición de las larvas a los distintos tratamientos se prolongó durante un periodo de 30 h. Durante este periodo, las larvas consumieron la mayor parte de las reservas vitelinas, hecho que determinó el final de la exposición. La supervivencia de las larvas se estimó promediando los conteos bajo lupa binocular de larvas vivas obtenidos en tres alícuotas tomadas de cada recipiente. Al finalizar la incubación, el contenido de cada recipiente se hizo pasar por una malla de plancton de $160 \mu\text{m}$ de luz, donde quedaban retenidas las larvas. Entonces, se procedió al lavado con agua destilada para eliminar restos de metionina y sales. Las muestras de larvas se conservaron en el congelador a -20°C y, posteriormente, se liofilizaron antes del análisis de aminoácidos libres (Apartado 2.4.6).

7.2.5. Baño 5: inmersión de larvas de dorada en liposomas con metionina

En este experimento se emplearon liposomas con la misma formulación utilizada en el Apartado 7.2.4. También se plantearon dos tratamientos en los que se administró metionina disuelta en suero

fisiológico, y un tratamiento control en el que no se administró metionina. Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Control: larvas tratadas con un volumen de suero fisiológico equivalente al volumen dispensado en los tratamientos 3 y 5.
2. LUVdet 1: larvas tratadas con baja concentración de metionina ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$) mediante liposomas LUVdet.
3. LUVdet 2: larvas tratadas con alta concentración de metionina ($12,5 \text{ mg l}^{-1}$) mediante liposomas LUVdet.
4. Disolución 1: larvas tratadas con baja concentración de metionina ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$) mediante una disolución en suero fisiológico.
5. Disolución 2: larvas tratadas con alta concentración de metionina ($12,5 \text{ mg l}^{-1}$) mediante una disolución en suero fisiológico.

Para este experimento se emplearon larvas de dorada criadas en las instalaciones de Piscicultura Marina, S.L. (Burriana, España) con una edad inicial de 25 dpe. Tras mantenerlas en ayunas durante 24 h, se estabularon en número de 40 en cada uno de los 15 recipientes del dispositivo experimental (triplicados de los cinco tratamientos). Tras la aclimatación de las larvas en los recipientes (1 h), fueron alimentadas con la primera ración de nauplios de bajo valor nutritivo (Inve EG, Gante, Bélgica) recién eclosionados. La densidad de presas en cada recipiente fue estimada entre 4-5 nauplios ml^{-1} . El protocolo cíclico de administración de nauplios, inmersión en los diferentes tratamientos y renovación del medio, fue exactamente el mismo que los descritos en los experimentos Baño 1 y Baño 2 (Apartado 7.2.1 y 7.2.2, respectivamente). En la primera exposición, la concentración de metionina fue de $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ (LUVdet 1 y Disolución 1) y de $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ (LUVdet 2 y Disolución 2), mientras que la concentración de lípido fue de $12,5$ y $62,5 \text{ mg l}^{-1}$ en LUVdet 1 y LUVdet 2, respectivamente. Las concentraciones de metionina y lípido pudieron haber aumentado durante los siguientes días de ensayo por la acumulación de restos de metionina y liposomas en la parte del medio no renovado. Al final del experimento, se llevaron a cabo un total de tres inmersiones de 17 h en los diferentes tratamientos. Al igual que en los experimentos Baño 1 y Baño 2, las larvas no fueron alimentadas el día anterior al muestreo para permitir el vaciado total de sus tractos digestivos. Tras el conteo de los individuos vivos para la estimación de la supervivencia, las larvas se sacrificaron colocándolas en un baño con hielo. A

continuación, se enjuagaron con agua destilada para eliminar restos de metionina y sal, antes de ser congeladas a -20°C . A partir de las muestras liofilizadas se determinaron los contenidos de metionina según la metodología descrita en el Apartado 2.4.6.

7.3. Resultados

El perfil de ácidos grasos de las larvas de lubina del experimento Baño 1 se representa en la Figura 7.2. Aunque la mayoría de los ácidos grasos representados no registran diferencias significativas entre los distintos tratamientos, los niveles de EPA y DHA de las larvas tratadas con liposomas LUVdet y la emulsión lipídica comercial tienen niveles promedios superiores a los de las larvas del tratamiento control, indicando una tendencia a incorporar EFAs en aquellas larvas. Esta diferencia entre las larvas tratadas con productos ricos en EFAs (tratamientos LUVdet 2 y EC 1) y las larvas control se constata estadísticamente en el nivel total de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 a la que pertenecen el EPA y el DHA.

Los contenidos de ascorbato de las larvas de lubina del experimento Baño 2 no muestran diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 7.3). En todos los grupos experimentales, los niveles de ascorbato de las larvas se encontraron entorno a $4 \mu\text{g mg PS}^{-1}$. A pesar de la ausencia de diferencias, las larvas tratadas con liposomas cargados con ascorbato sódico registraron contenidos medios de ascorbato superiores a los de las larvas sometidas a inmersiones en ascorbato en disolución y a los de las larvas control.

Las Figuras 7.4, 7.5 y 7.6 ilustran los niveles de metionina libre en larvas de lubina (7.4) y dorada (7.5 y 7.6) sometidas a inmersiones en liposomas con metionina (Baño 3, 4 y 5, respectivamente). En el experimento con larvas lecitotróficas (Figura 7.5) se obtuvieron niveles de metionina libre elevados en larvas expuestas a metionina disuelta en el agua de mar. En los dos tratamientos con liposomas, la metionina medida no difiere de la hallada en las larvas control. Las larvas de los tratamientos de los experimentos (Baño 3 y Baño 5) no registraron contenidos de metionina libre diferentes entre sí en ninguno de los dos experimentos (Figuras 7.4 y 7.6). En ambos casos, el contenido de metionina libre medido en las larvas de los tratamientos control registró niveles promedios superiores a los tratamientos con metionina disuelta o liposomada. Sólo en el experimento con dorada (Baño 5), con un tiempo total de exposición superior al experimento con larvas de lubina (Baño 3) se obtuvieron niveles promedios de metionina libre

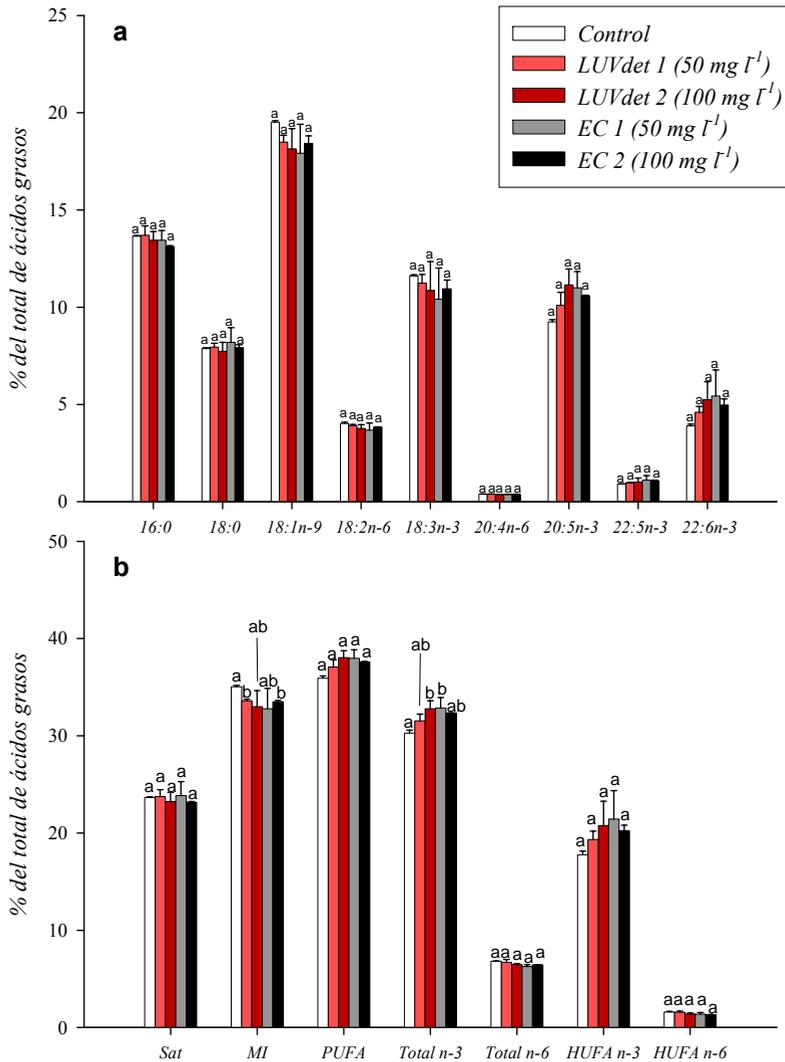


Figura 7.2. Selección de ácidos grasos (a) y grupos de ácidos grasos (b) de las larvas de lubina correspondientes al experimento Baño 1. Los valores expresan porcentajes del total de ácidos grasos y son medias de tres réplicas. Las barras de error son desviaciones típicas. Los tratamientos que comparten una misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

EC: emulsión comercial; LUVdet: liposomas de krill preparados por solubilización por detergente; Sat: ácidos grasos saturados; MI: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; Total n-3: ácidos grasos insaturados de la serie n-3; Total n-6: ácidos grasos insaturados de la serie n-3; HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos.

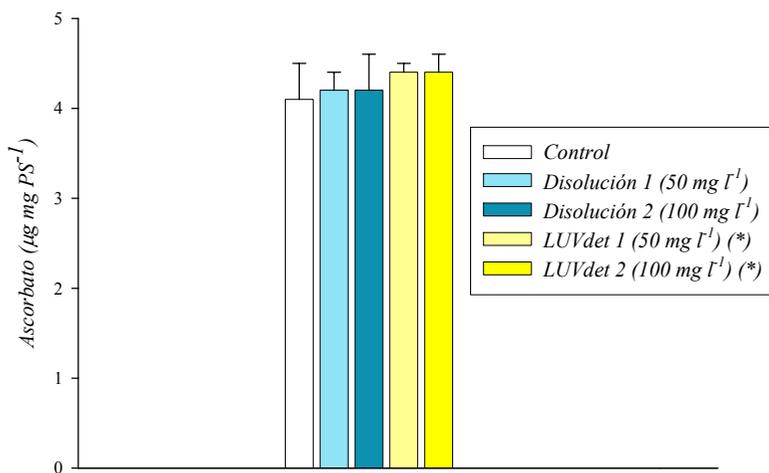


Figura 7.3. Contenido de ascorbato ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$) de las larvas de lubina correspondientes al experimento Baño 2. Las barras de error son desviaciones típicas (n=3). Los contenidos de ascorbato de los diferentes tratamientos no muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

(*) LUVdet preparados con SPC como único componente de membrana.

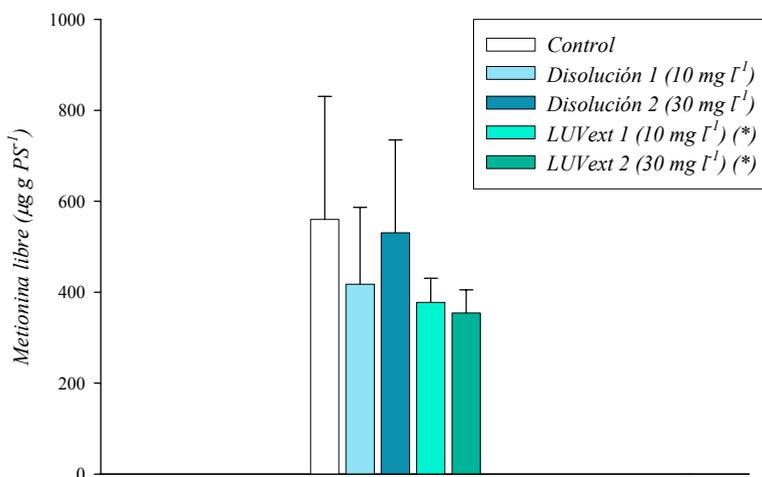


Figura 7.4. Contenido de metionina libre ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$) de las larvas de lubina correspondientes al experimento Baño 3. Las barras de error son desviaciones típicas (n=3). Los contenidos de metionina libre de los diferentes tratamientos no muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

(*) LUVext preparados con SPC y CHO como componentes de membrana.

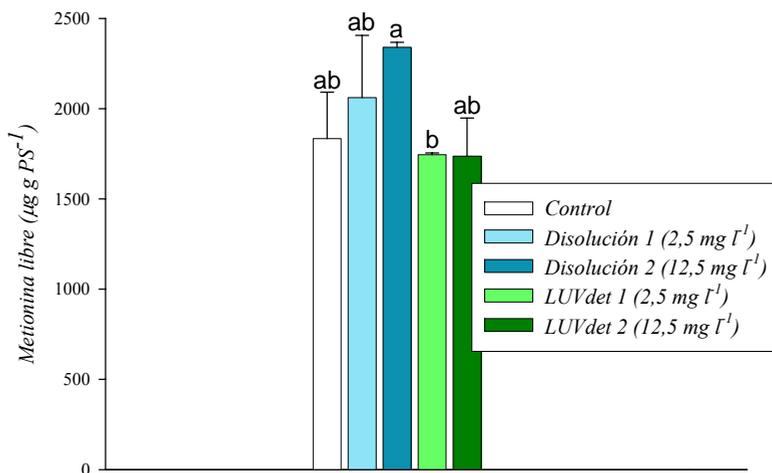


Figura 7.5. Contenido de metionina libre ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$) de las larvas lecitotróficas de dorada correspondientes al experimento Baño 4. Las barras de error son desviaciones típicas ($n=3$). Los tratamientos que comparten una misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

(*) LUVdet preparados con SPC como único componente de membrana.

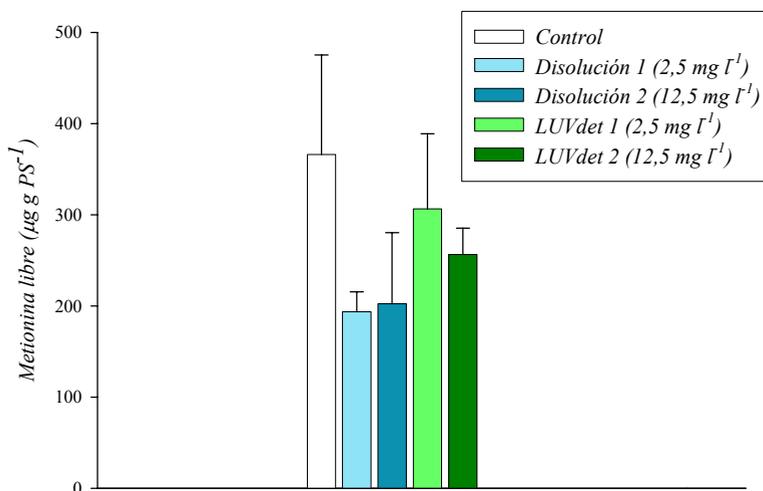


Figura 7.6. Contenido de metionina libre ($\mu\text{g mg PS}^{-1}$) de las larvas de dorada correspondientes al experimento Baño 5. Las barras de error son desviaciones típicas ($n=3$). Los contenidos de metionina libre de los diferentes tratamientos no muestran diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

(*) LUVdet preparados con SPC como único componente de membrana.

mayores en las larvas tratadas con liposomas en comparación a los tratamientos con metionina disuelta.

La supervivencia de las larvas estimada en los cinco experimentos no mostró diferencias significativas entre tratamientos, con valores promedios superiores al 80% en todos los casos.

7.4. Discusión

A pesar de las interesantes expectativas que los liposomas ofrecen para el suministro directo de nutrientes de diferente naturaleza a larvas de peces marinos, los resultados de este capítulo no evidencian tal versatilidad y sólo en algunos experimentos se aprecia una tendencia indicativa de incorporación de nutrientes liposomados. Este es el caso de Baño 1 y Baño 2, donde los contenidos de EFAs y de ascorbato, respectivamente, muestran contenidos promedio mayores en las larvas tratadas con liposomas en comparación a las larvas control. Sin embargo, en el resto de experimentos los análisis de los nutrientes vehiculados muestran niveles que no se diferencian de los tratamientos mediante disoluciones acuosas y los tratamientos control. Las razones de tales resultados pueden estar relacionadas con procesos de desestabilización de los liposomas durante el transcurso de los experimentos. Por un lado, los liposomas liberan sustancias disueltas desde la fase acuosa interna hacia el medio extravesicular, tal y como ha quedado demostrado con el estudio realizado en el Capítulo 3. Aunque las condiciones establecidas en los baños no fueron tan agresivas como en los experimentos de liberación del marcador fluorescente durante el enriquecimiento de presas vivas (menor agitación del medio, baja densidad de nauplios y menor temperatura), la liberación de sustancias hidrosolubles sigue siendo más que probable. Esta circunstancia limitaría la utilidad de los liposomas para suministrar nutrientes a las larvas de peces, debido a que el coste económico derivado de su utilización no aportaría ventajas adicionales en comparación con la administración de los nutrientes disueltos directamente en el medio. En segundo lugar, la presencia de microorganismos en el medio podría acelerar el deterioro de estas vesículas antes de ser ingeridas por las larvas. En este sentido, Fox y cols. (1990) utilizaron un medio de cultivo previamente tratado con antibióticos, para minimizar la proliferación de microorganismos durante las incubaciones. La ausencia de tratamientos antibióticos y el empobrecimiento de la calidad del medio de cultivo por acumulación progresiva de residuos en los experimentos de mayor duración (Baño 1, 2 y 5) podrían facilitar la proliferación de microorganismos. Por último, la susceptibilidad a la degradación de algunos nutrientes como

el ascorbato puede sumarse a la degradación provocada por los anteriores fenómenos.

En cualquier caso, todos estos procesos degenerativos planteados en el párrafo anterior y la ausencia de evidencias analíticas no deben, en ningún caso, descartar la eficacia de los liposomas para administrar nutrientes a las larvas sin su bioencapsulación en presas vivas (Capítulo 6). Como se ha comentado al inicio de este capítulo, entre los mecanismos que pueden tener una implicación importante en la entrada de nutrientes liposomados en las larvas se pueden distinguir dos tipos: aquéllos que dependen directamente de la larva (captura selectiva e ingestión de medio); y los procesos de interacción liposoma-célula detallados en la introducción a este capítulo. La importancia de cada uno de estos fenómenos y su eficacia se discuten a continuación.

En primer lugar, los estudios de Fox y cols. (1990) con larvas de arenque (*Clupea harengus*) y Koven y cols. (1999) con larvas de cherna de ley (*Epinephelus aeneus*) y dorada (*Sparus aurata*) demostraron, mediante técnicas radioactivas, la ingestión activa de liposomas por parte de las larvas sometidas a inmersiones en estas vesículas tras pocas horas de exposición. Concretamente, la captura selectiva de liposomas por las larvas fue propuesta por Koven y cols. (1999) aduciendo que la presencia de iones divalentes en el agua de mar facilita la agregación de liposomas originando partículas visibles para las larvas de tamaño entre 20 y 30 μm . Este argumento rebate el planteado por otros autores cuestionando el pequeño tamaño de los liposomas para su uso como dieta para larvas de peces, ya que éstas muestran preferencia por presas de mayor tamaño (Cahu y Zambonino Infante, 1994; Fernández-Díaz y cols., 1994; Reitan y cols., 1994; 1997). Sin embargo, esta formación de agregados de liposomas no parece representar un proceso importante con las preparaciones liposomales usadas en el presente estudio, tal y como se desprende de los experimentos realizados en el Capítulo 3 (Apartado 3.2.3), donde no se observan cambios relevantes del tamaño de los liposomas (entre 150 y 200 nm) cuando son incubados en agua de mar y en ausencia de nauplios de *Artemia*. La agregación de liposomas tiene lugar por establecimiento de fuerzas de van der Waals en las regiones planas de las vesículas. De esta forma, las vesículas pequeñas como las empleadas en estos experimentos (entre 150 y 200 nm) con mayor grado de curvatura, son menos susceptibles a formar agregados en comparación a vesículas de mayor diámetro como las empleadas por Koven y cols. (1999) con un tamaño de unos 600 nm (New, 1995; p. 17). Además del tamaño de las partículas, la intensidad de color de los liposomas puede influir en la percepción visual de los liposomas por

las larvas tal y como indican algunos estudios sobre la importancia del color de la dieta y el color del tanque y su iluminación para la visualización de las partículas de alimento por parte de la larva (Ostrowski, 1989; Roo y cols., 1999). En general, puede decirse que los liposomas tienen un color poco aparente, especialmente aquellos formulados con fosfolípidos de soja con un color amarillento poco intenso. Por su parte, los liposomas de krill (Baño 1) tienen un color rojizo más vivo probablemente debido a la presencia de pigmentos presentes en el extracto de fosfolípidos de krill. Esta circunstancia, unida al hecho de utilizar recipientes de vidrio transparente (Figura 2.6), podría haber dificultado la visualización de los liposomas por parte de las larvas.

Además de su apariencia física, la ingestión de alimento por parte de larvas de peces marinos también está relacionada con procesos de estimulación química (Cahu y Zambonino Infante, 2001). Entre los compuestos con capacidad estimuladora de la ingestión destacan algunos aminoácidos (Cahu y Zambonino Infante, 1995; Kolkovski y cols., 1997b; Cahu y cols., 1998b; Lazo y cols., 2000; Koven y cols., 2001). En este sentido, Koven y cols. (1999) concluyeron que las larvas de dorada ingerían de forma preferencial liposomas cuya fase acuosa contenía extracto de bacalao rico en aminoácidos libres con respecto a la ingestión de liposomas con una solución salina en la fase acuosa. Entre los aminoácidos más abundantes en el extracto de bacalao se hallan la alanina, la glicina y la arginina, compuestos descritos como estimuladores químicos en larvas de dorada (Kolkovski y cols., 1997b). Sin embargo, la metionina, nutriente utilizado como modelo de aminoácido en el presente estudio, no ha sido descrito entre los compuestos atrayentes incluidos en las dietas para larvas de dorada y lubina y, por tanto, no contribuiría a aumentar la atracción de las larvas en los experimentos Baño 1, 2 y 3.

Los procesos osmorregulatorios, por su parte, constituyen otra vía de entrada de liposomas obligatoria en peces teleósteos marinos, ya que éstos requieren la ingestión activa de agua de mar circundante en procesos de osmorregulación. Su carácter hiposmótico en relación al medio externo hace que los peces teleósteos marinos deban compensar la pérdida pasiva de agua que tiene lugar a través de distintos tejidos corporales (Evans, 1993). Este mecanismo tiene lugar no sólo en larvas de peces marinos con un estado de desarrollo avanzado, sino también en las larvas lecitotróficas (Baño 4) durante el periodo en el que todavía se está absorbiendo el vitelo (Mangor-Jensen y Adolf, 1987; Tytler y Blaxter, 1988; Reitan y cols., 1994).

Junto a los mecanismos mencionados arriba que implican una participación activa de la larva (captura selectiva de liposomas e ingestión por osmorregulación), existe otro tipo de mecanismos a través de los cuales los liposomas pueden suministrar compuestos que forman parte de su composición. Éstos son los procesos de interacción liposoma-célula descritos en la introducción de este capítulo: transferencia intermembrana, “contacto-liberación”, adsorción, fusión y fagocitosis. Estos mecanismos, estudiados principalmente en medicina para la liberación de fármacos en determinados tejidos diana, pueden tener diverso grado de eficacia en el sistema constituido por el liposoma, el agua de mar y la larva. Por un lado, la adsorción de liposomas a la superficie de la membrana celular no implica una liberación importante de sustancia disuelta en el compartimento acuoso hasta que se produce la endocitosis de la vesícula. Además, este proceso es mucho más eficaz cuando tiene lugar a una temperatura inferior a la temperatura de transición de fase del fosfolípido (T_c) que forma el liposoma, ya que la adsorción parece tener lugar en las irregularidades de la membrana, que son más probables en liposomas en estado de gel (New, 1990, p. 223). Todos los experimentos realizados se llevaron a cabo a 20°C, y por tanto, por encima de la T_c de los fosfolípidos usados en estos experimentos (KPL y SPC)¹¹. Por otra parte, la fagocitosis debe descartarse ya que únicamente tiene lugar en células con actividad fagocítica (p. ej., macrófagos) y no en células epiteliales como las existentes en la superficie de contacto entre la larva y el medio circundante. En cambio, procesos como la transferencia intermembrana de componentes lipídicos puede tener su importancia en la liberación de fosfolípidos ricos en EFAs (Baño 1). Además, el mecanismo de “contacto-liberación” de un liposoma con la membrana de células epiteliales de la larva permitiría la transferencia de nutrientes disueltos en la fase acuosa del liposoma. Unido a esta transferencia de nutrientes disueltos, el proceso de fusión permite la inserción de los fosfolípidos del liposoma en la membrana de las células. A pesar de las posibilidades expuestas, la administración de nutrientes a través de estos mecanismos pudo estar limitada por la ausencia de componentes específicos que actúan como ligando y también por el elevado grado de turbulencia del medio (New, 1990, p. 222).

Todos los mecanismos descritos anteriormente hacen pensar en una incorporación efectiva de los nutrientes incluidos en los

¹¹ A pesar de carecer de datos concretos sobre las T_c de la SPC o el KPL, es fácil pensar que éstas se hallan en valores inferiores a las de fosfolípidos como la EPC, con que posee una T_c entre -1 y -15°C (New, 1990, p. 9).

liposomas que, sin embargo, no se ha evidenciado en términos analíticos ni de supervivencia de las larvas. De esta forma, la utilización de nutrientes marcados que permitieran su trazabilidad en los tejidos corporales de la larva (Fox y cols., 1990; Koven y cols., 1999) y la determinación de otros indicadores fisiológicos de condición (Ferron y Leggett, 1994; Fernández-Díaz y cols., 2006) ayudarían a esclarecer la importancia de cada uno de los mecanismos sugeridos y se tendría una valoración más amplia de la capacidad de estas vesículas para administrar nutrientes de distinta naturaleza de forma directa a las larvas. En este sentido, el uso de liposomas puede constituir la clave para solucionar los problemas de lavado de nutrientes hidrosolubles en las microdietas usadas en la alimentación de larvas de peces (Cahu y Zambonino Infante, 2001; Yúfera y cols., 2002; Langdon, 2003).

En resumen, los experimentos del presente capítulo demuestran la posibilidad de incubar larvas de peces marinos con liposomas formulados con nutrientes esenciales de naturaleza diversa. Sin embargo, los resultados obtenidos no han permitido demostrar claramente la ingestión y/o incorporación de estos nutrientes en las larvas, hecho que invita a la utilización de técnicas de marcaje de nutrientes y la determinación de índices de condición nutricional que constaten las ventajas nutritivas derivadas. A pesar de ello, la eficacia de los liposomas también puede haber estado limitada a causa de una serie de factores que pueden afectar la ingestión de estas vesículas lipídicas y que, sin embargo, podrían ser resueltos mediante modificaciones del diseño experimental tales como la duración de las exposiciones, el color del recipiente, la densidad de liposomas, la desinfección del medio de cultivo, etc. Con todo ello se podría optimizar la efectividad de estas vesículas lipídicas como herramientas útiles para la realización de estudios de nutrición en larvas de peces marinos. A través de la administración directa de liposomas, se obviarían las transformaciones metabólicas que las presas vivas llevan a cabo en procesos de bioencapsulación (Capítulos 4 y 5) y se podría avanzar en el conocimiento de los requerimientos nutricionales de las larvas de peces marinos.

CAPÍTULO 8

RESUMEN

Los liposomas constituyen una herramienta de gran versatilidad para la administración de nutrientes a larvas de peces marinos debido a su estructura y a las propiedades nutricionales de los componentes que los forman. Así pues, los liposomas pueden formularse con nutrientes hidrosolubles disueltos en su fase acuosa y liposolubles inmersos en el ambiente lipofílico entre las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos. El estudio aquí presentado valora el empleo de estas vesículas como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos a través de dos vías. La primera de estas posibilidades plantea la vehiculación de nutrientes a larvas de peces a través de la bioencapsulación de liposomas ricos en nutrientes esenciales en nauplios de *Artemia*, tal y como sucede con otros productos comerciales, entre los que destacan las emulsiones lipídicas empleadas como producto enriquecedor de referencia en este estudio. La segunda alternativa está relacionada con la administración directa a las larvas mediante inmersiones de éstas en suspensiones de liposomas ricos en nutrientes esenciales. Esta última estrategia permite un control de la composición de la dieta y obvia la transformación que las presas vivas llevan a cabo sobre los componentes de los liposomas cuando éstos son utilizados como enriquecedores.

Uso de liposomas como enriquecedores de *Artemia*

El enriquecimiento de presas vivas se realiza en condiciones agresivas que pueden limitar el rendimiento de los productos enriquecedores. Los liposomas no son una excepción y, a pesar de las prometedoras propiedades descritas, su empleo como enriquecedor requiere de estudios preliminares dirigidos a valorar su potencial real. De esta forma, el Capítulo 3 recoge el estudio de tres propiedades que caracterizan a los liposomas y, además, los distinguen de otros productos enriquecedores. Las propiedades escogidas fueron: capacidad de retención de sustancias hidrosolubles en la fase acuosa interna de la vesícula, susceptibilidad a la peroxidación lipídica y distribución de tamaños de las vesículas.

Los liposomas, a diferencia de las gotículas que forman los productos enriquecedores basados en emulsiones, poseen un espacio acuoso que permite la inclusión de compuestos hidrosolubles. Bajo condiciones experimentales que trataron de emular aquéllas propias de enriquecimientos de nauplios de *Artemia*, los liposomas liberaron parte de las sustancias disueltas en su fase acuosa interna. Esta tasa de liberación depende básicamente de la composición de la membrana. De esta forma, los liposomas formulados con fosfolípidos insaturados de cadena larga (extracto de fosfolípidos de krill) muestran una baja

capacidad de retención de sustancias hidrosolubles como consecuencia de la fluidez de la membrana (Alberts y cols., 1996). Esta fluidez en liposomas altamente insaturados, como los formulados con fosfolípidos de krill (KPL), se reduce mediante la inclusión de colesterol, registrándose una mejora en la retención de nutrientes disueltos en la fase acuosa interna. La utilización de otras fuentes fosfolípicas más puras como la lecitina de soja (SPC), la de huevo (EPC) y el fosfolípido sintético dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) permite formular liposomas con mejor capacidad para albergar moléculas hidrosolubles. Entre ellas, la preparación de liposomas unilamelares preparados por el método de solubilización por detergente (LUVdet) y formulada exclusivamente con fosfatidilcolina de soja representa una formulación *a priori* recomendable porque combina una capacidad para encapsular este tipo de sustancias y un bajo coste económico en comparación a otros fosfolípidos.

En cuanto a la formación de peróxidos, el proceso de enriquecimiento se realiza bajo condiciones que favorecen la peroxidación lipídica de los enriquecedores (McEvoy y cols., 1995). El estudio llevado a cabo en condiciones propias de enriquecimiento de *Artemia* indica que los liposomas compuestos por fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos largas y altamente insaturadas son más susceptibles a este proceso de degradación (Frankel, 1998). Sin embargo, la peroxidación experimentada en la emulsión comercial supera en dos órdenes de magnitud a la medida en los liposomas para el mismo tiempo de incubación. Esta circunstancia puede tener implicaciones graves en las larvas alimentadas con nauplios con alto contenido en peróxidos debido a la toxicidad mostrada por este tipo de compuestos (Hiphkiss y cols., 1997; Tesoriere y cols., 2002; Del Rio y cols., 2005).

Por último, el tamaño de partícula es una característica de gran importancia en un enriquecedor de presas vivas, ya que determina la eficacia con que éstas incorporan el producto (Gelabert-Fernández, 2001; Han y cols., 2005). En condiciones de enriquecimiento, los liposomas unilamelares no ven alterado su tamaño original cuando son incubados en ausencia de nauplios, mientras que la presencia de éstos conlleva la aparición de partículas de mayor tamaño en algunas formulaciones de liposomas unilamelares preparados por extrusión (LUVext). En cualquier caso, el aumento de tamaño de los liposomas no debe implicar una pérdida de sus capacidades enriquecedoras, siempre que no esté asociado con alguna inestabilidad que provoque la evacuación de las sustancias disueltas en la fase acuosa.

A la vista de los resultados hallados en el estudio preliminar del Capítulo 3, se utilizaron distintos tipos de liposomas para enriquecer nauplios de *Artemia* en nutrientes esenciales de diferente naturaleza (Capítulos 4 y 5). El Capítulo 4 centra la atención en la mejora del contenido de ácidos grasos esenciales (EFAs) de *Artemia* mediante la utilización de liposomas formulados con KPL rico en EFAs. Con este objetivo, se realizaron cinco experimentos de enriquecimiento conducentes a determinar el tipo de vesícula más eficiente y las condiciones óptimas de uso (tiempo de incubación, modo de aireación, densidad de nauplios, concentración de enriquecedor y modo de dosificación). El primer experimento evaluó la eficacia de tres tipos de liposomas (vesículas multilamelares, LUVext y LUVdet) formulados exclusivamente con KPL para incorporar EFAs a lo largo del tiempo. Los resultados indican que los liposomas LUVdet alcanzaron niveles de EFAs superiores a los otros dos tipos de liposomas (vesículas multilamelares y LUVext) y, además, igualaron el rendimiento mostrado por una emulsión comercial con mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. El resto de experimentos, dirigidos al establecimiento de un protocolo de enriquecimiento mediante el uso de liposomas, se centró en el empleo de este tipo de vesícula (LUVdet) empleada en incubaciones de 21 h como periodo óptimo.

El estudio sobre el efecto de la aireación aplicada en el enriquecimiento de *Artemia* evidencia el bajo rendimiento que los liposomas muestran en condiciones extremas de aireación, tanto en condiciones de mínimo aporte como cuando la turbulencia del medio es muy alta. En cuanto al tipo de sistema de difusión, el uso de sistemas con alta capacidad difusora (piedras porosas) mejora el enriquecimiento de nauplios con liposomas de krill, pero, a su vez, se asocia con mortandades masivas de nauplios. Este fenómeno se manifestó en diversos experimentos y parece estar motivado por el efecto tensoactivo de los liposomas que provoca, por un lado, la formación de espumas que retiran nauplios fuera del medio y, por otro, un efecto de “lavado” sobre los componentes fosfolipídicos de los tejidos de los animales. En cualquier caso, este efecto negativo del uso de liposomas puede minimizarse mediante el control de la aireación durante el enriquecimiento, tal y como pudo comprobarse en el resto de experimentos incluidos en el Capítulo 4. En ellos, además, se acaban definiendo los parámetros óptimos de enriquecimiento de *Artemia* con liposomas LUVdet de krill. Así pues, el protocolo de utilización resultante consiste en una incubación de unas 21 h, una aireación de 1,0 lpm aplicada mediante varillas huecas, una densidad naupliar de 300 ind ml⁻¹ y una concentración de material enriquecedor

de 0,50 g lípido l⁻¹ administrado en una única dosis al inicio de la incubación.

Como ya se ha comentado anteriormente, los liposomas poseen una estructura que permite la inclusión, junto a los fosfolípidos, de otros nutrientes esenciales como las vitaminas y los aminoácidos. Esta posibilidad está estudiada en el Capítulo 5, donde se incluyen enriquecimientos de *Artemia* en vitamina A, vitamina C y metionina. Los resultados revelan la capacidad de liposomas formulados con KPL para aumentar el contenido de retinol (vitamina A) de nauplios de *Artemia* a partir del palmitato de retinol incluido en el liposoma. Este resultado indica que el sistema enzimático del nauplio actúa sobre la forma esterificada hasta convertirla en retinol (Takeuchi y cols., 1998b). En cuanto a la vehiculación de nutrientes hidrosolubles, los experimentos realizados muestran que los liposomas unilamelares tienen una escasa eficacia enriquecedora tanto en el enriquecimiento en vitamina C como en el de metionina. En ambos casos, la turbulencia del medio de enriquecimiento podría limitar el rendimiento del proceso. No obstante, los liposomas multilamelares podrían estar más protegidos frente a este efecto y, así, conseguirían retener el nutriente disuelto en los compartimentos acuosos situados entre bicapas más cercanas al núcleo. Esto explicaría los niveles de metionina libre hallados en nauplios enriquecidos con este tipo de vesículas y que fueron superiores a los registrados en nauplios incubados con liposomas unilamelares o con metionina disuelta.

El estudio sobre la utilización de liposomas como enriquecedores de *Artemia* se completa con la realización de experimentos de alimentación larvaria. Estos ensayos demuestran la posibilidad de utilizar nauplios enriquecidos con liposomas como alimento de larvas de lubina y dorada sin que se observen diferencias en la supervivencia y el crecimiento obtenidos con respecto a tratamientos con un producto comercial de eficacia contrastada. Además, los resultados ponen de manifiesto la importancia de controlar los parámetros biológicos y físico-químicos implicados en los enriquecimientos de nauplios de *Artemia*, para la obtención de un rendimiento óptimo en términos de incorporación de nutrientes. Este control de parámetros puede reducir la variabilidad intrínseca del proceso de enriquecimiento de presas vivas y, en consecuencia, controlar la calidad de las dietas.

Uso de liposomas como sistema de suministro directo de nutrientes a larvas de peces marinos

Una forma alternativa para administrar nutrientes a larvas de peces mediante liposomas consiste en la inmersión de éstas en suspensiones de liposomas (Fox y cols., 1990; Koven y cols., 1999). Este planteamiento se estudia en los experimentos realizados en larvas de lubina y dorada en diferentes estadios de desarrollo (Capítulo 7). Los resultados evidencian la posibilidad de incubar larvas de peces marinos con liposomas formulados con nutrientes esenciales de naturaleza diversa sin detrimento de la supervivencia de los animales. Sin embargo, la utilidad de esta vía de administración de nutrientes no ha quedado demostrada a pesar de los numerosos mecanismos de interacción larva-liposoma implicados. Entre ellos destacan la entrada a través de la ingestión de medio efectuada para satisfacer necesidades osmorregulatorias, la ingestión activa por captura de liposomas por parte de las larvas y otros mecanismos relacionados con las propiedades de biocompatibilidad de los liposomas (transferencia intermembrana, fusión, “contacto-liberación”, etc.). La utilización de técnicas de marcaje de nutrientes, así como la determinación de índices de condición nutricional que constaten las ventajas nutricionales derivadas de la incorporación de los nutrientes liposomados, se vislumbran como líneas futuras de investigación que deben completar los estudios aquí presentados.

CONCLUSIONES

PRIMERA: Los liposomas liberan parte de las sustancias disueltas en su fase acuosa interna cuando son sometidos a condiciones de enriquecimiento de nauplios de *Artemia*. La tasa de liberación está determinada por la composición de la membrana de dichos liposomas.

SEGUNDA: La peroxidación lipídica que sufren los liposomas durante su incubación en condiciones de enriquecimiento de nauplios de *Artemia* es muy inferior a la de productos enriquecedores compuestos por lípidos neutros y depende del grado de insaturación y de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos.

TERCERA: La incubación de liposomas en agua de mar no implica un aumento en el tamaño de las vesículas y sólo se registra un incremento del tamaño de las partículas en suspensiones unilamelares insaturadas preparadas por extrusión cuando se incuban en presencia de nauplios de *Artemia*.

CUARTA: El método de preparación de liposomas compuestos únicamente por fosfolípidos ricos en ácidos grasos de cadena larga determina la eficacia enriquecedora y su dinámica de incorporación en nauplios de *Artemia*.

QUINTA: Los nauplios enriquecidos con liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente mostraron los mayores niveles de ácidos grasos esenciales entre los tratados con los distintos tipos de liposomas evaluados. Este máximo fue registrado tras un tiempo de incubación de 21 h.

SEXTA: Los nauplios enriquecidos con liposomas muestran porcentajes de lípidos polares más altos que los enriquecidos con emulsiones lipídicas ricas en lípidos neutros. Estas diferencias disminuyen cuanto mayor es la bioencapsulación de liposomas en los nauplios.

SÉPTIMA: El enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con liposomas es un proceso con una alta variabilidad asociada que puede reducirse bajo un control preciso de los parámetros implicados, especialmente de la aireación.

OCTAVA: El régimen de aireación aplicado en el enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con liposomas determina la eficacia del enriquecimiento en ácidos grasos esenciales, obteniéndose rendimientos más altos bajo flujos de aire bajos aplicados mediante sistemas de alta capacidad de difusión.

NOVENA: la mortalidad de nauplios es un fenómeno frecuente en enriquecimientos con liposomas que puede ser minimizado con unas condiciones de aireación favorables.

DÉCIMA: El protocolo óptimo de uso de liposomas como producto enriquecedor consistiría en una incubación de 21 h, una aireación de 1,0 lpm aplicada mediante varillas huecas, una densidad naupliar de 300 ind ml⁻¹ y una concentración de material enriquecedor de 0,50 g lípido l⁻¹ administrado en una única dosis al inicio de la incubación.

UNDÉCIMA: Los liposomas compuestos de fosfolípidos de krill y palmitato de retinol constituyen un tratamiento eficaz para aumentar el contenido de vitamina A en nauplios de *Artemia*.

DUODÉCIMA: Los liposomas unilamelares preparados por solubilización por detergente con ascorbato sódico disuelto en su fase acuosa no resultan un método eficaz para aumentar el contenido de vitamina C en los nauplios de *Artemia*.

DECIMOTERCERA: Los liposomas multilamelares formulados con fosfatidilcolina de soja y colesterol constituyen un tratamiento eficaz para enriquecer nauplios de *Artemia* en metionina.

DECIMOCUARTA: Es posible alimentar larvas de lubina y de dorada con nauplios enriquecidos con liposomas de formulación muy diversa sin que se observen diferencias en la supervivencia y el crecimiento obtenidos con un producto comercial de eficacia contrastada.

DECIMOQUINTA: El control de los parámetros biológicos y físico-químicos implicados en el enriquecimiento de nauplios de *Artemia* mejora la calidad nutricional de los nauplios y ésta, a su vez, se refleja en la composición de las larvas alimentadas con ellos.

DECIMOSEXTA: Los liposomas pueden ser usados para el suministro directo de nutrientes a larvas de peces marinos mediante inmersiones de éstas en suspensiones de liposomas sin detrimento en la supervivencia, aunque la eficacia de este tratamiento no ha quedado demostrada.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1996. *Biología Molecular de la Célula* (3ª edición). Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1387 pp.
- Amat, F., 1985. *Biología de Artemia*. Inf. Técn. Inv. Pesq. 126-127, 3-59.
- Backhurst, J.R., Harker, J.H., 1988. The settling rates of larval feeds. *Aquacult. Eng.* 77, 363-366.
- Balon, E.K., 1985. *Early Life Histories of Fishes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 280 pp.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, 13, 238-252.
- Barclay, W., Zeller, S., 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.
- Barr, Y., Terjesen, B.F., Helland, S., 2005. Intensive short-term enrichment. An efficient method for enhancing phospholipids and free amino acids in live feed. En: Hendry, C.I., van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloos, P. (Eds.), *Proc. 4th International Fish and Shellfish Larviculture Symposium*. European Aquaculture Society Special Publication, Oostende (Bélgica), 36, 15-18.
- Beare-Rogers, J., Diefferbacher, A., Holm, J.V., 2001. *Lexicon of lipid nutrition* (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* 73, 685-744.
- Bell, J.G., Farndale, B.M., Bruce, M.P., Navas, J.M., Carillo, M., 1997. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 149, 107-119.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estévez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R., 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211-220.
- Bell, J.G., Roy, W.J., Blanco, A.I., Robertson, D.A., Henderson, R.J., Prickett, R., 2005. Optimisation of diets for Atlantic cod

- (*Gadus morhua*) broodstock: effect of arachidonic acid on egg and larval quality. En: Henry, C.I., van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloos, P. (Eds.), Proc. 4th International Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society Special Publication, Oostende (Bélgica), 36, 24-29.
- Bernabé, G., 1991. Acuicultura (Vol. 1), Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 478 pp.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., González, M.M., 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* 179, 265-275.
- Blom, J.H., Dabrowski, K., 1995. Reproductive success of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol. Reprod.* 52, 1073-1080.
- Bookhout, C.G., Costlow, J.D., 1970. Nutritional effects of *Artemia* from different locations on larval development of crabs. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 20, 435-442.
- Bransden, M.P., Battaglione, S.C., Morread, D.T., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., 2005. Effect of dietary 22:6n-3 on growth, survival and tissue fatty acid profile of striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae fed enriched *Artemia*. *Aquaculture* 243, 331-344.
- Bruce, M., Oyen, F., Bell, G., Asturiano, J.F., Farndale, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Bromage, N., 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of *n*-3 and *n*-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture* 177, 85-97.
- Caers, M., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 2000. Incorporation of different fatty acids, supplied as emulsions or liposomes, in the polar and neutral lipids of *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* 186, 157-171.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213-222.

- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 431-437.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Escaffre, A.M., Bergot, P., Kaushik, S., 1998a. Preliminary results on sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 169, 1-7.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Péres, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1998b. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. *Aquaculture* 161, 479-489.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish. *Aquaculture* 200, 161-180.
- Camara, M.R., Rocha, R.M., 1987. *Artemia* culture in Brazil: an overview. En: Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (Eds.), Proc. 2nd International Symposium on The Brine Shrimp *Artemia*. Universa Press, Wetteren (Bélgica), 3, 195-199.
- Camara, M.R., 1994. Dietary phosphatidylcholine requirements of *Penaeus japonicus* Bate and *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea, Decapoda, Penaeidea). Tesis doctoral, Ghent University, Gante, Bélgica.
- Chang, Q., Liang, M.Q., Wang, J.L., Chen, S.Q., Zhang, X.M., Liu, X.D., 2006. Influence of larval co-feeding with live and inert diets on weaning the tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Aquacult. Nutr.* 12, 135-139.
- Christie, W.W., 1982. *Lipid Analyses* (2^a edición). Pergamon Press, Oxford, 207 pp.
- Cohen, R.G., Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J.C., 1999. Preliminary characterization of some Argentinean *Artemia* populations from La Pampa and Buenos Aires provinces. *Int. J. Salt Lake Res.* 8, 329-340.
- Combs, G.F., 1998. *The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition*

- and Health (2^a edición), Academic Press, San Diego, 618 pp.
- Cook, M.A., Rust, M.B., Masee, K., Majack, T., Peterson, M.E., 2003. Uptake of erythromycin by first-feeding sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), fed live or freeze-dried enriched adult *Artemia* or medicated pellets. J. Fish Dis. 26, 277-285.
- Corraze, G., 2001. Lipid nutrition. En: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (Eds.), Nutrition and Feeding of Fish and Crustacean. Praxis Publishing Ltd., Chichester, pp. 111-130.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgeloos, P., 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. Aquaculture 155, 149-164.
- Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1997. Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures. Freshwater Biol. 28, 501-512.
- Cowey, C.B., 1994. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. Aquaculture 124, 1-11.
- Cowey, C.B., 1995. Protein and amino acid requirements: a critique of methods. J. Appl. Ichthyol. 11, 199-204.
- Cuesta, A., Esteba, M.A., Meseguer, J. 2002. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. Fish Shellfish Immunol. 13, 97-109.
- Dabrowski, K., Hinterleitner, S., Sturmbauer, C., El-Fiky, N., Wieser, W., 1988. Do carp larvae require vitamin C? Aquaculture 72, 295-306.
- Dabrowski, K., 1990. Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). Aquaculture 84, 61-70.
- Dabrowski, K., 1991. Administration of gulonolactone does not evoke ascorbic acid synthesis in teleost fish. Fish. Physiol. Biochem. 9, 215-221.
- Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T., Watanabe, T., 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval

- flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 133, 135-146.
- Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T., Watanabe, T., Hosoya, K., 1997. Hypervitaminosis A during vertebral morphogenesis in larval Japanese flounder. *Fish. Sci.* 63, 466-473.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15, 316-328.
- Devresse, B., Léger, P., Sorgeloos, P., Murata, O., Nasu, T., Ikeda, S., Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Kjorsvik E., Olsen Y., 1994. Improved of flat fish pigmentation through the use of DHA-enriched rotifers and *Artemia*. *Aquaculture* 124, 287-288.
- Dhert, P., González-Félix, M.L., van Ryckeghem, K., Geurden, I., Thyssen, F., 1999. Cofeeding of phospholipids to turbot *Scophthalmus maximus* L. larvae as a tool to reduce live food consumption. *Aquacult. Nutr.* 55, 237-245.
- Doi, M., Ohno, A., Taki, Y., Singhagraiwan, T., Kohno, H., 1997a. Nauplii of the calanoid copepod, *Acartia sinjiensis* as an initial food organism for larval red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Suisan Zoshoku* 45, 31-40.
- Doi, M., Toledo, J.D., Golez, M.S.N., Santos, M.D.L., Ohno, A., 1997b. Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton. *Hydrobiologia* 358, 259-263.
- Estévez, A., Kanazawa, A., 1995. Effect of (n-3) PUFA and vitamin A *Artemia* enrichment on pigmentation success of turbot, *Scophthalmus maximus* (L). *Aquacult. Nutr.* 1, 159-168.
- Estévez, A., Kanazawa, A., 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.
- Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in

- arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 180, 321-343.
- Estévez, A., Kaneko, T., Seikai, T., Tagawa, M., Tanaka, M., 2001. ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachidonic acid-enriched live prey. *Aquaculture* 192, 309-319.
- Evans, D.H., 1993. Osmotic and ionic regulation. In: Evans, D.H. (Ed.), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Londres, pp. 315-341.
- FAO, 2004. *Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura (SOFIA)*. FAO Fisheries Department. 168 pp.
- Fernández-Díaz, C., Pascual, E., Yúfera, M., 1994. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar. Biol.* 118, 323-328.
- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 1997. Detecting growth in gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae fed microcapsules. *Aquaculture* 153, 93-102.
- Fernández-Díaz, C., Kopecka, J., Cañavate, J.P., Sarasquete, C., Sole, M., 2006. Variations on development and stress defences in *Solea senegalensis* larvae fed on live and microencapsulated diets. *Aquaculture* 251, 573-584.
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Vergara, J., 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 132, 325-337.
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Montero, D., 1997. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for Gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 148, 233-246.
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., González, M., Robaina, L., Valencia, A., 1998. Combined effect of dietary α -tocopherol and n-3 HUFA on egg quality of gilthead seabream broodstock *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161, 475-476.

- Ferron, A., Leggett, W.C., 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Adv. Mar. Biol.* 30, 217-303.
- Fewster, M.E., Burns, B.J., Mead, J.F., 1969. Quantitative densitometric thin layer chromatography of lipids using copper acetate reagent. *J. Chromatogr.* 43, 120-126.
- Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fox C.J., Gamble J.C., Sargent J.R., Tytler P., 1990. Liposome ingestion. A novel technique for studying fish larval nutrition, En: Barnes, M., Gibson, R.N. (Eds.), *Trophic Relationships in the Marine Environment. Proc. 24th Europ. Mar. Biol. Symp.* Aberdeen University Press, Aberdeen (Reino Unido), 578-587.
- Frankel, E.N., 1998. *Lipid Peroxidation.* The Oily Press Ltd., Dundee, 303 pp.
- Fraser, A.J., 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 46, 1868-1873.
- Fujita, S., Watanabe, T., Kitajima, C., 1980. Nutritional quality of *Artemia salina* from different locations, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for marine fish. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *Proc. International Symposium on The Brine Shrimp Artemia.* Universa Press, Wetteren (Bélgica), 277-290.
- Fukuzawa, K., Ikebata, W., Shibata, A., Sakanaka, T., Urano, S., 1993a. Location of α -tocopherol in phospholipid vesicles and its dynamics in inhibiting lipid peroxidation. En: Mino M., Nakamura H., Diplock A.T., Kayden H.J. (Eds.), *Vitamin E – Its Usefulness in Health and in Curing Diseases.* Japan Scientific Society Press, Tokio, Japón, pp. 31-40.
- Fukuzawa, K., Ikebata, W., Sohmi, K., 1993b. Location, antioxidant and recycling dynamics of α -tocopherol in liposome membranes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39, S9-S22.
- Furuita, H., Takeuchi, T., Toyota, M., Watanabe, T., 1996. EPA and

DHA requirements in early juvenile red sea bream using HUFA enriched *Artemia* nauplii. Fish. Sci. 62, 246-251.

- Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Suzuki, N., Takeuchi, T., 2003. Supplemental effect of vitamin A in diet on the reproductive performance and egg quality of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T & S). Aquacult. Res. 34, 461-467.
- Furr, H.C., McGrane, M.M., 2003. Retinol: physiology. En: Caballero, B., Trujo, L., Finglas, P. (Eds.), Encyclopaedia of Food Sciences and Nutrition (2^a edición), Academic Press, Londres, pp. 4957-4967.
- Fyhn, H.J., Finn, R.N., Helland, S., Rønnestad, I., Lømsland, E., 1993. Nutritional value of phyto- and zooplankton as live food for marine fish larvae. En: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jørgensen, L., Tvinnerheim, K. (Eds.), Fish Farming Technology. Balkema, Rotterdam, pp. 121-126.
- Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., Bergot, P., 2001. Ontogeny, development and digestive physiology of fish larvae. En: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (Eds.), Nutrition and Feeding of Fish and Crustacean. Praxis Publishing Ltd., Chichester, pp. 197-212.
- Gelabert-Fernández, R., 2001. *Artemia* bioencapsulation I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. J. Crust. Biol. 21, 435-442.
- Geurden, I., Charlon, N., Marison, D., Bergot, P., 1995a. Dietary phospholipids and body deformities in carp *Cyprinus carpio* L. larvae. En: Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. (Eds.), Proc. 2nd International Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society Special Publication, Oostende (Bélgica), 24, 162-165.
- Geurden, I., Radünz-Neto, J., Bergot, P., 1995b. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio*) larvae. Aquaculture 131, 303-314.
- Geurden, I., Bergot, P., Schwarz, L., Sorgeloos, P., 1998. Relationship between dietary phospholipid classes and neutral lipid absorption in newly-weaned turbot, *Scophthalmus maximus*.

Fish Physiol. Biochem. 19, 217-228.

- Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino-Infante, J.L., Quazaquel, P., Cahu, C.L., 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* development. *Lipids* 40, 609-618.
- Gouillou-Coustans, M.-F., Guillaume, J., 2001. Vitamin nutrition. En: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (Eds.), *Nutrition and Feeding of Fish and Crustacean*. Praxis Publishing Ltd., Chichester, pp. 145-167.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., 1991. *Lipid Biochemistry* (4^a edición). Chapman and Hall, Londres, 406 pp.
- Haga, Y., Suzuki, T., Kagechika, H., Takeuchi, T., 2003. A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 221, 381-392.
- Haga, Y., Takeuchi, T., Seikai, T., 2004. Changes of retinoid contents in larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and *Artemia* nauplii enriched with a large dose of all-trans retinoic acid. *Fish. Sci.* 70, 436-444.
- Hagiwara, A., Kotani, T., Snell, T.W., Assavaaree M., Hirayama, K., 1995. Morphology, reproduction, genetics and mating behavior of small, tropical marine rotifer *Brachionus* strains (Rotifera). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194, 25-37.
- Halver, J.E., 2002. The vitamins. En: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, pp. 61-141.
- Hamlin, H.J., Herbing, I.H., Kling, L.J., 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *J. Fish Biol.* 57, 716-732.
- Han, K., Geurden, I., Sorgeloos, P., 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183, 335-347.

- Han, K., Geurden, I., Sorgeloos, P., 2001. Fatty acid changes in enriched and subsequently starved *Artemia franciscana* nauplii enriched with different essential fatty acids. *Aquaculture* 199, 93-105.
- Han, K., Geurden, I., van der Meeren, P., Bai, S.C., Sorgeloos, P., 2005. Particle size distribution in two lipid emulsions used for the enrichment of *Artemia* nauplii as a function of their preparation method and storage time. *J. World Aquacult. Soc.* 36, 196-202.
- Hara, T.J., 2006. Feeding behaviour in some teleosts is triggered by single amino acids primarily through olfaction. *J. Fish Biol.* 68, 810-825.
- Harel, M., Ozkizilcik, S., Lund, E., Behrens, P., Place, A.R., 1999. Enhanced absorption of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) in *Artemia* nauplii using a dietary combination of DHA-rich phospholipids and DHA-sodium salt. *Comp. Biochem. Physiol.* 124B, 169-176.
- Harris, L.E., 1984. Effects of a broodfish diet fortified with canthaxanthin on female fecundity and egg color. *Aquaculture* 43, 179-183.
- He, Z.-H., Qin, J.-G., Wang, Y., Jiang, H., Wen, Z., 2001. Biology of *Moina mongolica* (Moinidae, Cladocera) and perspective as live food for marine fish larvae: review. *Hydrbiologia* 457, 25-37.
- Helland, S., Triantaphyllidis, G.V., Fyhn, H.J., Evjen, M.S., Lavens, P., Sorgeloos, P., 2000. Modulation of the free amino acid pool and protein content in populations of the brine shrimp *Artemia* spp. *Mar. Biol.* 137, 1005-1016.
- Helland, S., Terjesen, B., Berg, L., 2003. Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 215, 213-228.
- Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1992. Thin-layer chromatography. En: Hamilton, R.J., Hamilton S. (Eds.). IRL Press, Oxford, pp. 65-111.
- Henrique, M.M., Gouillou-Coustans, M.F., Gomes, E., 2002. Effect of

- dietary ascorbic acid supplementation and chronic hypoxia on sea bream growth and vitamin C status. *J. Fish Biol.* 60, 442-452.
- Hipkiss, A.R., Preston, J.E., Himswoth, D.T.M., Worthington, V.C., Abbot, N.J., 1997. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 238, 135-138.
- Hontoria, F., Crowe, J.H., Crowe, L.M., Amat, F., 1994. Potential use of liposomes in larviculture as a delivery system through *Artemia nauplii*. *Aquaculture* 127, 255-264.
- Hontoria, F., Navarro, J.C., Crowe, J.H., Crowe, L.M., Amat, F., 1997. Encapsulación de ácidos grasos poliinsaturados esenciales y vitaminas en liposomas para su uso como enriquecedores de nauplios de *Artemia*. *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena (España)*, p. 127.
- Hontoria, F., Albadalejo, M.A., Amat, F., Navarro J.C., 1998. Stability of liposomes as enrichment diets for live food. *Proc. 8th International Symposium on Nutrition and Feeding of Fish. Las Palmas de Gran Canaria (España)*, p. 208.
- Howell, B.R., 1979. Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture* 18, 215-225.
- Hunter, J., 1981. Feeding ecology and predation. En: Lasker, R. (Ed.). *Marine Fish Larvae, Morphology, Ecology, and Relation to Fisheries*. Wash. Sea Grant Program, Univ. Wash. Press, Seattle, pp. 33-77.
- Hwang, D.F., Lin T-K., 2002. Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comp. Biochem. Physiol.* 131B, 1-7.
- Irie, T., Watarai, S., Iwasaki, T., Kodama, H., 2005. Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunisation with bacterial antigen entrapped liposomes. *Fish Shellfish Immun.* 18, 235-242.
- Ibeas, C., Cejas, J., Gómez, T., Jerez, S., Lorenzo, A., 1996. Influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile

- gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. *Aquaculture* 142, 221-235.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernández-Cruz, C.M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 97-107.
- Izquierdo, M.S., Tandler, A., Salhi, M., Kolkovski, S., 2001. Influence of dietary polar lipids' quantity and quality on ingestion and assimilation of labelled fatty acids by larval gilthead seabream. *Aquacult. Nutr.* 7, 153-160.
- Jumalon, N.A., Estenor, D.G., Ogburn, D.M., 1987. Commercial production of *Artemia* in the Philippines. En: Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (Eds.), *Proc. 2nd International Symposium on The Brine Shrimp Artemia.* Universa Press, Wetteren (Bélgica), 3, 231-238.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S., Iwashita, T., Nagao, A., 1981. Effects of phospholipids on growth, survival rate and incidence of malformation in the larval ayu. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 30, 301-309.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S., Matsubara, H., 1983. Effects of dietary phospholipids on growth of the larval red sea bream and knife jaw. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 32, 109-114.
- Kanazawa, A., Teshina, S.-I., Sakamoto, M., 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 50, 39-49.
- Kanazawa, A., 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture* 155, 129-134.
- Kashiwakura, M., Seto, A., Hasegawa, K., 1994. Heterotrophic microalgal production of docosahexaenoic acid and its use for aquaculture of marine juvenile fish. *Proc. 3rd Int. Marine Biotech. Conf. Tromso (Noruega)*, p. 61.
- Kim, J., Massee, K.C., Hardy, R.W., 1996. Adult *Artemia* as food for first feeding coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 144, 217-226.

- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., 1992a. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 69, 545-551.
- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., 1992b. Effects of phospholipids on lipid oxidation of a salmon oil model system. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 69, 237-242.
- Kitajima, C., Koda, T., 1976. Lethal effects of the rotifer cultured with baking yeast on the larval red seabream *Pagrus major*, and the increase rate using the rotifer recultured with *Chlorella* sp. *Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish.* 2, 113-116.
- Kitajima, C., Fujita, S., Oowa, F., Yone, Y., Watanabe, T., 1979. Improvement of dietary value for red seabream larvae of rotifers, *Brachionus plicatilis* cultured with bakers yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 45, 469-741.
- Kolkovski, S., Arieli, A., Tandler, A., 1997a. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Aquacult. Int.* 5, 527-536.
- Kolkovski, S., Koven, W., Tandler, A. 1997b. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 155, 193-205.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles. Implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181-201.
- Koop, D.R., Morgan, E.T., Tarr, G.E., Coon, M.J., 1982. Purification and characterization of a unique isoenzyme of cytochrome-P-450 from liver-Microsomes of ethanol-treated rabbits. *J. Biol. Chem.* 257, 8472-8480.
- Kotani, T., Hagiwara, A., Snell, T.W., 1997. Genetic variations among marine rotifer strains and function of mate recognition pheromone (MRP). *Hydrobiologia* 358, 105-112.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D., Friezlander, O., Harel, M., 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 91, 131-141.

- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D., 1992. The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* 104, 91-104.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D., 1993a. The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 357-364.
- Koven, W.M., Tandler, A., Sklan, D., Kissil, G.W., 1993b. The association of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the main phospholipids of different-age *Sparus aurata* larvae with growth. *Aquaculture* 116, 71-82.
- Koven, W., Barr, Y., Hadas, E., Ben-Atia, I., Chen Y., Weiss, R., Tandler A., 1999. The potential of liposomes as a nutrient supplement in first-feeding marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.* 55, 251-256.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194, 107-121.
- Koven, W.M., van Anholt, R., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Nixon, O., Ron, B., Tandler, A., 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture* 228, 307-320.
- Kvåle, A., Yúfera, M., Nygard, E., Aursland, K., Harboe, T., Hamre, K., 2006. Leaching properties of three different microparticulate diets and preference of the diets in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* 251, 402-415.
- Langdon, C., 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture* 227, 259-275.
- Langdon, C., Önal U., 2005. Complex microparticles for delivery of low-molecular-weight, water-soluble nutrients to marine fish larvae. En: Hendry, C.I., van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloos, P. (Eds.), Proc. 4th International Fish and Shellfish Symposium. European Aquaculture Society Special

Publication, Oostende (Bélgica), 36, 272-273.

- Lasch, J., Weissig, V., Brandl, M., 2003. Preparations of liposomes. En: Torchilin, V.P., Weissig, V. (Eds.), *Liposomes: a Practical Approach*. Oxford University Press, Nueva York, pp. 3-39.
- Lavens, P., Coutteau, P., Sorgeloos, P. 1995. Laboratory and field variation in HUFA enrichment of *Artemia* nauplii. En: Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. (Eds.), *Proc. 2th International Fish and Shellfish Larviculture Symposium*. European Aquaculture Society Special Publication, Gante (Bélgica), 24, 137-140.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181, 397-403.
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, C., Arnold, C.A., 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 188, 339-351.
- Lee, C.-S., 2003. Biotechnological advances in finfish hatchery production: a review. *Aquaculture* 227, 439-458.
- Lee, M.-H., Shiau, S.-Y., 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 119-129.
- Léger, P., Bieber, G.F., Sorgeloos, P., 1985a. International study on *Artemia* XXXIII. 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.
- Léger, P., Vanhaecke, P., Sorgeloos, P., Millamena, G., Simpson, K.L., 1985b. International study on *Artemia* XXV. Factors determining the nutritional effectiveness of *Artemia*: the relative impact of chlorinated hydrocarbons and essential fatty acids in San Francisco and San Pablo Bay *Artemia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 93, 71-82.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The

- use and nutritional value of *Artemia* as a food source. En: Barnes, E. (Ed.). Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. Aberdeen University Press, Aberdeen, pp. 521-623.
- Léger, P., Naessens-Foucquaert, E., Sorgeloos, P., 1987. Techniques to manipulate the fatty acid profile in *Artemia* nauplii, and the effect on its nutritional effectiveness for marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M.). En: Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (Eds.), Proc. 2nd International Symposium on The Brine Shrimp *Artemia*. Universa Press, Wetteren (Belgica), 3, 411-424.
- Liao, I.C., Su, J.M., Chang, E.Y., 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. Aquaculture 200, 1-31.
- Lubzens, E., 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. Hydrobiologia 147, 245-255.
- Mangor-Jensen, A., Adoff, G.R., 1987. Drinking activity of newly hatched larvae of cod (*Gadus morhua* L.). Fish Physiol. Biochem. 3, 99-103.
- Matsuoka, T., 1975. Culture of the giant prawn. Yosohoku 12, 48-52.
- Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J.G., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N., Rees, J., Papanikos, N., Porter, M., Bromage, N., 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture 227, 21-33.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. Aquaculture 134, 101-112.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Amat, F., Sargent, J.R., 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. Aquaculture 144, 339-352.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R., 1997. Application of soya phosphatidylcholine in tuna orbital oil enrichment emulsions for *Artemia*. Aquacult. Int. 5, 517-526.
- McEvoy, L.A., Naess, T., Bell, J.G., Lie, O., 1998. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic

- halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. *Aquaculture* 163, 237-250.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Dehasques, M., Nelis, H., De Leenheer, A., Sorgeloos, P., 1995a. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. *Aquaculture* 134, 325-337.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Pector, R., Mai Soni, A.F., Abbes, M., Nelis, H., Ollevier, F., De Leenheer, A., Sorgeloos, P., 1995b. Live food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus labrax* and *Clarias gariepinus*. *J. Appl. Ichthyol.*, 11, 336-341.
- Merchie, G., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture* 155, 165-181.
- Moren, M., Gundersen, T.E., Hamre, K., 2005. Quantitative and qualitative analysis of retinoids in *Artemia* and copepods by HPLC and diode array detection. *Aquaculture* 246, 359-365.
- Moretti, A., Fernandez-Criado, M.P., Cittolin, G., Guidastrì, R., 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. FAO Corporate Document Repository (Vol. 1), 195 pp.
- Mourente, G., Rodríguez, A., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 112, 79-98.
- Naas, K.E., Nress, T., Harboe, T., 1992. Enhanced first-feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture* 105, 143-156.
- NACA/FAO, 2001. Informe de la Conferencia sobre la Acuicultura en el Tercer Milenio. Bangkok, Tailandia, 20-25 de febrero de 2000. FAO Informe de Pesca. No. 661. Roma, FAO. 105pp.
- Naegel, L.C.A., 1987. Production of *Artemia* in Costa Rica: a pilot project. En: Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Decler, W.,

- Jaspers, E. (Eds.), Proc. 2nd International Symposium on The Brine Shrimp *Artemia*. Universa Press, Wetteren (Bélgica), 3, 279-238.
- Narciso, L., Pousao-Ferreira, P., Passos, A., Luís, O., 1999. HUFA content and DHA/EPA improvements of *Artemia* sp. with commercial oils during different enrichment periods. *Aquacult. Res.* 30, 21-24.
- National Research Council (NRC), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academic Press, Washington D.C., 114 pp.
- Navarro, J.C., Ireland, J., Tytler, P., 1993. Effect of temperature on permeability and drinking rates of the metanauplii of the brine shrimp *Artemia* sp. *Mar. Biol.* 116, 247-250.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V., Amat, F., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174, 155-166.
- Nelis, H. J. C. F., Lavens, P., Van Steenberge, M. M. Z., Sorgeloos, P., Criel, G. R., De Leenheer, A. P., 1988. Qualitative and quantitative changes in the carotenoids during development of the brine shrimp *Artemia*. *J. Lipid Res.* 29, 491-499.
- New, R.R.C., 1990. *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford University Press, Nueva York, 301 pp.
- New, R.R.C., 1995. Influence of liposome characteristics on their properties and fate. En: Philippot, J.R., Schuber, F. (Eds.), *Liposomes as Tools in Basic Research and Industry*. CRC Press, Boca Raton, pp. 3-20.
- Nimura, Y., 1980. Retarded growth of *Artemia salina* by overfeeding. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46, 681-687.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Olsen, A.I., Attramadal, Y., Jensen, A., Olsen, Y., 1999. Influence of size and nutritional value of *Artemia franciscana* on growth and quality of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) during the live feed period. *Aquaculture* 179, 475-487.

- Olsen, R.E., Henderson, R.J., 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 129, 189-197.
- Olsen, S., Figueroa, E., 1989. An integrated strategy to promote a sustainable shrimp mariculture industry in Ecuador: findings and recommendations. En: Olsen, S., Arriaga, L. (Eds.), *A Sustainable Mariculture Industry for Ecuador*. International Coastal Resources Management Project. Tech. Rep. Series TR-E-6. pp. 3-8.
- Ostrowski, A.C., 1989. Effect of rearing tank background color on early survival of dolphin larvae. *Prog. Fish-Cult.* 51, 161-163.
- Ozkizilcik, S., Chu F.-L.-E., 1994. Uptake and metabolism of liposomes by *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 128, 131-141.
- Person Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thebaud, L., Mugnier, C., 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live preys? *J. World Aquacult. Soc.* 24, 211-224.
- Pickova, J., Dutta, P.C., Larsson, P.-O., Kiessling A., 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty composition: comparison between two cod (*Gadus morhua*) stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 2410-2416.
- Provenzano, A.J., Goy, J.W., 1976. Evaluation of a sulphate lake strain of *Artemia* as food for larvae of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Aquaculture* 9, 343-350.
- Radünz-Neto, J., Corraze, G., Charlon, N., Bergot, P., 1994. Lipid supplementation of casein-based purified diets for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 128, 153-161.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Jørgensen, L., Olsen, Y., 1994a. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comp. Biochem. Physiol.* 107A, 699-710.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1994b. Effect of short- and long-term lipid enrichment on total lipids, lipid class and fatty acid composition in rotifers. *Aquacult. Int.* 2, 19-32.
- Reeve, M.R., 1963. Growth efficiency in *Artemia* under laboratory

- conditions. Biol. Bull. 125, 133-145.
- Reeve, M.R., 1969. The laboratory culture of the prawn *Palaemon serratus*. Fish. Invest., 26, 1-38.
- Reitan, K.I., Bolla S., Olsen, Y., 1994. A study of the mechanism of algal uptake in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). J. Fish Biol. 44, 303-310.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Oie, G., Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. Aquaculture 155, 207-221.
- Robin, J.H., Regost, C., Arzel, J., Kaushik, S.J., 2003. Fatty acid profile of fish following a change in dietary fatty acid source: model of fatty acid composition with a dilution hypothesis. Aquaculture 225, 283-293.
- Rodgers, C.J., 1990. Immersion vaccination for control of fish furunculosis. Dis. Aquat. Organ. 8, 69-72.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Izquierdo, M.S., Cejas, J.R., Bolaños, A., Lorenzo, A., 1996. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period. Aquaculture 147, 93-105.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Díaz, M., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Lorenzo, A., 1997. Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. Aquaculture 150, 77-89.
- Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Badía, P., Samper, M., Lorenzo, A., 1998a. Influence of n-3 highly unsaturated fatty acid deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. Fish Physiol. Biochem. 18, 177-187.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badía, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Lorenzo-Hernández, A., 1998b. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriated DHA/EPA ratio in the diet. Aquaculture 169, 9-23.
- Roo, F.J., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Hernández-

- Cruz, C.M., Fernández, A., Fernández-Palacios, H., 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract of larval feeding habits. *Aquaculture* 179, 499-511.
- Rønnestad, I., 1992. Utilization of free amino acids in marine fish eggs and larvae. Tesis Doctoral. University of Bergen, Bergen, Noruega.
- Rønnestad I., Helland S., Lie O., 1998a. Feeding *Artemia* to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. *Aquaculture* 165, 159-164.
- Rønnestad, I., Hemre, G.I., Finn, R.N., Lie, Ø., 1998b Alternate sources and its incorporation into the eyes endotrophic during the early endotrophic larval stages of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 787-793.
- Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177, 201-216.
- Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas-García, C.R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceição, L.E.C., 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. *Aquaculture* 227, 147-164.
- Saele, Ø., Solbakken, J.S., Watanabe, K., Hamre, K., Pittman, K., 2003. The effect of diet on ossification and eye migration in Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 220, 683-696.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., González, M., Fernández-Palacios, H., 1994. Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 124, 275-282.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., Socorro, J., Fernández-Palacios, H., 1997. The improved incorporation of polyunsaturated fatty acids and changes in liver structure in

- larval gilthead seabream fed on microdiets. *J. Fish Biol.* 51, 869-879.
- Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., 1999. Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179, 253-263.
- Sandnes, K., 1991. Vitamin C in fish nutrition. A review. *Fisk. Dir. Skr., Ser. Ernæring*, 4, 3-32.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. En: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, pp. 181-257.
- Schauer, P.S., Johns, D.M., Olney, C.E., Simpson, K.L., 1980. Lipid level, energy content and fatty acid composition of the cysts and newly hatched nauplii from five geographical strains of *Artemia*. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *Proc. International Symposium on The Brine Shrimp Artemia*. Universa Press, Wetteren (Bélgica), 1, 365-374.
- Schrehardt, A., 1987. A scanning electron-microscope study of the post-embryonic development of *Artemia*. En: Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (Eds.), *Proc. 2nd International Symposium on The Brine Shrimp Artemia*. Universa Press, Wetteren (Bélgica), 1, 5-32.
- Schüep, W., Marmet, J., Studer, W., 1989. Stability of ascorbate-2-sulfate in trout feed measured by HPLC. *Aquaculture* 79, 249-258.
- Scott, A.P., Middleton, C., 1979. Unicellular algae as a food for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae - the importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture* 18, 227-240.
- Seikai, T., Matsumoto, J., Shimozaki, M., Oikawa, A., Akiyama, T. 1987

An association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color formation with pigment anomalies developed under hatchery conditions in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Pigment Cell Res.* 1, 143-151.

Shelbourne, J.E., 1968. The culture of marine fish larvae with special references to the plaice *Pleuronectes platessa* and the sole *Solea solea*. Tesis Doctoral. London University, Londres, Reino Unido.

Shiau, S.-Y., Hsu, T.-S., 1994. Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon*, as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate. *Aquaculture* 122, 347-357.

Shields, R.J., Bell, J.G., Luizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R., Sargent, J.R., 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *J. Nutr.* 129, 1186-1194.

Shields, R.J., 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture* 200, 55-88.

Skalli, A., Robin, J.H., 2004. Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture* 240, 399-415.

Smith, G.G., Ritar, A.J., Brown, M.R., 2004. Uptake and metabolism of a particulate form of ascorbic acid by *Artemia* nauplii and juveniles. *Aquacult. Nutr.* 10, 1-8.

Sokal R.R., Rohlf, F.J., 1981. *Biometry*, Freeman, Nueva York, 859 pp.

Song, J-H., Inoue, Y., Miyazawa, T., 1997. Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids, triacylglycerols, and ethyl esters. *Biosci., Biotechnol. Biochem.* 61, 2085-2088.

Sorgeloos, P., 1980. The use of the brine shrimp in aquaculture. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.),

- Proc. International Symposium on The Brine Shrimp *Artemia*. Universal Press, Wetteren (Bélgica), 3, 25-46.
- Sorgeloos, P., Dhert P., Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200, 147-159.
- Southgate, P.C., Lou D.C., 1995. Improving the n-3 HUFA composition of *Artemia* using microcapsules containing marine oils. *Aquaculture* 134, 91-99.
- Støttrup, J.G., Norsker, N.H., 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155, 231-247.
- Støttrup, J.G., 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquacult. Res.* 31, 703-711.
- Szlaminska, M., Escaffre, A.M., Bergot, P., 1993. Preliminary data on semisynthetic diets for goldfish (*Carassius auratus* L.) larvae. En: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz (Francia), Ed. INRA, Paris 61, 607-612.
- Tackaert, W., Camara, M.R., Sorgeloos, P., 1991. The effect of dietary phosphatdylcholine in postlarval penaeid shrimp. I. Diet preparation. European Aquaculture Society Special Publication, Gante (Bélgica), 15, 76-79.
- Takeuchi, T., Ohkuma, N., Ishida, S., Ishizuka, W., Tomita, M., Hayasawa, H., Miyakawa, H., 1998a. Development of micro-particle diet for marine fish larvae. Proc. 8th International Symposium on Nutrition and Feeding of Fish, Las Palmas de Gran Canaria (España), p. 193.
- Takeuchi, T., Dedi, J., Haga, Y., Watanabe, T., 1998b. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 169, 155-165.
- Tandler, A., Harel, M., Koven, W.M., Kolkovski, S. 1995. Broodstock and larvae nutrition in gilthead seabream *Sparus aurata*: new findings on its mode of involvement in improving growth, survival and swimbladder inflation. *Isr. J. Aquacult.* – *Bamidgeh* 47, 95-111.
- Tarnchalanukit, W., Wongrat, L., 1987. *Artemia* culture in Thailand. En:

- Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (Eds.), Proc. 2nd International Symposium on The Brine Shrimp *Artemia*. Universa Press, Wetteren (Bélgica), 3, 201-213.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Koshio, S., 1993. Recent developments in nutrition and microparticulate diets of larval prawn. *Isr. J. Aquacult. - Bamidgeh* 45, 175-184.
- Tesoriere, L., D'Arpa, D., Butera, D., Pintaudi, A.M., Allegra, M., Livrea, M.A., 2002. Exposure to malondialdehyde induces an early redox unbalance preceding membrane toxicity in human erythrocytes. *Free Radic. Res.* 36, 89-97.
- Thrush, M., Navas, J.M., Ramos, J., Bromage, N.R., Carillo, C., Zanuy, S., 1993. The effect of artificial diets on lipid class and total fatty acid composition of cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs. En: *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura, Villagarcia de Arousa (España)*, 37-42.
- Tlustý, M.F., Goldstein, J.S., Fiore, D.R., 2005. Hatchery performance of early benthic juvenile American lobsters (*Homarus americanus*) fed enriched frozen adult *Artemia* diets. *Aquacult. Nutr.* 11, 191-198.
- Toledo, J.D., Golez, S.N., Doi, M., Ohno, A., 1997. Food selection of early grouper, *Epinephelus coioides*, larvae reared by the semi-intensive method. *Suisan Zoshoku* 45, 327-337.
- Tonheim, S.K., Koven, W., Rønnestad, I., 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture* 190, 223-235.
- Touraki, M., Rigas, P., Kastritsis, C., 1995. Liposome mediated delivery of water soluble antibiotics to the larvae of aquatic animals. *Aquaculture* 136, 1-10.
- Tytler, P., Blaxter, J.H.S., 1988. Drinking in yolk-sac stage larvae of the halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Biol.* 32, 493-494.
- Urano, S., Iida, M., Otani, I., Matsuo, M., 1987. Membrane stabilization of vitamin E; interactions of α -tocopherol with phospholipids in bilayer liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 146, 1413-1418.

- Van der Meeren, T., 2001. Biochemical composition of copepods: seasonal variation in lagoon-reared zooplankton. En: Hendry, C.I., van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloos, P. (Eds.), Proc. 3th International Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Europ. Aquacult. Soc., Oostende (Bélgica), 30, 614-615.
- Van Stappen, G., 1996. Introduction, biology and ecology of *Artemia*. En: Lavens, P., Sorgeloos, P., (Eds.), Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper (361), Roma.
- Van Stappen, G., 2005. *Artemia* zoogeography and taxonomy: an up-to-date overview. *Artemia* Seminar, Septiembre 2005, Gante, Bélgica.
- Voet, D., Voet, J.G., 1992. Bioquímica. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1315 pp.
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C. Fujita, S., 1978. Nutritional quality of Brine Shrimp, *Artemia*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44, 1115-1121.
- Watanabe, T., 1979. Nutritional quality of living feeds used in seed production of fish. En: G. Yamamoto (Ed.), Proc. 7th Japan-Soviet Joint Symposium on Aquaculture. Tokai University, Tokio (Japón), 49-57.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture 34, 115-143.
- Watanabe, T., Vassallo-Agius, R., 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. Aquaculture 227, 35-61.
- Weinstein, J.N., Ralston, E., Leserman, L.D., Klausner, R.D., Dragsten, P., Henkart, P., Blumenthal, R., 1984. Self-quenching of carboxyfluorescein fluorescence: uses in studying liposome stability and liposome-cell interaction En: Gregoriadis, G. (Ed.), Liposome Technology. CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 183-204.
- 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.

- Wille, M., van der Meeren, P., Sorgeloos, P., 2005. Influence of emulsion preparation method on enrichment of *Artemia* nauplii. En: Hendry, C.I., van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloos, P. (Eds.), Proc. 4th International Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society Special Publication, Oostende (Bélgica), 36, 560-563.
- Woollard, D.C., Indyk, H.E., 2003. Retinol: properties and determination. En: Caballero, B., Trujo, L., Finglas, P. (Eds.), Encyclopaedia of Food Sciences and Nutrition (2^a edición), Academic Press, Londres, pp. 4952-4957.
- Yoshitomi, B., 2004. Depletion of ascorbic acid derivatives in fish feed by the production process. Fish. Sci. 70, 1153-1156.
- Yúfera, M., Fernández Díaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M.C., Moyano, F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J., García Gallego, M., Parra, G., 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. Aquacult. Nutr. 6, 143-152.
- Yúfera, M., Kolkovski, S., Fernández Díaz, C., Dabrowski, K., 2002. Free amino acid leaching from a protein-walled microencapsulated diet for fish larvae. Aquaculture 214, 273-287.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. J. Nutr. 127, 608-614.

ANEXO



Enrichment of *Artemia* nauplii in PUFA, phospholipids, and water-soluble nutrients using liposomes

ÓSCAR MONROIG¹, JUAN CARLOS NAVARRO¹, ISABEL AMAT², PEDRO GONZÁLEZ², FRANCISCO AMAT¹ and FRANCISCO HONTORIA^{1*}

¹*Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Torre de la Sal, Castellón, Spain;*

²*Transtech, S.L. Jules Verne, 19, 08006 Barcelona, Spain; *Author for correspondence (e-mail: hontoria@iats.csic.es)*

Abstract. Different liposome formulations, including several combinations of membrane composition, type of vesicle (multilamellar and large unilamellar vesicles), preparation method, and vehiculated nutrient, have been assayed as bioencapsulation products to enrich *Artemia* nauplii with nutrients for feeding fish larvae. The stability of the liposome preparations under conditions of use as enrichment product has been tested using water soluble fluorescent markers as leakage indicators. The content of the fatty acids and lipid classes bioencapsulated in *Artemia* nauplii with liposomes has been analyzed by gas and thin layer chromatography, respectively, and compared with other enrichment products. The effect of the liposome enriched *Artemia* nauplii used as food for fish larvae has been evaluated in sea bass cultures. Liposomes with high content in polyunsaturated fatty acids leak out more than 50% of their aqueous phase in less than 2 hours, unless they are stabilized with cholesterol and formed as large unilamellar vesicles. Such vesicles hold 70% of the encapsulated material for 8 hours. Liposome enriched nauplii in this study reflect the influence of the enrichment products, however, they are far from the commercial emulsion (Super Selco) in terms of docosahexaenoic acid content, except for the nauplii enriched with liposomes made of pure krill phospholipid extract by the method of detergent solubilization. The liposome enriched nauplii show a higher amount of polar lipids in contrast to the feed enriched with emulsions. The larvae fed liposome enriched nauplii have only a slightly lower docosahexaenoic acid content than those fed emulsion enriched nauplii. The results obtained confirm the suitable potential use of liposomes as food supplement in larviculture. Problems and advantages are discussed.

Key words: *Artemia* enrichment, *Artemia* nauplii, Liposomes, Phospholipids, Polyunsaturated fatty acids

Introduction

Artemia nauplii lack long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA), which are essential for the proper nutrition of marine fish larvae. Consequently,

this widely used prey item needs to be enriched. This supplementation is achieved by enriching the nauplii with lipid emulsions, microparticles, or microalgae with high PUFA content. Enrichment materials are passively filtered by *Artemia* nauplii and their digestive tract becomes loaded with any particle of suitable size present in the medium. Thus, nauplii become vehicles of the enrichment products. These aspects have been recently reviewed by Sorgeloos et al. (2001).

The use of liposomes as enrichment products provides different advantages and possibilities (Hontoria et al. 1994; Ozkizilcik and Chu 1994; Touraki et al. 1995; Tonheim et al. 2000). Liposomes are discrete particles with an appropriate size for the naupliar filtering abilities. It is possible to encapsulate water soluble substances in the aqueous phase between the lipid bilayers of these lipid vesicles, as well as hydrophobic molecules into the hydrocarbon chain moiety of the phospholipids. In addition, the polar lipids that form the liposomes can also be easily introduced into the trophic chains utilized in larviculture. These characteristics allow for the encapsulation in the lipid vesicles of different nutrients of special importance for the proper development of marine larvae and thus the bioencapsulation into live prey organisms. Some examples of such nutrients are soluble vitamins (Merchie et al. 1997) or phospholipids (Coutteau et al. 1997). The main problem encountered when highly unsaturated phospholipids are used, is the loss of stability in the walls of the vesicles, causing the aqueous phase to leak, and any substance dissolved in it to be lost to the external medium.

Previous studies have shown that it is possible to encapsulate considerable amounts of PUFA into liposomes (McEvoy et al. 1996). However, other previous experiments concluded that the leakage found in highly unsaturated liposomes is more evident during the enrichment, since the process is particularly aggressive (high temperature and strong aeration). These studies had also ruled out the unsaturated chain autoxidation as the source of the instability (Hontoria et al. 1998).

We present the results of leakage tests (during enrichment) on different types of liposomes, varying in composition, lamellarity, and type. New data on PUFA bioencapsulation in *Artemia* nauplii using liposomes and their effect on sea bass larvae are also presented.

Materials and methods

Three different phospholipid sources were used in the preparation of liposomes: dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), krill phospholipid extract (KPC), and soybean lecithin (SBL) all from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, Alabama USA). Eicosapentaenoic (20:5n-3, 32% of total fatty

acids) and docosahexaenoic (22:6n-3, 20%) acids are the main fatty acids of krill phospholipid. It also contains 24% palmitic acid (16:0). On the other hand, the soybean lecithin major fatty acid is linoleic (18:2n-6, 59%) acid. Palmitic (16:0, 17%) and oleic (18:1, 13%) acids are other the important components of soybean phospholipid utilized. In some cases, certain amounts of cholesterol (CHO), purchased from Sigma-Aldrich Química S.A. (Alcobendas, Madrid, Spain) were included as a membrane stabilizer. Multilamellar vesicles (MLV) were prepared by the method proposed by Bangham et al. (1965), but using seawater as the aqueous phase. The lipid mixture was dried under nitrogen flux in a thin layer on the bottom of a flask and rehydrated with the aqueous phase for one hour by vortexing frequently until an homogenous suspension was achieved. Two different compositions were assayed: KPC:CHO (4:1 w/w) and DPPC:KPC:CHO (2:2:1 w/w). Two methods were used to form large unilamellar liposomes (LUV), following the techniques from New (1990). LUV was prepared by extrusion of the MLV through polycarbonate membranes (two preparations with the same composition as MLV) or by detergent solubilization (two more samples made of pure SBL and pure KPC). This last preparation method consisted of the solubilization of a mixture of lipid and sodium cholate (detergent) in ethanol. The mixture was dried in a rotary evaporator to form a thin film on the flask. Then the lipid film was exposed to the aqueous phase to form a population of micelles. The liposomes were formed through rapid detergent removal by dialysis. All these liposomes were subjected to stability tests; the previously mentioned aqueous phases contained a fluorescent marker which is described below. For the enrichment trials, two additional different mixtures of SBL and KPC (1:1, and 3:7) were utilized with the above mentioned method of detergent solubilization. Commercial Super Selco (SS) was assayed as emulsion control. The compositions utilized in each experiment are shown in the graphs.

The ability to maintain water soluble molecules encapsulated inside the liposomes (liposome stability) was estimated by means of the retention of carboxyfluorescein using the fluorescence methods described in Hontoria et al. (1994). Triplicate 100-ml tubes under enrichment conditions (28 °C, strong aeration and 300 *Artemia* nauplii per ml) were periodically sampled over 24 h, and the increase in fluorescence, proportional to the leakage from the liposomes, was measured in the incubation seawater after nauplii had been removed with a 60 μm plankton net.

Artemia nauplii were obtained from the hatching of cysts AF 480 Inve, NV (Belgium) lot number 02.0295.54. The nauplii enrichment was achieved after 24 h treatment in 500 ml of seawater at a temperature of 28 °C, strong

aeration, and a density up to 300 nauplii ml⁻¹. Final lipid concentration was 0.6 mg ml⁻¹ added in a single dose at the start of the incubation period.

Fifty sea bass larvae 52 days old in each of the 4 l triplicate vessels were fed the nauplii enriched with the different treatments over 17 days. At the end of this period, larvae were analyzed to determine their fatty acid content, survival and growth.

Lipids were extracted using the method of Folch et al. (1957). Lipid classes were analysed using high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) as described in Olsen and Henderson (1989), and fatty acid analyses of *Artemia* nauplii and sea bass larvae were carried out following the methods described in Navarro et al. (1992).

The mean content of the different fatty acids, both in the *Artemia* nauplii and the sea bass larvae, and the survival and growth (length and dry weight) of the larvae were analyzed through one way ANOVA and Tukey's HSD multiple comparison tests when appropriate. Lipid classes were compared by t-tests.

Results

Almost all the PUFA rich liposome preparations studied showed an important loss of the water soluble vehiculated materials under enrichment conditions (Figure 1). In a few hours, the water soluble fluorescent marker was completely lost. Multilamellar vesicles (MLV) showed less than 20% retention after only 4 hours. The unilamellar vesicles (LUV) made of pure krill phospholipid extract presented only a slightly better performance. However, the addition of cholesterol to the LUV resulted in a retention of carboxyfluorescein of 70% after 8 hours regardless of the amount of PUFA rich phospholipids (krill extract) present in it. In this case, after only 24 hours the fluorescent marker was completely lost. The reduction of PUFA-rich phospholipids did not decrease the leakage, unless PUFA phospholipids were totally absent (soybean lecithin liposomes). The preparation method did not interfere either. However, some unilamellar vesicles with cholesterol in their composition seemed to have a slightly better retention compared to the same liposomes without cholesterol. At least, 60% of the carboxyfluorescein was retained for 10 h.

Liposomes with a high PUFA content were able to modify *Artemia* nauplii lipid profiles. The unenriched nauplii from this strain typically showed a complete lack of DHA and a small amount of EPA at around 4% of the total fatty acids. All the preparations assayed were able to place some DHA into the nauplii, however, all of them, except the liposomes made of pure krill extract, provided only moderate amounts of DHA, normally below 3% of the

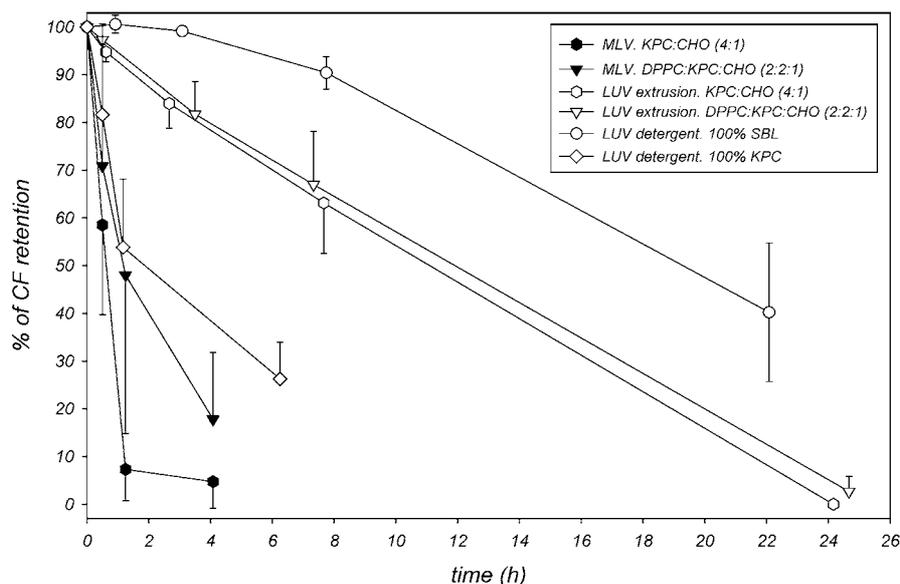


Figure 1. Stability in enrichment conditions of liposome preparations. Percentage of carboxy-fluorescein (CF) retention of different liposome preparations in enrichment conditions. See abbreviations in the text. Error bars are standard deviations.

total fatty acids. As shown in Figure 2, eicosapentaenoic (20:5n-3, EPA) and docosahexaenoic (22:6n-3, DHA) acid contents in nauplii enriched with pure KPC liposomes were similar to the amounts found in nauplii enriched with the control emulsion (SS). The presence of high levels of plant unsaturated fatty acids (18:2n-6 and 18:3n-3) in some of the enriched nauplii clearly revealed the use of soybean lecithin in these enrichment incubations.

The results of the lipid class analysis of nauplii enriched with liposomes compared to an emulsion are presented in Table 1. The amount of phospholipids was evidently higher in the liposome treated nauplii and the difference is statistically significant (t tests, $p \leq 0.05$) in the case of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA), and phosphatidylethanolamine (PE).

As shown in Figure 3, the fatty acid profiles of fish larvae reflect the composition of the *Artemia* nauplii used as food. The larvae fed nauplii enriched with liposomes have a slightly lower content of DHA than the larvae treated with emulsion fed nauplii. However, the survival and growth attained by the larvae from the three treatments did not show clear statistic differences. Larvae fed extruded LUV liposomes, those fed vesicles formed by detergent solubilization and the animals supplied with Super Selco enriched nauplii attained a mean length of 20.3 ± 2.6 , 18.8 ± 2.1 , and 19.6 ± 2.4 mm, respec-

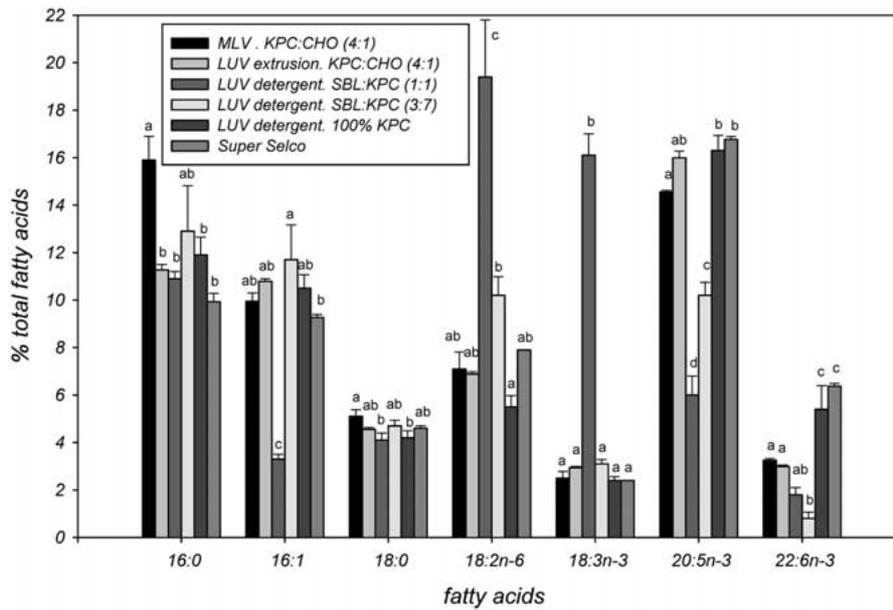


Figure 2. Fatty acid profile (% of total fatty acids) of nauplii enriched with different liposome preparations. See abbreviations in the text. Error bars are standard deviations. There are no statistical differences ($p \leq 0.05$) between means with the same letter.

tively by the end of the experiment. The final dry weight achieved was 10.6 ± 1.4 , 7.9 ± 1.1 , and 9.5 ± 1.4 mg and survival in each treatment was 82.7 ± 5.0 , 83.3 ± 6.1 , and 88.0 ± 8.7 percent, respectively.

Discussion

Results from the literature indicate an increase in the oxidation and the leakage in the membranes made of long chain polyunsaturated fatty acids (New 1990), and the results obtained in our experiments confirm the difficulties in maintaining the integrity of liposomes composed of a high amount of polyunsaturated fatty acids. Almost all the PUFA-rich liposomes studied leaked their aqueous content out into the external medium under enrichment conditions. These results show an important difference compared to the evidence found previously with liposomes stored at room temperature and under stable conditions (Hontoria et al. 1998). In this situation (room temperature and no agitation), the PUFA-rich liposomes retained the fluorescent markers for several days. This is an important issue to take into account, since the possibility of bioencapsulating water soluble molecules has been one of the main advantages proposed for the use of liposomes as an enrich-

Table 1. Lipid class analysis of *Artemia* nauplii enriched with unilamellar liposomes or emulsion. Data in percent of the total lipids are means of three replicates (standard deviation). Between row means with the same superscript there are no statistical differences ($p \leq 0.05$)

Lipid class	Liposome ¹	Emulsion ²
Lysophosphatidylcholine	0.23 (0.03) ^a	0.25 (0.06) ^a
Phosphatidylcholine	14.73 (0.55) ^a	9.67 (0.56) ^b
Phosphatidylserine	2.15 (0.21) ^a	1.34 (0.10) ^b
Phosphatidylinositol	3.28 (0.21) ^a	2.16 (0.06) ^b
Phosphatidic acid/cardiolipids	2.86 (0.29) ^a	1.79 (0.06) ^b
Phosphatidylethanolamine	10.63 (0.47) ^a	6.87 (0.27) ^b
Unknown	1.83 (0.40)	
Pigments/monoacylglycerides	0.87 (0.13) ^a	0.74 (0.34) ^a
Cholesterol	10.83 (1.12) ^a	8.09 (1.16) ^b
Free fatty acids	1.24 (0.51) ^a	2.71 (1.07) ^a
Triacylglycerides	46.43 (1.44) ^a	55.30 (2.04) ^b
Ethyl esters		6.37 (0.97)
Sterol esters	5.38 (0.37) ^a	3.70 (0.41) ^b

¹Unilamellar liposomes formed by detergent solubilization composed of soybean lecithin: krill extract phospholipids (1:1 w/w). ²Commercial emulsion Super Selco.

ment product for *Artemia* nauplii (Ozkizilcik and Chu 1994; Touraki et al. 1995). However, our results show that PUFA-rich liposomes, in the form of large unilamellar vesicles (LUV) stabilized with cholesterol, could hold hydrophilic substances encapsulated for long enough to enrich *Artemia* nauplii.

The integrity of highly unsaturated liposomes is longer in unilamellar vesicles, even in the case of similar formulations to those of the multilamellar vesicles that lose most of their content in less than two hours. This is probably due to the proximity between the different bilayers in MLV liposomes facilitating the interactions between different phospholipid molecules, which leads to a constant rearranging in the conformation of the bilayers with a loss in the aqueous content during the process. This situation can be avoided with LUV, since the bilayer in a point of the liposome has no opportunity to make contact with other parts of the vesicle.

The results obtained suggest two different strategies to enhance the performance of liposomes as an enrichment product. The use of unilamellar vesicles made of PUFA, starting the enrichment with half the dose necessary and the rest after 8–10 hours enrichment. This would ensure a minimum 60–70% integrity of the liposomes during a 20 hour period. This timing protocol is

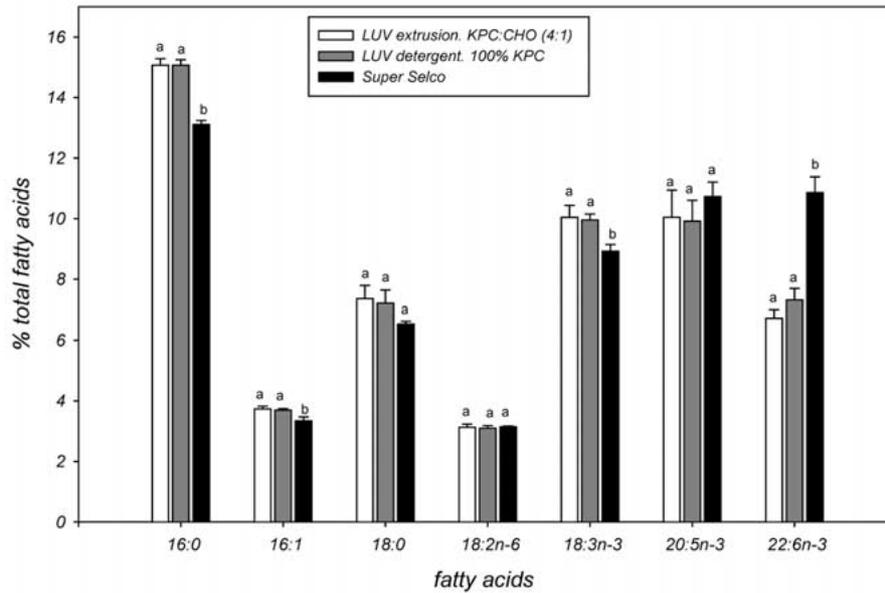


Figure 3. Fatty acid profile (% of total fatty acids) of sea bass larvae fed nauplii enriched with different liposomes and emulsions. See abbreviations in the text. Error bars are standard deviations. There are no statistical differences ($p \leq 0.05$) between means with the same letter.

presently suggested by most commercial suppliers for the correct emulsion enrichment. Another possibility is the utilization of a mixture of two types of liposomes: one made of highly stable (Hontoria et al. 1994) saturated or shorter chain unsaturated (i.e. soy bean lecithin, more stable than long chain) phospholipids, and loaded with water soluble nutrients, and another one made of PUFA-rich phospholipids, vehiculating large amount of lipophilic substances. The emulsions presently employed, if a phospholipid supplement is not necessary, could even replace this last component of the mixture.

It has been hypothesized (Rainuzzo et al. 1994; Coutteau et al. 1997) that the enrichment in polar lipids of the live prey used in larviculture fails due to the general conservative nature of phospholipid composition in these organisms that does not allow deviations from their original content. However, some changes in the polar lipid composition of live prey enriched with phospholipids instead of neutral lipids were noticeable in our data. *Artemia* nauplii enriched with liposomes showed a statistically significant increase of 25 to 30% in phosphatidylcholine, even though in absolute values this could appear as minor shifts (Table 1). This is also in agreement with other studies using PUFA-rich liposomes as enrichment products (McEvoy et al. 1996).

The DHA content in the nauplii enriched with unilamellar liposomes made of pure krill phospholipids is similar or slightly lower than other liter-

ature results of enrichment with commercial emulsions (McEvoy et al. 1996; Shields et al. 1999).

Although the fatty acid profile of the nauplii treated with liposomes was slightly poorer in PUFA than the emulsion fed preys, the survival and growth of sea bass larvae after 17 days of feeding enriched nauplii did not show significant differences. This may be due to the fact that the liposome enrichment fulfils the essential fatty acid requirements of sea bass or, perhaps, it illustrates the point raised by Sargent and co-workers about the balanced dietary fatty acid requirements in marine fish larvae. In several pieces of evidence, these authors stress the importance of the proper fatty acid balance instead of the absolute amount of dietary PUFA (Sargent et al. 1997; Sargent et al. 1999).

The fatty acid profiles of the sea bass larvae show a magnification of the differences found in the corresponding food (*Artemia* nauplii) profiles. This fact can be related to the different usage that the *Artemia* nauplii and the sea bass larvae make of the fatty acids from different lipid classes (Harel et al. 1999).

It has been stated in previous studies (Caers et al. 2000) that liposomes as a source of PUFA provide a lower nutritional level and that they do not fulfil the requirements of marine larvae, due to their small size. The results obtained here differ from this assertion, probably because of the bigger size of the liposomes used. Lipid vesicles formed with the proliposome technique described in Caers et al. (2000) are multilamellar and typically smaller than liposomes produced by other techniques (New 1990, p. 40). In addition, the superior performance of the unilamellar over multilamellar liposomes as enrichment product has been clearly established from our data. Consequently, the use of liposomes as enrichment product cannot be ruled out before more feeding experiments assaying unilamellar PUFA-rich liposomes of the proper size can be carried out. This will be necessary to ascertain the real performance of the polar lipid vesicles as carriers of essential fatty acids to enrich *Artemia* nauplii.

Liposomes seem an adequate vehicle to deliver different products to marine larvae through bioencapsulation in live prey, particularly the water soluble substances that cannot be delivered to larvae through the presently utilized emulsions. However, more efforts are necessary to devise better formulations that allow a single particle type that would be useful for both water-soluble and lipophilic molecules.

Conclusions

Pure PUFA liposomes leak out their aqueous content. However, when combined with cholesterol in the form of unilamellar vesicles, they are stable enough to enrich *Artemia* nauplii.

Certain liposome types give similar PUFA enrichment to commercial emulsions.

Liposomes are suitable enriching particles. They are containers made of nutrients that can be loaded with any substance.

Acknowledgements

This study has been funded by the CYTMAR Program of the Spanish Government R+D National Plan under the grant number MAR1998-0871-C02-01. Óscar Monroig has been supported by a fellowship of the Training and Specialization Program for Lines of Industrial Interest funded by CSIC and Archivel Technologies.

References

- Bangham A.D., Standish M.M. and Watkins J.C. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13: 238–252.
- Caers M., Coutteau P. and Sorgeloos P. 2000. Incorporation of different fatty acids, supplied as emulsions or liposomes, in the polar and neutral lipids of *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* 186: 157–171.
- Coutteau P., Geurden I., Camara M.R., Bergot P. and Sorgeloos P. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155: 149–164.
- Folch J., Lees N. and Sloane-Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509.
- Harel M., Ozkizilcik S., Lund E., Behrens P. and Place A.R. 1999. Enhanced absorption of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) in *Artemia* nauplii using a dietary combination of DHA-rich phospholipids and DHA-sodium salts. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 124: 169–176.
- Hontoria F., Crowe J.H., Crowe L.M. and Amat F. 1994. Potential use of liposomes in larviculture as a delivery system through *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 127: 255–264.
- Hontoria F., Albaladejo M.A., Amat F. and Navarro J.C. 1998. Stability of liposomes as enrichment diets for live food. VIII International Symposium on Nutrition and Feeding of Fish. Las Palmas de Gran Canaria (Spain).
- McEvoy L.A., Navarro J.C., Hontoria F., Amat F. and Sargent J.R. 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture* 144: 339–352.
- Merchie G., Lavens P. and Sorgeloos P. 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture* 155: 165–188.

- New R.R.C. (ed.) 1990. Liposomes. A Practical Approach. IRL Press: Oxford, pp. 301.
- Navarro J.C., Bell M.V., Amat F. and Sargent J.R. 1992. The fatty acid composition of phospholipids from brine shrimp, *Artemia sp.*, eyes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 103B: 89–91.
- Olsen R.E. and Henderson J.R. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 129: 189–197.
- Ozkizilcik S. and Chu F.-L. E. 1994. Uptake and metabolism of liposomes by *Artemia nauplii*. *Aquaculture* 128: 131–141.
- Rainuzzo J.R., Reitan K.I., Jørgensen L. and Olsen Y. 1994. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107A: 699–710.
- Sargent J.R., McEvoy L.A. and Bell J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155: 117–127.
- Sargent J.R., McEvoy L.A., Estévez A., Bell G., Bell M., Henderson J. and Tocher D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217–229.
- Shields R.J., Bell J.G., Luiz F.S., Gara B., Bromage N.R. and Sargent J.R. 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia nauplii* as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *Journal of Nutrition* 129: 1186–1194.
- Sorgeloos P., Dhert P. and Candreva P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia spp.*, in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200: 147–159.
- Tonheim S.K., Koven W. and Rønnestad I. 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture* 190: 223–235.
- Touraki M., Rigas P. and Kastritsis C. 1995. Liposome mediated delivery of water soluble antibiotics to the larvae of aquatic animals. *Aquaculture* 136: 1–10.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Aquaculture 251 (2006) 491–508

Aquaculture

www.elsevier.com/locate/aqua-online

Enrichment of *Artemia* nauplii in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae

Óscar Monroig ^{a,*}, Juan Carlos Navarro ^a, Francisco Amat ^a, Pedro González ^b,
Azucena Bermejo ^a, Francisco Hontoria ^a

^aInstituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Torre de la Sal. Castellón, Spain

^bTranstech, S.L. Jules Verne, 19. 08006 Barcelona, Spain

Received 11 May 2005; received in revised form 23 June 2005; accepted 23 June 2005

Abstract

The present study aimed to optimize the enrichment protocols of *Artemia* nauplii with highly unsaturated fatty acid liposomes. Three different types of liposomes formulated with krill phospholipid extract were tested, using a commercial emulsion as the control treatment. The incubation time of the nauplii in the enrichment medium was chosen as the first variable studied. Total lipid, lipid class and fatty acid profiles were analyzed in enriched nauplii after 18 and 21 h incubation in the enrichment media. A third sampling point at 24 h, where nauplii had been kept in clean seawater at 28 °C for 3 h, was established to emulate potential changes in the nutritional value of the nauplii after some hours in the larval rearing tank. A second objective of the study was the establishment of a suitable liposome-based diet for the rearing of gilthead sea bream larvae, as a model of marine fish.

Differences in the enrichment efficiencies through time were found not only between liposome and emulsion based diets, but also among the different types of liposomes. Whereas nauplii enriched with multilamellar vesicles and unilamellar liposomes prepared by extrusion had maximum enrichment performance at 18 h of incubation, nauplii enriched with unilamellar liposomes prepared by the detergent solubilization method followed the enrichment pattern of the control emulsion, with an optimal incubation period closer to 21 h. Analyses of the diets of the larval nutrition trial seemed to confirm the results obtained in the first experiment, although changes in certain variables occurred among the enrichments carried out during the larval feeding trial. Biochemical characterization of body lipids of the larvae indicated differences in total lipid and essential fatty acid content, although no significant differences were found in growth and survival of the larvae. Thiobarbituric acid reactive substances

* Correspondence author. Tel.: +34 964 319500; fax: +34 964 319509.

E-mail address: oscar@iats.csic.es (O. Monroig).

(TBARS), used to determine the peroxide content of the larvae, indicated a significant higher content of these compounds in larvae fed emulsion enriched nauplii compared to larvae fed liposome enriched prey.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Artemia* enrichment; Liposomes; Polyunsaturated fatty acids; Incubation time; Phospholipids; Sea bream larvae

1. Introduction

Artemia are widely used as live prey in marine fish larvae culture. The lack of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA), essential for marine fish, makes it necessary to enrich *Artemia* nauplii in order to improve their lipid profile. This enrichment protocol consists in making the nauplii filter lipid particles, normally, fish oil emulsions. Oil emulsions have been extensively used in hatcheries all over the world. They are composed of fish oil and fatty acid ethyl esters (FAEE), providing essential fatty acids (EFA) to the larvae in the form of these neutral lipid classes.

Hontoria et al. (1994), McEvoy et al. (1996) and Monroig et al. (2003) suggested the use of liposomes formulated with HUFA-rich phospholipids as an alternative way to enrich *Artemia* nauplii. Liposomes are lipid vesicles composed of a phospholipid bilayer, enclosing an internal aqueous phase. Nauplii enriched with liposomes present higher polar lipid (PL) percentages compared to nauplii enriched with commercial emulsions as demonstrated by McEvoy et al. (1996) and Monroig et al. (2003). Phospholipids are considered to be a suitable way for providing EFA to the larvae because these molecules facilitate the absorption of lipids in the larva gut (Koven et al., 1993; Teshima et al., 1993; Coutteau et al., 1997; Geurden et al., 1998), promote growth (Kanazawa et al., 1985) and reduce the potential entry of lipid peroxides through the nauplii as a consequence of their antioxidant properties (King et al., 1992a,b).

Enrichment conditions are well established for self-emulsifying concentrates used for *Artemia* nauplii enrichments. After a 24-h hatching period, newly hatched *Artemia* nauplii are subjected to an incubation in the lipid emulsion at 28 °C during 24 h at densities around 300 nauplii ml⁻¹. Lipid concentration is usually 0.6 g l⁻¹ of enrichment medium. Preliminary studies have elucidated that enrichment procedures

using n-3 rich liposomes can vary from those of self-emulsifying products (McEvoy et al., 1996). Incubation time, naupliar density, temperature and lipid concentration are variables that must be studied in order to optimize the enrichment with liposomes. Control of such variables would lead to consistent and reproducible results, especially in terms of essential fatty acid content and their availability as phospholipid molecules rather than TAG. Incubation time was the first variable chosen to be studied for the establishment of optimal enrichment protocols. The incubation time must be properly set in order to maximize lipid incorporation and to minimize metabolic action of nauplii and peroxide formation. The ability of *Artemia* nauplii to transform phospholipids into TAG has been described by several authors (Tackaert et al., 1991; Rainuzzo et al., 1994). This low effectiveness to increase the polar lipid fraction of nauplii could be avoided by fast boosting protocols, considering that the nauplii display lower metabolic ability at the first hours after hatching. On the other hand, susceptibility of highly polyunsaturated fatty acids to peroxidation when strong aeration, temperatures of approximately 28 °C and illumination are combined, could be reduced with short incubation periods. Lipid peroxides are potentially toxic for the larvae fed peroxide-rich nauplii.

Gilthead sea bream is one of the most important species in Mediterranean aquaculture. Standard protocols have been established for gilthead sea bream larval production and its availability makes this species an appropriate candidate to test new diets for larviculture. Diets based on liposome enrichment of live preys have been scarcely tested in fish larvae. Only Monroig et al. (2003) carried out a nutrition trial where European sea bass larvae were fed two diets based on nauplii enriched with highly unsaturated liposomes for 17 days. Thus, this is the first report on feeding gilthead sea bream larvae liposome-enriched *Artemia* nauplii.

The present study was designed to optimise enrichment protocols with liposomes, paying special attention to the determination of optimal incubation periods. A second objective was the evaluation of the suitability of diets based on liposomes for marine larvae rearing, using gilthead sea bream as a model of marine fish.

2. Materials and methods

The properties as enrichment products of three types of liposomes were tested, using a commercial emulsion as control. Total lipid, lipid class and fatty acid content of the enriched nauplii were determined, varying incubation time of the nauplii in the enrichment medium. After this first experiment, a second experiment was performed, where two liposome-based diets were chosen and used in a fish feeding experiment with gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test, a widely used estimator of oxidative damage, was determined in the larvae to check the presence of peroxide residuals. Growth and survival of the larvae were also monitored at the end of the feeding experiment.

2.1. Chemicals

A krill phospholipid extract was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA), *Artemia* EG cysts and Super Selco, a commercial emulsion used as control, were acquired from INVE (Ghent, Belgium). All chemicals used in total lipid extraction, fatty acid analyses and lipid class determination were analytical grade, supplied by Panreac (Castellar del Vallés, Spain) and Merck (Darmstadt, Germany). Butylated hydroxytoluene (BHT), internal standard nonadecanoic acid (19:0), thiobarbituric acid (TBA), 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), sodium dodecyl sulfate (SDS), α -tocopherol and pyridine were obtained from Sigma (Alcobendas, Spain). Thin layer chromatography plates used in fatty acid methyl ester purification and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Glacial acetic acid and sodium hydroxide were both analytical grade from Panreac (Castellar del Vallés, Spain).

2.2. Preparation of liposomes

All three types of liposomes were formulated with krill phospholipid (Avanti Polar Lipids) as unique lipophilic component, except for those made by detergent solubilization, where a small amount of vitamin E was included. The phospholipid source is an extract from krill (*Euphausia* sp.), mostly composed of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE). Multilamellar vesicles (MLV) were prepared by the method proposed by Bangham et al. (1965), but using filtered seawater as the aqueous phase. Large unilamellar vesicles (LUV) were obtained by extrusion (LUV extrusion) of MLV suspension using an extruder LiposoFast equipped with 100 nm polycarbonate membranes (Avestin Inc., Ottawa, Ontario, Canada). A second type of unilamellar liposomes was prepared by a detergent solubilization methodology (LUV detergent). Concretely, two solutions, a micelle suspension composed by a mixture of krill phospholipid extract and the detergent sodium cholate (7:10, mol/mol), and a saline solution (0.9% NaCl), were mixed and dialyzed allowing the removal of detergent from the micelle solution. The continuous and very rapid detergent removal spontaneously leads to the formation of liposomes. More details about these liposome preparation methodologies can be found in New (1990).

2.3. Enrichment of *Artemia* nauplii

Artemia nauplii were obtained from the hatching of EG grade Inve NV (Ghent, Belgium) cysts. The enrichment was carried out by placing the nauplii in filtered seawater at an approximate density of 300 nauplii ml⁻¹ in 1 l enrichment tubes, at a temperature of 28 °C, with strong aeration and light. Final lipid concentration was 0.5 g l⁻¹ in a single dose at the start of the incubation period. Samples of enriched nauplii were collected in a 100 μ m plankton mesh and gently washed with tap water, after 18 or 21 h of incubation in the enrichment medium. Part of the nauplii were kept in clean seawater at 28 °C for 3 h more (24 h since the start of the incubation), and then sampled. This sample point reflects the nutritional value of nauplii after some hours in the culture tank, and emulates food quality in normal hatchery procedures. Enriched nauplii samples were immediately frozen and lyophilized for lipid analyses.

2.4. Gilthead sea bream nutrition trial

A feeding trial was performed with gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae, using two (MLV and LUV detergent) of the three liposome-based diets tested in the first experiment, as well as nauplii enriched with Super Selco as the control diet. LUV extrusion liposome treatment was eliminated because it did not offer any clear advantage in terms of enrichment efficiency as found in the analyses obtained from the previous enrichment experiment. *Artemia* cysts from the same batch used in the previous study were used. After 23 h of incubation in filtered seawater at 28 °C and strong aeration and light, *Artemia* nauplii were separated from cyst shells and placed in 1 l enrichment tubes at an approximate density of 300 nauplii ml⁻¹. Lipid concentration, temperature, light and aeration were the same as those set for the enrichment experiment. A single tube was used daily for the enrichment of the nauplii employed as ration of the larvae stocked in the three containers for each treatment. The enrichment of the nauplii was stopped after an incubation periods of 22 h, based on the results of the enrichment trial. Although nauplii enriched with MLV displayed optimal nutritional value at 18 h compared to incubation time of 21 h, the detergent liposomes showed the best results among liposome-based treatments. This along with practical reasons resulted in the selection of 22 h, comparable to 21 h sample point of our previous enrichment trial, as the incubation period for the three treatments tested in the larvae trial. After the incubation period, nauplii were filtered, washed and placed in 200 ml vessels with filtered seawater and aeration. The estimation of final naupliar densities in the vessels was carried out by taking six 100 µl-aliquots. In order to standardize the nutritional value of the nauplii, all three vessels containing enriched nauplii were kept for 1 h at room temperature until they were offered to the larvae and, afterwards, sampled and frozen at -20 °C for further analyses. During this period, preparation of enrichments for the following day was carried out.

Fifty gilthead sea bream larvae obtained from Piscimar (Burriana, Spain) were acclimated in triplicate containers until no mortality was recorded. Containers were made of 15 cm diameter PVC-tubes, which were hanged on the edge of 150 l tanks containing filtered seawater. A plankton mesh was placed at the bottom

of each container. Each container received individually the entry of filtered seawater from the top and the plankton mesh permitted the effective renovation of the total seawater content every 10 min, and also the confinement of the larvae. The volume of seawater inside each container was around 4 l. During this acclimatizing period, dead larvae were replaced to maintain a total of 50 animals per container. At the beginning of the trial, the length (mean in mm ± standard deviation) and weight (mean in mg of dry weight ± standard deviation) of the larvae were 9.8 ± 1.5 and 0.99 ± 0.13, respectively. The larvae were fed the enriched nauplii from the different treatments for 19 days. Nauplii ration was daily adjusted for the larvae remaining in each container, and ranged from 250 to 300 nauplii per larva, except for the day before sampling, where larvae were starved in order to completely remove the content of their digestive tract. Every day, mortality was checked. At the end of the trial, 15 larvae from each triplicate container were weighted and their body length measured for growth estimation. Remaining larvae were counted for final survival and frozen until further analyses.

2.5. Total lipids, fatty acids and lipid class determination

Total lipids were extracted using the method of Folch et al. (1957). Fatty acid analyses were carried out by performing an overnight acid-catalysed transesterification of lipid aliquots (Christie, 1982). Then, fatty acid methyl esters (FAME) were extracted with hexane:diethyl ether (1:1, v/v), and purified by thin layer chromatography (Silica gel G 60, Merck, Darmstadt, Germany) using a mix of hexane:diethyl ether:acetic acid (85:15:1.5, v/v/v) as solvent system. The analyses of FAME were performed with a Fisons Instruments (Fisons Instruments GC 8000 series, Rodano, Italy) gas chromatograph equipped with a fused silica 30 m × 0.25 mm open tubular column (Tracer, TR-WAX, film thickness: 0.25 µm, Teknokroma, Spain) and a cold on-column injection system. Helium was used as carrier, and a 50 to 220 °C thermal gradient was established during the running of samples. A personal computer system equipped with ChromCard for Windows (CE Instruments, Milan, Italy) software was used in the recording and processing of data coming from a flame-ionization detector (Fisons

Instruments, Rodano, Italy). Peaks were determined by comparison with known standards. Lipid classes were analyzed using high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) as described by Olsen and Henderson (1989).

2.6. Measurements of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

The measurements of TBARS in larvae were carried out using the method of Ohkawa et al. (1979) with the following modifications. Pools of 5–6 fresh larvae were homogenized in 2 ml of 100 nM sodium phosphate buffer (pH=7.4) using a tissue disrupter (Ika Labortechnik, Staufen, Germany) and centrifuged for 5 min at 10000 × g. Supernatant aliquots ranging from 30 to 40 µl were reacted with 40 µl of 8.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate containing 0.05% (w/v) butylated hydroxytoluene (BHT), 300 µl of 20% acetic acid (pH=3.5) and 300 µl of 0.8% (w/v) thiobarbituric acid (TBA). A volume of sodium phosphate buffer was added to complete a final volume in the test tubes of 800 µl. The reagents were mixed in stoppered test tubes and incubated in a thermostated bath for 60 min at 95 °C. After cooling in ice bath, 200 µl of distilled water and 1 ml of n-butanol:pyridine (1 : 1, v/v) were added, and the mixture shaken vigorously. After centrifugation at 10000 × g for 3 min, the fluorescence of the organic layer was determined, setting excitation and emission wavelengths at 515 and 553 nm, respectively. TBARS concentrations were derived from a standard curve using 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) and values expressed in terms of TEP µmolar equivalents g⁻¹ of dry weight.

2.7. Statistical analysis

Biological and analytical data are expressed as means ± standard deviations. Homogeneity of variances was checked by Barlett’s test. When homogeneity of variances was accomplished, differences between treatments were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed, where appropriate, by Tukey’s multiple comparison test (Sokal and Rohlf, 1981). If heterogeneity of variances existed, Welch’s test was used to check differences between treatments and Game–Howell’s test to establish differences among groups. Lipid class and fatty acid composition

of the krill phospholipid extract and the control emulsion were compared with a Student’s *t*-test. Comparisons of the means with *P* values less or equal than 0.05 were considered significantly different. All the statistical analyses were carried out using the SPSS statistical package (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

3. Results

3.1. Artemia nauplii enrichment

Table 1 shows the fatty acid profile and lipid class analyses of the enrichment products used in this study.

Table 1
Selected fatty acid (percent of total fatty acids) and lipid class composition (percent of total lipids) of enrichment products. Data represent means (SD) (n=3)

	Control emulsion	Krill extract
<i>Fatty acid</i>		
16:0	2.8 (0.2) ^a	26.5 (0.2) ^b
18:0	2.6 (0.0) ^a	0.9 (0.0) ^b
18:1	12.2 (0.9) ^a	9.6 (0.0) ^b
18:2n-6	4.9 (0.6) ^a	1.9 (0.0) ^b
18:3n-3	1.1 (0.1) ^a	1.3 (0.0) ^b
20:4n-6	1.4 (0.1) ^a	0.7 (0.0) ^b
20:5n-3	24.0 (0.8) ^a	29.3 (0.1) ^b
22:5n-3	4.6 (0.2) ^a	0.8 (0.0) ^b
22:6n-3	27.8 (0.8) ^a	17.2 (0.1) ^b
Saturates	6.7 (0.3) ^a	30.0 (0.2) ^b
Monounsaturates	22.2 (0.7) ^a	13.3 (0.1) ^b
Polyunsaturates	68.0 (1.2) ^a	53.8 (0.2) ^b
Total n-3	60.3 (1.7) ^a	51.0 (0.2) ^b
Total n-6	8.1 (0.5) ^a	2.9 (0.1) ^b
HUFA n-3	57.7 (1.7) ^a	47.9 (0.1) ^b
HUFA n-6	2.5 (0.1) ^a	0.9 (0.1) ^b
DHA/EPA	1.2 (0.0)	0.6 (0.0)
<i>Lipid class</i>		
FAEE/TAG	91.1 (1.1) ^a	N.D. ^b
PC	0.4 (0.0) ^a	67.0 (1.9) ^b
PE	N.D. ^a	9.0 (1.2) ^b
Other	8.4 (1.0)	24.0 (3.1)

Variables sharing the same superscript letter within a row are not significantly different from each other (Student’s test, *P* ≤ 0.05). N.D.: not detected. HUFA n-3: ≥ 20:3n-3; HUFA n-6: ≥ 20:2n-6; DHA/EPA: docosahexaenoic and eicosapentaenoic fatty acid ratio; FAEE/TAG: combined fraction of fatty acid ethyl esters and triacylglycerols; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidylethanolamine.

These results confirm the specifications of the manufacturers. Total lipid of enriched nauplii at the three sample points are displayed in Fig. 1. As the figure shows, lipid fraction was higher at the three sample points in nauplii enriched with control emulsion compared to liposome enriched nauplii, though the lipids of LUV detergent enriched nauplii were not different from control nauplii at 24 h sample point. In MLV and LUV extrusion, maximum amounts of total lipid were found at 18 h of incubation, and no significant increase was registered during the next 3 h (21 h sample point). Lipid content seemed to decrease during the starvation period in these two liposome treatments, although no clear statistical differences could be established. On the other hand, nauplii enriched with LUV detergent and control emulsion increased their lipid content until 21 h ($P \leq 0.05$), with an apparent maintenance of this maximum during the starvation period up to 24 h.

Table 2 compares lipid class percentages in enriched nauplii at 18, 21 and 24 h sampling points. As it is shown, polar lipid fraction was significantly higher in MLV and LUV extrusion nauplii at any sampling time in terms of percentage of total lipids (Table 2a, b, and c). Combined fraction of PE/CL/PG/PA (see abbreviations in Table 2) was higher in

MLV and LUV extrusion enriched nauplii than in emulsion enriched nauplii at the three sampling points, though other fractions of phospholipids (PS/PI and PC/SM) did not contribute so clearly to the differences in the total polar lipid percentage. LUV detergent nauplii did not reach significantly higher total polar lipid percentages compared to control nauplii. However, combined fractions of PE/CL/PG/PA and PS/PI were significantly higher in LUV detergent nauplii compared to control nauplii at 18 and 24 h, respectively. Control emulsion and LUV detergent treatments showed close to 60% triacylglycerols in their total lipid content, significantly higher than those of MLV and LUV extrusion nauplii (50–56%) at the three sampling points. Fatty acid ethyl esters (FAEE), a major constituent of Super Selco emulsion and absent in liposomes, were found in important amounts in the emulsion enriched nauplii at 18 and 21 h (Table 2a and b, respectively), but decreased during starvation. Cholesterol percentages were generally higher in liposome enriched nauplii at any sampling point, although these differences disappeared between control and LUV detergent nauplii at 24 h.

Selected fatty acids of enriched nauplii at the 18, 21 and 24 h sampling times are displayed in Figs.

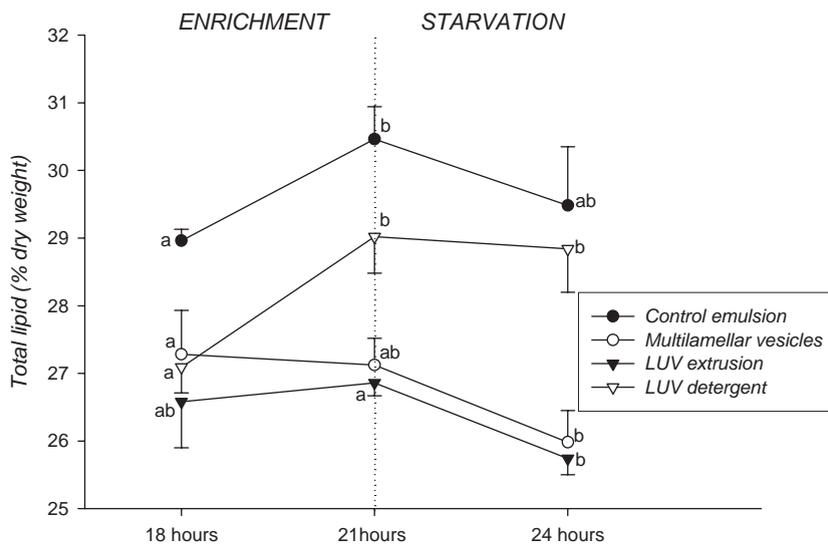


Fig. 1. Total lipid contents (percentage of dry weight) of enriched nauplii. Samples of 24-h belong to nauplii kept during 3 h in clean seawater after 21 h of incubation with the enrichment product. Data are means of three replicates. Error bars represent standard deviations. Sample times within a treatment sharing the same superscript letter are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Table 2
Lipid class composition (percentages of total lipid) of enriched nauplii at 18 (Table 2a), 21 (Table 2b), and 24 h (Table 2c)

	Control emulsion	Multilamellar vesicles	LUV extrusion	LUV detergent
<i>Lipid class (2a)</i>				
Sterol ester	3.0 (0.1) ^a	2.9 (0.2) ^a	3.2 (0.1) ^a	2.9 (0.4) ^a
FAEE	6.0 (0.3) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b	N.D. ^b
Unknown1	N.D. ^a	2.5 (0.2) ^b	2.9 (0.4) ^b	2.4 (0.0) ^b
TAG	57.7 (0.7) ^a	55.5 (1.0) ^b	52.7 (0.5) ^c	57.9 (0.5) ^a
Unknown2	N.D. ^a	0.6 (0.1) ^b	0.7 (0.0) ^b	0.5 (0.1) ^b
FFA	1.8 (0.1) ^a	2.3 (0.4) ^{ab}	3.0 (0.6) ^b	2.6 (0.1) ^{ab}
Cholesterol	6.4 (0.3) ^a	8.2 (0.6) ^{bc}	9.2 (0.1) ^b	7.6 (0.4) ^c
MAG/DAG	2.5 (0.1) ^a	2.6 (0.1) ^a	1.7 (0.1) ^b	2.5 (0.1) ^a
Pigments	1.1 (0.3) ^a	1.5 (0.1) ^a	1.0 (0.1) ^a	1.2 (0.4) ^a
PE/CL/P/PA	8.9 (0.2) ^a	10.2 (0.2) ^b	10.9 (0.2) ^c	9.7 (0.2) ^b
PS/PI	3.6 (0.1) ^a	3.8 (0.4) ^{ab}	4.3 (0.2) ^b	3.9 (0.1) ^{ab}
PC/SM	8.9 (0.3) ^a	10.0 (0.3) ^b	10.3 (0.1) ^b	8.8 (0.5) ^a
Polar lipids	21.4 (0.4) ^a	23.9 (0.6) ^b	25.6 (0.4) ^c	22.4 (0.7) ^a
<i>Lipid class (2b)</i>				
Sterol ester	2.0 (0.2) ^a	2.6 (0.3) ^a	2.5 (0.2) ^a	2.4 (0.3) ^a
FAEE	5.7 (2.1) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b	N.D. ^b
Unknown1	N.D. ^a	3.4 (0.2) ^b	3.2 (0.2) ^b	3.3 (0.2) ^b
TAG	58.1 (1.5) ^a	55.4 (0.8) ^b	54.7 (0.7) ^b	59.8 (0.4) ^a
Unknown2	N.D. ^a	0.7 (0.3) ^b	0.9 (0.2) ^b	0.7 (0.2) ^b
FFA	2.1 (1.0) ^a	1.5 (0.3) ^a	1.7 (0.5) ^a	1.3 (0.2) ^a
Cholesterol	7.3 (0.6) ^a	8.2 (0.8) ^{ab}	9.4 (0.3) ^b	7.5 (0.2) ^a
MAG/DAG	2.1 (0.1) ^a	2.3 (0.3) ^a	1.2 (0.1) ^b	2.0 (0.0) ^a
Pigments	0.8 (0.1) ^a	1.4 (0.1) ^b	0.7 (0.2) ^a	0.9 (0.1) ^a
PE/CL/P/PA	8.9 (0.5) ^a	10.5 (0.3) ^b	10.8 (0.1) ^b	9.5 (0.3) ^a
PS/PI	3.6 (0.2) ^a	3.9 (0.1) ^a	4.3 (0.1) ^b	3.7 (0.1) ^a
PC/SM	9.5 (0.3) ^{ab}	10.0 (0.5) ^a	10.5 (0.2) ^a	8.8 (0.6) ^b
Polar lipids	22.0 (0.9) ^a	24.4 (0.5) ^b	25.6 (0.4) ^b	21.9 (0.8) ^a
<i>Lipid class (2c)</i>				
Sterol ester	2.4 (0.3) ^a	2.3 (0.0) ^a	2.2 (0.2) ^a	2.3 (0.4) ^a
FAEE	2.2 (0.8) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b	N.D. ^b
Unknown1	N.D. ^a	3.3 (0.1) ^b	3.9 (0.2) ^b	3.4 (0.8) ^b
TAG	60.7 (0.4) ^a	51.6 (1.7) ^b	52.6 (1.1) ^b	57.8 (1.0) ^a
Unknown2	N.D. ^a	1.2 (0.4) ^b	0.9 (0.1) ^b	1.0 (0.3) ^b
FFA	1.4 (0.4) ^a	1.2 (0.5) ^a	0.9 (0.2) ^a	0.8 (0.1) ^a
Cholesterol	7.5 (0.2) ^a	9.8 (0.3) ^b	10.1 (0.6) ^b	8.2 (0.1) ^a
MAG/DAG	2.1 (0.2) ^a	1.8 (0.3) ^a	1.8 (0.1) ^a	2.0 (0.2) ^a
Pigments	1.1 (0.3) ^a	0.9 (0.2) ^a	0.9 (0.0) ^a	1.1 (0.2) ^a
PE/CL/P/PA	9.0 (0.3) ^a	11.5 (0.2) ^c	11.1 (0.5) ^{bc}	10.1 (0.5) ^{ab}
PS/PI	3.9 (0.1) ^a	4.6 (0.0) ^b	4.6 (0.1) ^b	4.1 (0.1) ^c
PC/SM	9.8 (0.4) ^a	11.8 (0.4) ^b	10.9 (0.2) ^{ab}	9.3 (1.3) ^a
Polar lipids	22.7 (0.8) ^a	27.9 (0.5) ^b	26.6 (0.8) ^b	23.5 (1.8) ^a

Data represent means (SD) ($n=3$).

Treatment means sharing the same superscript letter within a row are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$). PC/SM, combined fraction containing phosphatidylcholine and sphingomyelin; PS/PI, combined fraction containing phosphatidylserine and phosphatidylinositol; PE/CL/P/PA, combined fraction containing phosphatidylethanolamine, cardiolipin, phosphatidylglycerol and phosphatidic acid; MAG/DAG, combined fraction containing monoacylglycerols and diacylglycerols; FFA, free fatty acids; TAG, triacylglycerols; FAEE, fatty acid ethyl esters.

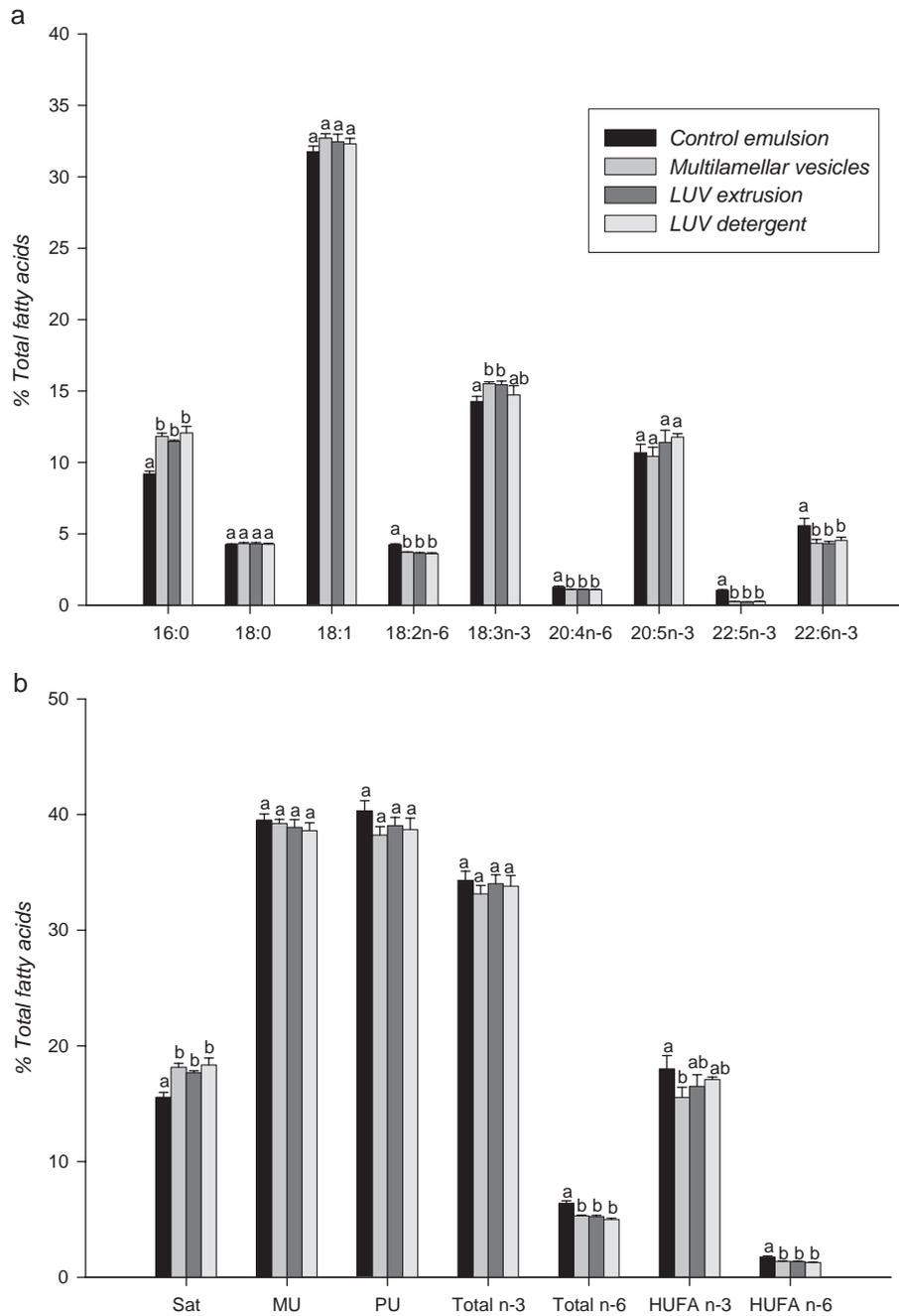


Fig. 2. Fatty acid profiles (a) and fatty acid groups (b) from nauplii enriched with different liposome preparations, after 18 h of incubation in the enrichment medium. Values express percentages of total fatty acids. Error bars are standard deviations. Treatment means sharing the same letter are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$). Sat, saturates; MU, monounsaturates; PU, polyunsaturates; HUFA n-3: $\geq 20:3n-3$; HUFA n-6: $\geq 20:2n-6$.

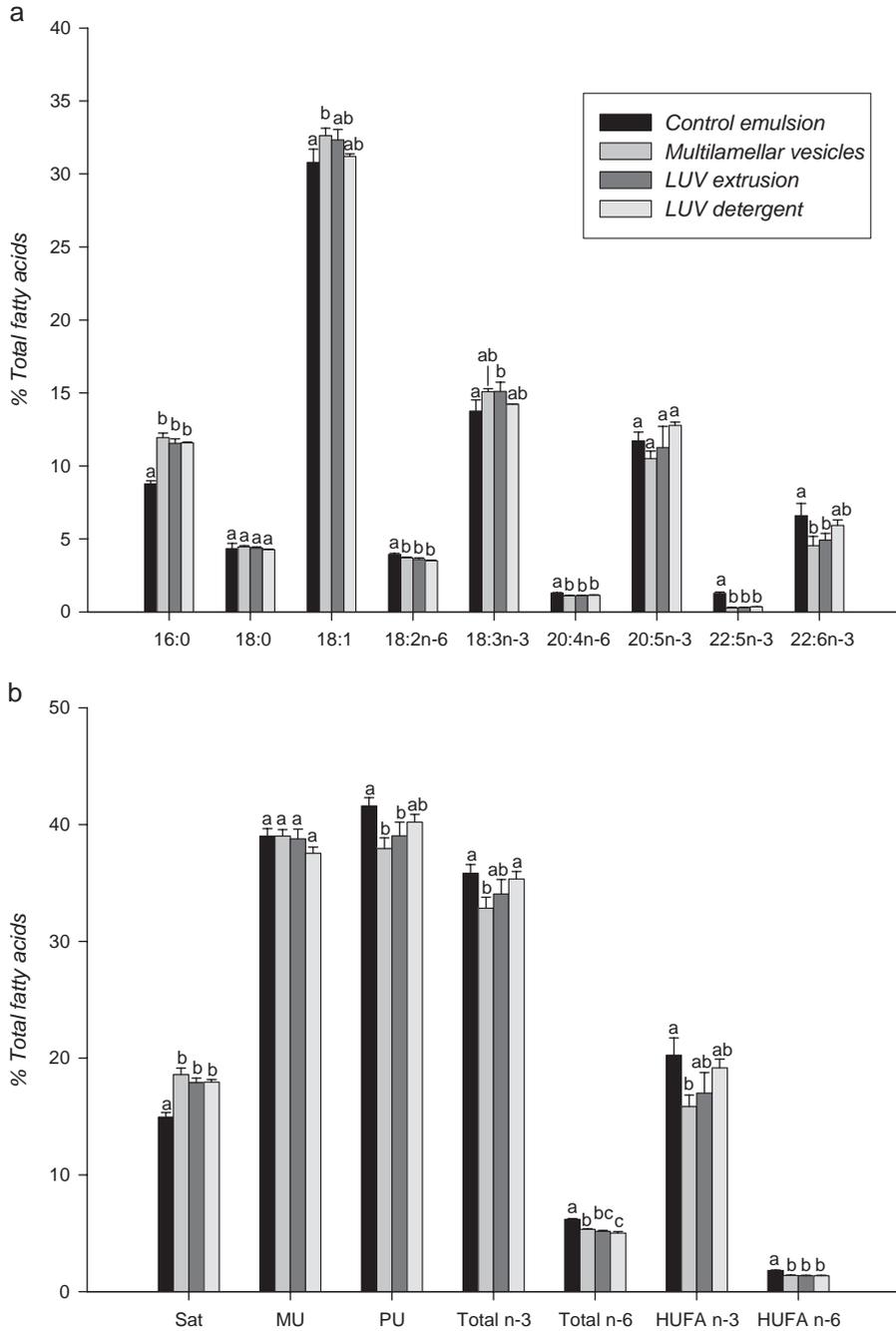


Fig. 3. Fatty acid profiles (a) and fatty acid groups (b) from nauplii enriched with different liposome preparations, after 21 h of incubation in the enrichment medium. Values express percentages of total fatty acids. Error bars are standard deviations. Treatment means sharing the same letter are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$). Sat, saturates; MU, monounsaturates; PU, polyunsaturates; HUFA n-3: $\geq 20:3n-3$; HUFA n-6: $\geq 20:2n-6$.

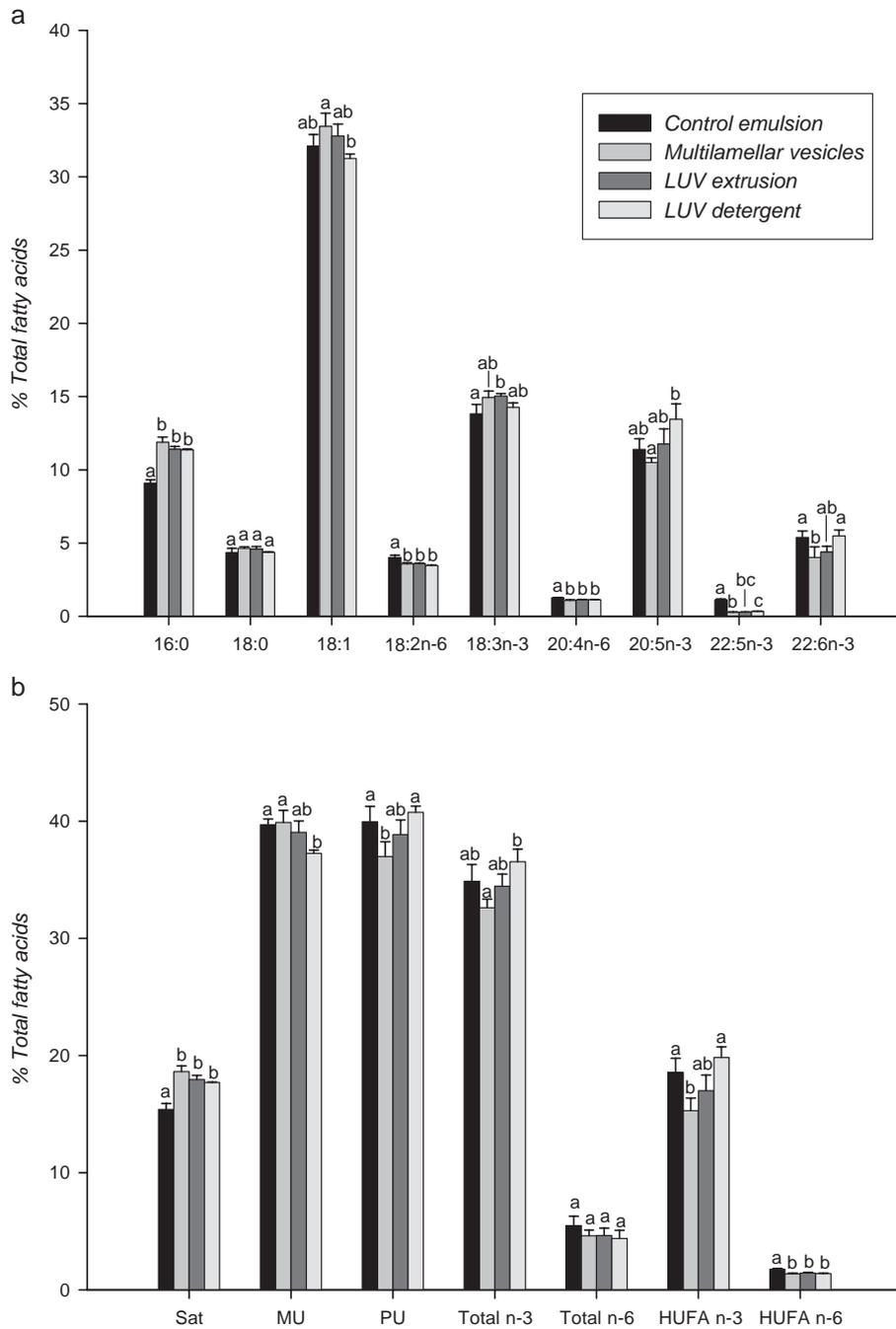


Fig. 4. Fatty acid profiles (a) and fatty acid groups (b) from nauplii enriched with different liposome preparations, after 21 h of incubation in the enrichment medium and 3 additional hours of starvation in clean seawater. Values express percentages of total fatty acids. Error bars are standard deviations. Treatment means sharing the same letter are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$). Sat, saturates; MU, monounsaturates; PU, polyunsaturates; HUFA n-3: $\geq 20:3n-3$; HUFA n-6: $\geq 20:2n-6$.

2–4, respectively. After 18 h of incubation (Fig. 2a and b), emulsion enriched nauplii contained higher percentages of DHA and docosapentaenoic acid (DPA, 22:5n-3), but not EPA. However, total HUFA n-3 did not show significantly higher levels compared to liposome treatments, except for MLV enriched nauplii, with a lower content in long chain n-3 unsaturated fatty acids (Fig. 2b). Arachidonic acid (ArA, 20:4n-6) content of the emulsion enriched nauplii was also higher than that of any liposome treatment (Fig. 2a), contributing to a significant increase in the content of total n-6 polyunsaturated fatty acids of control nauplii (Fig. 2b). On the other hand, palmitic acid (16:0) a major constituent of krill phospholipid extract (Table 1), increased saturates in liposome enriched nauplii at any sampling point (Figs. 2b, 3b and 4b). After 21 h of incubation, differences between the emulsion nauplii fatty acid profiles, and MLV and LUV extrusion treatments started to appear. In this regard, total polyunsaturated fatty acids displayed lower percentages in these two liposome treatments as compared to control nauplii, whereas LUV detergent did not differ statistically from the emulsion in such a parameter after 21 h of incubation (Fig. 3b). Although some of the important fatty acids (ArA and DPA) of nauplii enriched with liposomes displayed lower percentages than those of control nauplii, EPA and DHA percentages were not significantly different in nauplii enriched with the control emulsion or LUV detergent (Fig. 3a). Starvation of nauplii for the next 3 h (24 h sampling point), made the fatty acid profile of nauplii enriched with LUV detergent improve, matching the control emulsion nauplii. At this sampling point, DHA percentage of LUV detergent nauplii was not significantly different from that of control nauplii, whereas MLV and LUV extrusion nauplii showed slightly lower DHA percentages (Fig. 4a). Besides, EPA and DPA contents also showed differences among liposome diets, with significantly higher percentages of these fatty acids in nauplii enriched with LUV detergent compared to MLV nauplii (Fig. 4a). All this results are globally reflected in the total n-3 content of the nauplii enriched with LUV detergent, which showed no differences compared to control nauplii (Fig. 4b). On the other hand, ArA showed no differences ($P \leq 0.05$) among the nauplii enriched with the different types of liposomes (Fig. 4a).

3.2. Feeding trial of gilthead sea bream larvae

Table 3 lists the lipid class and total lipid content of enriched nauplii. Unlike results of lipid content in the previous enrichment trial, enriched nauplii collected during the larvae feeding trial did not show differences among treatments. Total polar lipid percentage of nauplii enriched with liposomes was higher than that of emulsion enriched nauplii, although only MLV nauplii presented statistical differences with control nauplii. PE/CL/PG/PA combination was the most important fraction accounting for this difference, as it is the only polar lipid fraction with significantly higher percentages in liposome enriched nauplii.

Fig. 5a and b show fatty acid profiles of enriched nauplii as the mean of the eight enrichments analyzed. DHA amounts were not significantly different among treatments. On the other hand, EPA amounts of con-

Table 3
Lipid class composition (percentages of total lipid) and total lipid contents (percentage of dry weight) of enriched nauplii of the larval feeding trial

Lipid class	Control emulsion	Multilamellar vesicles	LUV detergent
Sterol ester	3.2 (0.3) ^a	2.1 (0.4) ^b	2.2 (0.3) ^b
FAEE	6.1 (1.3) ^a	N.D. ^b	N.D. ^b
Unknown1	N.D. ^a	2.3 (0.2) ^b	1.9 (0.3) ^b
TAG	52.4 (0.8) ^a	51.6 (2.6) ^a	52.6 (3.6) ^a
Unknown2	N.D. ^a	0.1 (0.2) ^b	0.1 (0.2) ^b
FFA	1.9 (0.3) ^a	1.2 (0.2) ^b	1.3 (0.2) ^{ab}
Cholesterol	7.9 (0.1) ^a	9.7 (0.5) ^b	9.4 (0.5) ^b
MAG/DAG	2.3 (0.4) ^a	2.0 (0.5) ^a	1.8 (0.2) ^a
Pigments	1.2 (0.3) ^a	1.0 (0.4) ^a	1.0 (0.3) ^a
PE/CL/PG/PA	10.6 (0.4) ^a	13.0 (0.2) ^b	12.6 (0.1) ^b
PS/PI	4.1 (0.5) ^a	4.8 (0.6) ^a	5.1 (0.5) ^a
PC/SM	10.2 (1.5) ^a	12.2 (1.4) ^a	11.9 (1.6) ^a
Polar lipids	24.9 (2.3) ^a	30.0 (1.7) ^b	29.6 (2.0) ^{ab}
Total lipid	26.08 (1.15) ^a	24.50 (2.29) ^a	24.49 (1.96) ^a

Data represent means (SD) ($n = 3$ for lipid classes and $n = 8$ for total lipid).

Treatment means sharing the same superscript letter within a row are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$). N.D., not detected. PC/SM, combined fraction containing phosphatidylcholine and sphingomyelin; PS/PI, combined fraction containing phosphatidylserine and phosphatidylinositol; PE/CL/PG/PA, combined fraction containing phosphatidylethanolamine, cardiolipin, phosphatidylglycerol and phosphatidic acid; MAG/DAG, combined fraction containing monoacylglycerols and diacylglycerols; FFA, free fatty acids; TAG, triacylglycerols; FAEE, fatty acid ethyl esters.

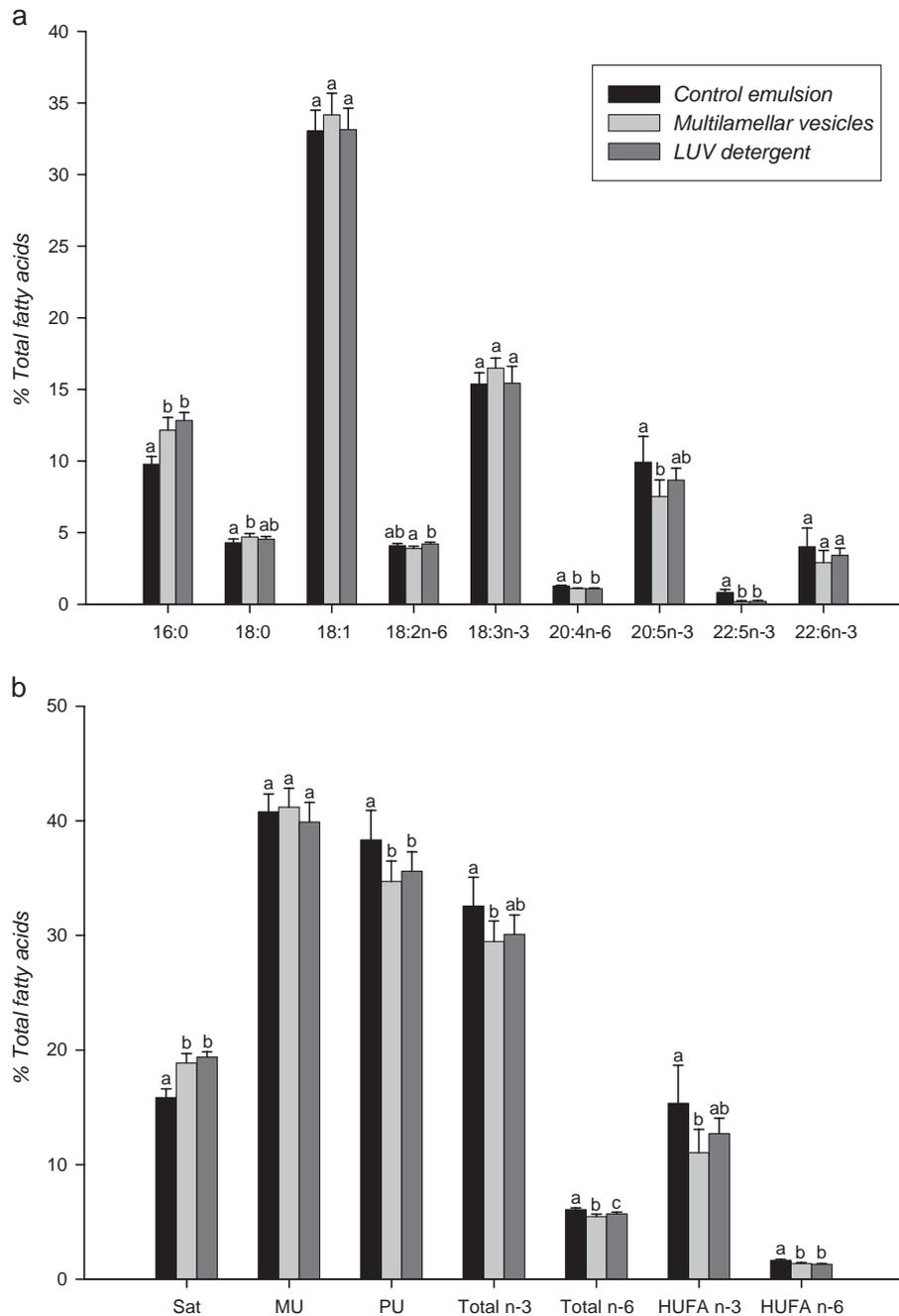


Fig. 5. Fatty acid profiles (a) and fatty acid groups (b) from nauplii enriched with different liposome preparations collected during the sea bream feeding trial. Values express percentages of total fatty acids and are means of eight enrichments. Error bars are standard deviations. Treatment means sharing the same letter are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$). Sat, saturates; MU, monounsaturates; PU, polyunsaturates; HUFA n-3: $\geq 20:3n-3$; HUFA n-6: $\geq 20:2n-6$.

trol and LUV detergent nauplii were not statistically different either, but differences were seen between control and MLV nauplii (Fig. 5a). Thus, total HUFA n-3 content was slightly lower in LUV detergent and MLV nauplii than in emulsion enriched nauplii, but only clear differences were shown between MLV and control nauplii (Fig. 5b). Besides, ArA levels of liposome treatments were lower than those of the emulsion control nauplii, contributing to lower levels of total n-6 HUFA (Fig. 5b). Another marked feature of the fatty acid composition of the liposome enriched nauplii was the higher content of total saturated fatty acids, a characteristic also seen in the nauplii from the enrichment trials. This was caused by higher percentage of palmitic acid in the krill phospholipids extract.

Gilthead sea bream larvae of experimental groups displayed final survival above 95% in all treatments with no differences among treatments. At the end of the trial, larval body lengths (mean in mm \pm standard deviation) were 15.7 ± 0.6 (control), 15.7 ± 0.4 (MLV), and 15.6 ± 0.3 (LUV detergent), while individual dry weight of larvae (mean in mg of dry weight \pm standard deviation) were 4.83 ± 0.44 , 4.93 ± 0.31 , and 4.56 ± 0.51 , corresponding to control, MLV and LUV detergent groups, respectively. No statistical differences were found in the growth of the larvae fed the different diets.

Total body lipid and lipid class contents of gilthead sea bream larvae fed experimental diets are presented in Table 4. Gilthead sea bream larvae fed *Artemia* nauplii enriched with liposomes contained lower lipid percentages in their body tissues compared to control larvae. Lipid classes of sea bream larvae did not exhibit differences among treatments. Polar lipid content of experimental groups did not show statistical differences either. Fatty acid profiles (Fig. 6a and b) reflect the fatty acid composition of the experimental diets, thus they express the high saturated and low polyunsaturated fatty acid content of lipids in larvae fed liposome enriched nauplii, compared to control larvae. DHA content did not show differences between control and LUV detergent treatment, while DPA and EPA amounts showed differences between liposome treatments and control larvae, as seen in the analysis of nauplii. ArA percentages of the larvae did not display differences among experimental groups, not reflecting the differences that exist in their diets.

Table 4

Lipid class composition (percentages of total lipid) and total lipid contents (percentage of dry weight) of gilthead sea bream larvae fed enriched nauplii

Lipid class	Control emulsion	Multilamellar vesicles	LUV detergent
Sterol ester	8.7 (1.7) ^a	8.7 (1.7) ^a	9.4 (1.8) ^a
FAEE*	N.D.	N.D.	N.D.
Unknown1*	N.D.	N.D.	N.D.
TAG	23.8 (2.1) ^a	21.8 (3.0) ^a	20.5 (1.2) ^a
Unknown2*	N.D.	N.D.	N.D.
FFA	0.8 (0.8) ^a	0.7 (0.5) ^a	0.6 (0.4) ^a
Cholesterol	22.6 (3.5) ^a	23.3 (2.4) ^a	23.9 (3.7) ^a
MAG/DAG	1.0 (0.7) ^a	0.9 (0.5) ^a	0.7 (0.7) ^a
Pigments	0.7 (0.2) ^a	0.8 (0.4) ^a	0.6 (0.4) ^a
PE/CL/PG/PA	15.0 (0.5) ^a	15.1 (0.6) ^a	15.8 (0.0) ^a
PS/PI	5.1 (1.7) ^a	5.1 (1.7) ^a	5.3 (1.9) ^a
PC/SM	22.5 (0.6) ^a	22.9 (1.2) ^a	23.1 (0.9) ^a
Polar lipids	42.6 (2.5) ^a	43.0 (3.2) ^a	44.2 (2.8) ^a
Total lipid	20.0 (0.3) ^a	18.1 (0.9) ^b	18.5 (0.2) ^b

Data represent means (SD) ($n=3$).

Treatment means sharing the same superscript letter within a row are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$). N.D., not detected. PC/SM, combined fraction containing phosphatidylcholine and sphingomyelin; PS/PI, combined fraction containing phosphatidylserine and phosphatidylinositol; PE/CL/PG/PA, combined fraction containing phosphatidylethanolamine, cardiolipin, phosphatidylglycerol and phosphatidic acid; MAG/DAG, combined fraction containing monoacylglycerols and diacylglycerols; FFA, free fatty acids; TAG, triacylglycerols; FAEE, fatty acid ethyl esters.

* Present in the enriched nauplii.

TBARS test (Fig. 7), carried out on pooled samples of experimental larvae, displayed a lower content of lipid peroxides in larvae fed nauplii enriched with LUV detergent or MLV, while the highest presence of lipid peroxides was found in larvae fed nauplii enriched with control emulsion ($P \leq 0.05$).

4. Discussion

This study represents a first step in determining an optimal protocol in enrichment of *Artemia* nauplii by means of liposomes as an essential fatty acid delivery system. As mentioned earlier, the different nature of emulsions and liposomes can force variations in the enrichment protocols. This assumption seems to be confirmed in the present study. In this way, lipid incorporation pattern in enriched nauplii seems to

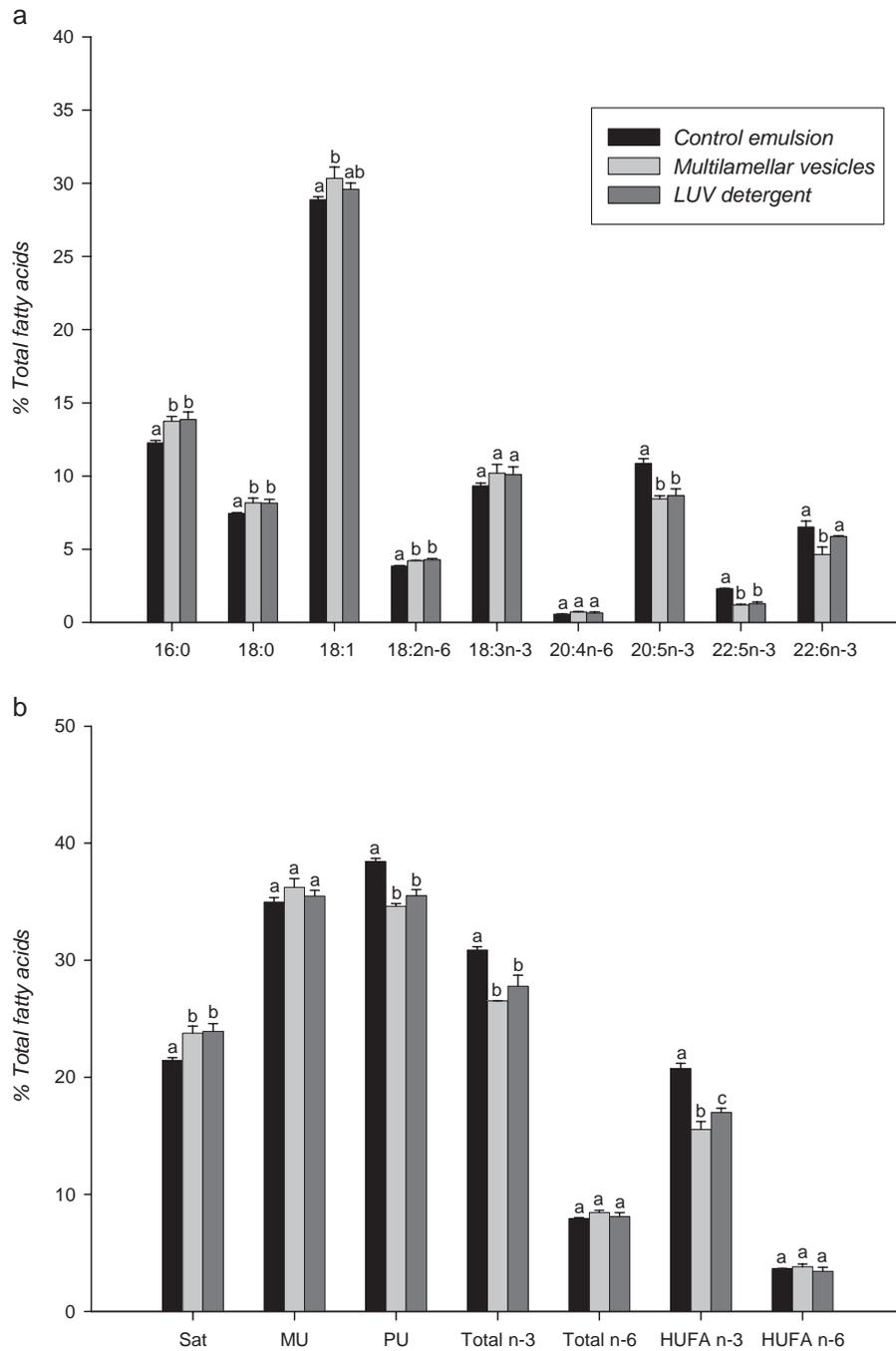


Fig. 6. Fatty acid profiles (a) and fatty acid groups (b) from gilthead sea bream larvae fed nauplii enriched with different liposome preparations. Values express percentages of total fatty acids and are means of triplicates. Error bars are standard deviations. Treatment means sharing the same letter are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$). Sat, saturates; MU, monounsaturates; PU, polyunsaturates; HUFA n-3: $\geq 20:3n-3$; HUFA n-6: $\geq 20:2n-6$.

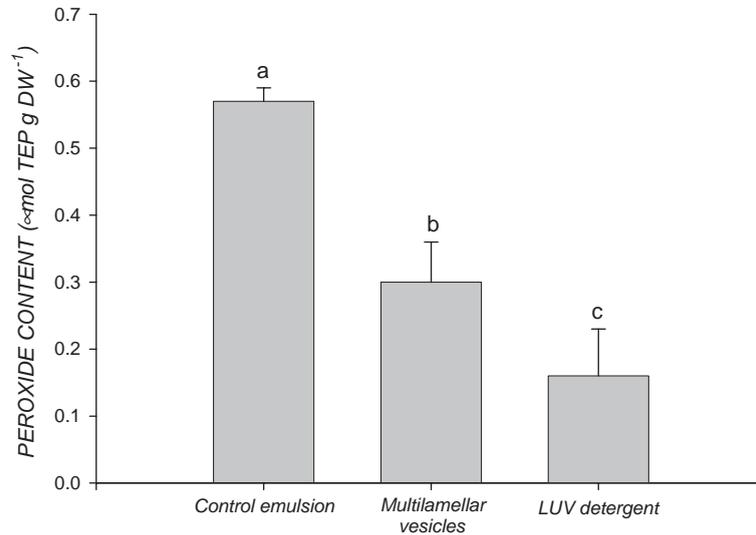


Fig. 7. Peroxide content expressed as the concentration of tetraethoxypropane (TEP) in μmol equivalents per gram of dry weight in pools of sea bream larvae fed different experimental diets. Values are means of three pool replicates. Error bars represent standard deviations. Treatments sharing the same superscript letter are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$).

differ not only between liposomes and emulsions, but also among the different types of liposomes, depending on the method of preparation employed in their manufacture. Thus, LUV detergent exhibit a lipid incorporation pattern through time similar to that of the control emulsion, whereas MLV and LUV extrusion liposomes showed a different behavior. MLV and LUV extrusion liposome enriched nauplii seem to reach their maximum content of total lipid before than LUV detergent and control emulsion. A possible explanation to these results could be related with differences in the integrity of the different types of liposomes employed in the enrichments. Defects in the lattice conformation of the phospholipids during the manufacture of liposomes (New, 1990, p. 101), together with the aggressive incubation conditions (strong aeration, nauplii presence, temperature of 28 °C), can lead to disruptions of the liposome bilayers. This loss of integrity would lead to changes in size of the liposomes present in the enrichment medium, with an increase in the heterogeneity of the vesicles. As a final consequence, high size dispersion of liposome would hinder the filtration ability of nauplii. In this way, ongoing studies of the change of size distribution of liposomes through time under enrichment conditions point to a very high increase of the mean and dispersion size distribution in LUV extrusion vesicles

compared to LUV detergent vesicles. This would indicate a higher unstability of these liposomes compared to LUV detergent, which do not undergo important shifts in size distribution under the same conditions (unpublished data). On the other hand, preparation of multilamellar vesicles by simple hydration of a phospholipid film gives rise to a very high heterogeneous size distribution population, behaving like deteriorated LUV extrusion from the beginning of the enrichment process.

McEvoy et al. (1996) obtained higher absolute amounts of polar lipids in *Artemia* nauplii enriched with liposomes of phosphatidylcholine purified from herring roe compared to those enriched with oil emulsions. However, some authors hypothesized the difficulty to enrich *Artemia* nauplii in polar lipids (Rainuzzo et al., 1994; Coutteau et al., 1997), arguing the metabolic action of the nauplii addressed to the conservation of phospholipid fraction. Metabolic activity of nauplii during enrichment process has been widely illustrated. McEvoy et al. (1996) described the synthesis of TAG from FAEE, Rainuzzo et al. (1994) observed conversion from phospholipids to TAG in enrichments of rotifers and *Artemia* nauplii, and Navarro et al. (1999) described changes in the fatty acid chains. Results of the present study demonstrate the difficulty to increase polar lipid fraction in the

nauplii, as it can be deduced from the small differences in the polar lipid fraction of enriched nauplii, even if the lipid class compositions of enrichment products are very different.

Enrichment quality differences between LUV detergent enriched nauplii and nauplii enriched with MLV or LUV extrusion are also apparent in their fatty acid profile. Indeed, DHA percentage found in nauplii enriched with detergent solubilization liposomes was significantly higher than those of MLV and extrusion liposomes, and equal to that of the control treatment after 21 and 24 h of incubation. This finding is relevant since the control emulsion contains more DHA than the krill phospholipid extract. A possible explanation could be related with the degradation of DHA present in TAG and FAEE forms in the emulsion, since these molecules are more susceptible to peroxidation than phospholipids of liposomes, especially under the aggressive conditions in which the enrichment is performed (King et al., 1992a,b; Song et al., 1997). DHA present in phospholipid molecules of krill extract would be protected not only by the phospholipid structure itself, but also by the presence of vitamin E in LUV detergent, acting as peroxidation protector of the fatty acid chains (Urano et al., 1987; Fukuzawa et al., 1993). Another possibility by which the DHA content of control nauplii does not differ from that of LUV detergent nauplii despite the higher content of DHA in the original emulsion, could be explained by the retro-conversion activity of the nauplii from DHA to EPA, as it has been widely described in the bibliography (Barclay and Zeller, 1996; Furuita et al., 1996; Navarro et al., 1999; Han et al., 2001).

Above discussed differences within the enrichment patterns observed among the different products, must be considered cautiously. The enrichment process itself is very variable and thus has been described by several authors. Furuita et al. (1996) explained the variability in the enrichment efficiency by differences of development degree in the pool of nauplii, and, consequently, by differences in their metabolic capability. In another sense, Navarro et al. (1999) included a second source of variability coming from changes in enrichment conditions (dissolved oxygen or, more likely, size of the air bubbles or hydrodynamics in the enrichment tubes). The analyses of the diets employed in the sea bream feeding trial denote

this high variability in the enrichment efficiency in terms of total lipid, essential fatty acids and lipid class content. The variability in the enrichment efficiency exists within either liposome or emulsion enriched nauplii. Therefore, this variability of the enrichment process could be the reason by which biochemical differences of the enriched nauplii in the feeding trial are attenuated, showing no important statistical differences among treatments in the lipid class and fatty acid contents. Contrary to what happens with the samples of the feeding trial taken during eight different days, nauplii of the enrichment experiment were sampled the same day, obviating daily differences in biological and physico-chemical conditions that contribute to this high variability in the enrichment efficiency. In this way, daily small changes in the naupliar densities, slight differences in the vitality of the nauplii after their separation from the cyst shells, and uncontrollable variations in the quality and quantity of the aeration employed in the enrichments could determine the achievement of variable results. Consequently, the analyses of the larvae, since they reflect the composition of the diets after 19 days of treatment, could serve to buffer daily variability. Indeed, biochemical composition differences do appear among experimental groups, as one can see in several biochemical parameters. For instance, DHA content in the experimental larvae showed differences between MLV and control treatments, although no significant differences in this EFA were found in the prey composition. Total lipid content also exhibited differences in the larvae, while such differences were not found in the diets. These differences between the composition of the larvae and their diets would support the caution with which the results obtained in the enrichment trial must be considered.

The present findings support the results of the study performed by Monroig et al. (2003) with European sea bass larvae, demonstrating the possibility of using liposome enriched nauplii as food for marine larvae, since survival and growth of gilthead sea bream larvae did not show differences among experimental groups. As a consequence, essential fatty acid requirements of gilthead sea bream larvae seemed to be satisfied by experimental diets or, perhaps, it demonstrates the importance of essential fatty acid balance (Sargent et al., 1997, 1999). In this way, DHA:EPA ratio is a very common biochemical pa-

parameter to evaluate the quality of diets used in marine larviculture. In this study, the values of this ratio were below natural amounts, as occurs in most of the diets used in marine larviculture (Bell et al., 2003; Estévez and Kanazawa, 2003; Morais et al., 2004), but these supposed deficiencies have not caused abnormal mortalities. In this way, two facts may have compensated for these deficiencies. Firstly, as mentioned in the introduction, the presence of higher percentages of polar lipids in the liposome-based diets may entail some advantages. Secondly, the lower lipid peroxide content in the tissues of the larvae fed liposome enriched nauplii can be beneficial to the larvae. Basal peroxide presence in krill phospholipids was one-fold lower than amounts encountered in original emulsion product. Moreover, mentioned susceptibility of TAG and FAEE to peroxidation, can lead to an extra production during the enrichment process, with the subsequent accumulation in the nauplii and, finally, in the larvae. Anyway, no consequence in terms of final survival or growth has been observed in the experimental larvae by the action of any concomitant nutritional benefit. Thus, in addition to the use of the classical parameters of condition (growth, survival), other specific nutritional condition indexes should be determined in order to emphasize these presumed advantages.

In summary, optimal protocols for *Artemia* nauplii enrichments with liposomes can vary from those stated for self-emulsifying complexes. Moreover, lipid incorporation in the nauplii through time seems to vary depending on method of preparation of the liposomes. However, quality of enrichments varied between enriched experiment nauplii and the diets of the larva nutrition trial, pointing to the existence of a high variability in the process of enrichment. Besides, enrichment of *Artemia* nauplii in polar lipids was confirmed to be difficult, but of putative benefit even with small increases. On the other hand, there is the evidence that liposome-based diets were demonstrated as useful to feed gilthead sea bream larvae.

All this encourages one to continue studying the variables associated with the enrichment process, like quality and quantity of aeration, lipid concentration and naupliar density, in order to find sources of variability and facilitate the production of reproducible diets for marine larviculture industry. Besides, the study of other indexes of larval nutritional status

need be carried out in order to determine further potential advantages of liposome-based diets.

Acknowledgements

This study has been funded by the Ministry of Education and Culture of the Spanish Government (project AGL2000-0135-P4-03). The authors thank Piscimar (Burriana, Spain) for providing the gilt-head sea bream larvae with which the study was carried out.

References

- Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238–252.
- Barclay, W., Zeller, S., 1996. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J. World Aquac. Soc.* 27, 314–322.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estévez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R., 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211–220.
- Christie, W.W., 1982. *Lipid Analyses*, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford (207 pp.).
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgeloos, P., 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155, 149–164.
- Estévez, A., Kanazawa, A., 2003. Effect of (n-3) PUFA and vitamin A *Artemia* enrichment on pigmentation success of turbot, *Scophthalmus maximus* (L). *Aquac. Nutr.* 1, 159–168.
- Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fukuzawa, K., Ikebata, W., Sohmi, K., 1993. Location, antioxidant and recycling dynamics of α -tocopherol in liposome membranes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39, s9–s22.
- Furuita, H., Takeuchi, T., Toyota, M., Watanabe, T., 1996. EPA and DHA requirements in early juvenile red sea bream using HUFA enriched *Artemia* nauplii. *Fish. Sci.* 62, 246–251.
- Geurden, I., Bergot, P., Schwarz, L., Sorgeloos, P., 1998. Relationship between dietary phospholipid classes and neutral lipid absorption in newly weaned turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 217–228.
- Han, K., Geurden, I., Sorgeloos, P., 2001. Fatty acid changes in enriched and subsequently starved *Artemia franciscana* nauplii enriched with different essential fatty acids. *Aquaculture* 199, 93–105.
- Hontoria, F., Crowe, J.H., Crowe, L.M., Amat, F., 1994. Potential use of liposomes in larviculture as a delivery system through *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 127, 255–264.

- Kanazawa, A., Teshina, S.-I., Sakamoto, M., 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 50, 39–49.
- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., 1992a. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 545–551.
- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., 1992b. Effects of phospholipids on lipid oxidation of a salmon oil model system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 237–242.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D., 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 357–364.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Amat, F., Sargent, J.R., 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture* 144, 339–352.
- Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, I., González, P., Amat, F., Hontoria, F., 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii in PUFA, phospholipids, and water-soluble nutrients using liposomes. *Aquac. Int.* 11, 151–161.
- Morais, S., Narciso, L., Pousao-Ferreira, P., 2004. Lipid enrichment for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on larval growth, survival and fatty acid profile. *Aquac. Int.* 12, 281–298.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V., Amat, F., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174, 155–166.
- New, R.R.C. (Ed.), 1990. *Liposomes. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford. (301 pp.)
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Olsen, R.E., Henderson, R.J., 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Mar. Biol. Ecol.* 129, 189–197.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1994. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comp. Biochem. Physiol.* 107A, 699–710.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117–127.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Estévez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217–229.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. *Biometry*. Freeman, New York. (859 pp.)
- Song, J.-H., Inoue, Y., Miyazawa, T., 1997. Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids, triacylglycerols, and ethyl esters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 2085–2088.
- Tackaert, W., Camara, M.R., Sorgeloos, P., 1991. The effect of dietary phosphatidylcholine in postlarval penaeid shrimp. I. Diet preparation. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *Larvi'91 — Fish and Crustacean Larviculture Symposium*, EAS Special Publication, vol. 15, pp. 76–79 (Gent, Belgium).
- Teshima, S., Kanazawa, A., Koshio, S., 1993. Recent developments in nutrition and microparticulate diets of larval prawn. *Isr. J. Aquac. - Bamidgeh* 45, 175–184.
- Urano, S., Iida, M., Otani, I., Matsuo, M., 1987. Membrane stabilization of vitamin E; interactions of α -tocopherol with phospholipids in bilayer liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146, 1413–1418.

Effect of aeration on the efficiency of *Artemia* enrichment with EFA-rich emulsion and liposomes

Óscar Monroig ^{a,*}, Juan Carlos Navarro ^a, Francisco Amat ^a,
Pedro González ^b, Francisco Hontoria ^a

^a Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Torre de la Sal, Castellón, Spain

^b Transtechnics, S.L. Jules Verne, 19, 08006 Barcelona, Spain

Received 29 July 2005; received in revised form 4 October 2005; accepted 4 October 2005

Abstract

A commercial emulsion and EFA-rich liposomes have been used as *Artemia* nauplii enrichment products in a study designed to determine the effect of the aeration on the enrichment efficiency and its importance as a source of variability in the final naupliar fatty acid content. With this purpose, fatty acid profiles of nauplii enriched under uncontrolled aeration conditions were compared to nauplii enriched under different controlled aeration modes. Concretely, both emulsions and liposomes were tested in six enrichment series resulting from the combination of three different airflows and two air diffusion systems. Moreover, the naupliar survival after the enrichment process was estimated since some mortality was previously recorded in liposome enrichments. The results revealed a small effect of aeration on both the EFA incorporation and naupliar survival in the emulsion treatment. However, liposome treated nauplii underwent the influence of the different aeration modes both in terms of EFA incorporation and naupliar survival. In general, the liposome enrichments showed the highest EFA incorporation when the enrichment procedures were carried out at low airflows. Besides, the use of airstones improved the enrichment efficiency at the lowest airflow, whereas this diffusion system produced a decrease of the EFA content in liposome enriched nauplii at the highest airflow. In spite of the unquestionable effect of aeration on the EFA enrichment in liposome enrichments, other concomitant factors must be acting in the process since variability still occurred even with the control of aeration.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Enrichment variability; Emulsion; Liposomes; Air diffusion system; Airflow

1. Introduction

Naupliar stages of the crustacean *Artemia* are widely used in aquaculture for the larval rearing of many marine species of fish and crustaceans. Generally, the use of *Artemia* nauplii, as well as other live prey as rotifers, requires the improvement of their nutritional value by

means of enrichment procedures. The process by which beneficial substances are included inside the body of live preys is known as bioencapsulation. This boosting process consists of an incubation of live preys in a medium with enrichment product. Non-selective feeding behavior of live preys makes the dispersed particles of the enrichment product incorporate in the composition and digestive tract of the prey.

Most of the enrichment products commercially available in the market have been developed to fulfil the larval essential fatty acid (EFA) requirements. Among

* Corresponding author. Tel.: +34 964 319500; fax: +34 964 319509.

E-mail address: oscar@iats.csic.es (Ó. Monroig).

them, enrichment diets based on both spray-dried cells of *Schizochytrium* sp. and self-emulsifying complexes are the most extensively used products in marine larviculture. Focusing the attention on self-emulsifying complexes, these products are mainly formulated as emulsions of EFA containing fish crude triglycerides and fatty acid ethyl esters. Among EFAs, arachidonic (ARA, 20:4n-6), eicosapentaenoic (EPA, 20:5n-3), and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) are the most important in fish larval nutrition (Sargent et al., 1997; Izquierdo et al., 2000).

A novel way to enhance the nutritional value of *Artemia* nauplii has been proposed on the use of liposomes with high content of highly unsaturated fatty acid (HUFA) phospholipids (McEvoy et al., 1996; Monroig et al., 2003, in press). Liposomes are lipid particles composed by a phospholipid bilayer, enclosing an internal aqueous space. The existence of such an internal compartment differentiates liposomes from emulsions, placing liposomes as a potential integral system to provide both hydrophilic and lipophilic nutrients. Moreover, the presentation of EFA in the form of phospholipid molecules is expected to bring nutritional benefits to the larvae (Kanazawa et al., 1985; Koven et al., 1993; Teshima et al., 1993; Coutteau et al., 1997; Sargent et al., 1997; Geurden et al., 1998). Although the enhancement of the polar lipid fraction has not been considered to be possible (Tackaert et al., 1991; Rainuzzo et al., 1994), previous studies showed the possibility of increasing the polar lipid fraction of *Artemia* nauplii enriched with highly unsaturated liposomes (McEvoy et al., 1996; Monroig et al., 2003, in press).

Since diets must satisfy the essential nutrient demands of animals during the different production stages, the reproducibility of the nutritional quality of diets destined to animal culture is considered to be a basic aspect in the achievement of successful productions. Marine finfish aquaculture is not an exception, but a special consideration must be done in the case of larval rearing, since the use of formulated diets is not possible in most species. As mentioned above, the need for live prey enrichment procedures makes reproducibility of marine larval diets a difficult goal to achieve because of the existence of inherent variability in the process itself and also because of the metabolic action of live prey on the enrichment products (Rainuzzo et al., 1994; McEvoy et al., 1996; Navarro et al., 1999). The study of variables implied in the occurrence of such variability can lead to the obtention of well-controlled diets and, in a last term, to better larval performances. The effectiveness of the *Artemia* nauplii enrichment depends on several conditions under which the process

takes place. Duration of the incubation of the newly hatched nauplii in the enrichment medium, temperature, and naupliar density are some of the most important factors to take into account (Léger et al., 1986). Standard protocols followed with emulsion enrichments consist of incubations during 21–24 h, at a temperature usually set at 28 °C, and at a naupliar density ranging from 100 to 300 nauplii ml⁻¹. These conditions were originally established to optimize developmental and physiological changes of the nauplii during the first hours of life, corresponding to the time when the enrichment is carried out. Some authors pointed out to the influence of other factors affecting the enrichment process, which cannot be totally controlled, and lead to variable performances (Furuita et al., 1996; Navarro et al., 1999; Han et al., 2000). Aeration, as Navarro et al. (1999) noted, could be considered a crucial aspect in the finding of explanations to such variability. Aeration during the enrichment provides dissolved oxygen to satisfy the respiratory requirements of nauplii, and also avoids their settlement on the bottom of the enrichment tank, and, hence, their death. But aeration can originate problems derived from its physical and chemical effects on the enrichment process. Firstly, physical integrity of lipid particles can be affected by the quantity (airflow) and quality (size of bubbles) of the aeration applied. Secondly, high oxygen levels can accelerate autoxidation processes of the unsaturated fatty acids (McEvoy et al., 1995).

The aim of this study was to determine the effect of quantity and quality of aeration on the EFA enrichment process when using emulsion- and liposome-based products, as a first attempt to account for certain poor and variable EFA enrichments. With this purpose, the EFA content of nauplii used in a larval feeding trial, which were enriched under uncontrolled aeration conditions, was compared to controlled aeration enrichments. Besides, naupliar survival during the enrichment procedure was estimated since previous studies pointed to the existence of notable mortality in liposome treatments.

2. Materials and methods

2.1. Nauplii from the larval feeding trial (uncontrolled aeration enrichment)

Three types of liposomes were formulated with krill phospholipid (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) as unique lipophilic component, except for those made by detergent solubilization, where a small amount of vitamin E was included. The phospholipid source was an extract from krill mostly composed of

phosphatidylcholine and phosphadidylethanolamine, containing a percentage of n-3 HUFA around 48% of total fatty acids (Monroig et al., in press). Multilamellar vesicles (MLV) were prepared by the method proposed by Bangham et al. (1965), but using filtered seawater as the aqueous phase. Large unilamellar vesicles (LUV) were obtained by extrusion (LUV extrusion) of MLV suspension using an extruder LiposoFast equipped with 100 nm polycarbonate membranes (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada). A second type of unilamellar liposomes was prepared by a detergent solubilization methodology (LUV detergent). Concretely, two solutions, a micelle suspension composed by a mixture of krill phospholipid extract and the detergent sodium cholate (7:10, mol/mol), and a second saline solution (0.9% NaCl), were mixed and dialyzed allowing the removal of detergent from the micelle solution. The continuous and very rapid detergent removal spontaneously leads to the formation of liposomes. More details about these liposome preparation methodologies can be found in New (1990).

Artemia nauplii, obtained from the hatching of Inve EG cysts (Ghent, Belgium), were daily enriched with the three liposome preparations, using a commercial emulsion as control treatment (Super Selco, Inve, Ghent, Belgium). Enrichments were initially carried out under an estimated airflow of 1.2 l min^{-1} (1 pm), although the occurrence of naupliar mortalities in the liposome enrichments made us to increase aeration two fold. The estimation of the air flux was carried out a posteriori by measuring the volume of air entering in an inverted water-filled graduated cylinder. The aeration was applied in each enrichment vessel by means of 0.5-cm-diameter section glass tubes connected to an air supplying system. Enrichments were accomplished in 1-l cylinder-conical glass vessels placed in a thermostated bath at $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ of temperature, and naupliar densities were fixed approximately at $300 \text{ nauplii ml}^{-1}$. Lipid concentration was 0.5 g l^{-1} , dispensing the enrichment product, liposomes or emulsion, in a single dose at the beginning of the incubation. After incubation periods ranging from 21 to 23 h, enriched nauplii were collected by filtration of the enrichment medium through a $100 \text{ }\mu\text{m}$ plankton mesh and gently washed with tap water. After dispensing naupliar ration to the larvae, the rest of the nauplii were frozen and freeze-dried for further analyses.

2.2. Nauplii from the controlled aeration enrichment series

Six enrichment series were carried out as a result of the combination of three different airflows (0.6, 1.0 and

3.0 l pm) and two different air diffusion systems (tubes and airstones). The enrichments under the six possible combinations of airflow and diffusion system were carried out with nauplii obtained from the hatching of six different 10 g batches of Inve EG cysts (Ghent, Belgium). The effect of each combination on the enrichment effectiveness, in terms of EFA incorporation and naupliar survival, was tested for the commercial emulsion Super Selco (Inve, Ghent, Belgium) and LUV detergent, both as models of emulsion- and liposome-based products. The methodology of preparation of this type of liposomes was the same followed in the enrichments of the larval feeding trial. Airflows were individually controlled in each enrichment cylinder-conical glass vessel by means of a rotameter (Key Instruments, Trevose, PA, USA). The two different air diffusion systems consisted of either a 0.5-cm-diameter section glass tube which provided large bubbles (the same used in the enrichments of the larval trial) or a stone diffuser which produced small size bubbles. Table 1 shows the combinations of airflow and air diffusion system set in each series. Newly hatched nauplii of each cyst batch were submitted to the enrichment process using the commercial emulsion or LUV detergent in triplicate vessels. Lipid concentration and temperature were the same as in the experiment of larval nutrition. Every effort was made to set naupliar densities around $300 \text{ nauplii ml}^{-1}$ within the six enrichment series. In this experiment, duration of the incubation in the enrichment medium was exactly 21 h. After this period, nauplii were collected in a $100 \text{ }\mu\text{m}$ plankton mesh and gently washed with tap water and finally with distilled water in order to eliminate rests of salt. Then, nauplii were frozen at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ and freeze-dried.

Survival of the nauplii during the enrichment was obtained by estimating the initial and final density. Thus, the live nauplii from six $100\text{-}\mu\text{l}$ aliquots taken from each enrichment vessel at the beginning and after 21 h were counted and the average calculated. Evaporation during the *Artemia* enrichments was estimated to

Table 1
Combinations of air flows and aeration systems established in the controlled aeration enrichment series

	Air flow (l pm ^a)	Aeration system
Series 1	0.6	0.5-cm-diameter tube
Series 2	1.0	0.5-cm-diameter tube
Series 3	3.0	0.5-cm-diameter tube
Series 4	0.6	Airstone
Series 5	1.0	Airstone
Series 6	3.0	Airstone

^a Liters per minute.

Table 2
Selected fatty acid (percentage of total fatty acids) of enrichment products

Fatty acid	Commercial emulsion	Krill extract
16:0	2.8 (0.2) ^a	26.5 (0.2) ^b
18:1	12.2 (0.9) ^a	9.6 (0.0) ^b
20:4n-6	1.4 (0.1) ^a	0.7 (0.0) ^b
20:5n-3	24.0 (0.8) ^a	29.3 (0.1) ^b
22:6n-3	27.8 (0.8) ^a	17.2 (0.1) ^b
Saturates	6.7 (0.3) ^a	30.0 (0.2) ^b
Monounsaturates	22.2 (0.7) ^a	13.3 (0.1) ^b
Polyunsaturates	68.0 (1.2) ^a	53.8 (0.2) ^b
Total n-3	60.3 (1.7) ^a	51.0 (0.2) ^b
Total n-6	8.1 (0.5) ^a	2.9 (0.1) ^b
HUFA n-3	57.7 (1.7) ^a	47.9 (0.1) ^b
HUFA n-6	2.5 (0.1) ^a	0.9 (0.1) ^b

Data represent means (S.D.) ($n=3$). Variables sharing the same super-script letter within a row are not significantly different from each other (Student's t -test, $P \leq 0.05$).

HUFA n-3: $\geq 20:3n-3$; HUFA n-6: $\geq 20:2n-6$.

correct the naupliar density at the end of the incubation. In order to determine the effect of extreme air condition itself on the naupliar survival, the survival percentage of nauplii incubated with an airflow of 3.0 l pm applied with airstones and no enrichment product was estimated.

2.3. Total lipid extraction and fatty acid analyses

Total lipids were extracted from freeze-dried samples following the method of Folch et al. (1957). Analyses of fatty acids were carried out following the methods described in Monroig et al. (in press).

2.4. Statistical analysis

Biological and analytical data are expressed as means \pm standard deviations. Homogeneity of variances was checked by Barlett's test. In cases of homoscedasticity, differences between treatments were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed, where appropriate, by Tukey's multiple comparison test (Sokal and Rohlf, 1981). If heterogeneity of variances existed, robust tests were applied. Welch's test was used to check differences between treatments and Game–Howell's test to establish differences among groups. In the controlled aeration enrichment series, fatty acid percentages of nauplii enriched with the emulsion or liposome were statistically analyzed separately, focusing the study not on the comparison between both products, but on the effect produced by the different aeration conditions on the enrichment effectiveness reached by each enrichment product. Fatty acid compo-

sitions of the krill phospholipid extract and the commercial emulsion were compared with a Student's t -test. Comparisons of the means with P values less or equal than 0.05 were considered significantly different. All the statistical analyses were carried out using the SPSS statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Nauplii from the larval feeding trial (uncontrolled aeration enrichment)

The fatty acid profiles of the emulsion and the krill phospholipid extract employed in the manufacture of the three types of liposomes are shown in Table 2. The presence of saturated fatty acids in the krill extract is noteworthy, with a special contribution of the palmitic acid (16:0) to this fatty acid group. However, both products contain high percentages of polyunsaturated fatty acids, with significantly higher values in the emulsion (68.0 ± 1.2) compared to the phospholipid extract (53.8 ± 0.2). In this sense, the percentage of DHA is also significantly higher in the commercial emulsion (27.8 ± 0.8) compared to the composition of the krill phospholipid extract (17.2 ± 0.1).

The analyses of fatty acids from larval feeding nauplii enriched under uncontrolled aeration conditions are shown in the Fig. 1. Whereas the ARA content did not show differences among treatments, EPA and DHA percentages were significantly higher in nauplii enriched with the emulsion and MLV treatments compared to

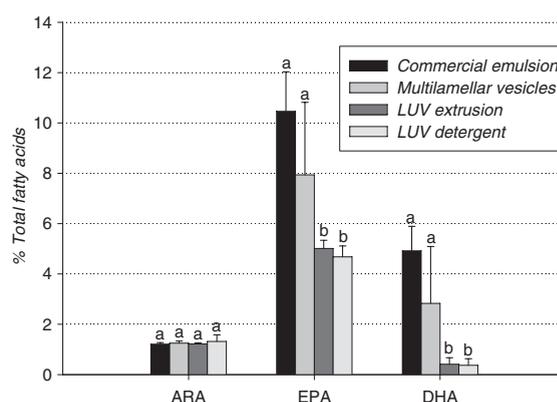


Fig. 1. Fatty acid profiles from nauplii enriched with a commercial emulsion and three different liposome preparations (see abbreviations in the text) from the uncontrolled aeration enrichment trial. Values are expressed as percentages of total fatty acids. Error bars are standard deviations ($n=5$). Treatment means sharing the same letter are not significantly different from each other (ANOVA, $P \leq 0.05$). ARA = arachidonic acid; EPA = eicosapentaenoic acid; DHA = docosahexaenoic acid.

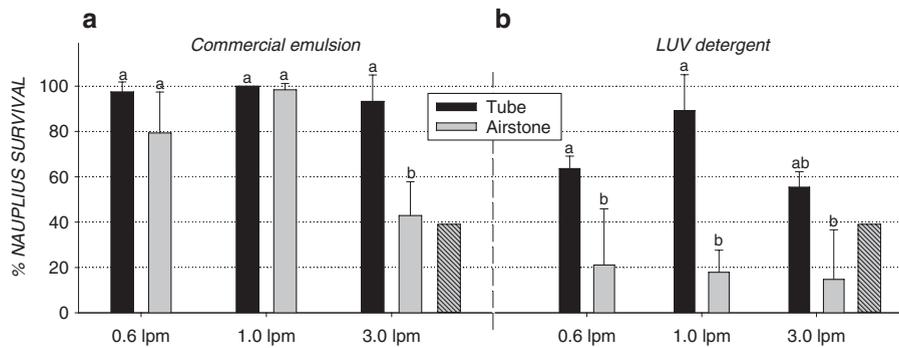


Fig. 2. Naupliar survival percentages estimated after 21 h of enrichment with a commercial emulsion (a) and LUV detergent liposomes (b) under controlled aeration conditions. Grey striped bars represent survival percentage of nauplii submitted to incubations without any enrichment product at 28 °C and high air flow (3.0 lpm) applied with airstones. Error bars are standard deviations ($n=3$). Treatments sharing the same letter in each panel (a and b) are not significantly different from each other (two one-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

both LUV preparations. The variability of these EFA percentages was remarkably high in the liposome treatments, although the occurrence of certain variability in the emulsion enriched nauplii was also observed (note the error bars of Fig. 1).

3.2. Nauplii from the controlled aeration enrichment series

Survival of *Artemia* nauplii after 21 h of incubation in the enrichment medium is shown in the Fig. 2. In the emulsion case (Fig. 2a), no differences in naupliar survival were observed among the different combinations of airflow and diffusion system, except for the highest airflow (3.0 lpm) applied by means of airstones, where survival of the nauplii significantly decreased in com-

parison to the other treatments ($P \leq 0.05$). On the other hand, the enrichments with LUV detergent (Fig. 2b) produced high mortalities in particular situations. Thus, the use of stone diffusers produced a significant decrease of naupliar survival at 0.6 and 1.0 lpm, compared to the results found at the same airflow levels applied by means of glass tubes ($P \leq 0.05$). In general, the naupliar survival tended to be maximal when aeration was applied by glass tubes at a flow of 1.0 lpm, although no statistical differences could be established if compared to nauplii enriched with the same air diffusion system at 0.6 or 3.0 lpm (Fig. 2b). The appearance of three *Artemia* nauplii individuals incubated during 21 h with LUV detergent is shown in Fig. 3. As can be seen in the figure, the normal nauplius (Fig. 3a) showed a normal aspect of filtratory structures and tissular

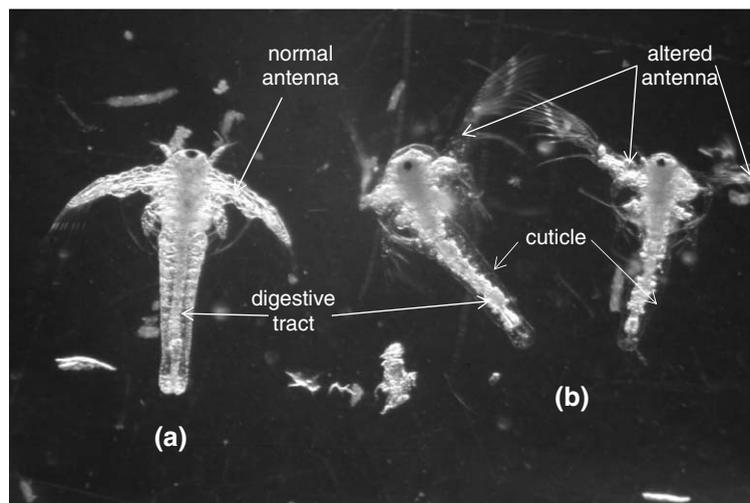


Fig. 3. Appearance of three *Artemia* nauplii after being submitted to 21 h incubation with liposomes at 3.0 lpm using airstones as air diffusion system: (a) normal nauplius; (b) two nauplii with altered body structure. Note the loss of antennules rigidity and the loss of body components especially apparent in the thorax where cuticle is visible in altered nauplii.

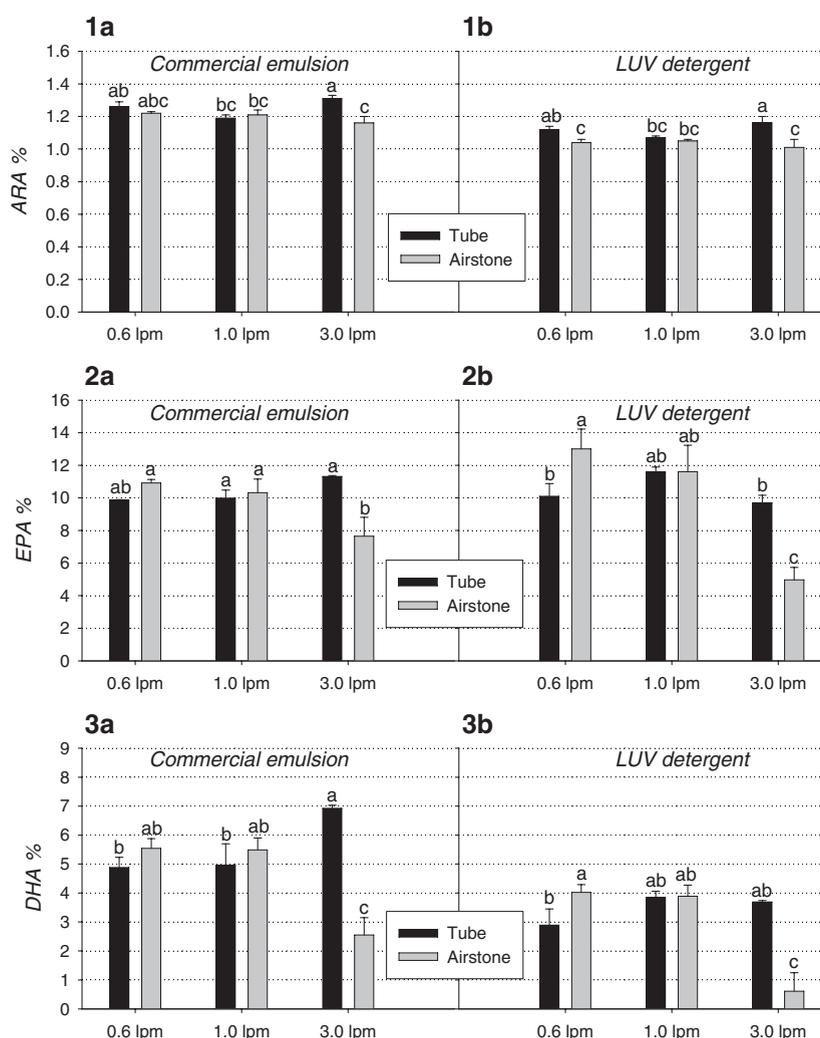


Fig. 4. Percentages of arachidonic (ARA) (4.1a, b), eicosapentaenoic (EPA) (4.2a, b) and docosahexaenoic (DHA) (4.3a, b) acids from total lipid fatty acids of *Artemia* nauplii enriched with a commercial emulsion and LUV detergent liposomes under the different combinations of three air flows (0.6, 1.0 and 3.0 l pm) and two air diffusion systems (tube and airstone). Errors bars are standard deviations ($n=3$). Treatments sharing the same letter in the six figures are not significantly different from each other (six one-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

structures around the digestive tract. On the contrary, altered nauplii (Fig. 3b) presented partial rupture of filtratory–natatory appendices, a loss of tissular components around the digestive tract which turned the cuticle conspicuous, and a notably disrupted digestive tract. Fig. 2 also shows the low survival percentage of nauplii incubated with extreme air conditions (airflow of 3.0 l pm and high air diffusion) and no enrichment product.

Fig. 4.1, 4.2 and 4.3 show the percentages of ARA, EPA and DHA, respectively, from nauplii enriched with the emulsion and krill LUV detergent under the different aeration modes. In the case of the emulsion, the results showed a minimal effect of aeration on the incorporation of ARA, EPA and DHA in enriched nau-

plii (Fig. 4.1a, 4.2a and 4.3a). The only remarkable effect is observed by the significant decrease of all these EFA when nauplii were enriched in aeration conditions where airstones and airflows of 3.0 l pm were combined. On the other hand, enrichments with liposomes showed significantly lower ARA percentages when enrichments carried out with glass tubes at 0.6 and 3.0 l pm are compared with their analogues performed with airstones (Fig. 4.1b). In the case of EPA and DHA, the use of airstones as air diffusion system acted in a different way depending on the airflow (Fig. 4.2b and 4.3b). At low flows (0.6 l pm), a higher incorporation of both EFA was observed if airstone enriched nauplii are compared against those enriched

using glass tubes. At high flows (3.0 l pm) both EFA percentages displayed a significant decrease when airstones were employed ($P \leq 0.05$). Besides, no effect was observed at intermediate levels (1.0 l pm).

If survival and EFA contents of enriched nauplii are compared, the results indicated that a clear positive relation could be established in the case of the emulsion, since both parameters followed the same tendency. As presented earlier, the combination of airstones and airflows (3.0 l pm) led to the lowest survival and EFA levels. If liposomes are considered, no positive relations between survival and EFA content could be established, since enrichments with liposomes carried out with airstones resulted in low naupliar survivals. However, the

EPA and DHA levels of nauplii enriched at moderate airflow rates (0.6 or 1.0) using airstones equaled or exceeded these EFA contents when tubes were used as air diffusion system.

Coefficients of variation of the ARA, EPA and DHA percentages from the enriched nauplii from the uncontrolled aeration trial are compared against the controlled air condition enrichment series in Fig. 5. In general, although variable results still occurred, the nauplii of the uncontrolled aeration trial showed higher coefficients of variation than those obtained in the controlled air enrichment series. Anyway, the combination of airstones and high airflows (3.0 l pm) gave rise to a high degree of variability, especially in the EPA and DHA

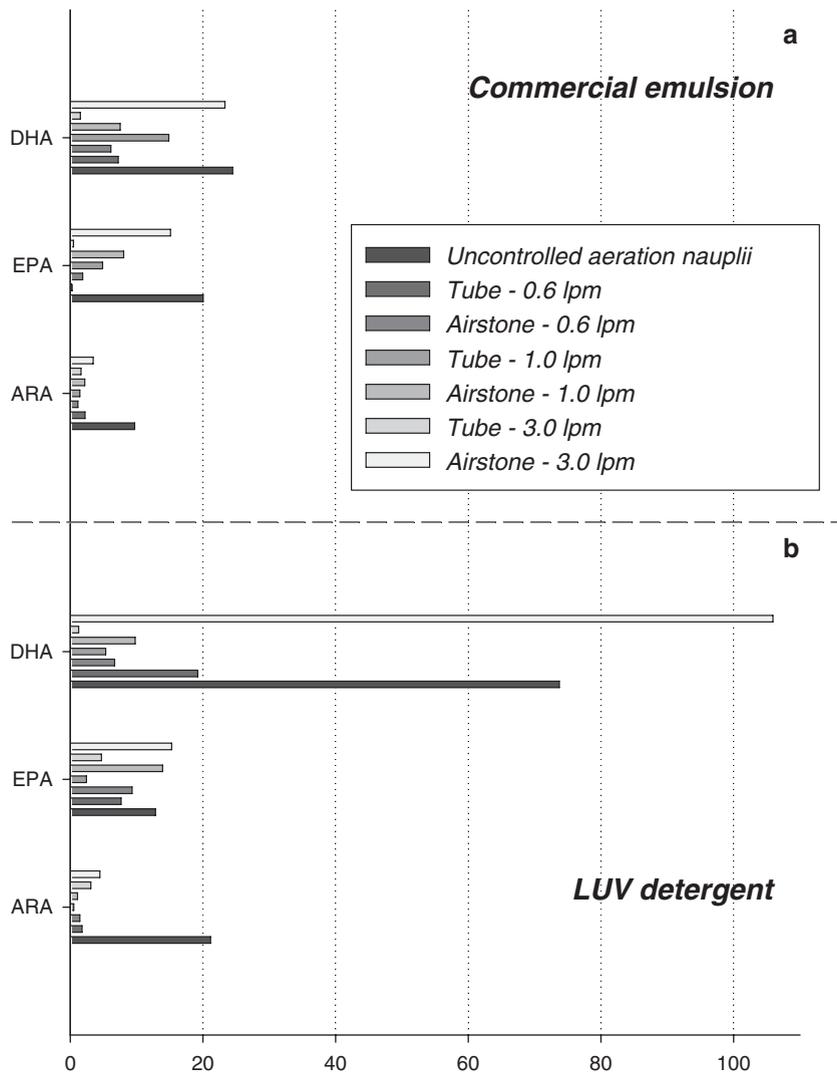


Fig. 5. Coefficients of variation of percentages of arachidonic (ARA), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids of nauplii from the uncontrolled aeration trial (black bars) and nauplii from the controlled aeration experiment series (grey bars), enriched with the commercial emulsion (a) and LUV detergent (b).

percentages of nauplii enriched with both the emulsion and liposomes.

4. Discussion

Previous studies concerning different aspects of live prey enrichment conditions state the need of an adequate aeration system to optimize these boosting procedures (Navarro et al., 1999; Babu et al., 2001; Sorgeloos et al., 2001; Kolkovski et al., 2004). Besides, manufacturers of emulsion-based commercial products recommend the use of small size bubbling systems in order to obtain maximal enrichment efficiencies. Nevertheless, the results of this study would indicate a low influence of either the airflow magnitude or the degree of air diffusion in enrichments with the commercial emulsion. Only a notable decrease of EFA incorporation was observed when the highest airflow tested was applied by means of airstones. This last finding could be due to the high turbulence present in the enrichment medium which could interfere with the normal swimming behavior of nauplii as well as produce a damaging effect on naupliar filtratory structures, both factors contributing to a low enrichment product incorporation. On the contrary, liposome enrichments were particularly affected by aeration, according to the wide variability of EFA contents among the different treatments. As occurred with the commercial emulsion, the low EFA values observed in liposome enrichments carried out with high airflows and airstones could also be the result of the aggressive turbulent conditions cited above. However, the use of airstones improved EPA and DHA incorporation at an airflow of 0.6 l pm if compared with the enrichment carried out with the glass tube as air diffusion system. A possible explanation to this result could be related to oxygen deficiencies in the enrichment media. In this sense, Lavens and Sorgeloos (1996) recommended to maintain oxygen levels above 4 mg l⁻¹ in order to obtain an optimum level of EFA incorporation during the *Artemia* enrichment. The airstones, since they facilitate the oxygenation of the enrichment medium, would cover naupliar respiratory demands at the lowest airflow. On the contrary, the large size of bubbles produced by the glass tubes implies a minor gas exchange surface which would limit oxygen availability. Consequently, normal biological functions of the nauplii, filtratory activity included, would be depressed. This oxygen deficit can become particularly acute in liposome enrichments because of the presence of dead nauplii in the medium which accelerate oxygen consumption through the action of aerobic microorganisms. The occurrence of naupliar mortality in liposome enrichments is discussed below.

Very few studies show data about the naupliar survival during the enrichment process with oil emulsion products (Harel et al., 1999) and none has been found when liposomes are employed as enrichment product. The evidence here presented has confirmed that the use of liposomes in live prey enrichments produces high naupliar mortalities during the incubations. The use of airstones decreased survival in enrichments with liposomes at any airflow, although a notable mortality was still observed in enrichments carried out with the tubular diffusion systems. The lethal effect observed in the liposome enrichments seems to be a consequence of two processes related to their physico-chemical properties. Firstly, the application of aeration in a medium with tensio-active elements as liposomes causes the formation of foam. As bubbling goes on, nauplii are removed from the enrichment medium imbibed in the liquid fraction of the foam, leaving the nauplii stuck on the walls of the enrichment vessel where they die. This effect is more important as more bubbles are formed, which occurs with high airflows and high degree of air diffusion. Secondly, the intermembrane transfer of lipid components takes place upon close approach of the phospholipid bilayer of the liposomes and the cell bilayers (New, 1990). Thus, the hydrophobic carbon chain moiety of the bilayer structure of phospholipids may act as a collector of naupliar lipid components, producing the 'washing' of naupliar vital components. Branchiopoda are characterized by the presence of a fine cuticle, and, consequently, a poor protection and increasing susceptibility to this washing. Fig. 3 illustrates this hypothesis since a loss of body compounds of the digestive tract surrounding tissues is apparent when normal and altered nauplii are compared. Although not presented in this study, analyses carried out on lipid extracts from the enrichment medium would confirm the presence of high amounts of naupliar carotenes (basically, canthaxanthin) in samples corresponding to liposome enrichments, whereas the presence of those pigments would be negligible in emulsions (unpublished data). Nevertheless, important naupliar mortality in emulsion enrichments was observed when high airflows and high degree of air diffusion were combined, despite the fact that emulsions did not produce foam nor pigment washing. The high turbulent conditions above exposed as a cause of the depression of naupliar filtratory activity could also lead to important naupliar mortality. Indeed, incubations of *Artemia* nauplii at the same conditions set in this study, but without dispensing any enrichment diet confirm a high naupliar mortality rate.

In the light of these results, the use of liposomes to enrich *Artemia* nauplii could be optimized if procedures

were carried out under the consideration of some aspects. Firstly, the use of tanks with sections of 0.5 or 1.0 m of diameter, common in hatchery facilities to carry out live prey enrichments, would reduce the lethal effect produced by the foam formed by the presence of liposomes. In such circumstances, foam could not be extended to the whole section of the tank and the removal of the nauplii would be minimal. Secondly, the use of airstones has demonstrated significantly improves EPA and DHA enrichments at low airflows (0.6 l pm). Therefore, the combination of wide section tanks and low aeration rate applied by high capability diffusion systems would maximize EFA incorporation and naupliar survival in liposome enrichment procedures. Although not tested in the present study, an alternative possibility to optimize liposome enrichments would imply the use of pure oxygen, instead of air, as source of oxygen in the enrichment medium. Thus, minimal gas flow could be applied reducing the above-mentioned turbulent damaging effect, foam formation, and avoiding potential anaerobic conditions. Although high oxygen content would contribute to the peroxidation of HUFA (McEvoy et al., 1995), the self-antioxidant properties of phospholipids have been demonstrated to protect autoxidation of the fatty acid chains of these lipid molecules (King et al., 1992a,b; Song et al., 1997), making the use of pure oxygen a promising option for liposome enrichment procedures.

As seen from the analyses carried out on nauplii collected during the larval trial and enriched under uncontrolled aeration, levels of EFA were very variable in all treatments, including those of nauplii enriched with the commercial emulsion. Nauplii from the larval trial belonged to enrichments carried out during incubation periods ranging from 21 to 23 h. This varying incubation time could be considered as a potential source of experimental variability in the samples. However, Monroig et al. (in press) analyzed nauplii incubated during 21 h and starved the following 3 h, reflecting minor differences in the EFA content of nauplii enriched with the same emulsion, as well as MLV and LUV detergent liposomes. The results of the present study state the existence of variability in the EFA enrichments of *Artemia* nauplii, as previously reported in the bibliography (Lavens and Soorgelos, 1996; Navarro et al., 1999; Han et al., 2000). Lavens and Soorgelos (1996) presented the inconsistency of n-3 HUFA enrichment efficiencies, regardless if *Artemia* nauplii were enriched by the same person or by several people. Furthermore, the results of a field study were presented in that paper, indicating that the average n-3 HUFA levels in enriched *Artemia* nau-

plii varied among different hatcheries. These authors pointed to the need of standardization protocols in order to obtain consistent results. In this way, Kolkovski et al. (2004) emphasized the need to control of the variables implied in the hatching and the live food enrichment process to avoid the above mentioned variability in the enrichment efficiencies. Possible causes of such variability can be originated by an insufficient control of important variables as aeration, naupliar density, time of incubation, etc., leading to a wide spectrum of conditions under which enrichments are carried out. In the controlled aeration enrichment series, every effort was made to control most of the variables in order to keep experimental conditions constant during the performance of the series. Indeed, the EFA contents of nauplii in these series generally showed less variability than those observed in the nauplii from the uncontrolled aeration enrichments, although it did not disappear under certain aeration conditions. This fact implies the consideration of other factors as sources of variability in the enrichment process, which have not been considered. Among them, the naupliar density in the enrichment exhibited variability among the different enrichment vessels of all the series, although special attention was paid to set this variable at the level around 300 nauplii ml⁻¹ (Lavens and Soorgelos, 1996). However, this value was occasionally exceeded, possibly leading to unfavourable conditions which finally resulted in poorer enrichments. Another possible source of variability can come from the vitality degree of the nauplii at the incubation starting point. The steps during the separation of the newly hatched nauplii from the cyst shells imply aggressive handling effects. Osmotic shocks, as well as hypoxic conditions due to their crowding on the bottom of the separation containers, would determine their physiological status at the beginning of the incubation. In this sense, the naupliar filtratory capability could be depressed, as argued in the case of potential hypoxic conditions, leading to final poor enrichment efficiency. Navarro et al. (1999) considered the variability of the *Artemia* enrichment coming from differences in the enrichment conditions, e.g., amounts of dissolved oxygen, size of bubbles, hydrodynamics in the enrichment vessels which may influence the enrichment itself or, secondarily, the developmental rates of the nauplii and thus their metabolic rates. Besides, the size distribution of lipid particles in the enrichment medium, either emulsion micelles or liposomes, could account for differences in the efficiency of enrichment adding variability to the process (Han et al., 2000; Gelabert-Fernández, 2001).

In summary, the effect of the quantity and quality of aeration on the enrichment should be considered according to the results obtained in this study. This effect was more important when the enrichment product is based on liposomes, with a lower effect in the case of emulsions. However, the existence of variability remained present even when the aeration conditions were controlled. In order to explain this variability, other uncontrolled factors must be taken into account, as well as their variations among the replicates of the experimental groups. Moreover, the use of liposomes gave rise, in certain circumstances, to important high naupliar mortality during the incubation in the enrichment medium, while these mortality events did not normally occur when emulsions were employed. The use of higher diameter tanks and low aeration rate applied by high diffusion systems would maximize EFA incorporation and naupliar survival in liposome enrichments. Besides, the antioxidant properties of phospholipids make the use of pure oxygen a noteworthy option in liposome enrichments, since foam formation, hypoxic conditions and turbulence damaging effect could be minimized at low gas flows.

Acknowledgements

This study has been funded by the Ministry of Education and Culture of the Spanish Government (project AGL2000-0135-P4-03).

References

- Babu, M.M., Marian, P.M., Kitto, M.R., 2001. A cradle aeration system for hatching *Artemia*. *Aquacult. Eng.* 24, 85–89.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238–252.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgeloos, P., 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155, 149–164.
- Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Furuita, H., Takeuchi, T., Toyota, M., Watanabe, T., 1996. EPA and DHA requirements in early juvenile red sea bream using HUFA enriched *Artemia* nauplii. *Fish. Sci.* 62, 246–251.
- Gelabert-Fernández, R., 2001. *Artemia* bioencapsulation: I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *J. Crustac. Biol.* 21, 435–442.
- Geurden, I., Bergot, P., Schwarz, L., Sorgeloos, P., 1998. Relationship between dietary phospholipid classes and neutral lipid absorption in newly-weaned turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 217–228.
- Han, K., Geurden, I., Sorgeloos, P., 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183, 335–347.
- Harel, M., Ozkizilcik, S., Lund, E., Behrens, P., Place, A.R., 1999. Enhanced absorption of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) in *Artemia* nauplii using a dietary combination of DHA-rich phospholipids and DHA-sodium salts. *Comp. Biochem. Physiol.* 124B, 169–176.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernández-Cruz, C. M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 97–107.
- Kanazawa, A., Teshima, S.-I., Sakamoto, M., 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 50, 39–49.
- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., 1992a. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 545–551.
- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., 1992b. Effects of phospholipids on lipid oxidation of a salmon oil model system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 237–242.
- Kolkovski, S., Curnow, J., King, J., 2004. Intensive rearing system for fish larvae research: II. *Artemia* hatching and enriching system. *Aquacult. Eng.* 31, 309–317.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D., 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 357–364.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Tech. Pap. 361, 295.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24, 521–623.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture* 134, 101–112.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Amat, F., Sargent, J.R., 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture* 144, 339–352.
- Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, I., González, P., Amat, F., Hontoria, F., 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii in PUFA, phospholipids, and water-soluble nutrients using liposomes. *Aquacult. Int.* 11, 151–161.
- Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, F., Bermejo, A., Hontoria, F., in press. Enrichment of *Artemia* nauplii in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V., Amat, F., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174, 155–166.
- New, R.R.C. (Ed.), 1990. *Liposomes. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford (U.K.). 301 pp.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1994. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comp. Biochem. Physiol.* 107A, 699–710.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117–127.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. *Biometry*. Freeman, New York (U.S.A.). 859 pp.
- Song, J.-H., Inoue, Y., Miyazawa, T., 1997. Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids,

- triacylglycerols, and ethyl esters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 2085–2088.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., Candrea, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200, 147–159.
- Tackaert, W., Camara, M.R., Sorgeloos, P., 1991. The effect of dietary phosphatidylcholine in postlarval penaeid shrimp: I. Diet preparation. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), Larvi'91—Fish and Crustacean Larviculture Symposium. EAS Special Publication No. 15, Ghent, Belgium, pp. 76–79.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Koshio, S., 1993. Recent developments in nutrition and microparticulate diets of larval prawn. *Isr. J. Aquac.-Bamidgeh* 45, 175–184.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Aquaculture 261 (2006) 659–669

Aquaculture

www.elsevier.com/locate/aqua-online

Research paper

Effects of naupliar density, product concentration and product dosage on the survival of the nauplii and EFA incorporation during *Artemia* enrichment with liposomes

Óscar Monroig^a, Juan Carlos Navarro^a, Francisco Amat^a,
Pedro González^b, Francisco Hontoria^{a,*}

^a Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Torre de la Sal, Castellón, Spain

^b Transtechnics, S.L. Jules Verne, 19, 08006 Barcelona, Spain

Received 7 July 2006; accepted 29 August 2006

Abstract

In order to determine an optimal enrichment protocol with krill phospholipid liposomes, three different experiments were carried out to evaluate the effects of naupliar density, the concentration of liposome, and the number of doses delivered to the nauplii on the survival and the essential fatty acid (EFA) bioencapsulation in *Artemia* nauplii. No survival differences were found between the different liposome treatments and the control nauplii enriched with a commercial emulsion. This result confirms that previously described mortalities during *Artemia* enrichment with liposomes can be minimized and controlled. On the other hand, the EFA incorporation obtained from the three experiments indicates that maximal bioencapsulation is achieved when incubations are carried out under naupliar densities of 300 nauplii ml⁻¹, where liposomes are dispensed in a single dose at the beginning of the incubation yielding a concentration of 0.5 g l⁻¹. These findings complete those obtained in two preliminary studies, and propose a well defined enrichment protocol with krill liposomes as an alternative complementary method to improve the nutritional value of the *Artemia* nauplii used as food for marine fish larvae.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Enrichment protocol optimization; Naupliar density; Liposome concentration; Liposome dosage; Naupliar survival

1. Introduction

The low acceptance of formulated diets by marine fish larvae has been circumvented by using live preys, essentially, rotifers and the naupliar stages of the crustacean *Artemia*. However, these organisms lack long chain polyunsaturated fatty acids which are essential for marine teleosts (Izquierdo, 1996; Sargent et al., 1997). The dietary essential fatty acids (EFA) for marine fish are

represented by the arachidonic (ARA, 20:4 n-6), eicosapentaenoic (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acids (DHA, 22:6 n-3) (Sargent et al., 2002). In order to improve their nutritional value, live preys are submitted to enrichment procedures in which EFA-rich products are incorporated through the passive filtratory behaviour of the live preys (Léger et al., 1986). Besides the initial use of phytoplanktonic algae (Wickins, 1972; Watanabe et al., 1978, 1982), a wide variety of products have been developed for this purpose. Among them, those based on spray-dried cells of *Schizochytrium* sp. (Barclay and Zeller, 1996; Bransden et al., 2005) and self-emulsifying

* Corresponding author. Tel.: +34 964 319500; fax: +34 964 319509.
E-mail address: hontoria@iats.csic.es (F. Hontoria).

lipid complexes (Léger et al., 1986; McEvoy et al., 1997; Villalta et al., 2005a,b) are the most habitual products used in hatcheries worldwide.

Since liposomes can be formulated with marine phospholipids, some studies have proposed their use as an alternative way to enhance the EFA content of live preys (McEvoy et al., 1996; Monroig et al., 2003, 2006a, b). In addition to the EFA administration, liposome enriched nauplii can represent a rich phospholipid diet whose nutritional advantages to marine larval organisms have been widely documented (Kanazawa et al., 1985; Koven et al., 1993; Teshima et al., 1993; Coutteau et al., 1997; Geurden et al., 1998; Izquierdo et al., 2000; Gisbert et al., 2005). The conditions for the use of liposomes in *Artemia* nauplii enrichments can vary from those followed with other enrichment materials as a consequence of their particular physical and chemical properties. In order to optimize their efficiency as an enrichment product, the establishment of a correct protocol for liposome use was initiated by means of two previous studies which were performed with vesicles formulated with krill phospholipid extract. Firstly, Monroig et al. (2006a) studied the EFA delivery efficiency of three different types of krill liposomes through the incubation time, concluding that the method of preparation determined the vesicle structure and thus its incorporation kinetics. Large unilamellar vesicles prepared by the methodology of detergent solubilization (LUVdet) achieved the highest EFA bioencapsulation among liposomes. More recently, a second experience studied the effect of aeration on the survival of nauplii and essential fatty acid incorporation during the enrichment with krill LUVdet (Monroig et al., 2006b). It was demonstrated that moderate aeration (1.0 l/min) applied with a low diffusion system showed both acceptable EFA bioencapsulation and low mortality of nauplii. The latter study represented the first report of the existence of high nauplii mortalities when liposomes are employed to enrich *Artemia* nauplii under certain conditions.

Besides these previous results, the definition of an optimal protocol for *Artemia* nauplii enrichment with krill liposomes needs to be completed by determining the setting of parameters such as the density of nauplii, liposome concentration and its dosage during incubation. Commercially available products based on fish oil emulsions are usually employed at nauplii densities ranging from 100 to 300 nauplii ml⁻¹ and dispensed to give a product concentration ranging between 0.4 and 0.6 g l⁻¹ (Lavens and Soergelos, 1996; McEvoy et al., 1996; Villalta et al., 2005a,b). The enrichment product is usually dispensed in a single dose at the beginning of incubation (Villalta et al., 2005a,b) or in two separated

doses to minimize deterioration of the enrichment product (McEvoy et al., 1995, 1996; Han et al., 2005). In the case of liposomes, previous studies have used markedly different incubation conditions from those set for emulsions. The nauplii densities of the enrichments with liposomes have been normally fixed at higher values than those with emulsion-based products, i.e., 500 nauplii ml⁻¹ (Hontoria et al., 1994), 450 nauplii ml⁻¹ (Ozkizilcik and Chu, 1994), 650 nauplii ml⁻¹ (McEvoy et al., 1996), or 600 nauplii ml⁻¹ (Tonheim et al., 2000). On the other hand, the incubations performed in those studies were carried out under a liposome concentration notably higher than that fixed for emulsions. Concretely, the concentration of liposomes in the enrichment medium was 1.20 g l⁻¹ (Ozkizilcik and Chu, 1994) and 1.0 g l⁻¹ (McEvoy et al., 1996). In the case of liposome administration, the enrichment product has been dispensed in a single dose at the beginning of the incubation period (Ozkizilcik and Chu, 1994; Hontoria et al., 1994; McEvoy et al., 1996) or in two separate doses (Touraki et al., 1995).

In the light of the heterogeneity shown among the conditions in which liposomes have been used, the objective of this work is to define an optimal protocol for the enrichment of *Artemia* nauplii with krill liposomes. Thus, this study assesses the effects of nauplii density, the enrichment product concentration, and its dosage on the EFA bioencapsulation in *Artemia* nauplii enriched with krill LUVdet. Since krill liposomes have been described to produce high mortality rates in some circumstances, the present study also estimates the survival of the nauplii in different enrichment conditions.

2. Materials and methods

Three different enrichment experiments were performed in order to evaluate the survival of nauplii and the EFA incorporation achieved by krill liposomes under different conditions of nauplii density (Experiment 1), liposome concentration (Experiment 2), and liposome dosage mode (Experiment 3). The commercial emulsion Super Selco (Inve, Ghent, Belgium) was used as a reference product in the three experiments.

2.1. Preparation of liposomes

Large unilamellar liposomes prepared by the methodology of detergent solubilization (LUVdet) were formulated with krill phospholipid extract (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA) as a unique lipophilic component of the membrane. The preparation method is based on the mixture of two solutions: a micelle

suspension composed of a mixture of krill phospholipid extract and the detergent sodium cholate (7:10, mol/mol), and a second saline solution (0.9% NaCl). In the mixture chamber, a dialyzing process allows the removal of the detergent from the micelle solution. The continuous and very rapid detergent removal spontaneously leads to the formation of liposomes. More details about these liposome preparation methodologies can be found in New (1990).

2.2. Enrichment of *Artemia* nauplii

Commercial cysts (EG grade Inve, Ghent, Belgium) were incubated in seawater at a temperature of 28 ± 1 °C and an illumination of 1500–2000 lx. The cyst incubation lasted for 23 h. During the following hour, the nauplii were separated from the cyst shells and stocked in 1 l cylinder–conical enrichment tubes, thus the nauplii were ready to begin the enrichment process (t_0). Similarly to the cyst incubation, the tubes were placed in a thermostated bath at a temperature of 28 ± 1 °C and illuminated between 1500 and 2000 lx. The incubation time of the nauplii with the enrichment products (commercial emulsion or liposomes) was 21 h and the air flow was 1.0 litre per minute (l/min) applied by means of 0.5 cm diameter glass tubes. Both the incubation time and aeration settings were adopted according to the results of the preliminary studies with krill LUVdet (Monroig et al., 2006a,b). All the enrichment treatments were assessed in three replicate tubes. The density of *Artemia* nauplii, the enrichment product concentration and its dosage mode were established as in the aforementioned studies (Monroig et al., 2006a,b). Unless stated otherwise, the nauplii density was 300 nauplii ml^{-1} and enrichment product was dispensed in a single dose at the beginning of the incubation to give a concentration of 0.5 g l^{-1} . The enrichment product concentration is expressed in terms of lipid weight, and hence humidity content is not considered in neither the emulsion nor the krill liposomes. At the end of the incubation time, enriched nauplii were collected in a 100 μm plankton mesh and gently rinsed with tap and distilled water in order to eliminate the remains of the enrichment product and salt. Samples of enriched nauplii were immediately frozen at -20 °C and lyophilized for lipid analyses.

The specific enrichment conditions set for each one of the three experiments are shown in Table 1 and detailed here.

2.2.1. Experiment 1: effect of nauplii density

The effect of nauplii density on the survival of the nauplii and on the EFA bioencapsulation with krill

Table 1

Conditions set in the experiments carried out to assess the effect of density of *Artemia* nauplii (Experiment 1), liposome concentration (Experiment 2) and liposome dosage (Experiment 3) on the nauplii survival and the EFA incorporation

	Treatments	Nauplii density (nauplii ml^{-1})	Total product concentration of (g lipid l^{-1})	Number of doses*
Experiment 1	Commercial emulsion	300	0.5	1
	Liposomes D1	100	0.5	1
	Liposomes D2	300	0.5	1
	Liposomes D3	700	0.5	1
Experiment 2	Commercial emulsion	300	0.5	1
	Liposomes C1	300	0.25	1
	Liposomes C2	300	0.5	1
	Liposomes C3	300	0.75	1
Experiment 3	Commercial emulsion	300	2×0.25	2
	Liposomes Do1	300	1×0.5	1
	Liposomes Do2	300	2×0.25	2
	Liposomes Do3	300	2×0.375	2

*The enrichment product was administered in a single dose (“1”) at the beginning of the incubation (t_0) or in two half doses (“2”), one at t_0 and the second dose at $t_0 + 7$ h. The treatment Liposomes Do1 (Experiment 3) consisted of a unique dose of liposomes dispensed at $t_0 + 7$ h.

unilamellar liposomes (LUVdet) was assessed by incubating the nauplii at increasing densities of 100 (Liposomes D1), 300 (Liposomes D2), and 700 nauplii ml^{-1} (Liposomes D3). A control treatment consisted of *Artemia* nauplii enriched with the commercial emulsion Super Selco (Inve, Ghent, Belgium) at a density of 300 nauplii ml^{-1} .

2.2.2. Experiment 2: effect of liposome concentration

This experiment evaluated the effect of liposome concentration on the survival and the EFA bioencapsulation in *Artemia* nauplii. Besides the control treatment where nauplii were enriched with the commercial emulsion Super Selco at a concentration of 0.5 g l^{-1} , liposomes were dispensed at three different concentrations: 0.25 (Liposomes C1), 0.5 (Liposomes C2), and 0.75 g l^{-1} (Liposomes C3).

2.2.3. Experiment 3: effect of liposome dosage

The commercial emulsion used as a control (Super Selco) was dispensed in two separate doses of 0.25 g l^{-1} at the beginning (t_0) and after 7 h ($t_0 + 7$). On the other hand, krill LUVdet were dispensed under three different dosage modes. The first liposome-based treatment (Liposomes Do1) consisted of a unique liposome administration of 0.5 g l^{-1} at $t_0 + 7$. Before the liposomes were administered, the nauplii were kept under normal enrichment conditions

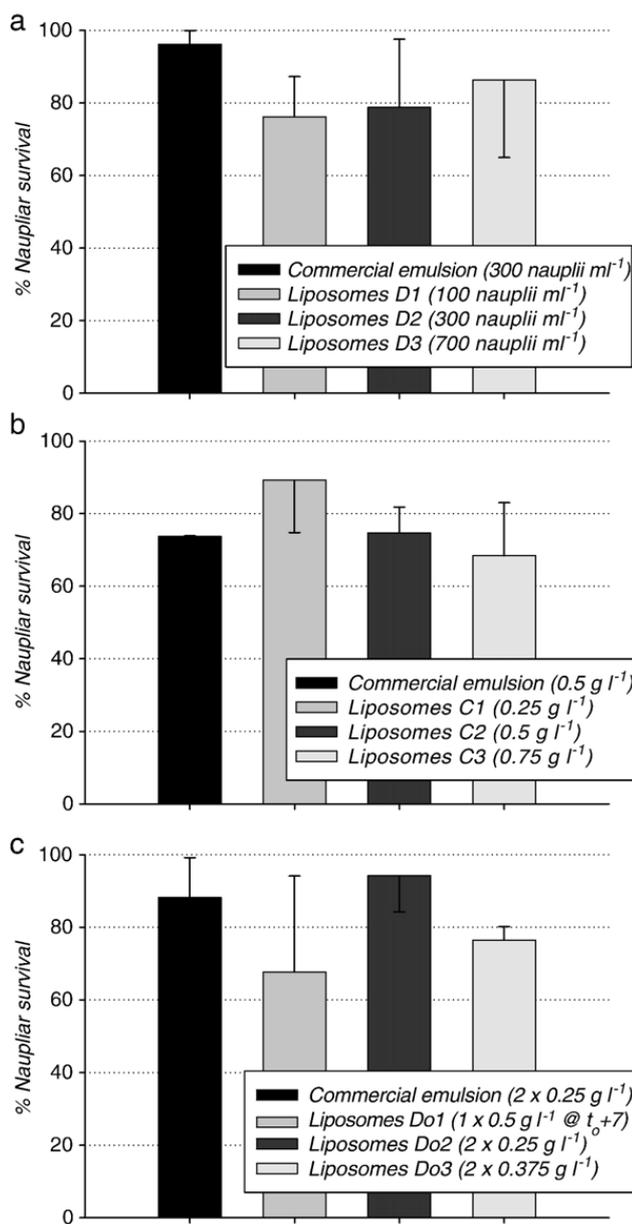


Fig. 1. Naupliar survival percentages estimated after 21 h of enrichment with a commercial emulsion and krill liposomes administered at the different experimental conditions: effect of the naupliar density (a); effect of liposome concentration (b); effect of liposome dosage mode (c). Error bars are standard deviations ($n=3$). No statistical differences were found among the treatments of each experiment ($P \leq 0.05$).

for temperature, naupliar density, aeration, etc. Since newly hatched nauplii cannot incorporate any particle because of their surrounding cuticle (Schrehardt, 1987), the Liposomes Do1 treatment would imply a reduction in the incubation time and thus a minimization of the enrichment product degradation. The other two liposome treatments, Liposomes Do2 and Liposomes Do3, consisted of the administration of two separate doses of 0.25 and 0.375 g l⁻¹, respectively, at t_0 and t_0+7 . These two latter treatments received the same final amount of

liposomes than their analogues Liposomes C2 and Liposomes C3 of Experiment 2.

2.3. Naupliar survival

The survival of the nauplii during enrichment was obtained by estimating initial and final densities. Therefore, the live nauplii from six 100 μ l aliquots taken from each enrichment tube replicate were counted at the beginning (t_0) and after 21 h. The average was calculated after refusing the highest and the lowest values. Evaporation during the *Artemia* enrichments was estimated in order to correct the naupliar density at the end of the incubation. In Experiment 3 (effect of dosage mode), the volume of the second dose was considered in order to estimate the final density.

2.4. Lipid class and fatty acid determination

Total lipids were extracted from freeze-dried samples following the method of Folch et al. (1957). The lipid

Table 2
Selected fatty acid (percent of total fatty acids) and lipid class composition (percent of total lipids) of the enrichment products utilized

	Commercial emulsion	Krill extract
<i>Fatty acid</i>		
16:0	2.8 (0.2) ^a	26.5 (0.2) ^b
18:0	2.6 (0.0) ^a	0.9 (0.0) ^b
18:1	12.2 (0.9) ^a	9.6 (0.0) ^b
18:2 n-6	4.9 (0.6) ^a	1.9 (0.0) ^b
18:3 n-3	1.1 (0.1) ^a	1.3 (0.0) ^b
20:4 n-6	1.4 (0.1) ^a	0.7 (0.0) ^b
20:5 n-3	24.0 (0.8) ^a	29.3 (0.1) ^b
22:5 n-3	4.6 (0.2) ^a	0.8 (0.0) ^b
22:6 n-3	27.8 (0.8) ^a	17.2 (0.1) ^b
Saturates	6.7 (0.3) ^a	30.0 (0.2) ^b
Monounsaturates	22.2 (0.7) ^a	13.3 (0.1) ^b
Polyunsaturates	68.0 (1.2) ^a	53.8 (0.2) ^b
Total n-3	60.3 (1.7) ^a	51.0 (0.2) ^b
Total n-6	8.1 (0.5) ^a	2.9 (0.1) ^b
HUFA n-3	57.7 (1.7) ^a	47.9 (0.1) ^b
HUFA n-6	2.5 (0.1) ^a	0.9 (0.1) ^b
DHA/EPA	1.2 (0.0) ^a	0.6 (0.0) ^a
<i>Lipid class</i>		
FAEE/TAG	91.1 (1.1) ^a	N.D. ^b
PC	0.4 (0.0) ^a	67.0 (1.9) ^b
PE	N.D. ^a	9.0 (1.2) ^b
Other	8.4 (1.0)	24.0 (3.1)

Data represent means (standard deviations) ($n=3$).

Variables sharing the same superscript letter within a row are not significantly different from each other (Student's test, $P \leq 0.05$).

N.D.: not detected. HUFA n-3: $\geq 20:3$ n-3; HUFA n-6: $\geq 20:2$ n-6; DHA/EPA: docosahexaenoic and eicosapentaenoic fatty acid ratio; FAEE/TAG: combined fraction of fatty acid ethyl esters and triacylglycerols; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidylethanolamine.

classes of the enrichment products were analyzed using high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) as described by Olsen and Henderson (1989). Analyses of fatty acids were carried out following the methods described in Monroig et al. (2006a).

2.5. Statistical analyses

Data are expressed as means±standard deviations. Mean comparisons were performed after verifying the homogeneity of variances (Barlett’s test). In cases of homoscedasticity, differences between treatments were

analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s multiple comparison test (Sokal and Rohlf, 1981). If heterogeneity of variances existed, robust tests were carried out. Welch’s test was used to check for differences between treatments and Game–Howell’s test to establish differences among groups. Lipid classes and fatty acid composition of the krill phospholipid extract and the commercial emulsion were compared with a Student’s *t*-test. Comparisons of the means with *P* values less or equal than 0.05 were considered significantly different in all statistical tests. All the statistical analyses were carried out using the

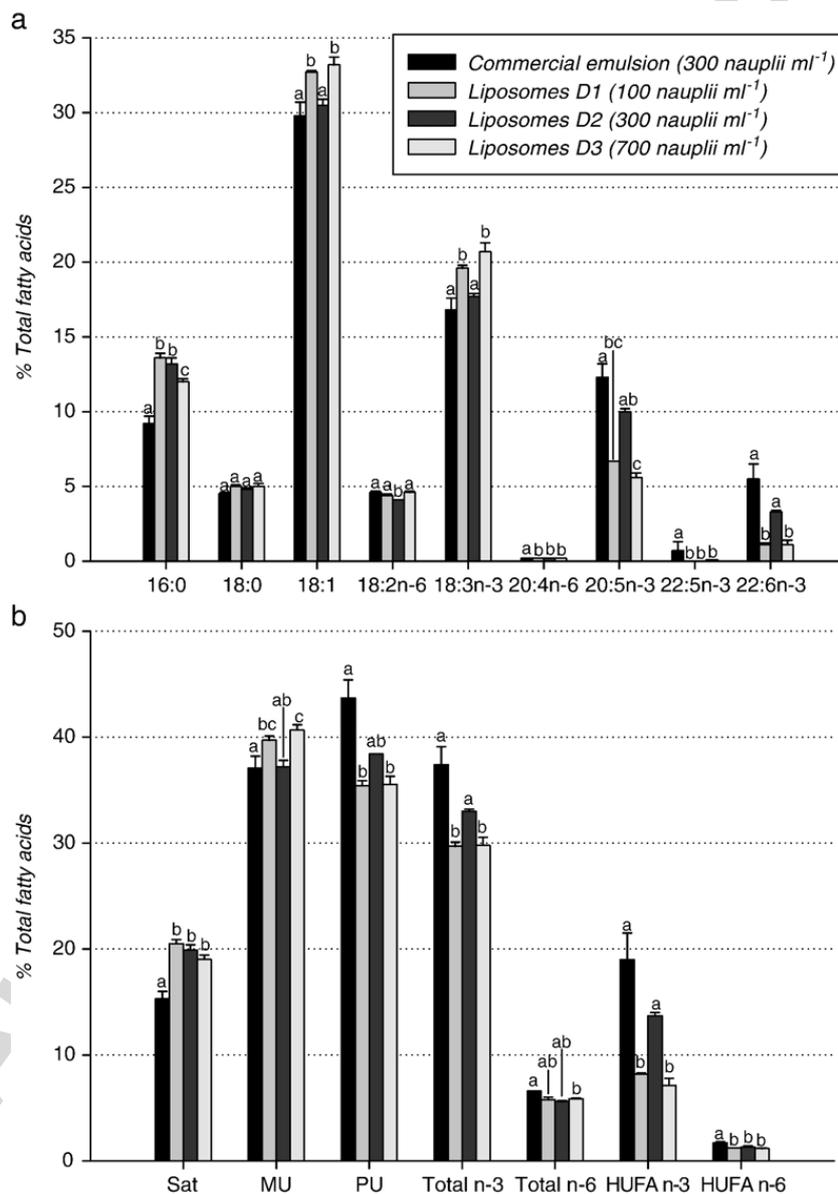


Fig. 2. Fatty acid profiles (a) and fatty acid groups (b) from nauplii enriched with the commercial emulsion and krill liposomes administered at three different nauplii densities. Values express percentages of total fatty acids. Error bars are standard deviations (n=3). Treatment means sharing the same letter are not significantly different from each other (P ≤ 0.05). Sat, saturates; MU, monounsaturates; PU, polyunsaturates; HUFA n-3: ≥20:3 n-3; HUFA n-6: ≥20:2 n-6.

SPSS statistical package (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

3. Results

The survival of *Artemia* nauplii estimated in the three experiments does not show significant differences among treatments in each experiment (Fig. 1). Both emulsion and liposome treated nauplii show survival rates between 70 and 90% although some variability exists within the three experiments. In spite of the lack

of statistical differences, the survival averages of liposome treatments seem to describe some remarkable tendencies. In Experiment 1 (Fig. 1a), higher survivals were achieved under high-density conditions, although the differences with the other treatments were very small. In addition, survival values obtained from Experiments 2 and 3 indicate a negative relationship between the nauplii survival and the liposome concentration in the enrichment medium. Indeed, survival estimates in Experiment 2 showed an inverse relationship between the survival of the nauplii and the

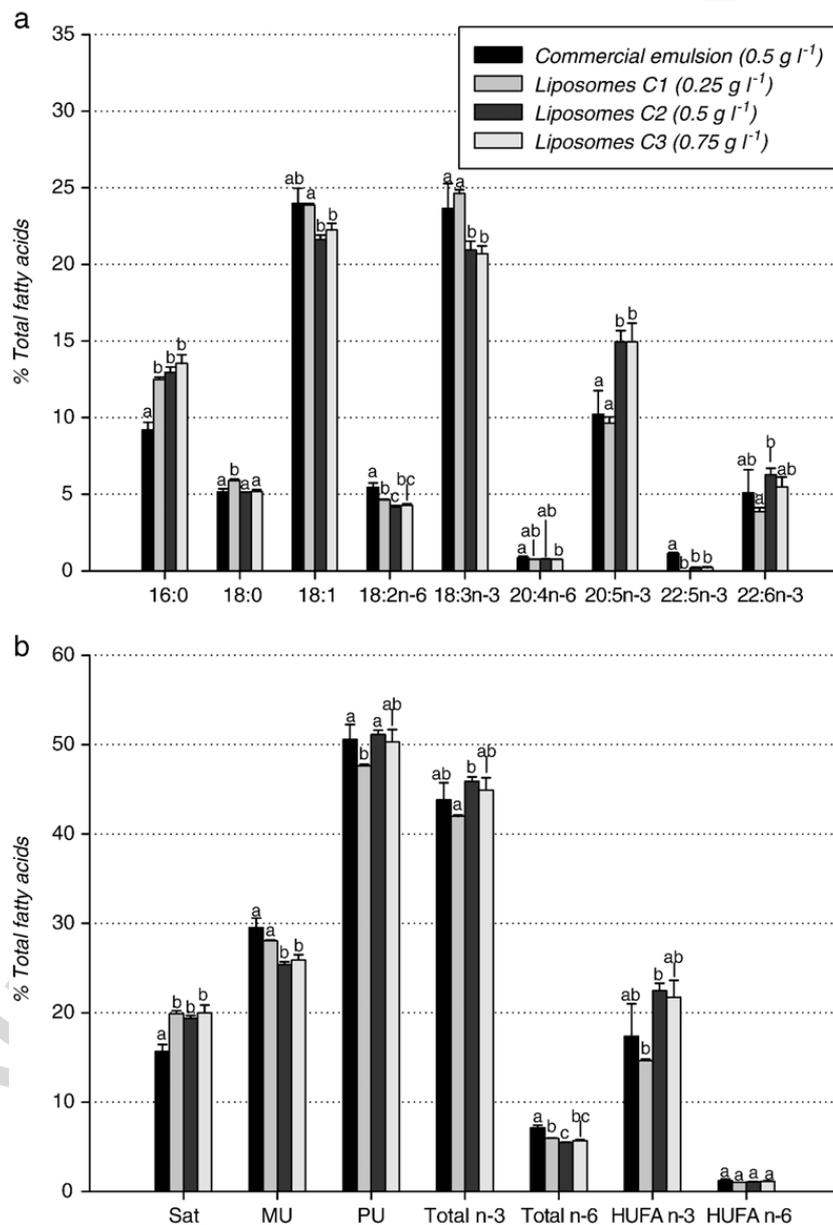


Fig. 3. Fatty acid profiles (a) and fatty acid groups (b) from nauplii enriched with the commercial emulsion and krill liposomes administered at three different concentrations. Values express percentages of total fatty acids. Error bars are standard deviations ($n=3$). Treatment means sharing the same letter are not significantly different from each other ($P \leq 0.05$). Sat, saturates; MU, monounsaturates; PU, polyunsaturates; HUFA $n-3$: $\geq 20:3 n-3$; HUFA $n-6$: $\geq 20:2 n-6$.

liposome concentration in the medium (Fig. 1b). Thus, survival decreased from the lowest liposome concentration treatment (Liposomes C1) to the highest (Liposomes C3). This tendency can be also observed in Experiment 3 (Fig. 1c), when comparing the treatments Liposomes Do2 and Liposomes Do3. On the other hand, the treatment Liposomes Do1 (Fig. 1c), where nauplii spent 7 h in clean seawater, displayed the lowest survival average among the three liposome treatments. However, it is remarkable that there exists a high variability associated with this treatment.

Table 2 displays the fatty acid and lipid class analyses of the commercial emulsion employed as a reference product and the krill phospholipid extract used in the liposome preparation. The results are in accordance with the specifications of the manufacturers. The effects of the nauplii density, the concentration of liposomes and their dosage mode on the fatty acid profile of treated nauplii are presented in the Figs. 2, 3, and 4, respectively. In general, liposome enriched nauplii present a rich saturated fatty acid profile, with significantly higher content of palmitic acid (16:0) in comparison to

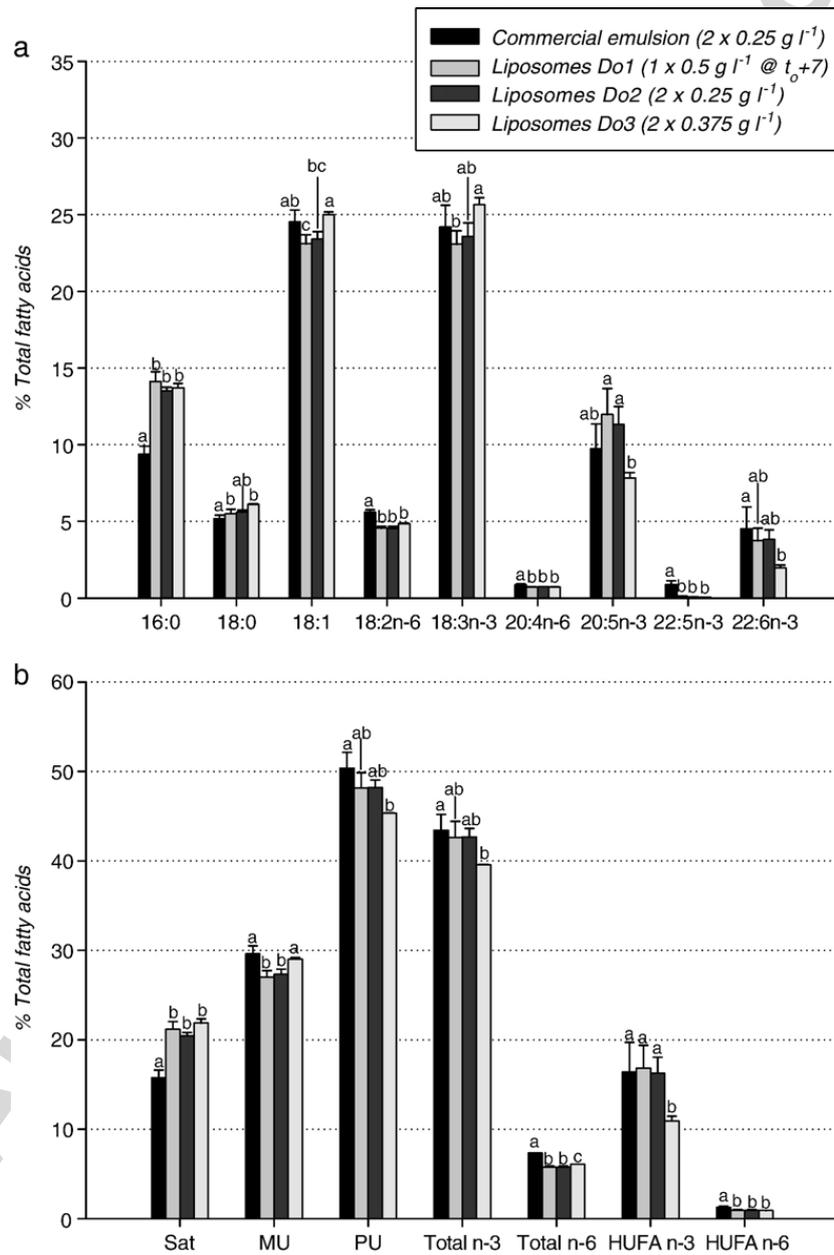


Fig. 4. Fatty acid profiles (a) and fatty acid groups (b) from nauplii enriched with the commercial emulsion and krill liposomes dispensed at three different dosage modes. Values express percentages of total fatty acids. Error bars are standard deviations ($n=3$). Treatment means sharing the same letter are not significantly different from each other ($P \leq 0.05$). Sat, saturates; MU, monounsaturates; PU, polyunsaturates; HUFA $n-3$: $\geq 20:3 n-3$; HUFA $n-6$: $\geq 20:2 n-6$.

the nauplii enriched with the commercial emulsion. Conversely, unsaturated fatty acids show a variable distribution among the different treatments in each experiment. In the nauplii density experiment (Fig. 2), the *Artemia* nauplii enriched with krill LUVdet at densities of 300 nauplii ml⁻¹ (Liposomes D2) show a significantly higher DHA percentage compared to nauplii enriched at densities of both 100 (Liposomes D1) and 700 nauplii ml⁻¹ (Liposomes D3). Moreover, Liposomes D2 nauplii show no differences in the DHA content compared with the control nauplii ($P \leq 0.05$). This pattern can be observed in the content of total polyunsaturated fatty acids (PU), especially in the $n-3$ fatty acid series (see values of total $n-3$ and HUFA $n-3$ in Fig. 2b) with higher levels in Liposomes D2 nauplii. On the contrary, $n-6$ HUFA, where ARA is included, presented significantly lower contents in the three liposome treatments in comparison to the commercial emulsion enriched nauplii.

The fatty acid profiles of *Artemia* enriched at three different krill liposome concentrations are shown in Fig. 3. The EFA levels in the liposome treated nauplii indicate a significantly higher content of both EPA and DHA in nauplii enriched at 0.25 g l⁻¹ (Liposomes C1) in comparison to those incubated at 0.5 g l⁻¹ (Liposomes C2). Nevertheless, the percentages of these two EFAs are not significantly different when nauplii incubated at 0.5 (Liposomes C2) and 0.75 g l⁻¹ (Liposomes C3) are compared. Both Liposomes C2 and Liposomes C3 show significantly higher EPA and equal DHA contents than the control treatment. As for the $n-6$ fatty acids, liposome treated nauplii show significantly lower percentages than control nauplii (Fig. 3b) although the ARA content is only significantly different between the control and the Liposomes C3 nauplii.

In the dosage mode experiment (Fig. 4), the Liposomes Do3 nauplii, enriched with two doses of 0.375 g l⁻¹, present significantly lower contents of total $n-3$ HUFA if compared to Liposomes Do1 and Liposomes Do2 nauplii, which were both enriched with a final product concentration of 0.5 g l⁻¹. The same tendency is maintained in the individual EPA and DHA levels, although only EPA percentages present significant differences (Fig. 4a). The control nauplii show higher $n-3$ HUFA (included EPA and DHA) contents if compared to Liposomes Do3 nauplii, but no differences can be observed with Liposomes Do1 and Liposomes Do2. The $n-6$ HUFA levels of liposome treated nauplii and, particularly, those of ARA, do not show significant differences among them. Besides, they are lower than those found in the emulsion enriched nauplii ($P \leq 0.05$).

4. Discussion

The survival of live preys during the enrichment process has been scarcely studied and only a few studies have presented limited information (Touraki et al., 1995; Harel et al., 1999; Ritar et al., 2004; Monroig et al., 2006b). In the case of liposome enrichment studies, Touraki et al. (1995) reported values of survival above 90% in nauplii enriched with oxytetracycline-loaded liposomes, although no details about nauplii density and lipid concentration were presented in this study. A more exhaustive work about nauplii survival during liposome enrichments was performed by Monroig et al. (2006b). The study, which represents the first report of the existence of high nauplii mortality rates in liposome enrichment procedures, assessed the mortality registered under certain aeration conditions in the enrichment of *Artemia* nauplii with the same type of liposomes used in the present study. It was stated that the mortality was caused when either hypoxic or high turbulence conditions occur. Whereas low oxygen availability takes place under low air flows applied by low diffusion systems, turbulent conditions occur under the opposite situation. In these circumstances, the application of vigorous aeration in a medium with tensioactive elements such as liposomes produces a thick foam which removes part of the nauplii from the enrichment medium embedded in the liquid fraction of the foam. Then, the nauplii die adhered to the walls of the enrichment tubes when the foam disappears. Another source of nauplii mortality is related to the chemical “washing” performed through the intermembrane transfer of lipid components (New, 1990) between liposomes and nauplii cells, that seems to remove vital components of the nauplii. These mechanisms could account for the notable mortality observed in the present study when the incubations are carried out under high liposome concentration (treatments Liposomes C3 and Liposomes Do3 from Experiment 2 and 3, respectively). In conditions of high liposome concentration, both foaming and chemical washing are favoured and their lethal effects potentially increased. Nevertheless, none of the three experiments presented here showed differences between the nauplii survival in the liposome treatments and the reference treatment (commercial emulsion). This would validate that such aeration conditions are adequate to minimize nauplii mortality as proposed by Monroig et al. (2006b).

The above mentioned mortalities during the enrichment with liposomes could have conditioned their use under high nauplii densities to overcome the loss of nauplii during the process. Furthermore, most of the studies which employed liposomes as an enrichment

product (Hontoria et al., 1994; Ozkizilcik and Chu, 1994; McEvoy et al., 1996; Tonheim et al., 2000) were performed at unusually high-densities (450–650 nauplii ml^{-1}) in comparison to the conditions applied with oil emulsion-based products (100–300 nauplii ml^{-1}). However, these authors did not present any explanation for the setting of such high-density conditions. Conversely, Monroig et al. (2006b) related the existence of variability in the EFA bioencapsulation efficiency with krill LUVdet to differences in naupliar densities during the enrichment. This hypothesis would point out a perceptible effect of the density of nauplii on the EFA bioencapsulation as demonstrated in the present study, where maximal bioencapsulation is achieved at densities of 300 nauplii ml^{-1} rather than 100 or 700 nauplii ml^{-1} . Hypoxic conditions produced by the crowding of *Artemia* nauplii could decrease the filtration activity of the nauplii, thereby explaining the lower EFA incorporation in incubations carried out at densities of 700 nauplii ml^{-1} . In addition, naupliar crowding conditions are not recommended since they produce the bioaccumulation of ammonium in the nauplii and, consequently, larvae fed on these nauplii could suffer the toxic effect of ammonium (Gelabert, 2001). On the other hand, the explanations for the low efficiency displayed by liposomes employed at 100 nauplii ml^{-1} remain unclear, although they could be related to a lipid peroxidation mechanism. Since a lower number of organisms are present, enrichments at low densities of nauplii are carried out in high dissolved oxygen concentrations, therefore facilitating the oxidation of polyunsaturated fatty acids. In such a way, the susceptibility of long chain polyunsaturated fatty acids has been widely described in literature (Gurr and Harwood, 1991; Frankel, 1998).

Concerning the effect of liposome concentration in the enrichment medium, the analyses show that the EFA bioencapsulation is not directly related to liposome concentration. Whereas an EFA increase is observed from nauplii incubated at 0.25 g l^{-1} (Liposomes C1) to those at 0.50 g l^{-1} (Liposomes C2), no remarkable improvements are registered if liposome concentration increases up to 0.75 g l^{-1} (Liposomes C3). This can be explained by the filling of the digestive tract of the nauplii. In such circumstances, the movement of the filtration appendages continues incorporating particles present in the enrichment medium, while simultaneously promoting the evacuation of the already ingested particles through the anus. This mechanism was proposed to explain the poor growth performance of *Artemia* when cultured in high algal densities (Reeve, 1963; Nimura, 1980). Under these conditions, a shortening of the gut passage takes place and newly incorporated cells replace

those present in the digestive tract avoiding their assimilation and, consequently, their utilization in the growth of the organism. This explanation could also apply for the low EFA bioencapsulation shown in the treatment Liposomes Do3 (Experiment 3), since both treatments employed a total equivalent amount of liposomes.

The administration of the enrichment product in two separate doses is advisable in order to reduce the exposure time of the product to the oxidative conditions of the enrichment process. However, this hypothesis has not been corroborated in the results obtained since no important differences can be observed between one dose treatments (Liposomes Do2 and Liposomes Do3, Experiment 2) and two dose analogues (Liposomes C2 and Liposomes C3, Experiment 3). The result would suggest that the establishment of two doses is not crucial in krill liposome enrichments as it is in enrichments with oil emulsion products. Phospholipids have been described to be less susceptible to oxidation than other lipid classes such as fatty acid ethyl esters and triacylglycerides which compose the commercial emulsion (King et al., 1992; Song et al., 1997). This low oxidation susceptibility of liposomes would make the administration of the enrichment product at the end of the *Artemia* vitellogenic stage (Liposomes Do1, Experiment 3) not to bring the preservation advantages of reduced incubation times. On the contrary, Liposomes Do1 nauplii spent only 14 h in the medium which seems not to be enough time to complete the enrichment according to the results obtained by Monroig et al. (2006a) where the same krill LUVdet formulation achieved higher EFA bioencapsulation in 21 h incubations rather than 18 h.

In summary, the naupliar survival estimates of liposome treatments of the three experiments do not differ from those obtained in the corresponding control treatments. This confirms that it is possible to reduce the high mortalities of nauplii during the enrichment with liposomes by controlling the aeration conditions as proposed by Monroig et al. (2006b). The results of the experiments on EFA bioencapsulation allow the establishment of a complete *Artemia* enrichment protocol with krill liposomes. This procedure should be performed during 21 h under conditions of moderate aeration (1.0 l/min) applied by a low air diffusion system to avoid naupliar mortality. The nauplii should be incubated at a density of 300 nauplii ml^{-1} with liposomes administered in a unique dose after their immediate hatching from the cyst. Under these conditions, the use of krill liposomes ensures a maximum EFA bioencapsulation efficiency comparable to that of the currently commercially available products.

Acknowledgements

This study has been funded by the R+D National Plan of the Spanish Government (project AGL2000-0135-P4-03). The authors would like to thank Mazdak Bagherie-Lachidan for his review of the manuscript.

References

- Barclay, W., Zeller, S., 1996. Nutritional enhancement of $n-3$ and $n-6$ fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J. World Aquac. Soc.* 27, 314–322.
- Bransden, M.P., Battaglione, S.C., Morehead, D.T., Dunstan, G.A., 2005. Effect of dietary 22:6 $n-3$ on growth, survival and tissue fatty acid profile of striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae fed enriched *Artemia*. *Aquaculture* 243, 331–344.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgeloos, P., 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155, 149–164.
- Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Frankel, E.N., 1998. Lipid Peroxidation. The Oily Press Ltd., Dundee (U.K.). 303 pp.
- Gelabert, R., 2001. Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*. Ph.D. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (México), 84 pp.
- Geurden, I., Bergot, P., Schwarz, L., Sorgeloos, P., 1998. Relationship between dietary phospholipid classes and neutral lipid absorption in newly-weaned turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 217–228.
- Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino-Infante, J.L., Quaziguel, P., Cahu, C.L., 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neural lipids for long-chain polyunsaturated fatty acids supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids* 40, 609–618.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., 1991. Lipid Biochemistry. Chapman and Hall, London (U.K.). 406 pp.
- Han, K., Geurden, I., van der Meeren, P., Bai, S.C., Sorgeloos, P., 2005. Particle size distribution in two lipid emulsions used for the enrichment of *Artemia* nauplii as a function of their preparation method and storage time. *J. World Aquac. Soc.* 36, 196–202.
- Harel, M., Ozkizilcik, S., Lund, E., Behrens, P., Place, A.R., 1999. Enhanced absorption of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 $n-3$) in *Artemia* nauplii using a dietary combination of DHA-rich phospholipids and DHA-sodium salt. *Comp. Biochem. Physiol.* 124B, 169–176.
- Hontoria, F., Crowe, J.H., Crowe, L.M., Amat, F., 1994. Potential use of liposomes in larviculture as a delivery system through *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 127, 255–264.
- Izquierdo, M.S., 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquac. Nutr.* 2, 183–191.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernández-Cruz, C.M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 97–107.
- Kanazawa, A., Teshina, S.-I., Sakamoto, M., 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 50, 39–49.
- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., 1992. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 545–551.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D., 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on $n-9$ fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 357–364.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Tech. Pap., vol. 361, p. 295.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24, 521–623.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture* 134, 101–112.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Amat, F., Sargent, J.R., 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture* 144, 339–352.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R., 1997. Application of soya phosphatidylcholine in tuna orbital oil enrichment emulsions for *Artemia*. *Aquac. Int.* 5, 517–526.
- Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, I., González, P., Amat, F., Hontoria, F., 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii in PUFA, phospholipids, and water-soluble nutrients using liposomes. *Aquac. Int.* 11, 151–161.
- Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, F., González, P., Bermejo, A., Hontoria, F., 2006a. Enrichment of *Artemia* in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 251, 491–508.
- Monroig, Ó., Navarro, J.C., Amat, F., González, P., Hontoria, F., 2006b. Effect of aeration on the efficiency of *Artemia* enrichment with EFA-rich emulsion and liposomes. *Aquaculture* 257, 382–392.
- New, R.R.C. (Ed.), 1990. Liposomes. A Practical Approach. IRL Press, Oxford (U.K.). 301 pp.
- Nimura, Y., 1980. Retarded growth of *Artemia salina* by overfeeding. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46, 681–687.
- Olsen, R.E., Henderson, R.J., 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Mar. Biol. Ecol.* 129, 189–197.
- Ozkizilcik, S., Chu, F.-L.-E., 1994. Uptake and metabolism of liposomes by *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 128, 131–141.
- Reeve, M.R., 1963. Growth efficiency in *Artemia* under laboratory conditions. *Biol. Bull.* 125, 133–145.
- Ritar, A.J., Dunstan, G.A., Nelson, M.M., Brown, M.R., Nichols, P.D., Thomas, C.W., Smith, E.G., Crear, B.J., Kolkovski, S., 2004. Nutritional and bacterial profiles of juvenile *Artemia* fed different enrichments and during starvation. *Aquaculture* 239, 351–373.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117–127.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego (USA). 257 pp.
- Schrehardt, A., 1987. A scanning electron-microscope study of the post-embryonic development of *Artemia*. In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), *Proc. 2nd International Symposium on The Brine Shrimp Artemia*. Universa Press No. 1, Wetteren, Belgium, pp. 5–32.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. Biometry. Freeman, New York. 859 pp.
- Song, J.-H., Inoue, Y., Miyazawa, T., 1997. Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids, triacylglycerols, and ethyl esters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 2085–2088.

- Teshima, S., Kanazawa, A., Koshio, S., 1993. Recent developments in nutrition and microparticulate diets of larval prawn. *Isr. J. Aquac. – Bamidgeh* 45, 175–184.
- Tonheim, S.K., Koven, W., Rønnestad, I., 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture* 190, 223–235.
- Touraki, M., Rigas, P., Kastritsis, C., 1995. Liposome mediated delivery of water soluble antibiotics to the larvae of aquatic animals. *Aquaculture* 136, 1–10.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., 2005a. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 245, 193–209.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., Bell, J.G., 2005b. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture* 249, 353–365.
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C., Fujita, S., 1978. Nutritional quality of brine shrimp, *Artemia salina*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 1115–1121.
- Watanabe, T., Ohta, M., Kitajima, C., Fujita, S., 1982. Improvement of dietary value of brine shrimp *Artemia salina* for fish larvae by feeding them on omega 3 highly unsaturated fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 1775–1782.
- 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.

Author's personal copy