



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

Facultad de Biología

**Programa Institucional de Maestría en
Ciencias Biológicas**

**EFFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO DE *Artemia*
FRANCISCANA CON DIFERENTES PROPORCIONES DE ω -3
DHA/EPA SOBRE EL CRECIMIENTO DE JUVENILES DE PEZ
BLANCO *Menidia estor*.**

TESIS

QUE PRESENTA

Ana Rosa Hernández Téllez

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de Tesis: Dr. Jorge Fonseca Madrigal
Co-Director de Tesis: Dr. Ilie Racotta Dimitrov

Morelia, Michoacán, Octubre de 2009.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo recibido a través de los siguientes proyectos para la realización de la presente tesis:

“Caracterización enzimática de las rutas biosintéticas (elongación y desaturación) de ácidos grasos en el pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor*: un pez de origen marino que habita en agua dulce y sintetiza ácidos grasos altamente insaturados.” Ciencia Básica CONACYT (61117), a cargo del Dr. Jorge Fonseca Madrigal.

Asimismo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca (No. 216689) otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Jorge Fonseca Madrigal, Dr. Ilie Racotta Dimitrov, Dr. Antonio Campos Mendoza, Dr. Carlos A. Martínez Palacios, Dra. Patricia Ríos Chávez, por todo su apoyo y consejos.

Muy especialmente quiero agradecer al Dr. Jorge Fonseca, Dr. Ilie Racotta y Dra. Elena Palacios, por toda su ayuda, su tiempo, dedicación, esfuerzo y sugerencias, sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

Asimismo, manifiesto mi agradecimiento por el apoyo y asesoramiento recibido en los diversos laboratorios en cuyas instalaciones se realizaron los experimentos y/o análisis correspondientes:

M.C. Olivia Arjona López (Laboratorio de Metabolismo de Lípidos. CIBNOR).

M.C. Lidia Ambriz, (Laboratorio de Nutrición IIAF)

INDICE	Pag
I. RESUMEN GENERAL.	1
II. INTRODUCCION GENERAL.	2
III. OBJETIVO GENERAL	8
III.1. Objetivos Particulares	8
IV. CAPITULO I ESTANDARIZACION PARA ENRIQUECER NAUPLIOS DE <i>Artemia franciscana</i> CON DIFERENTES PROPORCIONES DE DHA/EPA.	9
IV.1. Resumen	9
IV.2. Introducción.	10
IV.3 Materiales y Métodos.	13
IV.3.1. Diseño experimental.	13
IV.3.1.1 Obtención de nauplio de <i>Artemia</i> para análisis preliminares de enriquecimiento.	13
IV.3.1. 2. Enriquecimiento de nauplio de <i>Artemia</i> .	13
IV.3.1.2.1 Experimento 1: Efecto del tiempo de enriquecimiento.	13
IV.3.1.2.2 Experimento 2: Efecto del doble enriquecimiento.	14
IV.3.1.2.3 Experimento 3. Efecto del lavado de la <i>Artemia</i> posterior al enriquecimiento.	14
IV.3.2.1 Análisis del perfil de ácidos grasos del nauplio de <i>Artemia</i> .	14
IV.3.3.1 Estadística	16
IV.4. Resultados y Discusión.	17
IV.4.1. Análisis de <i>Artemia</i> enriquecida.	17
IV.4.1.1. Análisis del tiempo de enriquecimiento de nauplio de <i>Artemia</i> .	17
IV.4.1.2. Análisis del efecto del doble enriquecimiento de <i>Artemia</i> .	20
IV.4.1.3. Análisis del efecto de enjuague en el enriquecimiento del nuplio de <i>Artemia</i> .	22
IV.4.1.3.1 En condiciones de uno y doble enriquecimiento.	22
IV.5. Conclusión.	25
IV.6. Literatura Citada.	26

V.	CAPITULO II. ANALISIS DEL EFECTO DE LA RELACION DHA/EPA EN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE JUVENILES DE <i>M. estor</i> , ALIMENTADAS CON NAUPLIO DE <i>ARTEMIA</i> ENRIQUECIDA.	29
V.1.	Resumen.	29
V.2.	Introducción.	30
V.3.	Materiales y Métodos.	33
V.3.1.	Experimento con juveniles de pez blanco <i>Menidia estor</i> .	33
V.3.2	Toma de muestras del experimento con juveniles de Pez blanco <i>Menidia estor</i> .	36
V.3.3	Análisis Bromatológicos.	37
V.3.3.1.	Humedad.	37
V.3.3.2.	Proteína Cruda	38
V.3.3.3.	Extracto Etéreo	38
V.3.3.4.	Cenizas	38
V.3.3.5.	Extracto libre de nitrógeno.	39
V.3.4.	Análisis del perfil de ácidos grasos en juveniles pez blanco <i>Menidia estor</i> .	
V.3.4.1	Derivatización de ácidos grasos <i>estor</i> .	39
V.3.5	Análisis estadístico.	40
V.4	Resultados y Discusión.	41
V.4.1.	Análisis del nauplio de <i>Artemia</i> enriquecida para utilizarse durante el ensayo con juveniles de pez blanco <i>M. estor</i> .	41
V.4.2.	Crecimiento de juveniles <i>M. estor</i> .	43
V.4.3.	Frecuencia de Tallas (cm).	45
V.4.4.	Composición proximal de los peces.	47
V.4.5.	Supervivencia de juveniles <i>Menidia estor</i> .	47
V.4.6	Perfil de ácidos grasos mayoritarios de tejidos de juveniles.	48
V.4.6.1.	Músculo e Hígado.	48
V.5.	Conclusión.	55
VI.	CONCLUSION GENERAL	56
V.6.	Literatura Citada.	58

ANEXOS

- Anexo 1. Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de *Artemia* enriquecida con las emulsiones E100-4 (DHA/EPA=4) y E100-0-6 (DHA/EPA=0.6), a 18 y 24 de enriquecimiento. 69
- Anexo 2. Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de *Artemia* enriquecida durante 24 horas con las dos emulsiones E100-4 (DHA/EPA=4) y E100-0.6 (DHA/EPA=0.6) en relación a un solo enriquecimiento (0 h) o un doble enriquecimiento (0 y 12 h). 70
- Anexo 3. Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de *Artemia* enriquecida con las emulsiones y E100- 4 (DHA/EPA=4) y E100-0.6 (DHA/EPA=0.6) (después de haberse aplicado un doble enriquecimiento donde se, evaluó además el efecto de lavado). 71

INDICE DE FIGURAS

- Figura. 1. Diagrama de la ruta de elongación y desaturación de los ácidos grasos en sus diferentes familias ω -3, ω -6 y ω -9 a partir de 18:0. 5
- Figura 2. Microfotografía que muestra la región intestinal del nauplio de *Artemia* enriquecida por 18 h (Arulvasu, 2009). 11
- Figura 3. 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). 16
- Figura 4. Niveles de EPA (A), DHA (B) y proporción de DHA/EPA (C) en nauplios de *Artemia* enriquecida por 18 y 24 horas con diferentes contenidos de DHA/EPA ratio (E100-4 y E100-0,6). Se realizó una prueba ANOVA de dos vías (E: emulsión x T: la hora de enriquecimiento). 19
- Figura 5. Niveles de EPA (A), DHA (B) y proporción de DHA/EPA (C) en nauplios de *Artemia* enriquecido por 24 horas con diferentes proporciones de DHA/EPA (E100-4 y E100-0,6) con un único (S) o doble enriquecimiento (D) (ver Métodos) Se realizó un ANOVA de dos vías (E: emulsión x D: enriquecimiento único o doble). 21
- Figura 6. Niveles de EPA (A), DHA (B) y proporción de DHA/EPA (C) en nauplios de *Artemia* enriquecido por 24 horas con diferentes contenidos de DHA/EPA ratio (E100-4 y E100-0,6), y aplicando un lavado (L) o no (NL) con un solo enriquecimiento (Véanse métodos). Se realizó un ANOVA de dos vías (E: emulsión x: lavado o no lavado). 23
- Figura 7. Niveles de EPA (A), DHA (B) y proporción de DHA/EPA (C) en nauplios de *Artemia* enriquecido por 24 horas con diferentes contenido de DHA/EPA ratio (E100-4 y E100-

0,6), y aplicando un lavado (DL) o no (DSL) después de aplicar un doble enriquecimiento (Véanse métodos). Se realizó un ANOVA de dos vías (E: emulsión D x: lavado o no lavado).	24
Figura 8. Enriquecimiento a las 18, 20, 22 y 24 h para los 5 tratamientos.	35
Figura 9. Esquema para llevar a cabo las biometrías.	35
Figura 10. Toma de parámetros fisicoquímicos del sistema.	36
Figura 11. Esquema de análisis bromatológicos.	37
Figura 12. Crecimiento de juveniles de pez blanco (<i>M. estor</i>), a lo largo de 90 días de cultivo a una salinidad de 5 g/L, alimentados con nauplios de <i>Artemia</i> enriquecidas previamente con cinco distintos tratamientos: EM, E 100-4, E100-0.6, E50-4 y E50-0.6.	45
Figura 13. Frecuencia de tallas de los juveniles de <i>M. estor</i> , en cinco dietas.	46
Figura 14. Supervivencia (%) de juveniles de pez blanco <i>M. estor</i> , a lo largo de 90 días de cultivo a una salinidad de 5 g/L y alimentados con nauplios de <i>Artemia</i> enriquecidos con cinco distintos tratamientos.	48

INDICE DE TABLAS

NUMERO	TITULO	Pag
Tabla 1.	Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de <i>Artemia</i> recién eclosionada (sin enriquecer), aceite de maíz y las 2 emulsiones (E100-4 y E100-0.6).	34
Tabla 2.	Valores promedio obtenidos de la calidad del agua del sistema utilizado.	36
Tabla 3.	Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de <i>Artemia</i> después de enriquecerse por 24 h con las emulsiones EM (aceite de maíz), E 100-4 de emulsión ICES 30/4 con 30% de HUFA`s totales y una proporción DHA/EPA =4, E 100-0.6 de emulsión ICES 30/0.6 con 30% de HUFA`s totales y una proporción DHA/EPA=0.6, E50-4 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-4, y finalmente E50-0.6 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-0.6.	43
Tabla 4.	Variables en el bioensayo de juveniles de <i>M. estor</i> .	45
Tabla 5.	Composición proximal del cuerpo de <i>M estor</i> alimentados con diferentes proporciones de DAH/EPA.	47
Tabla 6.	Perfil de ácidos grasos mayoritarios de músculo de juveniles de pez blanco <i>M. estor</i> iniciales y después de haber sido alimentados con nauplio de <i>Artemia</i> enriquecida con las las emulsiones EM (aceite de maíz), E100-4 de emulsión ICES 30/4 con 30% de HUFAs totales y una proporción DHA/EPA =4, E100-0.6 de emulsión ICES 30/0.6 con 30% de HUFAs totales y una proporción DHA/EPA=0.6, E50-4 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-4, y finalmente E50-0.6 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-0.6	53

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos mayoritarios de hígado de juveniles de pez blanco *M. estor* iniciales y después de haber sido alimentados con nauplio de *Artemia* enriquecida con las emulsiones EM (aceite de maíz), E100-4 de emulsión ICES 30/4 con 30% de HUFAs totales y una proporción DHA/EPA =4, E100-0.6 de emulsión ICES 30/0.6 con 30% de HUFAs totales y una proporción DHA/EPA=0.6, E50-4 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-4, y finalmente E50-0.6 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-0.6.

54

ABREVIATURAS

ANOVA: análisis de varianza

ARA: ácido araquidónico (20:4n-6)

DHA: ácido docosahexaenoico (22:6n-3)

DPA: ácido docosapentaenoico (22:5n-3)

EFA: ácido graso esencial

EPA: ácido eicosapentaenoico (20:5n-3)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FFA: ácido graso libre

GC: cromatografía de gases

HUFA: ácido graso poliinsaturado de cadena larga (20 o más carbonos) y con más de dos insaturaciones.

LA: ácido linoleico (18:2n-6)

LN: lípido neutro

LNA: ácido linolénico (18:3n-3)

LP: lípido polar

PUFA: ácidos grasos poliinsaturado

I. RESUMEN GENERAL

La inclusión de los ácidos grasos ω -3 DHA y EPA en el alimento, es un factor importante para lograr mejor supervivencia y crecimiento en la mayoría de los peces cultivados. Dentro del desarrollo tecnológico para el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor*, se desconoce el requerimiento de ácidos grasos ω -3 DHA/EPA, y el efecto que éstos tienen en el crecimiento y supervivencia de juveniles en cautiverio. En esta especie como en otras, el alimento vivo (nauplio de *Artemia franciscana*) es utilizado en las primeras etapas de desarrollo. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de los niveles de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) ω -3 en juveniles de pez blanco, alimentados con diferentes proporciones de DHA/EPA. Para esto se llevó a cabo: A) una estandarización del método para enriquecer nauplios de *Artemia franciscana* con diferentes proporciones de DHA/EPA. B) se analizó el efecto de 5 tratamientos con diferentes relaciones de DHA/EPA (una emulsión basada en aceite de maíz, 2 emulsiones con diferentes proporciones de DHA/EPA (4 y 0.6) y 2 más con las dos últimas emulsiones diluidas al 50%) en el crecimiento y supervivencia de juveniles de *Menidia estor*, alimentados con nauplio de *Artemia* enriquecida con diferentes proporciones de HUFA; y C) se evaluó el perfil de ácidos grasos, en hígado y músculo de juveniles alimentados con nauplios de *Artemia* enriquecida con diferentes proporciones de HUFA.

El diseño experimental constó de 5 tratamientos triplicados con 90 organismos de 4 meses de edad, peso promedio de 0.5 g, que fueron alimentados 4 veces al día, por un periodo de 90 días. Los organismos fueron pesados cada 30 días, sacrificando 6 organismos por tratamiento para realizar el análisis de perfil de ácidos grasos, en hígado y músculo. El efecto de las dietas se reflejó en el crecimiento y supervivencia de juveniles de pez blanco, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos los peces alimentados con el nauplio de *Artemia* enriquecida con la emulsión de aceite de maíz presentaron un crecimiento significativamente mayor, en comparación con el resto de los tratamientos. El perfil de ácidos grasos de hígado y músculo no mostró diferencias importantes ya que ambos registraron una relación de DHA/EPA cercana a 7. Se discute acerca de la falta de dependencia de ácidos grasos ω -3 (DHA/EPA) en la dieta, y de un requerimiento fundamental de ácido linolénico (18:3n-3), el cual, según el perfil de ácidos grasos de los peces, está siendo utilizado como sustrato para la producción de DHA.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL.

El desarrollo de la acuicultura en México se ha basado principalmente en especies exóticas, que por poseer información básica para su cultivo, se han introducido con el fin de desarrollar una acuicultura productiva, dejando a un lado las especies nativas, las cuales presentan una gran potencial para esta actividad (Dillanes, 2001). Tal es el caso del pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor*, el cual pertenece a la familia *Atherinopsidae* que comprende un notable número de especies con una amplia variedad de hábitats; contiene además entre 150 y 160 especies, con representantes en su mayoría marinos (Barbour, 1973). Se sabe que *Menidia estor* presenta gran similitud con *Menidia beryllina* especie que penetró la meseta central de México, a través de los sistemas estuarios costeros, y que invadió las aguas de lo que se ha llamado “Lago Xalisco” del cual solo quedan remanentes, lagos de menos tamaño como el Lago de Pátzcuaro y el Lago de Chapala. Estos cambios geográficos permitieron el desarrollo de un gran número de especies con adaptaciones para sobrevivir en agua dulce y con un alto grado de endemismo (Dillanes, 2001).

Por otro lado *Menidia estor* es una especie muy cotizada comercialmente, por lo que ha sido explotada hasta el punto de ponerla en peligro, alcanzando altos costos en el mercado (700 pesos mexicanos/kg) reduciendo drásticamente las tallas de captura (Martínez-Palacios *et al.*, 2002). Como consecuencia, de la presión ejercida en esta especie, surge la necesidad de implementar su cultivo como una opción para reducir los niveles de pesca al ofrecer el producto a un precio competitivo, además de generar una opción de trabajo a los pescadores

Así el pez blanco del lago de Pátzcuaro (*Menidia estor*) es una especie que presenta algunas características propias de peces marina, como es su tolerancia a la salinidad, el tamaño pequeño de los huevecillos y una duración relativamente corta del desarrollo embrionario y larvario lecitotrófico (Martínez-Palacios *et al.*, 2004a). Esta característica hace interesante y relevante determinar si dicha especie presenta requerimientos de ácidos grasos similares a las de especies marinas o, por el contrario, a los de especies dulceacuícolas. Una parte fundamental para lograr el desarrollo tecnológico del cultivo de pez blanco, es conocer los requerimientos nutricionales de estos organismos, lo que

permitirá obtener organismos de tallas comerciales en el menor tiempo y con el menor costo posible (Martínez- Palacios *et. al.*, 2002).

En los últimos años se ha generado un mayor conocimiento sobre la función nutricional de los lípidos, los cuales son una serie de compuestos que cumplen funciones en los organismos vivientes, entre ellas la de reserva energética (Guillaume *et al.*, 2004). Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas, la mayoría biomoléculas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno, que tienen como característica principal el ser hidrofóbicas o insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como la bencina, el alcohol, el benceno y el cloroformo. Los lípidos se pueden dividir en dos grandes grupos: los fosfolípidos, cuya función básica es estructural en las membranas celulares y los triglicéridos que tienen un papel energético y generalmente son acumulados en el citoplasma en forma de gotas lipídicas. Tanto los triglicéridos como los fosfolípidos están formados por ácidos grasos los cuales son las unidades básicas de la mayoría de los lípidos y consisten en moléculas formadas por un larga cadena hidrocarbonada (hidrofóbica) con un número par de átomos de carbono (12-24) y un grupo carboxilo terminal (hidrofilico), que de acuerdo con el número de dobles enlaces son clasificados como saturados (sin dobles enlaces), monoinsaturados (un doble enlace), polinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés con dos o más dobles enlaces) y altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés con cuatro o más dobles enlaces) (Sargent, 1995a). Entre estos último, podemos considerar a los más importantes de punto de vista funcional a los ácidos grasos de más de 20 carbonos, como son los ácidos araquidónico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA).

Se sabe que este tipo de ácidos grasos son indispensables para el mantenimiento e integridad de las membranas celulares debido a que sus niveles relativos influyen sobre la permeabilidad y fluidez de la membrana celular y subcelular; sirven como vehículo biológico en la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) (Guillaume *et al.*, 2004). Además, los ácidos grasos se requieren para el óptimo transporte lipídico (ligados a fosfolípidos como agentes emulsificantes) y son precursores de las hormonas conocidas como eicosanoides moléculas de importancia en la salud animal (Sargent *et al.*, 1999a). Se considera que los lípidos juegan un papel importante como “colchón mecánico” para el

soporte de los órganos vitales y ayudan en el mantenimiento de la flotabilidad neutra; además se ha observado que son fuente de esteroides esenciales, mismos que desempeñan una amplia gama de funciones biológicas importantes (Sargent *et al.*, 1995b Gill y Valivety 1997). Un ejemplo claro es el colesterol, el cual está involucrado en el mantenimiento de los sistemas de membrana, en el transporte lipídico y como precursor de la vitamina D3, de los ácidos biliares y las hormonas esteroides como los andrógenos, estrógenos, hormonas adrenales y corticosteroides (Haines, 1994).

En peces, el desarrollo larvario, el crecimiento y la calidad reproductiva son afectados por la deficiencia de ARA, EPA y DHA, por lo cual el balance nutricional entre estos tres HUFA es de fundamental importancia (Sargent *et al.* 1999b). Esto se ha observado, particularmente para los peces marinos, que tienen una capacidad limitada para la síntesis de HUFA, que es aún más crítica a nivel del desarrollo larvario (Sargent *et al.*, 1999a; Bell *et al.*, 2003). Así mismo, el requerimiento de ácidos grasos en la dieta varía de acuerdo a la capacidad de síntesis de los organismos, la cual es regulada por la tasa de transcripción genética y la actividad de enzimas desaturasas y elongasas, a través de rutas de síntesis dependientes de oxígeno (Figura 1). Los peces marinos no son capaces de sintetizar HUFA n-3 y n-6 a partir de sus precursores de 18 carbonos, debido a la ausencia de la elongasa C18-C20 y/o inactividad de la desaturasa $\Delta 5$; por lo que el ácido eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA) y el ácido docosahexaenóico (22:6n-3, DHA), son esenciales en su dieta (Ghioni *et al.*, 1999). Aunque algunas especies marinas como el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) presentan cierta capacidad de elongación y desaturación de ácidos grasos de 18 carbonos a sus equivalentes HUFA, dicha capacidad es cuantitativamente deficiente para cubrir sus necesidades fisiológicas (Castell *et al.*, 1994; Sargent *et al.*, 1995b; Tocher 2003). Se ha sugerido que en ambientes marinos, la disponibilidad de dichos ácidos grasos en la dieta es alta, por lo que los peces no requieren invertir energía para sintetizarlos (Bell *et al.*, 1986; Copeman y Parrish, 2002; Bell *et al.*, 2003; Bransden *et al.*, 2005). En contraste, la mayoría de los peces dulceacuícolas presentan la capacidad de sintetizar HUFA n-3 y n-6 a partir de ácido linolénico (18:3n-3) y ácido linoléico (18:2n-6) (Sargent *et al.*, 1993; De Silva, *et al.*, 1997; Almansa *et al.*, 2001). Sin embargo, dicha capacidad de síntesis también puede ser cuantitativamente limitada, por lo que también es común que los peces de agua dulce cuya dieta es suplementada con HUFA n-3 y n-6 presenten mejores tasas de supervivencia y crecimiento

comparados con organismos alimentados con 18:2n-6 y 18:3n-3 (Henderson *et al.*, 1987; Brett y Navarra 1997; Gill y Valivety, 1997; Bell y Sargent, 2003). Dichas diferencias en la capacidad de síntesis de ácidos grasos entre los peces marinos y dulceacuícolas se manifiestan en un mayor contenido de HUFA en las especies marinas, dado que las especies marinas tienden a depositar los ácidos grasos obtenidos de la dieta en los tejidos, mientras que las especies de agua dulce, tienden a sintetizar solo la cantidad de ácidos grasos necesaria para satisfacer sus necesidades fisiológicas a corto plazo (Tocher, 2003). Por lo anterior, se considera en general que las especies marinas son una fuente importante de HUFA n-3 (EPA y DHA) comparado con las especies de agua dulce (Steffens, 1997). A su vez, los contenidos de éstos ácidos grasos en los peces tiene una alta relevancia a nivel de nutrición humana debido su creciente importancia en salud humana a distintos niveles (Simpoulos 2000a; Simpoulos 2000b; Maina *et al.*, 2003). Finalmente, es necesario considerar que la capacidad de síntesis de ácidos grasos y/o actividad de las enzimas involucradas disminuye conforme aumenta la edad de los organismos, por lo tanto, es variable en las diferentes etapas del ciclo de vida de cada especie (Tocher, 2003). Así mismo, si la proporción de HUFA DHA/EPA en la dieta no es adecuada para la especie y/o etapa del ciclo de vida se puede promover una competencia entre las enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos a la hora de convertir estos a moléculas funcionales como los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, etc.) (Henderson *et al.*, 1987; Tocher, 2003; Aguilar y Mendoza, 2004).

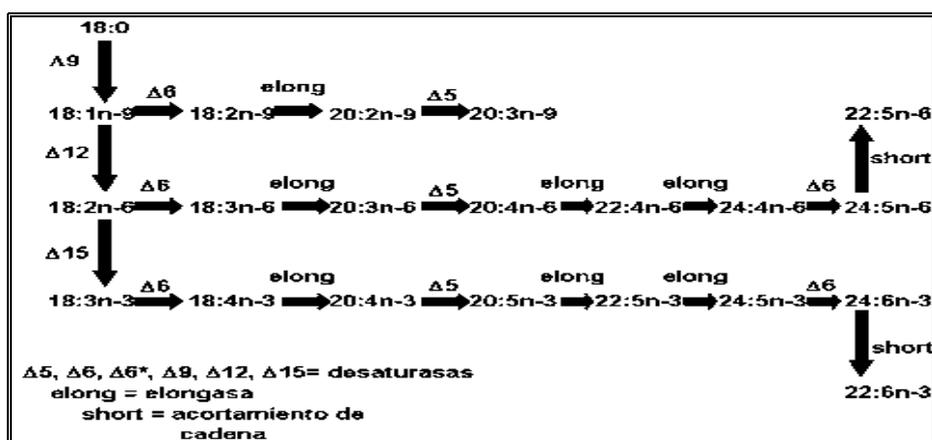


Figura. 1. Diagrama de la ruta de elongación y desaturación de los ácidos grasos en sus diferentes familias ω-3, ω-6 y ω-9 a partir del ácido graso 18:0. (Adaptado de Aguilar y Mendoza 2004)

Como se mencionó anteriormente, el pez blanco de Pátzcuaro, como todas las especies del género *Menidia* posee un origen marino, y su requerimiento de ácidos grasos podría estar más cercano al de sus ancestros marinos (Monroy-Mendoza 2006). Los adultos silvestres (Martínez-Palacios *et al.*, 2006) así como la progenie (Palacios *et al.*, 2007) presenta altos niveles de DHA y bajos de EPA, lo cual resulta en relaciones de DHA/EPA entre 7 y 10 que suelen observarse también en otras especies dulceacuícolas (Cengiz *et al.*, 2003; Maina *et al.*, 2003). En contraste, los niveles relativos de EPA y DHA en el alimento natural (zooplancton) del lago o del alimento suministrado a nivel cultivo (*Artemia* y alimento peletizado) resultó ser muy diferente con una relación DHA/EPA igual o inferior a 1 y un contenido relativamente alto de PUFA n-3 (18:3n-3 y 18:4n-3) (Palacios *et al.*, 2007). Estos resultados en conjunto con diversos estudios nutricionales donde predominaba el ácido linolénico (18:3n-3) en la dieta (Valencia-Betancourt *et al.*, 2004; Monroy-Mendoza 2006), sugiere que el pez blanco es capaz de sintetizar y por ende tener altos niveles de DHA a partir de la elongación y desaturación de otros PUFA o HUFA n-3. Sin embargo, al igual que lo expuesto anteriormente para otras especies dulceacuícolas, es posible que el suplemento nutricional de HUIFA n-3 resulte en ventajas directas en el desempeño del cultivo del pez blanco. Adicionalmente y considerando la relación particular de DHA/EPA del pez blanco, es importante analizar si variaciones en dicha relación en la dieta pueden influenciar el desempeño en cultivo. Este tipo de estudios hacen parte de un conjunto de investigaciones enfocadas a incrementar el bajo crecimiento en cultivo que tiene el pez blanco (Martínez-Palacios *et al.*, 2004). Colateralmente es importante considerar la composición de ácidos grasos de la carne del pez blanco para fines de consumo humano, tal como se ha analizado en otras especies como la tilapia *Oreochromis niloticus* en la cual el contenido particular de DHA dependió en buena medida de su suministro en la dieta (Maina *et al.*, 2003). Dado que el pez blanco de manera natural es un organismo zooplanctófago no estricto (Ross *et al.*, 2006), se han podido evaluar los requerimientos nutricionales de proteína, lípidos y carbohidratos, utilizando dietas artificiales. Sin embargo y al igual que otros atherinópsidos como el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), *Menidia estor*, durante el cultivo, ha sido dependiente del alimento vivo (rotífero y nauplio de *Artemia*), no sólo durante la etapa larvaria sino también en la etapa juvenil, aunque en menor grado, como en la mayoría de especies del género (Bahamondes, *et al.*, 1979; Martínez *et al.*, 2002; Mancini *et al.*, 2009).

Por lo anterior en el presente trabajo, se planteó analizar los efectos de la cantidad y calidad de HUFA en la dieta de juveniles del pez blanco, utilizando a los náuplios de *A. franciscana* como medio para enriquecer y hacer llegar estos ácidos grasos a los peces (Léger *et al.*, 1986). Gracias a un control de calidad estricto, con este procedimiento, se puede evitar en cierta medida tanto la oxidación o transformación de HUFAs, al manipular los tiempos y procedimientos de enriquecimiento. En el caso de pez blanco ya se han realizado algunos estudios de enriquecimiento con rotífero (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia*, en particular en larvas, donde se encontró que el enriquecimiento mejora el crecimiento y supervivencia de esta especie (Valencia-Betancourt *et al.*, 2004; Monroy-Mendoza, 2006; Navarrete-Ramírez 2006). Sin embargo no se han realizado estudios con juveniles, por lo cual el propósito del presente trabajo fue evaluar los protocolos de enriquecimiento de *Artemia franciscana* con diferentes proporciones de DHA/EPA en la dieta para juveniles de pez blanco *M. estor*, en términos de crecimiento y supervivencia, lo que permitirá desarrollar esquemas de alimentación con alimento enriquecido, óptimos para juveniles de esta especie.

III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del enriquecimiento de *Artemia franciscana* con diferentes proporciones de DHA/EPA en la dieta para juveniles de pez blanco *Menidia estor*, en términos de crecimiento y supervivencia.

III.1 Objetivos Particulares.

- Estandarizar el método para enriquecer nauplios de *Artemia franciscana* con diferentes proporciones de DHA/EPA.

- -Analizar el efecto de 5 tratamientos en donde se enriquecieron nauplios de *A. franciscana*, con diferentes proporciones de DHA/EPA usados como alimento de juveniles de *Menidia estor*, evaluando el crecimiento y supervivencia.

-Evaluar los niveles de ácidos grasos, en hígado y músculo de juveniles alimentados con nauplios de *Artemia* enriquecida con diferentes proporciones de HUFA.

IV CAPITULO I

ESTANDARIZACION DEL MÉTODO PARA ENRIQUECER NAUPLIOS DE *Artemia franciscana* CON DIFERENTES PROPORCIONES DE DHA/EPA.

IV.1. RESUMEN

La utilización de *Artemia franciscana* (nauplios y adultos) enriquecida con ácidos grasos ω -3 específicamente DHA y EPA como principal alimento de peces, ha sido motivo de abundante investigación, el caso del cultivo del pez blanco *M. estor*, el alimento vivo (nauplio de *Artemia franciscana*) también es utilizado en las primeras etapas de desarrollo y en menor grado en estado juvenil. El objetivo del presente capítulo fue analizar las condiciones óptimas de enriquecimiento de nauplios de *Artemia franciscana*, investigando el efecto del tiempo de enriquecimiento (18 y 24 h), el efecto de un doble enriquecimiento (0 y 12h) y el efecto del lavado del nauplio de *Artemia* después de ser enriquecida. Con el fin de llevar a cabo lo anterior se utilizaron dos emulsiones con diferentes proporciones de DHA/EPA (4 y 0.6). Los experimentos se realizaron con la finalidad de evaluar el posible efecto de las variables mencionadas en los niveles de ácidos grasos DHA y EPA en el nauplio de *Artemia* para posteriormente utilizarlo como alimento para juveniles de pez blanco. Los resultados encontrados indican que tanto el tiempo óptimo de enriquecimiento como el efecto de un doble enriquecimiento dependen en gran medida del tipo de emulsión que se utilice. Sin embargo, según los resultados obtenidos, se establece que después de un periodo de enriquecimiento de 18 h, se obtienen niveles mayores de DHA, por lo que se considera que es posible iniciar con el esquema de alimentación después de ese periodo. Aunque se obtienen mejores resultados con un doble enriquecimiento de *Artemia* durante 24 horas para la emulsión con una relación de DHA/EPA=4 no sucede lo mismo para la emulsión de DHA/EPA=0.6. Por el contrario, el doble enriquecimiento significa un mayor esfuerzo para el usuario en condiciones de 18 horas de enriquecimiento. Por su parte, la realización de un lavado para eliminar la emulsión adherida al cuerpo de la *Artemia* no afecta sustancialmente el contenido de DHA en ella y es preferible realizarlo para evitar contaminación en la unidad de cultivo. Por lo anterior, el procedimiento recomendado para la fase experimental con peces fue de 18 a 24 horas de enriquecimiento para los distintos suministros de *Artemia* a los peces durante el día, un solo enriquecimiento y un lavado de la *Artemia* antes de ser suministrada a los peces.

IV.2. INTRODUCCIÓN.

La alimentación a base de presas vivas para larvas de peces jóvenes sigue siendo esencial en las operaciones comerciales, debido a que en la actualidad aun no existe una formulación de alimento artificial disponible para poder sustituir completamente la utilización del nauplio de *Artemia*. La *Artemia* presenta características importantes como una rápida y sencilla disponibilidad de nauplios, una buena digestibilidad, una cutícula delgada, su movimiento constante, la ausencia de respuesta de escape, el color llamativo y una buena palatabilidad (Monroig, 2006). Sin embargo, la *Artemia* tiene un gran desventaja en cuanto a su calidad nutricional, dado que es relativamente pobre en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) y carece por completo de ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3), el cual es esencial para muchas especies de peces (Ando *et al.*, 2003). Una práctica común para enriquecer estas presas vivas es la utilización de emulsiones basadas en aceites, ya sea de origen vegetal o más comúnmente marinos (Leger *et al.*, 1986).

El enriquecimiento de *Artemia* es una práctica común en acuicultura que se basa en aprovechar la característica filtradora de las presas vivas mediante la cual incorpora en su cuerpo los nutrientes del enriquecedor, funcionando como vehículo hacia los peces (figura 2). Hoy en día, existen en el mercado una amplia gama de productos comerciales para ser utilizados como enriquecedores. Los más utilizados son las emulsiones con base en aceites de pescado o en derivados de algas y/o plantas (maíz), ricas en determinados ácidos grasos (ARA, DHA, EPA), a los que se les añade emulsionantes naturales, como las lecitinas o yema de huevo, o artificiales, como el Tween o el Span, manteniendo los otros nutrientes esenciales más o menos constantes (Bransden *et al.*, 2005). Dada la carencia particular de DHA en la *Artemia* y al incremento en el conocimiento científico acerca de los requerimientos de DHA, así como sobre la disponibilidad de este ácido graso en diferentes ingredientes, las formulaciones tradicionales ricas en EPA, se han sustituido por nuevos productos ricos en DHA. Todos estos cambios en la formulación de emulsiones para el enriquecimiento de *Artemia*, ofrece más posibilidades para cubrir las necesidades de las diferentes especies y ayudar a reducir los problemas relacionados con las enfermedades, resistencia al estrés, las deformidades, y pigmentación en numerosas especies de peces; aunado a esto se ha observado que los organismos llegan a presentar mejor crecimiento y

supervivencia cuando el alimento es enriquecido con emulsiones ricas en ácidos grasos ω -3 (Ando *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005; Monroig *et al.*, 2006; Palmtag *et al.*, 2006).

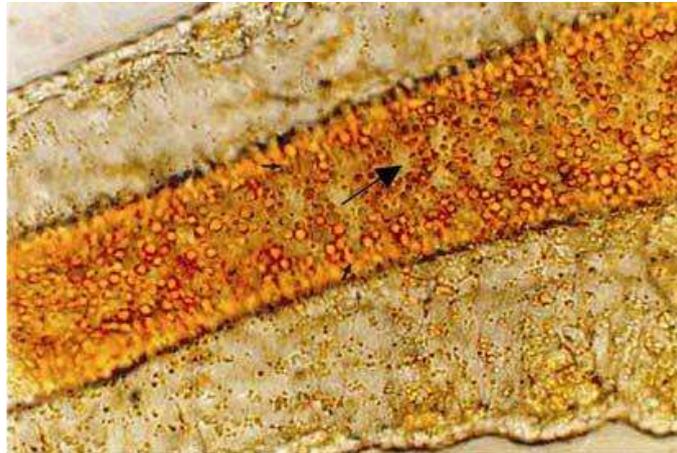


Figura 2. Microfotografía que muestra la región intestinal del nauplio de *Artemia* enriquecida por 18 h (Arulvasu y Munuswamy, 2009).

El enriquecimiento tiene sus limitaciones debido a que la *Artemia* cataboliza selectivamente algunos de los nutrientes como el DHA. Se ha demostrado en diferentes cepas de *Artemia* que el DHA es catabolizado o “retroconvertido” a EPA y que esto depende en gran medida del tiempo de enriquecimiento, de la temperatura, del tipo y dosis de la emulsión, o dicho de otra manera de la técnica de enriquecimiento (Shiozaki *et al.*, 2005, Immanuel *et al.*, 2007). Aun cuando el enriquecimiento se está convirtiendo en una operación de rutina en muchos criaderos de organismos acuáticos, algunas condiciones de enriquecimiento siguen siendo importantes objetos de estudio para llegar a conocer las variaciones del contenido de ácidos grasos que finalmente se ofrece como alimento del organismo de interés. Por lo anterior existen cierto número de trabajos que evalúan dichas variaciones en función las condiciones y procedimientos particulares del enriquecimiento. Así, un factor importante que es tomado en cuenta, es el tiempo de enriquecimiento, que regularmente va desde 12 h, hasta un periodo de 24 h después de la eclosión (Han *et al.*, 2000). Al comparar el curso temporal de incorporación de ácidos grasos, se ha observado que en periodos de enriquecimiento entre 12 y 18h, el contenido de DHA o de HUFA totales prácticamente alcanzan sus niveles máximos (Han *et al.*, 2000; Evjemo *et al.* 2001; Immanuel *et al.*, 2007; Arulvasu y Munuswamy, 2009). Por otro lado, Léger *et al.* (1987) observaron que el dividir la ración total de la emulsión enriquecedora en dos o hasta tres raciones no mejoraba el contenido total de HUFA o el contenido particular de DHA al

cabo de 24 y 48 horas de enriquecimiento. Sin embargo, no está del todo claro si algunas de las condiciones particulares de los trabajos citados pueden afectar de manera diferencial la incorporación/retención particular de DHA en función de una determinada relación DHA/EPA en la emulsión, por lo que el objetivo del presente trabajo fue estandarizar el método para enriquecer nauplios de *Artemia franciscana* con diferentes proporciones de DHA/EPA, para alimentar juveniles de pez blanco *M. estor*.

IV.3 .MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.3.1. Diseño experimental.

IV.3.1.1. Obtención de nauplio de *Artemia* para análisis de enriquecimiento.

Para la obtención de nauplios de *Artemia* para el análisis de enriquecimiento, se utilizaron 45g de quiste de *Artemia*; el cual fue desenquistado con una solución de hipoclorito de Sodio (NaClO) al 60% y una solución de tiosulfato de sodio al 10%. Posteriormente fue puesto a eclosionar por 24 h a una salinidad de 25‰. Los nauplios de *Artemia* obtenidos después de la eclosión fueron transferidos a unidades experimentales de 1L de agua a la misma salinidad y a una densidad de 200,000 *Artemia*/L (Dhert y Sorgelos; 1993). Posteriormente se agregó la emulsión correspondiente en una proporción total de 0.6 g/200,000 nauplios/L que fue proporcionada diferencialmente según el experimento.

IV.3.1. 2. Enriquecimiento de nauplio de *Artemia*.

Se realizaron tres experimentos diferentes para evaluar las condiciones prácticas óptimas a usar en el bioensayo final con los peces. Estas evaluaciones se hicieron con emulsiones proporcionadas por el “*Artemia Referente Center*”, Universidad de Ghent, Bélgica (ICES standar reference emulsions) y que contenían un 30% de HUFAs, dos relaciones diferentes de DHA/EPA de 0.6 y 4, de tal manera que se usaron 2 emulsiones:

- Emulsión con 30% de HUFAs totales y una proporción de DHA/EPA=4 (E100-4).
- Emulsión con 30% de HUFAs totales y una proporción de DHA/EPA=0.6 (E100-0.6).

IV.3.1.2.1 Experimento 1: Efecto del tiempo de enriquecimiento.

Se proporcionó una sola dosis inicial de 0.6 g a y se tomaron muestras de los nauplios de *Artemia* enriquecida al cabo de 18 y 24 horas de enriquecimiento, con tres réplicas por tiempo.

IV.3.1.2.2 Experimento 2: Efecto del doble enriquecimiento.

Se comparó el enriquecimiento sencillo que consiste en una sola ración inicial de emulsión de 0.6 g con el enriquecimiento a dos tiempos (0 y 12 h) con dos dosis de 0.3g/200,000 nauplios/L a cada tiempo. En ambos casos se colectó la muestra de *Artemia* enriquecida (n=3 réplicas por tratamiento) al cabo de 24 h para el análisis de ácidos grasos.

IV.3.1.2.3 Experimento 3. Efecto del lavado de la *Artemia* posterior al enriquecimiento.

Esta evaluación se realizó tanto con una sola dosis como con dos dosis de enriquecimiento, de acuerdo con el protocolo del experimento anterior, dado que era importante evaluar si la influencia del lavado podría ser variable dependiendo del suministro de las raciones de emulsión. Para las muestras sin lavado, únicamente se eliminó el exceso de agua, mientras que en las muestras lavadas se hacía pasar 1 L de agua a través de un tamiz, en el cual se retenía el nauplio de *Artemia*.

IV.3.2.1 Análisis del perfil de ácidos grasos del nauplio de *Artemia*.

Para determinar el perfil de ácidos grasos del nauplio de *Artemia*, se tomaron 50 mg de nauplio y se colocaron en 6 ml de solución Folch (mezcla de cloroformo: metanol 2:1), utilizando la metodología descrita por Palacios y Arjona (2007) que se describe brevemente a continuación. A cada una de las muestras se les agregó 10 µL de BHT (Butilhidroxitolueno) para evitar la oxidación de la muestra y 10 µL de ácido graso C:23 (ácido tricosanoico), como estándar interno.

Las muestras se almacenaron a una temperatura de -4°C, para su posterior análisis. Cada muestra fue separada en 2 partes iguales (3 ml), utilizando una parte para el análisis para ácidos grasos totales de cada tratamiento mientras que el resto de la muestra se almacenó como respaldo. Los 3 ml de homogenizado se evaporaron con nitrógeno gaseoso hasta concentrar la muestra en aproximadamente 0.5ml. Una vez concentrada la muestra se agregó 1 ml de hexano y se procedió a centrifugar la muestra a 2000 rpm a 5°C por 5

minutos, para separar la muestra en dos fases (metanol:HCL y hexano), para posteriormente desechar la parte inferior de la muestra (metanol:HCL) dejando únicamente el hexano conteniendo los metil-esteres de la muestra. Finalmente para lograr eliminar los posibles residuos y recuperar únicamente el contenido de lípidos, se realizaron dos lavados agregando 2 mL de H₂O destilada, después de agitar los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos a 4° C para su separación en dos fases. La fase inferior (agua + restos de carbohidratos) se separó de la fase superior (hexano + ácidos grasos metil-esterificados o FAME por sus siglas en inglés), eliminando la primera con pipetas Pasteur y agregando agua nuevamente para repetir el procedimiento de lavado. Las muestras se almacenaron a -20° C hasta lograr el congelamiento de la fase acuosa.

Una vez congelada el agua se recuperó la fase de hexano con los FAME y se colocaron en viales de ámbar de 1 mL con tapa de teflón los cuales se almacenaron a -20°C. Los FAME obtenidos fueron analizados por cromatografía de gases en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste modelo HPG1800B. Se utilizó una columna capilar de silica fundida de 30 m de longitud por 0.25um (espesor de película) por 0.25 mm (diámetro interno), fase de pili-etileno-glicol con helio como gas acarreador un flujo de 0.9ml/min, una rampa de temperatura de 110-220°C. La identificación de los FAME se realizó comparando el tiempo de retención de la muestra con el de estándares conocidos (37 Component FAME Mix de Supelco y Marinol).

Finalmente se realizó la identificación de los picos del cromatograma de cada una de las muestras analizadas (figura 3).

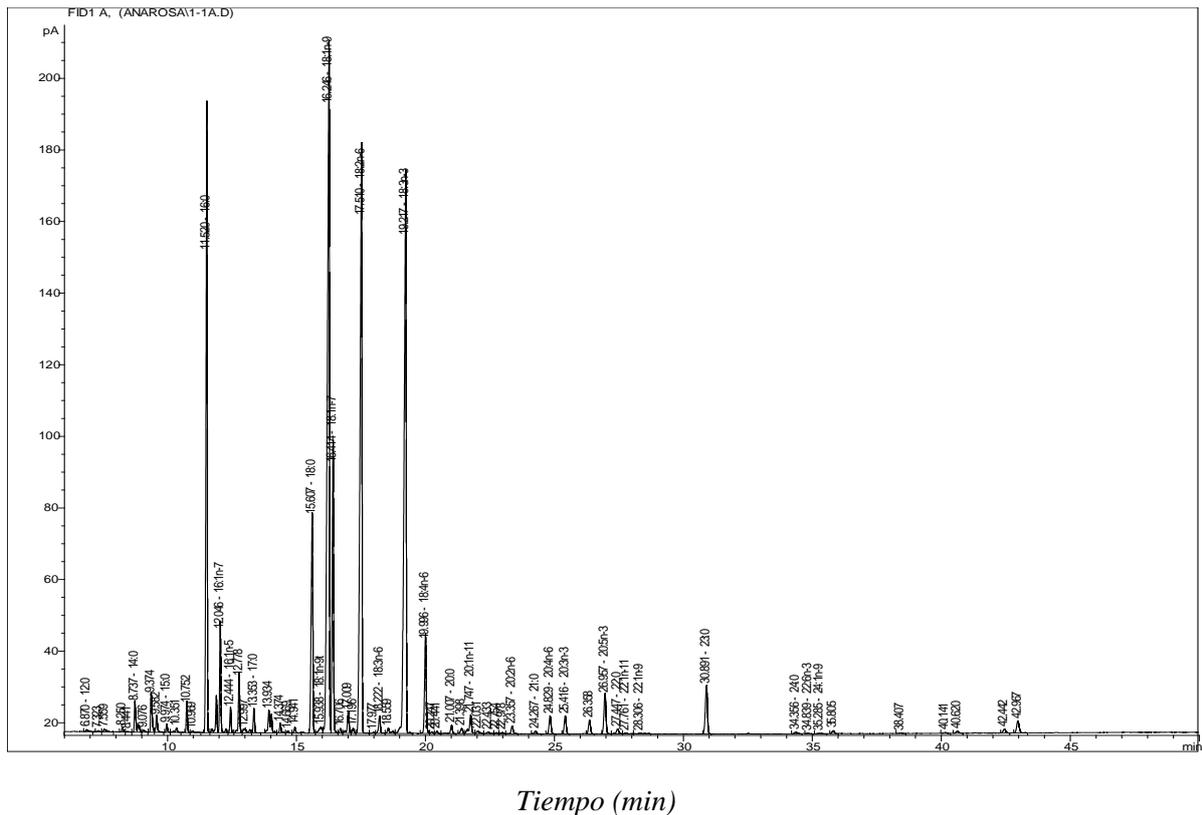


Figura 3. Separación de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante una técnica de GC con una columna tubular abierta y detección por ionización de llama de un patrón comercial (37 Component FAME Mix de Supelco).

IV.3.3.1 Estadística.

Los datos se reportan como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre medias de los distintos tratamientos se determinaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias. El nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$. Los valores expresados en porcentaje fueron transformados mediante arcoseno para su análisis estadístico. Se reportan aquí únicamente los datos correspondientes a los perfiles de DHA, EPA y la relación DHA/EPA, mientras que el resto de los ácidos grasos se reportan en el Anexo 1, 2 y 3.

IV.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.4.1 Análisis de *Artemia* enriquecida.

IV.4.1.1. Análisis del tiempo de enriquecimiento de nauplio de *Artemia*.

Los resultados del experimento para determinar el tiempo óptimo de enriquecimiento del nauplio de *Artemia* con las emulsiones se muestran en la Figura 4. Tal y como era de esperarse, se puede apreciar una mayor proporción de EPA, una menor proporción de DHA y por consiguiente una menor relación DHA/EPA con la emulsión con menor relación DHA/EPA. A mayor tiempo de enriquecimiento, se incrementó el contenido de EPA sólo con la emulsión E100-4, tal y como lo muestra la interacción significativa. En contraste, el contenido de DHA y la relación DHA/EPA disminuyen al cabo de 24 horas de enriquecimiento comparado con 18 horas, tal y como lo indica el efecto significativo del factor tiempo. Sin embargo, este efecto fue más pronunciado en el caso de la emulsión con alta relación DHA/EPA, tal y como lo indica la interacción significativa para la relación DHA/EPA en la *Artemia*.

Los datos obtenidos en diversos trabajos son muy variables y dependen de una serie de factores como la dosis y el tipo de emulsión (Coutteau y Mourente 1997; Evjemo *et al.*, 2001; Immanuel *et al.*, 2007), la especie de *Artemia* (Evjemo *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2000), así como de las condiciones físicas (temperatura, luminosidad) (Evjemo *et al.*, 2001) y químicas (salinidad). McEvoy *et al.*, (1997) encuentran que a partir 15h de enriquecimiento con aceite de orbital de atún mezclado con diferentes proporciones de fosfatidilcolina (PC), hay una disminución notable del contenido de DHA y EPA, pero ésta depende del contenido de PC de la emulsión que al parecer ejerce un papel protector, al impedir la oxidación de estos HUFA. En contraste, al usar emulsiones ICES que contienen antioxidantes sintéticos, el DHA se incrementa progresivamente hasta las 24 horas que dura el enriquecimiento (Evjemo *et al.*, 1997); mientras que al usar una emulsión comercial rica en DHA (Selco-INVE), hay un incremento progresivo muy pronunciado de DHA entre 0 y 12 horas seguido de un incremento mucho menor entre 12 y 24 horas (Evjemo *et al.*, 2001). Resultados similares de una incorporación menos pronunciada, pero

a partir de 6 horas de enriquecimiento, se obtuvieron con una emulsión a base de aceite de pescado, yema de huevo, vitaminas y levadura (Immanuel *et al.*, 2007).

Por lo resultados tan variables de la bibliografía, era necesario probar la influencia del tiempo de enriquecimiento para los fines prácticos del presente trabajo. Según los resultados obtenidos, es posible iniciar a ofrecer *Artemia* a partir de las 18h de enriquecimiento, considerando que el decremento en DHA y en la relación DHA/EPA es de aproximadamente 10 y 20%, respectivamente, entre 18 y 24h. Por lo anterior, se consideró factible realizar la primera alimentación con *Artemia* enriquecida por 18 horas, la segunda con *Artemia* enriquecida por 20h, una tercera a las 22h y la última con *Artemia* enriquecida por 24h.

Por otro lado y aunque no se evaluó en el presente trabajo, está documentado que después de 24h de enriquecimiento los niveles de HUFA (EPA, DHA y DHA/EPA), del nauplio de *Artemia*, tienden a disminuir, esto se ha observado al realizar trabajos donde después del enriquecimiento el nauplio de *Artemia* es sometido a periodos de inanición de hasta 96 h (Dhert *et al.*, 1993; Evjemo *et al.*, 1997 Coutteau y Mourente; 1997, Evjemo *et al.*, 2001; Naz 2008). Lo anterior se debe tanto a la oxidación de los HUFA como a una particularidad metabólica importante de los nauplios de *Artemia* que es la “retroconversión” de DHA a EPA (McEvoy *et al.*, 1995; Navarro, *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2000., Monroig *et al.*, 2007). Esto implica que el nauplio que comerán los peces durante las primeras horas será el que realmente aporte las cantidades de HUFA determinadas en este capítulo de estandarización.

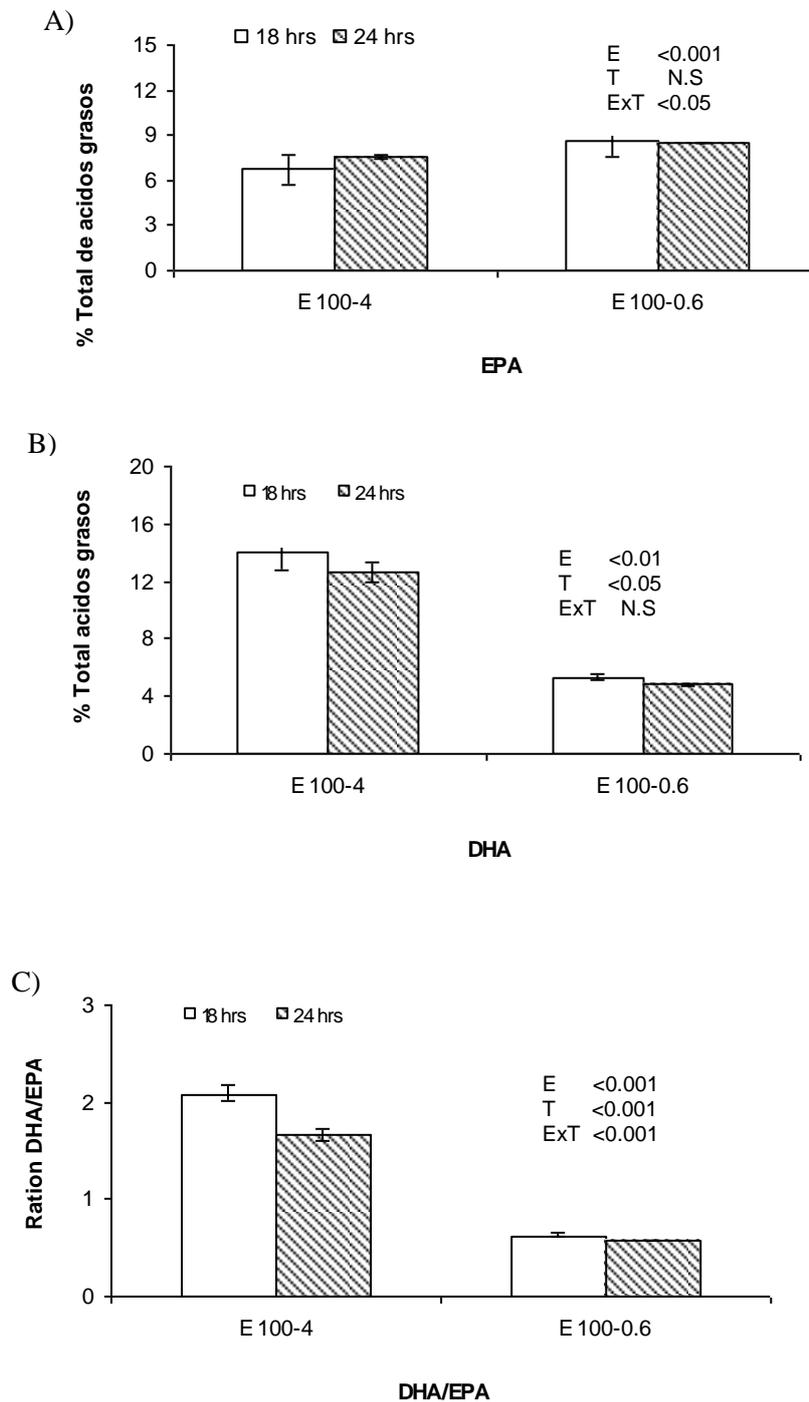


Figura 4. Niveles de EPA (A), DHA (B) y proporción de DHA/EPA (C) en nauplios de *Artemia* enriquecida por 18 y 24 horas con diferentes contenidos de DHA/EPA ratio (E100-4 y E100-0,6). Se realizó una prueba ANOVA de dos vías (E: emulsión x T: la hora de enriquecimiento).

IV.4.1.2. Análisis del efecto del doble enriquecimiento de *Artemia*.

Los resultados del experimento (Figura 5) indican que el doble enriquecimiento no favorece significativamente la acumulación de EPA en ningún tratamiento (E100-4 y E100-0.6), ya que se encontraron niveles significativamente más bajos de este ácido graso cuando se aplicó un doble enriquecimiento. En contraste, el efecto del doble enriquecimiento sobre los niveles de DHA y sobre la relación DHA/EPA dependió del tipo de emulsión, tal y como lo indica un interacción significativa. Así, el aplicar un doble enriquecimiento promovió una mayor acumulación de DHA en el nauplio de *Artemia* alimentado con la emulsión E100-4, mas no con la emulsión E100-0.6 que inclusive fue menor con un doble enriquecimiento. Lo anterior repercutió de manera directa en la relación en DHA/EPA de cada tratamiento: valores de 1.5 vs 2,5 con enriquecimiento sencillo o doble, respectivamente, con la emulsión E100-4 y un valor de 0.5 para la emulsión E100-0.6, independientemente del tipo de enriquecimiento.

Si bien Léger *et al.*, (1987) observaron que el dividir la emulsión en dos o hasta tres raciones no mejoraba la incorporación de HUFA en la *Artemia*, la mayoría de los trabajos utilizan un doble enriquecimiento (McEvoy *et al.*, 1997; Evjemo *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2000; Evjemo *et al.*, 2001) a menos que utilicen tiempos de enriquecimiento menores a 24 horas (Immanuel *et al.*, 2007; Arulvasu y Munuswamy, 2009). Los resultados del presente trabajo si justifican el uso del doble enriquecimiento dado que los niveles de DHA fueron mayores que al suministrar la emulsión en una sola ración desde el tiempo (0h). Lo anterior puede deberse, tanto a una menor incorporación como su degradación por oxidación o retroconversión a EPA (McEvoy *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1999). Sin embargo es difícil explicar el efecto contrario con la dosis de relación baja DHA/EPA y los cambios que ocurren en paralelo con los niveles de EPA y se requieren enfoques experimentales más particulares para analizar el metabolismo de estos dos ácidos grasos en estas condiciones. En cualquier caso a partir de estos resultados obtenidos, para el bioensayo de alimentación de peces juveniles (capitulo II) se tomó la decisión de enriquecer una sola vez dado que se optó por un periodo total de enriquecimiento de 24 horas, iniciando con la primera alimentación a las 18 de enriquecimiento. Lo anterior también tiene ventajas prácticas de no tener que enriquecer a las 3:00 AM durante un periodo prolongado de tiempo que dura un bioensayo nutricional con peces.

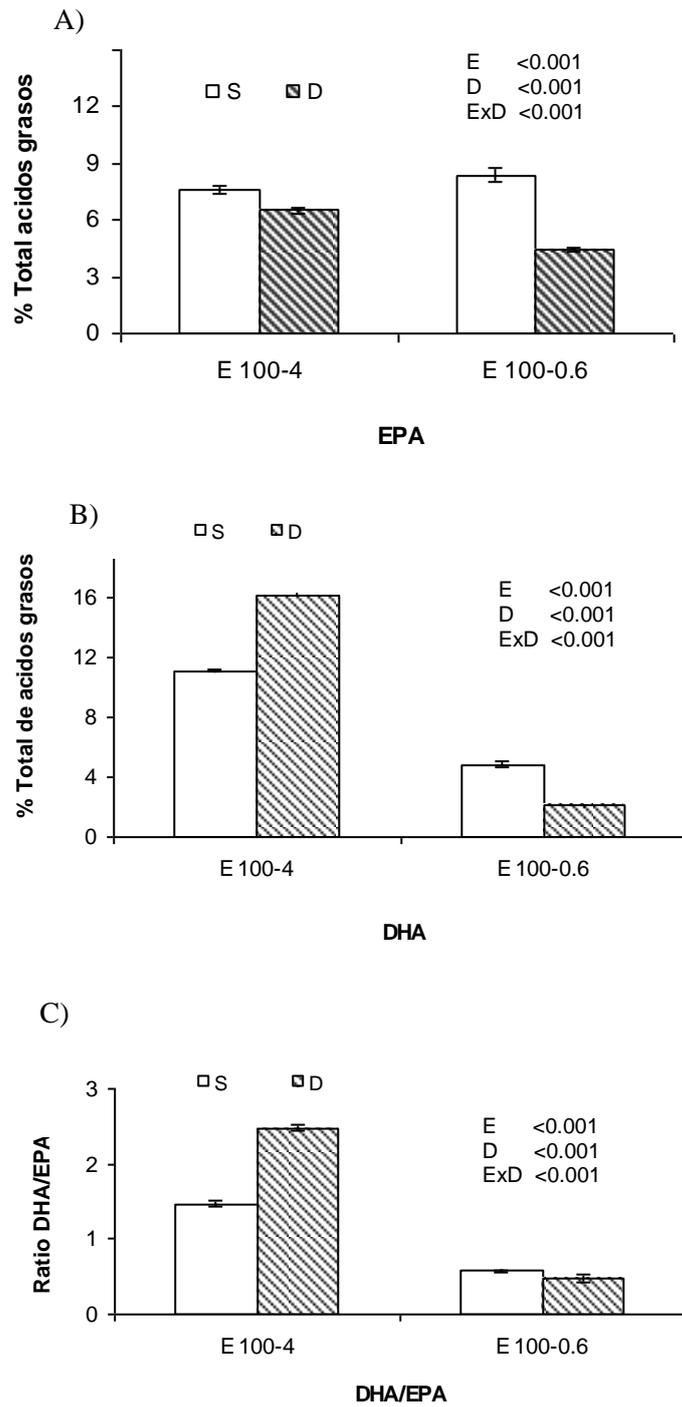


Figura 5. Niveles de EPA (A), DHA (B) y proporción de DHA/EPA (C) en nauplios de *Artemia* enriquecido por 24 horas con diferentes proporciones de DHA/EPA (E100-4 y E100-0,6) con un único (S) o doble enriquecimiento (D) (ver Métodos) Se realizó un ANOVA de dos vías (E: emulsión x D: enriquecimiento único o doble).

IV.4.1.3. Análisis del efecto de enjuague en el enriquecimiento del nuplio de *Artemia*.

IV.4.1.3.1 En condiciones de uno y doble enriquecimiento.

Los resultados de los experimentos para evaluar el efecto de un enjuague o lavado de la *Artemia* después del proceso de enriquecimiento, muestra que no existen diferencias significativas en el contenido de EPA para ningún tratamiento por efecto del lavado. Únicamente se puede apreciar que hubo diferencias significativas entre los dos tipos de emulsión (E100-4 y E100-0.6) utilizadas para el enriquecimiento. En cuanto al contenido de DHA y la relación DHA/EPA, y tal como lo indica una interacción significativa, el efecto del lavado dependió del tipo de emulsión. Con la emulsión E100-4, el lavado disminuyó ligeramente el contenido de DHA y la consecuente relación DHA/EPA mientras que este efecto no se observó con la emulsión E100-0.6. El efecto del lavado se debe muy probablemente a que una parte de la emulsión queda adherida al cuerpo de los nauplios enriquecidos, aunque es difícil explicar porque este efecto solo se observó con la emulsión E100-4.

Con el doble enriquecimiento, la influencia del lavado fue similar, aunque en este caso la pérdida de DHA por efecto de lavado con la emulsión E100-4 ya no fue estadísticamente significativa. Se esperaba una posible diferencia del efecto el lavado entre el enriquecimiento sencillo y doble, debido a la cantidad de emulsión que se agregaba en un determinado tiempo y que podía repercutir en un momento dado en una menor eficiencia de asimilación.

Aún cuando no existen trabajos en donde se haya evaluado la importancia del enjuague del nauplio de *Artemia* (con agua dulce o marina), esta es una práctica común realizada en todos los protocolos de enriquecimiento (Monroig *et al.*, 2007; Villalta *et al.*, 2005; Immanuel *et al.*, 2007; Naz 2008; Arulvasu y Munuswamy, 2009), para disminuir la contaminación del cultivo, por los restos de emulsión no ingerida que la *Artemia* tiene adherida a su cuerpo y que no es aprovechada por los peces en el cultivo. Debido a que el efecto de no lavar la *Artemia* fue mínimo y sólo representó una ganancia del 2 y 3 % en los niveles de DHA y en la relación DHA/EPA, respectivamente, el protocolo a usar con los peces fue el de realizar dicho lavado por la razón ya mencionada de no contaminar el

cultivo. Asimismo, se puede concluir que la mayor parte de los lípidos de la emulsión fueron ingeridos por la *Artemia* y no como emulsión adherida al cuerpo.

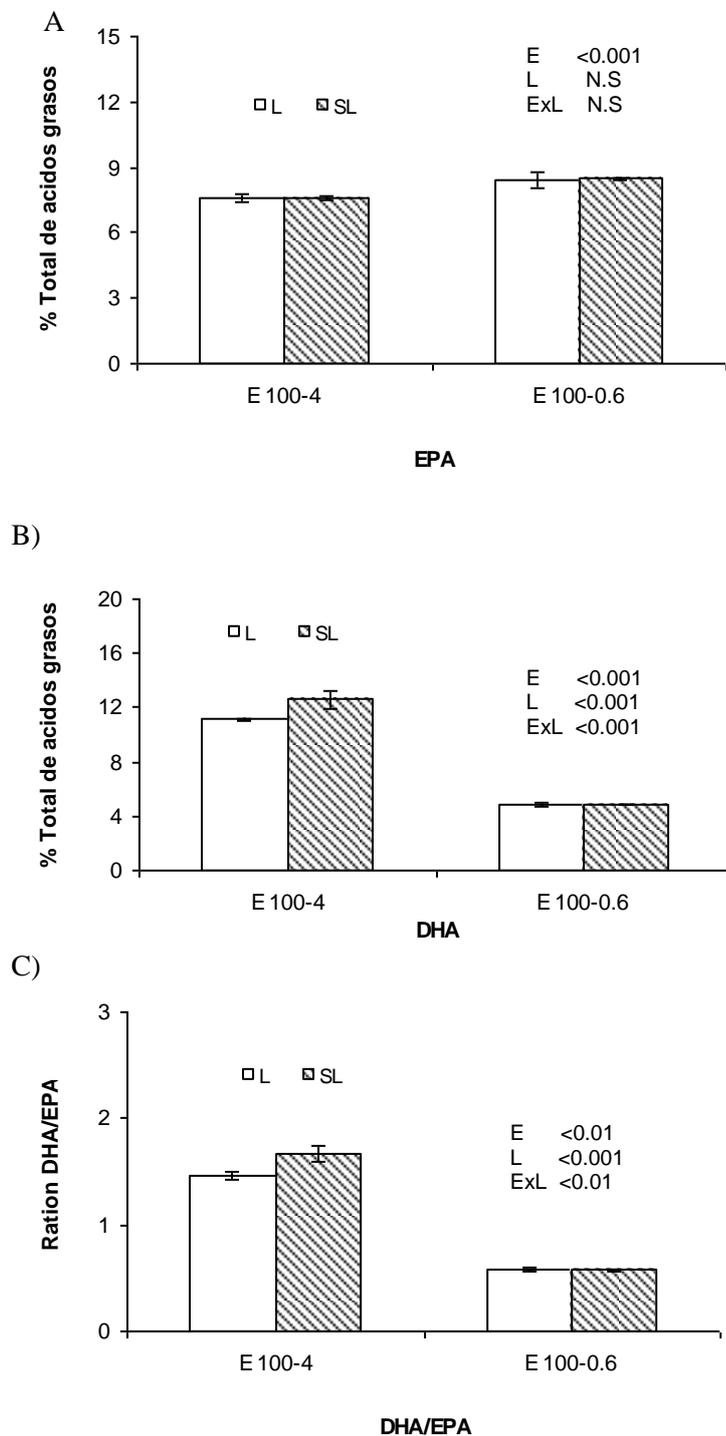


Figura 6. Niveles de EPA (A), DHA (B) y proporción de DHA/EPA (C) en nauplios de *Artemia* enriquecido por 24 horas con diferentes contenidos de DHA/EPA ratio (E100-4 y E100-0,6), y aplicando un lavado (L) o no (NL) con un solo enriquecimiento (Véanse métodos). Se realizó un ANOVA de dos vías (E: emulsión x: lavado o no lavado).

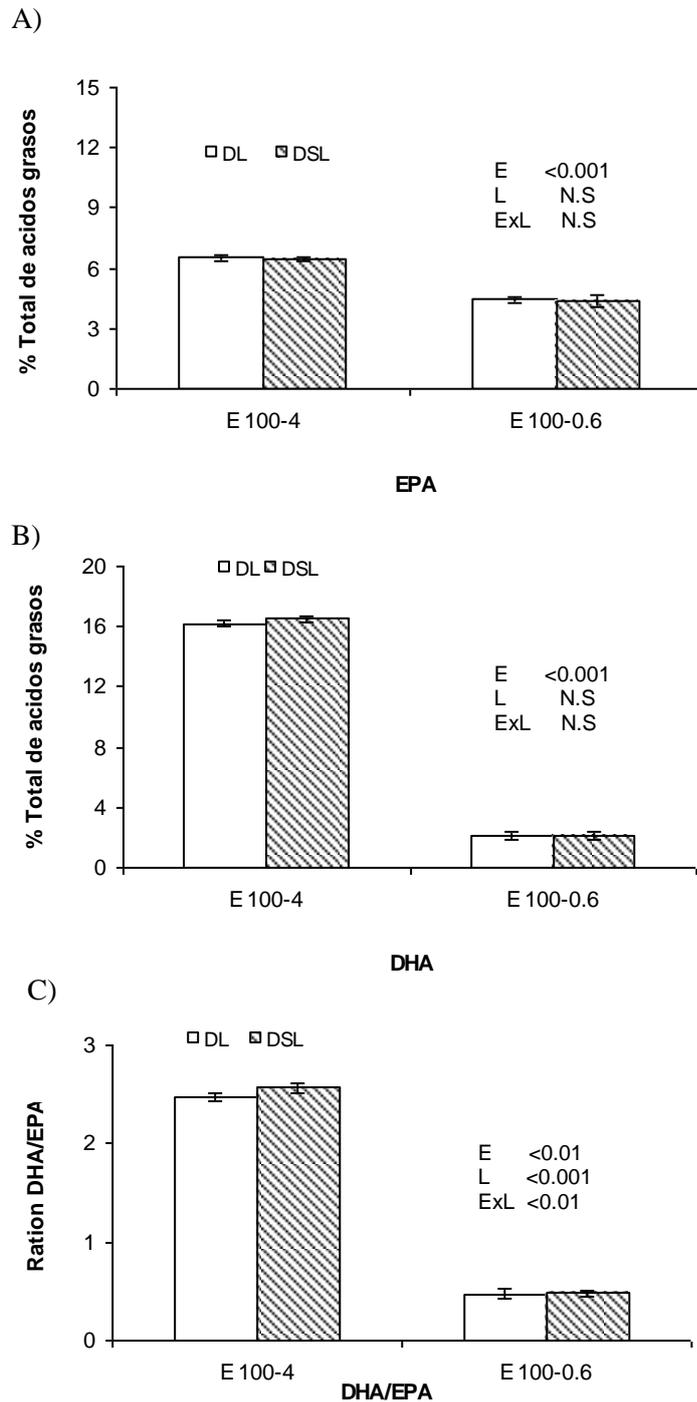


Figura 7. Niveles de EPA (A), DHA (B) y proporción de DHA/EPA (C) en nauplios de *Artemia* enriquecido por 24 horas con diferentes contenido de DHA/EPA ratio (E100-4 y E100-0,6), y aplicando un lavado (DL) o no (DSL) después de aplicar un doble enriquecimiento (Véanse métodos). Se realizó un ANOVA de dos vías (E: emulsión D x: lavado o no lavado)

V.5. CONCLUSION

Con los resultados obtenidos en este capítulo, acerca del enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* con las emulsiones ricas en HUFA se establecieron tres importantes preceptos:

- 1- que es posible iniciar el esquema de alimentación con la *Artemia* enriquecida por 18h sin reducir su calidad nutricional, lo que permite ahorrar unas horas en el proceso de enriquecimiento para ajustar de forma práctica los tiempos de enriquecimiento a los tiempos de alimentación de los peces en una planta de producción de peces.
- 2- que se obtienen mejores resultados con doble enriquecimiento al cabo de 24 horas, aunque depende del tipo de emulsión. Para fines de este trabajo se optó por un solo enriquecimiento dado que solo se usaron 18 horas de enriquecimiento y además porque simplificó la labor de usuario.
- 3- que es importante la realización de un enjuague o lavado de la *Artemia* antes de ser depositada en los tanques de cultivo. Aun cuando hay cierta pérdida de DHA, ésta es mínima y será preferible trabajar con mayor limpieza del agua de cultivo, lo que finalmente puede traducirse en menor esfuerzo para realizar los recambios de agua y menor estrés para los peces cultivados.

Finalmente la estandarización de los procesos de enriquecimiento pueden facilitar las condiciones empleadas para nauplio de *Artemia*, mejorando su contenido nutricional, de tal manera que contenga los niveles óptimos para los organismos.

Para el desarrollo de los experimentos de alimentación del pez blanco de Pátzcuaro en el siguiente capítulo, se llevó a cabo la práctica de los tres puntos anteriores para el enriquecimiento de los nauplios de *Artemia*.

V.6 LITERATURA CITADA.

- Ando, Y. Samoto and S. Sasaki. (2003). Preparation of Salmon Roe Polar Lipid Concentrate as an HUFA Enricher of *Artemia* Nauplii, *J. Oleo Sci.*, Vol. 52, 443-447.
- Ando, Y. Murayama and H. Samoto, (2004) Positional Distribution of DHA and EPA in Triacyl-*sn*-glycerols (TAG) of *Artemia franciscana* Nauplii Enriched with Fish Oils Ethyl Esters and TAG, *Aquaculture*, Vol. 233, 321-335.
- Arulvasu C. and Munuswamy N, (2009). Survival, growth and composition of *Poecilia latipinna* fry fed enriched *Artemia* nauplii. *Current Science*, Vol. 96, No. 1.
- Coutteau P, Mourente G (1997). Lipids class and their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia Franciscana* after hatching, HUFA enrichment and subsequent starvation. *Mar. Biol.* 130: 81-91.
- Brandsen, 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.
- Dhert, P., Sorgelos, P. (1993) Contribution towards a specific DHA enrichment in the live food *Brachionus plicatilis* and *Artemia* sp. In: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jorgensen, L., Tvinnereim, K. ŽEds., *Fish Farming Technology*. Balkema, Rotterdam, Netherlands, pp. 109–115
- Evjemo J O, Coutteau P, Olsen Y, Sorgeloos P (1997) The stability of docosahexaenoic acid in two *Artemia* species following enrichment and subsequent starvation. *Aquaculture* 155:135–137.
- Evjemo J O, Danielsen TL, Olsen Y (2001) Losses of lipids, protein and n-3 fatty acids in enriched *Artemia franciscana* starved at different temperatures. *Aquaculture* 193:65–80
- Han, K. I. Geurden and P. Sorgeloos. (2000). Enrichment Strategies for *Artemia* Using Emulsions Providing Different Levels of n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids, *Aquaculture*, Vol. 183, 335-347.

- Han, K., Geurden, I., Meeren, P. V., 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 methods and storage time. *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol 36 (2) pp 196-202.
- Immanuel G, T. Citarasu, V. Sivaram, V. Selva Shankar, A. Palavesam. (2007). Bioencapsulation strategy and highly unsaturated fatty acids (HUFA) enrichment in *Artemia franciscana* nauplii by using marine trash fish *Odonus niger* liver oil. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (17), pp. 2043-2053.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24, 521-623.
- Leger, P., Bengtson, D.A., Sorgeloos, P., Simpson, K.L. and Beck, A.D. (1987) *Artemia* Research and its applications. Vol. 3. Ecology, culturing, use in aquaculture. In: *The Nutritional Value of Artemia: A Review*. (eds P. Sorgeloos, D. A. Bengtson, W. Declair and E. Jaspers). Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 357–371
- 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.
- Monroig, O. (2006). Diseño y optimización de liposomas para su uso como sistema suministro de nutrientes a larvas de peces marinos. Tesis doctoral. Universidad de Valencia España.
- Monroig O., Navarro J. C., Amat F., González P., Hontoria F., (2007) .Oxidative stability and changes in the particle size of liposomes used in the *Artemia* enrichment. *Aquaculture* Vol. 266, pp 200-210
- 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.
- Naz M (2008) The changes in the biochemical compositions and enzymatic activities of rotifer (*Brachionus plicatilis*, Muller) and *Artemia* during the enrichment and starvation periods. *Fish Physiol Biochem* 34, pp 91–404.

- Palmtag, R. M., Faulk, C. K., Holt, G. J. (2006). Highly unsaturated fatty acid composition of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* fed various enrichments. *Journal of World Aquaculture Society*, **1** (37): 126-131.
- Palacios, M. E., Arjona, L. O (2007). Análisis de ácidos grasos metal-esterificados (Derivatización directa) en alimentos peletizado enriquecido con ácidos grasos. Manual. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Primera Edición. La Paz, B. C. S. México. Reporte técnico No. 1..
- Shiozaki R and Yasuhiro Ando (2005) Positional Distribution of DHA in Triacyl-*sn*-glycerols of *Artemia* Nauplii Enriched with Salmon Roe Polar Lipids-Containing Fish Oil. *Journal of Oleo Science*. Vol. 54, No. 3 161-166
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., Bell, J.G., 2005. 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.

V
CAPITULO II.

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA RELACIÓN DHA/EPA EN EL CRECIMIENTO Y
SUPERVIVENCIA DE JUVENILES DE *Menidia estor* (ATHERINOPSIDAE),
ALIMENTADOS CON NAUPLIO DE *Artemia* ENRIQUECIDA.

V.1. RESUMEN.

El desarrollo de la tecnología para lograr el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) ha avanzado de manera satisfactoria. Sin embargo, aún es necesario optimizar las prácticas de cultivo, así como conocer acerca de sus requerimientos nutricionales para lograr un mejor crecimiento. Anteriormente se ha descrito que esta especie presenta altos niveles de DHA, al parecer debido a una alta capacidad de síntesis a partir de ácido linolénico (18:3n-3), que aparentemente cubre sus requerimientos en larvas. Dado el bajo crecimiento en cultivo que registra *M. estor*, se consideró necesario evaluar el efecto del suministro de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) sobre el crecimiento, la supervivencia y el perfil de ácidos grasos de juveniles de *M. estor*. Se evaluaron cinco tratamientos alimenticios consistentes de nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos por 18 h con una emulsión basada en aceite de maíz; dos emulsiones (con 30% de HUFA totales) con dos relaciones de DHA/EPA (4 y 0.6) y otras 2 emulsiones (con 15% de HUFA totales) con la mismas relaciones de DHA/EPA. Después DE 90 días de bioensayos se pudo observar que los peces que fueron alimentados con el nauplio de *Artemia* enriquecido con la emulsión EM mostraron una ganancia de peso (1.48 ± 0.06^b) y una longitud total (6.59 ± 0.27^c) significativamente mayores con respecto al resto de los tratamientos ($p < 0.05$). Los valores de supervivencia oscilaron entre 78.8 y 88.8 %, los cuales mostraron diferencias significativas en tratamiento. El hígado y músculo de los peces alimentados con cualquiera de las 5 emulsiones registraron una relación de DHA/EPA cercana a 7. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente bioensayo, donde al parecer *M. estor*, no requiere de DHA/EPA en la dieta, por lo que sus requerimientos son básicamente de ácido linolénico (18:3n-3), dado los niveles elevados de DHA encontrados en esta especie.

V.2 INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes a considerar en el cultivo del pez blanco, así como todas las especies cultivadas, es concerniente a lograr una nutrición adecuada de la especie. Diversos autores han estudiado el efecto de los lípidos en la nutrición de peces y resaltan la importancia de los mismos como estimuladores del crecimiento, fuente de energía, constituyentes estructurales de las membranas celulares que favorecen los procesos de osmo-regulación y la permeabilidad de las branquias, agente de transporte de sustancias liposolubles y precursores metabólicos, entre otros (Sargent *et al.*, 1993; Geurden *et al.*, 1997; Steffens, 1997; Alessandri *et al.*, 2004; Sampath y Ntambi, 2005).

El establecimiento de dietas a partir del enriquecimiento nutricional de alimento vivo (nauplio de *Artemia*) permite la incorporación de elementos esenciales en la dieta, que en algunos casos, estimulan respuestas como el crecimiento, supervivencia, desarrollo y resistencia a condiciones estresantes comúnmente presentadas en las actividades de cultivo (Sakamoto *et al.*, 1982; Narciso *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2000). En algunos casos, este enriquecimiento se basa en el uso de emulsiones lipídicas, cuyos componentes principales son aceites ricos en ácidos grasos polinsaturados de cadena larga extraídos de peces como el bacalao (Czesny *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2002) y es recomendado como alternativa para incorporar en el alimento vivo nutrientes que no son tradicionalmente encontrados en su composición natural (Smith *et al.*, 2002).

La supervivencia y crecimiento o la ganancia de peso son unos de los indicadores más importantes para evaluar el desempeño de los peces, tanto en estudios experimentales como en la producción comercial (Tacon 1989, Guillaume 2004). Es de suponer que una adecuada alimentación en estado juvenil favorecerá el crecimiento, la supervivencia y finalmente el desarrollo reproductivo.

Sin embargo, esto depende de las condiciones nutricionales a las que estén sometidos los organismos, en términos de calidad y cantidad de los principales macronutrientes (proteína, lípidos y carbohidratos), así como de constituyentes de estos macronutrientes (aminoácidos y ácidos grasos) y de micronutrientes (vitaminas y

minerales). Particularmente los ácidos grasos son de gran importancia debido a nutrientes que intervienen en el metabolismo celular, respuesta al estrés, reproducción, adaptación al ambiente, síntesis de eicosanoides, respuesta inmune, desarrollo del sistema nervioso y expresión genética, entre otros (Brett y Navarra, 1997; Steffens, 1997; Alessandri *et al.*, 2004; Sampath y Ntambi, 2005). Generalmente, se considera que los HUFA (por sus siglas en inglés) actúan como bloques estructurales de los fosfolípidos (PL) de las membranas celulares, mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados participan como lípidos de reserva (acilglicéridos, esteroides, etc.).

Los requerimientos de ácidos grasos en la dieta de los organismos varía ampliamente entre especies, de acuerdo a la etapa del ciclo de vida, sexo, dieta, factores ambientales (salinidad, temperatura, fotoperíodo, etc.); pudiendo además, intensificarse durante los períodos de mayor actividad, crecimiento, estrés y/o la temporada reproductiva (Henderson *et al.*, 1987; Booth *et al.*, 1999). Por otro lado, el requerimiento de ácidos grasos en la dieta también varía de acuerdo a la capacidad de síntesis de los organismos, la cual es regulada por la tasa de transcripción genética y la actividad de las enzimas desaturasas y elongasas. Los peces marinos no son capaces de sintetizar HUFA n-3 y n-6 a partir de sus precursores de 18 carbonos, debido a la ausencia de la elongasa C18-C20 y/o inactividad de la desaturasa $\Delta 5$; por lo que el ácido eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA) y el ácido docosahexaenóico (22:6n-3, DHA) son esenciales en su dieta (Ghioni *et al.*, 1999) y aun cuando algunas especies marinas como el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) presentan una capacidad de elongación y desaturación de PUFA a HUFA, ésta puede presentarse a una tasa y/o velocidad deficiente para cubrir sus necesidades fisiológicas (Castell *et al.*, 1994; Sargent *et al.*, 1995b; Tocher, 2003). Se ha sugerido que en ambientes marinos, la disponibilidad de dichos ácidos grasos en la dieta es alta, por lo que los peces no requieren invertir energía para sintetizarlos (Bell *et al.*, 1986; Copeman *et al.*, 2002; Bransden *et al.*, 2005). En contraste, la mayoría de los peces dulceacuícolas presentan la capacidad de sintetizar HUFA n-3 y n-6 a partir de ácido linolénico (18:3n-3) y ácido linoléico (18:2n-6) (Sargent *et al.*, 1993; De Silva, *et al.*, 1997; Almansa *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 2004). Sin embargo, dicha capacidad de síntesis puede ser limitada o presentarse a baja velocidad, por lo que los peces de agua dulce cuya dieta es suplementada con HUFA n-3 y n-6 presentan mejores tasas de supervivencia y crecimiento comparados (Henderson

et al., 1987; Brett y Navarra 1997; Gill y Valivety, 1997; Bell y Sargent, 2003). Asimismo, si la proporción de n-3:n-6 en la dieta no es adecuada para la especie y/o etapa del ciclo de vida se puede promover una competencia entre las enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos (Henderson *et al.*, 1987; Tocher, 2003; Aguilar y Mendoza, 2004). Las especies dulceacuícolas de zonas templadas requieren 0.5 al 1.0% de 18:3n-3 y 18:2n-6 (peso seco) en la dieta, presentando por lo general mayor requerimiento de 18:3n-3; mientras que las especies de zonas tropicales presentan el patrón opuesto (Tocher, 2008).

Dada la importancia de los ácidos grasos en la nutrición y por lo tanto en el desempeño de los peces (Lazo *et al.*, 2000; Delbert y Gatlin 2000; Hardy y Gatlin 2002; Gisbert *et al.*, 2008) se consideró importante determinar el efecto de nauplios de *Artemia franciscana* enriquecida con cinco emulsiones lipídicas, ricas en ácidos grasos HUFA, sobre el crecimiento y supervivencia de pez blanco.

V.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

V.3.1. Experimento con juveniles de pez blanco *M. estor*.

El experimento se realizó con juveniles de 4 meses de edad con un peso promedio de 0.54 g sometidos a 5 tratamientos nutricionales enfocados a analizar tanto el efecto del contenido total de HUFA como de la relación DHA/EPA. Para enriquecer los nauplios de *Artemia* se utilizaron emulsiones proporcionadas por el “Artemia Referente Center”, Universidad de Ghent, Bélgica (ICES standar reference emulsions) y que contenían un 30% de HUFA, dos relaciones diferentes de DHA/EPA de 0.6 y 4 (Tabla 1), de tal manera que se usaron 5 emulsiones:

- 1- Emulsión de aceite de maíz (EM).
- 2- 100% de una emulsión con 30% de HUFAS totales y una proporción de DHA/EPA=4 (E100-4).
- 3- 100% de una emulsión con 30% de HUFAS totales y una proporción de DHA/EPA=0.6 (E100-0.6).
- 4- Emulsión con 50% de EM y 50% de E100-4. (E50-4)
- 5- Emulsión con 50% de EM y 50% de E100-0.6. (E50-0.6)

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de *Artemia* recién eclosionada (sin enriquecer), aceite de maíz y las 2 emulsiones (E100-4 y E100-0.6).

Ácidos grasos	<i>Artemia</i> (nauplio)	Aceite de Maíz	E 100-4 (30/4)	E 100-0.6 (30/0.6)
14:0	1.03	N.D	2.78	6.22
16:0	13.09	11.9	16.84	14.82
16:1(n-7)	6.03	0.15	3.47	7.84
18:0	0.26	1.9	5.37	5.17
18:1(n-9)	30.06	28.1	12.35	11.67
18:1(n-7)	7.93	N.D	1.68	2.12
18:2(n-6)	4.81	55.4	4.31	4.46
18:3(n-6)	1.14	N.D	0.10	0.25
18:3(n-3)	18.28	0.8	0.85	1.13
18:4(n-3)	3.41	N.D	0.91	2.54
20:0	0.26	N.D	0.56	0.45
20:1(n-9)	0.77	N.D	0.80	1.02
20:1(n-7)	0.28	N.D	0.11	0.20
20:2(n-6)	0.29	N.D	0.16	0.14
20:3(n-6)	0.31	N.D	0.12	0.13
20:4(n-6)	1.41	N.D	1.40	0.89
20:3(n-3)	N.D	N.D	0.08	0.07
20:4(n-3)	N.D	N.D	0.40	0.81
20:5(n-3)	3.61	N.D	7.20	16.85
22:5(n-6)	N.D	N.D	1.77	0.37
24:0	N.D	N.D	0.31	0.09
22:5(n-3)	N.D	N.D	2.18	2.13
24:1(n-9)	0.46	N.D	N.D	0.32
22:6(n-3)	N.D	N.D	28.58	12.34
n-3 PUFA	N.D	N.D	38.98	33.01
n-6 PUFA	N.D	N.D	8.19	6.33

Posteriormente se adicionó la emulsión correspondiente a cada tratamiento de nauplio de *Artemia*, la cual fue enriquecida por un periodo de 18, 20, 22 y 24 h. (Figura 8), a una densidad de 200,000 *Artemia*/L según como se describe en Dhert y Sorgelos (1993). Finalmente la *Artemia* enriquecida fue utilizada para alimentar a los juveniles de pez blanco *M. estor*.

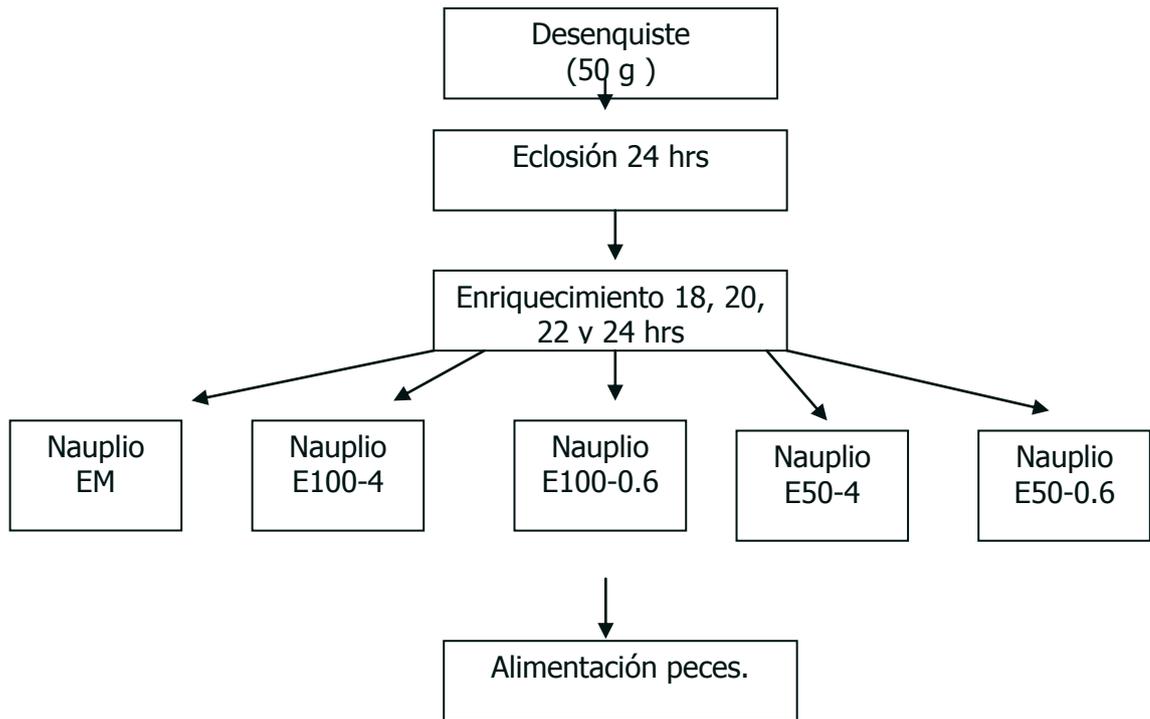


Figura 8. Enriquecimiento a las 18, 20, 22 y 24 h para los 5 tratamientos.

Las condiciones del bioensayo fueron las siguientes: salinidad de 5 ‰, temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, densidad inicial de 1.5 organismos/L en canaletas de 60 L. Así, cada tratamiento estaba compuesto por tres réplicas de 30 organismos cada uno. Los juveniles fueron alimentados 4 veces al día (9:00, 11:00, 13:00 y 15:00 horas) con nauplio de *Artemia* enriquecida, a una densidad de 20 nauplios/ml, durante 90 días. Con el fin de determinar el crecimiento, los peces se midieron y se pesaron al inicio y a los 30, 60 y 90 días del experimento con una micro balanza (Mettler Toledo, modelo MX5).



Figura 9. Esquema para llevar a cabo las biometrías.

Para la evaluación de peso y longitud, los juveniles de pez blanco se anestesiaron previamente en recipientes con 4 L de agua a una salinidad de 5 ‰ y la adición de 1 ml de

benzocaína al 10% (25 mg/L), lo cual corresponde a un estado intermedio entre sedación profunda y anestesia ligera (Ross *et al.*, 2007) (Fig. 9). Posteriormente, los organismos fueron regresados a la canaleta de cultivo correspondiente.



Figura 10. Toma de parámetros fisicoquímicos del sistema.

La limpieza del fondo de las canaletas, el recambio del 30% del volumen del agua, (Fig, 10) y los parámetros de calidad de agua a través del experimento (tabla 2) se mantuvieron dentro de los intervalos óptimos reportados para el cultivo de peces. La temperatura se mantuvo alrededor de 25°C, donde se a observado que esta especie tiene un mejor crecimiento (Martínez-Palacios *et al.*, 2002), por otro lado la salinidad se mantuvo en valores cercanos a 5 g/L como ha sido recomendado para obtener mejores desempeños del pez blanco de Pátzcuaro en cultivo (Martínez-Palacios *et al.*, 2004a)

Tabla 2. Valores promedio obtenidos de la calidad del agua del sistema utilizado.

Parámetros	$\bar{x} \pm \sigma$
Amonio (mg/L)	0
Oxígeno(mg/L)	6.48±0.23
Temperatura (C°)	24.94±0.80
Salinidad (g/L)	5.31±0.22
Nitritos (mg/L)	0.3±0.02
pH	7.2±0.03

V.3.2. Toma de muestras del experimento con juveniles de pez blanco *Menidia estor*.

La toma de muestras, tejido de hígado y músculo, para el análisis de ácidos grasos en juveniles de pez blanco se realizó a los 0 y 90 días de haber iniciado el experimento. Para esto se tomaron 2 juveniles por cada una de las tres réplicas (6 juveniles por

tratamiento), se colocaron sobre hielo y fueron almacenadas en un ultracongelador (-80°C. Revco) para su posterior disección y análisis.

V. 3. 3. Análisis Bromatológicos.

En el inicio, antes de aplicar las dietas y al final del experimento (90 días en dieta) se tomaron 10 organismos de cada réplica, en cada uno de los cinco tratamientos, con lo cual, posteriormente se evaluó el análisis proximal, correspondiente al porcentaje de materia seca, fibra, proteína, extracto etéreo, extracto libre nitrogenado y cenizas.



Figura 11. Esquema de análisis bromatológicos.

V. 3.3.1. Humedad

La cantidad de agua presente en la muestra o porcentaje de humedad, se determinó deshidratando la muestra en una estufa a 105 °C por 12 horas. La diferencia de peso de la muestra, antes y después de haber sido depositada en la estufa (peso constante), registró el contenido de humedad (Olvera *et al.*, 1993; A.O.A.C., 2000).

Cálculo:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = [(A-B)/A]*100$$

Donde:

A = Peso de la muestra húmeda (g).

B= Peso de la muestra seca (g).

V.3.3.2. Proteína cruda.

El análisis de proteína cruda, consta de la cuantificación del contenido de nitrógeno proteínico total en la muestra, el cual se determinó mediante el uso de un auto-analizador Nitrógeno/Proteína LECO FP528 por medio de la técnica de Dumas (conductividad de gases), utilizando helio como referencia y multiplicando el resultado por el factor 6.25 para conocer la concentración de proteína (Olvera *et al.*, 1993, A.O.A, C., 2000)

V.3.3.3 Extracto etéreo

El extracto etéreo tiene una estrecha relación con el contenido de lípidos en la muestra, su determinación se realizó a través del método “Soxtec”, utilizando un equipo Soxtec Avanti Tecator (modelo 2050). La extracción se realizó adicionando éter de petróleo a la muestra como solvente (Olvera *et al.*, 1993, A.O.A, C., 2000).

Cálculos

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = [(B-A)/C]*100$$

Donde:

A= Peso del crisol limpio y seco (g)

B = Peso del crisol con grasa (g).

C= Peso de la muestra (g)

V.3.3.4. Cenizas

El porcentaje de cenizas corresponde al contenido de minerales totales o materiales inorgánicos de una muestra. Este se determinó por calcinación de la muestra en una mufla a 550°C por 12 horas a peso constante (Olvera *et al.*, 1993, A.O.A, C., 2000)

Cálculos:

$$\text{Contenido de cenizas} = 100 \% \{[(A-B)/C]*100\}$$

Donde:

A= Peso del crisol con muestra (g)

B= Peso del crisol con ceniza (g).

C=Peso de la muestra (g)

V.3.3.5. Extracto libre de nitrógeno

El extracto libre de nitrógeno es una medida que representa el porcentaje total de carbohidratos en una muestra, este se obtuvo simplemente al restar al 100% la suma de los componentes analizados previamente (humedad, proteína, lípidos y cenizas) (Olvera *et al.*, 1993, A.O.A, C., 2000).

Cálculos:

Extracto libre de nitrógeno (%) = 100- (A+B+C+D).

Donde:

A = Contenido de humedad (%).

B = Contenido de proteína cruda (%).

C = Contenidos de extracto etéreo (%)

D = Contenido de ceniza (%).

V.3.4. Análisis del perfil de ácidos grasos en juveniles pez blanco *M. estor*.

V.3.4.1 Derivatización de ácidos grasos.

Para realizar el análisis de ácidos grasos del hígado, fue necesario juntar los hígados de dos organismos en una sola muestra para tener la cantidad necesaria de este tejido (50 mg). Por el pequeño tamaño del hígado, no fue posible obtener la cantidad necesaria de muestra en organismos al inicio del experimento. La muestra de músculo se obtuvo a partir de 50 mg de tejido de un solo organismo, y en este caso, si fue posible obtener muestras en organismos al inicio del experimento. Las muestras, tanto de hígado como de músculo, fueron fijadas en 6ml de solución Folch (mezcla de cloroformo: metanol 2:1). A cada una de las muestras se le adicionó 10µL de BHT (Butilhidroxitolueno) como antioxidante y 10µL del ácido graso 23:0 (ácido tricosanóico), como estándar interno. Posteriormente las muestras se almacenaron a una temperatura de -4°C, para su posterior análisis.

La extracción de lípidos en hígado y músculo de pez blanco, así como el análisis de ácidos grasos se realizó siguiendo el método descrito en el capítulo I de este trabajo en la evaluación del perfil de ácidos grasos de *Artemia*.

V.3. 5 Análisis estadístico.

Los datos se reportan como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre medias de los distintos tratamientos se determinaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias. El nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$. El análisis de frecuencia de tallas se realizó por medio de una distribución normal.

V.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

V.4.1. Análisis del nauplio de *Artemia* enriquecida para utilizarse durante el ensayo con juveniles de pez blanco *M. estor*.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de *Artemia* enriquecida por 24 horas, la cual fue utilizada para alimentar a los juveniles de *M. estor* por 90 días. Como era de esperarse, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los cinco tratamientos y en general se encontró una relación positiva entre el perfil de ácidos grasos de la *Artemia* enriquecida y el de las emulsiones con las cuales se enriquecieron (ver métodos).

El nauplio de *Artemia* enriquecido con la emulsión E100-4, mostró un porcentaje de EPA de 7.6 % y el mayor porcentaje de DHA (11.1 %) de todos los tratamientos, así como la relación DHA/EPA más alta (1.46). El tratamiento E100-0.6 fue el que resultó con el porcentaje más alto de EPA (8.4 %), con una relación de DHA/EPA de 0.58. En los nauplios de *Artemia* enriquecida con la emulsión E50-4, como era de esperarse, se encontraron porcentajes más bajos de DHA y de EPA, aunque la relación DHA/EPA se mantuvo por arriba de 1 (1.37). Para el caso de la emulsión E50-0.6 la relación DHA/EPA fue por debajo de 1 (0.3) aunque los niveles de EPA (7.2%) en este tratamiento fueron similares a los encontrados en las emulsiones directa que contiene un 30% de HUFA's totales (E100-4 y E100-0.6). Finalmente la *Artemia* enriquecida con la emulsión con aceite de maíz (EM) mostró los niveles mas bajos de EPA y DHA (2.6 y 0.07%) y por ende un relación casi nula de DHA/EPA (0.03).

Aunque los resultados del perfil de ácidos grasos en la *Artemia* enriquecida si se relacionan con aquel de las emulsiones usadas, esta relación no es exacta, principalmente debido a el propio perfil de ácidos grasos de la *Artemia*, quien se sabe que cuenta con 3% de EPA y casi nulo DHA (Leger *et al.*, 1987, Ando *et al.*, 2003; Aparicio 2004). Esta es la razón por la cual la *Artemia* enriquecida con la emulsión E50-0.6 presentó tan altas cantidades de EPA, similares a la encontrada en la *Artemia* enriquecida con emulsiones mayor cantidad de EPA. Sin embargo, es importante destacar el contenido de DHA y EPA

en la *Artemia* enriquecida con emulsiones E100-0.6 y E50-4, donde se puede apreciar que aun cuando el nauplio es enriquecido con diferentes emulsiones este, contiene niveles muy semejantes de DHA (4.8 y 4.4 %) y solo difiere en el contenido de EPA (8.3 y 3.2%) respectivamente, lo cual puede tener un efecto importante en los organismos alimentados con estas relaciones muy diferentes de DHA/EPA.

Por otro lado se considera que la calidad nutricional de los nauplios de *Artemia* son el primer factor más importante a la hora elaborar diseños (dosis-respuesta) que permiten establecer los requerimientos en muchas especies de peces marinos (Bransden *et al.*, 2005; Arulvasu y Munuswamy 2009). De ahí la importancia de realizar estudios para evaluar la composición de ácidos grasos de los nauplios de *Artemia*, antes y después del enriquecimiento, asegurando que el contenido de EPA, DHA y la relación DHA/EPA se encuentren en los niveles deseados al momento de alimentar a los peces.

Con este análisis se decidió dar comienzo al experimento de alimentación de los peces, ya que se corroboró que el alimento ofrecido si contenía diferentes cantidades y proporciones de los ácidos grasos de interés en el estudio.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de *Artemia* después de enriquecerse por 24 h con las emulsiones EM (aceite de maíz), E 100-4 de emulsión ICES 30/4 con 30% de HUFA`s totales y una proporción DHA/EPA =4, E 100-0.6 de emulsión ICES 30/0.6 con 30% de HUFA`s totales y una proporción DHA/EPA=0.6, E50-4 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-4, y finalmente E50-0.6 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-0.6.

Ácidos Grasos	EM	E100-4	E100-0.6	E50-4	E50-0.6	p
C14	0.60±0.00 ^a	0.82±0.00 ^b	1.79±0.04 ^d	0.82±0.00 ^b	0.90±0.00 ^c	<0.001
C16	10.31±0.11 ^a	10.36±0.14 ^a	10.59±0.10 ^a	11.13±0.35 ^b	10.17±0.03 ^a	<0.01
C18	5.47±0.06 ^b	6.23±0.14 ^c	4.63±0.07 ^a	4.77±0.38 ^a	5.41±0.05 ^b	<0.001
Total saturados	16.38±0.17 ^a	17.41±0.29 ^b	17.01±0.17 ^{ab}	16.72±0.73 ^{ab}	16.47±0.08 ^{ab}	<0.05
C16:1n-7	2.14±0.02 ^a	2.52±0.00 ^b	3.74±0.04 ^c	2.65±0.03 ^c	2.73±0.00 ^d	<0.001
C18:1n-9	20.71±0.26 ^d	14.92±0.07 ^a	15.12±0.34 ^a	17.96±0.06 ^b	18.60±0.01 ^c	<0.001
C18:1n-7	7.04±0.00 ^c	6.17±0.08 ^a	6.48±0.13 ^b	6.51±0.04 ^b	6.67±0.04 ^b	<0.001
Total monoinsaturados	29.90±0.25 ^e	23.61±0.08 ^a	25.34±0.42 ^b	27.12±0.14 ^c	27.99±0.05 ^d	<0.001
C18:2n-6	15.80±0.29 ^d	4.95±0.08 ^a	5.36±0.04 ^b	9.08±0.17 ^c	12.36±0.09 ^d	<0.001
C18:3n-3	22.99±0.03 ^c	19.77±0.29 ^a	23.53±0.21 ^c	25.01±0.45 ^d	21.37±0.09 ^b	<0.001
C18:4n-3	3.47±0.03 ^c	2.93±0.29 ^a	4.59±0.21 ^c	4.40±0.45 ^d	3.15±0.09 ^b	<0.001
ARA (20:4n-6)	0.89±0.03 ^b	0.83±0.09 ^a	0.95±0.01 ^c	0.85±0.07 ^a	0.83±0.02 ^a	<0.001
EPA (20:5n-3)	2.64±0.02^a	7.59±0.10^c	8.39±0.21^d	3.20±0.03^b	7.18±0.01^c	<0.001
DHA (22:6n-3)	0.07±0.06^a	11.11±0.08^e	4.85±0.020^d	4.40±0.02^c	2.21±0.02^b	<0.001
Total n-6 PUFA	16.69±0.28 ^c	5.78±0.09 ^a	6.31±0.05 ^a	6.74±0.56 ^a	13.19±0.09 ^{cb}	<0.001
Total n-3 PUFA	29.17±0.17 ^b	41.40±0.44 ^c	41.36±0.47 ^c	37.01±0.44 ^b	33.91±0.07 ^a	<0.001
Total HUFA	3.60±0.10 ^a	19.53±0.15 ^e	14.19±0.52 ^d	8.45±0.30 ^b	10.22±0.05 ^c	<0.001
DHA/EPA	0.03±0.02^a	1.46±0.04^e	0.58±0.04^c	1.37±0.05^d	0.31±0.00^b	<0.001

La última columna indica los resultados del ANOVA unifactorial; medias con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí. ($p < 0.05$), por la prueba de Tukey.

V.4.2. Crecimiento de juveniles *M. estor*.

La evaluación del crecimiento promedio en juveniles de pez blanco *M. estor*, alimentados con nauplio de *Artemia* enriquecida con las 5 emulsiones (EM, E100-4, E100-0.6, E50-4 y E50-0.6), se muestran en la figura 12.

Se observó una tendencia de incremento en peso a partir de los primeros 30 días del bioensayo, haciéndose más evidente a partir de los 60 días. Dicho incremento fue mayor en el tratamiento de *Artemia* enriquecida con aceite de maíz (EM) con respecto al resto de los demás tratamientos hasta los 90 días. Por lo tanto esto se reflejó en el peso final de los organismos, donde el mayor peso final fue de 1.99 mg en los organismos alimentados con el tratamiento EM; el segundo valor más alto (1.71 mg) se registró en el tratamiento E100-4, seguido por los tratamientos E100-0.6 (1.62 mg), E50-4 (1.53mg) y finalmente el tratamiento con menor incremento de peso fue el E50-0.6 (1.52 mg) (tablas 4). Con respecto a la longitud total al final de 90 días del bioensayos, nuevamente existe una clara

tendencia, de mayor longitud (6.59 cm) en el tratamiento de *Artemia* enriquecida con aceite de maíz (EM), mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los demás tratamientos. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos con respecto al el factor de condición, el cual indica la condición del pez o peso por unidad de longitud (Bagenal, y Tesch. 1978), no mostró diferencias significativas entre los cinco tratamientos.

De acuerdo con los resultados el mejor crecimiento se observó en los peces alimentados con los nauplios de *Artemia* enriquecida con la emulsión de aceite de maíz, la cual contenía un alto porcentaje de 18:3n-3 (22%) y niveles muy bajos de de DHA y EPA. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en varias especies de agua dulce, sobre todo especies de salmónidos donde se ha demostrado que altos niveles de inclusión de aceite vegetal no compromete el crecimiento ni los procesos fisiológicos de los peces (Bell *et al.*, 2003, David *et al.*, 2007). Sin embargo, si llega a existir una deficiencia en el suministro de ácidos grasos ω -3 de la dieta, pueden presentar alteraciones irreversibles como una disminución en los fosfolípidos de membrana, nula o deficiente actividad reproductiva, alteraciones visuales, desarrollo y/o, crecimiento lento, coagulación sanguínea deficiente, alta mortalidad, reacciones inflamatorias, hipersensibilidad, hígado graso y baja respuesta inmune, entre otros (Ako *et al.*, 1991; De Silva *et al.*, 1997; Dhert *et al.*, 1999; De Pablo y Álvarez, 2000; Om *et al.*, 2003). En el presente trabajo no se observaron alteraciones como las descritas anteriormente, ni defectos físicos en los peces que se pudieran asociar con deficiencias nutricionales.

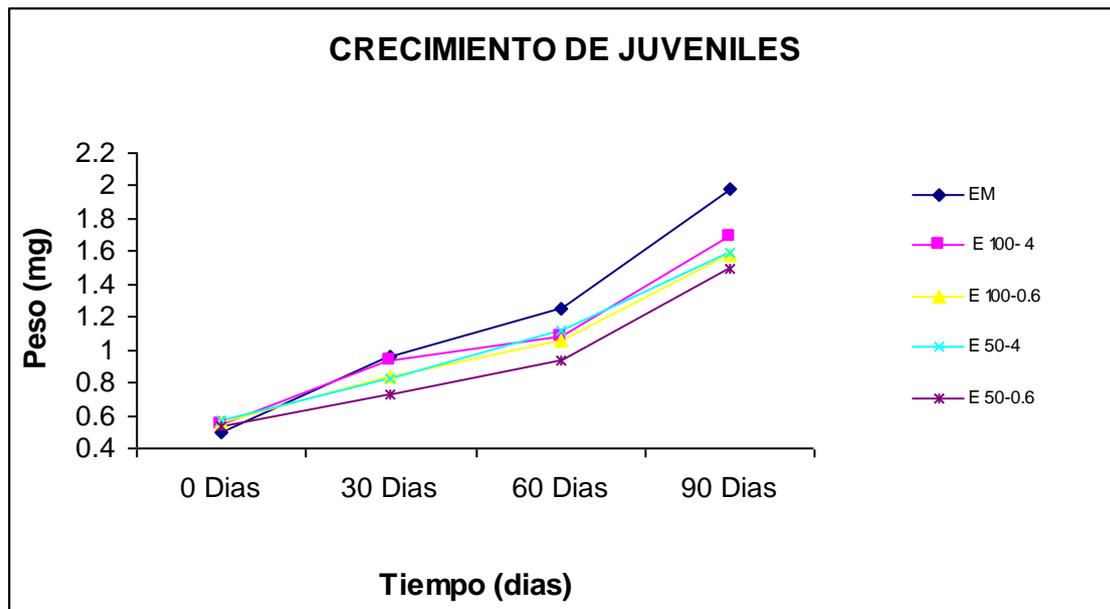


Figura 12. Crecimiento de juveniles de pez blanco (*M. estor*), a lo largo de 90 días de cultivo a una salinidad de 5 g/L, alimentados con nauplios de *Artemia* enriquecidos previamente con cinco distintos tratamientos: EM, E 100-4, E100-0.6, E50-4 y E50-0.6.

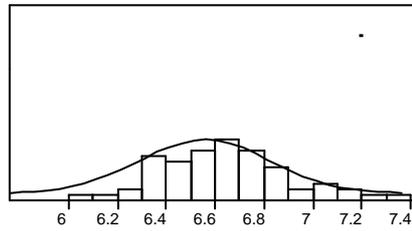
Tabla 4. Variables en el bioensayo con juveniles de *M. estor*.

TRATAMIENTO	EM	E 100-4	E 100-0.6	E 50-4	E 50-0.6
Peso Inicial (mg)	0.52±0.05 ^a	0.55±0.03 ^a	0.55±0.01 ^a	0.51±0.06 ^a	0.56±0.06 ^a
Peso Final (mg)	1.99±0.02 ^c	1.71±0.19 ^b	1.62±0.11 ^b	1.53±0.14 ^{ab}	1.52±0.10 ^a
Ganancia de peso (mg)	1.48±0.06 ^b	1.15±0.16 ^a	1.07±0.10 ^a	1.02±0.11 ^a	0.96±0.09 ^a
Long. Total Final (cm)	6.59±0.27 ^c	6.22±0.43 ^b	6.18±0.47 ^b	6.13±0.54 ^{ab}	5.90±0.46 ^a
Factor de Condición	0.70±0.02	0.72±0.02	0.71±0.02	0.72±0.02	0.74±0.02

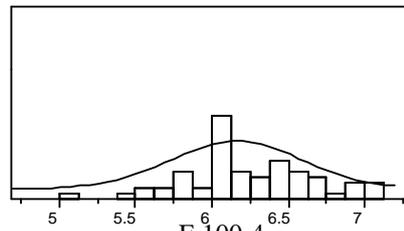
V.4.3. Frecuencia de Tallas (cm).

Para poder observar mejor el efecto del alimento en el incremento de tallas de los peces al final de la etapa experimental se realizó un análisis de frecuencia de tallas. Este al final del bioensayo, mostró una distribución de tallas más homogéneas en el tratamiento de la emulsión de aceite de maíz (EM), donde los organismos obtuvieron longitudes totales finales entre 6.2 y 7 cm; mientras que en el resto de los tratamientos E100-4, E100-0.6, E50-4 y E59-0.6, se observa la formación de dos o tres grupos de tallas (figura 13), por lo que no muestra homogeneidad. Estos resultados pueden ser atribuidos a la cantidad de HUFA's que contenía el nauplio de *Artemia*, de tal manera que al parecer está influyendo sobre la heterogeneidad que se observa en cada uno de los tratamiento haciendo evidente que los organismos que fueron alimentados con la *Artemia* enriquecida con aceite de maíz

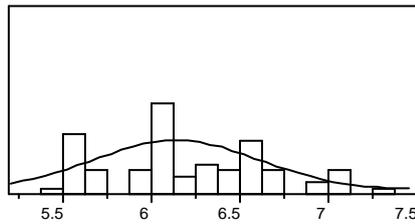
(EM), presenta tallas mas homogéneas, estos resultados son de gran importancia ya que en cualquier cultivo comercial se busca tener tallas lo mas homogéneas posibles.



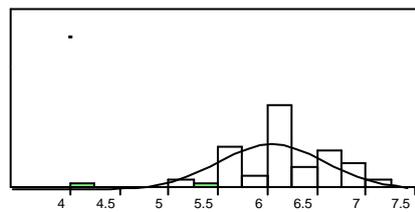
EM



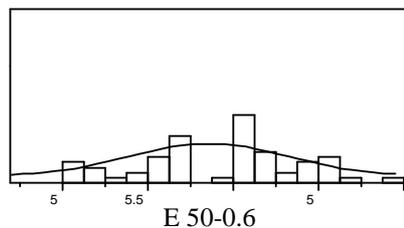
E 100-4



E 100-0.6



E 50-4



E 50-0.6

Figura 13. Frecuencia de tallas de los juveniles de *M. estor*, en cinco dietas.

V.4.4. Composición proximal de los peces.

Se ha observado que la dieta utilizada para alimentar peces durante bioensayos con diferentes ácidos grasos puede llegar a modificar la composición proximal de los organismos. Esto no ocurrió en el presente trabajo ya que la composición proximal del cuerpo de los peces al inicio y al final del experimento de 90 días no registró diferencias significativas ($p>0.05$) (tabla 5). En la trucha arcoiris, según Brauge *et al.*, (2002) en Peres y Olivia-Teles (2002), observaron que la proporción lípidos/carbohidratos no afecta significativamente a la composición del cuerpo de los peces. Sin embargo, algunos autores han observado un aumento en todo el organismo del contenido en lípidos, cuando existe un aumento de carbohidratos en la dieta (Kaushik y Oliva-Teles, 1985; Lanari *et al.*, 1999) Por otro lado, este tipo de análisis, no solo se conocer el valor nutricional de la dieta de un organismos si no, además el efecto de esta sobre la composición final de los peces.

Tabla 5. Composición proximal del cuerpo de *M. estor* alimentados con diferentes proporciones de DAH/EPA.

Tratamientos	Humedad	Cenizas	Proteína	Lípidos	ELN
Inicial	77.48±0.16 ^a	2.58±0.03 ^a	16.69±0.10 ^a	1.00±0.21 ^a	2.25±0.39 ^a
EM	77.98±0.48 ^a	2.58±0.01 ^a	16.72±0.34 ^a	1.53±0.08 ^a	1.19±0.53 ^a
E 100-4	77.64±0.50 ^a	2.61±0.01 ^a	15.27±2.09 ^a	0.97±0.16 ^a	3.50±2.35 ^a
E 100-0.6	77.47±0.18 ^a	2.64±0.01 ^a	16.99±0.26 ^a	1.10±0.44 ^a	1.80±0.07 ^a
E 50-4	77.55±0.26 ^a	2.62±0.01 ^a	16.96±0.17 ^a	1.42±0.25 ^a	1.44±0.48 ^a
E50-0.6	77.49±0.59 ^a	2.60±0.02 ^a	16.43±0.51 ^a	1.09±0.09 ^a	2.39±0.79 ^a

Los superíndices indican diferencias significativa ($p<0.05$).

V.4.5 Supervivencia de juveniles *M. estor*.

El índice de supervivencia de juveniles de *M. estor* a lo largo de 90 días de experimento, se presenta en la figura 14. De acuerdo a las supervivencias normalmente encontradas en la planta de producción de pez blanco, con todos los tratamientos se obtuvieron supervivencias “buenas” o “aceptables” ya que los valores, oscilaron entre 78.8 y 88.8 %. Aun cuando las mejores supervivencias se encontraron en los tratamientos EM y E100-4 no se mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguno de los cinco tratamientos. Estos resultados son similares a los valores de supervivencia (80%) obtenidos en larvas de *M. estor* alimentadas con alimento vivo (rotífero y nauplio de *Artemia*)

enriquecido con ácidos grasos poliinsaturados (Valencia-Betancourt *et al.*, 2004, Monroy-Mendoza 2006).

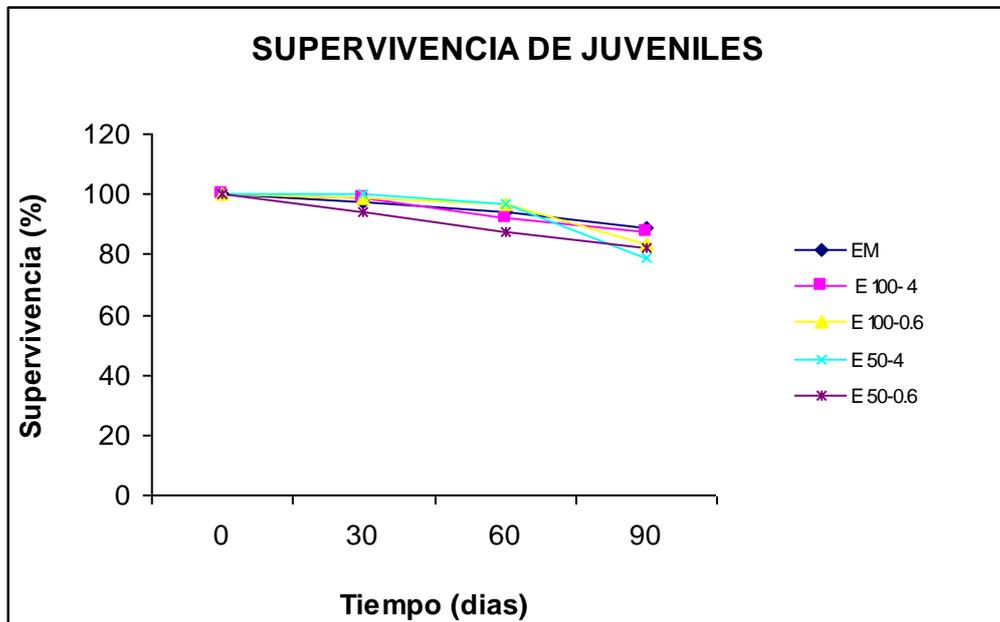


Figura 14. Supervivencia (%) de juveniles de pez blanco *M. estor*, a lo largo de 90 días de cultivo a una salinidad de 5 g/L y alimentados con nauplios de *Artemia* enriquecidos con cinco distintos tratamientos.

V.4.6 Perfil de ácidos grasos mayoritarios de tejidos de juveniles.

V.4.6.1. Músculo e Hígado.

El perfil de ácidos grasos mayoritarios del músculo de juveniles de pez blanco se muestra en la Tabla 6. Los peces alimentados con la emulsión E100-0.6 tuvieron valores significativamente mayores de 18:1n-7, monoinsaturados totales, 18:4n-3, 20:5n-3 (EPA) y HUFA totales que los peces alimentados con la emulsión a base de aceite de maíz (EM). Sin embargo, esto últimos tuvieron niveles significativamente mayores de 18:2n-6 y n-6 PUFA que cualquiera de los tratamientos a base de emulsión ICES los tratamientos. Lo anterior se debe a alto contenido de 18:2n-6 del aceite de maíz (Tabla 1) y de hecho se puede apreciar que los peces alimentados con la emulsión con 50% de aceite de maíz tienen un contenido intermedio de 18:2n-6 y n6 PUFA. Al comparar el tratamiento de EM con el de músculo de los organismos tomados al inicio del experimento, se encontraron diferencias significativas en el contenido de la mayoría de los ácidos grasos. Cabe resaltar

que al final del experimento, lo peces alimentados con EM tenían un contenido menor de 18:2n-6 pero mayor de 18:3n-3, 18:4n-3, 20:4n-6, 20:4n-3, 20:5n-3 comparado con peces iniciales. Lo anterior resultó menor contenido de n-6 PUFA y menor relación DHA/EPA pero en mayor contenido de n-3 PUFA al final del experimento.

El mayor porcentaje de EPA (3%) se encontró en el tratamiento E100-0.6. Sin embargo, aún cuando presenta diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos, este tratamiento no reflejó el contenido de EPA encontrado en el nauplio de *Artemia* enriquecida (8.3%). A partir del nivel encontrado de algunos ácidos grasos, como 20:4n-3 y 22:5n-3, que están presentes tanto en músculo como en hígado (1 a 3%) mas no en la *Artemia*, se puede dilucidar que la ruta de síntesis de ácidos grasos de la familia ω -3 se ha llevado a cabo, ya que estos ácidos grasos son intermediarios de esta ruta. (Sargent *et al.*, 1995b).

También en músculo se observaron porcentajes altos de ácido linolénico 18:3n-3 (9%) en todos los tratamientos usados para alimentar a los peces, comparados con la cantidad de éste ácido graso encontrado al inicio del experimento. El perfil de ácidos grasos del músculo también mostró un alto porcentaje de DHA (12%) y una relación elevada de DHA/EPA (5) sin mostrar diferencias significativas entre todos los tratamientos.

En cuanto al perfil de ácidos grasos encontrados en hígado, se registraron pocas diferencias significativas entre los distintos tratamientos después de 3 meses de alimentación con las 5 emulsiones ofrecidas (tabla 7). Una de ellas fue encontrada en el ácido palmítico 16:0, diferencia que en consecuencia afectó también el total de ácidos grasos saturados, que fueron significativamente mayores en el tratamiento E50-0.6 con respecto al tratamiento E100-4. Por otro lado, se encontró un porcentaje significativamente mayor de ácido linolénico 18:3n-3 en el hígado del tratamiento E100-4 comparado con el tratamiento E50-0.6. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas para el contenido de 18:2n-6 y n-6 PUFA aunque el patrón fue similar al del músculo debido al origen de la emulsión usada en el tratamiento EM y en los E-50.

Los porcentajes encontrados de EPA en músculo (1.4% en organismos al inicio a 3.1% con la emulsión E100-0.6 que es la mas alta en EPA) concuerdan con los

encontrados en el músculo de adultos (1 a 2%) (Martínez-Palacios *et al.*, 2006a; Salgado et al, 2009). Sin embargo, el contenido de DHA (11-14%) en el músculo de los juveniles, no fue tan alto como el reportado por Martínez-Palacios *et al.*, (2006b) en músculo de adultos silvestres (30%). La diferencia entre del contenido tan variable de DHA y por ende de la relación DHA/EPA entre estos trabajos es difícil de explicar pero bien se puede especular que se debe una necesidad de DHA particular entre los distintos estadios del ciclo de vida. En este sentido, el contenido de DHA varió de 16 a 43% dependiendo del estadio embrionario o larvario, del origen de los reproductores y del tipo de lípidos (Palacios et al., 2007). En otro trabajo, el contenido de DHA en gónadas fue de 30 a 35% mientras que en larvas varió de 19 a 33% (Salgado, 2009). Por otro lado, este tipo de variación se ha reportado en trabajos previos para un mismo estadio. Así, en larvas alimentadas con rotíferos, el contenido de DHA puede variar desde 4 a 21% en larvas de 20 días dependiendo del tipo de lípidos (neutros o polares) y del tipo de enriquecimiento de rotíferos, mientras que las larvas recién eclosionadas tenían un contenido hasta de 28% (Martínez-Palacios et al., 2006). En contraste, larvas de 40 días fueron menos susceptibles al nivel de DHA en la dieta y tuvieron niveles entre 19 y 24% dependiendo del tipo de enriquecimiento de la *Artemia* suministrada y de la salinidad (Monroy-Mendoza, 2006).

En el presente trabajo, la relación DHA/EPA que se encontró en los hígados de los peces alimentados con cualquiera de los 5 tratamientos fue de 7. La diferencia entre estas proporciones de DHA/EPA entre reproductores (10) y juveniles (7) es difícil de explicar, pero siendo el DHA uno de los ácidos grasos más utilizados por la especie, se puede especular que éste ácido graso es transferido del hígado hacia otros tejidos durante el crecimiento. Está bien documentado, que durante el crecimiento de los peces el tejido adiposo es la más importante reserva de lípidos, principalmente triglicéridos (TG) (Sargent, 1995), siendo rápidamente liberados al torrente sanguíneo para ser utilizados principalmente como combustible en otros tejidos del cuerpo (Lehninger, 1975). Es probable que debido a esto, los niveles de DHA y EPA en juveniles no sean tan altos como los reportados anteriormente en reproductores de esta especie, ya que pueden estar acumulándose en el tejido adiposo o en otros tejidos como el cerebro o las gónadas, dada la importancia que el DHA y el EPA tienen en estos últimos.

Es importante mencionar que en el presente trabajo se encontraron niveles importantes de 20:4n-3 y 22:5n-3, tanto en músculo como hígado (1 a 3%), mas no sucedió lo mismo con la *Artemia* que se usó como alimento. Esta evidencia sirve para dilucidar, al igual que se hizo en el caso del músculo, que existe actividad de biosíntesis de ácidos grasos de la familia ω -3, ya que los mencionados ácidos grasos son intermediarios de esta ruta metabólica. (Sargent *et al.*, 1995b).

En otras especies de agua dulce también se han observado niveles de DHA similares en músculo, como el pangia (*Macquaria australasica*) (Sheikh *et al.*, 1996), y la trucha (*Salmo trutta*), quien independientemente de la dieta ofrecida siempre registró niveles constantes de este ácido graso (Arzel *et al.*, 1994). En *M. estor*, los constantes niveles de DHA encontrados aún cuando es alimentado con dietas deficientes en este ácido graso, pero que contienen 18:3n-3 (EM), confirma los trabajos previos en larvas alimentadas con rotífero o *Artemia* enriquecidos con 18:3n-3 y con muy bajo DHA (Valencia-Betancourt *et al.*, 2004; Monroy-Mendoza, 2006) en los que también se encontraron niveles similares de DHA en músculo. Aun cuando los niveles de DHA en hígado y músculo del pez blanco encontrados en el presente trabajo sean menores a los reportados anteriormente en reproductores (Palacios *et al.*, 2007), en diversos experimentos con esta especie se registraron mayores cantidades de DHA que de EPA, lo que hasta la fecha ha sido una característica constante del perfil de ácidos grasos de la especie, y que se conserva en todos los tratamientos a los que ha sido sometida (Valencia-Betancourt *et al.*, 2004; Martínez-Palacios *et al.*, 2006; Monroy-Mendoza, 2006; Palacios *et al.*, 2007; Salgado, 2009). Los autores consideraron la posibilidad de la actividad biosintética de DHA, a través de la desaturación y elongación de su precursor 18:3n-3 o directamente a partir de EPA (Palacios *et al.*, 2007).

También se ha reportado que en otros peces la actividad biosintética se encuentra regulada por la alimentación a la que esté sujeta el organismo (CITa). A este respecto, aun cuando son pocos los trabajos referentes a este tema con esta especie, indirectamente se ha observado que existe esa regulación también en *M. estor*. Recientemente se observó que una dieta con 4% y 7% de ARA para reproductores de pez blanco estimuló una mayor utilización de 18:3n-3 para sintetizar EPA y DHA (Salgado, 2009).

Sin duda los resultados encontrados en el presente trabajo son de gran interés, ya que se ha descrito que el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) una especie con ancestros marinos que actualmente se encuentra en un cuerpo de agua de agua dulce (Martínez-Palacios *et al.*, 2006, Martínez-Palacios *et al.*, 2008). Las especies de peces dulceacuícolas, en general, son capaces de sintetizar ácidos grasos de 20 y 22 carbonos (EPA y DHA) a partir de su precursor (18:3n-3); por el contrario, las especies marinas no son capaces de llevar a cabo la mencionada biosíntesis ya que obtienen los ácidos grasos HUFA, necesarios para ellos, del alimento en su ambiente natural. (Sargent *et al.*, 1995b).

La investigación para corroborar la existencia de la capacidad de biosíntesis de HUFAs en esta especie eurihalina está llevándose a cabo, pero se sabe que los peces de agua dulce son capaces de mantener un cierto grado de actividad de las enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas y la elongasa para producir EPA y DHA si su precursor (18:3n-3) está presente en la dieta (Sargent *et al.*, 1995a; Tocher *et al.*, 2002;).

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos mayoritarios de músculo de juveniles de pez blanco *M. estor* iniciales y después de haber sido alimentados con nauplio de *Artemia* enriquecida con las emulsiones EM (aceite de maíz), E100-4 de emulsión ICES 30/4 con 30% de HUFAs totales y una proporción DHA/EPA=4, E100-0.6 de emulsión ICES 30/0.6 con 30% de HUFAs totales y una proporción DHA/EPA=0.6, E50-4 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-4, y finalmente E50-0.6 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-0.6.

Ácidos Graso	Iniciales	EM	E 100-4	E100-0.6	E50-4	E50-0.6	p
14:0	0.90±0.09*	0.39±0.01	0.38±0.02	0.44±0.04	0.40±0.04	0.41±0.01	NS
16:0	21.15±0.65	22.70±0.84	22.14±0.85	21.94±0.14	22.91±0.33	22.13±0.64	NS
18:0	9.09±0.18	8.96±0.26	9.13±0.06	9.02±0.27	9.08±0.49	9.15±0.15	NS
20:0	0.22±0.01	0.17±0.05	0.12±0.00	0.11±0.00	0.14±0.03	0.14±0.04	NS
24:0	0.43±0.05	0.54±0.11	0.54±0.08	0.43±0.05	0.53±0.11	0.44±0.12	NS
Total Saturados	31.79±0.70	32.76±0.62	32.32±0.90	31.94±0.21	33.05±0.88	32.27±0.47	NS
16:1n-9	0.64±0.04	0.45±0.18	0.36±0.04	0.35±0.04	0.37±0.03	0.38±0.02	NS
16:1n-7	1.42±0.09*	1.04±0.05	1.15±0.08	1.21±0.02	1.16±0.13	1.17±0.05	NS
18:1n-9	15.84±0.37*	14.34±0.46	14.62±0.87	14.63±0.19	14.25±0.64	15.14±0.40	NS
18:1n-7	4.42±0.11*	5.31±0.16 ^a	5.78±0.17 ^{ab}	5.89±0.26 ^b	5.45±0.29 ^{ab}	5.76±0.07 ^{ab}	<0.05
Total Monoinsaturados	22.33±0.56*	21.15±0.39 ^a	21.92±1.04 ^{ab}	22.08±0.32 ^b	21.23±0.99 ^{ab}	22.44±0.50 ^{ab}	<0.05
18:2n-6	11.53±0.79*	7.77±0.11 ^c	5.12±0.16 ^a	5.13±0.19 ^a	5.76±0.21 ^b	6.00±0.33 ^b	<0.001
18:3n-6	0.90±0.05	0.82±0.08	0.70±0.10	0.72±0.05	0.83±0.15	0.74±0.03	NS
18:3n-3	5.79±0.40*	8.90±0.89	9.75±0.39	9.17±0.59	9.17±0.86	9.87±0.11	NS
18:4n-3	0.75±0.08*	1.62±0.09 ^a	1.70±0.06 ^{ab}	1.94±0.10 ^c	1.77±0.09 ^{abc}	1.86±0.07 ^{bc}	<0.01
20:3n-6	0.61±0.08*	0.36±0.02 ^b	0.28±0.01 ^a	0.30±0.01 ^a	0.32±0.03 ^a	0.31±0.02 ^a	<0.01
20:3n-3	1.11±0.06	1.08±0.08	1.15±0.21	1.01±0.08	1.03±0.14	1.12±0.20	NS
20:4n-6	2.39±0.27*	3.33±0.49	3.42±0.22	3.20±0.16	3.34±0.30	3.19±0.30	NS
20:4n-3	0.81±0.09*	1.70±0.22	1.60±0.20	1.61±0.05	1.61±0.24	1.75±0.09	NS
20:5n-3	1.38±0.08*	2.09±0.36 ^a	2.44±0.29 ^a	3.08±0.18 ^b	2.19±0.17 ^a	2.40±0.29 ^a	<0.001
22:5n-3	2.13±0.13*	1.76±0.14	1.81±0.14	1.93±0.06	1.73±0.10	1.88±0.25	NS
22:6n-3	13.57±0.50	12.03±0.87	12.51±0.45	12.85±0.36	12.93±1.74	11.35±0.65	NS
n-6 PUFA	15.43±0.59*	12.28±0.52 ^c	9.52±0.27 ^a	9.36±0.17 ^a	10.25±0.12 ^b	10.24±0.61 ^b	<0.01
n-3 PUFA	25.55±0.85*	29.19±0.70	30.96±0.42	31.59±0.47	30.44±2.14	30.24±0.94	NS
HUFA Total	22.01±0.88	22.36±0.55 ^a	23.22±0.44 ^{ab}	23.98±0.50 ^c	23.16±2.29 ^{ab}	22.00±0.70 ^a	<0.05
DHA/EPA	9.82±0.28*	5.93±1.51	5.18±0.64	4.19±0.30	5.90±0.46	4.79±0.72	NS

Se realizó la comparación de medias por medio de la prueba Tukey a partir de la cual, medias con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí. ($p < 0.05$). N.S: No significativo. Por ANOVA seguido de Tukey: para el músculo inicial y el tratamiento a base de maíz, por lo que medias con (*) son significativamente diferentes entre sí. ($p < 0.05$).

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos mayoritarios de hígado de juveniles de pez blanco *M. estor* iniciales y después de haber sido alimentados con nauplio de *Artemia* enriquecida con las emulsiones EM (aceite de maíz), E100-4 de emulsión ICES 30/4 con 30% de HUFAs totales y una proporción DHA/EPA=4, E100-0.6 de emulsión ICES 30/0.6 con 30% de HUFAs totales y una proporción DHA/EPA=0.6, E50-4 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-4, y finalmente E50-0.6 emulsión con 50% de EM y 50% de E100-0.6.

Ácidos grasos	EM	E 100-4	E 100-0.6	E 50-4	E50-0.6	p
14:0	0.74±0.03	0.79±0.06	0.87±0.11	0.76±0.03	0.90±0.08	N.S
16:0	13.95±0.50 ^{bc}	12.80±0.73 ^a	13.05±0.09 ^{ab}	13.63±0.39 ^{abc}	14.50±0.21 ^c	<0.001
18:0	5.94±0.30	5.58±0.39	5.71±0.40	5.80±0.07	5.97±0.81	N.S
20:0	0.12±0.02	0.12±0.01	0.12±0.03	0.12±0.01	0.11±0.01	N.S
24:0	0.35±0.02	0.24±0.02	0.23±0.03	0.30±0.05	0.27±0.06	N.S
Total Saturados	21.09±0.81 ^{ab}	19.54±1.08 ^a	19.98±0.42 ^{ab}	20.62±0.45 ^{ab}	21.76±0.9 ^b	<0.05
16:1n-9	1.45±0.08	1.40±0.08	1.51±0.10	1.45±0.02	1.57±0.03	N.S
16:1n-7	2.89±0.17	3.26±0.21	3.25±0.27	3.08±0.16	3.27±0.33	N.S
18:1n-9	17.37±0.75	17.89±1.40	17.72±0.59	17.22±1.23	17.86±1.37	N.S
18:1n-7	7.33±0.23	7.72±0.41	7.83±0.17	7.46±0.58	7.59±0.41	N.S
Total Mono	29.04±1.10	30.27±2.05	30.31±1.06	29.21±1.96	30.29±1.90	N.S
18:2n-6	8.70±1.14	7.37±0.35	7.30±0.23	7.55±0.45	7.96±1.12	N.S
18:3n-6	1.27±0.19	1.25±0.11	1.37±0.14	1.31±0.13	1.35±0.11	N.S
18:3n-3	18.01±0.44 ^{ab}	20.17±0.56 ^b	17.67±0.27 ^{ab}	18.26±1.22 ^{ab}	16.80±0.11 ^a	<0.05
18:4n-3	3.86±0.46	4.90±0.51	5.15±0.09	4.91±0.62	4.20±0.74	N.S
20:3n-6	0.02±0.01	0.03±0.00	0.02±0.00	0.04±0.02	0.02±0.02	N.S
20:3n-3	2.01±0.16	1.87±0.30	1.59±0.13	1.71±0.33	1.77±0.19	N.S
20:4n-6	1.32±0.18	1.14±0.45	1.27±0.21	1.36±0.32	1.21±0.20	N.S
20:4n-3	2.44±0.06	2.54±0.34	2.33±0.15	1.78±0.70	2.34±0.12	N.S
20:5n-3	0.91±0.12	0.95±0.29	1.12±0.16	1.04±0.24	0.90±0.01	N.S
22:5n-3	1.84±0.12	1.67±0.14	1.92±0.03	1.74±0.08	1.80±0.33	N.S
22:6n-3	6.42±0.86	6.59±0.03	6.75±0.	7.16±1.59	6.83±1.29	N.S
n-6 PUFA	11.31±1.21 ^b	9.79±0.48 ^a	9.96±0.19 ^{ab}	10.27±0.13 ^{ab}	10.54±1.23 ^{ab}	<0.05
n-3 PUFA	35.49±1.07	38.18±0.84	36.53±0.56	36.61±1.71	34.64±0.80	N.S
HUFA Total	14.96±1.17	14.77±0.39	15.01±0.85	14.85±2.59	14.87±1.89	N.S
DHA/EPA	7.08±0.32	6.04±0.90	6.06±0.63	6.87±0.47	7.62±1.35	N.S

Se realizó la comparación de medias por medio de la prueba Tukey a partir de la cual, medias con diferentes letras son significativamente diferentes entre si. ($p < 0.05$). N.S: No significativo.

V.5. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir:

-No se encontró una diferencia significativa en la supervivencia por ninguno de los tratamientos.

- Los peces alimentados con el nauplio de *Artemia* enriquecido con la emulsión de maíz (EM), presentaron significativamente un mejor desempeño en términos de crecimiento, observándose a demás talla mas homogéneas en comparación con el resto de los tratamientos, por lo que *M. estor* no necesita del enriquecimiento con alto contenido de HUFA ni de una relación particular DHA/EPA en la dieta para juveniles.

-Con los resultados encontrados, tanto en el análisis de ácidos grasos de músculo como en el de hígado, se puede concluir que el alimento ofrecido no afectó la composición del pez blanco y este hecho pudiera ser debido a que *M. estor* tiene la capacidad de convertir ácidos grasos de la serie n-3 a otros como EPA y DHA. Si bien *M. estor* tiene esta capacidad biosintética y de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente experimento, se discute acerca de la falta de dependencia de ácidos grasos ω -3 (DHA/EPA) en la dieta, y de un requerimiento fundamental de ácido linolénico (18:3n-3) que, dado los niveles elevados de DHA encontrados en el pez, al parecer, es sintetizado por ellos mismos.

-Por otro lado de acuerdo a los resultados de los hígados y músculos de los peces alimentados con cualquiera de las 5 emulsiones registraron una relación de DHA/EPA 7, y si bien se requieren más estudios sobre la capacidad de este pescado, para sintetizar el DHA y en la medida en que se producen HUFA, la alta proporción de DHA/EPA (7:1) en la carne, hace de este pescado una especie valiosa para la nutrición humana.

VI. CONCLUSION GENERAL.

Con los resultados obtenidos en el capítulo de estandarización del enriquecimiento de la *Artemia*, se encontró que:

- que es posible iniciar el esquema de alimentación con la *Artemia* enriquecida por 18h sin reducir su calidad nutricional, lo que permite ahorrar unas horas en el proceso de enriquecimiento para ajustar de forma práctica los tiempos de enriquecimiento a los tiempos de alimentación de los peces en una planta de producción de peces.
- que se obtienen mejores resultados con doble enriquecimiento al cabo de 24 horas, aunque depende del tipo de emulsión. Para fines de este trabajo se optó por un solo enriquecimiento dado que solo se usaron 18 horas de enriquecimiento y además porque simplificó la labor de usuario.
- que es importante la realización de un enjuague o lavado de la *Artemia* antes de ser depositada en los tanques de cultivo. Aun cuando hay cierta pérdida de DHA, ésta es mínima y será preferible trabajar con mayor limpieza del agua de cultivo, lo que finalmente puede traducirse en menor esfuerzo para realizar los recambios de agua y menor estrés para los peces cultivados.

En el capítulo de alimentación del pez blanco con *Artemia* enriquecida se concluyó que:

- No se encontró ninguna diferencia significativa en la supervivencia de los peces con ninguno de los tratamientos. Por otro lado se observó que los peces que fueron alimentados con el nauplio de *Artemia* enriquecido con la emulsión de maíz (EM), presentaron significativamente un mejor desempeño en términos de crecimiento, observándose tallas más homogéneas en comparación con el resto de los tratamientos.
- Juveniles de *M. estor* no necesitan del enriquecimiento con alto contenido de HUFA ni de una relación particular DHA/EPA en la dieta para juveniles, ya que según los resultados del perfil de ácidos grasos de hígado y músculo, no presentó variaciones importantes con ninguna de las dietas ofrecidas.

- Al parecer *M. estor*, tiene la capacidad de convertir ácidos grasos de 18C de la serie n-3 a otros como EPA y DHA, por lo que puede tener un requerimiento fundamental de ácido linolénico (18:3n-3).

- La alta relación de DHA/EPA (7), que esta especie presenta, aun cuando es alimentado con dietas pobres en estos ácidos grasos, lo hace una especie extraordinariamente valiosa para el consumo humano.

VI. LITERATURA CITADA.

- Aguilar, P. S., Mendoza, D. (2004). Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Molecular Microbiology*, **62** (6): 1507-1514.
- Ako, H., Kraul, S., Tamaru, C. (1991). Pattern of fatty acid loss in several warmwater fish species during early development. Larvi'91. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. Editors. Gent, Belgium. *European Aquaculture Society (Special Publication)*, **15**. 23-25.
- Alessandri, J. M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aid, S., Poumes, B. C., Champell, G. P., Laviaille, M. (2004). Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reproduction and Nutrition Development*, **44**: 509-538.
- Almansa, E., Martin, M. V., Cejas, J. R., Badia, P., Jerez, S., Lorenzo, A. (2001). Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *Journal of Fish Biology*, **59**: 267-286.
- Ando Y, M. Sateke and Y. Takahashi. (2000). Reinvestigation of Positional Distribution of Fatty Acids in Docosahexaenoic Acid-Rich Fish Oil Triacyl-*sn*-glycerols, *Lipids*, Vol. 35, 579-582.
- Ando Y, Oomi and K. Narukawa. (2002). Regiospecific Distribution of Fatty Acids in Triacylglycerols of *Artemia franciscana* Nauplii Enriched with Fatty Acid Ethyl Esters, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 133B, 191-199.
- Ando Y, H. Samoto and S. Sasaki. (2003). Preparation of Salmon Roe Polar Lipid Concentrate as an HUFA Enricher of *Artemia* Nauplii, *J. Oleo Sci.*, Vol. 52, 443-447.

- Ando, Y. Murayama and H. Samoto, (2004) Positional Distribution of DHA and EPA in Triacyl-*sn*-glycerols (TAG) of *Artemia franciscana* Nauplii Enriched with Fish Oils Ethyl Esters and TAG, *Aquaculture*, Vol. 233, 321-335.
- A.O. A. C., (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17 th Edition. Washington, E. U. A. 1018 p.
- Aparicio, S. B. (2004). Importancia de los lípidos en la reproducción y ontogenia del pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor*). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur.120 pp.
- Arulvasu C. and Munuswamy N, (2009). Survival, growth and composition of *Poecilia latipinna* fry fed enriched *Artemia* nauplii. *Current Science*, Vol. 96, No. 1.
- Bahamondes L, D Soto & I Vila (1979) Hábitos alimentarios de los pejerreyes (Pisces Atherinidae) del embalse Rapel Chile. *Medio Ambiente (Chile)* 4: 3-18.
- Bagenal, T. y F. Tesch (1978). Age and growth. En: T. Bagenal. *Methods for assessment of fish production in freshwater*. IBP Handbook, 3. Blackwell Scient. Publ., Oxford.
- Barbour C.D. (1973). The systematics and evolution of the genus *Chirostoma* Swainson (Pisces, Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology and Botany*.
- Bell, M. V., Henderson, R. J., Sargent, J. R. (1986). The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83B (4): 711-719.
- Bell J.G., McGhee F., Campbell P., Sargent J.R. (2003) Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): Changes in flesh fatty acids composition and effectiveness of subsequent fish oil “wash out”. *Aquaculture* 218:515-528.

- Bell J G., Henderson J., Douglas R., Tocher and Sargent R. J (2004). Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil: Modification of flesh fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet. *Lipids*. Vol. 39. pp 223-232.
- Bransden, M. P., Battaglione, S. C., Morehead, 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.
- Brett, T. M., Navarra, M. D. C. (1997). The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology*, 38: 483-499
- Bente E. T., J. Gordon Bell, Grethe R, R. Henderson, Ingvild E. Graff, Douglas R. and John R. Sargent. (2005). Tailoring of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Flesh Lipid Composition and Sensory Quality by Replacing Fish Oil with a Vegetable Oil Blend . *J. Agric. Food Chem.*, 53 (26),
- Booth, R. K., McKinley, R. S., Ballantyne, J. S. (1999). Plasma non esterified fatty acid profiles in wild Atlantic salmon during freshwater migration and spawning. *Journal of Fish Biology*, 55: 260-273.
- Castell, J.D., Bell, J.G, Tocher, D.R., Sargent, J.R., (1994). Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 128, 315–333
- Copeman L.A., Parrish C. C., J.A. Brown J. A., Harel M, (2002) Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210. 285–304.

- Czesny s. Kolkovski S, Dabrowski K, Curver D, (1999) Growth, survival and quality of juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*) as influenced by n-3 HUFA enriched *Artemia* nauplii. *Aquaculture*. 178. 103-115.
- David S. Francis, Giovanni M. Turchini, Paul L. Jones, and Sena S. De Silva Dietary Lipid Source Modulates in Vivo Fatty Acid Metabolism in the Freshwater Fish, Murray Cod (*Maccullochella peelii peelii*). *J. Agric. Food Chem.*, 55 (4), pp 1582–1591.
- De Silva, S. S., Gunasekera, R. M., Collins, R., Ingram, B. A., Austin, C. M. (1997). Changes in the fatty acid profile of the Australian shortfin eel in relation to development. *Journal of Fish Biology*, 50: 992-998.
- De Pablo, M. A., Álvarez de Ceinfuegos, G. (2000). Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunology and Cell Biology*, 78: 31-39.
- Delbert M. Gatlin III. (1998). Nutrición de Reproductores y Juveniles de Peces Marinos. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, La Paz, B.C.S., México.
- Dhert, P., Sorgelos, P. (1993). Contribution towards a specific DHA enrichment in the live food *Brachionus plicatilis* and *Artemia* sp. 982.
- Dhert, P., González, M. F., Van, R. K., Geurden, I., Thysen, F., Lebegue, E., Lavens, P., Zorruelos, P. (1999). Cofeeding of phospholipids to turbot *Scophthalmus maximus* L. larvae as a tool to reduce live food consumption. *Aquaculture Nutrition*, 5: 237-245.
- Dillanes G. M. (2001). Las pesquerías continentales (la pesca en México): ante un mar de problemas una red de soluciones. *Ecología*. México D.F. 12-18.
- Geurden, I., Coutteau, P., Sorgeloos P., (1997). Effect of a dietary sodium chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. *Prog. Fish-Cult.* 54, pp 220-227.

- Gisbert E., Fernandez I., Estevez A. (2008). Nutrición y Morfogénesis. Efecto de la dieta sobre la calidad larvaria en peces. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Ensenada. Baja California. Mexico. Pp 46-78.
- Ghioni, C., Tocher, D. R., Bell, M. V., Dick, J. R., Sargent, J. R. (1999). Low C18 to C20 fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18:4(n-3), to eicosapentaenoic acid, 20:5(n-3), in a cell line from the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1437: 170-181.
- Guillaume J, Kaushik S, Bergot P. Metailler R. (2004). Nutrición y alimentación de peces y crustáceos . INRA p106.
- Gill, I., Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Elsevier Science Reviews*, 15: 401-409.
- Hardy, R.W., Gatlin, D., (2002). Nutritional strategies to reduce nutrient losses in intensive aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Haines, T.H. (1994). Water transport across biological membranas. *FEBS. letters* 346 115-122.
- Henderson, R. J., Tocher, R. D., (1987). The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research*, 26: 281-347.
- K. Narukawa *et al* (2002). Regiospecific Distribution of Highly Unsaturated Fatty Acids in Triacylglycerols of *Artemia* Nauplii Enriched with Marine Oils, *J. Oleo Sci.*, Vol. 51, 615-620.

- Han, K. I. Geurden and P. Sorgeloos. (2000). Enrichment Strategies for *Artemia* Using Emulsions Providing Different Levels of n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids, *Aquaculture*, Vol. 183, 335-347.
- Harel, M., Koven, W., Lund, E.D., Behrens, P., Place, A.R., (1998). High DHA docosahexaenoic acid enrichment of live food organisms using novel DHA-rich phospholipids. Abstract only Book of Abstracts—Aquaculture '98. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p. 228.
- 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
- Lazo, J., (2000). Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico..
- Leaf, A. and P. C. Weber. (1988). Medical progress. Cardiovascular effects of n-6 fatty acids. *New England Journal of Medicine* 318, 549-557.
- Leger, P., Bengtson, D.A., Sorgeloos, P., Simpson, K.L. and Beck, A.D. (1987) *Artemia* Research and its applications. Vol. 3. Ecology, culturing, use in aquaculture. In: *The Nutritional Value of Artemia: A Review*. (eds P. Sorgeloos, D. A. Bengtson, W. Declair and E. Jaspers). Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 357–371
- Maina, J.G., Beames R. M, Higgs D, Mbugua P N, Iwama G & Kisia S M (2003) Partial replacement of fishmeal with sunflower cake and corn oil in diets for tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn): effect on whole body fatty acids. *Aquaculture*, Vol. 34, pp 601-608

- Mancini M, Nicola I, Salinas v y Bucco C, (2009). Biology of silverside *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinopsidae) in the shallow lake “Los Charos” (Córdoba, Argentina). *Rev. peru. biol.* 15(2): 065- 071
- Martínez-Palacios. C. A., Ríos, D. M. G., Campos, M. A., Toledo, C. M., Ross, L. G. (2002). Avances sobre el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. En: Avances en la nutrición acuícola. VI Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cruz, S. I. E., Ricque, M. D., Tapia, S. M. Gaxiola, C. M. G., Simoes, N. 3 a 6 Septiembre, 2002. Cancún, Quintana Roo. México.
- Martínez-Palacios, C. A., Comas, M.J. Tello-Ballinas , J. A., Toledo-Cuevas, M, Ross, L, G, (2004a). The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae).
- Martínez-Palacios, C. A., Barriga T.E., Taylor, F.J. Rios D.G. , Ross, L, G, (2004b). Effects of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor* Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juveniles fishes. *Aquaculture* 209 369-377.
- Martínez-Palacios, C. A., Ross, L. G., Racotta-Dimitrov, I, Ríos Durán, M., Palacios Metchenov, E., Toledo Cuevas, M. (2006a). Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). *Biocell.* 30: (1), 137-148.
- Martínez-Palacios, C. A., Toledo Cuevas M, Racotta-Dimitrov, I, Ríos Durán, M., Palacios Metchenov, E., Jorge Fonseca Madrigal, Antonio Campos Mendoza y Ross, L.G., (2006b). Aspectos nutricionales del Pez Blanco de Patzcuaro (*Chirostoma estor estor*). Avances en Nutrición Acuícola XIII. XIII. Simposio Internacional de Nutrición Acuícola.

- Martínez-Palacios, C.A., Salgado-García, R.L., Racotta, I.S., Campos-Mendoza, A. and Ross, L.G. (2007). The effects of salinity on eggs, larvae and juveniles of silverside (*Chirostoma promelas* Jordan and Snyder 1899) from Lake Chapala, Mexico. In press. North American Journal of Aquaculture.
- Monroy-Mendoza, M. (2006). Influencia de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) sobre el crecimiento, la supervivencia y la capacidad osmoreguladora en larvas de pez blanco (*Chirostoma estor estor*). Tesis de Licenciatura.
- Narciso L, Pousao-Ferreira P, Passos , A, Luiz O, (1999) HUFA, content and DHA/EPA improvements of Artemia SP. With comercial oils during different enrichment periods. Aquacult. Res 30: 21-14
- Navarrete Ramírez P. (2006). Determinación del punto de no retorno y el efecto del enriquecimiento del rotífero *Braquionus plicatilis* en el crecimiento y supervivencia en larvas de Pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor*). Tesis de Licenciatura. UMSNH.
- Olvera-Novoa, M. A; Martínez-Palacios, C.A. y Real de León E. (1993). Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos. Programa cooperativo gubernamental FAO-Italia. Documento de campo No. 7. México. 104p
- Om, A. D., Ji, H., Umino, T., Nakagawa, H., Sasaki, T., Okada, K., Asano, M., Nakagawa, A. (2003). Dietary effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic on lipid metabolism in black sea bream. *Fisheries Science*, 69: 1182-1193
- Palacios, E., Racotta, I., Aparicio, B., Arjona, O., Martínez, P. C. A. (2007). Lipid classes and fatty acids during embriogénesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33: 81-91.
- R. D. Van., F. A. T. Spanings, W. M. Koven, O. Nixon and S. E. Wendelaar Bonga. (2004). Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Journal of Experimental Biology* 207, 3419-3430.

- Ross L.G., J. Sánchez Blanco, C. Martínez-Palacios, I.S. Racotta, and M. Toledo Cuevas. (2007). Anaesthesia, sedation and transportation of juvenile *Menidia estor* (Jordan) using benzocaine and hypothermia. *Aquaculture Research*. 38:909-917. (F.I. 1.051)
- Sakamoto M. Holland D L, Jones D A, (1982). Modification of the nutritional composition of *Artemia* by incorporation of polyunsaturated fatty acids using micro-encapsulated diets. *Aquaculture* 28: 311-320
- Salgado García R. S. (2009). Efecto del ácidos araquidonico (20:4n-6), sobre La capacidad reproductiva y el nivel de prostaglandinas PGE3 del Pez Blanco de Patzcuaro *Menidia estor*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur.169 pp
- Sampath, H., Ntambi, J. M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annual Reviews of Nutrition*, 25: 317-340.
- Sargent, J. R., Bell, V., Tocher, D. R. (1993). Docosahexaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. In: Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects. Drevon, C. A., Baksaas, I., Krokan, H. E. Editors. First Edition. Birkhauser. Basel.139-149 p..
- Sargent, J. R., Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R. (1995a). Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Appl. Ichthyology*, 11: 183-198.
- Sargent, J. R. (1995b). Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Broodstock management and egg and larval quality. N. R. Bromage and J. R. Roberts (Eds).. Blackwell Sciences. First Edition. Oxford, England. 424 pp.
- Sargent J, R. Mcevoy, A. Estevez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson and D. Tocher. (1999a) Lipid Nutrition of Marine Fish Early Development: Current Status and Future Directions, *Aquaculture*, Vol. 179, 217-229.

- Sargent, J.R, Bell, J.G., Mcevoy, L., Tocher, D., Estevez A. (1999b). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177 191-199
- Sargent, D.R. Tocher and J.G. Bell. (2002). The Lipids, in *Fish Nutrition*, 3rd (J.E. Halver and R.W. Hardy), Academic Press, San Diego, pp. 181-257.
- Sang Lee, M., *et al.* (2006). Current Clinical Applications of Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *Nutrition in Clinical Practice*, Vol. 21, No. 4, 323-341
- Shiozaki R and Yasuhiro Ando (2005) Positional Distribution of DHA in Triacyl-*sn*-glycerols of *Artemia* Nauplii Enriched with Salmon Roe Polar Lipids-Containing Fish Oil. *Journal of Oleo Science*. Vol. 54, No. 3 161-166
- Sorgeloos P, Coutteau P, Dhert P, Merchie G, Lavens P (1998) Use of Brine Shrimp, *Artemia* spp., in Larval Crustacean Nutrition: A Review. *Rev. Fish. Sci.* 6: 55-68.
- Steffens, W., Wirth, M. (1997). Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture International*, 15 (3-4): 313-319.
- Simpoulos A. P. (2000a) Requisito humano por ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *A Poultry Science* vol 79 : 961-970.
- Simpoulos A. P. (2000b) Ácidos grasos esenciales para la salud y enfermedad crónicas *American J. Clínica Nutrición* 71 suppl: 560
- Steffens, W., Wirth, M. (1997). Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture International*, 15 (3-4): 313-319
- Smith GG, Rita A J, Phleger C F, Nelson M M, Mooney B, Nichols Hart P, (2002) Changes in gut content and composition of juveniles *Artemia* after oil enrichment and during starvation. *Aquaculture*. 208: 137-158.

- Tacon, Albert G. J. (1989). Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados: manual de capacitación. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Pp. 572.
- Tocher, D. R., J. G. Bell and J. R. Sargent. (1996). Induction of Δ^9 -fatty acyl desaturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver by dietary manipulation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B, 205-212.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2): 107-184.
- Tocher, D. (2008). Relevance of essential fatty acids metabolism in fish to human nutrition. In: *SciTopics. Research summaries by experts*. (www.scitopics.com).
- Valencia-Betancourt R, Mendez-Carranco TZ, Aparicio-Simón B, Martínez-Palacios CA, Palacios E, Racotta IS (2004). Influence of rotifers enrichment on growth and survival of white fish (*Chirostoma estor*) larvae from Pátzcuaro Lake. *Aquaculture Europe 04*, European Aquaculture Society, Special publication No. 34, pp 815-816.

ANEXOS

Anexo 1. Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de *Artemia* enriquecida con las emulsiones E100-4 (DHA/EPA=4) y E100-0-6 (DHA/EPA=0.6), a 18 y 24 de enriquecimiento.

Ácidos Grasos	E100-4 (18h)	E100-4(24h)	E100-0.6 (18h)	E100-0.6 (24h)
C14	1±0.05	0.88±0.01	1.93±0.03	1.81±0.02
C16	10.54±0.07	10.54±0.04	10.55±0.19	10.55±0.03
C18	5.56±0.05	6.22±0.13	4.49±0.08	4.65±0.01
Total saturados	17.1±0.12	17.64±0.16	16.97±0.20	17.01±0.05
C16:1n-7	2.67±0.04	2.56±0.00	3.89±0.00	3.77±0.02
C18:1n-9	14.27±0.41	14.49±0.17	15.06±0.32	15.23±0.07
C18:1n-7	5.82±0.08	5.89±0.10	6.36±0.06	6.67±0.11
Total monoinsaturados	23.33±0.45	23.5±0.27	25.98±0.27	26.41±0.20
C18:2n-6	4.69±0.15	4.71±0.04	5.4±0.14	5.34±0.02
C18:3n-3	18.99±1.02	18.97±0.45	23.09±0.80	23.29±0.06
C18:4n-3	3.20±0.07	2.80±0.04	4.68±0.03	4.63±0.02
ARA (20:4n-6)	0.8±0.04	0.79±0.00	0.96±0.02	0.97±0.00
EPA (20:5n-3)	6.74±0.25	7.56±0.09	6.08±0.01	8.47±0.03
DHA (22:6n-3)	13.99±1.15	12.6±0.69	5.33±0.16	4.85±0.06
Total n-6 PUFA	5.48±0.20	5.50±0.05	6.36±0.13	6.31±0.03
Total n-3 PUFA	42.92±0.31	41.94±0.32	39.19±0.4.45	41.25±0.12
Total HUFA	21.52±1.33	20.96±0.78	12.37±0.51	14.29±0.08
DHA/EPA	2.08±0.10	1.67±0.06	0.88±0.07	0.57±0.05

E2: Indica el tratamiento con una relación DHA/EPA 4.

E3: Indica el tratamiento con una relación DHA/EPA 0.6..

18 y 24: Tiempo (horas) de enriquecimiento.

Anexo 2. Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de *Artemia* enriquecida durante 24 horas con las dos emulsiones E100-4 (DHA/EPA=4) y E100-0.6 (DHA/EPA=0.6) en relación a un solo enriquecimiento (0 h) o un doble enriquecimiento (0 y 12 h).

Ácidos Grasos	E100-4 D	E100-4 S	E100-0.6 D	E100-0.6 S
C14	1.12±0.01	0.82±0.00	1.09±0.05	1.79±0.04
C16	10.07±0.14	10.36±0.14	10.77±0.04	10.59±0.04
C18	5.49±0.14	6.23±0.07	4.37±0.39	4.63±0.07
Total saturados	16.68±0.13	17.41±0.29	16.23±0.34	17.01±0.17
C16:1n-7	2.74±0.03	2.52±0.00	2.7±0.20	3.74±0.04
C18:1n-9	13.88±0.07	14.92±0.07	18.84±0.17	15.12±0.34
C18:1n-7	5.78±0.12	6.17±0.08	6.26±0.55	6.48±0.13
Total monoinsaturados	22.41±0.14	23.61±0.08	28.47±0.46	26.08±0.42
C18:2n-6	4.47±0.07	4.95±0.08	13.8±1.42	5.36±0.04
C18:3n-3	17.97±0.26	19.77±0.29	22.26±0.31	23.53±0.21
C18:4n-3	3.12±0.04	2.93±0.09	4.38±0.34	4.59±0.13
ARA (20:4n-6)	0.78±0.02	0.83±0.01	0.82±0.05	0.95±0.02
EPA (20:5n-3)	6.54±0.16	7.59 ±0.18	4.44±0.14	8.39±0.36
DHA (22:6n-3)	16.19±0.21	11.11±0.085	2.09±0.24	4.85±0.20
Total n-6 PUFA	5.25±0.05	5.78±0.09	14.61±1.36	6.31±0.05
Total n-3 PUFA	43.80±0.44	41.40±0.14	41.36±0.38	41.36±0.47
Total HUFA	43.81±0.38	19.53±0.15	7.34±0.27	14.19±0.52
DHA/EPA	2.48±0.04	1.46±0.03	0.47±0.05	0.58±0.01

E2: Indica el tratamiento con una relación DHA/EPA 4.

E3: Indica el tratamiento con una relación DHA/EPA 0.6.

D: Doble enriquecimiento

Anexo 3. Perfil de ácidos grasos mayoritarios del nauplio de *Artemia* enriquecida con las emulsiones y E100- 4 (DHA/EPA=4) y E100-0.6 (DHA/EPA=0.6) (después de haberse aplicado un doble enriquecimiento donde se, evaluó además el efecto de lavado).

Ácidos Grasos	E100-4 D	E100-4 DS	E 100-0.6 D	E100-0.6 DS
C14	1.12±0.01	1.11±0.00	1.09±0.05	1.12±0.05
C16	10.07±0.08	10.08±0.14	10.77±0.03	10.94±0.15
C18	5.49±0.07	5.36±0.03	4.37±0.39	4.23±0.18
Total saturados	16.68±0.13	16.55±0.08	16.23±0.34	16.29±0.26
C16:1n-7	2.74±0.03	2.74±0.02	2.7±0.02	2.76±0.02
C18:1n-9	13.88±0.08	13.78±0.07	18.84±0.17	18.81±0.23
C18:1n-7	5.78±0.12	5.62±0.13	6.26±0.55	6.06±0.36
Total monoinsaturados	22.41±0.14	22.13±0.17	28.47±0.46	27.63±0.16
C18:2n-6	4.47±0.07	4.46±0.03	13.8±1.42	13.93±1.91
C18:3n-3	17.97±0.02	18.12±0.03	22.26±0.31	22.61±1.48
C18:4n-3	3.12±0.04	3.04±0.01	4.38±0.34	4.26±0.28
ARA (20:4n-6)	0.78±0.02	0.78±0.05	0.82±0.05	0.79±0.04
EPA (20:5n-3)	6.54±0.16	6.44±0.08	4.44±0.14	4.38±0.28
DHA (20:6n-3)	16.19±0.21	16.52±0.22	2.09±0.24	2.11±0.26
Total n-6 PUFA	5.25±0.05	6.31±0.03	16.61±1.85	14.72±1.87
Total n-3 PUFA	43.81±0.14	44.12±0.18	33.17±0.38	33.16±1.23
Total HUFA	23.51±0.38	23.74±0.19	7.34±0.27	7.28±0.49
DHA/EPA	2.48±0.05^a	2.56±0.03	0.47±0.05	0.48±0.03

E2: Indica el tratamiento con una relación DHA/EPA 4.

E3: Indica el tratamiento con una relación DHA/EPA 0.6..

D: Doble enriquecimiento

S: Sin enjuagar.