

Evaluación de microcápsulas a partir de proteínas concentradas del suero de leche en la sustitución total de microalgas para las zoeas de camarón blanco

Medina-Reyna, C. E.^{*}, F. Hernández-Rojas, P. Jacinto-Nolasco^{*}, R. Pedroza-Islas^{**}, I. S. Santiago-Morales^{*} y J. A. Ronson-Paulin^{*}.

Resumen

Evaluación de microcápsulas a partir de proteínas concentradas del suero de leche en la sustitución total de microalgas para las zoeas de camarón blanco. Existe un interés creciente en desarrollar nuevos materiales formadores de pared para elaborar dietas microencapsuladas. Una opción es la combinación entre proteínas y polisacáridos aprovechando la funcionalidad particular de cada uno de ellos. En este trabajo, se encapsuló una dieta estándar utilizando como agentes formadores de pared, Goma arábica (GA), Quick Gum (QG), Maltodextrina (MD) y Proteína concentrada de suero de leche (WPC, 80% proteína). La evaluación de las microcápsulas de pared compuesta (MPC) comprendió: 1) WPC como complemento de gomas convencionales, 2) WPC como sustituto de gomas convencionales, y 3) WPC como fuente de proteínas, en el régimen de sustitución total de microalgas. La evaluación biológica de las MPC se realizó en matraces de vidrio de 1.5 L, los cuales fueron colocados en un baño de agua termo-controlado. La densidad de siembra fue de 100 nauplios L⁻¹ y se mantuvieron sin recambio de agua durante los 6 días del experimento. Las microdietas se dieron a una razón de 8 mg L⁻¹ cada cuatro horas de 0800 a 2000. Los rendimientos larvarios de los experimentos indicaron que la WPC no solo es un buen sustituto de las gomas tradicionales sino que también representan una excelente fuente de proteínas en las MPC, siempre y cuando la dieta este balanceada en cuanto a lípidos y proteínas.

Palabras claves: Larvicultura, camarón, microcápsulas, proteína concentrada de suero de leche

Abstract

Evaluation of whey protein concentrate microencapsulated in the total algal replacement feeding regime of the zoal white shrimp. Development of new wall-forming materials for microencapsulated diets is increasingly popular in marine larviculture. One alternative is Protein Polysaccharide mixtures that take advantage of each component's individual functionalities during the microencapsulating process. A standard diet was encapsulated using arabic gum, quick gum, maltodextrin and whey protein concentrate (WPC, 80% protein) as wall-forming agents. WPC was used to produce composite wall microcapsules (MPC). MPCs were evaluated consisted in the following tests: 1) WPC as a complement of conventional gums; 2) WPC as a partial substitute for conventional gums; and 3) WPC as a protein source in total algal replacement feeding regimes. The biologic evaluation of MPCs on shrimp larval culture was carried out using 1.5 l round bottomed glass flasks, in a thermostatically controlled water bath. One hundred l⁻¹ shrimp nauplii were stocked, 5 m-filtered oceanic seawater was not exchanged during 6 days experimental period. The microdiets were dosified daily at a rate of at 8 mg l⁻¹, every 4 h from 08:00 a.m. to 20:00 p.m.. Larviculture outputs of the experiments showed that WPC is a good substitute for conventional gums, but is an excellent protein source when the protein:lipid ratio is balanced.

Key words: Larviculture, shrimp, microcapsules, whey protein concentrate.

Résumé

Evaluation de microcapsules à partir de protéines concentrées de sérum de lait dans la substitution totale de microalgues pour les zoés de la crevette blanche. Un intérêt croissant se manifeste pour le développement de nouveaux matériaux formateurs de paroi afin d'élaborer des régimes microcapsulés. Une option est la combinaison de protéines et de polysaccharides, mettant à profit la fonctionnalité particulière de chacun d'eux. Un régime standard utilisant comme agents formateurs de paroi, la gomme arabique (GA), le Quick Gum (QG), la maltodextrine (MD) et la protéine concentrée de sérum de lait (WPC, 80 % de protéines) a été encapsulé. L'évaluation des microcapsules de paroi composée (MPC) comprend: 1) WPC comme complément de gommes conventionnelles, 2) WPC comme substitut de gommes conventionnelles, et 3) WPC comme source de protéines, dans le régime de substitution totale de microalgues. L'évaluation biologique des MPC s'est réalisée dans des matras de verre de 1,5l, ceux-ci ont été placés dans un bain d'eau termo-contrôlée. La densité de semilles a été de 100 nauplius L⁻¹, maintenus, sans changer l'eau, 6 jours, durée de l'expérience. Les micro-régimes ont été distribués à raison de 8 mg L⁻¹ toutes les quatre heures de 8 h 00 à 20 h00. Les rendements larvaires des expériences indiquent que la WPC n'est pas seulement un bon substitut des gommes traditionnelles sinon qu'elle représente une excellente source de protéines pour les MPC, si toutefois le régime est équilibré en lipides et protéines.

Mots clés: larviculture, crevette, microcapsules, protéine concentrée de sérum de lait.

^{*}Instituto de Industrias. Universidad del Mar.

^{**}Depto. de Ingenierías. Universidad Iberoamericana.

Introducción

El cultivo de alimento vivo para larvicultura requiere de mano de obra excesiva, equipos costosos, e involucra fluctuaciones en la calidad por lo que impera la necesidad de producir alimentos artificiales. Por otro lado, las dietas para larvas deben ser partículas pequeñas (5 - 300 de diámetro), estables en agua, con ingredientes bien balanceados y digeribles (Teshima *et al.* 1982). Más aún, el tamaño de partícula y la gravedad específica de las dietas deben modificarse de acuerdo al estadio de crecimiento. Considerando que las larvas de crustáceos consumen su alimento en un medio acuoso (Jones *et al.* 1997a;b; Medina-Reyna *et al.* 2000), es importante que los alimentos estén disponibles para las larvas exhibiendo buena flotabilidad, bajas velocidades de sedimentación, así como bajas tasas de disolución y de lavado de nutrimentos, de tal manera que las dietas mantengan su integridad y retengan su contenido nutricional. Se ha reconocido que la pérdida de nutrimentos por lavado podría controlarse preparando las dietas por técnicas de microligado o microencapsulación (López-Alvarado *et al.* 1994). La microencapsulación es una técnica introducida de manera comercial en 1954 (Gardner, 1966) y se ha aplicado para empaquetar numerosos ingredientes (sólidos, líquidos o materiales gaseosos) a escala microscópica, para su liberación posterior a velocidades controladas bajo condiciones específicas (Dziezak, 1988). Existen diferentes métodos para microencapsular; entre ellos, los más utilizados son la coacervación, la polimerización interfacial, el secado por aspersión o spray drying y la gelación iónica, entre otros (Luzzi, 1970). El secado por aspersión es uno de los métodos más utilizados actualmente para microencapsular. Su principio radica en la producción de un polvo seco por medio de la atomización de una emulsión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la emulsión quede atrapado dentro de una película de material encapsulante (Dziezak, 1988). Uno de

los factores de mayor relevancia en la encapsulación utilizando dicho método, lo constituye la adecuada selección del material que forma la pared de la microcápsula y la concentración utilizada (Karel, 1990; Pothakamury y Barbosa-Canovas, 1995). Se han utilizado diferentes polímeros de grado alimenticio tales como la goma de mezquite, goma arábica, almidones, maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz, etc.; sin embargo, el uso exclusivo de un solo material no ha mostrado un comportamiento ideal. Pedroza-Islas (2000) encapsuló por secado de aspersión, una dieta para larvas de camarón, utilizando como agentes encapsulantes a la goma arábica, goma de mezquite y maltodextrina, solos y mezclados, de acuerdo a un diseño experimental de tres componentes. Sin embargo, el logro tecnológico alcanzado sacrificó el valor nutricional de las microcápsulas, ya que éste se redujo a una tercera parte y, como es conocido, las dietas artificiales contienen un mínimo de 55% de proteínas (Jones, 1998). Con base en lo anterior, resulta necesario hacer foco hacia la búsqueda de nuevos agentes encapsulantes, que además de ser buenos formadores de pared ayuden a cubrir las necesidades nutricionales de las larvas de camarón, mediante una adecuada atractabilidad y digestibilidad.

Las proteínas concentradas y aisladas de suero de leche se han empleado como materiales de pared para microencapsular grasas de leche anhidra, obteniendo microcápsulas esféricas con una superficie tersa, libre de fracturas y poros visibles (Young *et al.* 1993a,b; Moreau y Rosenberg, 1998). Las proteínas de suero de leche son aquellas que permanecen solubles a pH 4.6 y 20 C, después de la remoción de la caseína a la leche descremada o leche entera. Las principales proteínas en todos los tipos de suero de leche son la beta-lactoglobulina y la alfa-lactoalbúmina (Bottomley *et al.* 1990). Recientemente Espinoza-Herrera (2002) encapsuló, mediante secado por aspersión, una dieta para larvas de camarón, proponiendo la formación de paredes compuestas entre proteínas y polisacáridos, por lo que utilizó dos encapsulantes con características de formación

de película y de producción de suspensiones de baja viscosidad (el suero de leche y la goma de mezquite), siendo el primero el suero de leche con una concentración de 34% (WPC34) y 80% (WPC80) de proteínas, en dos relaciones encapsulante:dieta de 1:1 y 2:1. Como resultado, observó que las microcápsulas de forma más esférica, con superficies más lisas y tersas, libre de poros y fracturas, se obtuvieron cuando se utilizó la mezcla de WPC80 con goma de mezquite y la relación encapsulante:dieta de 2:1. El WPC80 mostró tener una menor capacidad de absorción de agua. Espinoza-Herrera *et al.* (2002) ratificaron lo anterior y consideraron que el WPC, como agente encapsulante, tiene un futuro promisorio para la alimentación de las larvas de camarón.

Recapitulando los resultados de las investigaciones de Young *et al.* (1993b), Espinoza-Herrera (2002) y Espinoza-Herrera *et al.* (2002), este trabajo tiene como objetivo evaluar el uso de microcápsulas hechas con proteínas de suero de leche en el régimen alimenticio de sustitución total de microalgas para las larvas de camarón blanco.

Material y Métodos

Para la formulación del alimento, se realizó el balanceo de la mezcla de ingredientes empleando la técnica de tanteo, mediante la aplicación de un algoritmo lineal (Medina-Reyna, 1998). Como agentes encapsulantes se utilizaron la goma arábiga (Acacia Senegal, GA); la goma arábiga modificada (Quick Gum, QG), según lo recomendado por Vernon-Carter *et al.* (1996), una maltodextrina comercial "Amidex 10" con un equivalente de dextrosa de 10 (MD), y proteína concentrada de suero de leche (WPC).

Se formularon dos tipos de dietas, las cuales se clasificaron comparándolas entre ellas como: a) Isoenergéticas hipo-lipídicas (contenido de lípidos menor a 9%) identificadas con el numeral 1; y b) Isoenergéticas hiper-lipídicas (contenido de lípidos mayor a 16%), marcadas con el numeral 2 (Tabla I); para cumplir esta condición, se ajustaron las relaciones encapsulante:dieta de cada alimento.

En ambos tipos de fórmulas se tuvo el siguiente criterio: las dietas A1 y A2 prueban el efecto de la proteína concentrada de suero de

Tabla I. Composición de ingredientes (g 100 g⁻¹ en peso seco) de las dietas. Los números de las letras corresponden a dietas Isoenergéticas hipo-lipídicas (1), e Isoenergéticas hiper-lipídicas (2).

	A1	B1	C1	A2	B2	C2
Pulpa de ostión	50.98	43.38	-	-	1.42	-
Manto de calamar	21.81	18.61	-	20.68	11.81	-
Gónada de barrilete	5.81	4.88	-	2.45	6.38	-
Músculo de barrilete	9.58	4.76	-	2.15	52.65	-
Aceite de pescado	10.66	12.95	25.15	37.15	9.27	28.3
Aceite de hígado de Bacalao ¹	-	-	25.15	37.15	9.27	28.3
Almidón de maíz ²	-	13.72	47.43	-	8.16	42.6
Premix de minerales ³	0.10	0.15	0.22	0.03	0.09	0.07
Premix de vitaminas ³	0.05	0.07	0.11	0.01	0.04	0.03
Vitamina C	0.10	0.15	0.22	0.03	0.09	0.07
Lecitina de soya ¹	0.52	0.77	1.12	0.17	0.46	0.37
Colesterol	0.35	0.52	0.56	0.12	0.31	0.18

¹ Droguería Cosmopolita SA de CV. México DF.

² Aranal SA de CV. México DF

³ Tacon, 1987.

Tabla II. Diseño experimental de las mezclas de encapsulantes seleccionados (%) como formadores de la pared de las microcápsulas.

Codificación del tratamiento	A1	B1	C1	A2	B2	C2
Goma arábica (GA) ¹	66	0	0	66	0	0
Quick Gum (QG) ²	17	75	25	17	75	25
Maltodextrina (MD) ³	7	0	0	7	0	0
Proteína concentrada de suero de leche (WPC) ⁴	10	25	75	10	25	75

1 Colloids Naturels, Marsella, Francia.

2 Laboratorios de alimentos, Universidad Iberoamericana.

3 Arancia S.A. de C.V., México DF.

4 AMPC, Iowa, E.U.A.

leche (WPC), como complemento de gomas en la pared de las microcápsulas; las dietas B1 y B2 evalúan la WPC como sustituto parcial de gomas; y las dietas C1 y C2 evalúan la WPC como fuente única de proteínas en la dieta. Dado lo anterior, se produjeron seis alimentos microencapsulados, cuya composición de encapsulantes se presenta en la Tabla II. Dichos productos de aquí en lo sucesivo recibirán el nombre genérico de microcápsulas de pared compuesta (MPC).

Los ingredientes de la dieta, excepto los agentes encapsulantes y el almidón, se mezclaron por medio de un homogenizador de tejidos Kinematica-Polytron a una velocidad de 30,000 rpm. Los agentes encapsulantes se dispersaron en agua destilada. El almidón se pre-gelatinizó a 100-C y se dejó enfriar. Los ingredientes y el almidón, se adicionaron a la dispersión acuosa de los materiales de la pared, agitando continuamente por medio de un mezclador Silverson L4R, a una velocidad máxima (5,000 rpm), manteniendo una temperatura menor a 10 °C para obtener una emulsión estable.

Las dispersiones finales se nebulizaron con un secador Mobile Minor Niro-Atomiser (Copenhague, Dinamarca) bajo las siguientes condiciones: velocidad de alimentación de 20 mL min⁻¹, 3.0 bar de presión de aire y temperatura de entrada de 150 C (Pedroza-Islas, 2000).

Para la caracterización fisico-química de las MPC se obtuvieron distribuciones volumétricas (volumen de partículas) y

acumulativas de tamaño del alimento nebulizado, con un analizador de tamaños de partículas Malvern 2600 SBOD (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra), usando un modelo log normal (Masters, 1985).

Para evaluar la estructura externa y la forma de las MPC, éstas se cubrieron con grafito por medio de un evaporador de metales JEOL. Las MPC cubiertas se observaron a través de un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-35CF).

Se estimó la flotabilidad determinando la tasa de sedimentación de una cantidad conocida de alimento microencapsulado en suspensión con agua de mar, colocada en un tubo de ensaye, a la cual se le realizó una previa homogeneización con un agitador tipo vortex por cinco minutos. Se tomó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 350 nm, a intervalos de cinco minutos durante media hora, con un espectrofotómetro Bausch Lomb - Spectronic 20. Se calculó el tiempo medio en que la microcápsula se mantuvo en el seno del líquido antes de sedimentar en el fondo (f), mediante el modelo de decaimiento cinético de primer orden (Pedroza-Islas, 2000).

$$F = 100 e^{-T/f}$$

Donde F es la flotabilidad y T es tiempo. Para este caso, el parámetro de ajuste fue la constante de tiempo de flotabilidad f .

Los contenidos de humedad, proteínas y cenizas de las MPC, se determinaron de acuerdo

a los métodos estándares establecidos por la AOAC (1990). La energía disponible se calculó usando los factores de conversión 18.0, 35.2 y 17.2 kJ g⁻¹ en base seca para las proteínas, lípidos y carbohidratos, respectivamente (Mourente y Rodríguez, 1997).

Para la evaluación biológica de las MPC se usaron 35 recipientes de vidrio de 1.9 litros de fondo esférico, equipados con tubos de vidrio, los cuales proporcionaron una suave aireación. Las unidades experimentales (UE) se colocaron en un baño de agua termostáticamente controlado a 29 °C. El agua de cultivo fue agua de mar obtenida a 5 millas de Puerto Angel, y doblemente filtrada con un filtro de cartucho de 5 µm (Simões *et al.* 2002). No existió recambio de agua durante los experimentos (Jones *et al.* 1997b; Medina-Reyna, 1998). Se manejó un fotoperíodo 12:12 luz:oscuridad, manteniendo la intensidad luminosa durante el experimento a 4.7 E m⁻² s⁻¹ con lámparas de tipo Day-Light.

Para todos los experimentos se adquirieron, por donación, nauplios (N-III) de camarón del laboratorio de producción de postlarvas de la empresa industrias PECIS S.A. de C.V. de Sisal, Yucatán. Una vez en el larvatrón de la UMAR, se procedió a aclimatarlos a 29°C

mediante un recambio parcial y paulatino de agua de mar. Se verificó la calidad del lote de nauplios de camarón, siguiendo el protocolo descrito por Treece y Fox (1993) y Treece y Yates (1993).

La microalga empleada, *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), se obtuvo de la colección de microalgas del CICESE (Trujillo-Valle, 1995) y fue mantenida en el laboratorio de alimento vivo de la UMAR. La microalga creció en medio f/2 de Guillard y Ryther (1962), con doble ración de silicatos, siguiendo el protocolo descrito por Paniagua-Michel *et al.* (1989). El monitoreo de la población microalgal se realizó empleando la técnica del conteo directo (Paniagua-Michel *et al.* 1989).

Se tomaron nauplios aprovechando su fotocinetismo positivo, y se sembraron en las UE a una densidad de 100 nauplios por litro. Las UE se llenaron a 1.5 litros. La asignación de los tratamientos y sus repeticiones se realizaron por quintuplicado, aleatoriamente dentro del baño de agua. El alimento control se mantuvo diario a 100 cél L⁻¹ de *Chaetoceros muelleri*. La identificación de los estadios larvales se determinó diariamente mediante la inspección de los matraces (Kitani, 1986). En todas las UE se adicionaron diariamente 10 mL de EDTA a 30

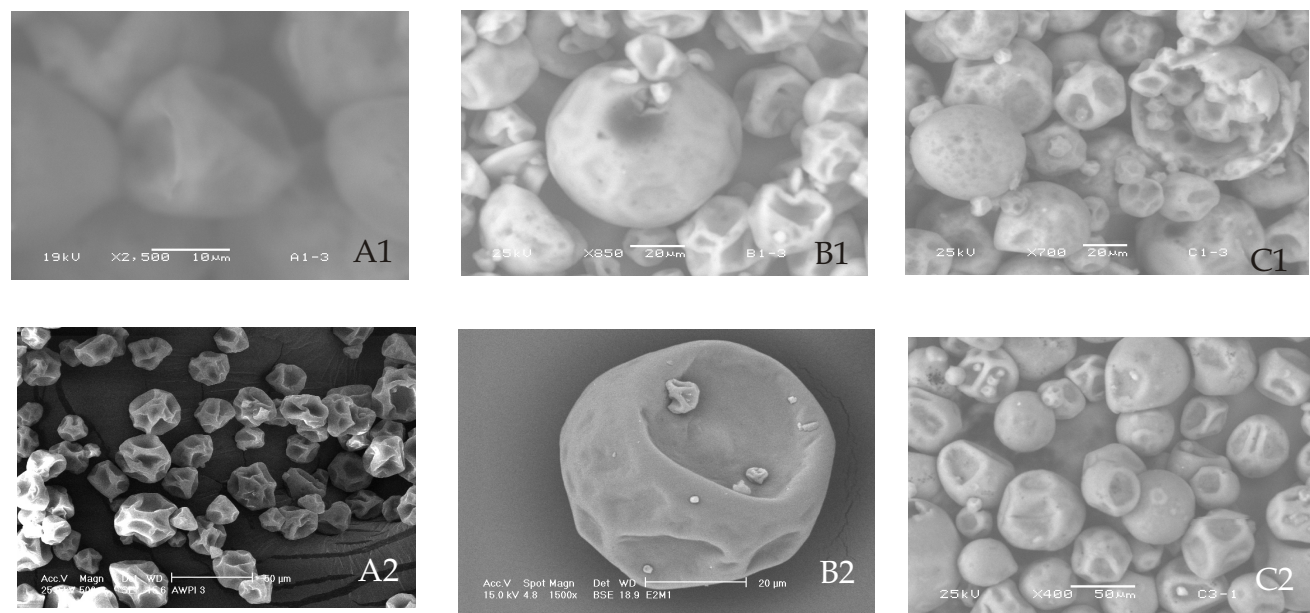


Figura 1: Morfología de las microcápsulas de pared compuesta (MPC). Las letras indican el tipo de MPC de acuerdo a la Tabla I.

Tabla III. Diseño del experimento de sustitución total de microalgas por MPC isoenergéticas hipo-lipídicas.

Tratamientos	Alimentos empleados
1	A1
2	B1
3	C1
4	<i>Chaetoceros muelleri</i>

ppM, como agente quelante (Castille y Lawrence, 1981; Treece, 1985; Treece y Fox, 1993).

Las microdietas artificiales se hidrataron en agua de mar por 3 minutos y fueron proporcionadas a los organismos a las 08:00, 12:00, 16:00 y 20:00 hrs.

Una vez obtenido el sub-estadio Mysis₁ (M₁), en los 6 días del cultivo, se dio por

tratamiento. Para fines de comparación se calculó el índice de desempeño larvario (PLIc) de cada tratamiento (Medina-Reyna *et al.* 2002).

Diseño experimental de la evaluación biológica.

En este bioensayo se realizó la sustitución total de la microalga *Chaetoceros muelleri* por las

Tabla IV. Diseño del experimento de sustitución total de microalgas por MPC isoenergéticas hiper-lipídicas.

Tratamientos	Alimentos empleados
1	A2
2	B2
3	C2
4	<i>Chaetoceros muelleri</i>

terminado el ensayo y se determinó el número de sobrevivientes (S) de cada réplica. Se tomaron aleatoriamente 10 ejemplares de cada UE y se les midió la longitud del caparazón (LC), excluyendo el rostro; previa fijación en formol al 4%. Se calculó por triplicado el peso seco individual (PSI), secando a 60°C por 36 horas muestras de 10-20 organismos de cada réplica; además se determinó el índice de desarrollo larval (Villegas y Kanazawa, 1979) mediante la fórmula

$ID = A / \text{número total de larvas identificadas}$, donde A es el valor del estadio por el número de larvas a ese estadio. El valor del estadio aumenta conforme la larva muda de zoea₁ (Z₁) a M₁. De manera adicional, se estimó la tasa metamórfica (MR) como el porcentaje de M₁ presentes al final del experimento en cada

MPC isoenergéticas hipo-lipídicas. El nivel de alimentación fue igual al que se utiliza en los laboratorios: 8 mg L⁻¹ d⁻¹ para Zoea, calculado con base en peso seco total (Kumlu y Jones, 1995). Las dietas experimentales se compararon con un tratamiento control (Tabla III). El cultivo larvario en dicho ensayo se llevó hasta el estadio de M1.

Por otra parte, se evaluó la sustitución total de la microalga *Chaetoceros muelleri* con MPC isoenergéticas hiper-lipídicas (Tabla IV). Se proporcionó el mismo nivel de alimentación y tratamiento control que en el anterior experimento.

Análisis de datos.

Se determinó el tiempo característico de flotabilidad ajustando el modelo por mínimos

Tabla V. Composición proximal media (Error estándar: E.E, N=3, % en base seca) y contenido energético total (KJ g⁻¹) de los alimentos utilizados en los ensayos. Carbohidratos (CHO). P:E (Razón proteína:energía).

Dieta	Proteínas	CHO	Lípidos	Cenizas	Energía total	P:E
A1	15.61(0.27)	72.93	5.69(0.59)	5.77(0.24)	17.35	0.20
B1	24.61(0.27)	68.04	4.07(0.51)	3.28(0.24)	17.56	0.34
C1	30.11(0.27)	59.28	8.34(0.59)	2.27(0.24)	18.55	0.44
A2	10.54(0.23)	68.09	17.89(0.59)	3.48(0.24)	19.90	0.12
B2	14.52(0.27)	63.51	19.77(0.59)	2.20(0.30)	20.49	0.17
C2	14.58(0.27)	65.53	18.42(0.51)	1.47(0.24)	20.37	0.17

cuadrados. Se utilizó el procedimiento simplex del módulo de estimación no lineal del software STATISTICA.

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) como bondad de ajuste a la distribución normal, y la prueba de Bartlett que evalúa la igualdad de varianza (Zar, 1984; Sokal y Rohlf, 1995). En el caso en donde no se cumplieron estas premisas del modelo general lineal aditivo, se empleó la transformación logarítmica o arcoseno (Steel y Torrie, 1960), según el caso.

La significancia de las diferencias en los tratamientos se determinó usando un análisis de varianza (ANOVA). Se compararon todas las medias por pares, siguiendo el método de Tukey para muestras no ortogonales (Wilkinson, 1987). Para todos los casos, el nivel de significancia nominal fue del 5 %.

Resultados

La composición proximal y contenido energético, de los alimentos utilizados en este trabajo se reportan en la Tabla V. El contenido proteico de las dietas formuladas varió de 10.54% a 30.11%. Las dietas marcadas con el numeral 1 presentaron un mayor nivel proteico que las marcadas con el numeral 2 (Tabla V). El contenido de lípidos varió de 4.07% a 19.77%, siendo hiper-lipídicas las dietas de la serie 2, ya que éstas contienen los valores más altos de lípidos; en caso contrario, las dietas con el numeral 1 fueron hipo-lipídicas (Tabla V). Por otro lado, tanto las dietas 1 como las 2 fueron isoenergéticas, ya que el contenido de energía total fue cerca de 17.35 KJ g⁻¹ y 20.49 KJ g⁻¹, respectivamente (Tabla V).

Tabla VI. Resumen de las características físicas de las MPC empleadas en los cultivos larvarios de camarón blanco.

Dieta	Tamaño medio (m)	Forma	<i>f</i> (min.)
A1	5.28	Esférica regular	94.01
B1	59.24	Esférica regular	40.76
C1	58.48	Esférica regular	3.81
A2	2.75	Esférica regular	19.71
B2	61.10	Esférica regular	33.38
C2	58.84	Esférica regular	225.38

^{†††}: Tiempo característico de flotabilidad según $F = 100e^{(t/\theta)}$

Los tamaños medios de las microcápsulas de pared compuesta estuvieron por debajo de los 62 m (Tabla VI); siendo la dieta A2 la de menor tamaño (2.75 m). Con lo que respecta a la morfología externa, se observó que todas las MPC presentan una forma esférica regular, con superficies lisas, libres de poros y fracturas (Figura 1; Tabla VI). En cuanto al tiempo característico de flotabilidad, la dieta C2 presentó el mayor tiempo el cual fue de 225.38 min. (Tabla VI).

Evaluación biológica de las MPC

Para el primer bioensayo, las zoeas de camarón blanco alimentadas con las MPC isoenergéticas hipo-lipídicas y sin una DUIM, no sobrevivieron.

Para el otro caso, se observó que las MPC isoenergéticas hiper-lipídicas aumentaron la sobrevivencia (Tabla VII). El peso seco individual (PSI) medio, varió de 12.91 a 30.33 g. El mayor PSI medio se obtuvo con el tratamiento control. Las dietas B2 y C2 fueron significativamente menores al control y estadísticamente iguales entre ellas, con un peso promedio de 12.91 y 15.55 g, respectivamente (Tabla VII). La sobrevivencia media de las larvas de camarón blanco osciló de 59 a 82%. La sobrevivencia más alta se obtuvo con el tratamiento control y fue

significativamente diferente a los demás tratamientos (Tabla VII). La sobrevivencia más baja de larvas se obtuvo con el tratamiento C2, siendo estadísticamente igual al tratamiento B2, (Tabla VII). El crecimiento de las larvas de camarón, estimado con la longitud del caparazón, varió de 0.57 a 0.73 mm, obteniéndose la mayor LC con el tratamiento control, siendo significativamente mayor a los demás tratamientos. El tratamiento B2 rindió un tamaño de 0.58 mm, el cual fue estadísticamente igual al obtenido con la dieta C2 (Tabla VII). El índice de desarrollo medio de las larvas de camarón blanco fluctuó entre 2.29 y 3.98. El mayor se obtuvo con el tratamiento control, el cual fue significativamente superior al resto de los tratamientos (Tabla VII).

La tasa metamórfica (MR) media de las larvas presentó su valor más alto con el tratamiento control (89.65%), siendo significativamente diferente a los demás tratamientos, los cuales fueron de 0% (Tabla VII).

El índice de desempeño larvario (PLI_c) medio del camarón blanco, varió de 0.78 a 1. El mayor PLI_c se obtuvo con el tratamiento control, siendo significativamente superior a los demás tratamientos. En el tratamiento C2 se obtuvo el PLI_c más bajo, aunque no estadísticamente diferente al B2 (Tabla VII).

Tabla VII. Valores medios (Error estándar: EE) del peso seco individual (PSI), sobrevivencia (S), longitud del caparazón (LC), índice de desarrollo (ID), tasa metamórfica (MR) e índice de desempeño (PLI_c) de las larvas de *Litopenaeus vannamei* criadas con MPC isoenergéticas hiper-lipídicas. Tratamientos (TRAT). Control (CON). PLI_c (CV). CV: Coeficiente de variación.

TRAT	PSI (g)	S (%)	LC (mm)	ID	MR (%)	PLI _c
A2	ND	0	ND	ND	ND	ND
B2	12.91(2.05) ^a	62(0.04) ^a	0.58(0.01) ^a	2.29(0.05) ^a	0 ^a	0.82 (20)
C2	15.55(2.05) ^a	59(0.04) ^a	0.57(0.01) ^a	2.38(0.05) ^a	0 ^a	0.78 (22)
CON	30.33(1.83) ^b	82(0.04) ^b	0.73(0.01) ^b	3.98(0.05) ^b	89.65(1.35) ^b	1.00 (1)

Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes a $p < 0.05$.
ND = No determinado.

Discusiones y conclusiones.

El tamaño medio de las microcápsulas de pared compuesta (MPC) fue mayor cuando se utilizó como agente encapsulante WPC y goma arábica modificada (QG) (Tabla II), por lo que se comprueba que el tamaño de las microcápsulas se ve afectado por la interacción de los materiales formadores de la pared (Espinoza-Herrera, 2002). Las dietas A destacaron con menores tamaños de partículas; ello se debe a que estas dietas tienen como pared mezcla de gomas con alta capacidad emulsificante, que al interactuar entre ellas muestran un efecto sinérgico que incrementa su actividad de superficie, lo cual redundaría físicamente en el tamaño de la partícula (Pedroza-Islas, 2000). Las microfotografías de las MPC mostraron que las microcápsulas obtenidas fueron muy semejantes morfológicamente a las descritas por Medina-Reyna (1998), Pedroza-Islas (2000), Cruz-Teran (2000), Jacinto-Nolasco (2002), y Espinoza-Herrera (2002). Esto se debe principalmente a la técnica de secado por aspersión, utilizada para la elaboración de dichas microcápsulas. Por otro lado, se observó que la proporción de WPC, con relación en la QG, influye sobre la microestructura de las MPC. Mientras mayor fue la proporción de WPC, se obtuvieron microcápsulas con forma más esférica, superficies lisas y con menos áreas dentadas (Figura 1), lo cual concuerda con lo reportado por Espinoza-Herrera (2002). El tiempo de flotabilidad fue diferente para cada tipo de MPC, esto se le atribuye tanto al material de la pared, la relación encapsulante:dieta, como al contenido de lípidos en la dieta (Espinoza-Herrera, 2002).

El análisis proximal mostró que la inclusión de la proteína concentrada del suero de leche, como sustituto de agentes encapsulantes, incrementó el contenido proteico de las microcápsulas (Tabla V). Las dietas con el numeral 1, presentaron un contenido de lípidos inferior al nivel óptimo recomendado por Jacinto-Nolasco (2002), el cual es de 11.5%. En estas dietas la fracción proteica superó a la fracción lipídica. En caso contrario, en las dietas con el numeral 2, el contenido de lípidos fue mayor que el de proteínas (Tabla V). Como resultado, el contenido de carbohidratos en la dieta fue mucho mayor que el de lípidos y proteínas (Tabla V). El

contenido energético de las dietas hiper-lipídicas superó al del OrbiCap microencapsulado por Medina-Reyna *et al.* (En prensa), alcanzando así niveles máximos de 20 KJ g⁻¹ (Tabla V), igual a los niveles de energía de las dietas usadas por Cruz-Terán (2000), por lo que se consideró que dichas dietas contaron con la energía necesaria para la cría de larvas de camarón.

Con los resultados obtenidos en el primer bioensayo, se obtuvo claramente que las MPC isoenergéticas hipo-lipídicas por sí solas no fueron suficientes para mantener el desarrollo de las larvas de camarón. Lo cual ratifica que la adición de alimento vivo (microalgas) durante los primeros días del cultivo, es de especial importancia en la digestión de alimento inerte (Le-Vay, 1994; Kumlu y Jones, 1995; Sangha *et al.* 2000; Le-Vay *et al.* 2001); por otro lado, se puede atribuir que las dietas utilizadas fueron deficientes en su contenido lipídico (Tabla V). En ese sentido, está plenamente probado que tanto los lípidos como las proteínas son nutrimentos esenciales para un buen crecimiento de las larvas de camarón (Jones *et al.* 1979; Le-Moullac *et al.* 1994; Puello-Cruz, 1996; Jones *et al.* 1997a). Además, es posible que estas microdietas lograron formar microagregados proteínicos en la pared, dificultando su digestión.

En el experimento con MPC isoenergéticas hiper-lipídicas, se observó que las dietas B2 y C2, encapsuladas con WPC y QG (Tabla VII), permitieron la sobrevivencia de los organismos; sin embargo, los resultados de los indicadores larvarios que se obtuvieron con éstas, fueron inferiores a los que se produjeron con el alimento vivo (Tabla VII). En el tratamiento A2, las larvas no sobrevivieron (Tabla VII), y esto se puede atribuir al bajo contenido de proteínas y lípidos en la misma, además de la incapacidad de romper la pared mecánica y/o enzimáticamente. (Tabla V). En este experimento resalta que la omisión del alimento vivo, principalmente en los estadios de protozoa, provocan un bajo rendimiento larvario (Kumlu y Jones 1995; Sangha *et al.* 2000); sin embargo, el hecho de que las dietas B2 y C2 se desempeñaran muy cercanas al alimento vivo, indica que el WPC es un buen sustituto de gomas convencionales, además de que es una buena fuente de proteína. Con este trabajo, se documenta por primera vez que

el WPC incorporado en microcápsulas, es un buen ingrediente capaz de formar pared y, al mismo tiempo, proporcionar la proteína necesaria para los estadios zoearios del camarón blanco, siempre y cuando la microdieta este bien balanceada respecto a su perfil nutricional.

Agradecimientos.

Se reconoce el financiamiento del SIBEJ a través del proyecto clave 19980505006 otorgado al primer autor y al proyecto grupal G33565-B del CONACYT, Proyecto 427-UIA autorizado a Ruth Pedroza-Islas. Los autores agradecen a Industrias PECISS. A. de C. V. por la donación de nauplios de camarón.

Bibliografía.

- AOAC, 1990. Official methods of analysis. Vol. 1. 15 edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington. D.C.
- Bottomley, R. C., M.T.A. Evans y C. J. Parkinson, 1990. Whey Proteins. In: Food Gels, ed. Elsevier, Havre. Peter. UK. 435 pp.
- Castille, F. L. y A. L. Lawrence, 1981. The effects of EDTA (Ethylenedinitrotetraacetic acid) on the survival and development of shrimp nauplii (*Penaeus stylirostris* Stimpson) and the interactions of EDTA with the toxicities of cadmium, calcium and phenol. *J. World Maricult. Soc.* 12(2):292-304.
- Cruz-Terán, E. M., 2000. Efecto de la fuente de lípidos dietarios en la sobrevivencia, crecimiento y metamorfosis de larvas de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. UMAR. Puerto Angel Oaxaca., Septiembre de 2000. 77 pp.
- Dziezak, J. D., 1988. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. *Food Technol.* April: pp 136-151.
- Espinoza-Herrera, N. L., 2002. Elaboración y caracterización de microcápsulas de pared compuesta (Proteína-Polisacárido) como alimento para acuicultura. Tesis de maestría. Universidad Iberoamericana. México, D. F. 60 pp.
- Espinoza-Herrera, N., R. Pedroza-Islas, E. J. Vernon-Carter, C. E. Medina-Reyna, I. Santiago-Morales y Gaxiola-Cortés, G., 2002. Composite wall microencapsulated diets (Whey-Mesquite Gum) for marine shrimp larvae. Book of Abstracts. World Aquaculture 2002. Beijing, China. April: 23-27, 2002. pp 591.
- Gardner, G.L., 1966. Manufacturing encapsulated products. *Chem. Eng. Prog.* 62 (4): 87-91.
- Guillard, R. R. L. y J. H. Ryther, 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervaceae* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Jacinto-Nolasco, P., 2002. Evaluación del orbital de barrilete negro (*Euthynnus lineatus*) en el cultivo zoeario del camarón blanco. Tesis de Ingeniería en Acuicultura. UMAR. Puerto Angel Oaxaca. Enero de 2002. 75 pp.
- Jones, D. A., A. Kanazawa y S. Abdel-Rahman, 1979. Studies on the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 17:33-43.
- Jones, D. A., A. Yule y D. L. Holland, 1997a. Larval nutrition. In: Crustacean Nutrition. D. Conklin, L.R. D'Abramoy D. M. Akiyama (Eds). Adv. in World Aquaculture Vol. 6. World Aquaculture Soc. Baton Rouge, L. A. USA.
- Jones D. A., P. Bridson, M. Freeman, J. Latchford, C. A. Martínez-Palacios, N. Misciatelli, F. A. L. T. Riveiro, S. Sirvas-Rowlands, y F. Simoes, 1997b. Progress in the use of artificial feeds in penaeid larval culture. In: Proc. Of the 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conf. y Third Asia-Pacific Conf. on Algal Biotechnology: 107. 7-10 Mayo, 1997. Phuket, Thailand.
- Jones, D. A., 1998. Crustacean larval microparticulate diets. *Rev. in Fish. Sci.* 6(1-2):41-45.
- Karel, M., 1990. Encapsulation and controlled release of food components. In: Biotechnology and Food Process Engineering. Schwartzberg H.G and Rao, M.A. EDS. IFT Basic Symposium Series. Marcel Dekker, Inc.: 277-293. USA.
- Kitani, H., 1986. Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* BOONE reared in the Laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 52 (7):1131-1139.
- Kumlu, M. y D. A. Jones, 1995. The Effect of live and Artificial Diets on Growth, Survival, and Trypsin Activity in Larvae of *Penaeus indicus*. *J. World Aquaculture Soc.* 26(4):406-415.
- Le-Moullac, G., A. V. Wormhoudt y AQUACOP, 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fiber levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Resour.*, 7:203-210.
- Le-Vay, L., 1994. Nutritional studies on fish and crustacean larvae. Ph. D. Thesis. School of Ocean Sciences. UCNW. Bangor, Wales. UK.
- Le-Vay, L., D. A. Jones, A. C. Puello-Cruz, R. S. Sangha y C. Ngamphogsai, 2001. Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comp. Biochem. and Physiol.* Part A 128: 623-630.
- López-Alvarado, J., C. J. Langdon, S. Teshima, y A. Kanazawa, 1994. Effects of coating and encapsulation of

- crystalline amino acids on leaching in larval feeds. *Aquaculture* 122: 335-346.
- Luzzi, L. A., 1970. Microencapsulation. *J. Pharmaceutical Sciences* 59 (10):1367-1375.
- Masters, K., 1985. *Spray Drying Handbook*. 4th. ed. John Wiley Sons. New York, NY. USA.
- Medina-Reyna, C. E., 1998. Diseño y evaluación de un alimento nebulizado para la larvicultura de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Baja California, México. Noviembre de 1998. 67 pp.
- Medina-Reyna, C. E., M. C. Chavéz-Sánchez, C. A. Martínez-Palacios y R. Pedroza-Islas., 2000. Evaluation of a microbound spray-dried feed for the rearing of penaeid shrimp larvae. *North Am. J. Aquaculture* 62:73-77.
- Medina-Reyna, C. E. P. Jacinto-Nolasco, J. Ronson, I. Santiago-Morales & R. Pedroza-Islas., 2002. A new index for the evaluation of the shrimp larviculture. En: Mem. del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancun, Quintana Roo, México. Méx.
- Medina-Reyna, C. E., P. Jacinto-Nolasco, R. Pedroza-Islas, I. S. Santiago-Morales y J. A. Ronson-Paulin. En prensa. Sustitución de microalgas en el cultivo larvario de camarón blanco por microcápsulas a base de un subproducto del barrilete negro. *Ciencia y Mar*
- Moreau, D. L. y M. Rosenberg, 1998. Porosity of Whey Protein-Based Microcapsules Containing Anhydrous Milkfat Measured by Gas Displacement Pycnometry. *J. Food Sci.* 63: 819-822.
- Mourente, G. y A. Rodríguez, 1997. Effects of salinity and dietary DHA (22:6n-3) content on lipid composition and performance of *Penaeus kerathurus* postlarvae. *Mar. Biol.* 128:289-298.
- Paniagua-Michel, J., L. F. Buckle-Rámirez, C. Granados-Machuca y D. Loya-Salinas, 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. 2^a. Ed. CICESE. Ensenada, B. C. México. 50 pp.
- Pedroza-Islas R., 2000. Estudios de difusión de nutrientes en alimentos microencapsulados para larvas de crustáceos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 69 pp.
- Pothakamury, U.R, y G.V. Barbosa-Canovas, 1995. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends Food Sci. Technol.* 6:397-406.
- Puello-Cruz, A. C., 1996. Trypsin activity during larval development of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* shrimp (Crustacea: Decapoda). M. S. thesis. School of Ocean Sciences. UCNW. Bangor, Wales. UK.
- Rosenberg, M., Y. Talmon y I. J. Kopelman, 1988. The microstructure of spray-dried microcapsules. *Food Microstructure* 7:15-23.
- Sangha, R., A. C. Puello-Cruz, M. Chávez-Sánchez y D. Jones, 2000. Survival and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae fed a single dose of live algae and artificial diets with supplements. *Aquaculture Res.* 31 (8-9):683-689.
- Simoes, N., G. Gaxiola y D. Jones, 2002. *Litopenaeus vannamei* Larval culture success as a consequence of manipulation of bacterial communities in initial culture water. Book of Abstracts. World Aquaculture 2002. Beijing, China. April 23-27, 2002. pp 700.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf, 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. 3rd. Ed. W. H. Freeman and Co. New York, N. Y. USA. 881pp.
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie, 1960. *Principles and Procedures of Statistics with special reference to the biological sciences*. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York, N. Y. U. S. A. 481 pp.
- Tacon, A. G. J., 1987. *The Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. A Training Manual*. 1. The essential nutrients. FAO Field Doc. 2/E.GCP/RLA/075/ITA.
- Teshima, S., A. Kanazawa y M. Sakamoto, 1982. Microparticulate diets for the larvae of aquatic animals. *Min. Rev. Data File Fish. Res.*, 2:67-86.
- Treece. G. D., 1985. *Larval rearing technology*. Texas Shrimp Farming Manual. Texas Agricultural Ext. Serv. Chamberlain GW, M. G. Haby and R. J. Miget (ed.). TX. USA: 43-64.
- Treece, G. D. y M. E. Yates, 1993. *Manual de Laboratorio para el Cultivo de Larvas de Camarón Peneido*. Texas A M University. College Station, TX: 7-18.
- Treece M. y J. M. Fox, 1993. *Desing, operation and training manual for an intensive culture shrimp hatchery (with emphasis on Penaeus monodon and Penaeus vannamei)*. Texas AM Sea Grant College Program. Pub. TAMU-SG-93-505. pp 187. College Station, TX, USA.
- Trujillo-Valle, M. L., 1995. La colección de Microalgas del CICESE. Inf. Técnico CICT9301. Com. Acad. Ser. Acuicultura. CICESE. 103 p.
- Vernon-Carter, E. J., S. A. Gomez, C. L. Beristain, G. Mosqueira, R. Pedroza-Islas, y R. C. Moreno-Terrazas, 1996. Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. *J. Texture Studies* 27:625-641.

Villegas, C. T. y A. Kanazawa, 1979. Relation between diet composition and growth rate of the zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. *Fisheries J. Philipp.* (4):32-40.

Villegas, C.T. y A. Kanazawa, 1980. Rearing of the larval stage of prawn *Penaeus japonicus* bate, using artificial diet. *Memoirs of the Kagoshima University Research Center for the South Pacific* 1 (1):43-49.

Villegas, C.T., T. L. Li y A. Kanazawa, 1980. The effects of feeds and feeding levels on the survival of a prawn, *Penaeus monodon* larvae. *Mem. Kagoshima Univ. Res. Center S. Pac.* 1(1):51-55.

Young, S. L., X. Sarda y M. Rosenberg, 1993a. Microencapsulating Properties of Whey Proteins.1. Microencapsulation of anhydrous Milk fat. *J. Dairy Sci.*, 76: 868-2877.

Young, S. L., X. Sarda y M. Rosenberg, 1993b. Microencapsulating Properties of Whey Proteins. 2. Combination of Whey Proteins with Carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 76:2878-2885.

Zar, J. H., 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ. USA. 334 pp.

Recibido 1 de agosto del 2002

Aceptado 3 de septiembre del 2002