

Uso de ficocoloides en la nebulización de microdietas para larvicultura marina

Ruth Pedroza-Islas*
Carlos E. Medina-Reyna**
Manuel J. Acosta-Ruiz***

Resumen

Las dietas artificiales para larvas de camarón tienen la presentación de microcápsulas, microaglutinados, microcubiertos y liposferas, cada una con problemas en su uso debido al proceso de fabricación. El spray-drying o nebulización es una tecnología muy usada en la industria farmacéutica y alimentaria. En este trabajo, se adapta dicho proceso con el fin de diseñar un alimento microparticulado, a partir de productos pesqueros regionales y ligados ya sea con k-Carragenano (KAR) o Alginato (ALGIN), para el larvicultivo de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*. La disolución media de sólidos, morfología, tamaño de partícula y análisis proximal del alimento resultante se determinaron para su evaluación fisicoquímica. Se obtuvieron microesferas (ME) que variaron de 8.4 ± 10.35 a 27.28 ± 34.5 mm. En el caso de ME con KAR, la disolución media de sólidos dependió de la concentración de KAR y del tiempo, siendo el nivel de inclusión del 5% el menor a 90 minutos. Las ME con ALGIN dependieron de la concentración de ALGIN, y no del pH ni de la concentración del gelificador. El nivel de inclusión de 2% a un pH de 2 y 280 mg de CaCl_2 rindió la menor disolución media de sólidos a los 60 y 90 minutos.

Abstract

Microground, microencapsulated, microcoated and lipospheres are present in the artificial diets of larvalshrimp. Due to the manufacturing process each one has problems with their use. In the pharmaceutical and nutrition industries spray-drying is a frequently used technology. The purpose of this paper is to design micro-particles, food from regional or related fishery-by-products for the cultivation of white shrimp larvae, *Litopenaeus vannamei*. The mean solid dissolution, morphology, size of particle and proximal analysis resulting feed was determined in order to evaluate their physiochemicals. There was a variation in microspheres obtained from 8.4 ± 10.35 a 27.28 ± 34.5 . In the case of ME with KAR the average solid dissolution depended on the concentration of KAR, the time, the level of inclusion from 5% minor to 90 minutes. The ME with the ALGIN depended on the concentration of ALGIN and not on the pH nor on the concentration of gelifier. The level of inclusion of 2% to pH of 2 and 280 mg of CaCl_2 rendered the smaller mean dissolution of solids to the 60 and 90 minutes.

Résumé

Les diètes artificielles pour les larves de crevettes se présentent sous forme de microcapsules, microaglutinés, microcouverts et lyosphères; toutes présentent des problèmes quant à leur utilisation du au processus de fabrication. Le spray-drying ou nébulisation est une technologie très utilisée dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire. Dans ce travail, le processus de fabrication en particules microscopiques, à partir de produits de pêche régionaux et liés au k-carragénane (KAR) ou alginate (ALGIN), pour la culture des larves de crevettes blanches, *Litopenaeus vannamei*. La semi-dissolution de solides, la morphologie, la taille des particules et l'analyse proche de l'aliment, obtenus sont déterminés pour son évaluation physique et chimique. On a obtenu des microsphères (ME) qui varient de $8,4 \pm 10,35$ à $27,28 \pm 34,5$ mm. Dans le cas de ME avec KAR, la semi-dissolution de solides dépend de la concentration de KAR et du temps, le niveau d'inclusion étant de 5% minimum à 90 minutes. Les ME avec ALGIN dépendent de la concentration d'ALGIN, et non pas du pH ni de la concentration du géifiant. Le niveau d'inclusion de 2% à un pH de 2 et 280 mg de CaCl_2 , et a rendu une semi-dissolution minimale de solides après 60 et 90 minutes.

* Depto. de Ingenierías. UIA-Santa Fé. México, D. F.

** Instituto de Industrias. Universidad del Mar.

*** Depto. de Acuicultura. CICESE. Ensenada, B. C.

Introducción

El alimento artificial para larvicultura de peneidos se emplea en la suplementación, reemplazo parcial o total del alimento vivo (Jones, 1998). El alimento artificial puede clasificarse, de acuerdo a su presentación, en alimento seco y alimento líquido. Los alimentos secos gozan de gran popularidad por ser los primeros en ser lanzados al mercado. Jones et al. (1974) modificaron la técnica de polimerización interfacial y obtuvieron una microcapsula que se probó experimentalmente para larvas de camarón, langostino y Artemia (Jones et al., 1974, 1979). Posteriormente, Kanazawa et al. (1982) describieron la preparación de alimento microligado y microcubierto para larvas de camarón, como una alternativa sencilla a la microencapsulación. Como una medida para disminuir los problemas de lixiviación y estabilidad (Teshima *et al.*, 1993), problemas comunes con alimentos secos, Villamar y Langdon (1993), sofisticaron la preparación del alimento microencapsulado mediante la creación de una doble capa que cubre el núcleo de las cápsulas. Recientemente, se introdujo al mercado el alimento líquido por medio de lipoesferas hidroestabilizadas y microemulsiones estables (D. F. Villamar, Cargill Feeds, Inc.)

Las técnicas para elaborar alimento seco se han adecuado paulatinamente conforme el mercado se va diversificando. Una de las técnicas que ha sido poco explorada para este fin ha sido el secado por aspersión o spray drying (Medina-Reyna et al., en prensa), con gran potencial para ingredientes frescos y labiles pues el producto obtenido presenta poca modificación química debido a la rapidez del proceso (Masters, 1985; Dziezack, 1988)

El objetivo principal de este trabajo es diseñar y evaluar fisicoquímicamente un alimento nebulizado para el larvicultivo de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.

Material y Métodos

Se diseñó una dieta basal (Tabla I) con ingredientes localmente disponibles y se prepararon varios alimentos empleando un Atomizador

Niro Mobile Minor (Niro Atomizer, Dinamarca) según el proceso descrito por Medina-Reyna, 1998. Se utilizaron al k-Carragenano y Alginato de Calcio como ligantes. Para el caso de la elaboración del alimento nebulizado (AN) con k-Carragenano (KAR) se probaron tres concentraciones, con respecto a la base seca de los ingredientes : 1, 2.5 y 5%, denominadas, en lo sucesivo, CF1, CF2 y CF3, respectivamente. En el caso del uso del Alginato de Calcio (ALGIN) en la preparación del AN, se diseñaron ocho formulaciones derivadas de dos concentraciones de agente gelificante (CaCl_2), dos pH y dos concentraciones de ALGIN.

Disolución de sólidos y morfología

La técnica para la determinación del lavado fue la disolución de sólidos en suspensión (Bengtson, 1993). Esta prueba se realizó por duplicado.

Para examinar la estructura externa y la forma del AN, estos se cubrieron con grafito por medio de un evaporador de metales JEOL. El AN cubierto se observó con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-35CF). Las características por observar fueron : forma, pared, dimples, fracturas, y caps (Rosemberg *et al.*, 1988).

Análisis de distribución de tamaños

Se obtuvieron distribuciones volumétricas y acumulativas de tamaño del AN con un analizador de tamaños de partículas Malvern 2600 SBOD (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra), usando un modelo lognormal (Masters, 1985). Este equipo proporciona un estimado del valor medio del diámetro al 50% de la fracción acumulativa de volumen (FAV). El diámetro medio (d_{50}) y la desviación estándar aritmética ($s_a=0.5 [d_{84}-d_{16}]$) se calculó a partir de la curva de distribución acumulativa.

Análisis proximal

Los macro-ingredientes y la dieta basal se analizaron para formular y confirmar su perfil bromatológico. Todas las marchas analíticas son procedimientos aprobados por la A. O. A. C. La

Tabla I. Composición de ingredientes (g kg⁻¹) de la dieta (CIAD-DME-03) para larvas de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.

Pulpa de ostión de placer	370.2
Carne de atún aleta amarilla	118.4
Pulpa de jaiba azul	92.8
Manto de calamar	183.6
Aceite de girasol	15.2
Aceite de hígado de Bacalao ¹	52.8
Almidón de maíz ²	107.0
Lecitina de soya ¹	10.0
Colesterol ³	5.0
Premix de minerales ⁴	2.0
Premix de vitaminas ⁴	1.0
Rovimix Stay C 25 ⁵	2.0
Ligante	Descrito en texto
Energía de (kJg ⁻¹):	
Proteínas	9.00
Carbohidratos	2.58
Lípidos	5.28
Total	16.86

¹ Drogeria Cosmopolita SA de CV. México DF. ² Aranal SA de CV. México DF. ³ Sigma Chemicals, St. Louis, MO. USA. ⁴ Tacon, 1987.

⁵ Hoffman-La Roche, Basilea, Suiza.

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).

Análisis de datos

Los datos provenientes de la prueba de disolución de sólidos fueron comparados a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) factorial de medidas repetidas (Damon y Harvey 1987). Para cada ficocoloide empleado en la preparación del AN, se descartó a aquellos tratamientos que a los 30 min de incubación rindieron un 50% de lavado, ya que de acuerdo a Jones *et al.*, (1997) este es el tiempo de gastroevacuación en las larvas de peneidos y al cabo de este ocurre otra ingestión. Tales tratamientos se contrastaron por medio de comparaciones planeadas.

Resultados

La disolución media de los tratamientos diseñados con k-Carragenano (KAR) variaron de 14 a 77 %. El tratamiento CF3 presento 42% de

disolución media hasta los 60 minutos, seguido por CF2 y CF1. A los 90 minutos, la disolución media del tratamiento CF2 casi se duplicó (77 %), en tanto que el resto de los tratamientos se mantuvieron a niveles cercanos al 50 % de disolución. La disolución media del alimento nebulizado resultó diferente a las tres concentraciones de KAR así como en los sucesivos tiempos. Además cualquier diferencia en la disolución del AN entre los tiempos no es la misma bajo las tres concentraciones del polímero (Tabla II).

La disolución media de los tratamientos diseñados con Alginato de Calcio (ALGIN) variaron de 8 a 94 %. La menor tasa de disolución fué obtenida con el tratamiento AF7 (0.11 % min⁻¹) y la mayor con el tratamiento AF3 (0.84 % min⁻¹). La disolución media del alimento nebulizado resultó homogénea a las dos concentraciones del agente gelificante (CaCl₂) y a los dos pH probados (Tabla III). Las variables que tuvieron un efecto en la disolución media fueron la concentración de ALGIN y el tiempo (Tabla III). Se encontraron fuertes evidencias estadísticas que indican que el efecto de cualesquiera de los factores probados

Tabla II: Análisis de varianza factorial de medidas repetidas (Modelo I) del efecto de la concentración de k-Carragenano (A : 1, 2.5 y 5%), tiempo (B : 15, 30, 60, 90 min.) e interacciones sobre la disolución de sólidos del alimento nebulizado con KAR. Nombre individual de los tratamientos como en texto.

Fuente	g. l.	S. C.	C. M.	F	p
Entre A	6	329.48			
A	2	319.98	159.99	50.43	0.004
Error a	3	9.52	3.17		
Dentro de B	18	5407.91			
B	3	4568.91	1522.98	223.67	<0.001
AB	6	777.73	129.62	19.03	<0.001
Error b	9	61.27	6.80		
Contrastes a 60 min					
CF3 vs. CF1	1	55.72	55.72	4.17	0.13
CF3 vs. CF2	1	0.42	0.42	0.03	0.87
Error	3	40.09	13.36		
Contrastes a 90 min					
CF3 vs. CF1	1	12.71	12.71	7.06	0.07
CF3 vs. CF2	1	504.45	504.45	280.56	<0.001
Error	3	5.93	1.79		

Tabla III :Análisis de varianza factorial de medidas repetidas (Modelo I) del efecto de la concentración de la concentración del CaCl₂ como gelificador (A : 80 y 280 g), pH (B : 3 y 7), concentración de Alginato de Calcio (C : 2 y 4 g), tiempo (T : 15, 30, 60, 90 min.) e interacciones sobre la disolución de sólidos del alimento nebulizado con ALGIN.

Fuente	g. l.	S. C.	C. M.	F	p
Entre factores	15	19532.73			
A	1	20.28	20.28	0.50	0.49
B	1	46.29	3.17	1.15	0.31
C	1	13020.24	13020.24	323.53	<0.001
AB	1	3667.00	3667.00	86.14	<0.001
AC	1	481.86	481.86	11.97	0.008
BC	1	1238.78	1238.78	30.78	<0.001
ABC	1	1058.28	1058.28	26.29	<0.001
error d	8	321.92	40.24		
Dentro de tiempo	48	4298.32			
T	3	9103.32	3034.44	253.33	<0.001
AT	3	1249.41	416.47	34.77	<0.001
BT	3	140.01	46.67	3.89	0.021
CT	3	326.52	108.84	9.08	<0.001
ABT	3	445.05	148.35	12.38	<0.001
ACT	3	515.01	171.67	14.33	<0.001
BCT	3	850.59	283.53	23.67	<0.001
ABCT	3	229.14	76.38	6.37	0.002
Error e	24	287.28	11.97		
Contrastes a 60 min					
AF5 vs. AF1	1	11.02	11.02	0.46	0.51
AF5 vs. AF3	1	187.41	187.41	7.89	0.02
AF5 vs. AF7	1	497.73	497.73	20.93	0.001
error	8	190.22	23.78		

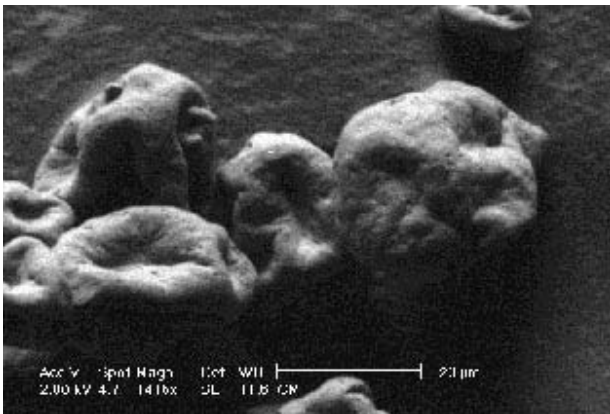
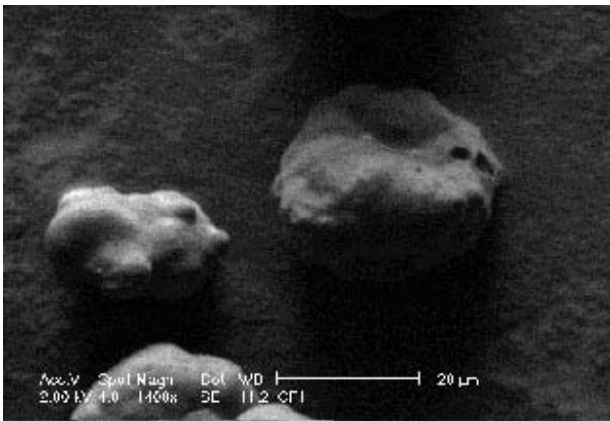
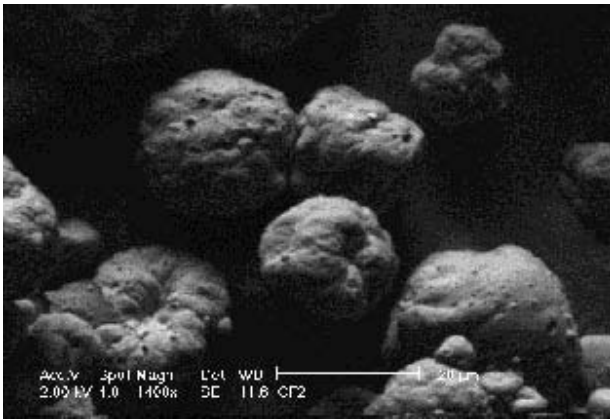


Figura 1. Microesferas nebulizadas conteniendo diferentes proporciones en base seca, de k-Carragenano. A: 1%, B: 2.5% y C:5%.

dependen de la presencia de un nivel particular de ellos mismos, si los tomamos como las interacciones de primer, segundo y tercer orden (Tabla III). Los tratamientos con mayor disolución (>50 %) a los 30 minutos fueron AF2, AF6, AF4 y AF8, por los cuales fueron excluidos de los análisis a posteriori. El resto de los tratamientos presentaron ese nivel de disolución después de

los 60 minutos, siendo el tratamiento AF5 el menos lavado durante los tiempos analizados, por lo que se consideró como el mejor obtenido.

Con las concentraciones de k-Carragenano (KAR) y Alginato empleadas en el proceso descrito, las microesferas producidas exhibieron la misma geometría externa de partículas esféricas con indentaciones algo profundas o dimples (Figura 1).

Las partículas presentaron una típica distribución log-normal con diámetros medios que variaron de 8.45 ± 10.35 mm a 27.28 ± 34.5 mm. El menor tamaño medio de partícula lo presentó el tratamiento CF3 seguido por AF5.

La composición proximal y contenido energético del alimento presento una mayor diferencia entre el perfil energético calculado y el obtenido despues del proceso de nebulización, sobre todo con los lípidos (2.58 vs 6.86) y carbohidratos (2.42 vs 3.77).

Discusión

El proceso de emulsificación, previo a la nebulización, estuvo determinada por la calidad de los macroingredientes, que de una u otra forma promovieron la adsorción de la molécula de proteína a la interfase aceite-agua (Magdassi y Vinetski, 1996). Estos macroingredientes fueron la pulpa de ostión, carne de atún y manto de calamar, de entre los cuales la vitelogenina y colageno fueron las proteínas recurrentes. Estas proteínas indirectamente demostraron tener una actividad superficial en términos de adsorción inicial y reducción de tensión superficial, que determinó la característica de la mezcla emulsificada y la formación de una pared alrededor de la dieta rindiendo microesferas dentro de una matriz de ficocoloide (Magdassi y Vinetski, 1996). Bajo este contexto, la disolución media de los alimentos nebulizados fue diferente en las tres concentraciones de k-Carragenano resultando menor a una concentración de 5 %. Esta concentración es usualmente empleada para aglutinar alimento microparticulado (Kanazawa, 1990) y esta basado en la capacidad de reactividad de la proteína. En el caso del Alginato, se encontró que la disolución media de sólidos es homogénea a las dos

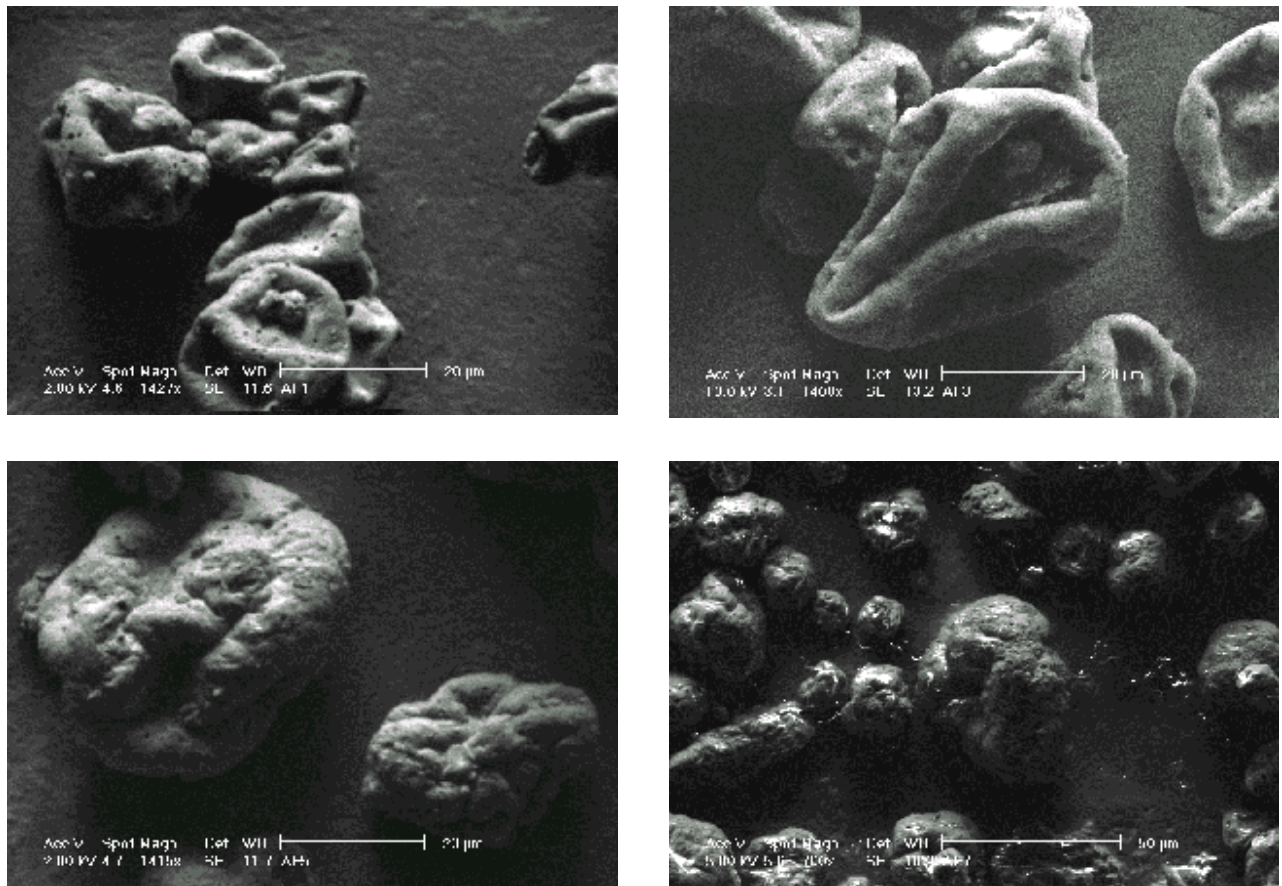


Figura 2. Microesferas nebulizadas a diferentes condiciones (Tabla II) empleando Alginato de Calcio como ligante y seleccionadas a partir de la disolución de sólidos. A: AF1, B: AF3, C: AF5, D:AF:7.

concentraciones de agente gelificante y a los dos pH probados. Lo anterior coincide con lo descrito por Heyraud *et al.*, 1990, pues el factor determinante en la gelificación es la concentración del ácido algínico, el cual incidió directamente en la formación de la matriz donde se incluyeron los macroingredientes. Por otro lado, el tiempo de exposición al agua de mar tiene un fuerte efecto en la disolución media ya que el Alginato absorbe agua rápidamente (Guist, 1990) y este produce un incremento en este parámetro como consecuencia de la fracturación y escisión de los caps y permeabilidad a través de los poro.

La morfología en general de todos los tratamientos analizados fue similar. La geometría externa recurrente fue de partículas esféricas con indentaciones poco profundas, propias de la nebulización (Rosemberg *et al.*, 1988). En la ma-

yoría de las microesferas existió la presencia de caps, escasa formación de poros y fracturas. Rosemberg *et al.* (1988), reportan que la formación de los dimples o indentaciones son el resultado de la pérdida de agua de las gotas deshidratadas en las primeras fases del proceso. La formación de estas estructuras esta ligada también a la aparición de caps, una característica recurrente en este estudio. Para estas, un enfriamiento lento pero con temperatura interna mayor pudo ser el proceso de formación, esto es, el calentamiento de gas o vapor atrapado dentro de la esfera es muy rápido y el crecimiento externo del cap es más rápido que el encogimiento debido a la pérdida de agua.

Con respecto al tamaño de partículas, Benoit *et al.* (1996) mencionan que la presión del aire comprimido, el diámetro interno del

atomizador, la viscosidad y la tasa de flujo de la solución a nebulizar producen una distribución gaussiana modispersa. En este estudio, todas esas condiciones se mantuvieron constantes, salvo la viscosidad. Por lo que este parámetro, así como la configuración en solución de los ficocoloides permiten explicar los resultados obtenidos. El peso molecular de los ficocoloides puede servir como una estimación de la viscosidad a través de la ecuación de Mark-Houwink, por lo que para KAR y ALGIN, se reporta el rango de 100 000 a 500 00 (Heyraud *et al.*, 1990), teniendo mayor viscosidad intrínseca el KAR. En el caso de KAR, no se empleó iones para producir la gelificación, pues se ha visto que este polielectrolito forma complejos proteinizados (Guist *et al.*, 1990). De esta forma, la conformación de KAR en solución es la de dímeros helicoidales que con temperaturas altas puede mantenerse. Así, en el proceso, el tratamiento con KAR pudo presentar menor viscosidad y facilitar la nebulización, produciendo partículas cercanas a 10 μ m. En el caso de ALGIN, la gelificación con CaCl_2 permitió la formación del llamado modelo de caja de huevos (Heyraud *et al.*, 1990). Estos geles de Alginato forman agregados voluminosos que aumentan la viscosidad y volumen. Como consecuencia este tipo de gelificación del Alginato pudo producir los tamaños de partículas más grandes.

El análisis proximal del alimento nebulizado produjo mayor proporción de proteínas, lípidos y carbohidratos que la fórmula basal, siendo más evidente para los segundos. Estos resultados son coherentes pues forman parte de la incertidumbre de las técnicas empleadas. El alimento obtenido presentó un adecuado nivel de energía derivada de las proteínas pues es similar al reportado para alimento artificial, artemia y suplementos alimenticios. Sin embargo, el nivel energético producido por los lípidos es muy inferior al referido para Artemia y microalgas, pero mayor para el alimento artificial comercial

Bibliografía

- Bengtson, D. A. 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. *J. World Aquacult. Soc.* 24(2):285-293.
- Benoit, J. P., H. Marchais, H. Rolland y V. Van-Valde, 1996. Biodegradable microspheres: Advances in production technology. En: S. Benita (Ed.). *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. Marcel Dekker Inc. Nueva York, USA. 35-62 p.
- Damon, R. A. y W. R. Harvey, 1987. *Experimental designs, ANOVA and regressions*. Harper and Row Pub. New York, N. Y. U. S. A. 508 p.
- Dziejack, J. D., 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology* 42:136-148
- Guist, G. G. 1990. Applications for seaweed hydrocolloids in prepared foods. En: I. Akatsuka (Ed.). *Introduction to Applied Phycol.* SPB Academic Pub. The Hague, The Netherlands. 391-400p.
- Heyraud, A., M. Rinaudo y C. Rochas., 1990. Physical and chemical properties of phycocolloids. En: I. Akatsuka (Ed.). *Introduction to Applied Phycol.* SPB Academic Pub. The Hague, The Netherlands. 151-176 p.
- Jones, D. A. 1998. Crustacean larval microparticulate diets. *Rev. in Fish. Sci.* 6(1-2):41-54.
- Jones, D. A., J. G. Munford y P. A. Gabbott., 1974. Microcapsules as artificial particles for aquatic filter feeders. *Nature* 247:233-235.
- Jones, D. A., A. Kanazawa y S. Abdel-Rahman., 1979. Studies on the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture* 17:33-43
- Jones, D. A., Bridson, P., Freeman, M., Latchford, J., Martínez-Palacios, C. A., Misciatelli, N., Ribeiro, F. A. L. T., Sirvas-Rowlands, S., y Simoes, F., 1997. Progress in the Use of Artificial Feeds in Penaeid Larval Cultures. *J. Mar. Biotechnology*. In press.
- Kanazawa, A., S. Teshima, H. Sasada y S. Abdel-Rahman., 1982. Culture of Prawn larvae with microparticulate diets. *Bull. of the Japanese Soc. of Sci. Fish.* 48(2): 195-199.
- Kanazawa, A., 1990. Microparticulate Feeds for Penaeid Larvae. *Aquacop-IFREMER. Actes de Coll.* 9:395-404

Magdassi, S. y Y. Vinetski, 1996. Microencapsulation of oil-in-water emulsions by proteins. En: S. Benita (Ed.). Microencapsulation: Methods and Industrial Applications. Marcel Dekker Inc. Nueva York, USA. 21-27 p.

Masters, K. 1985. Spray Drying Handbook. 4th. ed. John Wiley y Sons. New York, NY. USA.

Medina- Reyna, C.E. 1998. Diseño y Evaluación de un Alimento Nebulizado para la Larvicultura de Peneidos. Tesis de Maestria. CICESE. Ensenada B.C : México. 80 p.

Medina-Reyna C.E., Chávez-Sánchez M.C., Martínez-Palacios C.A. y Pedroza-Islas R. (En Prensa). Evaluation of a microband spray-dried feed for the rearing of penaeid shrimp larvae. N. Amer. J. Of Aquaculture. 62:73-77.

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.

Rosemberg, M., Y. Talmon, e I. J. Kopelman. 1988. The microstructure of spray-dried microcapsules. Food Microstructure 7:15-23.

Teshima, S., Kanazawa, A., y Koshio, S. 1993. Recent Developments in the Nutrition and Microparticulate Diets of Larval Prawns. The Israeli J. of Aquaculture 45(4):175-184.

Villamar D.F. y C.I. Langdon, 1993. Delivery of dietary components to larval shrimps (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. Mar. Biol. 115:635-642.