



TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
CIENCIAS DEL MAR**

Artemia como vehículo de sustancias bioactivas/antibióticos en acuicultura: encapsulación mediante nanopartículas de zeína.

Myriam Lizanda Piqueras

Inmaculada Varó Vaello. Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS-CSIC), Ribera de Cabanes (Castellón).

M^a José Fabra Rovira. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Paterna (Valencia).

Pablo José Sanchis Benlloch. Universidad Católica de Valencia (UCV), Valencia.

Curso académico 2018/19



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a la Universidad Católica de Valencia (UCV) por permitirme disfrutar de esta carrera tan maravillosa y todo lo aprendido en ella. En segundo lugar, al Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS-CSIC) que en colaboración con la UCV me han permitido realizar un proyecto muy interesante, por ello al IATS le tengo que agradecer la oportunidad que me ha brindado de realizar allí las prácticas, así como a todas las personas que me han ayudado durante mi estancia en dicho centro.

También quería agradecer al equipo de trabajo de Julio Polaina del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC) por permitirme realizar parte de mi proyecto en sus instalaciones y por todas las facilidades otorgadas, en especial a David Talens por su guía y dirección en el desarrollo del antibiograma, así como de las imágenes de los nauplios expuestos a las nanopartículas de zeína.

Agradecer a mi tutor de TFG Pablo José Sanchís, por aconsejarme y supervisarme durante el desarrollo del trabajo.

A una de mis tutoras, M^a José Fabra (IATA), por su orientación en el desarrollo de las nanopartículas de zeína, además de su guía y supervisión en el proyecto.

Pero sobre todo, me gustaría agradecer a Inma Varó, por su tiempo, por la paciencia y dedicación que ha tenido conmigo, por guiarme y ayudarme a cumplir el objetivo del trabajo, no podía haber tenido una tutora mejor.

Me gustaría agradecer a mis compañeros de clase, Jone, Isabel, Belén, Alberto, Antonio, Sara y Esther, por ayudarme en todo momento, por soportar mis agobios con los exámenes y trabajos, por ser los mejores amigos que he podido encontrar.

Finalmente, quería agradecer a mi familia, en especial a mis padres y a mi novio, por ser incondicionales, por aconsejarme y tranquilizarme, y sobre todo aguantar mis situaciones de estrés constante durante esta etapa, porque siempre estuvieron pendiente cuando los necesité.

GRACIAS A TODOS POR TANTO.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. <i>Artemia</i> en acuicultura	3
1.2. Biología y ecología de <i>Artemia</i>	5
1.3. Sistema digestivo. Mecanismo de alimentación.....	7
1.4. Nuevos sistemas de encapsulación.....	9
1.5. Nanopartículas de zeína.....	12
1.5.1. Bioencapsulación de antibióticos: ej. cloranfenicol	15
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1. Preparación de las nanopartículas de zeína	17
3.2. Obtención de nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	18
3.3. Crecimiento	19
3.4. Exposición de nauplios a las nanopartículas de zeína	20
3.5. Antibiograma	21
3.6. Análisis estadístico	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Nanopartículas de zeína	23
4.2. Crecimiento	25
4.3. Exposición de nauplios a las nanopartículas de zeína	26
4.4. Antibiograma	31
5. DISCUSIÓN.....	35
6. CONCLUSIONES.....	37
7. LÍNEAS FUTURAS.....	38
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

Los nauplios de *Artemia* son el alimento vivo más utilizado en larvicultura, a pesar de que su contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga es insuficiente para cubrir las necesidades nutricionales de las larvas de peces y crustáceos. Estas deficiencias se han abordado mediante la vehiculación de dichos compuestos y otras sustancias (antibióticos y bioactivos) mediante los nauplios.

El objetivo principal de este trabajo ha sido explorar el empleo de nanopartículas de zeína (NPZ) como sistema de encapsulación de antibióticos y bioactivos para su explotación en larvicultura.

En el presente estudio se expusieron nauplios de *Artemia franciscana* de 24h de edad a NPZ con curcumina, β -caroteno y cloranfenicol, frente a dos controles: NPZ vacías, para comprobar el efecto del antibiótico, y nauplios alimentados con microalgas, para verificar el tiempo de entrada y llenado del tracto digestivo, realizándose muestreos a diferentes tiempos (30, 60, 120 min). Previamente los nauplios recién eclosionados se cultivaron a 25°C, con aireación y fotoperiodo continuo, y alimentados con microalgas.

Los resultados del estudio mostraron que las NPZ fueron ingeridas por los nauplios y no afectaron a su talla tras 2h de exposición. Las NPZ con cloranfenicol provocaron un retraso del crecimiento bacteriano, demostrando el efecto del antibiótico, y verificando la efectividad de su encapsulación al mantenerse activo en el interior del tracto digestivo de los nauplios. Estos resultados revelan la efectividad de las NPZ para la encapsulación de antibióticos y sustancias bioactivas y su vehiculación mediante nauplios de *Artemia* para su aplicación en larvicultura.

Palabras clave: *Artemia franciscana*, nauplios, nanopartículas de zeína, encapsulación, cloranfenicol, bioactivos.

ABSTRACT

Nowadays, *Artemia* nauplii are the live food most used in larviculture, although their content of long-chain polyunsaturated fatty acids is insufficient to cover all the nutritional requirements of larval fish and crustaceans. These deficiencies have been addressed through the vehiculation of said compounds and other substances (antibiotics and bioactives) through the nauplii.

The main objective of this work has been to explore the use of zein nanoparticles (NPZ) as an encapsulation system for bioactive and antibiotics to their exploitation in larviculture.

In the present study, nauplii of *Artemia franciscana* of 24h of age were exposed to NPZ with curcumin, β -carotene and chloramphenicol, against two controls: empty NPZ, to prove the effect of the antibiotic, and nauplii fed with microalgae, to verify the time of entry and filling of the digestive tract, taking samples at different times (30, 60, 120 min). Previously, the newly hatched nauplii were cultivated at 25°C, with aeration and continuous photoperiod and they have been fed with microalgae.

The results showed that the NPZ were ingested by the nauplii and they didn't affect its size after two hours of exposure. The NPZ with chloramphenicol caused a delay of the bacterial growth, proving the effect of the antibiotic and verifying the effectiveness of its encapsulation to remain active inside the digestive tract of the nauplii. These results reveal the effectiveness of the NPZ for the encapsulation of antibiotics and bioactive substances and their vehiculation by *Artemia* nauplii for its application in larviculture.

Keywords: *Artemia franciscana*, nauplii, zein nanoparticles, encapsulation, chloramphenicol, bioactive.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Artemia* en acuicultura

La acuicultura ha mejorado las técnicas de cultivo en los últimos años, permitiendo el manejo de cantidades mayores de organismos en espacios reducidos, y provocando un aumento del rendimiento de producción (Alderman, 1988; Mejía *et al.*, 2007).

En el medio natural las fases larvarias se alimentan de organismos planctónicos (fitoplancton y zooplancton) que forman una red trófica muy diversa y compleja. Para obtener dicho plancton del medio natural se ha practicado su captura, lo que produce una serie de problemas, ya que tanto el rendimiento productivo para satisfacer el gran número de presas vivas que se necesitan, como la comodidad y disponibilidad del manejo del recurso, son insuficientes (Stottrup, 2000). Debido a esto, se ha tendido a reproducir la cadena trófica de forma artificial, consiguiendo una simplificación al usar especies de plancton fácilmente manipulables y cultivables, las cuales presentan cualidades nutricionales aptas para el crecimiento y supervivencia de las larvas.

La cadena trófica artificial está formada por tres eslabones, el primero de ellos está constituido por las microalgas que presentan un tamaño entre 5 y 20 micras y, en ocasiones, se emplean como alimento directo para larvas de especies fitófagas (ej. *Cetorhinus maximus*); el segundo eslabón está formado por rotíferos mixohalinos, generalmente, del género *Brachionus* (*Brachionus plicatilis*), que se caracteriza por tener un tamaño pequeño (80-250 μm), tasa reproductiva alta (>300 ind/hembra) y fácil manejo con tamaño adecuado para su ingestión por las larvas; y el tercer y último eslabón está formado, exclusivamente, por las larvas o nauplios de los crustáceos branquiópodos del género *Artemia* (Theilacker y McMaster, 1971; Bernabé, 1973; Bernabé y René, 1973; Ruíz, 2008).

Los nauplios de *Artemia* son el alimento vivo más utilizado a nivel mundial para la cría de especies cultivables (Bengtson *et al.*, 1991) por dos motivos: por el elevado número de especies a las que alimenta y por la rapidez y facilidad con la que se obtienen sus nauplios, lo que hace que sea un alimento hasta la fecha insustituible en larvicultura (Kinne 1977; Léger, 1986). Además, este crustáceo se utiliza como organismo modelo en estudios fisiológicos, toxicológicos y ecológicos (Petrucci *et al.*, 1995; Shields, 2001; Sorgeloos *et al.*, 2001). Las características que hacen que los nauplios de *Artemia* sean un alimento tan bueno para las larvas son: cutícula externa fina, lo que asegura una digestibilidad buena, color llamativo, movimiento constante, tamaño óptimo (400-600 μm), respuesta de escape ausente y buena palatabilidad. Además, presentan un elevado contenido en proteínas (50-60%), ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos (Llosa, 2007), lo que hace que siga siendo la elección

preferible frente a microcápsulas o macropartículas inertes presentes en el mercado, a las cuales parece que muestran una aceptabilidad baja (Monroig, 2007; Medina, 2012).

La utilización de *Artemia*, como alimento en acuicultura comenzó en el año 1930, sin embargo, hasta 1950 no aparecieron los primeros lotes de quistes en el mercado, procedentes de las salinas del *Great Salt Lake* (GSL) y de la bahía de San Francisco (Bengtson *et al.*, 1991; Ruíz, 2008). Desde 1970 en adelante, se ha producido la globalización de la acuicultura y como consecuencia de ello ha habido un aumento en la demanda de quistes, de tal forma, que se han alcanzado las 2000 Tm/año, es decir, el 40% de la totalidad del alimento que requieren las larvas a nivel mundial en la actualidad (Sorgeloos *et al.*, 2001). El principal proveedor de quistes mundial ha sido el Gran Lago Salado (GLS), generando una cosecha de 4000 Tm/año de producto húmedo bruto, de los cuales 1200 Tm/año son quistes procesados. Dicha productividad ha sufrido grandes cambios debido, tanto a las cosechas irregulares, al aumento de la demanda en larvicultura y a la explotación de dicho recurso de forma insostenible, como a impactos antropogénicos y alteraciones meteorológicas sobre los ecosistemas productores, lo que ha generado una escasa disponibilidad de quistes (Sorgeloos *et al.*, 2001).

Las soluciones planteadas para dicho problema han sido, en primer lugar, la investigación de este recurso natural a nivel mundial, encontrándose en Rusia y China, principalmente (Lavens y Sorgeloos, 2000; Sorgeloos *et al.*, 2001), y en los lagos salados de Asia (Van Stappen, 2007) y en América del Sur (Cohen *et al.*, 1998) ecosistemas que permiten la explotación de quistes a nivel comercial; y en segundo lugar, al perfeccionamiento de la gestión de la explotación de los biotopos conocidos, así como, de los sistemas de procesado de los mismos (Medina, 2012).

Otro de los factores que limita el uso de nauplios del género *Artemia*, como presa viva en acuicultura, es el contenido en ácidos grasos poliinsaturados esenciales, ya que los crustáceos y peces, de ecosistemas marinos, cubren sus necesidades con el ácido linolénico (18:3n-3 o LNA), linoleico (18:2n-6 o LA), docosahexaenoico (22:6n-3 o DHA) y eicosapentaenoico (20:5n-3 o EPA). Sin embargo, los nauplios carecen de DHA en su composición lipídica, además de que el EPA está ausente o su contenido es variable (Léger *et al.*, 1986; Navarro, 1990; Navarro *et al.*, 1992). Estas deficiencias nutritivas han sido solucionadas mediante técnicas de enriquecimiento, basadas en la vehiculación de las sustancias ricas principalmente en EPA y DHA mediante las presas vivas (Kashiwakura *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 2003; Tlusty *et al.*, 2005; Monroig *et al.*, 2003, 2006). La metodología más empleada es el uso de las emulsiones con alto niveles de DHA y EPA, las cuales forman micelas en el agua que son ingeridas por los nauplios (Watanabe *et al.*, 1982; Léger *et al.*, 1987), actuando éstos como vehículo de las mismas, proceso conocido como bioencapsulación.

1.2. Biología y ecología de *Artemia*

El género *Artemia* se engloba en el grupo de crustáceos branquiópodos anostráceos, siendo uno de los taxones más antiguos conocidos en la actualidad, procedente del Cretácico inferior (más de 100 millones de años) (Fryer, 1987; Varó, 2015).

Son organismos que se caracterizan por poseer un cuerpo alargado y delgado, claramente segmentado, cubierto por una cutícula fina y flexible de quitina, que se renueva mediante un proceso de muda, permitiendo de esta forma, el crecimiento del organismo (Amat, 1985a; Varó, 2015). Además, su aspecto y tamaño puede ser muy variable, dependiendo de las condiciones abióticas del medio, así como de la cepa o especie, aunque suele estar comprendido entre los 10 y 12 mm. Presenta un color anaranjado, el cual puede variar a rojizo cuando se encuentra en aguas de elevada salinidad (Amat, 1985a).

Anatómicamente, posee tres partes diferenciables: cabeza, tórax y abdomen. En primer lugar, la cabeza, formada por cinco segmentos fusionados, y en cuya zona frontal posee el ojo naupliar compuesto por tres ocelos, presentando a ambos lados los ojos compuestos los cuales están provistos de pedúnculos, más largos en machos que en hembras (Bowen *et al.*, 1978), y cerca de cuya base nacen las anténulas en posición dorsal y las antenas en posición ventral, formadas por el exopodito y el protopodito, y están dotadas de un dimorfismo sexual. En las hembras las antenas adoptan una forma filiforme y sencilla con dos botones sensoriales en el protopodito, mientras que en los machos están hipertrofiadas en apéndices prensiles, principalmente en la porción del exopodito, adecuadas para agarrar a la hembra por la parte anterior de la bolsa ovígera u ovisaco (posición conocida como “riding horse”) en el momento previo a la cópula y fertilización (Heath, 1924). En segundo lugar, el tórax, formado por once segmentos, cada uno de los cuales está dotado de un par de apéndices en forma de hoja, es decir, aplanados y foliáceos, con una branquia y sin caparazón rígido, conocidos como toracópodos o filópodos, con morfología idéntica, pero longitud variable, y cuya función es respiratoria, filtradora y locomotora (Ruiz, 2008; Varó, 2015). Estos apéndices poseen dos formaciones, los endopoditos, que son formaciones foliáceas de finas y largas sedas, y cuya función es natatoria; y los exopoditos que son sacos con un tegumento muy delgado, actuando a modo de branquias (Croghan, 1958). En tercer y último lugar se encuentra el abdomen, el cual posee ocho segmentos ápodos, seis de ellos son los abdominales acabando con el telson y constituidos por la furca caudal, mientras que los dos restantes son los segmentos genitales, que son más voluminosos y se hipertrofian en su parte ventral, formando así los respectivos aparatos sexuales, en hembras conocido como bolsa ovígera u ovisaco y en machos como vesícula seminal o pene (Amat, 1985a).

Uno de los aspectos más importantes a destacar en el género *Artemia* es su reproducción, ya que hay dos tipos: la bisexual, también conocida como zigogenética o anfigónica, con presencia de hembras y machos, y la partenogenética, que suele ser telitoca, es decir, progenie femenina. En ambos casos, se dan lugar a dos tipos de huevos, unos son los que se desarrollan embrionariamente en el útero de la hembra, siendo el resultado el nacimiento directo en forma de nauplios (reproducción ovovivípara); y el otro tipo es aquel que cesa su desarrollo al alcanzar el estado de gástrula incipiente o blástula avanzada, cubriéndose con una estructura conocida como corion, procedente de las glándulas de la cáscara, siendo expulsados por la hembra en forma de quistes (reproducción ovípara), asegurando una protección frente a condiciones ambientales desfavorables. Se diferencian dos tipos de quistes, unos que dan lugar a una eclosión subitánea e inmediata, con nacimiento de nauplios poco tiempo después de ser expulsados al medio; y el otro tipo es aquel que está en estado de diapausa o criptobiosis (estado de vida suspendida) y requieren de una activación de la misma para que se produzca la eclosión y nacimiento del nauplio (Mathias, 1932; Lochhead, 1941; Dutrieu, 1960).

El género *Artemia* está distribuido por todo el planeta, a excepción de la Antártida, ocupando, exclusivamente, ambientes acuáticos hipersalinos, los cuales destacan por la presencia limitada de predadores y por la escasa biodiversidad (Ruiz, 2008). El factor abiótico más importante en estos ecosistemas es la salinidad, la cual condiciona su reproducción, su desarrollo y la dinámica de sus poblaciones, pero debido a que son capaces de autorregular su presión osmótica, soportan niveles de salinidad muy elevados (> 220 ppm), encontrándose en ambientes con salinidades entre 3g/L y 370 g/L (Van Stappen, 2002). Otros dos factores a los que se tiene que enfrentar este género son la temperatura y el oxígeno; en cuanto al primero, los umbrales máximo y mínimo de supervivencia suele estar entre 5-35°C, variando según la población y especie; en cuanto al segundo factor, los ecosistemas hipersalinos se caracterizan por una baja disponibilidad de oxígeno, presentando situaciones de hipoxia ($< 2\text{ml O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) y anoxia (Vos *et al.*, 1979; Decler *et al.*, 1980). Sin embargo, estas condiciones de hipoxia y anoxia no les afecta debido a que son capaces de absorber el poco oxígeno disponible en el agua, gracias a que responden con un aumento en la cantidad de hemoglobina, principalmente la del tipo Hb-III, que se caracteriza por una altísima afinidad por el oxígeno (Vos *et al.* 1979).

1.3. Sistema digestivo. Mecanismo de alimentación

Artemia es un organismo filtrador fagótrofo continuo, no selectivo y obligado (Evjemo y Olsen, 1999; Provasoli y Shiraishi, 1959; Reeve, 1963; D'Agostino, 1980), cuya alimentación está basada en algas unicelulares (*Dunaliella viridis*, *D. salina*), bacterias (*Halococcus*, *Halobacterium*), detritos presentes en el medio divididos de forma fina y pequeños protozoos (Amat, 1985a).

Estos organismos presentan un tracto digestivo con estructura tubular en forma de gancho y cuyo revestimiento epitelial está formado por una única capa de células. Está compuesto por tres partes principales (figura 1): el intestino proximal o anterior ("foregut") y el intestino distal, caudal o posterior ("hindgut") que presentan características apropiadas para funciones principalmente mecánicas, y cuyos enterocitos están recubiertos por una delgada cutícula y estructura cuboidal, con pequeñas cantidades de orgánulos citoplasmáticos; y el intestino medio ("midgut") que muestra características de almacenamiento, secreción y absorción, y cuyos enterocitos presentan un retículo endoplasmático bien desarrollado y numerosas mitocondrias, estando recubiertos por unas microvellosidades de epitelio cuboidal simple y por las células epiteliales columnares simples, formando una estructura conocida como borde en cepillo. El intestino medio y el posterior están alineados, mientras que el anterior es un tubo con forma de gancho, cuya parte más larga es paralela al medio y la más corta es perpendicular a este. Asimismo, el intestino posterior y anterior son más cortos y con un diámetro menor en comparación con el medio. Además, en la parte anterior del intestino medio se pueden encontrar dos protuberancias globulares laterales, conocidas como ceca gástrica o hepatopancreática (figura 1). Hay que destacar que los tres segmentos se encuentran suspendidos de forma libre en la hemolinfa (Gunasekara *et al.*, 2011).

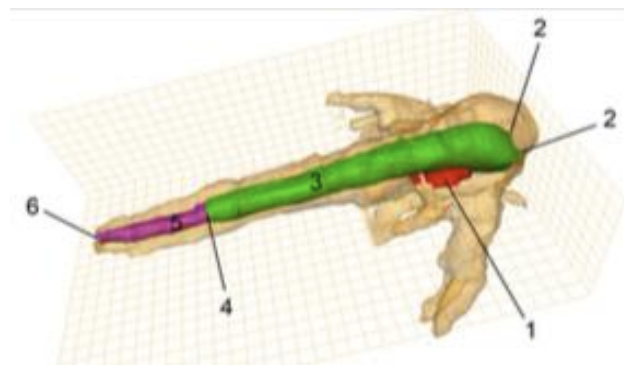


Fig. 1. Características morfológicas del tracto digestivo del nauplio de *Artemia franciscana*. 1: Foregut; 2: Ceca gástrica; 3: Midgut; 4: Transición midgut–hindgut; 5: Hindgut; 6: Apertura anal (Gunasekara *et al.*, 2011).

Los nauplios recién eclosionados (Instar I) se alimentan de sus reservas vitelinas que están acumuladas en el órgano nupal. Una vez que se encuentran en la segunda fase larvaria (Instar II) se alimentan mediante una actividad filtradora constante y coordinada, con ayuda de las segundas antenas (Heath, 1924; Barlow y Sleight, 1980), hasta que desarrollan los telopoditos de los toracópodos (Schrehardt, 1987), de tal forma que el par de apéndices empieza su movimiento cuando el anterior ha realizado $\frac{1}{6}$ del suyo (Cannon, 1928; Vollmer, 1952; Amat, 1985a), momento en el que las partículas retenidas en ellos, son arrastradas debido a las corrientes opuestas, generadas por el aumento y disminución del espacio entre pares de apéndices adyacentes hacia el atrio bucal y por el labro, el cual las agrupa mediante una secreción viscosa que él mismo segrega. Una vez que pasan por las maxilas y mandíbulas (aparato masticador poco efectivo), entran en el intestino proximal hacia el par de divertículos globulares, llegando de esta forma al intestino medio donde sufren la acción de los enzimas digestivos. Finalmente, el alimento llega al intestino posterior, donde mediante unos movimientos de contracción, los restos se eliminan por el ano en forma alargada y con una coloración dependiente de la abundancia y naturaleza del alimento ingerido (Amat, 1985a).

La capacidad de adaptación de los organismos con una alimentación por filtración se determina a partir de la energía mínima consumida durante la ingesta, que se expresa como: la tasa de respiración (R) (tasa de ingestión = tasa de filtración (F)* concentración de alimento en el medio). La relación F/R (tasa de filtración (F) y tasa de respiración (R)) que expresa la cantidad de agua filtrada por unidad de oxígeno consumido, y se utiliza para caracterizar la adaptación a la alimentación por filtración. En *Artemia*, a 25°C la relación F/R es de 7.4 L de agua filtrada por ml de O₂ consumido mientras que en invertebrados marinos que se alimentan por filtración de manera obligada presentan una la relación mayor (F/R > 10 L, Riisgård y Larsen, 2000), indicando una menor adaptación para alimentarse y competir por el alimento en medios típicamente marinos con crustáceos marinos filtradores (Riisgård *et al.*, 2015).

Artemia presenta una tasa de asimilación que varía dependiendo de las diferentes concentraciones de alimentos, lo que está relacionado con la digestibilidad y con un tiempo variable en atravesar el intestino (Porter 1973, 1975). En ambos casos, siendo la digestibilidad alta o baja, la concentración de alimento tiene efecto sobre la tasa de asimilación y la ingesta (Coutteau, 1992). El tiempo necesario que *Artemia* requiere para reemplazar completamente el contenido intestinal son 30 minutos, independientemente del tamaño del individuo y del alimento (Nimura, 1989). Esto permite su empleo como vehículos de compuestos nutricionales, especialmente en las primeras fases de desarrollo (nauplios y metanauplios), durante la cría larvaria de organismos.

La selección del tamaño del alimento puede determinarse mediante las diferencias en la tasa de eliminación de las partículas en función de su tamaño (Makridis y Vadstein, 1999). La distancia intersetular se utiliza como indicador del tamaño mínimo que debe tener el alimento para organismos filtradores (ej, cladóceros, Marshall, 1973). Los organismos del género *Artemia* son capaces de filtrar la materia particulada que esté en suspensión en el medio acuático en el que se encuentren (Reeve, 1963), presentando preferencia por alimentos de tamaño específico (ej. *Dunaliella sp.* (8–12 μm) y *Chlamydomonas sp.* (4-7 μm), cianobacterias cocoides (1–2 μm), diatomeas céntricas y penadas (20–40 μm)) (Mason, 1967; Stephens y Gillespie, 1976; Wurtsbaugh y Berry, 1990; Wurtsbaugh, 1992), oscilando entre 6.8 y 27.5 μm , con un óptimo de 16.0 μm según el estudio de Fernández (2001).

1.4. Nuevos sistemas de encapsulación

Artemia presenta unas características de alimentación que permiten manipular su composición bioquímica según las necesidades nutricionales de las larvas, lo que ha dado lugar al desarrollo de técnicas de enriquecimiento en acuicultura (Gelabert, 2003).

Las técnicas de enriquecimiento con nauplios de *Artemia* varían en función de las condiciones ambientales (pH, salinidad y temperatura) y del tiempo de enriquecimiento (Dhont *et al.*, 1991; Mejía *et al.*, 2007). El principal método es la encapsulación, que consiste en sistemas coloidales de liberación que presentan dos fases: la primera está dividida en partículas pequeñas, constituyendo la fase dispersa; y la segunda es la fase dispersante, formada por las sustancias que rodean a la otra formando la matriz. Se clasifican en tres tipos: dispersiones de moléculas autoensambladas, dispersiones de líquidos en líquidos, y dispersiones de sólidos en líquidos (Patel y Velikov, 2011). Estos sistemas de liberación coloidal, para ser utilizados en alimentación, tienen que ser compatibles con la matriz, sin cambiar sus características originales (textura, sabor, estabilidad y apariencia), garantizando la actividad y estabilidad del agente durante su procesado y almacenamiento, sin ser fácilmente degradados por el pH, el oxígeno, la temperatura y luz (Shin, Kim y Park, 2015).

La encapsulación presenta dos ventajas, la primera de ellas es que evitan la percepción sensorial, permitiendo el enriquecimiento con productos bioactivos sin tener efecto sobre las propiedades organolépticas del producto original; y la segunda es que a través de distintos mecanismos (mejora de la absorción y transporte, incremento de la estabilidad en la digestión y perfección de la solubilidad en el intestino) se aumenta la biodisponibilidad del bioactivo (Livney, 2015).

Los principales tipos de sistemas de liberación coloidal (figuras 2 y 3) empleados son: **1)** las micelas que son agrupaciones de moléculas anfipáticas producidas a una concentración

micelar crítica, presentando un tamaño pequeño (< 10 nm), limitada solubilidad y una estabilidad coloidal y termodinámica. **2)** Los liposomas, cuya estructura consta de una vesícula que se encuentra rodeando un núcleo acuoso y que está compuesta mediante una o más bicapas lipídicas, formada principalmente por fosfolípidos. A pesar de que tiene limitaciones en cuanto a alto coste, estabilidad baja a pH ácido y eficiencia de encapsulación insuficiente, son empleados como portadores por presentar dominios tanto hidrófobos como hidrófilos, ya que de esta forma puede portar moléculas de ambas naturalezas. **3)** Las emulsiones, que son sistemas de dispersión termodinámicamente inestables (estabilizados usando moléculas de superficie activa) y que están compuestas por dos líquidos inmiscibles. Presentan tamaños variables de decenas de nanómetros a milímetros, dependiendo de las gotas que las forman, y son adecuadas para la solubilización de activos lipofílicos (Fang 2010; Patel y Velikov 2011; Livney 2015; Shin, Kim y Park 2015; Katouzian y Mahdi 2016). Existe una amplia gama de emulsiones con bases en aceites de algas, pescado o derivados de estos, ricos en ácidos grasos poliinsaturados como DHA, ARA y EPA (Selco excelente (INVE), DHA Selco (INVE), Superartemia (Catvis)). Además, pueden incorporarse pigmentos y vitaminas solubles en lípidos (vit A y vit E) (Ando *et al.*, 2003). Por último, **4)** las nanopartículas (figura 3), que poseen una estructura estable, uniformidad y una alta relación superficie-volumen (Kim *et al.*, 2011). Hay dos tipos: en primer lugar, las lipídicas-sólidas que son similares a las emulsiones, pero en este caso el lípido se encuentra total o parcialmente cristalizado a temperatura ambiente. Presentan ventajas en cuanto a buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y estabilidad, pero muestran una eficiencia baja de encapsulación cuando el compuesto a encapsular es poco soluble en el lípido (Fang 2010; Patel y Velikov 2011; Livney 2015; Shin, Kim, y Park 2015; Katouzian y Mahdi 2016). Y en segundo lugar las poliméricas, son dispersiones particuladas con un tamaño entre 10 y 100 nm, diseñadas a partir de polímeros. El término nanopartícula engloba a las nanoesferas que son sistemas matriciales cuyo activo está incrustado uniformemente en la matriz polimérica, y las nanocápsulas que son sistemas vesiculares cuyo principio activo se encuentra confinado en un núcleo o cavidad líquida, cubierta por una membrana polimérica. Estas presentan una ventaja frente a las nanoesferas, y es que poseen una eficiencia de encapsulación mayor y un contenido polimérico menor (Teixeira *et al.*, 2012).

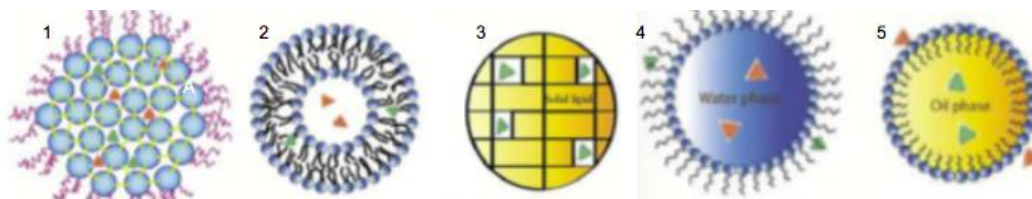


Fig. 2. Tipos de nanoformulaciones. 1: micela; 2: liposoma; 3: nanopartícula sólida lipídica; 4: emulsión W/O; 5: emulsión O/W (Katouzian y Mahdi, 2016).



Fig. 3. Tipos de nanopartículas. 1: nanocápsulas; 2: nanoesferas (Kim *et al.*, 2011).

La técnica de enriquecimiento más utilizada en *Artemia* es la bioencapsulación, que consiste en la exposición de los nauplios a un medio con una emulsión que contenga la sustancia enriquecedora, de esta forma los nauplios se cubren y alimentan de dicha emulsión, actuando como vehículos (Leger *et al.*, 1986; Lèger *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1982). Los niveles de enriquecimiento son mejores cuando las emulsiones son más concentradas (Mejía *et al.*, 2007). Las sustancias enriquecedoras también se pueden encapsular en un núcleo formado por un material que la protege del entorno, permitiendo su liberación en condiciones controladas y facilitando la absorción a través del intestino de los organismos durante su alimentación (Zeng *et al.*, 2019).

La técnica de encapsulación consta de dos procesos: un proceso químico, ya que se realiza en un medio líquido con el fin de desarrollar una fase de separación; y un proceso físico, debido al uso del material de cobertura que es retenido tras la formación de la cápsula (Anaya *et al.*, 1995).

La mayoría de los trabajos de enriquecimiento de nauplios y metanauplios de *Artemia* se han centrado en la encapsulación directa (bioencapsulación) de carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados (Nordeng y Bratland, 1971; Watanabe *et al.*, 1980; Leger *et al.*, 1986; Leger *et al.*, 1987; Watanabe, 1991); pero también hay algunos estudios que evalúan la bioencapsulación de otros compuestos como los antibióticos (Mohny *et al.*, 1990; Nelis *et al.*, 1991; Chair *et al.*, 1995; Chair *et al.*, 1996; Gapasin *et al.*, 1996; Touraki *et al.*, 1999; Majack *et al.*, 2000).

Estas técnicas se han aplicado de manera extensa en acuicultura de peces y crustáceos (figura 4), con el objetivo de obtener una mejora en cuanto al color, salud y valor nutritivo de las presas vivas (Gelabert, 2003). Además, de esta forma se evita la pérdida de las sustancias hidrosolubles en el medio, asegurando la dosis adecuada para cada especie y acorde con su fase de desarrollo (Léger *et al.*, 1986; Castro *et al.*, 2003). Por ello, la naturaleza de la sustancia o compuesto encapsulado varía en función de los requerimientos nutricionales de la especie a la que va dirigida (Chérel y Nin, 1991; Gelabert *et al.*, 1996).

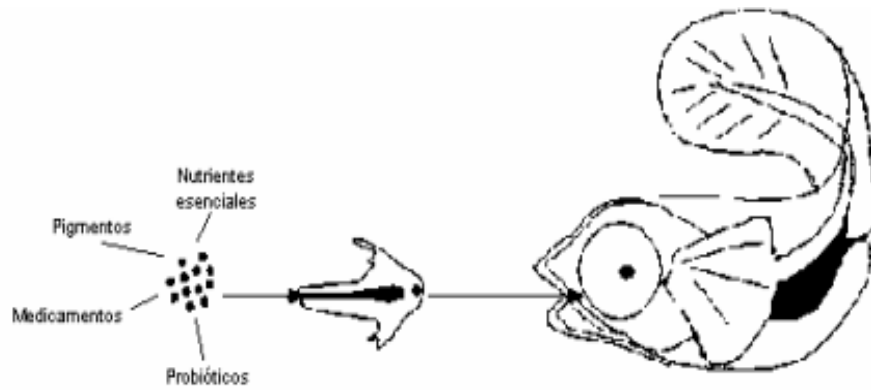


Fig. 4. Uso de *Artemia* como vehículo de diferentes sustancias para larvas de peces en cultivo (Léger *et al.*, 1986).

1.5. Nanopartículas de zeína

La zeína es la principal proteína de reserva del maíz y es una combinación de péptidos de diversos pesos moleculares, carga y solubilidad. Consta de cuatro fracciones α -, β -, γ - y δ -zeína (Hudson, 1997; Guo, Liu, An, Li y Hu, 2005), siendo la α y β las mayoritarias, aunque la α es la más abundante en el mercado ya que es la prolamina del maíz (19-22 kDa) (Parris, Dickey, Tomasula, Coffin, y Vergano, 2001) representando el 70-85% de la totalidad de la prolamina de este, mientras que la β no se comercia por su baja estabilidad (Shukla y Cheryan, 2001). Ambos tipos de zeína son poco solubles en agua, debido al alto contenido en aminoácidos sin carga (Paliwal y Palakurthi, 2014), pero poseen una alta solubilidad en etanol (α : etanol de 70-95%; β : etanol 60%), acetona y soluciones alcalinas acuosas (pH \geq 11.5) (Hudson, 1997; Shukla y Cheryan, 2001; Kasaai, 2018).

La zeína, estructuralmente, carece de aminoácidos básicos o ácidos (como lisina), pero consta de una cantidad significativa de aminoácidos con residuos no polares (>50% de su contenido) como alanina (10%), prolina (10%) y leucina (20%), por ello es una proteína hidrofóbica (Shukla y Cheryan, 2001; Wang y Padua, 2012; Esquivel, 2013; Patel y Velikow, 2014; Kasaai, 2018). Presenta un núcleo hidrofóbico (carácter anfipático), el cual actúa como barrera acuosa, y una película dura y quebradiza que lo recubre (Cug, Gonlard y Guilbert, 1998; Padua y Wang, 2009; Reza, 2018), siendo de esta forma, un candidato ideal para la síntesis de polímeros (Patel y Velikow, 2014; Chuacharoen y Sabliov, 2016). Posee las propiedades y ventajas de ser biodegradable, biocompatible y de bajo coste, lo que le da una alta viabilidad comercial; es insoluble al agua, permitiendo la formación de partículas por precipitación y, además, es mejor para sistemas de liberación controlada y para encapsular compuestos (hidrofóbicos e hidrofílicos) con actividad antioxidante y/o antimicrobiana, protegiéndolos así frente a la degradación (Shukla y Cheryan, 2001). La zeína es abundante y de origen natural, y ha sido clasificada como *Generally Recognized as Safe* (GRAS), ya que

es segura y no tóxica. Se caracteriza por ser resistente a enzimas, permitiendo la liberación de sustancias funcionales (fármacos, micronutrientes, aceites esenciales) encapsuladas en partículas de zeína, tanto en el área alimentaria como farmacéutica (Parris, 2005; Hurtado-López, 2006; Luo *et al.*, 2010; Patel, 2010; Luo *et al.*, 2011, 2012, 2013; Esquivel, 2013; Patel y Velikow, 2014; Zhang *et al.*, 2019).

Las nanopartículas de zeína presentan un tamaño (≤ 200 nm) que permite que sus propiedades fisicoquímicas difieran a las de partículas de mayor tamaño, de esta forma se obtiene una mejora en la estabilidad en cuanto a los fenómenos de separación gravitacional y agregación, así como de mayor solubilidad, velocidad de difusión y de penetración en barreras biológicas (Dan, 2016).

Las aplicaciones de los nanomateriales suelen ser muy limitadas, ya que en comparación con los empleados normalmente en aplicaciones alimentarias o nutricionales, presentan un mayor grado de toxicidad. En el caso de la zeína esto no supone ningún problema, ya que es una proteína segura y respetable con el medio ambiente (Kasaai, 2018). Sus aplicaciones se presentan en la tabla 1. Hay que destacar que, hasta el momento, su aplicación en el campo de la nutrición en la acuicultura (larvicultura) no se ha explorado.

Tabla 1. Aplicaciones de las nanopartículas de zeína en industrias de alimentación y nutrición (Kasaai, 2018).

Aplicación	Descripción	Referencia
Cápsula	Para sistemas encapsulados de aceites esenciales, ácidos grasos, colorantes/pigmentos alimentarios, vitaminas liposolubles, sabores, agentes antioxidantes y antimicrobianos naturales, y suplementos nutricionales y alimenticios.	Luo <i>et al.</i> , 2010; Patel y Velikov, 2014; Zou <i>et al.</i> , 2012.
Núcleo	Para encapsular componentes nutricionales y alimentarios.	Hu y McClements, 2015.
Estabilizador	Para mejorar la estabilidad de los antioxidantes mediante procesos oxidativos.	Ghorani y Tucker, 2015.
Protector	Para proteger componentes bioactivos (sabores, agentes antioxidantes, colorantes de alimentos, aceites esenciales, lípidos) de la degradación y deterioro provocado por el oxígeno y humedad, así como la mejora de las propiedades ante la barrera del oxígeno y el agua.	Zou <i>et al.</i> , 2012.
Tubo nanométrico	Para proteger los componentes de los alimentos y nutrientes del deterioro por humedad.	Padua y Wang, 2009.
Parte de un sistema de nanobiosensor	Para detectar proteínas alérgicas u otros componentes alimenticios.	Gezer <i>et al.</i> , 2016; Jornet-Martinez <i>et al.</i> , 2016
Nanoesfera (< 100 nm)	Para la fabricación de emulsiones aceite/agua.	Wang y Padua, 2012.

1.5.1. Bioencapsulación de antibióticos: ej. cloranfenicol

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro antimicrobiano que se encarga de inhibir la síntesis de proteínas a nivel de la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano, impidiendo la formación de puentes peptídicos en la cadena de elongación (Uriarte *et al.*, 2001; Rodríguez, 2014). Es un bacteriostático que impide la multiplicación y el desarrollo de los microorganismos, pero sin destruirlos (Madigan *et al.*, 1999).

Ha sido empleado frecuentemente en acuicultura, principalmente en “hatcheries”, para el control del crecimiento microbiano en cultivos larvarios de pectínidos y de peces. Es un antibiótico prohibido en la mayoría de los países, pero todavía se sigue usando en algunos de Sudamérica (Uriarte *et al.*, 2001; Romero-Soto *et al.*, 2018).

En el presente estudio se ha evaluado la viabilidad de encapsular sustancias bioactivas y antibióticos en nanopartículas de zeína, usando como modelo la curcumina y β -caroteno como compuestos bioactivos, y el cloranfenicol como antibiótico (figura 5). A pesar de sus restricciones, en este estudio el cloranfenicol se ha utilizado como prueba de concepto en vez del florfenicol, cuyo uso no presenta restricciones y sus funciones son similares.

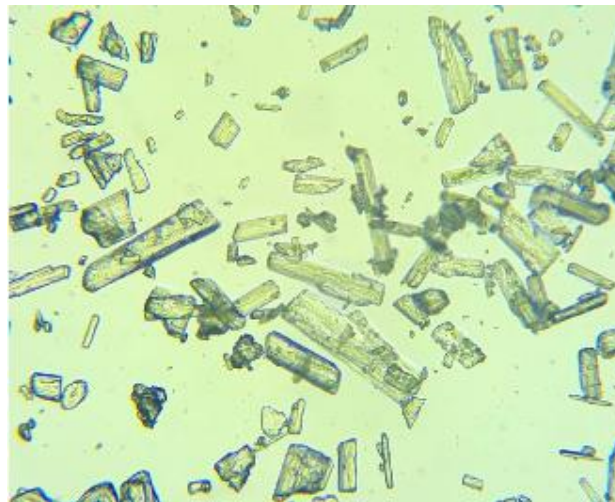


Fig. 5. Aspecto del antibiótico cloranfenicol en agua de mar (imagen tomada con microscopio estereoscópico Leica MZ6 con cámara digital incorporada Leica MC170HD, con ayuda del programa Motic Images Plus 3.0 ML). Fuente: elaboración propia.

2. OBJETIVOS

El objetivo general planteado en este estudio consiste en la evaluación de las nanopartículas de zeína como sistema de encapsulación, para vehicular sustancias bioactivas y antibióticos en nauplios de *Artemia*, y confirmar si es susceptible de ser explotado de una manera útil en larvicultura.

Los objetivos específicos planteados para lograr el objetivo general son:

1. Determinar la incorporación (vehiculación) de nanopartículas de zeína (NPZ) con sustancias bioactivas y antibióticos en nauplios de *Artemia*: tiempo de llenado y vaciado del tracto digestivo.
2. Evaluar la digestibilidad de nanopartículas de zeína en el tracto digestivo de nauplios de *Artemia*: actividad antimicrobiana del cloranfenicol.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Preparación de las nanopartículas de zeína

Las nanopartículas de zeína (NPZ) se prepararon por el método de precipitación antisolvente (figura 6), que consiste en la precipitación de la disolución biopolimérica que contiene el compuesto activo en un medio en el que no es soluble, de forma que se favorecen las interacciones biopolímero-biopolímero sobre las interacciones biopolímero-solvente, promoviendo así la asociación de las moléculas de biopolímero. Para ello, se preparó una disolución de zeína al 2.5 % (p/v) utilizando como solvente una disolución de etanol al 80% (v/v) y se añadió el compuesto bioactivo/antibiótico (curcumina y β -caroteno encapsulado y como colorante o cloranfenicol como antibiótico encapsulado (Sigma)) en una concentración 10 % (p/p) respecto a la zeína. Las nanopartículas se formaron por adición de 5 ml de la disolución de zeína-bioactivo/antibiótico en 25 ml de agua destilada (antisolvente), manteniendo el sistema en agitación a 60 rpm durante 3 min. Las nanopartículas control (zeína sin compuesto bioactivo/antibiótico) se prepararon siguiendo el mismo procedimiento.

El tamaño de las nanopartículas en disolución se determinó, por triplicado, por dispersión dinámica de luz (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK).

Tras la preparación de las NPZ se procedió a su observación mediante un microscopio estereoscópico Leica MZ6 con cámara digital incorporada Leica MC170HD, y se realizaron fotos con el programa LAS (Leica Application Suite) analizador de imágenes.

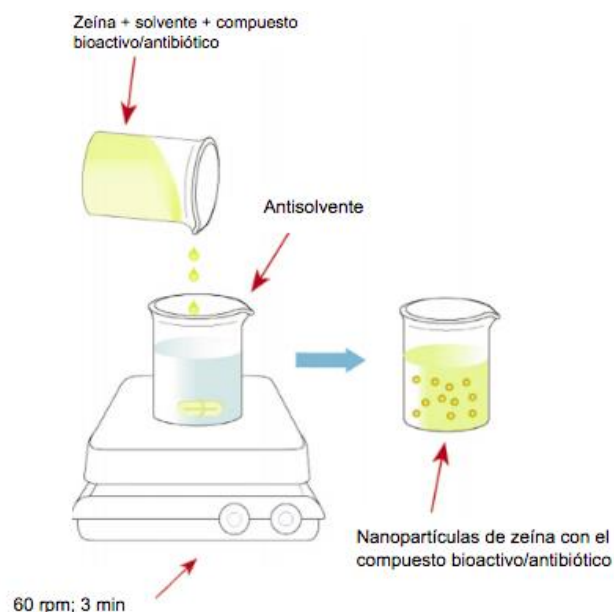


Fig. 6. Preparación nanopartículas de zeína (modificado de Chen *et al.*, 2014).

3.2. Obtención de nauplios de *Artemia franciscana*

El trabajo fue desarrollado a partir del uso de nauplios de la especie americana bisexual *Artemia franciscana* (AF), los cuales fueron obtenidos mediante la eclosión de quistes deshidratados, proporcionados por la empresa INVE Aquaculture (Bélgica).

Previamente a la eclosión, se realizó la descapsulación de los quistes, con el objetivo de retirar el corion (envuelta que cubre el embrión) y de esta forma poder eliminar cualquier contaminación que pueda estar adherida (microorganismos, pesticidas, metales pesados, etc.), así como facilitar la recogida de los nauplios eclosionados. La solución de descapsulación se preparó con 0.162 L de lejía, 0.5 L de agua de mar y 7.5 gr de sosa cáustica. Para la descapsulación se hidrataron 50 gr de quistes en agua dulce durante 1 h con aireación constante. A continuación, se recogieron los quistes hidratados y se resuspendieron en la solución descapsuladora con aireación vigorosa y constante. Se mantuvieron en dichas condiciones hasta que se produjo un cambio de color desde marrón a anaranjado, momento en el que se recogieron con ayuda de una malla de plancton de 100 μm y se procedió a su lavado con abundante agua dulce para eliminar cualquier resto de la solución de descapsulación. Tras el lavado, se escurrió el exceso de agua y los quistes descapsulados (figura 7.1) se recogieron con ayuda de una espátula. Después se pesaron cantidades de 10 gr (peso húmedo), y se distribuyeron en recipientes de cristal que contenían salmuera de 270 ppm, para su conservación a 4°C hasta el momento de su eclosión.

La eclosión de los quistes (figura 7.2), acción por la que se produce el nacimiento del nauplio tras la rotura de la membrana, se realizó a partir de una cantidad conocida (2.5 g/L y 4 g/L) que fue resuspendida en tubos de cristal cilíndricos, con 1 litro de agua de mar y en un baño termostático a 28°C, aireación individual, vigorosa y constante, mediante burbujeo desde el fondo, e iluminación continua (1000 lux) (Amat, 1985b).

Tras un periodo de 22-24 horas, la aireación fue detenida y se procedió a la recogida de los nauplios recién eclosionados. La separación de los nauplios (figura 7.3) de los restos de la eclosión (quistes, membranas y embriones sin eclosionar) se realizó mediante la sifonación y recogida de estos en una malla de plancton de 100 μm , donde se lavaron con abundante agua dulce para eliminar todos los metabolitos generados durante el proceso de eclosión. Posteriormente, los nauplios (figura 7.4) fueron resuspendidos en una probeta de 1 L con agua dulce, durante 2-3 minutos, con el objetivo de eliminar por flotación posibles restos más ligeros de la eclosión. Pasado dicho tiempo, se sifonaron y resuspendieron de nuevo, pero esta vez en un volumen conocido de agua de mar filtrada, generalmente 1 L, con aireación moderada y constante, para tener una dispersión homogénea antes de proceder a su conteo. La densidad media de nauplios (n° individuos/ml) se calculó a partir de 3 alícuotas de 250 μl

tomadas con ayuda de una pipeta automática. De esta forma, se determinó el volumen a transferir a cada tubo de exposición para que la densidad final fuera de 250 nauplios/ml. Finalmente, los nauplios se mantuvieron en dos recipientes de cristal de 0.5 L durante 24 h en condiciones estándar (aireación constante, fotoperiodo continuo y alimentados con *Tetraselmis suecica*, en una cámara termostatzada a 25°C).

La concentración de microalga (suministrada por el banco de microalgas del IATS) se obtuvo mediante el cálculo de la concentración inicial del cultivo stock utilizando una cámara de recuento Neubauer, así se determinó el volumen a coger de dicho cultivo para obtener una concentración final de 300.000 cél/ml.

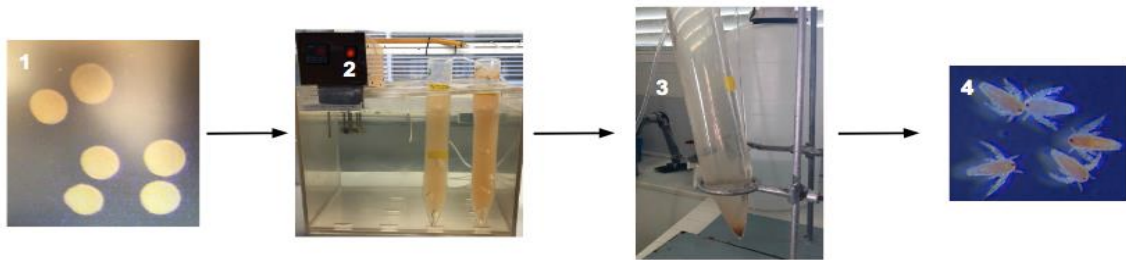


Fig. 7. Obtención de nauplios de *A. franciscana*. 1: quistes descapsulados; 2: eclosión; 3: recogida; 4: nauplios.

3.3. Crecimiento

Para la determinación de la talla de los nauplios recién eclosionados (0h) y tras 24h de cultivo en condiciones estándar, se realizaron fotografías de los ejemplares de interés con ayuda de un microscopio estereoscópico Leica MZ6 con cámara digital incorporada Leica MC170HD y el programa LAS (Leiza Application Suite), y las imágenes fueron procesadas con el software de acceso libre ImageJ (National Institutes of Health, USA).

La talla media de los nauplios de 0 h y 24 h se estimó a partir de 120 individuos. Para poder realizar la fotografía, los nauplios fueron anestesiados con una solución de agua saturada de cloroformo. Después de determinar la talla, los nauplios fueron eliminados del experimento.

3.4. Exposición de nauplios a las nanopartículas de zeína

Para realizar los ensayos de exposición a las nanopartículas de zeína (NPZ) se utilizaron nauplios de 24h de edad cultivados en condiciones estándar. Previamente se filtraron desde el medio de cultivo y se concentraron con ayuda de una malla de plancton de 100 μm , a continuación, se resuspendieron en un volumen final de 30 ml en tubos tipo Corning a una densidad de aproximadamente 200 nauplios/ml.

Cada grupo experimental se preparó con 28 ml H_2O de mar filtrada y autoclavada y 2 ml de NPZ con 200 nauplios/ml. Se prepararon un total de 4 grupos experimentales: NPZ con antibiótico cloranfenicol encapsulado, NPZ vacías (sin antibiótico/bioactivo), NPZ con β -caroteno y NPZ con curcumina. Además, se incluyeron dos grupos control (sin NPZ), uno de fitoplancton (300.000 cél/ml) y otro con levadura (0.02 g/100 ml). Todos los grupos experimentales se mantuvieron en las mismas condiciones en una cámara termostatzada a 25 °C, con aireación constante y fotoperiodo continuo (figura 8).

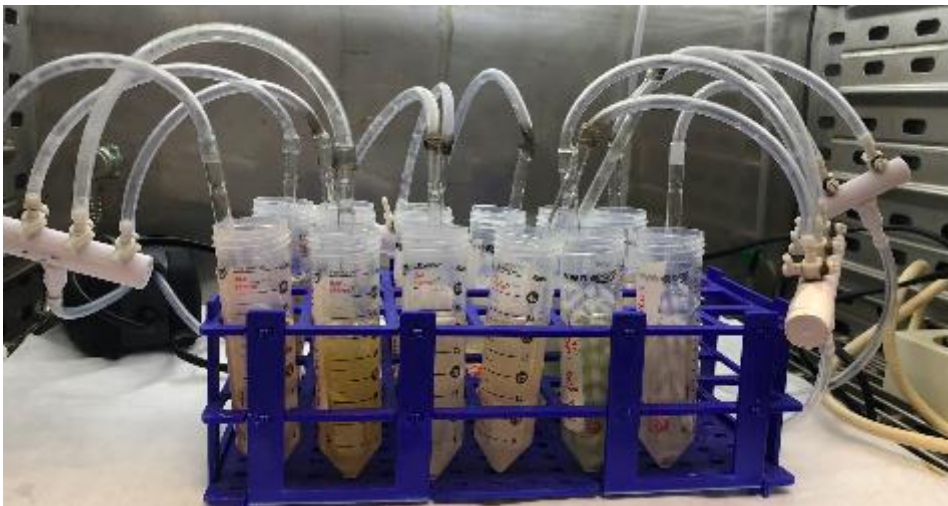


Fig. 8. Detalle del sistema empleado para la exposición de nauplios de *A. franciscana* a nanopartículas de zeína (NPZ). De izquierda a derecha: NPZ con β -caroteno, con curcumina y con antibiótico, NPZ vacía, control de fitoplancton (*T. suecica*) y control de levadura.

Fueron realizados un total de 6 ensayos por triplicado, tomando muestras de 1 ml a diferentes tiempos (30, 60 y 120 minutos), con el objetivo de medir la talla de los nauplios ($n=30$) y verificar la entrada de las NPZ. Dichos nauplios fueron eliminados del experimento.

Finalmente, el resto de los nauplios fueron filtrados a través de una malla de plancton de 100 μm y lavados con abundante agua destilada, con el fin de eliminar los restos de NPZ, para su posterior congelado a -20°C en tubos eppendorf de 1.5 ml hasta su análisis (figura 9).



Fig. 9. Detalle del etiquetado de muestras antes de ser congeladas hasta su análisis.

3.5. Antibiograma

Para la realización del antibiograma se prepararon precultivos de XL1 Blue en tubos de 5 ml del medio Luria-Bertani Agar (LBA) y se procedió a su incubación. Tras esto, se inocularon 0.5 ml del precultivo de LBA a un matraz de 50 ml y se procedió al crecimiento hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0.1 a 600 nm.

Seguidamente, las muestras de nauplios expuestas a NPZ con antibiótico encapsulado y a NPZ vacías (usadas como control) fueron congeladas en nitrógeno líquido durante 10 s y posteriormente, homogeneizadas (trituras) en condiciones estériles en eppendorfs de 1.5 ml junto con 200 μ l de agua destilada estéril.

A continuación, se prepararon dos métodos de antibiograma, el primero de ellos se llevó a cabo en placas Petri, en las cuales se añadieron 200 μ l del precultivo dispersados por toda la superficie. Mientras se secaban las placas, se prepararon discos estériles con papel Whatman con 50 μ l de muestra (extracto de nauplios) y se incubaron en la estufa a 37°C durante 24h, con el objetivo de que se secaran. Posteriormente, dichos discos fueron depositados en las placas sembradas. Finalmente, se procedió a la observación y medición del crecimiento de los halos tras 24h de incubación a 37°C.

El segundo método fue realizado en una placa multipocillo (figura 10), en la que se pusieron 150 μ l de LBA, 50 μ l de muestra (extracto de nauplios) y 20 μ l de *Escherichia coli* resistente a ampicilina. En la primera fila (A) fue colocado el blanco, en la primera columna se puso el cloranfenicol a distintas concentraciones (control positivo) y en el resto de las columnas (2-4) se colocaron las muestras (extractos de nauplios), en las filas de la B-D se dispuso el control negativo (extracto de nauplios expuestos a NPZ vacías), y en las filas de la E-G se dispusieron los extractos de nauplios expuestos a las NPZ con cloranfenicol encapsulado, cada una de ellas a los tres tiempos (30, 60 y 120 min). Después, la microplaca

ya preparada fue colocada en el lector de placas, capaz de realizar cinéticas, a 37°C durante 18 horas, tomando datos cada 10 minutos y a una absorbancia de 600 nm.

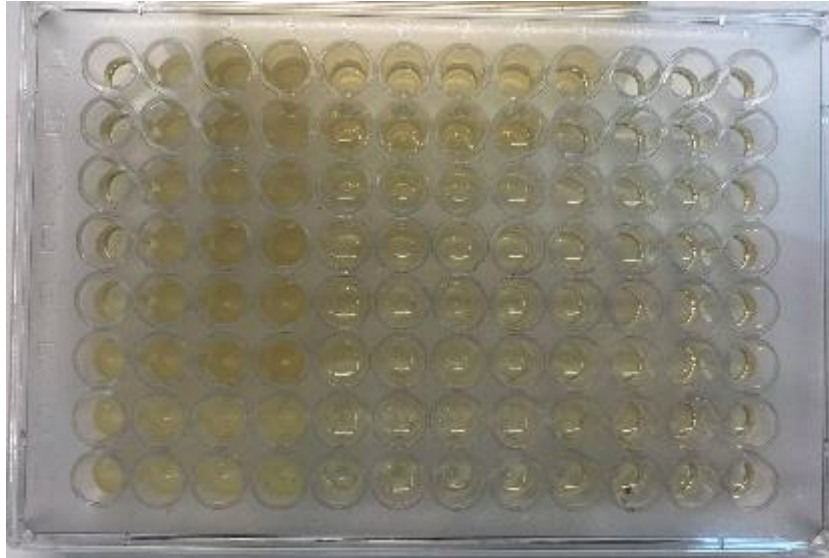


Fig. 10. Detalle de la placa multipocillo formada por 150 μ l de LBA, 50 μ l del extracto de *A. franciscana* y 20 μ l de *E.coli* resistente a ampicilina. Primera fila (A): blanco. Primera columna: cloranfenicol a distintas concentraciones. Columnas 2-4: extractos de nauplios de *A. franciscana* (B-D: control negativo (nauplios expuestos a NPZ vacías), E-G: extractos de nauplios expuestos a NPZ con cloranfenicol encapsulado).

3.6. Análisis estadístico

Los datos de crecimiento en nauplios de 0h y 24h se analizaron con un análisis t-student.

Para comparar los datos de crecimiento de los nauplios de 24h expuestos a las diferentes nanopartículas se llevó a cabo un análisis de la varianza de una vía (ANOVA de una vía) seguido de un test Dunnett *post hoc* para ver diferencias entre los grupos experimentales expuestos a NPZ y levadura respecto al grupo control (fitoplancton). Los resultados se presentaron como media \pm desviación típica, y el nivel de significación se estableció a $p \leq 0.05$ (95%).

Todo el análisis estadístico se generó con la ayuda del software Graphpad Prism7.

Las gráficas que representan los resultados del antibiograma se analizaron realizando una cinética mediante el promedio y la desviación típica de las absorbancias de los triplicados del grupo control y los triplicados del grupo con antibiótico, cada uno a los tres tiempos de exposición.

4. RESULTADOS

4.1. Nanopartículas de zeína

En las figuras 11-14 se puede observar el aspecto de las diferentes nanopartículas de zeína (NPZ) con el bioactivo/antibiótico encapsulado.

Las NPZ con β -caroteno (figura 11) mostraron forma irregular con color rojizo debido al bioactivo.

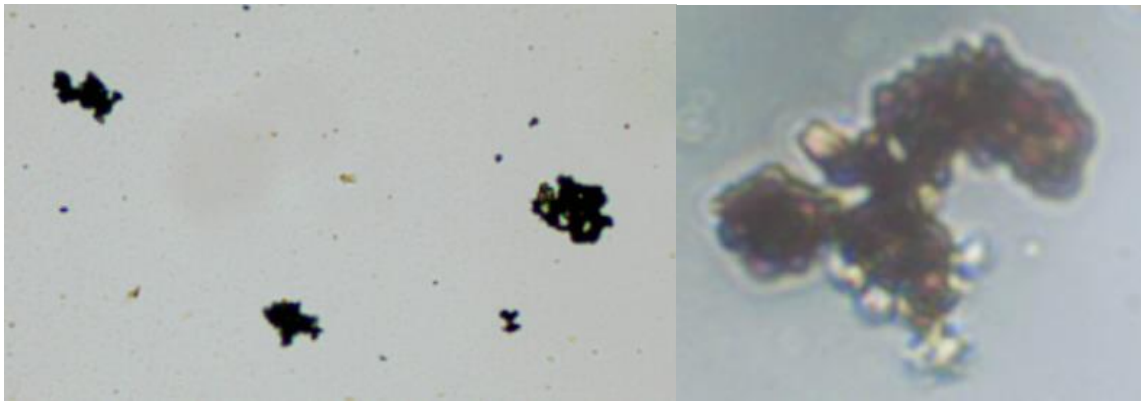


Fig. 11. Aspecto de las NPZ con β -caroteno encapsulado (imágenes con cámara digital incorporada Leica MC170HD al microscopio estereoscópico Leica MZ6, con ayuda del programa Motic Images Plus 3.0 ML). Izquierda: 10x; Derecha: 40x.

En la figura 12 se pueden ver las NPZ vacías, que presentaron un aspecto similar al de las NPZ con β -caroteno, con la diferencia de que las vacías poseían un color crema, propio de la zeína.

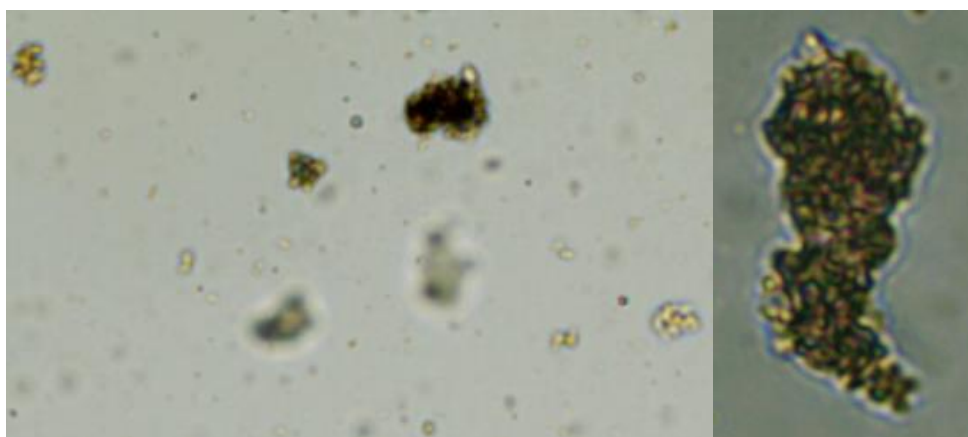


Fig. 12. Aspecto de las NPZ vacías (imágenes con cámara digital incorporada Leica MC170HD al microscopio estereoscópico Leica MZ6, con ayuda del programa Motic Images Plus 3.0 ML). Izquierda: 10x; Derecha: 40x.

En cuanto a las que contenían cloranfenicol encapsulado (figura 13) mostraron un color más similar a las NPZ vacías, con una tonalidad más clara por el antibiótico.

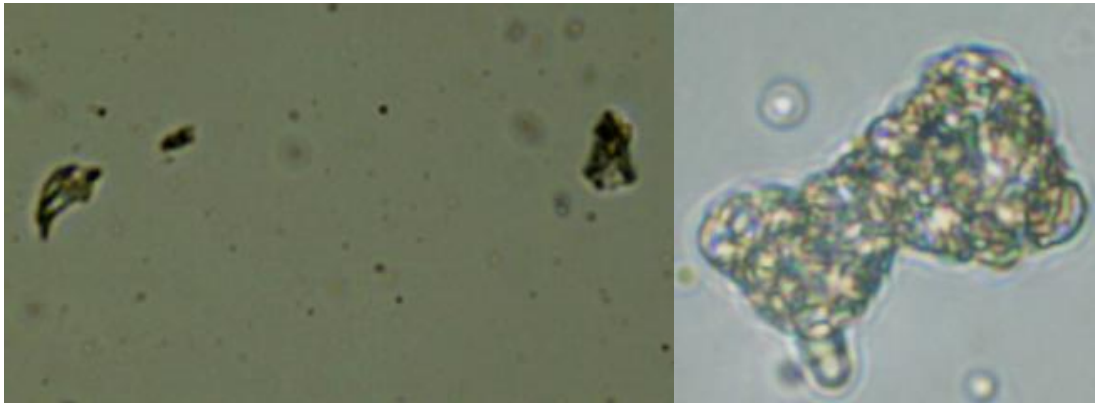


Fig. 13. Aspecto de las NPZ con cloranfenicol encapsulado (imágenes con cámara digital incorporada Leica MC170HD al microscopio estereoscópico Leica MZ6, con ayuda del programa Motic Images Plus 3.0 ML). Izquierda: 10x; Derecha: 40x.

Hay que destacar las NPZ con curcumina (figura 14) presentaron un aspecto espicular, muy diferente al resto, con aristas muy pronunciadas. Además de una coloración más anaranjada, propia de la curcumina. En todas las NPZ se observaron la formación de agregados.

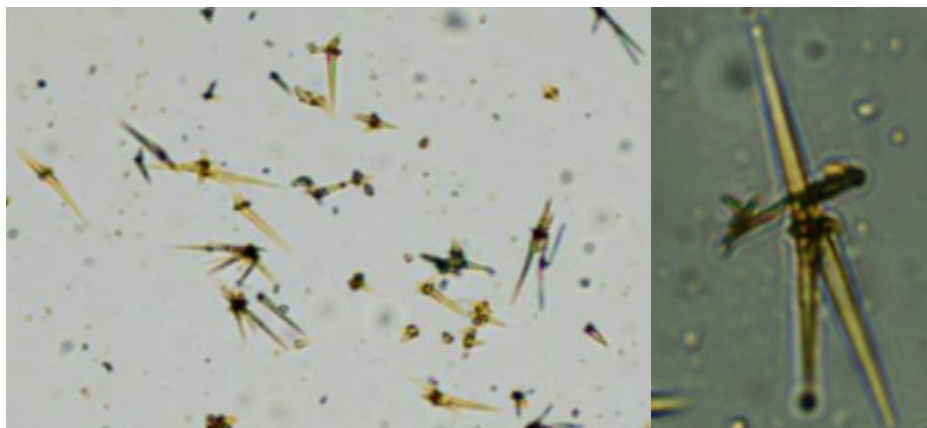


Fig. 14. Aspecto de las NPZ con la curcumina encapsulada (imágenes con cámara digital incorporada Leica MC170HD al microscopio estereoscópico Leica MZ6, con ayuda del programa Motic Images Plus 3.0 ML). Izquierda: 10x; Derecha: 40x.

4.2. Crecimiento

En la figura 15 se presentan los resultados de las tallas (μm) de nauplios recién eclosionados (0h) y a las 24 horas tras ser alimentados con *T. suecica* (300.000 cél/mL).

El análisis estadístico (t-student) mostró que hay un crecimiento significativo ($p \leq 0.05$) de nauplios con el tiempo.

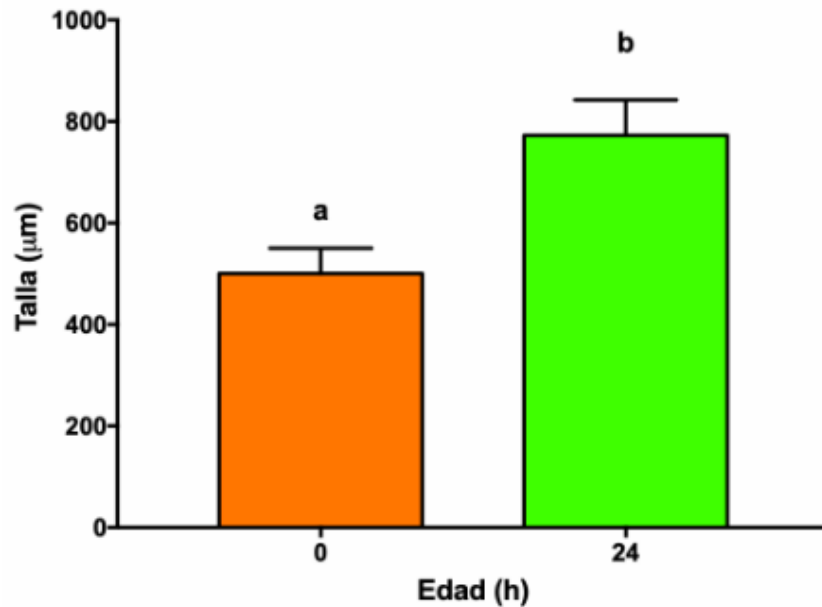


Fig. 15. Variación de la talla de nauplios de *A. franciscana* recién eclosionados (0h) y a las 24 horas alimentados con *T. suecica*. Los resultados se presentan como media \pm desviación típica ($n=120$).

La media de las tallas de nauplios a 0h fue de $500.09 \pm 49.89 \mu\text{m}$ y tras 24h de cultivo con *T. suecica* fue de $772.55 \pm 69.86 \mu\text{m}$ (figura 16).

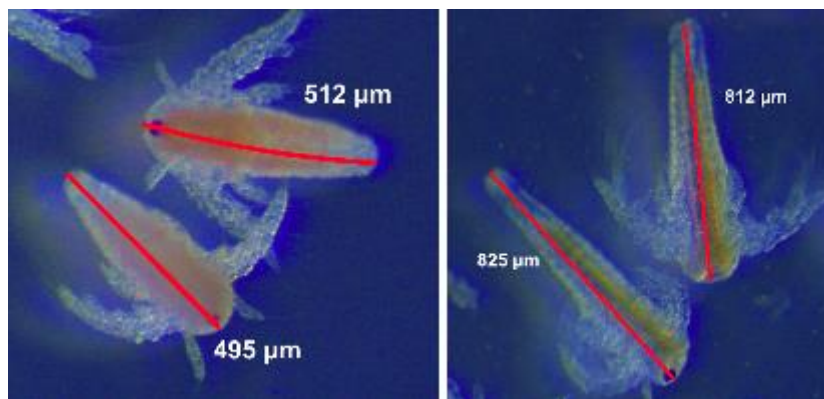


Fig. 16. Detalle del tamaño (μm) de nauplios de *A. franciscana* recién eclosionados (0h) (izquierda) y de 24 horas de edad alimentados con *T. suecica* (derecha).

4.3. Exposición de nauplios a las nanopartículas de zeína

En la figura 17 se muestran los resultados de las tallas (μm) de nauplios de 24h expuestos a las diferentes nanopartículas de zeína (NPZ), a levadura y al control (fitoplancton), al finalizar los ensayos de exposición (120 min).

El análisis estadístico mostró que no hay efecto sobre la talla de los nauplios expuestos a las diferentes NPZ y a la levadura en comparación con el fitoplancton (grupo control) (ANOVA de una vía, $p \geq 0.05$).

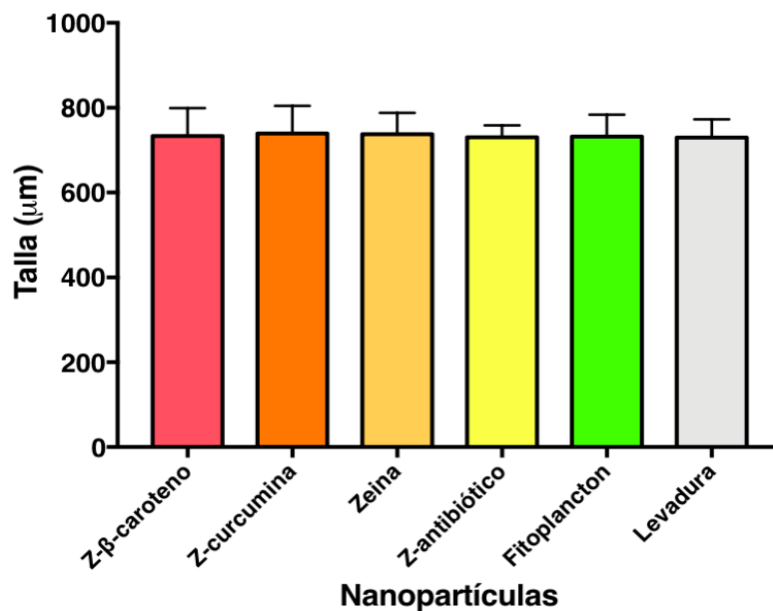


Fig. 17. Talla (μm) de nauplios de *A. franciscana* alimentados con *T. suecica* durante 24h, expuestos a las diferentes nanopartículas de zeína, fitoplancton (control) y levadura durante 120 min. Los resultados se presentan como media \pm desviación típica (n=60).

La media de las tallas fue de $732.92 \pm 65.83 \mu\text{m}$ en los nauplios expuestos a las NPZ de β -caroteno, $739.08 \pm 65.34 \mu\text{m}$ a los de NPZ de curcumina, $737.65 \pm 50.54 \mu\text{m}$ a los de NPZ vacías, $730.1 \pm 28.34 \mu\text{m}$ a las NPZ que contenían cloranfenicol, $732.0751.87 \mu\text{m}$ a los expuestos al control y por último los de levadura que fue de $729.32 \pm 42.81 \mu\text{m}$ (figura 18).

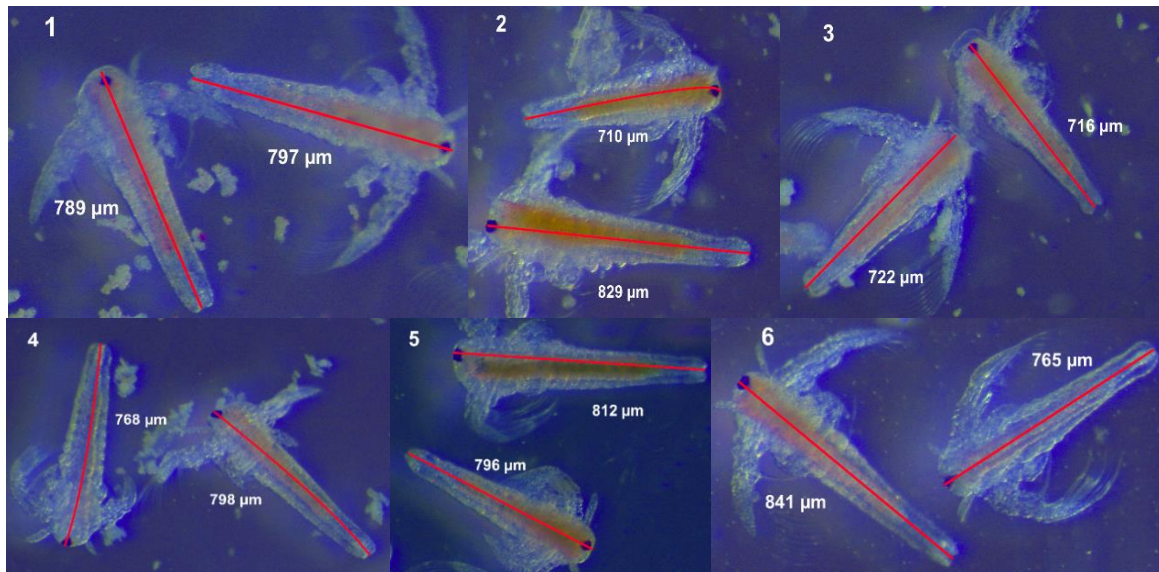


Fig. 18. Detalle del tamaño (μm) de nauplios de *A. franciscana* de 24 horas de edad expuestos durante 120 min a nanopartículas de zeína (NPZ) con β -caroteno (1) y curcumina encapsulados (2), NPZ vacías (3), NPZ con Cloranfenicol encapsulado (4), grupo control con fitoplancton (5) y levadura (6).

En la figura 19 se muestra el porcentaje de llenado del tracto digestivo de los nauplios de *A. franciscana* tras las exposiciones a las diferentes NPZ, levadura y fitoplancton (control) a diferentes tiempos (30, 60 y 120 min).

Los resultados obtenidos mostraron que todas las NPZ fueron ingeridas por los nauplios, observándose un aumento de ingestión con el tiempo. En cuanto a la levadura, fue ingerida de igual forma que las NPZ, mientras que los nauplios que estuvieron expuestos a fitoplancton (control) presentaron el mayor porcentaje de llenado a los 3 tiempos, dando como resultado un 100% a los 120 min de exposición.

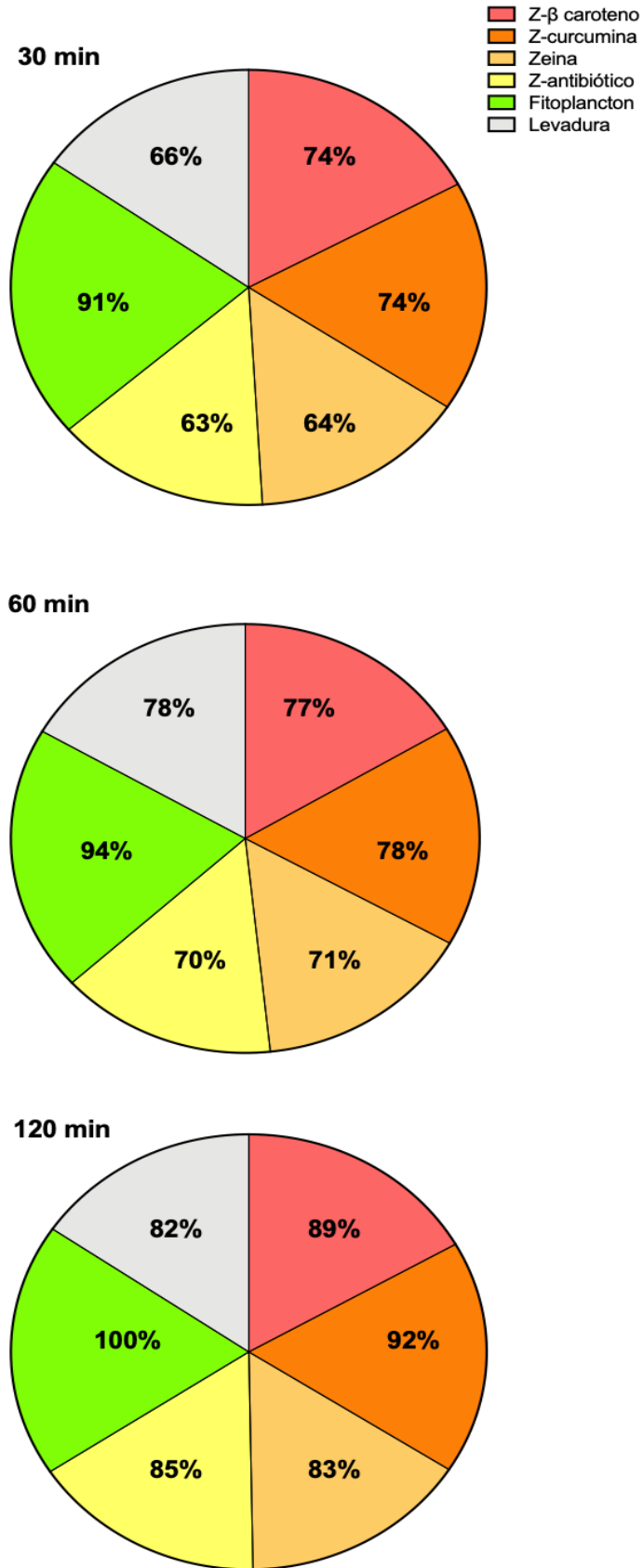


Fig. 19. Variación en el porcentaje de llenado del tracto digestivo en nauplios de *A. franciscana* de 24h de edad tras 30, 60 y 120 min de exposición a las diferentes NPZ, levadura y fitoplancton (control).

En las figuras 20-24 se muestran las imágenes de nauplios de *A. franciscana* de 24h de edad expuestos a las diferentes NPZ durante 120 min. En dichas imágenes se puede apreciar el detalle del tracto digestivo lleno de nanopartículas.

Los nauplios expuestos a las NPZ con β -caroteno (figura 20) mostraron un tracto digestivo más oscuro, con cierta coloración rojiza, propia del bioactivo.

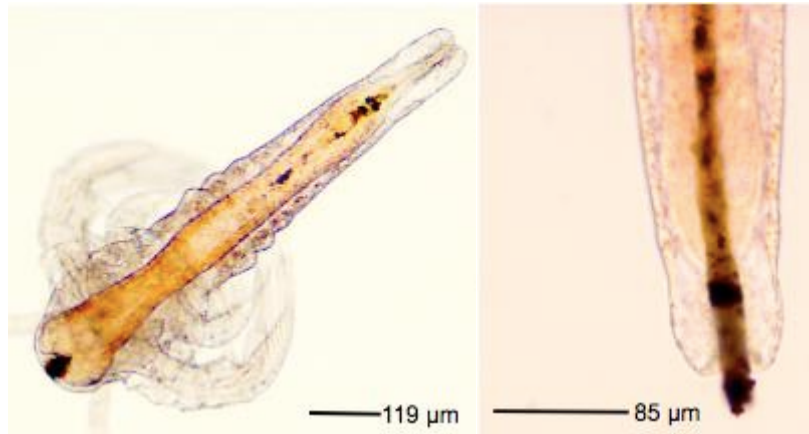


Fig. 20. Nauplios de *A. franciscana* de 24h de edad tras ser expuestos a NPZ de β -caroteno durante 120 min (imagen tomada con microscopio Nikon Eclipse 90i). Izquierda: individuo completo. Derecha: parte posterior del tracto digestivo donde se aprecia claramente el detalle de las partículas en su interior, y su eliminación por el ano.

En la figura 21 se pueden ver los nauplios expuestos a las NPZ de curcumina, la cual proporcionó un tono más anaranjado que el habitual de su tracto digestivo vacío.

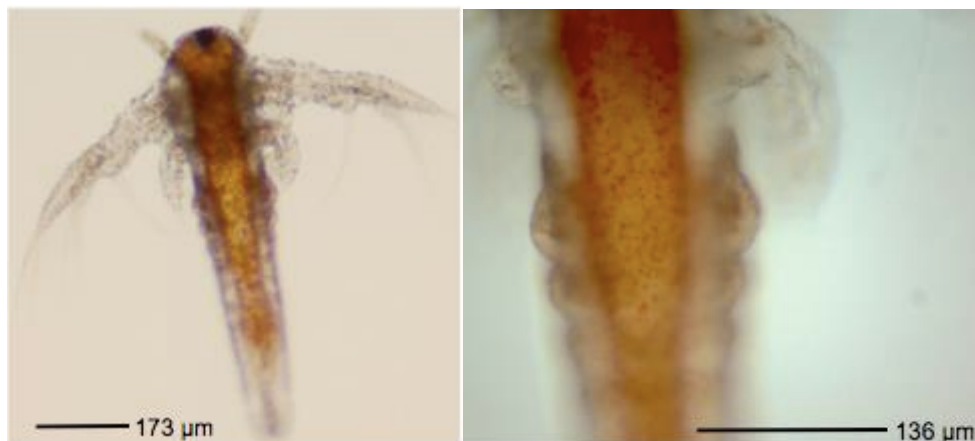


Fig. 21. Nauplios de *A. franciscana* de 24h de edad tras ser expuestos a NPZ de curcumina durante 120 min (imagen tomada con microscopio Nikon Eclipse 90i). Izquierda: individuo completo. Derecha: parte media del tracto digestivo donde se aprecia claramente el detalle de las partículas en su interior.

En cuanto a los de NPZ vacías (figura 22) mostraron un tracto digestivo con una coloración crema.



Fig. 22. Nauplios de *A. franciscana* de 24h de edad tras ser expuestos a NPZ vacías durante 120 min (imagen tomada con microscopio Nikon Eclipse 90i). Izquierda: individuo completo. Derecha: parte media del tracto digestivo donde se aprecia claramente el detalle de las partículas en su interior.

El tracto digestivo de los nauplios expuestos a las NPZ con cloranfenicol (figura 23) presentaron la misma coloración que los de NPZ vacías, ya que el antibiótico no les confirió ningún color.

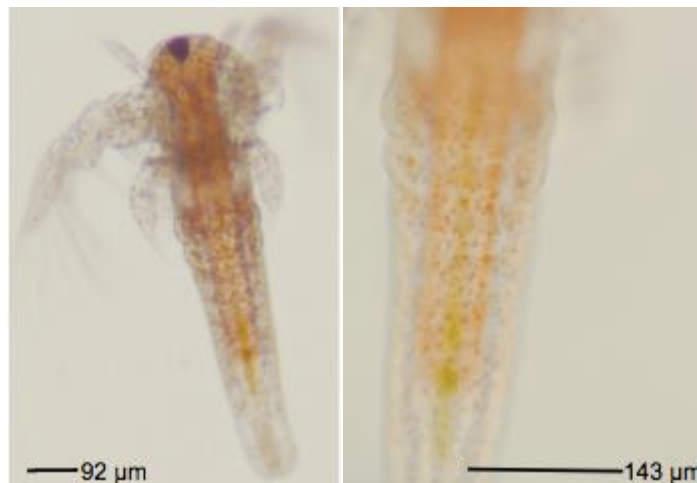


Fig. 23. Nauplios de *A. franciscana* de 24h de edad tras ser expuestos a NPZ con cloranfenicol durante 120 min (imagen tomada con microscopio Nikon Eclipse 90i). Izquierda: individuo completo. Derecha: parte media del tracto digestivo donde se aprecia claramente el detalle de las partículas en su interior.

Por último, los nauplios alimentados con fitoplancton (control) (figura 24) presentaron un color verde en el tracto digestivo, característico de la microalga.

Hay que destacar que la coloración verdosa que se observó en el tracto digestivo en los nauplios expuestos a las NPZ se debe a restos de fitoplancton que quedaron sin digerir.

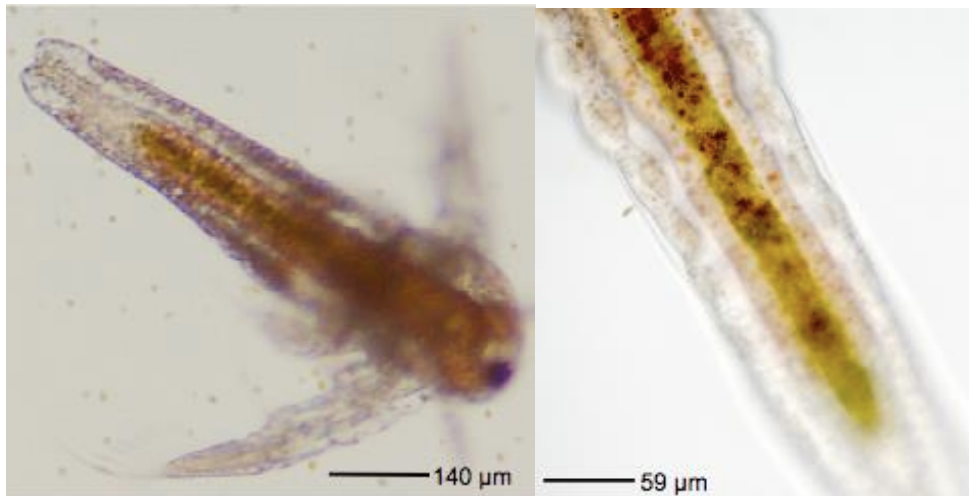


Fig. 24. Nauplios de *A. franciscana* tras ser alimentados con fitoplancton durante 24h (imagen tomada con microscopio Nikon Eclipse 90i). Izquierda: individuo completo. Derecha: parte media del tracto digestivo donde se aprecia claramente el detalle del fitoplancton en su interior.

4.4. Antibiograma

En la figura 25 se presentan los resultados obtenidos en el antibiograma realizado en placas de Petri. Las tres primeras placas son las que contenían los extractos de nauplios expuestos a 3 tiempos (30, 60 y 120 min) a las NPZ con cloranfenicol. Las dos últimas placas muestran los controles, a la izquierda el control negativo que consistió en el extracto de nauplios expuestos a NPZ vacías, y a la derecha el control positivo con un extracto de nauplios expuestos a diferentes concentraciones de cloranfenicol.

Tal y como se puede observar en la imagen no se obtuvieron halos de inhibición en ninguna placa (a excepción del control negativo), lo que parece indicar que no se alcanzó la concentración de antibiótico mínima inhibitoria.

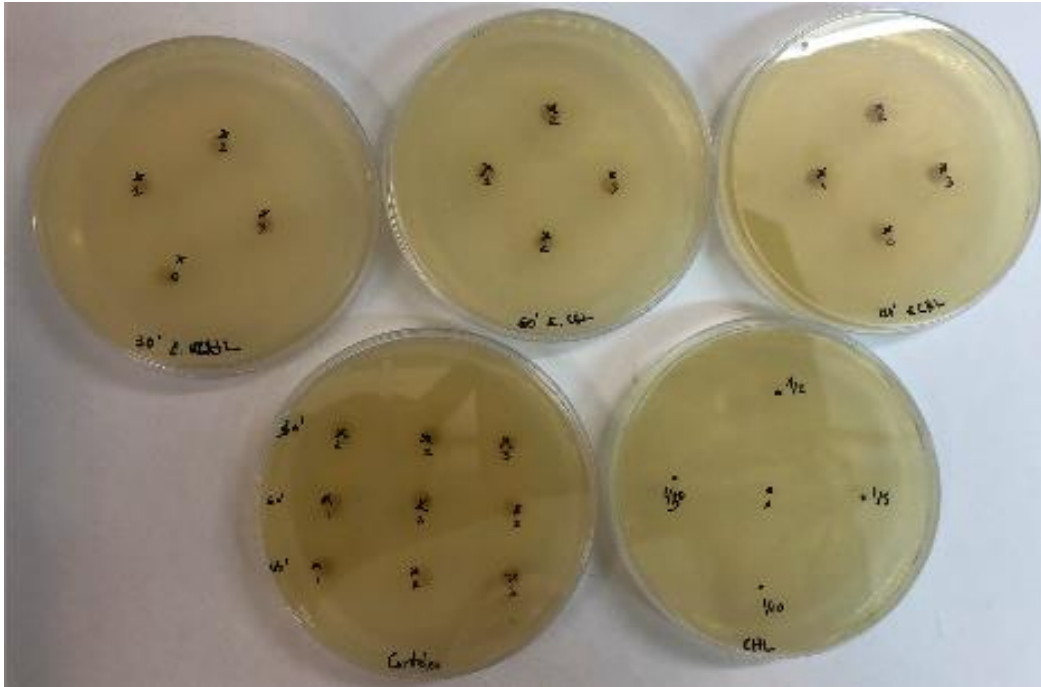


Fig. 25. Detalle de las placas realizadas con LBA y discos estériles de Whatman con 50 μ l del extracto de nauplios. Las 3 primeras placas: extractos de nauplios expuestos a NPZ con cloranfenicol a diferentes tiempos (30, 60 y 120 minutos). Las dos últimas placas: control negativo (izquierda), formado por el extracto de nauplios expuesta a NPZ vacías, y el positivo (derecha), con cloranfenicol a distintas concentraciones.

En las figuras 26-28 se presentan los resultados de la cinética del crecimiento bacteriano obtenidos tras 20 h de incubación a 37°C de los extractos de nauplios expuestos a NPZ vacías (grupo control en color azul) y a NPZ con cloranfenicol (grupo zeína en rojo). Los valores se expresan en unidades de densidad óptica (D.O) frente al tiempo.

Como puede observarse en la figura 26, correspondiente al grupo expuesto durante 30 min, la DO del grupo control fue superior comparado con el grupo de cloranfenicol, con un valor máximo de 2 a los 800 min (~13.30h), mientras que en las de antibiótico el valor fue de 1.5 a los 1100 min (~18.30h).

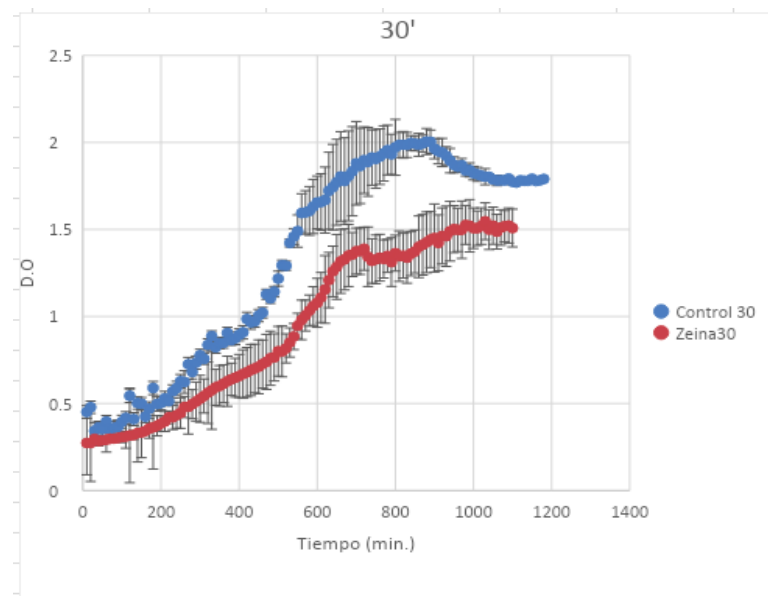


Fig. 26. Crecimiento bacteriano de los extractos de nauplios expuestos durante 30 min a las NPZ vacías (control, color azul) y a las que contenían cloranfenicol (zeína, color rojo). Cada punto se corresponde con la media \pm desviación típica obtenida por triplicado para el grupo control y de zeína (antibiótico).

Lo mismo ocurre en los grupos expuestos durante 60 y 120 min (figura 27 y 28 respectivamente), dónde los valores obtenidos de D.O fueron mayores en el grupo control, con valores entre 1.8 y 1.9 respectivamente.

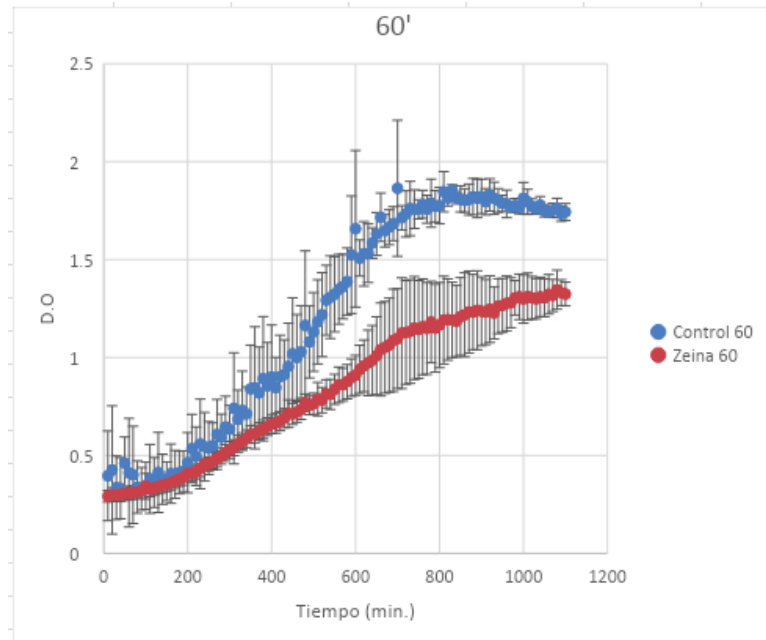


Fig. 27. Crecimiento bacteriano de los extractos de nauplios expuestos durante 60 min a las NPZ vacías (control, color azul) y a las que contenían cloranfenicol (zeína, color rojo). Cada punto se corresponde con la media \pm desviación típica obtenida por triplicado para el grupo control y de zeína (antibiótico).

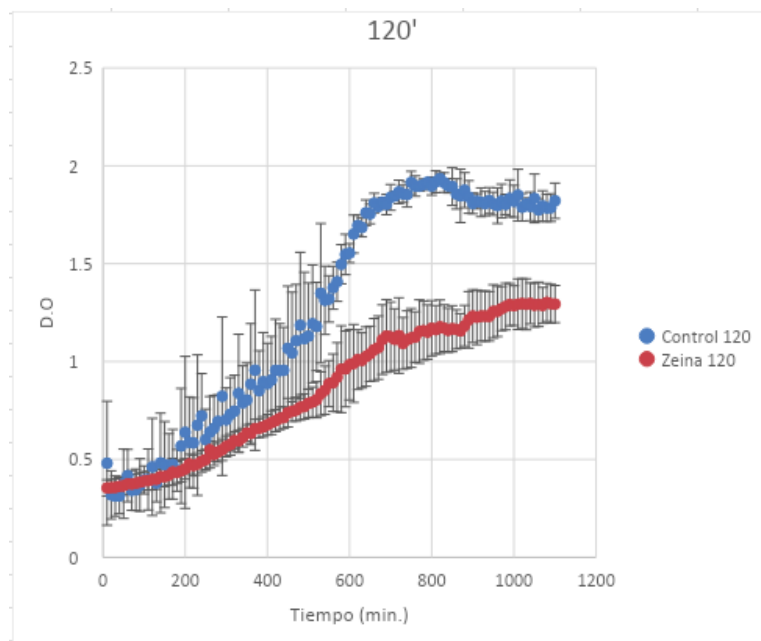


Fig. 28. Crecimiento bacteriano de los extractos de nauplios expuestos durante 120 min a las NPZ vacías (control, color azul) y a las que contenían cloranfenicol (zeína, color rojo). Cada punto se corresponde con la media \pm desviación típica obtenida por triplicado para el grupo control y de zeína (antibiótico).

5. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que las nanopartículas de zeína (NPZ) son muy efectivas en la encapsulación de sustancias bioactivas como la curcumina y β -caroteno, así como de antibióticos poco solubles como el cloranfenicol.

Durante la síntesis de las NPZ se obtuvieron partículas de un color crema característico e insolubles en agua siendo necesario el uso de etanol para su preparación, coincidiendo con los resultados obtenidos por Shukla y Cheryan (2001) en su estudio sobre la zeína como proteína para uso industrial.

En cuanto al crecimiento de los nauplios, los resultados mostraron que hay un aumento significativo de su tamaño (de 500.09 a 772.55 μm) tras 24h de cultivo a 25°C y alimentados con *T. suecica*. Los mismos resultados de crecimiento se observaron en individuos de la misma especie en el estudio realizado por Fornés (2018) sobre la viabilidad de la producción de biomasa adulta, tras 24h de cultivo a temperaturas entre 25-28°C y alimentados con la misma microalga a una densidad entre 200.000-300.000 cél/ml. Pero contrasta con el estudio sobre la caracterización y criterios de eclosión de quistes de *Artemia* sp., realizado por Eslava-Eljaiek *et al.*, (2011), donde encuentran que la talla media de los nauplios es de 431.79 μm tras 24h de cultivo, la cual es inferior a la obtenida en este estudio, lo que puede ser debido a la especie utilizada.

Respecto al efecto de las NPZ sobre la talla de los nauplios, se ha comprobado que no les afecta, ya que su crecimiento no varía tras 2h de exposición, hecho que no es sorprendente ya que las diferencias en talla de individuos de más de 24h varía significativamente en periodos de tiempo mayores. De hecho, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Peixoto (2019) en un estudio sobre los efectos de diferentes concentraciones de micropartículas de polímero esféricas, en el cual muestra que la talla de ejemplares de *A. franciscana* no se ve alterada tras su ingestión.

En el caso de la exposición de los nauplios a NPZ, los resultados demuestran que son ingeridas por los estos, al observarse la presencia de las mismas en el interior de su tracto digestivo. Este hecho confirma que a pesar de que forman agregados de diferentes formas y tamaños, los nauplios, por su condición de ser organismos filtradores no selectivos (Amat, 1985a), son capaces de filtrarlas e incorporarlas, al presentar un tamaño adecuado que varía entre 0.5-50 μm (Espinosa, 2002). Nuestros resultados corroboran los obtenidos previamente por Peixoto *et al.*, (2019) en adultos de *A. franciscana*, donde confirma que micropartículas de polímero esféricas entre 1-5 μm son incorporadas al tracto digestivo sin efectos adversos. En la misma línea, el estudio de Mejía *et al.*, (2007) demuestra la incorporación de antibióticos (cloranfenicol y ciprofloxacino) en diferentes fases de desarrollo de *A. franciscana*, señalando que los metanauplios incorporan mejor estos compuestos poco solubles debido a una

filtración más elevada, fomentada por una mayor actividad metabólica durante esta fase (Wilson, 1989; Mejía *et al.*, 2007).

Además, se ha determinado que el tiempo mínimo para entrada de alimento o NPZ y el llenado del tracto digestivo de nauplios de 24h de edad es de 30 min, y que la digestión tiene lugar a los 120min, tiempo en el que se observaron la presencia de heces. Estos resultados confirman los obtenidos por Nimura (1989), que describe que la entrada del alimento en individuos de *A. franciscana* mantenidos a 25°C es de 30 min, e independientemente de la fase de desarrollo, señalando el poco tiempo que está el alimento en el intestino.

En relación con la efectividad del cloranfenicol, en el primer método del antibiograma (placa Petri) no se generó un retraso del crecimiento bacteriano (*E. coli*), lo que se cree que es debido a que la carga que se ha utilizado de antibiótico (10%) es relativamente baja para producir un efecto significativo, es decir, no se alcanzó la concentración mínima necesaria para producir inhibición en el crecimiento de *E. coli*. Sin embargo, al realizar el antibiograma mediante cinética, se ha comprobado que el antibiótico sigue estando activo dentro de las NPZ, ya que sí que se observó una inhibición del crecimiento cuando se utilizaron los extractos de nauplios con NPZ con cloranfenicol frente a los expuestos a NPZ vacías (control). Los resultados obtenidos respecto al tiempo de exposición de nauplios a las NPZ indican que no hay una relación de éste con el efecto inhibitorio observado. Sin embargo, se podría decir que a los 60 min se obtiene el valor más bajo de D.O (inhibición), que se queda por debajo de 1.5, observándose un crecimiento más lento con respecto del control, aunque en 120 min este se efecto se ve más pronunciado. Estos resultados coinciden con los encontrados en el estudio de Roque *et al.*, (2004), sobre la evaluación de la concentración de oxitetraciclina en tejidos de camarón suministrada mediante nauplios de *Artemia*. Estos tampoco obtuvieron en sus ensayos la concentración mínima inhibitoria, apuntando que habría que suministrar 4 veces más de antibiótico para alcanzar dicha concentración. Por el contrario, Mejía *et al.*, (2007), sí que obtuvo halos de inhibición en el antibiograma, debido a que ha empleado una concentración del antibiótico cloranfenicol mucho mayor (2g/L) a la utilizada en este estudio.

6. CONCLUSIONES

1. Las nanopartículas de zeína (NPZ) capaces de encapsular en su interior los bioactivos/antibióticos como β -caroteno, curcumina y cloranfenicol, son ingeridas por los nauplios de *A. franciscana*, confirmando que el tamaño y forma que adoptan en agua de mar son adecuadas para poder ser filtradas e incorporadas en el tracto digestivo. Además, la entrada y salida de nanopartículas de zeína se produce en un tiempo corto (30 min).
2. Las NPZ con cloranfenicol provocaron un retraso del crecimiento bacteriano, confirmando la efectividad de su encapsulación al mantenerse activo en el interior del tracto digestivo de los nauplios durante 120 min.
3. Los resultados de este estudio permiten confirmar un importante potencial de las NPZ y su vehiculación para la introducción de diferentes tipos de moléculas de interés médico o nutricional.

7. LÍNEAS FUTURAS

Respecto a las líneas futuras de investigación, durante el desarrollo de este estudio se ha planteado la posibilidad de realizar otros ensayos para completar esta investigación.

En primer lugar, los resultados obtenidos en el antibiograma señalan la necesidad de aumentar la concentración de cloranfenicol encapsulado, al menos unas 5 veces por encima de la empleada en este estudio, para asegurar que la encapsulación del antibiótico sigue siendo del 100%, y así verificar su efectividad para inhibir el crecimiento de las bacterias.

Por otro lado, sería necesario la realización de ensayos con cloranfenicol disuelto directamente en el medio (agua de mar), con el objetivo de confirmar si es más efectivo que cuando está encapsulado en NPZ y vehiculado a través de nauplios.

Además, sería interesante ensayar la viabilidad de este sistema de encapsulación con nanopartículas de zeína con otras sustancias de interés en nutrición larvaria, como lípidos (DHA, EPA) y antioxidantes (α -tocoferol, quercetina, vitamina A).

Por último, se podría añadir al diseño experimental otras etapas de desarrollo de *A. franciscana*, como metanauplios, juveniles y adultos, con el fin utilizarlo en el cultivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*) ya que precisa de presas vivas de mayor tamaño.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alderman, D.J. (1988). *Fisheries chemotherapy a review*. pp. 1-61. En: Recent Advances in Aquaculture, vol. 3. Muir, J.F. Roberts. R.J. (Eds.). Croom Helm. London, United Kingdom and Timber Press, Portland, Or.
- Amat, F. (1985a) *Biología de Artemia*. Barcelona: Centro Nacional de Investigaciones Pesqueras.
- Amat, F. (1985b). *Utilización de Artemia en acuicultura*. Informes técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras, 128-129, 1-60.
- Anaya C., Cid H y Villa J (1995). *Microencapsulado de una emulsión múltiple de colorante de betabel en Oleoresina de flor de cempasúchil y su bioasimilación en Penaeus Vannamei*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.
- Ando, Y., Samoto, H., y Sasaki, S. (2003). *Preparation of salmon roe polar lipid concentrate as an HUFA enricher of Artemia nauplii*. Journal of Oleo Science, 52, 443-47.
- Barlow, D. I., y Sleigh, M. A. (1980). *The propulsion and use of water currents for swimming and feeding in larval and adult Artemia*. The brine shrimp Artemia, 1, 61-73.
- Bernabé, G. (1973). *Mass rearing of the bass Dicentrarchus labrax L*. En: Blaxter J. H. S. (eds). The early life history of fish. Springer Verlag, Berlín: pp 749-53.
- Bernabé, G. y René, F. (1973). *Reproduction contrôlée et production chez la dorade Sparus aurata Linné 1778*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris 276: 1621-3.
- Bengtson, D. A., Léger, P., y Sorgeloos, P. (1991). *Use of Artemia as a food source for aquaculture*. Artemia biology, 11, 255-85.
- Bowen, S. T., Durkin, J. P., Sterling, G., y Clark, L. S. (1978). *Artemia hemoglobins: genetic variation in parthenogenetic and zygogenetic populations*. The Biological Bulletin, 155, 273-87.
- Cannon, H. G. (1928). *On the feeding mechanism of the copepods, Calanus finmarchicus and Diaptomus gracilis*. Journal of Experimental Biology, 6, 131-44.
- Castro, B.T.; Castro, M.J. y Castro, M.G. (2003). *Artemia*. p. 67-81. En: *Alimento vivo para organismos acuáticos*. Cap. 7. Castro, B.T. (ed.) AGT Editor, S.A. México. 129 p.
- Chair, M; M. Dehasque; P. Sorgeloos; H. Nelis; y A.P. Leenher. (1995). *Live Food Mediated Drug Delivery as a Tool for disease Treatment in Larviculture: A Case Study with Turbot Scophthalmus maximus*. Journal of the World Aquaculture Society 26: 217-9.
- Chair, M; H.J. Nelis; P. Leger; P. Sorgeloos y A.P. De Leenher. (1996). *Accumulation of Trimethoprim, Sulfamethoxazole, y N-Acetylsulfamethoxazole in Fish and Shrimp Fed Medicated Artemia franciscana*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40:1649-1652.

- Chen, J., Zheng, J., McClements, D. J., & Xiao, H. (2014). *Tangeretin-loaded protein nanoparticles fabricated from zein/ β -lactoglobulin: Preparation, characterization, and functional performance*. *Food chemistry*, 158, 466-72.
- Cherel, P.; y F. Nin. (1991). *Antibiotherapy using biocarriers (Artemia salina) in hatcheries*. En: *Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality*. (Ed.) British Crown. pp. 389-93.
- Chuacharoen, T., y Sabliov, C. M. (2016). *The potential of zein nanoparticles to protect entrapped β -carotene in the presence of milk under simulated gastrointestinal (GI) conditions*. *Lwt-food Science and Technology*, 72, 302–9.
- Cohen, R. G., y Vélez, C. G. (1998). *The post-embryonic development of Artemia persimilis Piccinelli & Prosdocimi*. *Hydrobiologia*, 391, 63-80.
- Cook, M. A., Rust, M. B., Masee, K., Majack, T., y Peterson, M. E. (2003). *Uptake of erythromycin by first-feeding sockeye salmon, Oncorhynchus nerka (Walbaum), fed live or freeze-dried enriched adult Artemia or medicated pellets*. *Journal of fish diseases*, 26, 277-85.
- Coutteau, P. (1992). *Baker's yeast as substitute for micro-algae in the culture of filter-feeding organisms* (Doctoral dissertation, Ghent University).
- Croghan, P. C. (1958). *The mechanism of osmotic regulation in Artemia salina (L.): the physiology of the gut*. *Journal of Experimental Biology*, 35, 243-9.
- Cug, B., Gonlard, N., y Guilbert, S. (1998). *Proteins as agricultural polymers for packaging production*. *Cereal Chemistry*, 75, 1–9.
- D'agostino, A. (1980). *The vital requirements of Artemia: physiology and nutrition*. *The Brine Shrimp*. Vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology, 474.
- Dan, N. (2016). *Transport and release in nano-carriers for food applications*. *Journal of Food Engineering*, 175, 136–44.
- Declair, W., Vos, J., Bernaerts, F., Van Den Branden, C. (1980). *The respiratory physiology of Artemia*. In: Persoone, G. et al. (eds.) *The brine shrimp Artemia*, Vol. 2, Physiology, biochemistry, molecular biology. Universal Press, CVette- ren, Belgium, p. 137-45
- De la Cruz, J. (1906). *Producción de quistes de (Artemia franciscana) bajo condiciones controladas y determinación de su calidad con fines acuícolas*. *Facultad deficiencias marinas*, 1.
- Dhont, J.; Lavens, P. y Sorgeloos, P. (1991). *Development of a lipid enrichment technique for Artemia juveniles produced in an intensive system for use in marine larviculture*. In P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier (eds). *Larvi 91 - Fish & Crustacean Larviculture Symposium*, European Aquaculture Society, Special Publication Nr. 15, Ostend, Belgium, pp.51-5.

- Dutrieu, J. (1960). *Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'Artemia sauna Leach*. Arch Zool exp gén, 99, 1-133.
- Esquivel Chávez, A. (2013). *Desarrollo y caracterización de nanopartículas a base de zeína estabilizadas con pectina y β -lactoglobulina*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Eslava-Eljaiek, P., Wedler, E., y Serna-Macias, D. (2011). *Caracterización y criterios de eclosión de quistes de Artemia sp. en la salina de pozos colorados (Santa Marta, Colombia)*. Intropica, 101-8.
- Espinosa, A., García, C., Cabrera, E., Arenal, A., Pimentel, E., Carrillo, O., y Fajardo, J. (2002). *Bioencapsulación de levadura Pichia pastoris en nauplios de Artemia salina*.
- Evjemo, J. O., y Olsen, Y. (1999). *Effect of food concentration on the growth and production rate of Artemia franciscana feeding on algae (T. iso)*. Journal of experimental marine biology and ecology, 242, 273-96.
- Fang, Z. (2010). *Encapsulation of polyphenols: a review*. Trends in Food Science & Technology, 21, 510–23.
- Fernández, R. G. (2001). *Artemia bioencapsulation I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of Artemia franciscana*. Journal of Crustacean Biology, 21, 435-42.
- Fornés Dieje, J. J. (2018). *Estudio de viabilidad de la producción de biomasa adulta de Artemia (A. franciscana) como alimento vivo o congelado para acuariofilia*.
- Fryer, G. (1987). *A new classification of the branchiopod Crustacea*. Zoological Journal of the Linnean Society, 91, 357-83.
- Gapasin, R.S.J., Nelis, H.J., Chair, M. y Sorgeloos, P. (1996). *Drugg assimilation in the tissue of European sea bass (Dicentrarchus labrax) fry delivered orally through bioencapsulation*. Journal of Applied Ichthyology. 12, 39-42.
- Gelabert, F.; T. Castro; C. Gallardo y G. Castro. (1996). *Bioencapsulación en Artemia: mejoramiento de su valor nutricional*. Oceanología 3, 27-34.
- Gelabert, F. R. (2003). *Bioencapsulation in Artemia: II. Influences of the particle concentration in the enrichment process*. Aquaculture 216, 143-53.
- Gezer, P. G., Liu, G. L., y Kokini, J. L. (2016). *Development of a biodegradable sensor platform from gold coated zein nanophotonic films to detect peanut allergen, Ara h1, using surface enhanced Raman spectroscopy*. Talanta, 150, 224–32.
- Ghorani, B., y Tucker, N. (2015). *Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology*. Food Hydrocolloids, 51, 227–40.
- Gunasekara, R. A., Rekecki, A., Cornillie, P., Cornelissen, M., Sorgeloos, P., Simoens, P., y Van den Broeck, W. (2011). *Morphological characteristics of the digestive tract of gnotobiotic Artemia franciscana nauplii*. Aquaculture, 321, 1-7.
- Guo, Y., Liu, Z., An, H., Li, M., y Hu, J. (2005). *Nano-structure and properties of maize zein studied by atomic force microscopy*. Journal of Cereal Science, 41, 277–81.

- Heath, H. (1924). *The external development of certain phyllopods*. Journal of Morphology, 38, 453-83.
- Hu, K., y McClements, D. J. (2015). *Fabrication of biopolymer nanoparticles by anti-solvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nano-particles*. Food Hydrocolloids, 44, 101–8.
- Hudson, S. M. (1997). *The spinning of silk-like proteins into fibers*. In K. McGrath, & D. Kaplan (Eds.). Protein-based materials (Chapter 10). Boston: Birkhause.
- Hurtado-López, P.; Murdan, S. (2006) *Zein microspheres as drug/antigen carriers. A study of their degradation and erosion, in the presence and absence of enzymes*. Journal of Microencapsulation 23,3, 303-14.
- Jornet-Martinez, N., Campins-Falco, P., y Hall, E. A. H. (2016). *Zein as biodegradable material for effective delivery of alkaline phosphate and substrates in biokits and biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 86, 14–9.
- Kasaai, M. R. (2018). *Zein and Zein-based nanoparticles for food packaging applications: A global view*. Advanced Science, Engineering and Medicine, 9, 439–44.
- Kashiwakura, M., Seto, A., y Hasegawa, K. (1994). *Heterotrophic microalgal production of docosahexaenoic acid and its use for aquaculture of marine juvenile fish*. In Proc. 3rd Int. Marine Biotech. Conf. Tromso, Norway (p. 61).
- Katouzian, I., y Mahdi, S. (2016). *Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins*. Trends in Food Science & Technology, 53, 34–48.
- Kim, K. R., Ahn, K. Y., Park, J. S., Lee, K. E., Jeon, H., y Lee, J. (2011). *Lyophilization and enhanced stability of fluorescent protein nanoparticles*. Biochemical and biophysical research communications, 408, 225-9.
- Kinne, O. (1977). *Cultivation of animals-research cultivation*, 3: Porifera. Marine Ecology, Vol III (Cultivation), part 2, 5, 627-64.
- Lavens, P., y Sorgeloos, P. (2000). *The history, present status and prospects of the availability of Artemia cysts for aquaculture*. Aquaculture, 181, 397-403.
- Léger, P., Bengtson, D. A., Simpson, K. L., y Sorgeloos, P. (1986). *The use and nutritional value of Artemia as a food source*. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev, 24, 521-623.
- Léger, P., Bengtson, D. A., Sorgeloos, P., Simpson, K. L., y Beck, A. D. (1987). *The nutritional value of Artemia: a review*. Artemia research and its applications, 3, 357-72.
- Livney, Y. D. (2015). *Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions*. Current Opinion in Food Science, 3, 125–135.
- Llosa, J. 2007. *Artemia, Aportes para el Desarrollo de la Acuicultura en el Perú*.
- Lochhead, J. H. (1941). *Artemia, the brine shrimp*. Turtox News, 19, 41-5.

- Luo, Y.; Zhong, B.; Cheng, W. H.; Wang, Q. (2010). *Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating*. Carbohydrate Polymers 82, 942-51.
- Luo, Y.; Zhang, B.; Whent, M.; Yu, L.; Wang, Q. (2011). *Preparation and characterization of zein chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study*. Colloids and Surfaces 85, 145-52.
- Luo, Y.; Teng, Z.; y Wang, Q. (2012). *Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 60, 836–43.
- Luo, Y. C.; Wang, T.T.Y.; Teng, Z.; Chen, P.; Sun, J. H.; Wang, Q. (2013) *Encapsulation of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolymethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability*. Food Chemistry, 139, 224-30.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. y Parker, J. (1999). Brock. *Biología de los microorganismos*. 8a ed. Revisada. Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. 1, 064 p.
- Majack, T.J., M.B. Rust, K.C. Masee, G.W. Kissil, R.W. Hardy y M.E. Peterson. (2000). *Bioencapsulation of erythromycin using adult brine shrimp, Artemia franciscana (Latreille)*. Journal of Fish Disease. 23, 71-6.
- Makridis, P., y Vadstein, O. (1999). *Food size selectivity of Artemia franciscana at three developmental stages*. Journal of plankton research, 21, 2191-201.
- Marshall, S. M. (1973). *Respiration and feeding in copepods*. In *Advances in marine biology*. Academic Press. 11, 57-120.
- Mason, D. T. (1967). *Limnology of Mono Lake, California*.
- Mathias, P. (1932). *Sur le développement de l'oeuf d'un crustacé Phyllopedes (Artemia salina L.)*. Comptes Rendus de l'Academie Scientifique de Paris, 194, 1195-7.
- Medina, G. R. (2012). *El recurso de Artemia de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura*. Universitat de València, 34-36.
- Mejía, G. C., Barrera, T. C., Figueroa, J. L. A., Mejía, J. C., y Andrade, R. D. L. (2007). *Antibiotics incorporation in Artemia franciscana nauplii, metanauplii, juveniles and adults, and their inhibitory action on Aeromonas hydrophila bacteria*. Hidrobiológica, 17, 53-60.
- Mohney, L.; Lightner, D., y Williams, R. (1990). *Bioencapsulation of therapeutic Quantities of the antibacterial Romet-30 in nauplii of the Brine shrimp Artemia and in the Nematode Panagrellus redivivus*. Journal of the World aquaculture society, 21,186-91.
- Monroig, Ó., Navarro, J. C., Amat, I., González, P., Amat, F., y Hontoria, F. (2003). *Enrichment of Artemia nauplii in PUFA, phospholipids, and water-soluble nutrients using liposomes*. Aquaculture International, 11, 151-61.

- Monroig, Ó., Navarro, J. C., Amat, F., González, P., Bermejo, A., y Hontoria, F. (2006). *Enrichment of Artemia nauplii in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (Sparus aurata) larvae*. Aquaculture, 251, 491-508.
- Monroig, O. (2007). *Diseño y optimización de liposomas para uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos*. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Navarro, J. C. (1990). *Caracterización de las cepas españolas de Artemia desde el punto de vista de su valor nutritivo y de sus fenotipos electroforéticos*. Implicaciones prácticas en Acuicultura.
- Navarro, J. C., Amat, F., y Sargent, J. R. (1992). *Fatty acid composition of coastal and inland Artemia sp. populations from Spain*. Aquaculture, 102, 219-30.
- Nelis, H.J.; F.Leger; P. Sorgeloos; P. De Leenheer. 1991. *Liquid Chromatographic Determination of Efficacy of Incorporation of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Brine Shrimp (Artemia spp.). Used for Prophylactic Chemotherapy of Fish*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 35, 2486-9.
- Nimura, Y. (1989). *Shortest gut passage time and gut content volume of Artemia franciscana*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.
- Nordeng, H. y P. Bratland. (1971). J. Coms. Perm. Int. Explor. Mer. 34, 51-7.
- Padua, G. W., y Wang, Q. (2009). *Controlled self-organization of zein nanostructures for encapsulation of food ingredients*. In Q. Huang, P. Given, & M. Qian (Eds.). Micro/ Nano encapsulation of active food ingredients, ACS Symposium Series, 1007 (Chapter 9). Washington, DC: ACS Publication.
- Paliwal, R., y Palakurthi, S. (2014). *Zein in controlled drug delivery and tissue engineering*. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 189, 108–22.
- Parris, N., Dickey, L. C., Tomasula, P. M., Coffin, D. R., y Vergano, P. J. (2001). *Films and coatings from commodity agro-proteins*. In R. A. Gross, & C. Scholz (Eds.). Biopolymers from polysaccharides and agro-proteins, ACS Symposium series, 786, 118–31. Washington, DC: ACS.
- Parris, N.; Cooke, P. H. y Kicks, K. B. (2005). *Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4788-92.
- Patel, A. R.; Bouwens, E. C. M. y Velikov, K. P. (2010). *Sodium caseinate stabilized zein colloids particles*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 12497-503.
- Patel, A. R., y Velikov, K. P. (2014). *Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 19, 450–8.

- Peixoto, D., Amorim, J., Pinheiro, C., Oliva-Teles, L., Varó, I., de Medeiros Rocha, R., y Vieira, M. N. (2019). *Uptake and effects of different concentrations of spherical polymer microparticles on Artemia franciscana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 176, 211-18.
- Petrucci, F., Caimi, S., Mura, G., y Caroli, S. (1995). *Artemia as a bioindicator of environmental contamination by trace elements*. *Microchemical Journal*, 51, 181-6.
- Porter, K. G. (1973). *Selective grazing and differential digestion of algae by zooplankton*. *Nature*, 244, 179.
- Porter, K. G. (1975). *Viable gut passage of gelatinous green algae ingested by Daphnia*. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 19, 2840-50.
- Provasoli, L., y Shiraishi, K. (1959). *Axenic cultivation of the brine shrimp Artemia salina*. *The Biological Bulletin*, 117, 347-55.
- Reeve, M. R. (1963). *Growth efficiency in Artemia under laboratory conditions*. *The Biological Bulletin*, 125, 133-45.
- Riisgård, H. U., y Larsen, P. S. (2000). *Comparative ecophysiology of active zoobenthic filter feeding, essence of current knowledge*. *Journal of Sea Research*, 44, 169-93.
- Riisgård, H. U., Zalacáin, D., Jeune, N., Wiersma, J. B., Lüskow, F., y Pleissner, D. (2015). *Adaptation of the brine shrimp Artemia salina (Branchiopoda: Anostraca) to filter-feeding: effects of body size and temperature on filtration and respiration rates*. *Journal of Crustacean Biology*, 35, 650-8.
- Roque, A., Cuenca, C., Espinosa, A., Bermúdez, C., Bolan, C., y Gómez-Gilr, B. (2004). *Evaluación de la concentración de oxitetraciclina en tejidos de camarón suministrada a través de nauplios de Artemia y de un baño medicado*. *Ciencias marinas*, 30, 219-26.
- Romero-Soto, I. C., Di, O., Leyva-Soto, L. A, Drogui, P. Buelna, G., Díaz-Tenorio, L. M., y Gortáres-Moroyogui, P. (2018). *Degradation of Chloramphenicol in Synthetic and Aquaculture Wastewater Using Electrooxidation*. *Journal of environmental quality*.
- Ruiz Pérez, O. (2008). *Caracterización de diversas poblaciones de Artemia desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos y de sus patrones moleculares*. *Universitat de València*.
- Schrehardt, A. (1987). *A scanning electron-microscope study of the post-embryonic development of Artemia*. *Artemia research and its applications*, 1, 5-32.
- Shields, R. J. (2001). *Larviculture of marine fish in Europe*. *Aquaculture*, 200, 55-88.
- Shin, G. H., Kim, J. T., y Park, H. J. (2015). *Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods*. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 144–57.

- Shukla, R., y Cheryan, M. (2001). *Zein: The industrial protein from corn*. Industrial Crops and Products, 13, 171–92.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., y Candreva, P. (2001). *Use of the brine shrimp, Artemia spp., in marine fish larviculture*. Aquaculture, 200, 147-59.
- Stephens, D. W., y Gillespie, D. M. (1976). *Phytoplankton production in the Great Salt Lake, Utah, and a laboratory study of algal response to enrichment 1*. Limnology and oceanography, 21, 74-87.
- Støttrup, J. G. (2000). *The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture*. Aquaculture Research, 31, 703-11.
- Teixeira, Z., Dreiss, C. A., Lawrence, M. J., Heenan, R. K., Machado, D., Justo, G. Z., Durán, N. (2012). *Retinyl palmitate polymeric nanocapsules as carriers of bioactives*. Journal of Colloid And Interface Science, 382, 36–47.
- Theilacker, G.H. y McMaster, M. F. (1971). *Mass culture of the Rotifer Brachionus plicatilis and his evaluation as a food for larval anchovies*. Marine Biology 10,183-88.
- Tlusty, M. F., Goldstein, J. S., y Fiore, D. R. (2005). *Hatchery performance of early benthic juvenile American lobsters (Homarus americanus) fed enriched frozen adult Artemia diets*. Aquaculture Nutrition, 11, 191-8.
- Touraki, M.; I. Niopas y C. Kastritsis. (1999). *Bioaccumulation of trimethoprim, sulfamethoxazole and NAcetyl-Sulfamethoxazole in Artemia nauplii and residual kinetics in seabass larvae after repeated oral dosing of medicated nauplii*. Aquaculture, 175, 15-30.
- Uriarte, I., Farias, A. y Castilla, J. C. (2001). *Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop Argopecten purpuratus*. Aquac. Eng. 25, 139–47.
- Van Stappen, G., Abotzopoulos, T. J., Beardmore, H. A., Clegg, J. S., y Sorgeloos, P. (2002). *Zoogeography. Artemia: basic and applied biology*. Netherlands/Dordrecht: Kluwer Academic publishing, 171-215.
- Varó, I., Redón, S., Garcia-Roger, E. M., Amat, F., Guinot, D., Serrano, R., y Navarro, J. C. (2015). *Aquatic pollution may favor the success of the invasive species A. franciscana*. Aquatic Toxicology, 161, 208-20.
- Völlmer, C. (1952). *Kiemenfüss, Hupferling and Muschelkrebs*. Die Neue Brehm-Bucherei. Band 57.
- Vos, J., Bernaerts, F., Gabriels, I., y Decler, W. (1979). *Aerobic and anaerobic respiration of adult Artemia salina L., acclimated to different oxygen concentrations*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 62, 545-8.
- Wang, Y., y Padua, G. W. (2012). *Nanoscale characterization of zein self-assembly*. Langmuir, 28, 2429–35.

- Watanabe, T.; F. Oowa, C. Kitajima y S. Fujita. (1980). *Relationship between dietary value of brine shrimp Artemia and their content of W3 highly unsaturated fatty acids*. Bull. Jap. Soc; Scient Fish; 46, 35-41.
- Watanabe, T. (1982). *Lipid nutrition in fish. Comparative Biochemistry and Physiology*. Comparative Biochemistry, 73, 3-15.
- Watanabe, T. (1991). *Importance of decosahexaenoic acid in marine larval fish*. En: Larvi'91. Fish and crustacean larviculture symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Oliverr (Eds.), 19-22.
- Wilson, J. A. (1989). *Nutrición y temperatura corporal*. En: Fundamentos de fisiología animal. Cap. 14. Limusa. (Ed.). McMillan, México. 984 p.
- Wurtsbaugh, W. A., y Berry, T. S. (1990). *Cascading effects of decreased salinity on the plankton chemistry, and physics of the Great Salt Lake (Utah)*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 47, 100-9.
- Wurtsbaugh, W. A. (1992). *Food-web modification by an invertebrate predator in the Great Salt Lake (USA)*. Oceanología, 89, 168-75.
- Zeng, J., Yu, W., Dong, X., Zhao, S., Wang, Z., Liu, Y., y Wang, Y. (2019). *A nanoencapsulation suspension biomimetic of milk structure for enhanced maternal and fetal absorptions of DHA to improve early brain development*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 15, 119-28.
- Zhang, F., Khan, M. A., Cheng, H., y Liang, L. (2019). *Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability*. Journal of Food Engineering, 247, 9-18.
- Zou, T., Li, Z., Percival, S. S., Bonard, S., y Gu, L. (2012). *Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles*. Food Hydrocolloids, 27, 293–300.