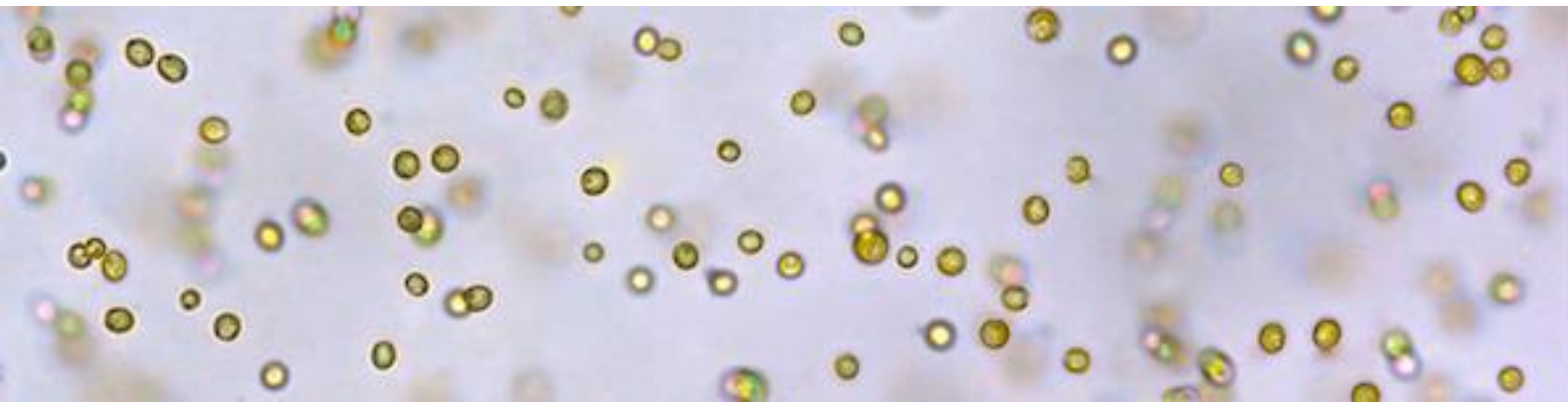


Efecto del tipo de procesamiento de microalgas en la capacidad antioxidante y composición lipídica de presas vivas (rotífero y *Artemia*)

Effects of the different types of microalgae formats in antioxidant capacity and lipid composition of live preys (rotifer and *Artemia*)



Trabajo de Fin de Grado

Annia Mora Martin

Tutorizado por Covadonga Rodríguez González y Diana Reis

Grado en Biología. Marzo 2020.

# Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Importancia y aplicaciones de las microalgas.....	2
2.2. Las microalgas en la acuicultura.....	2
2.3. Papel de los ácidos grasos poliinsaturados y los carotenoides en organismos marinos.....	4
2.4. Presas vivas y cultivo larvario de organismos marinos.....	5
2.5. <i>Isochrysis galbana</i> .....	6
3. Objetivos.....	6
4. Material y métodos.....	7
4.1. Diseño experimental.....	7
4.1.1. Rotífero.....	7
4.1.2. <i>Artemia</i> .....	7
4.2. Análisis de composición lipídica.....	8
4.2.1. Extracción de lípidos.....	8
4.2.2. Determinación de clases lipídicas.....	9
4.2.3. Determinación del perfil de ácidos grasos.....	10
4.3. Composición lipídica de los tratamientos de enriquecimiento de presas vivas.....	11
4.4. Análisis de peróxidos.....	13
4.5. Análisis de TBARS.....	13
4.6. Análisis estadístico.....	15
5. Resultados.....	16
5.1. Supervivencia.....	16
5.2. Contenido de lípido total y composición de clases lipídicas.....	17
5.3. Perfil de ácidos grasos.....	19
5.4. Índice de peróxidos y TBARS.....	21
6. Discusión.....	24
7. Conclusiones.....	28
8. Bibliografía.....	29

## 1. Resumen

Las presas vivas más habituales en los cultivos larvarios marinos, *Artemia* y rotífero, fueron enriquecidas con tres formatos diferentes (fresco, congelado y atomizado) de la microalga *Isochrysis galbana*, con el fin de estudiar su efecto en la supervivencia, el perfil lipídico y la capacidad antioxidante de estas presas vivas. En *Artemia*, los formatos experimentales también fueron contrastados con un producto comercial de *I. galbana*. Ambas especies fueron enriquecidas con los distintos tratamientos en tanques troncocónicos de 5 L, durante un periodo de 24h y por triplicado. Los resultados obtenidos mostraron altas tasas de supervivencia en todos los ensayos de *Artemia* y también con el formato atomizado en los rotíferos mientras que la concentración ensayada de 6g de producto fresco o congelado por millón de rotíferos y en 5 L de cultivo, parece disminuir la calidad de los parámetros de cultivo. El tratamiento con *I. galbana* atomizada resultó ser el más beneficioso en cuanto al contenido de ácidos grasos esenciales (LC-PUFA), aunque la *Artemia* presentó baja concentración de DHA, independientemente del tratamiento ensayado. En cuanto a la capacidad antioxidante, esta fue significativamente superior en la *Artemia*, especialmente cuando esta es enriquecida con el formato de *I. galbana* atomizada.

Palabras clave: *Isochrysis galbana*, *Artemia*, rotífero, LC-PUFA, capacidad antioxidante.

## Abstract

Most common live preys in marine larval culture, *Artemia* and rotifers, were enriched with three different formats (fresh, frozen, and atomised) of microalgae *Isochrysis galbana*, in order to study its effect on survival, lipid profile and antioxidant capacity. In *Artemia*, experimental formats were also compared to a commercial product of *I. galbana*. Both species were enriched in triplicate, in 5 L tanks for 24h. The results showed high survival rates in all *Artemia* treatments and also in atomised treatment on rotifers, whereas fresh and frozen treatments (6g of product in 5 L) seemed to diminish the quality of the culture. Atomised *I. galbana* treatment turned out to be the most beneficial format in terms of essential fatty acids (LC-PUFA) content, however, *Artemia* showed low DHA concentrations, regardless of microalgae format. Antioxidant capacity was significantly higher in *Artemia*, especially when enriched with atomised *I. galbana*.

Keywords: *Isochrysis galbana*, *Artemia*, rotifer, LC-PUFA, antioxidant capacity.

## **2. Introducción**

### **2.1. Importancia y aplicaciones las de microalgas**

Las algas son organismos eucariotas fotosintéticos caracterizados por presentar una gran biodiversidad, y una elevada variedad de morfologías y actividades metabólicas, habitando diferentes hábitats donde ejercen un papel ecológico relevante. Van desde organismos unicelulares microscópicos de 0,2 a 200  $\mu\text{m}$  (microalgas), a pluricelulares de gran tamaño (macroalgas). Gracias a esta diversidad, han conseguido adaptarse a todo tipo de ambientes, tanto acuáticos como terrestres (Norton et al., 1996).

Las microalgas, también conocidas como fitoplancton, se caracterizan por su rápido crecimiento: sus células se duplican en un periodo de uno a diez días, por lo que la producción de biomasa es mayor que en otros tipos de algas. (Santos et al., 2014; Muller-Feuga et al., 2003). Las microalgas están compuestas principalmente por proteínas e hidratos de carbono, y su contenido lipídico puede alcanzar un 50% en peso seco en algunos casos (Dahman et al., 2019; Santos et al., 2014). Otra característica interesante de las microalgas es la facilidad de su cultivo, ya que pueden desarrollarse en pequeños espacios, en sustratos sintéticos o en agua, ya sea dulce, salada o residual y con dióxido de carbono como única fuente de carbono (Dahman et al., 2019).

Este conjunto de características sitúa a las microalgas en un punto de mira de gran relevancia por su combinación de usos, y de cara a la investigación, para continuar desarrollando todas sus potenciales aplicaciones como biocombustible, en el tratamiento de aguas residuales, como biofertilizante en la agricultura, en la obtención de productos de alto valor añadido y de compuestos bioactivos, con aplicaciones en nutrición y salud humana, farmacología, cosmética, etc. Otra aplicación de gran interés consiste en su uso como alimento en acuicultura, tanto para consumo directo como para consumo indirecto a través de presas vivas (Santos et al., 2014; Muller-Feuga et al., 2003).

### **2.2. Las microalgas en la acuicultura**

En el año 2017, la producción mundial de pescado alcanzó los 205,6 millones de toneladas. De esta cantidad, un 54,5% provino de la acuicultura (FAO, 2019). La acuicultura ha contribuido en gran medida al importante crecimiento de la producción mundial de pescado que viene dándose desde mediados del siglo XX, y en el consiguiente aumento del consumo anual medio mundial de pescado, pasando de 9 Kg en 1961 a 20,2 Kg *per cápita* en 2015, y con la previsión de que continúe en ascenso (FAO, 2018).

En un mundo de 7.700 millones de personas, que, según las últimas estimaciones del Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas (ONU), seguirá creciendo hasta alcanzar los 9.700 millones en 2050, la producción de alimentos entra en conflicto con la disponibilidad de recursos. Se considera que la producción acuícola es un extra con respecto a la producción mundial de pescado, y que sirve para compensar el deterioro y la escasez de recursos marinos. Sin embargo, los grandes requerimientos de aceites y harinas de pescado para la alimentación de peces carnívoros suponen un impacto ambiental sobre el océano y la costa. Así, la acuicultura es, a la vez, la posible solución y una potencial responsable del colapso de los recursos marinos (Naylor et al., 2000).

En este contexto, se hace necesario el desarrollo de una industria acuícola sostenible. El uso generalizado de piensos a base de aceites y harinas de pescado es adecuado para la alimentación en acuicultura, debido a su contenido en proteína de alta calidad y en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga ( $\omega$ 3 LC-PUFA, *long chain polyunsaturated fatty acids*), pero depende directamente de la pesca, por lo que se trata de un recurso agotable y por tanto insostenible. En consecuencia, se está investigando la producción de piensos a partir de otras fuentes, principalmente, cultivos vegetales convencionales. Estos han demostrado ser un buen sustituto en cuanto a la tasa de crecimiento del pescado, pero a la vez pueden presentar baja digestibilidad o deficiencia de ciertos aminoácidos esenciales, entre otras desventajas, pudiendo afectar a la calidad nutricional del pescado producido (Shah et al., 2017). Además, las alternativas vegetales son muy ricas en ácidos grasos (AG) de tipo  $\omega$ 6, como el ácido linoleico (18:2n-6), pero no en el tipo  $\omega$ 3, los cuales son imprescindibles para el correcto crecimiento y la calidad del producto (Turchini et al., 2009), por lo que una sustitución completa sería inviable para la mayoría de las especies.

Las microalgas, por su parte, son un recurso sostenible. Son la base de la cadena alimenticia acuática y son fuente de energía y de nutrientes esenciales, tales como vitaminas,  $\omega$ 3 LC-PUFA (EPA; 20:5n-3 y DHA; 22:6n-3) y pigmentos (Ghosh et al., 2016). Actualmente, las microalgas son utilizadas como alimento directo en el cultivo de moluscos bivalvos y crustáceos, y peces en estadio larvario, o bien de manera indirecta, para el enriquecimiento del zooplankton del cual se alimentan las larvas de peces y crustáceos como presas vivas. Estas modalidades pueden realizarse en combinación con la técnica de alimentación del “agua verde”, que consiste en añadir las microalgas al tanque de cultivo, de manera que juegan un papel crucial en la estabilización de la calidad del agua, mediante el consumo de productos derivados y la producción de oxígeno, en el

control microbiano, de forma que aumenta la supervivencia de zooplancton y larvas, en la estimulación del sistema inmune no específico de las larvas, y en el aumento de la frecuencia de alimentación, ya que potencia el contraste visual y la dispersión de la luz en el medio (Ghosh et al., 2016; Halima, 2017; Neori, 2010). En los últimos años, las microalgas han comenzado a considerarse como posible ingrediente mayoritario de piensos, debido a la combinación de su sostenibilidad y su calidad nutricional. Así, las microalgas suponen una alternativa prometedora a los piensos basados en aceites y harinas de pescado (Shah et al., 2017). Su principal inconveniente radica en su elevado coste de producción derivado de la inversión inicial, el mantenimiento y el consumo energético. En menor medida también influyen la poca digestibilidad de algunas especies y el riesgo de contaminación del conjunto de biomasa debido a la forma en la que está estructurado el cultivo. Por el momento, la información existente no es suficiente como para considerar las microalgas un sustituto completo, siendo necesario continuar con la investigación, no solo comprobando su calidad como enriquecedor y como ingrediente para piensos, sino también desarrollando formas de cultivo más eficientes (Santos et al., 2014; Shah et al., 2017) y formatos de comercialización, almacenaje y transporte más asequibles, duraderos y sostenibles.

### **2.3. Papel de los ácidos grasos poliinsaturados y los carotenoides en organismos marinos**

Los lípidos, junto con las proteínas, son los principales constituyentes orgánicos de los peces. Son su principal fuente de energía metabólica, proporcionando alrededor del doble de la contenida en proteínas y carbohidratos (Glencross, 2009; Tocher, 2003). Los AG son los constituyentes mayoritarios de los lípidos. Existen AG de cadena corta (menos de 20C) o de cadena larga (más de 20C), que pueden ser saturados, monoinsaturados o poliinsaturados, y que pertenecen a la serie  $\omega 3$  (n-3),  $\omega 6$  (n-6),  $\omega 9$  (n-9), etc., según la posición de la insaturación más cercana al grupo metilo terminal. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), especialmente el ácido docosaheptaenoico (DHA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido araquidónico (ARA; 20:4n-6), son constituyentes particularmente importantes de los peces, porque desempeñan papeles cruciales en procesos fisiológicos vitales (Glencross, 2009). Están implicados en el mantenimiento de la integridad y la fluidez de la bicapa lipídica, la regulación de la homeostasis, la respuesta inmune e inflamatoria, el funcionamiento de muchos órganos, la modulación de la expresión génica, etc. (Pérez et al., 2014). Además, ni los vertebrados,

ni la mayoría de los animales, son capaces de sintetizar estos AG a partir de sus precursores monoinsaturados (MUFA, *monounsaturated fatty acids*). Únicamente las algas y las plantas son capaces de producirlos, siendo las microalgas la principal fuente en el ecosistema acuático. Por ello, se consideran ácidos grasos esenciales (EFA, *essential fatty acids*), y deben ser proporcionados por la dieta (Tocher, 2003; Tocher, 2010, Wall et al., 2010). El requerimiento, y por tanto la esencialidad de los distintos AG, varía en función del estado de desarrollo y de la especie, siendo más evidente en el caso de la mayoría de los organismos marinos, ya que, en contraposición con la mayoría de las especies dulceacuícolas, no son capaces de sintetizar LC-PUFA a partir de sus precursores de 18C, debido a la falta o a la inactividad de enzimas clave en el proceso (Garrido et al., 2019; Glencross, 2009; Tocher, 2010).

Debido a su gran número de dobles enlaces, los LC-PUFA son altamente susceptibles a la peroxidación lipídica, produciendo lipoperóxidos, y provocando así la pérdida de su valor nutricional (Frankel, 2005). La peroxidación lipídica se produce por la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS, *oxygen reactive species*) y de radicales libres durante algunos procesos metabólicos, pudiendo causar daño celular y tisular. Al ser una reacción en cadena, cuando un AG se ve alterado, este puede promover la peroxidación de otros cercanos. La presencia de antioxidantes en la dieta podría prevenir esta peroxidación de los AG (Jacobsen, 2010). Los carotenoides son pigmentos que se encuentran de forma natural en los organismos fotosintéticos, siendo las microalgas la principal fuente de los mismos en el ecosistema acuático. Además de participar en la coloración de los organismos, los carotenoides están implicados en la protección frente de la radiación ultravioleta, en el buen funcionamiento de la visión y del sistema inmune, y además protegen frente al estrés oxidativo debido a sus propiedades antioxidantes (De Carvalho & Caramujo, 2017). Es por ello que la capacidad antioxidante de los carotenoides es doblemente importante: no solo previene el estrés oxidativo, también disminuye la degradación de los LC-PUFA (Jin et al., 2017).

#### **2.4. Presas vivas y cultivo larvario de organismos marinos**

Las larvas de organismos marinos son muy vulnerables durante las primeras fases de su desarrollo, y presentan requerimientos estrictos para su correcto desarrollo y crecimiento (Hamre et al., 2013). El cultivo larvario de la mayoría de las especies marinas depende de alimento vivo, siendo los rotíferos y los nauplios y metanauplios de *Artemia* los más comunes. El rotífero del género *Brachionus* se caracterizan por su lenta natación

y su pequeño tamaño, por lo que muchas veces se utiliza como alimento en las fases larvianas tempranas. La *Artemia*, por su parte, es un crustáceo anostráceo que se encuentra fácilmente en costas de lagos, lagunas hipersalinas y salinas solares, y se caracteriza por poner huevos protegidos, lo cual supone una enorme ventaja a la hora de su transporte, almacenamiento y conservación. Sin embargo, estos organismos presentan una baja calidad nutricional, por lo que suelen ser enriquecidos con emulsiones lipídicas, microalgas y otros preparados artificiales, de modo que no solo proporcionan energía sino también nutrientes esenciales (Ghosh et al., 2016; Gopakumar et al., 2008).

### **2.5. *Isochrysis galbana***

*Isochrysis galbana* es una especie de microalga marina flagelada perteneciente a la clase Haptophyceae y una de las más utilizadas como alimento en acuicultura marina (Ghosh et al., 2016). La calidad nutricional de esta especie radica en su relativamente alto contenido lipídico, entre 7 y 40% en peso seco (Li et al., 2016), siendo especialmente alto el contenido en DHA, con valores de 8,2 – 11,1% del total de los AG (Liu & Lin, 2001). Su contenido lipídico puede variar en función de las condiciones de cultivo, siendo menor a temperaturas elevadas, alta intensidad de luz y baja disponibilidad de nitrógeno (Li et al., 2016; Sukenik & Wahnou, 1991). Por otro lado, *I. galbana* es también valorada por su riqueza en fucoxantina, un carotenoide ampliamente extendido en el ecosistema marino, con un contenido medio de 18,23 mg/g de muestra en peso seco (Kim et al., 2012).

## **3. Objetivos**

El objetivo principal de este trabajo es determinar el efecto que tiene el tipo de procesado de la microalga *I. galbana* (fresca, congelada o atomizada) sobre la supervivencia, la capacidad antioxidante y la composición lipídica de las presas vivas más utilizadas en el cultivo larvario de especies acuícolas: rotífero y *Artemia*.

Para ello se pretende cuantificar:

- La supervivencia de *Artemia* y rotífero enriquecidos con los distintos tipos de procesado.
- El contenido lipídico, así como el perfil de clases lipídicas y ácidos grasos de *Artemia* y rotífero enriquecidos con los distintos tipos de procesado.
- El estrés oxidativo, mediante el análisis de peróxidos y de TBARS en *Artemia* y rotífero enriquecidos con los distintos tipos de procesado.



## 4. Material y métodos

### 4.1. Diseño experimental

En el marco del proyecto MACBIOBLUE “Nuevos productos y procesos en el ámbito de la biotecnología azul de la Macaronesia” (Intereg, MACBIOBLUE, MAC/1.1B/086), se han enriquecido rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y metanauplios de *Artemia* spp., con tres formatos diferentes de *I. galbana* (fresca, congelada y atomizada) producidos por el socio líder del consorcio del proyecto (ITC, Centro Pozo Izquierdo, Las Palmas de Gran Canaria). Los formatos fresco y congelado del alga consisten en una pasta densa, de consistencia similar a la de la mantequilla, obtenida por centrifugación de la masa algal. Esta masa, congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , permite obtener el formato congelado. El producto atomizado se obtiene en un proceso que dura unas 4-5 horas, en el que el fluido de las microalgas es obtenido por centrifugación e inmediatamente transformado en spray mediante un atomizador que permite un secado muy rápido (segundos), a unos  $60-80^{\circ}\text{C}$ . El cultivo de rotíferos y *Artemia* y los ensayos de enriquecimiento con estos productos de microalgas, se realizaron en el Centro Oceanográfico de Canarias del Instituto Español de Oceanografía (IEO).

#### 4.1.1. Rotífero

Los rotíferos obtenidos de cultivos desarrollados en el IEO de Tenerife fueron cultivados y enriquecidos en tanques troncocónicos de 5 L, a una densidad de 200 ind/mL durante 24h, a temperatura ambiente ( $\sim 22^{\circ}\text{C}$ ) y 28-30 ppt de salinidad. Los cultivos se realizaron por triplicado ( $n=3$ ).

Los tratamientos fueron los siguientes:

- *Tratamiento 1.* 6 g/millón de rotíferos añadiendo al medio *I. galbana* fresca
- *Tratamiento 2.* 6 g/millón de rotíferos añadiendo al medio *I. galbana* congelada
- *Tratamiento 3.* 0,6 g/millón de rotíferos añadiendo al medio *I. galbana* atomizada

#### 4.1.2. Artemia

Los nauplios recién eclosionados de *Artemia* BF (INVE Aquaculture, Bélgica), tras abrir la boca a las 12-24h, fueron cultivados y enriquecidos en tanques troncocónicos de 5 L, a una densidad de 10 ind/mL durante 24h, a temperatura de  $28,8 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ , 36 ppt de salinidad e iluminación continua (24h luz). Los ensayos de enriquecimiento se realizaron por triplicado ( $n=3$ ). A cada tratamiento se le añadió una cantidad equivalente de cada formato del alga para establecer una densidad en el tanque de 1 millón de células/mL.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- *Tratamiento 1.* (Control) – 0,4g/tanque *I. galbana* liofilizada comercial “PhytoBloom Prof” (Necton, Olhão, Portugal).
- *Tratamiento 2.* 0,5g/tanque *I. galbana* fresca
- *Tratamiento 3.* 0,5g/tanque *I. galbana* congelada
- *Tratamiento 4.* 0,05g/tanque *I. galbana* atomizada

Con el fin de evaluar el efecto del enriquecimiento en la supervivencia de la población de rotífero y *Artemia*, se estimó el número de individuos al inicio y al final del experimento (recuento volumétrico del número medio de individuos. mL<sup>-1</sup>). Al final de cada experimento, el contenido restante de cada tanque fue filtrado y lavado con agua (dulce en el caso de rotífero y salada para *Artemia*) para eliminar vestigios del enriquecedor, y fue alicuotado en Eppendorf, y guardado a -80°C hasta su posterior análisis bioquímico.

## **4.2. Análisis de composición lipídica**

Los análisis bioquímicos se llevaron a cabo en el laboratorio del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología (U.D. Fisiología Animal) de la Universidad de La Laguna.

### **4.2.1. Extracción de lípidos**

El análisis de lípidos requiere en primer lugar su extracción. Para ello se ha seguido el método de Christie (Christie, 2003), una modificación del método de Folch (Folch et al., 1957). Este método requiere que el trabajo se realice en condiciones de frío y oscuridad, evitando así alteraciones del perfil lipídico.

Se pesaron entre 250 y 300 mg de muestra en un tubo de ensayo, y se homogeneizaron en un homogeneizador (Virtishear homogenizar, Virtis Company, NY, USA) con 10 mL de cloroformo:metanol (Cl:Met; 2:1 v/v). El homogeneizado se pasó a otro tubo de ensayo a través de un filtro (Filter-Lab, Barcelona, España), para eliminar los residuos sólidos. Se añadieron 2,5 mL de cloruro potásico (KCl; 0,88% w/v) al segundo tubo, para la separación entre las fases liposoluble (fase inferior) e hidrosoluble (fase superior). Las muestras se agitaron en vórtex y se centrifugaron en frío, a 1500 rpm durante 5 minutos en centrífuga (Beckman Coulter Allegra 25R, IN, USA). Posteriormente, se recuperó la fase liposoluble, que fue trasvasada a otro tubo y evaporada

bajo atmosfera de nitrógeno. El extracto seco fue redissuelto y trasvasado a un vial de cristal previamente pesado. El solvente se evaporó de nuevo bajo atmosfera de nitrógeno y se dejaron los viales toda la noche en desecador, en oscuridad y bajo vacío, para eliminar posibles restos de solventes. Al día siguiente, se pesaron nuevamente los viales. La cantidad total de lípido de cada muestra se obtuvo por diferencia de pesada de los viales: contenido lipídico = (peso vial + lípido) – peso vial. El extracto lipídico fue resuspendido a una concentración de 10mg/mL de Cl:Met (2:1 v/v) con 0,01% de BHT y sellado con nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta la realización de los siguientes análisis.

Con el fin de presentar los valores de lípido total (LT) en porcentaje de peso seco, se determinó el porcentaje de humedad de las muestras. Para ello, se pesó una pequeña cantidad de cada muestra en platina y se introdujeron en estufa a 110°C. La cantidad de humedad (H) de cada muestra se obtuvo por diferencia de pesada:  $H = [(peso\ platina + muestra\ fresca) - peso\ platina] - [(peso\ platina + muestra\ seca) - peso\ platina]$ . El porcentaje de H se calculó multiplicando por 100 y dividiendo por el peso de la muestra fresca:  $\% H = (H \times 100) / muestra\ fresca$ .

#### **4.2.2. Determinación de clases lipídicas**

La separación de clases lipídicas (CL) se realizó mediante el método de Olsen y Henderson (Olsen & Henderson, 1989), en cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, *high performance thin layer chromatography*), y doble desarrollo, en placas de sílica gel de 10 cm x 10 cm x 0,15 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las placas previamente lavadas con dietiléter se activaron en estufa a 110°C durante 30 min para quemar las impurezas. Las placas ya activadas se mantuvieron en el desecador hasta su utilización. Se pincharon 6 muestras en cada placa con una pipeta Hamilton, además de un estándar de composición conocida, extraído de huevas de bacalao. Para la separación de los lípidos polares (LP), se preparó una solución de isopropanol, cloroformo, metil acetato, metanol y KCl al 0,25% (5:5:5:2:1,8, v/v). Una vez desarrollada la placa hasta la mitad, se sacó de la cubeta y se dejó secar el resto de solvente bajo campana. Posteriormente, se preparó una solución de hexano, éter y ácido acético (22,5:2,5:0,25, v/v) para la separación de los lípidos neutros (LN), dejando que la placa se desarrollara completamente.

Una vez desarrolladas las placas, estas se tiñeron de forma homogénea con una solución de acetato cúprico al 3% y ácido ortofosfórico al 8%, y se quemaron en estufa a

160°C durante 10 min. A continuación, las placas fueron escaneadas en el CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza) mediante el software winCATS versión 1.4.4, para determinar las bandas correspondientes a las diferentes CL por densitometría. Las imágenes se procesaron mediante el software VideoScan versión 1.02, para obtener la proporción de cada CL de la muestra.

### **4.2.3. Determinación del perfil de ácidos grasos**

Con el objetivo de separar los AG de las diferentes muestras por cromatografía de gases (Christie, 2003), y posteriormente identificarlos y cuantificarlos se realizó una transmetalación de los extractos lipídicos. Al romper los enlaces éster entre los esqueletos hidrocarbonados y los AG, se producen ácidos grasos libres (AGL) que posteriormente se unen a un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>), obteniéndose así ésteres metílicos de AG (FAMEs, *fatty acid methyl esters*) y confiriendo así a los AG la propiedad de ser volátiles y analizables por cromatografía de gases. Para ello, se tomaron 100 µL (1mg) de extracto de LT al cual se añadió un 5% de estándar interno (19:0). Las muestras con el estándar interno fueron evaporadas bajo atmosfera de nitrógeno. A continuación, se añadieron 1 mL de tolueno y 2 mL de ácido sulfúrico al 1% en metanol v/v. Las muestras se introdujeron en un bloque calefactor a 50°C y se dejaron reaccionar durante 16-18h en atmosfera de nitrógeno y oscuridad.

Pasado el tiempo de reacción, se añadieron 5 mL de hexano:dietiléter 1:1 v/v con BHT al 0,01%, y 2 mL de bicarbonato potásico (KHCO<sub>3</sub>) al 2% w/v, agitando fuertemente y centrifugando a 1500 rpm durante 5 min. La fase orgánica superior que contenía los FAMEs se trasvasó a otro tubo. Para asegurar la recuperación de todos ellos, este proceso se repitió una vez más. Las dos fases superiores obtenidas se evaporaron totalmente bajo atmosfera de nitrógeno, se redisolviéron en 100 µL de hexano y se procedió a su purificación. La purificación de los FAMEs se realizó por cromatografía en capa fina (TLC, *thin layer chromatography*) usando placas de TLC de silica gel de 20 cm x 20 cm x 0,25 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). En cada placa, además de 4 muestras también se pinchó un estándar externo, permitiendo así identificar la posición de los FAMEs en la placa. Las placas se desarrollaron por completo en una solución de hexano, dietiléter y ácido acético (90:10:1, v/v). Una vez desarrolladas las placas, se tiñeron con iodina al 1%, pero solo por un lateral (donde se ha pinchado el estándar), y la parte superior de las mismas (donde debe aparecer la mancha correspondiente al BHT). Ello permite identificar y delimitar la zona de sílice conteniendo los FAMEs de cada muestra,

sin impregnarla de yodo, que afecta negativamente a los AG. Una vez identificada la posición de los FAMES, se rascó la sílice correspondiente en tubos de ensayo a los que se añadieron 10 mL de hexano:dietiléter 1:1 v/v (2 mL con BHT al 0,01%, y 8 mL sin). Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se recuperó la fase superior, que contiene los FAMES purificados y se evaporó totalmente el solvente bajo atmosfera de nitrógeno.

Por último, se redisolviéron las muestras en ~700 µL de hexano de alta calidad y se almacenaron en viales de cristal en atmosfera de nitrógeno y en congelador a -20°C hasta su posterior determinación por cromatografía de gases. La cromatografía de gases se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (TRACE-GC, Thermo Scientific, Milán, Italia) con inyección en columna y detector de ionización de llama FID (*Flame Ionization Detector*) que separa los AG según su peso molecular. La identificación de cada AG se realizó con ayuda de un patrón con tiempos de retención conocidos. El contenido de cada AG en las muestras fue expresado en porcentaje del total de AG. La inclusión del 19:0 en el proceso de transmetalación permitió establecer también el contenido absoluto de AG de las muestras. Cuando fue necesario, se confirmó la identidad de los ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (DSQ II, Thermo Scientific, Milán, Italia), bajo las mismas condiciones cromatográficas descritas.

### **4.3. Composición lipídica de los tratamientos de enriquecimiento de presas vivas**

Con el fin de determinar el efecto de los diferentes formatos de *I. galbana* en la composición lipídica de los rotíferos y nauplios de *Artemia* enriquecidos, se analizó la composición de *I. galbana* en sus diferentes formatos (Tablas 1 y 2). Debido a que los formatos del alga congelada y fresca solo varían en cuanto a su estado, fresco o congelado, y a que existen evidencias de que la congelación preserva la composición lipídica (Christie, 2003), únicamente se analizó en formato congelado y los datos se expresaron conjuntamente como congelada/fresca. Se realizó un solo análisis de cada producto ensayado, por tratarse cada uno de ellos, de una única muestra, abundante, pero toda ella de un mismo origen y tipo de procesado, no pudiendo considerarse como réplicas los resultados de análisis repetidos de la misma muestra.

**Tabla 1.** Contenido lipídico (% en peso seco) y composición de clases lipídicas (% de LT) de *I. galbana* en sus diferentes formatos.

	<b>PhytoBloom Prof</b>	<b>Congelada / Fresca</b>	<b>Atomizada</b>
<b>Lípido total</b>	<b>25,6</b>	<b>15,4</b>	<b>16,2</b>
Lisofosfatidilcolina	0,2	0,7	0,3
Fosfatidilcolina	2,0	2,2	2,5
Fosfatidilserina y fosfatidilinositol	2,6	1,5	2,3
Lípido polar desconocido	2,4	1,2	1,2
Fosfatidilglicerol	2,3	0,3	2,3
Fosfatidiletanolamina	1,5	0,6	0,8
Monogalactosildiacilglicerol	4,1	6,3	4,8
<b>Σ lípido polar</b>	<b>15,1</b>	<b>12,8</b>	<b>14,2</b>
Pigmentos	22,9	29,7	25,5
Fitoesteroles y ácidos grasos libres	29,8	35,1	40,4
Lípido neutro desconocido	1,6	1,4	3,8
Triglicéridos	24,3	11,9	16,6
Ésteres de esterol	6,3	4,5	4,4
<b>Σ lípido neutro</b>	<b>84,9</b>	<b>87,2</b>	<b>85,8</b>

**Tabla 2.** Contenido total de ácidos grasos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco) y perfil de los principales ácidos grasos (% del total de AG) de *I. galbana* en sus distintos formatos.

	<b>PhytoBloom Prof</b>	<b>Congelada / Fresca</b>	<b>Atomizada</b>
Total de ácidos grasos	99,9	63,8	87,3
14:0	14,8	16,3	15,9
16:0	13,7	11,3	11,9
18:0	1,4	0,2	0,2
<b>Σ SFA</b>	<b>31,6</b>	<b>28,4</b>	<b>28,9</b>
16:1n-7	6,0	5,2	3,8
18:1n-9	16,8	7,9	8,2
18:1n-7	1,8	1,4	1,3
20:1n-9	0,7	5,4	7,4
<b>Σ MUFA</b>	<b>29,9</b>	<b>24,7</b>	<b>24,5</b>
18:2n-6	9,7	6,1	3,8
20:4n-6 (ARA)	0,3	0,0	0,2
22:5n-6	1,2	2,4	3,6
<b>Σ n-6 PUFA</b>	<b>11,8</b>	<b>9,5</b>	<b>8,3</b>
18:3n-3	9,0	8,0	6,4
18:4n-3	7,8	13,6	14,4
20:5n-3 (EPA)	0,6	0,4	0,4
22:6n-3 (DHA)	6,1	12,1	14,2
<b>Σ n-3 PUFA</b>	<b>24,1</b>	<b>34,3</b>	<b>35,7</b>
n-3/n-6	2,0	3,6	4,3
<b>Σ LC-PUFA</b>	<b>9,2</b>	<b>15,3</b>	<b>18,8</b>
DHA + EPA	6,8	12,5	14,6
ARA/EPA	0,5	0,0	0,5
DHA/EPA	9,7	30,8	34,7

SFA: ácidos grasos saturados, MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, LC-PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, n-3: serie  $\omega$ 3, n-6: serie  $\omega$ 6.

#### 4.4. Análisis de peróxidos

La determinación del índice de peróxidos (IP) se ha basado en un método espectrofotométrico (Shantha & Decker, 1994). Este procedimiento se fundamenta en la capacidad oxidante de los primeros productos de la oxidación de los lípidos: los lipoperóxidos. Si a una muestra lipídica se le añaden iones  $\text{Fe}^{2+}$ , los lipoperóxidos los oxidan a iones  $\text{Fe}^{3+}$ , por lo que midiendo la cantidad de  $\text{Fe}^{3+}$  formado, se puede conocer la cantidad de  $\text{O}_2$  activo que contiene la muestra. El tiocianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) reacciona con el  $\text{Fe}^{3+}$  produciendo una sustancia rosa que absorbe a 500 nm, lo cual permite llevar a cabo la cuantificación del  $\text{Fe}^{3+}$ , tomando de referencia una curva patrón. Así se obtuvo el IP, que se define como los miliequivalentes de  $\text{O}_2$  activo que contiene un Kg de lípido.

En primer lugar, se preparó la curva patrón a partir de una disolución madre de cloruro de hierro III ( $\text{FeCl}_3$ ) a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En nueve tubos se introdujeron distintas cantidades de disolución madre,  $\text{Fe}^{3+}$  y Cl:Met (7:3, v/v) hasta un volumen de 10 mL. Para las muestras, se prepararon 150  $\mu\text{L}$  del extracto lipídico de cada una, en 10 mL de Cl:Met (7:3, v/v). A cada tubo se le añadieron 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de tiocianato de amonio y 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de cloruro de hierro II ( $\text{FeCl}_2$ ). Se agitó vigorosamente y tras 5 min de reacción, se midió la absorbancia a 500 nm en espectrofotómetro (DU 800 spectrophotometer, Beckman Coulter, CA, USA). Con los valores obtenidos se construyó la curva patrón. Por último, se calculó el IP según la relación en la curva patrón de  $\mu\text{g}$  de  $\text{Fe}^{3+}$  frente a la absorbancia:

$$y = a.x + b \rightarrow \text{Abs} = a.\mu\text{g Fe}^{3+} + b$$

$$\text{IP} = \text{meq O}_2 \text{ activo} / \text{Kg lípido} = \frac{(\text{Abs muestra} - b) / a}{m \cdot 55,845 \cdot 2}$$

Donde “a” es la pendiente de la recta patrón, “b” es la ordenada en el origen de la recta patrón, y “m” es la masa del lípido expresada en gramos. El valor 55,845 se refiere al peso atómico del hierro, mientras que el valor 2, hace referencia al oxígeno.

#### 4.5. Análisis de TBARS

El análisis de TBARS (Ohkawa et al., 1979), se basa en la presencia de estos TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*), productos de la peroxidación lipídica, para cuantificar el estrés oxidativo de una muestra lipídica, mediante fluorimetría.

Los TBARS hacen referencia a un conjunto de sustancias que se forman como resultado del daño producido por el estrés oxidativo. Una de estas sustancias es el

malondialdehído (MDA), que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando lugar a un color “bright Pink” que se mide en fluorímetro (Thermo Scientific Appliskan, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia) a 530 nm de excitación / 550 nm de emisión. El nivel de peroxidación lipídica se expresa en nmoles de MDA por mg de proteína, en referencia a una curva patrón calculada a partir de un estándar externo de tetrametoxipropano (TMO).

El primer paso consistió en preparar la disolución madre para la realización de la curva patrón, a partir de TMO y etanol 1:1000, v/v. Se tomaron distintas cantidades de la disolución madre y se disolvieron en la cantidad correspondiente de solución tampón para obtener un volumen total de 144  $\mu$ L. Las muestras también se disolvieron en solución tampón hasta el mismo el volumen, a concentración 1:10, v/v en el caso de rotífero, y a concentración 1:2, v/v en el de *Artemia*. Una vez preparadas la curva y las muestras, a todo ello se le añadieron 36  $\mu$ L de SDS, un detergente, 270  $\mu$ L de ácido acético, que mantiene un pH óptimo para la reacción, y TBA, la sustancia reactiva, y se agitó vigorosamente en vórtex. A continuación, se incubaron en un baño a 95°C durante 1h, y pasado el tiempo, se introdujeron en hielo durante 3 min para detener la reacción. Para terminar, se añadieron 180  $\mu$ L de agua bidestilada y 900  $\mu$ L de n-butanol y piridina 15:1, v/v, para arrastrar los lípidos a una fase orgánica superior, y se agitó en vórtex y se centrifugó a 10.000 G durante 3 min a 4°C. De cada tubo se tomaron 200  $\mu$ L de la fase superior, y se leyeron en el fluorímetro. La peroxidación lipídica se calculó según la relación en la curva patrón de nmoles de MDA frente a la absorbancia:

$$y = a.x + b \rightarrow \text{Abs} = a.\text{nmoles MDA} + b$$

$$\text{Peroxidación lipídica} = \text{nmoles MDA} / \text{mg proteína} = \frac{((\text{Abs muestra} - b) / a) \cdot 2000}{144} / \text{mg proteína} / \text{mL}$$

Donde “a” es la pendiente de la recta patrón y “b” es la ordenada en el origen de la recta patrón. El valor 144 se refiere al volumen contenido en cada tubo en  $\mu$ L, mientras que 2000 se refiere al volumen de la solución tampón.

Para cuantificar el contenido de proteína se usó el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Se trata de un método espectrofotométrico basado en la unión del colorante azul de Coomassie a la estructura terciaria y aminoácidos específicos de las proteínas, formándose un compuesto coloreado que absorbe a 595 nm. En primer lugar, se hizo una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina bovina a las que se les añadió el colorante y se dejó actuar 5 min. Paralelamente se procedió de la misma



forma con las muestras problema. Con la curva se obtuvo la relación de la absorbancia con la concentración de proteína. Cuando medimos la absorbancia de la muestra, se pudo calcular su concentración gracias a esta relación.

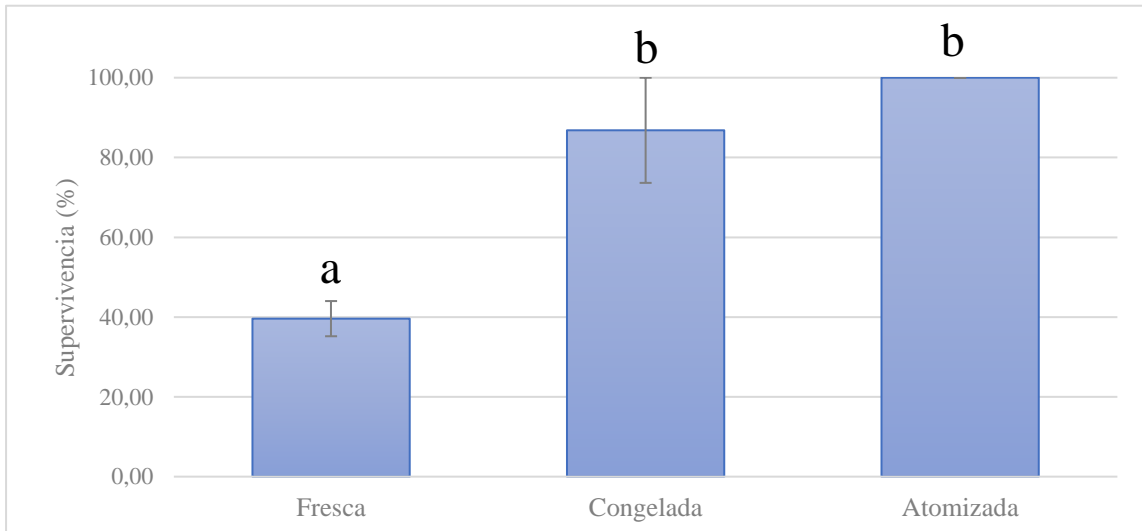
#### **4.6. Análisis estadístico**

La determinación de la normalidad y homocedasticidad de los datos se realizó mediante el test Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente. En el caso de que no se cumpliera alguno de estos supuestos, los datos se transformaron calculando el arcoseno de la raíz cuadrada, o bien el logaritmo en base 10. Una vez confirmadas la normalidad y la homocedasticidad de los datos, se realizó un ANOVA de una vía, para comprobar si los distintos tratamientos tuvieron algún efecto sobre las variables estudiadas, y un test de Tukey para encontrar los tratamientos significativamente diferentes. Cuando la transformación de los datos no fue suficiente para confirmar la normalidad y la homocedasticidad de los datos, el análisis de la varianza se realizó mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, de Welch y de Brown-Forsythe, y para las comparaciones múltiples se utilizaron los estadísticos T3 de Dunnett y la corrección de Bonferroni. Los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ), y las diferencias se consideraron significativas para  $p<0,05$ . Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa IBM SPSS Statistics versión 23.0 para Windows.

## 5. Resultados

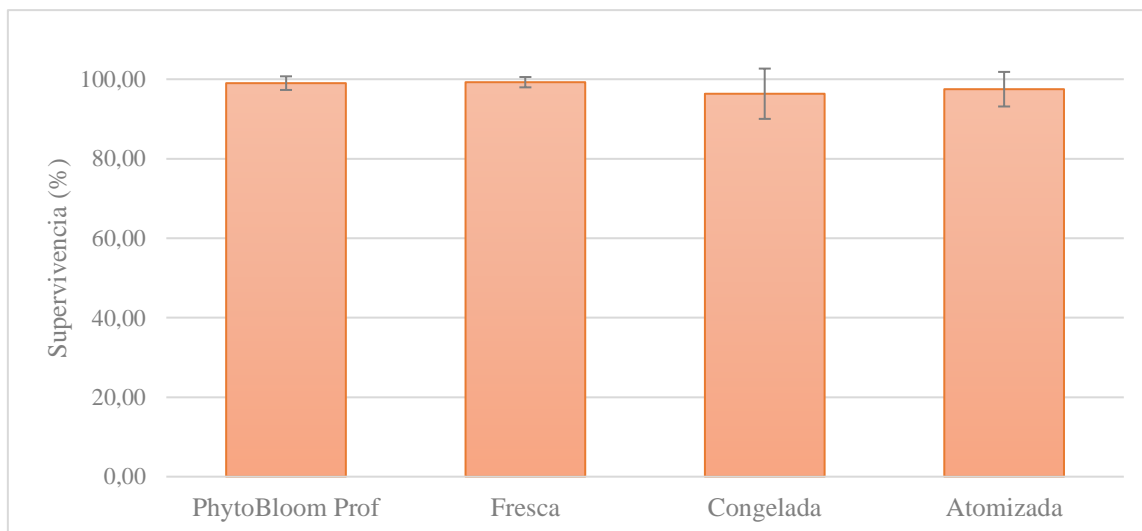
### 5.1. Supervivencia

Las Figuras 1 y 2 muestran la tasa de supervivencia de rotífero y de *Artemia* tras el periodo de enriquecimiento con los diferentes tratamientos. El rotífero enriquecido con *I. galbana* fresca presentó una supervivencia de  $39,6 \pm 4,4\%$  ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, cuando fue enriquecido con *I. galbana* atomizada no se observó mortalidad alguna (Figura 1).



**Figura 1.** Tasa de supervivencia (%) de rotífero enriquecido con los distintos tratamientos. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Las letras a,b representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En relación con la supervivencia del ensayo con *Artemia*, no se observaron diferencias estadísticas tras el enriquecimiento con los diferentes tratamientos (Figura 2).



**Figura 2.** Tasa de supervivencia (%) de *Artemia* enriquecida con los distintos tratamientos. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Las letras a,b representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

## 5.2. Contenido de lípido total y composición de clases lipídicas

Todos los productos ensayados presentan una mayor proporción de LN, principalmente triglicéridos y fitoesteroles, que de LP. Otra clase lipídica abundante son los pigmentos. En comparación con los productos experimentales del ITC, el producto comercial presenta un valor más elevado de LT y triglicéridos (TG), si bien los experimentales son más ricos en pigmentos y fitoesteroles (Tabla 1).

El contenido lipídico del rotífero fue similar entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), con un valor de alrededor del 20% (Tabla 3). Los rotíferos presentaron un elevado contenido de LN, debido mayoritariamente a los monoacilglicéridos y diacilglicéridos (MAG+DAG) y a los TG. Destaca el valor elevado de TG tras el enriquecimiento con *I. galbana* congelada ( $32,2 \pm 1,0\%$ ), suponiendo casi el doble al de los otros dos tratamientos ( $p > 0,05$ ). El contenido de MAG+DAG, fue superior en los rotíferos enriquecidos con *I. galbana* tanto en formato fresco ( $25,3 \pm 5,1\%$ ) como atomizado ( $27,0 \pm 2,4\%$ ) frente al tratamiento con *I. galbana* congelada ( $13,5 \pm 1,3\%$ ).

**Tabla 3.** Contenido lipídico (% en peso seco) y composición de clases lipídicas (% de LT) de rotífero enriquecido con los distintos formatos de *I. galbana*.

	Fresca	Congelada	Atomizada
<b>Lípido total</b>	<b>18,4 ± 0,7</b>	<b>20,8 ± 0,1</b>	<b>20,1 ± 1,6</b>
Lisofosfatidilcolina	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0
Esfingomielina	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
Fosfatidilcolina	3,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,6 <sup>b</sup>
Fosfatidilserina	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
Fosfatidilinositol	1,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>ab</sup>	2,8 ± 0,6 <sup>b</sup>
Fosfatidilglicerol	1,2 ± 0,4	2,0 ± 0,3	1,5 ± 0,3
Fosfatidiletanolamina	4,1 ± 0,6	5,5 ± 0,7	5,5 ± 0,6
Lípido polar desconocido	1,3 ± 0,5 <sup>ab</sup>	2,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>Σ lípido polar</b>	<b>12,6 ± 1,6<sup>a</sup></b>	<b>18,7 ± 1,6<sup>b</sup></b>	<b>17,3 ± 1,4<sup>b</sup></b>
Monoacilglicéridos y diacilglicéridos	25,3 ± 5,1 <sup>b</sup>	13,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	27,0 ± 2,4 <sup>b</sup>
Colesterol	12,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	10,9 ± 0,8 <sup>ab</sup>	9,5 ± 1,6 <sup>a</sup>
Ácidos grasos libres	20,5 ± 1,2 <sup>ab</sup>	17,7 ± 2,7 <sup>a</sup>	24,3 ± 2,4 <sup>b</sup>
Triglicéridos	17,3 ± 2,0 <sup>a</sup>	32,2 ± 1,0 <sup>b</sup>	17,2 ± 2,5 <sup>a</sup>
Ésteres de esteroles	11,6 ± 1,8 <sup>b</sup>	5,8 ± 3,6 <sup>ab</sup>	4,7 ± 0,7 <sup>a</sup>
Lípido neutro desconocido	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0
<b>Σ lípido neutro</b>	<b>87,4 ± 1,6<sup>b</sup></b>	<b>81,3 ± 1,6<sup>a</sup></b>	<b>82,7 ± 1,4<sup>a</sup></b>

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=3). Las letras a,b representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Por otro lado, el colesterol (COL) y los ésteres de esteroles (EE) presentaron contenidos más bajos cuando los rotíferos fueron enriquecidos con *I. galbana* atomizada ( $9,5 \pm 1,6\%$  y  $4,7 \pm 0,7\%$  respectivamente), aunque solo significativamente inferiores respecto al rotífero enriquecido con el formato fresco del alga. Entre los LP destacan por su mayor contenido la fosfatidilcolina (FC) y la fosfatidiletanolamina (FE). El contenido en FC presentó diferencias entre tratamientos, siendo los rotíferos enriquecidos con *I. galbana* atomizada los de mayor porcentaje ( $p < 0,05$ ; Tabla 3).

El contenido lipídico en *Artemia* muestra valores en torno al 14%, excepto cuando es enriquecida con PhytoBloom Prof, donde presenta un valor en torno al 9% a pesar de ser el producto que aportaba mayor cantidad de lípido. No obstante, las diferencias en la *Artemia* no llegan a ser significativas debido a la variabilidad de los datos (Tabla 4). Al igual que en el rotífero, la *Artemia* también presenta un alto contenido en LN, siendo el COL y los TG las clases más abundantes, aunque solo en este último se verificaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), al presentar la *Artemia* tratada con el formato comercial mayor proporción que con el alga atomizada.

**Tabla 4.** Contenido lipídico (% en peso seco) y composición de clases lipídicas (% de LT) de *Artemia* enriquecida con los distintos formatos de *I. galbana*.

	PhytoBloom Prof	Fresca	Congelada	Atomizada
<b>Lípido total</b>	<b>9,3 ± 4,7</b>	<b>16,0 ± 2,2</b>	<b>14,4 ± 3,1</b>	<b>17,6 ± 1,6</b>
Lisofosfatidilcolina	1,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>ab</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
Esfingomielina	1,9 ± 1,4	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,4	0,6 ± 0,3
Fosfatidilcolina	9,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	10,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	13,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	11,8 ± 0,6 <sup>b</sup>
Fosfatidilserina	2,5 ± 0,1	1,6 ± 0,3	2,2 ± 0,0	2,1 ± 0,3
Fosfatidilinositol	4,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,4 <sup>ab</sup>
Fosfatidilglicerol	3,9 ± 0,5	2,8 ± 0,8	2,7 ± 0,0	2,8 ± 0,3
Fosfatidiletanolamina	12,5 ± 0,7 <sup>b</sup>	8,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	9,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	11,1 ± 0,9 <sup>b</sup>
Lípido polar desconocido	2,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	4,3 ± 0,6 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>Σ lípido polar</b>	<b>38,7 ± 2,5<sup>b</sup></b>	<b>32,5 ± 1,6<sup>a</sup></b>	<b>34,4 ± 1,2<sup>ab</sup></b>	<b>34,2 ± 2,2<sup>ab</sup></b>
Monoacilglicéridos y diacilglicéridos	7,7 ± 1,4 <sup>a</sup>	18,0 ± 4,0 <sup>b</sup>	4,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	8,8 ± 1,7 <sup>a</sup>
Colesterol	20,0 ± 2,2	19,9 ± 0,4	20,1 ± 1,8	23,1 ± 4,0
Ácidos grasos libres	2,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	10,6 ± 2,1 <sup>c</sup>
Triglicéridos	25,0 ± 1,5 <sup>b</sup>	22,2 ± 1,9 <sup>ab</sup>	21,2 ± 3,1 <sup>ab</sup>	17,9 ± 0,5 <sup>a</sup>
Ésteres de esteroles	4,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,0 ± 1,2 <sup>b</sup>	5,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
Lípido neutro desconocido	1,7 ± 0,2	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
<b>Σ lípido neutro</b>	<b>61,3 ± 2,5<sup>a</sup></b>	<b>67,5 ± 1,6<sup>b</sup></b>	<b>65,6 ± 1,2<sup>ab</sup></b>	<b>65,8 ± 2,2<sup>ab</sup></b>

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=3). Las letras a,b,c representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

El contenido en MAG+DAG fue superior en la *Artemia* enriquecida con el tratamiento de *I. galbana* fresca, con  $18,0 \pm 4,0\%$ , mientras que en los EE se verificó un mayor contenido al ser enriquecida con *I. galbana* congelada ( $12,0 \pm 1,2\%$ ). Los LP predominantes fueron la FC y la FE (Tabla 4).

### 5.3. Perfil de ácidos grasos

Entre los AG de todos los tratamientos ensayados destacan el 14:0, y 16:0; 16:1n-7 y 18:1n-9; 18:2n-6 y 22:5n-6; 18:3n-3, 18:4n-3 y 22:6n-3. El producto comercial presenta más AG totales, 18:1n-9 y 18:2n-6 que los formatos experimentales. Estos últimos, sin embargo, son más ricos en 22:5n-6, 18:4n-3 y 22:6n-3 (Tabla 2).

El contenido de total de AG del rotífero tiende a ser más elevado cuando ha sido enriquecido con *I. galbana* congelada ( $68,8 \pm 7,0 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), y más bajo con *I. galbana* atomizada ( $46,7 \pm 11,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), pero no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 5). De entre los diferentes AG destacan el 16:0, 16:1n-7 y 18:1n-9. De los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), resaltar el 18:2n-6 y 18:3n-3, como AG principales, con alguna diferencia entre tratamientos. En cuanto a los LC-PUFA, 22:6n-3 (DHA) es el más abundante, y es significativamente mayor en los rotíferos enriquecidos con *I. galbana* atomizada ( $6,6 \pm 0,9\%$ ). Por otro lado, 20:2n-6 y 20:4n-6 (ARA) fueron significativamente mayores en los rotíferos enriquecidos con *I. galbana* en formato fresco ( $1,6 \pm 0,3\%$  y  $1,2 \pm 0,1\%$  respectivamente), siendo, en cualquier caso, más abundantes que lo aportado por las algas, en cualquiera de sus formatos (Tabla 2). Finalmente, al ser el contenido en DHA diferente entre tratamientos, la relación DHA/EPA reflejó también estas diferencias (Tabla 5).

El contenido en AG totales de la *Artemia* presenta diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), verificándose el valor más elevado tras el enriquecimiento con *I. galbana* atomizada ( $90,3 \pm 15,8\%$ ), y el menor, tras el enriquecimiento con PhytoBloom Prof ( $32,1 \pm 14,7\%$ ; Tabla 6), que es el que sin embargo aportó más lípido y AG totales. Se observó un alto contenido en SFA, destacando 16:0 y 18:0. Este último además presenta diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), con un mayor contenido cuando la *Artemia* fue enriquecida con PhytoBlomm Prof ( $10,7 \pm 1,2\%$ ), frente a cuando fue enriquecida con *I. galbana* fresca ( $6,4 \pm 0,3\%$ ). Los MUFA son de nuevo el grupo predominante, con 18:1n-9 como AG principal. Su contenido en el tratamiento con *I. galbana* en formato congelado ( $24,8 \pm 0,7\%$ ) fue mayor que en los demás tratamientos ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 5.** Contenido total de ácidos grasos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco) y perfil de los principales ácidos grasos (% del total de AG) de rotífero enriquecido con los distintos formatos de *I. galbana*.

	Fresca	Congelada	Atomizada
<b>Total de ácidos grasos</b>	<b>55,8 ± 6,2</b>	<b>68,8 ± 7,0</b>	<b>46,7 ± 11,5</b>
16:0	9,7 ± 0,6	10,1 ± 0,9	11,8 ± 1,3
18:0	6,9 ± 1,4	6,9 ± 2,1	9,1 ± 2,0
<b>Σ SFA</b>	<b>22,5 ± 1,6</b>	<b>23,5 ± 1,5</b>	<b>26,6 ± 3,8</b>
16:1n-7	13,7 ± 2,5 <sup>b</sup>	12,4 ± 0,5 <sup>ab</sup>	9,2 ± 1,0 <sup>a</sup>
18:1n-9	16,8 ± 1,7 <sup>b</sup>	16,4 ± 1,1 <sup>b</sup>	13,2 ± 0,7 <sup>a</sup>
18:1n-7	4,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
<b>Σ MUFA</b>	<b>43,6 ± 5,7</b>	<b>43,2 ± 2,8</b>	<b>36,6 ± 2,0</b>
18:2n-6	3,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,0 <sup>b</sup>
20:2n-6	1,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>ab</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>a</sup>
20:4n-6 (ARA)	1,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>
22:5n-6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,8 ± 0,8
<b>Σ n-6 PUFA</b>	<b>6,2 ± 1,2<sup>a</sup></b>	<b>4,6 ± 0,8<sup>a</sup></b>	<b>8,0 ± 1,3<sup>b</sup></b>
18:3n-3	1,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,3 <sup>b</sup>
20:5n-3 (EPA)	2,4 ± 0,5	2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,0
22:6n-3 (DHA)	3,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,9 <sup>b</sup>
<b>Σ n-3 PUFA</b>	<b>13,6 ± 1,6</b>	<b>14,6 ± 1,9</b>	<b>16,8 ± 2,3</b>
n-3/n-6	2,2 ± 0,3	3,3 ± 0,9	2,1 ± 0,1
<b>Σ LC-PUFA</b>	<b>12,4 ± 1,2<sup>ab</sup></b>	<b>11,4 ± 2,7<sup>a</sup></b>	<b>16,3 ± 0,3<sup>b</sup></b>
DHA + EPA	6,2 ± 1,0	5,8 ± 0,4	9,0 ± 0,9
ARA/EPA	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
DHA/EPA	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,4 <sup>b</sup>

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las letras a,b representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). SFA: ácidos grasos saturados, MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, LC-PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, n-3: serie  $\omega 3$ , n-6: serie  $\omega 6$ .

Entre los PUFA distinguimos el 18:2n-6 y el 18:3n-3, cuyos valores aumentan significativamente en el tratamiento con *I. galbana* fresca ( $5,7 \pm 0,2\%$  y  $4,0 \pm 0,2\%$  respectivamente). De los LC-PUFA, el EPA fue el más abundante, muy por encima a lo aportado por los productos algales y el único con diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; Tabla 6). Destacan igualmente los contenidos de ARA superiores a los aportados por los productos de enriquecimiento en todas las *Artemias* enriquecidas, frente al DHA, que sigue la tendencia contraria (Tabla 2 y Tabla 6).

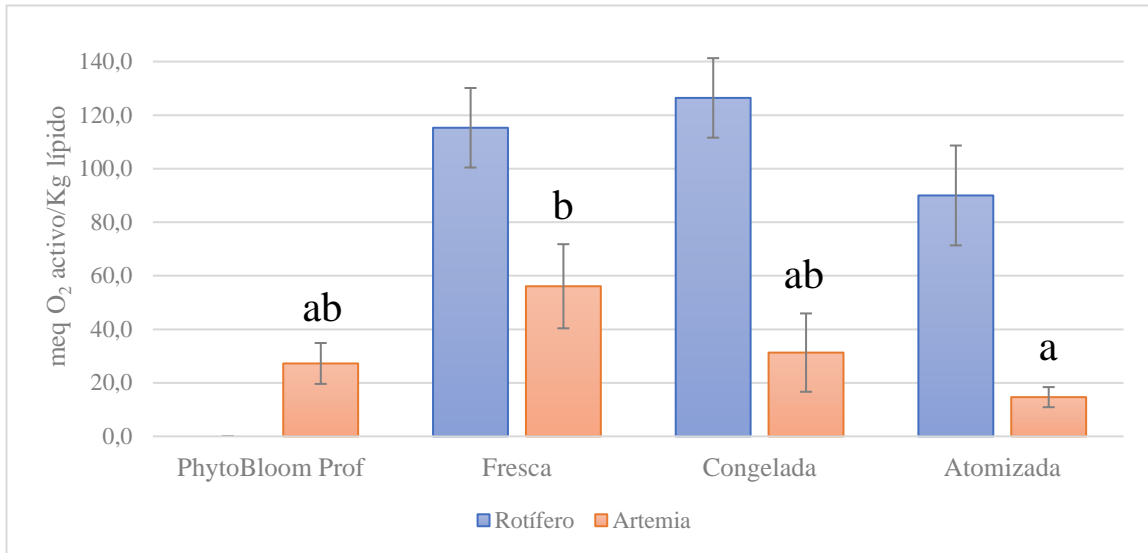
**Tabla 6.** Contenido total de ácidos grasos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco) y perfil de los principales ácidos grasos (% del total de AG) de *Artemia* enriquecida con los distintos formatos de *I. galbana*.

	PhytoBloom Prof	Fresca	Congelada	Atomizada
<b>Total de ácidos grasos</b>	<b>32,1 <math>\pm</math> 14,7<sup>a</sup></b>	<b>64,2 <math>\pm</math> 9,4<sup>ab</sup></b>	<b>64,7 <math>\pm</math> 26,0<sup>ab</sup></b>	<b>90,3 <math>\pm</math> 15,8<sup>b</sup></b>
16:0	10,5 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 0,3	9,9 $\pm$ 0,3	10,6 $\pm$ 0,7
18:0	10,7 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	6,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	11,0 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	9,0 $\pm$ 1,3 <sup>ab</sup>
<b><math>\Sigma</math> SFA</b>	<b>21,5 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>19,6 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>20,2 <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>22,8 <math>\pm</math> 2,0</b>
16:1n-7	7,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	8,9 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	7,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	9,3 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>
18:1n-9	22,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	21,7 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	24,8 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	22,8 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
18:1n-7	13,3 $\pm$ 0,7	13,9 $\pm$ 0,3	14,0 $\pm$ 0,2	13,3 $\pm$ 0,4
<b><math>\Sigma</math> MUFA</b>	<b>51,2 <math>\pm</math> 2,2</b>	<b>49,4 <math>\pm</math> 1,1</b>	<b>53,4 <math>\pm</math> 1,0</b>	<b>49,3 <math>\pm</math> 3,0</b>
18:2n-6	4,6 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	5,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	4,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
20:4n-6 (ARA)	2,7 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,2
<b><math>\Sigma</math> n-6 PUFA</b>	<b>7,3 <math>\pm</math> 2,1<sup>a</sup></b>	<b>8,7 <math>\pm</math> 2,1<sup>b</sup></b>	<b>8,0 <math>\pm</math> 1,9<sup>ab</sup></b>	<b>8,1 <math>\pm</math> 1,9<sup>ab</sup></b>
18:3n-3	2,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	4,0 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	3,2 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	2,9 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>
20:5n-3 (EPA)	9,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	9,0 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	9,4 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	10,8 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
22:6n-3 (DHA)	0,5 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1
<b><math>\Sigma</math> n-3 PUFA</b>	<b>13,7 <math>\pm</math> 3,1</b>	<b>16,3 <math>\pm</math> 3,1</b>	<b>14,2 <math>\pm</math> 3,3</b>	<b>14,4 <math>\pm</math> 3,8</b>
n-3/n-6	1,9 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,2
$\Sigma$ LC-PUFA	12,9 $\pm$ 2,6	13,1 $\pm$ 1,0	12,9 $\pm$ 0,4	14,1 $\pm$ 0,3
DHA + EPA	10,2 $\pm$ 2,4	10,0 $\pm$ 0,9	9,8 $\pm$ 0,1	11,0 $\pm$ 0,4
ARA/EPA	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
DHA/EPA	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Las letras a,b,c representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p<0,05$ ). SFA: ácidos grasos saturados, MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, LC-PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, n-3: serie  $\omega 3$ , n-6: serie  $\omega 6$ .

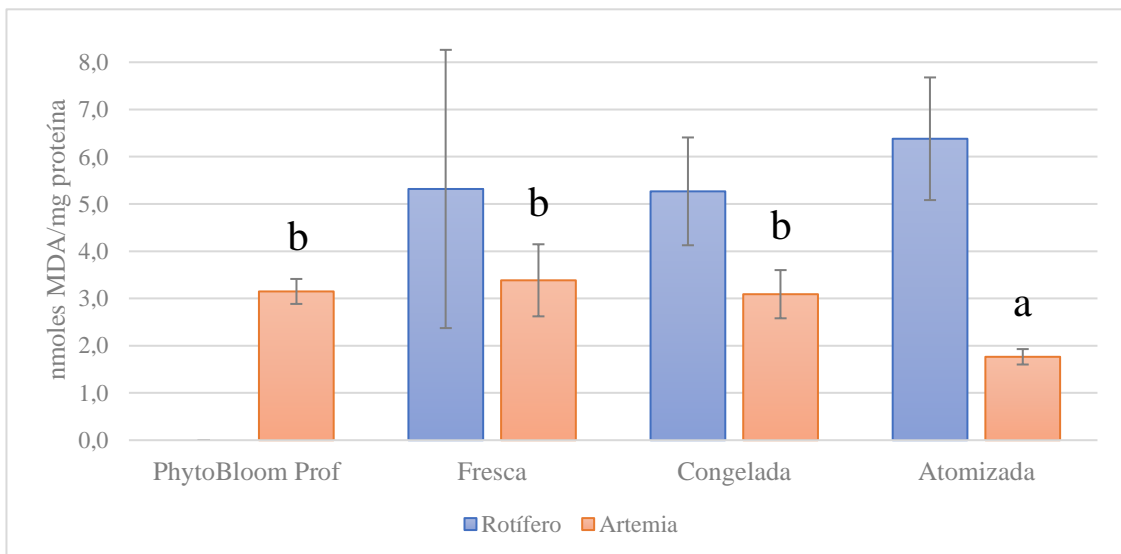
#### 5.4. Índice de peróxidos y TBARS

El IP de rotífero es considerablemente superior al de la *Artemia* (Figura 3). En rotífero, el valor más alto de IP se observó cuando los rotíferos fueron enriquecidos con *I. galbana* congelada ( $126,4 \pm 14,8$  meq  $\text{O}_2$  activo/Kg lípido), seguido del tratamiento con *I. galbana* en formato fresco ( $115,3 \pm 14,9$  meq  $\text{O}_2$  activo/Kg lípido), mientras que en el tratamiento con *I. galbana* en formato atomizado se detectó el valor más bajo de peroxidación ( $90,0 \pm 18,6$  meq  $\text{O}_2$  activo/Kg lípido). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 3).



**Figura 3.** Índice de peróxidos (meq O<sub>2</sub> activo/Kg lípido) de rotífero y *Artemia* enriquecidos con los diferentes formatos de *I. galbana*. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=3). Las letras a,b representan diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

En *Artemia*, el IP con valor más elevado corresponde al de *I. galbana* fresca (56,1 ± 15,7 meq O<sub>2</sub> activo/Kg lípido). El tratamiento con valor más bajo es el de *I. galbana* atomizada (14,7 ± 3,8 meq O<sub>2</sub> activo/Kg lípido). Los tratamientos con PhytoBloom Prof e *I. galbana* congelada presentan valores intermedios (27,2 ± 7,6 y 31,3 ± 14,6 meq O<sub>2</sub> activo/Kg lípido). *Artemia* sí que mostró diferencias significativas entre tratamientos, por lo que hubo un efecto favorable del tratamiento del alga atomizada en el IP.



**Figura 4.** TBARS (nmol MDA/mg proteína) de rotífero y *Artemia* enriquecidos con los diferentes formatos de *I. galbana*. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=3). Las letras a,b representan diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).



Los valores de TBARS en los rotíferos fueron similares entre tratamientos, situándose entre los  $5,3 \pm 2,9$ , al enriquecerse con *I. galbana* fresca y congelada, y los  $6,4 \pm 1,3$  nmoles MDA/mg proteína al enriquecerse con *I. galbana* atomizada. Por otro lado, en la *Artemia*, los diferentes formatos de *I. galbana* ensayados sí han demostrado tener un efecto sobre los valores de TBARS, observándose, una vez más, un menor valor al ser enriquecida con *I. galbana* atomizada ( $p < 0,05$ ; Figura 4).

## 6. Discusión

El uso de rotífero y *Artemia* como presas vivas continúa siendo la opción más común para la alimentación larvaria de organismos marinos (Rogacki et al., 2019). Sin embargo, estos organismos son deficientes de forma natural en LC-PUFA, imperativos para el desarrollo normal y la supervivencia de las larvas, de modo que deben ser enriquecidos antes de ser utilizados como presas vivas (Navarro et al., 1999; Sargent et al., 1999). A pesar del extendido uso de enriquecedores artificiales, la inclusión de microalgas en este proceso es cada vez mayor (Ferreira et al., 2009), debido a su calidad nutricional y a su sostenibilidad (Shah et al., 2017). *I. galbana* es una microalga marina destacada por su contenido lipídico y su perfil de ácidos grasos rico en LC-PUFA como el DHA, además de por su alto contenido en fucoxantina y  $\beta$ -caroteno, carotenoides con importantes propiedades antioxidantes.

En el proyecto MACBIOBLUE, donde se incluyen los experimentos aquí descritos, se pretende evaluar el potencial industrial de especies de microalgas nativas de la Macaronesia, siendo una de ellas la microalga *I. galbana*. Para ello, el presente trabajo se fundamenta en el enriquecimiento del rotífero y la *Artemia* con diferentes formatos de la microalga *I. galbana* producidos en el propio consorcio del proyecto, con el fin de determinar su efecto sobre la supervivencia, estrés oxidativo y nivel de  $\omega$ 3 de cadena larga. En el caso de la *Artemia* se contrastó la efectividad de estos formatos con PhytoBloomProf, otro novedoso producto comercial a base de la misma especie de microalga, que se venía utilizando en el IEO para el cultivo de la *Artemia*, cuando esta está destinada a la alimentación de paralarvas de pulpo común (*Octopus vulgaris*).

Después del periodo de enriquecimiento (24h) la *Artemia* presentó una mortalidad prácticamente nula tanto en el enriquecimiento con PhytoBloom Prof como con los diferentes formatos de *I. galbana* (Fresca, Congelada y Atomizada) producidos por el consorcio, lo que ya es un resultado interesante de cara a la explotación comercial de estos productos. Sin embargo, el tratamiento de *I. galbana* en formato fresco coincidió con una mortalidad de más de la mitad de la población de rotíferos, mientras que con el formato congelado fue del 80%, alcanzando un 100% con el formato atomizado. A la vista de la supervivencia del 100% obtenida con todos los formatos en *Artemia* y con el formato atomizado en el caso del rotífero, parece más bien que los peores resultados de la pasta fresca y congelada en el rotífero se deben a la dosis ensayada de estos productos, del orden de 10 veces superior para un mismo volumen de 5 L del incubador. Ello, unido a

la mayor densidad del cultivo de rotíferos, pudo haber inducido un alto grado de eutrofización que no favoreció la supervivencia, y que concuerda luego con el mayor estrés oxidativo que arroja valores de peróxidos y TBARS más elevados.

Como productores primarios, destaca el perfil lipídico de la microalga ensayada, en cualquiera de sus formatos, destacando cómo es capaz de producir los ácidos grasos esenciales 18:2n-6 y 18:3n-3 y a partir de ellos, ARA, EPA y DHA (Colombo et al., 2020; Khozin-Goldberg et al., 2011). Particularmente destacable en la ruta de síntesis de los  $\omega$ -3 LC-PUFA del alga ensayada es la presencia de importantes cantidades de 18:4n-3, como producto de la desaturación directa del 18:3n-3, y del 22:6n-3 como principal producto final de esta ruta. Respecto a los  $\omega$ -6 LC-PUFA, destaca sin embargo el 22:5n-6 como principal producto final de su ruta biosintética.

Un cambio en el perfil lipídico de la dieta de los organismos marinos de cultivo afecta a la composición de AG de sus tejidos, lo cual puede afectar a su salud, pero también a la salud humana, ya que los productos marinos son nuestra principal fuente de  $\omega$ 3 LC-PUFA, y su escasez o desbalance en nuestra dieta está relacionada con el desarrollo de enfermedades tales como trastornos cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, así como enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas (Pérez et al., 2014; Wall et al., 2010). Salvo determinadas excepciones, el contenido de AG de las dos especies estudiadas (rotíferos y *Artemia*) reflejó el contenido de los tratamientos de enriquecimiento, demostrando que el perfil lipídico es altamente dependiente de la dieta, especialmente tratándose de estos organismos, filtradores pasivos (Hamre et al., 2013; Navarro et al., 1999). Comúnmente *I. galbana* presenta buenas concentraciones de EPA y DHA (especialmente de DHA en nuestros productos), y de ARA en menor medida (Khozin-Goldberg et al., 2011), variando su composición según las condiciones de cultivo. Como se mencionó anteriormente, la *Artemia* y el rotífero son deficientes en LC-PUFA, mientras que presentan una mayor riqueza de 18:3n-3 y 18:2n-6, precursores de estos AG (Sargent et al., 1999). Tras el enriquecimiento, los rotíferos presentaron concentraciones aceptables de los ácidos grasos esenciales, alcanzándose valores de 1,2% de ARA, 2,5% de EPA y 6,6% de DHA. Interesante destacar que estos valores superiores fueron alcanzados cuando los rotíferos fueron enriquecidos con *I. galbana* en formato atomizado, lo que lleva a pensar que el procedimiento de atomización ya descrito pueda favorecer la digestión y absorción de sus componentes. En *Artemia* sorprendieron los altos niveles de EPA y los bajos niveles de DHA en todos los tratamientos, teniendo en cuenta que en *I.*

*galbana* las concentraciones de DHA eran muy superiores a las de EPA. Este valor inferior de DHA podría deberse a la oxidación preferente del DHA por parte de la *Artemia*, además de su capacidad para retroconvertir el DHA en EPA (Díaz-López et al., 2010; Navarro et al., 1999; Reis et al., 2017), haciendo más difícil mantener unos niveles de DHA y un balance DHA/EPA adecuados para las fases larvarias, donde el requerimiento de DHA es más elevado que el de EPA (Hamre et al., 2013). El uso de una novedosa variedad marina de *Artemia* más rica en EPA y pobre en 18:3n-3, justifica también en este caso, la elevada concentración de EPA respecto al enriquecedor.

Los fosfolípidos son LP requeridos como constituyentes estructurales de las membranas, y participan en la digestión, absorción y transporte de lípidos del intestino al resto del cuerpo (Hamre et al., 2013; Tocher, 2003). Estos son esenciales para el correcto desarrollo de la mayoría de las especies marinas (Tocher et al., 2008), no solo como fuente de colina/inositol, sino también como una mejor manera de proporcionar AG esenciales a las larvas (Sargent et al., 1999). Además, la presencia de fosfolípidos en la dieta larvaria es fundamental debido a su ineficiencia para sintetizarlos. En las dos especies estudiadas, los LP más abundantes fueron la FC y la FE. Conseguir valores elevados de estos compuestos es importante en cuanto a que son los fosfolípidos cerebrales mayoritarios (Sargent et al., 1999), y los más abundantes en los huevos de la mayoría de las especies de peces (Tocher, 2003). Además, se ha descubierto que la FC promueve el crecimiento más que otros LP (Hamre et al., 2013). En este sentido, el mejor tratamiento podría ser el de *I. galbana* atomizada, ya que ha mostrado un efecto positivo sobre el contenido de los mismos en *Artemia*. En el caso del rotífero, la *I. galbana* atomizada vuelve a ser el enriquecimiento más recomendable en cuanto al contenido de FC, mientras que para la FE ningún formato de *I. galbana* favoreció su aumento. El enriquecimiento con *I. galbana* atomizada también fue beneficioso en las dos especies con respecto al contenido en FI, importante precursor de segundos mensajeros como el IP3 (*Inositol 3 phosphate*) (Hamre et al., 2013).

Los TG son los componentes mayoritarios de los LN y en general, la clase lipídica más abundante en los organismos acuáticos (Morais et al., 2007; Sargent et al., 1999). Por ello no sorprende su alto valor entre los distintos tratamientos, aunque sí llama la atención en los rotíferos enriquecidos con *I. galbana* congelada, cuyo contenido supone casi el doble con respecto a los otros dos tratamientos. Estos rotíferos tienden a acumular mayor proporción de AG lo que tal vez induce un mayor depósito de los mismos en una molécula eminentemente de reserva energética. El COL, elemento crucial en la fluidez

de las membranas lipídicas, también presenta una cierta abundancia. El alimento natural de los organismos marinos en estadio larvario suele contener más fosfolípidos, ricos en  $\omega$ 3 PUFA, que las dietas artificiales, las cuales presentan mayor contenido en TG, cuyo contenido en  $\omega$ 3 PUFA es menor. Previo enriquecimiento, *Artemia* y rotífero contienen alrededor un 30% de LP y un 70% de LN, mientras que los copépodos suelen presentar relaciones de 50:50%. Las dietas larvarias muy altas en LN resultan en la acumulación de gotas lipídicas en los enterocitos, comprometiendo la absorción de AG, y en última instancia, el crecimiento larvario (Hamre et al., 2013; Morais et al., 2007). En este sentido, la *Artemia* podría considerarse una mejor opción, ya que presentó un contenido en lípido polar algo superior al 30%, mientras que los rotíferos mostraron una relación de LP-LN aproximadamente del 15:85%. La clave se encuentra en conseguir un balance entre los niveles de fosfolípidos y TG en el alimento vivo enriquecido, con tal de obtener una combinación óptima de AG esenciales y AG energéticos (Sargent et al., 1999).

El estrés oxidativo es producido por radicales libres, que pueden causar daño celular y degradación de los AG (Jin et al., 2017). La presencia de carotenoides en *I. galbana*, principalmente fucoxantina (Kim et al., 2012), otorga a las especies enriquecidas con la misma, el potencial de reducir dicho estrés gracias a su naturaleza antioxidante. El análisis de peróxidos y TBARS permite conocer el estado de oxidación de una muestra, de modo que, a niveles más elevados, mayor será la oxidación. En este sentido, ningún tratamiento resultó totalmente efectivo frente a la oxidación en los rotíferos, la cual fue elevada respecto a valores de peróxidos referidos en la bibliografía (Sawada & Carlson, 1987) y a los obtenidos para *Artemia* en el presente estudio. La alta densidad de individuos y la aireación favorecen este ambiente prooxidante. La elevada concentración de producto en el medio y el proceso de elaboración son otros factores que pudieron favorecer el mayor estrés oxidativo de los formatos fresco y congelado frente al atomizado. Sin embargo, en *Artemia*, el control y los tratamientos experimentales con *I. galbana* demostraron una capacidad antioxidante significativamente mejor que en rotífero. Ello es probablemente debido a que la *Artemia* posee elevadas concentraciones de cantaxantina, un pigmento carotenoide con relevante papel antioxidante. Por otro lado, en *Artemia* se trabajó a concentraciones y densidades menos eutrofizantes, obteniéndose igualmente valores de estrés oxidativo inferiores con el formato de microalga atomizada.

## 7. Conclusiones

- A la vista del 100% de supervivencia obtenida en *Artemia* enriquecida con todos los tratamientos y en el rotífero enriquecido con *I. galbana* atomizada, parece recomendable trabajar a concentraciones muy inferiores a la de 6g de *I. galbana* fresca y congelada por millón de rotíferos, ya que parece ser la causante de la peor tasa de supervivencia observada con estos tratamientos.
  - Desde el punto de vista de la calidad nutricional, el formato atomizado parece ser el más adecuado en el enriquecimiento de ambas presas vivas. Si bien la retención de ácidos grasos esenciales LC-PUFA procedentes de las algas, y en particular del DHA, es más efectiva en los rotíferos que en la *Artemia*.
  - En conjunto, la *Artemia* enriquecida con el formato atomizado presenta una mayor protección frente al estrés oxidativo que con los otros formatos ensayados.
  - Bajo las condiciones ensayadas los rotíferos parecen ser más vulnerables a la oxidación que la *Artemia*, por lo que sería recomendable mejorar dichas condiciones de cara a evaluar de forma efectiva la idoneidad de los formatos de microalga ensayados.
- 
- After observing a 100% rate of survival in *Artemia* enriched with all the treatments and in the rotifer enriched with atomised *I. galbana*, it seems recommendable to work with lower concentrations than 6g of fresh and frozen *I. galbana* per million rotifers, as this seems to be the cause of a worse survival rate observed under these treatments.
  - From the nutritional value point of view, atomised format seems to be the most appropriate in enriching both species, even though the retention of LC-PUFA essential fatty acids from algae, particularly DHA, is more effective in rotifers than in *Artemia*.
  - *Artemia* along with atomised format shows a higher protection to oxidative stress than with other tested formats.
  - Under these tested conditions, rotifers seem to be more vulnerable to oxidation than *Artemia*, therefore it would be recommendable to improve said conditions in order to effectively evaluate the suitability of algae tested formats.

## 8. Bibliografía

- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Christie, W.W.** (2003). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, (Bridgwater, England).
- Colombo, S.M., Rodgers, T.F., Diamond, M.L., Bazinet, R.P., & Arts, M.T.** (2020). Projected declines in global DHA availability for human consumption as a result of global warming. *Ambio*, 49(4), 865-880.
- Dahman, Y., Syed, K., Begum, S., Roy, P., & Mohtasebi, B.** (2019). Biofuels: Their characteristics and analysis, pp.277-325. In: Verma, D., Fortunati, E., Jain, S., & Zhang, X. (eds.), *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy*. Woodhead Publishing.
- De Carvalho, C.C., & Caramujo, M.J.** (2017). Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: a colorful business with implications for human health. *Frontiers in Marine Science*, 4, 93.
- Díaz-López, M., Pérez, M.J., Acosta, N.G., Jerez, S., Dorta-Guerra, R., et al.,** (2010). Effects of dietary fish oil substitution by Echium oil on enterocyte and hepatocyte lipid metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 155(4), 371-379.
- Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J., & Otero, A.** (2009). Enriching rotifers with “premium” microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Marine Biotechnology*, 11(5), 585-595.
- FAO.** (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Rome, Italy.
- FAO.** (2019). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2019. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Rome, Italy.
- Folch J., Lees, M. & Stanley, G.H.S.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biology Chemistry*, 226, 497-509.
- Frankel, E.N.** (2005). Edwin, N. Frankel (eds.), *Lipid oxidation* (2nd ed.), The Oily Press, Bridgwater, UK.
- Garrido, D., Kabeya, N., Betancor, M.B., Pérez, J.A., Acosta, N.G., et al.,** (2019). Functional diversification of teleost Fads2 fatty acyl desaturases occurs independently of the trophic level. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Ghosh, S., Xavier, B., Edward, L., & Dash, B.** (2016). Live feed for marine finfish and shellfish culture.
- Glencross, B. D.** (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2), 71-124.
- Gopakumar, G., Madhu, K., Jayasankar, R., Madhu, R., Kizhakudan, J.K., et al.,** (2008). Live feed research for larviculture of marine finfish and shellfish. *Marine Fisheries Information Service T&E Ser.*, (197), 1-6.
- Guihéneuf, F., Schmid, M., & Stengel, D.B.** (2015). Lipids and fatty acids in algae: extraction, fractionation into lipid classes, and analysis by gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID), pp.173-190. In: Stengel, D., & Conan, S. (eds.), *Natural products from marine algae*. Humana Press, New York.
- Halima, N.B.** (2017). Why is it important to use algae in aquaculture? *J Biochem Biotech*, 1(1), 11-13.
- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L.E., et al.** (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*, 5, S26-S58.
- Jacobsen, C.** (2010). Challenges when developing omega-3 enriched foods. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 17(4), 251-258.
- Jin, M., Lu, Y., Yuan, Y., Li, Y., Qiu, H., et al.** (2017). Regulation of growth, antioxidant capacity, fatty acid profiles, hematological characteristics and expression of lipid related genes by different dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Aquaculture*, 471, 55-65.
- Kim, S.M., Kang, S.W., Kwon, O.N., Chung, D., & Pan, C.H.** (2012). Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis galbana*: Characterization of extraction for commercial application. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55(4), 477-483.
- Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U., & Cohen, Z.** (2011). LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(4), 905.
- Li, L., Zhang, L., Zhang, Z. & Liu, J.** (2016). Comparison of heat resistance and application potential of two lipid-rich *Isochrysis galbana* strains. *Algal Research*, 20, 1-6.
- Liu, C. P., & Lin, L. P.** (2001). Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis sp.* CCMP1324. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42.

- Morais, S., Conceição, L. E. C., Rønnestad, I., Koven, W., Cahu, C., et al.** (2007). Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture*, 268(1-4), 106-122.
- Muller-Feuga, A., Moal, J., & Kaas, R.** (2003). The microalgae of aquaculture, pp.206-252. In: Støttrup, J. G., & McEvoy, L. A. (eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Navarro, J. C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V. & Amat, F.** (1999). Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture*, 174(1-2), 155-166.
- Naylor, R. L., Goldburg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., et al.** (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017-1024.
- Neori, A.** (2011). "Green water" microalgae: the leading sector in world aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 143-149.
- Norton, T.A., Melkonian, M. & Andersen, R.A.** (1996). Algal biodiversity. *Phycologia*, 35(4), 308-326.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K.** (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Olsen, R.E. & Henderson, R.J.** (1989). The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129(2), 189-197.
- Pérez, J.A., Rodríguez, C., Bolaños, A., Cejas, J.R. & Lorenzo, A.** (2014). Beef tallow as an alternative to fish oil in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Effects on fish performance, tissue fatty acid composition, health and flesh nutritional value. *European journal of lipid science and technology*, 116(5), 571-583.
- Reis, D.B., Acosta, N.G., Almansa, E., Navarro, J.C., Tocher, D.R., et al.** (2017). Comparative study on fatty acid metabolism of early stages of two crustacean species: *Artemia* sp. metanauplii and *Grapsus adscensionis* zoeae, as live prey for marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 204, 53-60.
- Rogacki, T.C., Davie, A., King, E., Esnault, S., Migaud, H., et al.** (2019). Short-term lecithin enrichments can enhance the phospholipid and DHA contents of the polar lipid fraction of *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 510, 122-130.
- Santos, A.M., González-Arechavala, Y., & Martín-Sastre, C.** (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. In: *Anales de mecánica y electricidad* (Vol. 91, No. 1, pp. 20-28). Asociación de Ingenieros del ICAI.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., et al.** (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1-4), 217-229.
- Sawada, M., & Carlson, J.C.** (1987). Association between lipid peroxidation and life-modifying factors in rotifers. *Journal of gerontology*, 42(4), 451-456.
- Shah, M.R., Lutz, G.A., Alam, A., Sarker, P., Chowdhury, M.K., et al.** (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 197-213.
- Shantha, N.C., & Decker, E.A.** (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-424.
- Sukenik, A., & Wahnon, R.** (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97(1), 61-72.
- Tocher, D.R.** (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, 11(2), 107-184.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.Å., Campbell, P.J., & Bell, J.G.** (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280(1-4), 21-34.
- Tocher, D.R.** (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41(5), 717-732.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., & Ng, W.K.** (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10-57.
- Wall, R., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., & Stanton, C.** (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews*, 68(5), 280-289.



## **Agradecimientos**

Para finalizar, me gustaría dar las gracias a la Dra. Diana Reis y a la Dra. Covadonga Rodríguez, por ser mis guías en este último trabajo, y por su dedicación y paciencia. También a todas las personas del laboratorio, por acogerme como a una más durante estos meses. Todos ellos han convertido esta asignatura en mucho más que un simple trabajo. Por supuesto, a mis padres, a mis hermanos y a mi pareja, por su apoyo incondicional e infinito.

Gracias a todos.