

Avances y Perspectivas en Microdietas para Larvas de Peces

Lic. Andrés Rodríguez Aguilera

Universidad Católica de Temuco, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Acuicultura

Apartado Postal Casilla 15-D, Temuco (Chile).

E-mail andresrodriguezaguilera@gmail.com

Resumen

El cultivo larvario de la mayoría de las especies de peces ha dependido hasta ahora, en su primera etapa, de la disponibilidad de presas vivas (rotíferos o artemia, principalmente) como primer alimento. Este tipo de cultivo presenta como desventaja que requiere para su disponibilidad la inversión de una serie de recursos, tales como espacio, tiempo, dinero y mano de obra técnicamente calificada. Es por esto que en los últimos años, se han dedicado numerosos esfuerzos en conseguir el reemplazo de este tipo de alimento por dietas inertes, encontrándose en la literatura muchos trabajos referidos al tema. El objetivo de éste manuscrito es el de presentar dichos estudios e introducir al lector en el campo de la investigación del desarrollo de las microdietas como una alternativa válida en la primera nutrición larvaria.

Palabras claves: Microdietas, Alimento vivo, Cultivo larval, Destete.

Summary

Advances and Perspectives on Fish Larvae Microdiets. Larva culture has depended on the availability of live prey (especially rotifers and artemia) as a first food. This type of culture has some disadvantages, such as the need to invest in a number of resources like space, time, money and qualified manual labour. For those reasons, in recent years much effort has been put into replacing live prey with artificial microdiets, with many studies published in the literature. The aim of this work is summarize that information and to introduce the reader to research on microdiets as a valid alternative to first larval nutrition.

Key words: Microdiets, Live prey, larval culture, first feeding, weaning

Introducción

El cultivo larvario de la mayoría de las especies de peces es dependiente en su primera etapa de la disponibilidad de alimento vivo, ya sean rotíferos o nauplios de artemia (Buchet y cols., 2000; Lazo, 2000; D'Abramo, 2002). Este alimento vivo es altamente eficiente para inducir crecimiento y supervivencia en las larvas (Cahu & Zambonino, 1997), sin embargo presenta la gran desventaja de poseer una incierta calidad nutricional (Muir & Sutton, 1994; Ronnestad y cols., 2001; Takeuchi y cols., 2003) y de requerir para su disponibilidad de la inversión de una serie de recursos, ya sea espacio, tiempo, dinero, etc. conformando los llamados "cultivos auxiliares" que incrementan los costos de producción durante esta fase del cultivo (Cahu & Zambonino, 2001; Copeman y cols., 2001; García-Ortega y cols., 2003). Este alto costo de los cultivos auxiliares, ha llevado a los investigadores a desarrollar estrategias de alimentación que reduzcan al mínimo la etapa de alimentación con presas vivas, tanto iniciando inmediatamente desde la eclosión la alimentación con dietas inertes, como adelantando el tiempo de destete. Numerosos experimentos han sido conducidos con el objeto de adelantar el destete en muchas especies de peces (principalmente marinos). Sin embargo, son muchos los factores que deben ser considerados a la hora de formular una dieta inerte que tenga rendimientos similares o mejores que las presas vivas en cuanto a crecimiento y supervivencia larvaria

(García-Ortega, 2000; Dinis y cols., 2000; Ronnestad y cols., 2000). Debido a lo anterior, la etapa crucial para el desarrollo de una dieta artificial, que condiciona el éxito o fracaso de la misma, es la etapa de formulación de la microdieta. Preguntas como ¿qué ingrediente utilizar? ó ¿cuál es la proporción exacta de nutrientes que debe poseer la microdieta? adquieren gran relevancia a la hora de preparar una dieta que sea eficiente y eficaz para las larvas. Es por esto que el presente trabajo pretende recopilar la información existente hasta la fecha sobre microdietas y entregarla en forma clara y sencilla.

Materiales y métodos

Micro dietas en Larvas de Peces.

I. Componente Enzimático de las Larvas.

Existen muchas consideraciones a tener en cuenta a la hora de desarrollar una micro dieta. La primera guarda relación con la capacidad de las larvas para digerir las micro dietas inertes. Esta capacidad se encuentra estrechamente relacionada con el tipo y cantidad de enzimas digestivas que poseen las larvas en el momento de su eclosión.

El primer hecho importante a señalar es que la mayoría de las larvas en el momento de la eclosión no poseen un estómago funcional. Esto hace que la digestión ácida a base de pepsina no se pueda llevar a cabo y se hable de una digestión alcalina en lugar de una ácida (Díaz y cols., 1995). Esta digestión es regulada principalmente por la hormona peptídica Colecistoquinina (CCK), que regula entre otras la liberación de la bilis y de enzimas digestivas pancreáticas, mostrando además, cierta influencia sobre la actividad motora peristáltica y la regulación del vaciado de intestino y estómago en caso de existir (Ronnestad, 2002). Así, las principales enzimas que participan en la digestión de las larvas, de acuerdo al nutriente o sustrato sobre el cual actúan, son:

- **Proteasas:** Enzimas que participan en la digestión de proteínas, péptidos y aminoácidos. En larvas de peces marinos, generalmente se da a base de proteasas alcalinas secretadas por el páncreas (tripsina y quimotripsina), en la parte posterior del intestino. También participan en el proceso de digestión de proteínas, enzimas secretadas en la membrana intestinal (aminopeptidasas, fosfatasa alcalinas y carboxipeptidasas entre otras) y en el interior de la célula (catepsinas) (Díaz y cols., 1995; Moyano y cols., 1995; Alarcón-López & Martínez-Díaz, 2000; Lazo, 2000; Ronnestad, 2002).
- **Lipasas:** la digestión lipídica es iniciada por la presencia de sales biliares en el intestino anterior y es regulada por la presencia o ausencia de enzimas tales como lipasa neutra no-específica, lipasa pancreática específica y co-lipasa, entre otras (Alarcón-López & Martínez-Díaz, 2000; Lazo, 2000). En general, se sabe que los lípidos son utilizados como fuente primaria de energía justo después de la eclosión (Vázquez y cols., 1994), de lo cual se extrae que las larvas ya traen una batería enzimática desarrollada para la utilización de lípidos desde antes de la eclosión.
- **Amilasas y Maltasas:** los carbohidratos no son tan relevantes para las larvas de peces que obtienen energía a partir de lípidos y proteínas, principalmente. Sin embargo es importante detallar que su digestión en la etapa larval está mediada principalmente por dos tipos de enzimas, las amilasas y las maltasas, absorbiéndose en toda la superficie del intestino (Alarcón-López & Martínez-Díaz, 2000; Lazo, 2000).

Al avanzar el desarrollo del tracto digestivo, las larvas desarrollan un estómago funcional y con esto la capacidad de realizar una digestión en medio ácido debido a la facultad del estómago de contener ácido clorhídrico (HCl), lo cual activa la producción de pepsinógeno, precursor de la pepsina, que participa en la digestión de las proteínas. Con esto, las larvas de peces cambian de una digestión alcalina a una ácida mucho más eficiente. Por tanto su capacidad de digerir dietas inertes se incrementa.

II. Requerimientos Nutricionales de las Larvas.

Proteínas, Péptidos y Aminoácidos Libres.

En peces, las proteínas son uno de los principales constituyentes de tejidos y órganos. Además, son precursoras de otros compuestos nitrogenados como enzimas, hormonas, neurotransmisores, cofactores, etc. (Robaina & Izquierdo, 2000; Houlihan y cols., 1991). Este hecho es particularmente importante durante la fase larvaria, debido al acelerado crecimiento que presentan durante esta etapa, lo que se traduce en mayores requerimientos de aminoácidos para la producción de proteínas que conformarán los tejidos durante el crecimiento y que suplirán además la energía requerida para el metabolismo (Ronnestad y cols., 2000; Lazo, 2000; García-Ortega, 2000). Por lo general, en la formulación de alimentos inertes para larvas se utilizan niveles elevados de proteínas, entre 55-60% en base seca (Lazo, 2000).

Ahora bien, la inclusión de aminoácidos libres y de péptidos de bajo peso molecular en las dietas, podría facilitar la digestión y absorción de proteínas en las larvas de peces (García-Ortega, 2000). Adicionalmente, la batería de aminoácidos en los huevos y larvas con saco vitelino de los peces marinos consiste principalmente de aminoácidos libres (más del 50% del total de aminoácidos), los cuales son rápidamente agotados durante la etapa de absorción del saco (Stottrup, 1993; Lazo, 2000), reduciéndose drásticamente de un 60% a un 10% (Lazo, 2000; Nobuyuki & Takahiro, 1998). Lo anterior sugiere un papel especial de los aminoácidos libres en el metabolismo de los estadios de vida tempranos (Ronnestad y cols., 2000). Algunos estudios sobre las capacidades proteolíticas de las larvas de peces han sugerido que la incorporación de pequeños péptidos o de hidrolizados de proteína en las dietas para larvas mejoran los procesos de desarrollo en el tracto digestivo de las larvas (Cahu y cols., 1995; Cahu & Zambonino-Infante, 1997; 2001; Zambonino-Infante y cols., 1996; Zambonino-Infante & Cahu, 2001).

Pese a lo anterior, es importante mencionar que se han reportado límites para la inclusión de péptidos y aminoácidos libres en las dietas para larvas. En este sentido, Cahu & Zambonino-Infante (1997; 2001) han reportado una reducción en el crecimiento y supervivencia de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) al administrarse altos niveles de péptidos y aminoácidos libres. Este efecto ha sido atribuido a una posible saturación de los sistemas de transporte de estos compuestos en las larvas. Por consiguiente, se hace imperativo encontrar un punto de equilibrio entre los niveles de aminoácidos libres, péptidos y proteínas (García-Ortega, 2000).

Así también, se debe tener en cuenta qué aminoácidos específicos se van a suministrar y en qué cantidad. Por ejemplo, Cahu & Zambonino (2001) reportaron una marcada incidencia del aminoácido libre triptófano sobre la escoliosis en salmón Chum.

Lípidos y Ácidos Grasos.

La importancia de los lípidos en la fisiología de los peces está relacionada con funciones tales como fuente de energía dietética, manutención y funcionamiento de las estructuras de biomembrana, regulación de la fluidez de las membranas celulares, precursor de prostaglandinas, vitaminas liposolubles y transporte de pigmentos

carotenoides, y hormonas, entre otras (Robaina & Izquierdo, 2000). Las micro dietas para larvas de peces suelen contener entre 10-20% de lípidos (Lazo, 2000), lo cual se ve limitado por la técnica de manufactura que se utilice a la hora de desarrollarla (Robaina & Izquierdo, 2000). Así, se hace más fácil introducir lípidos en dietas micro extruidas y micro encapsuladas (hasta un 35% del total en base seca), que en dietas micro articuladas y micro hojuelas (solo hasta un 20% del total en base seca).

Además de los niveles de lípidos, se ha determinado que las larvas de peces marinos requieren suplementos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) para su normal crecimiento (Watanabe y cols., 1989). Así, se han señalado como los ácidos grasos de mayor importancia a considerar en un estudio de requerimientos nutricionales para larvas de peces, a los PUFAs de la serie n-3 y n-6, ácido Docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3), ácido Eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) y ácido Araquidónico (20:4 n-6) (Lazo, 2000; Koven y cols. 1999 - 1998; 2000; Buchet y cols., 2000). En general, se sabe que el requerimiento de DHA es mayor que el de EPA, debido a su importancia en diversas funciones fisiológicas (Watanabe y cols., 1989; Stottrup, 1993; Lazo, 2000). Considerando lo anterior, se deben añadir cantidades importantes de estos dos ácidos grasos debido a la incapacidad de las larvas de peces marinos para re-sintetizar DHA y EPA a partir de precursores de cadena corta como 18 3n-3 (De Silva y cols., 1988 - 1998; Watanabe y cols., 1989; Stottrup, 1993; Sargent y cols., 1999). Por otro lado, se debe buscar el equilibrio entre las cantidades de DHA y EPA a añadir para evitar efectos negativos a nivel neurológico y visual (Cahu & Zambonino, 2001). Como norma general, en la formulación de dietas artificiales para larvas de peces marinos la proporción DHA:EPA es de 2:1 (Lazo, 2000).

Ahora bien, en general se relaciona específicamente a EPA con el éxito en la pigmentación y con el desarrollo del sistema nervioso en numerosas especies de peces. En relación con este punto, se cree que un exceso de EPA, ocasionará una pigmentación defectuosa, tal como ocurre en peces planos (Sargent y cols., 1999). En la literatura se relaciona también DHA con una incidencia sobre la pigmentación, el sistema nervioso, la vitalidad y la aparición de malformaciones (Vázquez y cols., 1994; Sargent y cols., 1999; Cahu & Zambonino, 2001).

El otro ácido graso postulado como importante a considerar en la formulación de micro dietas, es el ácido Araquidónico (20:4 n-6), el cual es el principal precursor de prostaglandinas y leucotrienos, sustancias hormonales de actividad paracrina importantes en la respuesta fisiológica al stress y en los procesos de coagulación y anti-inflamación (Lazo, 2000). Se ha postulado también a este ácido graso como un inhibidor de la pigmentación en algunas especies y como un inductor de la vitalidad en las larvas (Cahu & Zambonino, 2001). Así, se ha relacionado la proporción de ácido Araquidónico con EPA, debido a que estos dos ácidos grasos tienen una suerte de competencia por las ciclo-oxigenasas y las lipo-oxigenasas que producen 2 series de prostanoïdes y 4 series de leucotrienos a partir de ARA, y 3 series de prostanoïdes y 5 series de leucotrienos a partir de EPA. Los eicosanoïdes producidos a partir de ARA son generalmente más activos biológicamente que los producidos desde EPA, observándose una competencia continua entre los compuestos producidos por los mismos receptores celulares de membrana (Stottrup, 1993; Sargent y cols., 1999). En general, se recomienda mantener una proporción de 1,5: 1 de EPA:DHA, en las microdietas formuladas (Lazo, 2000), ya que un exceso de 20:4 (w-6) en la dieta puede inducir una reacción generalizada de estrés en las larvas como consecuencia de una producción excesiva de prostaglandinas (Copeman y cols., 2001; Koven y cols. 2000).

Otro aspecto a considerar dentro de la nutrición de lípidos en larvas de peces, guarda relación con la fuente de lípidos a añadir. En este sentido, la síntesis de fosfolípidos por parte de las larvas de peces, es menor que lo que requiere, razón por la cual, es esencial introducirlos dentro de las dietas. Además, los fosfolípidos se presentan como una mejor fuente de ácidos grasos esenciales para las larvas que los triglicéridos (Sargent y cols., 1999; Cahu & Zambonino, 2001; Cahu y cols., 2002; 2003), ya que la proporción de DHA:EPA en los fosfolípidos es de 2:1, mientras que en el aceite de pescado, compuesto mayormente de triglicéridos, es menor o igual a 1:1. Como consecuencia de lo anterior, se ha sugerido que la proporción de DHA:EPA en el aceite de pescado puede resultar subóptima (Lazo, 2000). Además, recientemente se ha encontrado que los efectos positivos de los fosfolípidos no son solamente atribuibles a su composición y proporción en ácidos grasos esenciales o a sus propiedades emulsificadoras, sino más bien a su estructura básica glicero-fosfórica (ej., fosfoglicerocolina). Esta estructura sirve de esqueleto para la síntesis de fosfolípidos por parte de la larva, lo cual es sumamente importante dada la limitada capacidad que tienen las larvas para sintetizar de nuevo esta estructura glicero-fosfórica (Cahu y cols., 2003). Adicionalmente, los fosfolípidos juegan un papel esencial en el transporte de ácidos grasos que son absorbidos a través de la mucosa intestinal hacia la linfa, y posteriormente al plasma (Lazo, 2000). Recientes trabajos, relacionan además, a los fosfolípidos con el crecimiento, supervivencia y normal desarrollo de las larvas, encontrándose deformaciones y problemas en la pigmentación cuando se registran carencias (Cahu & Zambonino, 2001).

Carbohidratos.

Los peces, obtienen energía mayormente a partir de proteínas y lípidos, y no tanto a partir de los carbohidratos, razón por la cual, en la literatura se les ha comparado con los mamíferos diabéticos (Robaina & Izquierdo, 2000). Pese a lo anterior, las larvas de peces parecen mostrar una mayor preferencia por la obtención de energía a partir de carbohidratos que los peces mayores, tanto así que se han logrado incluir en las dietas algunas formas muy digeribles de carbohidratos, en cantidades que van del 10 – 20% de la dieta sin llegar a afectar el crecimiento ni la supervivencia de manera significativa (Lazo, 2000). Se recomienda pues que la fracción de carbohidratos presentes en una micro dieta formulada no sobrepase el 12% (Cahu & Zambonino-Infante, 2001).

Vitaminas y Minerales.

Se conoce muy poco sobre los requerimientos de vitaminas y minerales de larvas de peces marinos. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en las vitaminas C y E (Lazo, 2000; Cahu y Zambonino-Infante, 2001), aunque existen algunos estudios sobre la vitamina A (Cahu & Zambonino-Infante, 2001), asociándose con efectos sobre la pigmentación y deformidades de las larvas. En la práctica, los niveles de estas vitaminas se suministran en cantidades muy superiores a las requeridas con la finalidad de compensar la pérdida de estos compuestos durante los procesos de fabricación de dietas (Lazo, 2000). Por ejemplo, en el caso de la vitamina C, se recomienda incluir de 2 a 3% del peso seco de la dieta, ya que las pérdidas pueden ser del orden del 20 al 80% (Lazo, 2000).

En relación con los minerales, la mayoría son absorbidos directamente del medio, siendo probablemente el más importante el fósforo, debido a que se encuentra en bajas concentraciones en agua de mar. Por esta razón, se incluyen en micro dietas para larvas de peces marinos, niveles de fósforo disponible de 0.6% (Lazo, 2000).

Actualmente, se utilizan mezclas (premix) de vitaminas y minerales para juveniles de salmónidos, que superestiman las cantidades de vitaminas y minerales requeridas por las larvas de peces.

III. Tipos de Alimento para Larvas de Peces.

Como se ha señalado en numerosas ocasiones durante los párrafos anteriores, el tipo de alimento a suministrar a las larvas, condicionará de manera notable el éxito o fracaso del cultivo que se esté llevando a cabo. A continuación detallaremos los dos tipos de dietas más comúnmente utilizadas en acuicultura, el alimento vivo y el alimento inerte, siendo este último categorizado de acuerdo a la técnica de fabricación que se utilice para ganar un mayor entendimiento.

Alimento Vivo.

Dentro de este tipo de alimento, se cuentan una serie de micro crustáceos, siendo las especies más utilizadas en los cultivos de larvas, los rotíferos y las artemias (Lavens y cols., 1994 – no incluido en ref.). Además de los micro crustáceos, principalmente copépodos (Lazo, 2000), se cuentan entre el alimento vivo de larvas de especies herbívoras y omnívoras las microalgas (Lazo y cols., 2000).

Se ha planteado a modo de hipótesis en numerosos trabajos, que el alimento vivo es mejor digerido que las dietas inertes, debido principalmente a una batería extra de enzimas que haría que este tipo de alimento se digiriera a sí mismo generando un proceso de autólisis (Lazo, 2000). Sin embargo, recientes trabajos (Cahu y Zambonino, 1997 y 2001) han sugerido que las enzimas presentes en el alimento vivo son escasas y no intervienen de manera significativa en la digestión de las larvas.

Otro inconveniente de la alimentación con presas vivas radica en que estas especies son deficientes en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, especialmente en ácido Docohexanoico (DHA). Por lo tanto es indispensable enriquecer previamente el alimento vivo y utilizarlo como vehículo de nutrientes para las larvas (Lazo, 2000; Shields y cols., 1999).

En el caso de las microalgas, se utilizan principalmente en sistemas de cultivo para larvas de especies omnívoras y herbívoras, y se cree que la adición de estas microalgas aportarían enzimas y otras sustancias que facilitarían la digestión del alimento suministrado (Lazo y cols. 2000). Dentro de las especies más utilizadas en el cultivo de larvas de peces encontramos: *Isochrysis galvana*, *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Nanochloris sp.* y *Tetraselmis sp.* entre otras (Lazo, 2000).

Como se podrá notar, el mantenimiento del alimento vivo, así como el enriquecimiento del mismo son procesos de altos requerimientos en espacio, recursos y tecnología, lo cual hace necesario el desarrollo de una estrategia que reemplace este tipo de alimentación, y es ahí donde surge la necesidad del desarrollo de un alimento inerte que posea rendimientos similares al alimento vivo.

Alimento Inerte.

Dentro del alimento inerte utilizado para el cultivo de larvas de peces existen numerosas variedades, las cuales pueden ser diferenciadas de acuerdo al método de fabricación que se utilice para producirlo. Así, en el caso de las microdietas para larvas de peces tendremos tres tipos de microdietas: micropartículas, microcápsulas y hojuelas (Langdon, 2000; Lazo, 2000).

- **Micropartículas:** Para la producción de este tipo de dietas, los ingredientes son llevados a un tamaño adecuado mediante tamices (generalmente 20–80 micras), y luego se mezclan con un aglutinante (agar zeína, gelatina) para mantenerlos

unidos y son pelletizados. Finalmente, mediante procesos mecánicos, son llevados al tamaño deseado (por lo general menor a 200 micras). Si bien son de fácil confección, presentan el inconveniente de perder ingredientes en el agua por efecto de la lixiviación de los nutrientes solubles (Langdon, 2000) debido a que no poseen una pared impermeable, lo que causa una pérdida en la calidad original de la dieta y un rápido deterioro de la calidad del agua (Lazo, 2000).

- Microcápsulas: Los ingredientes son encapsulados en un polímero orgánico natural o sintético (como albúmina de huevo, proteína nylon, nylon - agar, colesterol, etc.). Este polímero debe ser semipermeable y fácilmente digerido por las larvas a través de procesos enzimáticos o bacteriológicos, o bien ser sensibles a cambios de pH (Lazo, 2000). Hoy en día, las microcápsulas utilizadas presentan una variedad amplia de estructuras: algunas son de geometría esférica con una fase interna continua rodeada por una pared también continua (estructura de partícula simple), mientras que otras pueden tener una geometría irregular y pueden tener la fase interna distribuida en una matriz de material de pared (estructuras agregadas) (Pedroza-Islas, 2002). Aunque hay diversas opiniones acerca del intervalo de tamaño al que pertenecen, puede decirse que las microcapsula van desde 0.2 a 5000 μm (Barrows, 2000; Pedroza-Islas, 2002). Para preparar las microcápsulas hay numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos en la literatura de patentes. No obstante algunos autores clasifican los métodos de encapsulación en dos tipos: físicos o mecánicos y químicos. Como métodos químicos pueden citarse: Coacervación compleja, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica y atrapamiento en liposomas. Entre los métodos físicos se encuentran el secado por aspersión y la encapsulación por lecho fluidificado como los más comunes (Pedroza-Islas, 2002). La selección del método estará en función del presupuesto, los costos, las propiedades del material a encapsular, el tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y los mecanismos de liberación (Lazo, 2000).

Dentro de las desventajas de este tipo de dieta, se encuentran la baja solubilidad que pudiera tener para las larvas el compuesto encapsulador y la alta tecnología que requiere su fabricación (Langdon, 2000), sin dejar de considerar que permite tener un gran control sobre la cantidad de nutrientes que se suministra a las larvas.

- Hojuelas: En este tipo de alimento, los ingredientes son molidos y cocidos bajo presión con algún aglutinante, siendo molidos a altas temperaturas (130-190° C) en un tambor rotativo, obteniéndose hojuelas que se muelen fácilmente para ser llevadas al tamaño adecuado para las larvas. Este tipo de dietas presenta el mismo problema de lixiviación de nutrientes que las micropartículas. Se usa principalmente en acuariofilia (Lazo, 2000).

IV. Estrategias de Suministro del Alimento para Larvas.

Con el correr de los años, se han desarrollado diversas formas de suministrar el alimento inerte a las larvas de peces. Con el objeto de clarificar el entorno en el cual se encuentra inmerso el presente trabajo, se describirán las estrategias más utilizadas a la fecha, las cuales son: suministro directo, destete tardío, destete progresivo y co-alimentación.

Suministro Directo

En este caso, las dietas artificiales se suministran cuando las larvas presentan un estado avanzado de desarrollo al iniciarse la alimentación exógena. Se emplea principalmente en especies de agua dulce y salmónidos (Lazo, 2000).

Destete Tardío.

Una vez que la larva desarrolla un estómago funcional, es posible alimentarlas directamente con alimento artificial. Este proceso se denomina destete. Por lo general, se lleva a cabo entre el primer y segundo mes de desarrollo (Lazo, 2000). En ocasiones es difícil lograr que el animal acepte el cambio de alimento vivo a inerte, razón por la cual se postula la tercera estrategia de alimentación conocida como destete progresivo.

Destete Progresivo.

En esta estrategia, el alimento artificial se suministra en conjunto con el alimento vivo desde el inicio de la alimentación exógena. Paulatinamente, se incrementa la proporción de la dieta artificial y se reduce el alimento vivo. Esta estrategia es la que ha reportado el mayor éxito con diversas especies de peces (Lazo, 2000).

Co-Alimentación.

La co-alimentación, es similar al destete progresivo, ya que se le define como alimentar con dietas inertes y vivas al mismo tiempo. La diferencia radica en que esta estrategia de alimentación engloba además la utilización de microalgas (cultivos en agua verde), además de las tradicionales rotíferos y artemia. Se plantea como una estrategia para reducir la utilización de alimento vivo durante la primera alimentación de larvas de peces (Lazo y cols., 2000), siendo importante resaltar que permite que las larvas se acostumbren a la presencia de la microdieta y la asimilen como una parte integrante de su entorno disminuyendo el trauma que significa el destete (Cahu & Zambonino, 2001).

V. Desarrollo de Microdietas.

La principal razón argumentada acerca del porqué de las microdietas no obtienen los mismos resultados que el alimento vivo se debe a las deficiencias nutricionales de aquéllas con respecto a las presas vivas (Ruuhijarvi y cols., 1991; Person Le Ruyet, 1991). Varias dietas artificiales para larvas han sido probadas con éxito relativo. De éstas, los mejores resultados se obtuvieron con las dietas que incluían en su formulación levadura o proteína derivada de organismos unicelulares (García-Ortega, 2000). Sin embargo, con éstas dietas, el crecimiento y supervivencia obtenidos fueron inferiores que los logrados con el alimento vivo. Se pueden obtener tasas de crecimiento más altas al combinar en la alimentación las dietas artificiales con un suplemento de alimento vivo o mediante la co-alimentación (Lazo y cols., 2000; Walford & Lam, 1991; Marte & Duray, 1991; Mookerji & Ramakrishna-Rao, 1991; Koskela & Pirhunen, 1991; Tandler & Kolkovski, 1991). Así también, en la literatura se critica el destete abrupto, debido a que además de reducir el crecimiento y la supervivencia de las larvas (Devresse y cols., 1991), induciría el canibalismo (Juario y cols., 1991).

Una corriente muy popular en la década pasada postulaba que las microdietas debían emular la composición nutricional del saco vitelino de las larvas al momento de la eclosión (Vázquez y cols., 1994). Sin embargo, recientes trabajos han desmentido dicha afirmación debido a que las larvas comienzan a consumir el saco desde antes de la eclosión, además de que la calidad del saco vitelino varía de acuerdo a factores

tales como la temperatura y la calidad nutricional de los reproductores, haciéndose relativa la composición de nutrientes que presenta (Yufera y cols., 1993).

A pesar de los denodados esfuerzos realizados para obtener microdietas comparables al menos, con el alimento vivo, hasta la fecha no se han logrado buenos resultados, lo cual ha llevado a la incorporación de nuevas tecnologías aplicadas a la confección de microdietas y a la utilización de ingredientes novedosos, los cuales se hacen interesantes de revisar a continuación.

Ingredientes más Utilizados e Innovaciones.

Existen numerosos ingredientes utilizados para la conformación de microdietas. Con el objeto de revisarlos de una manera ordenada, se presentarán a continuación de acuerdo a su principal aporte nutritivo, siendo los más importantes aquellos que aportan proteínas y lípidos.

- Proteínas: Entre las fuentes más utilizadas de proteínas en microdietas para larvas de peces se pueden contar la tradicional harina de pescado (Cahu & Zambonino, 1997; Alam y cols., 2001; García-Ortega y cols., 2002 y 2003; Kanazawa y cols., 1989; Wu y cols., 2002), harina de camarón (Shrimp meal) (Cahu & Zambonino, 1997; García-Ortega y cols., 2003; Cordova-Murueta & García-Carreño, 2002), harinas de algunos tipos de moluscos (Cahu & Zambonino, 1997; Kanazawa y cols., 1989; Villanueva y cols., 2002), harina de calamar (Cahu & Zambonino, 1997; Koven y cols., 1999; Alam y cols., 2001; García-Ortega y cols., 2003; Kanazawa y cols., 1989; Salhi y cols., 1994 Villanueva y cols., 2002), harina de Krill (Kanazawa y cols., 1989; Villanueva y cols., 2002), harina de Cefalópodo (Yufera y cols., 1993 - 1999), entre otros. Sin embargo, estos ingredientes tienen el inconveniente de no ser bien digeridos por las larvas, razón por la cual, en los últimos ensayos, se ha optado por adherir en las dietas proteínas que sean más fáciles de digerir o pre-digeridos, como son los hidrolizados de harinas, los péptidos, o simplemente aminoácidos libres dentro de las dietas. Algunos de los ingredientes utilizados que presentan estas características son: la caseína (Alam y cols., 2001; Bergot y cols., 2002; García-Ortega y cols., 2002; Fontagne y cols., 2000; Yufera y cols., 1993-1999), caseína hidrolizada (Bergot y cols., 2002; Yufera y cols., 1993-1999), harina de calamar hidrolizada (Kolkovski & Tandler, 2000), hidrolizado de Krill (Cordova-Murueta & García-Carreño, 2002) e hidrolizado de pescado (Cordova-Murueta & García-Carreño, 2002), entre otros.

Pese a lo anterior, aún no se logra dar con el ingrediente perfecto que sirva como fuente de proteína para las larvas. Es por esto que también se ha optado por ingredientes no-tradicionales, presentados a nivel de experimentos y que se espera que alcancen revuelo en su utilización en un futuro cercano como son los Cistes Descapsulados de Artemia (García-Ortega, 2000; García-Ortega y cols., 2003) y la Harina de Gónada de Atún (García-Ortega y cols., 2003) que han sido destacados como un camino a seguir en el desarrollo de microdietas. Principalmente, con la harina de quistes de Artemia se obtuvieron interesantes resultados en las pruebas realizadas a la fecha.

Tabla 1. Fuentes de Proteínas utilizadas en la elaboración de microdietas para cría larvaria en acuicultura y autores que los proponen.

Fuentes de Proteínas	
Harina de pescado	Cahu y Zambonino, 1997; Alam y cols., 2001; García-Ortega et al 2002; Kanazawa y cols., 1989; Wu y cols., 2002.
Harina de camarón	Cahu y Zambonino, 1997; Garcia-Ortega y cols., 2003; Cordova-Murueta y Garcia-Carreño, 2002.
Harina de almeja	Cahu y Zambonino, 1997; Kanazawa y cols., 1989; Villanueva y cols., 2002
Harina de calamar	Cahu y Zambonino, 1997; Koven et al, 1998 - 1999; Alam et al, 2001; Garcia-Ortega y cols., 2003; Kanazawa et al, 1989; Salí et al, 1994; Villanueva et al, 2002
Harina de soja	Kanazawa et al, 1989
Harina de krill	Kanazawa et al, 1989; Villanueva et al, 2001
Harina de cefalópodo	Yufera et al, 2001
Harina secada en seco de moluscos	Villanueva et al, 2002
Proteína concentrada de peces	Cahu y Zambonino, 1997
Caseína	Alam y cols. 2001; Bergot et al, 2002; Garcia-Ortega y cols., 2002; Fontagne y cols., 2000; Yufera et al, 1993 -1999
Concentrado soluble de proteína de pescado	Fontagne y cols., 2000
Harina de calamar hidrolizada	Kolkovski y tandler, 2000
Hidrolizado de krill	Cordova-Murueta y Garcia-Carreño, 2002
Hidrolizado de pescado	Cordova-Murueta y Garcia-Carreño, 2002
Caseína Hidrolizada	Bergot y cols., 2002; Yufera y cols., 1993 - 1999
quistes descapsulados de artemia	Garcia-Ortega y cols., 2000, 2003
Gónada de atún	Garcia-Ortega y cols., 2003
Aminoácidos libres (arg y lis)	Alam y cols., 2001

- Lípidos: dentro de los ingredientes utilizados para añadir lípidos a las microdietas, se encuentran los tradicionales aceite de pescado (Cahu y cols., 2003; Kolkovski & Tandler, 2000; Bergot y cols., 2002; García-Ortega y cols., 2002; Yufera y cols., 1993-1999) y aceite de hígado de bacalao (Cahu & Zambonino, 1997; Alam y cols., 2001; Pedroza y cols., 2000; Kolkovski & Tandler, 2000; García-Ortega y cols., 2003), Pese a lo anterior, en los últimos tiempos se han buscado otras fuentes que resulten más beneficiosas para las larvas, ya sea en su composición de ácidos grasos, como en la fuente proveedora de lípidos (como los fosfolípidos). Así, en la actualidad se ha optado en la mayoría de los trabajos con microdietas por incluir también Lecitina de poroto de soya (Cahu & Zambonino, 1997; Cahu y cols., 2003; Alam y cols., 2001; Pedroza y cols., 2000; Kolkovski & Tandler, 2000; García-Ortega y cols., 2003) y Ácidos grasos de la serie n-3 y n-6 purificados (Bergot y cols., 2002; Salhi y cols., 1994; Fontagne y cols., 2000). Entre los ingredientes utilizados como fuentes de lípidos, no deja de llamar la atención que en algunos experimentos se utilicen enriquecedores de alimento vivo como el Super Selco (Villanueva y cols., 2001–2002), además de poseer una conformación de ácidos grasos adecuada para las larvas de peces, también posee dentro de su formulación vitaminas y minerales, lo que hace que sea un interesante ingrediente, a pesar de su alto precio.

Tabla 2. Fuentes de Lípidos utilizadas en la elaboración de microdietas para cría larvaria en acuicultura y Autores que los proponen.

Fuentes de Lípidos	
Aceite de hígado de bacalao	Cahu y Zambonino, 1997; Alam y cols., 2001; Pedroza y cols., 2000; Kolkovski y Tandler, 2000; Garcia-Ortega y cols., 2003
Lecitina de soja	Cahu y Zambonino, 1997; Cahu y cols., 2003; Alam y cols., 2001; Pedroza y cols., 2000; Kolkovski y Tandler, 2000; Garcia-Ortega y cols., 2003
Aceite de pescado	Cahu y cols., 2003; Kolkovski y Tandler, 2000; Bergot y cols., 2002; Garcia-Ortega y cols., 2002; Yufera y cols., 1993 - 1999
Aceite de capelín	Koven y cols., 1998
Ácidos grasos esenciales (EPA, DHA y ARA)	Bergot y cols., 2002; Salhi y cols., 1994; Fontagne y cols., 2000
Super Selco	Villanueva et al, 2001

- Carbohidratos y otros Ingredientes: Los peces, en general, no utilizan en demasía los carbohidratos. Es por esto que llama la atención que para las fases larvarias, algunos trabajos (Tabla 3) incluyan dentro de sus microdietas algunas formas pre-digeridas de carbohidratos como son el almidón de maíz precocido (Cahu & Zambonino, 1997; Alam y cols., 2001; Pedroza y cols., 2000; Cordova-Murueta & García-Carreño, 2002; Wu y cols., 2002) y la dextrina (García-Ortega y cols., 2003; Bergot et al, 2002; García-Ortega y cols., 2002; Fontagne y cols., 2000; Yufera y cols., 1993-1999). Además de los requerimientos de nutrientes, los organismos en general también presentan requerimientos de vitaminas y minerales. En la práctica, estos requerimientos son satisfechos con la adición de pre-mezclas (premix) especialmente formuladas de vitaminas y minerales, y con la adición de cantidades separadas de las vitaminas más necesarias, especialmente de vitamina A y C (Cahu & Zambonino, 1997; García-Ortega y cols., 2003; Alam y cols., 2001). Además de la utilización de vitaminas y minerales, se plantea en la literatura la utilización de otros componentes que actúan sobre la flora intestinal de las larvas, como es el caso de la adición de levaduras vivas en las microdietas (para mayor información, ver los trabajos de Cahu & Zambonino, 1997 y Tovar y cols., 2000).

Tabla 3. Otros ingredientes utilizados en la elaboración de Microdietas.

Fuentes de Otros Compuestos	
Almidón precocido	Cahu y Zambonino, 1997; Alam y cols., 2001; Pedroza y cols., 2000; Cordova-Murueta y García-Carreño, 2002; Wu y cols., 2002
Dextrina	García-Ortega y cols., 2003; Bergot et al, 2002; García-Ortega y cols., 2002; Fontagne y cols., 2000; Yufera et al., 2001 1993 - 1999
Levadura láctica	Cahu y Zambonino, 1997; Tovar et al, 2000.
Mezcla de vitaminas	Cahu y Zambonino, 1997; García-Ortega y cols., 2003; Alam y cols., 2001
Suplementos de vitaminas (A y C)	Kolkovski y Tandler, 2000
Mezcla de minerales	Cahu y Zambonino, 1997

A pesar de los esfuerzos abocados a conseguir ingredientes adecuados para el desarrollo de microdietas para larvas de peces, hasta la fecha, aún no se logra un consenso entre los investigadores acerca de cuales son los mejores ingredientes para la fabricación de microdietas. Se espera que en un futuro cercano, los científicos del mundo acierten en su búsqueda de los ingredientes claves para alcanzar finalmente esta meta.

Evaluación de una microdieta.

En larvas de peces, la diferenciación morfológica y enzimática ocurre durante la alimentación exógena, distinguiéndose entre los factores que originan dicha diferenciación, tres tipos: factores externos no-programados, factores centrales (pre-programados desencadenados por una sustancia liberadora central como una glándula endocrina) y locales (pre-programados por un temporizador local en el tracto digestivo) (Dabrowski, 1991). Esta diferenciación condicionará fuertemente el éxito o fracaso de la microdieta, lo cual hace que a la hora de evaluar un alimento inerte, se haga imprescindible estimar las cualidades de la microdieta, además de las capacidades digestivas de la especie en la cual se esté trabajando (Bengston, 1991). En general se propone para una evaluación eficiente estimar la calidad de la microdieta en el medio de cultivo, determinada por la estabilidad en el agua (en su composición y tiempo de disponibilidad para las larvas) (Bengston, 1991; Rice et al, 1994), su interacción con las larvas de peces medida como palatabilidad (Rice y cols., 1994) y digestibilidad por parte de las larvas (Kanazawa y Teshima, 1988; Bengston, 1991; Rice y cols., 1994), además se deben considerar estudios acerca del tamaño de partícula adecuada para las larvas (Kanazawa y Teshima, 1988).

Para evaluar la calidad de la microdieta en el medio de cultivo, Rice y cols. (1994), proponen, entre otras cosas, evaluar el tiempo que una cantidad conocida de microdieta permanece en la superficie, en la columna de agua y en el fondo, siendo considerada aceptable una dieta cuanto mayor sea el tiempo que permanezca disponible para las larvas en la columna de agua, sin que varíe demasiado su condición nutricional, siendo esto último a su vez, sujeto a evaluación para considerar la pérdida de nutrientes por efecto de la lixiviación (Rice y cols., 1994; Langdon, 2000). En este sentido se plantea analizar químicamente partículas de alimento recobradas desde el agua a varios intervalos de tiempo (Bengston, 1991) para así estimar el grado de impacto que sufre el medio de cultivo al añadir la microdieta (Rice y cols., 1994).

Para la evaluación de la interacción de las larvas con el alimento inerte, la palatabilidad de la dieta se puede estimar visualmente (Bengston, 1991) y la digestibilidad de la dieta se puede notar indirectamente mediante los índices de crecimiento, muy utilizados en el cultivo de peces (SGR, GF3, FC, CUT, etc.), y directamente mediante un análisis proximal de las larvas después de la ingestión del alimento. En general se recomienda que se realicen ambos análisis (Rice y cols., 1994).

La evaluación de dietas artificiales para larvas de peces, se encontrará en etapa de desarrollo hasta que se logre dar con una dieta que sirva de parámetro para futuras evaluaciones y comparaciones.

Tras la Microdieta Ideal.

Si bien la dieta "ideal" no ha sido plenamente definida, los recientes avances sobre el conocimiento de las capacidades digestivas y los requerimientos nutricionales de las larvas indican que no se está muy lejos de lograr una dieta que permita reemplazar la utilización de alimento vivo. Sin embargo, existen algunos aspectos nutricionales que aún quedan por determinar para facilitar su desarrollo para que sean aptas para el cultivo larvario de peces. Tomando en cuenta lo anterior, Lazo (2000) nos plantea que los principales objetivos de la investigación y desarrollo hacia los cuales deberían apuntar las futuras investigaciones son:

- La determinación de los niveles de inclusión y proporciones entre aminoácidos libres, péptidos y proteínas. Se debe tomar en cuenta que estos valores son susceptibles de variar durante el desarrollo larvario. Por ejemplo, es probable que las larvas exhiban un requerimiento alto de aminoácidos libres durante los primeros días de alimentación exógena, seguido por una mayor utilización de péptidos y finalmente la digestión eficiente de proteínas intactas.
- En el caso de los lípidos (Ej., HUFAs w-3, DHA:EPA:ARA, fosfolípidos en relación con triglicéridos), la identificación de los niveles y proporciones adecuados han sido determinados casi en su totalidad (Sargent y cols. 1999). Por lo tanto, el reto actual es más técnico que académico, ya que es necesario encontrar ingredientes comerciales que sirvan como fuente de estos nutrientes y que puedan ser incluidos en las dietas sin elevar en demasía el costo de producción.
- Es necesario identificar el equilibrio adecuado entre la fuente de ácidos grasos esenciales (como los HUFAs ω -3) y aquellos que no se consideran esenciales (como los insaturados y monosaturados) y que sirven como sustrato para el metabolismo energético.
- Se debe evaluar la digestibilidad de los ingredientes in vitro y las interacciones inhibitorias que puedan tener algunos ingredientes con las enzimas digestivas de la especie de interés.
- Determinar compuestos y técnicas alimenticias que incrementen el consumo de las dietas artificiales. Por ejemplo, la inclusión de sustancias naturales como la betaina, alanina y/o sustancias homólogas que cumplan la misma función.
- Desarrollar dietas que estimulen la secreción de zimógenos y enzimas digestivas al tubo digestivo para incrementar su digestión.
- Evaluar la utilización de probióticos que incrementen la eficiencia de utilización de las dietas artificiales en el sistema de cultivo.
- Además, en la literatura, se nos plantean rangos de incorporación de nutrientes para que las microdietas sean adecuadas para los requerimientos de las larvas, esta tabla es presentada a continuación (extraída de Lazo, 2000):

Tabla 4. Niveles Mínimo y Máximo de Inclusión de los Principales Nutrientes en las Microdietas.

Nutriente	Gramos por 100 g. de dieta	
	mínimo	máximo
Proteínas	50	65
aminoácidos libres		10
Péptidos		20
proteína natural	30	
Lípidos	10	20
triglicéridos		5
fosfolípidos	10	
22: 6n-3	2	
20: 5n-3	1	
20: 4n-6	0,1	
DHA/EPA	2	

Tabla 5. Niveles Mínimo y Máximo de Inclusión de los Principales Nutrientes en las Microdietas.

Nutriente	Gramos por 100 g. de dieta	
	mínimo	máximo
HUFAs n-3	3	5
Carbohidratos		10
Fibra		2
Cenizas		10
Vitaminas	5	
Ac. Ascórbico	0,5	
Minerales	4	
Atractantes	2	4

Bibliografía

- Alam M. S., Teshima S., Ishikawa M. & Koshio S. 2001. Effects of Ursodeoxycholic Acid on Growth and Digestive Enzyme Activities of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Aquaculture Research* (2001) 32: 235-243.
- Alarcón F. J. & Martínez M.I. 2000. Fisiología de la Digestión en Larvas de Peces Marinos y sus Aplicaciones al Cultivo Larvario en Masa. <http://aquatic.unizar.es/n1/art501/fishlarva.htm>.
- Barrows F. T. 2000. Larval Feeds: Two Methods for Production of On-size, Microbound Particles. *The advocate* Febrero 2000: 61-63.
- Bengston D.A. 1991. A Comprehensive Program for the Evaluation of Artificial Diets. Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium nº15: 142-143.
- Bergot P., Gondonin E., Lebel C. & Ronault T. 2002. Regimes Purifiés Pour Larvae D'Esturgeon Siberien. 4 Journee Nutrition Des Poissons INRA-IFREMER, Bordeaux Aquaculture 20 Septembre 2002. 5 Expositure.
- Buchet V., Zambonino J. L. & Cahu Ch. L. 2000. Effect of Lipid Level in a Compound Diet on the Development of Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) Larvae. *Aquaculture* (2000) 184: 339-347.
- Cahu C.L., Zambonino J.L., Le Gall M.M. & Quazuguel P. 1995. Early Weaning of Seabass: Are Digestive Enzymes Limiting?. Larvi '95 – Fish & Shellfish larviculture Symposium. P. Lavens, E. Jaspers e I. Roelants (Eds.). 1995 Gent, Belgium European Aquaculture Society, Special Publication Nº 24: 268-271.
- Cahu Ch. & Zambonino J. L. 1997. Is the Digestive Capacity of Marine Fish Larvae Sufficient for Compound Diet Feeding?. *Aquaculture* (1997) 5: 151-160.
- Cahu Ch. & Zambonino J. L. 2001. Substitution of Live Food by Fomulated Diets in Marine Fish Larvae. *Aquaculture* (2001) 200: 161-180.
- Cahu Ch., Zambonino J. L., Barbosa V. & Quazuguel P. 2002. Effect du Taux de Phospholipide Alimentaire sur le Developpement des Larves de Bar. 4 Journee Nutrition Des Poissons INRA-IFREMER, Bordeaux Aquaculture 20 Septembre 2002. 1 Expositure.
- Cahu Ch.L., Zambonino-Infante J.L. & Barbosa V. 2003. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Brithish Journal of Nutrition* 90: 21-28.
- Copeman L. A., Parrish C. C., Brown J. A. & Harel M. 2001. Effects of Docohexaenoic, Eicosapentaenoic, and Arachidonic Acids on the Early Growth, Survival, Lipid Composition of YellowTail Flounder (*Limanda ferruginea*): A Live Food Enrichment Experiment. *Aquaculture* (2002) 210: 285-304.

13. Cordova_Murrueeta J.H. & García-Carreño F.L. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* (2002) 123: 1-14.
14. D'Abrahamo L. R. 2002. Challenges in Developing Successful Formulated Feed for Culture of Larval Fish and Crustaceans. Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds). *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, Mexico. 143-151.
15. Dabrowski K. 1991. Dietary Requirements for Freshwater Fish Larvae – In Search of a Common Thread. Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium n°15: 9-10.
16. De Silva S.S., Gunasekera R.M., Austin C.M. & Allinson G. 1998. Habitat Related Variations in Fatty Acids of Catadromous *Galaxias maculatus*. *Aquat. Living Resource* (1998) 11: 379-385.
17. Devresse B., Candreva P., Léger P. & Sorgeloos P. 1991. A New Artificial Diet for the Early Weaning of Seabass (*Diocentrarchus labrax*) Larvae. Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium n°15: 178-182.
18. Díaz M., Moyano F.J., García-Carreño F.L., Alarcón F.J., Muñoz-Cueto J.A. & Sarasquete M.C. 1995. Determination of Protease Type Activity by Substrate-SDS Page Through Larval Development in Seabream (*Sparus aurata*). Larvi '95 – Fish & Shellfish larviculture Symposium. P. Lavens, E. Jaspers e I. Roelants (Eds.). 1995 Gent, Belgium European Aquaculture Society, Special Publication N° 24: 276-280.
19. Dinis M. T., Ribeiro L., Conceicao L. E. C. & Aragao C. 2000. Larvae Digestión and New Weaning Experiments in Solea senegalensis. *CIHEAM-Options Mediterraneeennes* (2000): 193-204.
20. Fontagne S., Corraze G. & Bergot P. 2000. Effect of dietary (n-3) highly unsaturated fatty acids on growth and survival of fat snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) larvae during first feeding. *Journal of Nutrition* (2000) 130: 2009-2015.
21. García-Ortega A. 2000. Valor Nutricional de los Quistes de Artemia y su Uso como Fuente de Proteína en Dietas Artificiales para Larvas de Peces. Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Golvera-Novoa M.A., Civera-Cerecedo R. (Eds). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19 al 22 de Noviembre del 2000. Mérida, Yucatán, Mexico. 287-299.
22. García-Ortega A., Hernández C., Abdo-De La Parra I. & González-Rodríguez B. 2002. Advances in the Nutrition and Feeding of the Bullseye Puffer *Sphoeroides Annulatus*. Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds). *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, Mexico. 187-196.
23. García-Ortega A., Abdo I. & Hernández C. 2003. Weaning of Bullseye Puffer (*Sphoeroides annulatus*) from Live Food to Microparticulates Diets Made With Decapsulated Cyst of Artemia and Fishmeal. *Aquaculture International* (2003) 11: 183-194.
24. Houlihan D.F., Pannevis M. & Heba H. 1991. Protein Turnover in Fish Larvae. Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium n°15: 16.
25. Juario J.V., Duray M.N. & Fuchs J. 1991. Weaning of Seabass, Lates calcarifer B. Larvae to Artificial Diet. Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium n°15: 183.
26. Kanazawa A. & Teshima S. 1988. Microparticulate Diets for Fish Larvae. Sparks, A.K. (ed.), *New and Innovative Advances in Biology / Engineering with Potential for Use in Aquaculture*. NOAA Tech. Rep. NMFS 70, Ntl. Mar. Fish. Serv., Seattle, WA 98115, Noviembre 1988.
27. Kanazawa A., Koshio S. & Teshima S. I. 1989. Growth and Survival of Larval Red Sea Bream *Pagrus major* and Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* Fed Microbound Diets. *Journal of the World Aquaculture Society* (1989) Volumen 20 N° 2: 31-37.
28. Kolkovski S. & Tandler A. 2000. The Use of Squid Protein Hydrolysate as a Protein Source in Microdiets for Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* Larvae. *Aquaculture Nutrition* (2000) 6: 11-15.

29. Koskela J. & Pirhunen J. 1991. Growth and Survival of First-Feeding Arctic Charr, *Salvelinus alpinus* Fed a Dry Diet Supplemented with Artemia. Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium nº15: 164-166.
30. Koven W.M., Parra G., Kolkovski S. & Tandler A. 1998. The Effect of Dietary Phosphatidylcholine and its Constituent Fatty Acids on Microdiet Ingestion and Fatty Acid Absorption Rate in Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*, Larvae. *Aquaculture Nutrition* (1998) 4: 39-45.
31. Koven W., Barr Y., Lutzky S., Ben-Aia I., Weiss R., Harel M., Behrens P. & Tandler A. 2000. The Effect of Dietary Arachidonic Acid (20:4n-6) on Growth, Survival and Resistance to handling Stress in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Larvae. *Aquaculture* (2001) 193: 107-122.
32. Langdon Ch. 2000. Artificial Microparticles for Delivery of Nutrients to Marine Suspension-Feeders. *The Advocate* Febrero 2000: 40-41.
33. Lazo J. P. 2000. Conocimiento Actual y Nuevas Perspectivas en el Desarrollo de Dietas para Larvas de Peces Marinos., Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Golvera-Novoa M.A., Civera-Cerecedo R. (Eds). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19 al 22 de Noviembre del 2000. Mérida, Yucatán, Mexico. 300-312.
34. Lazo J. P., Dinis M. T., Holt G. J., Faulk C. & Arnold C. R. 2000. Co-Feeding Microparticulate Diets UIT Algae: Toward Eliminating the need of Zooplankton at First Feeding in Larval Red Drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* (2000) 188:339-351.
35. Marte C.L. & Duray M.N. 1991. Microbound Larval Feed as Supplement to Live Food for Milkfish (*Chanos Chanos Forsskal*) larvae. Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium nº15: 175-177.
36. Mookerji N. & Ramakrishna-Rao T. 1991: Survival and Growth of Rohu (*Labeo rohita*) and Singhi (*Heteropneustes fossilis*) Larvae Fed on Dry and Live Foods. Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium nº15: 148-150.
37. Moyano F.J., Alarcón F.J., Díaz M., Muñoz-Cueto J.A., Yufera M. & Sarasquete M.C. 1995. Changes of Digestive Enzyme Activities During larval Development in Seabream (*Sparus aurata*). Larvi '95 – Fish & Shellfish larviculture Symposium. P. Lavens, E. Jaspers e I. Roelants (Eds.). 1995 Gent, Belgium European Aquaculture Society, Special Publication Nº 24: 297-300.
38. Muir P. R. & Sutton D.C. 1994. Bacterial Degradation of Microencapsulated Foods Used in Larval Culture. *Journal of the World Aquaculture Society* (1994) Volumen 25 Nº3: 371-378.
39. Nobuyuki O. & Takahiro M. 1998. Sequential Utilization of Free Amino Acids, Yolk Protein, And Lipids by Developing Embryos and Larvae in Barfin Flounder *Verasper moseri*. *UJNR Technical Report* (1998) 26: 61-66.
40. Pedroza-Islas R., Medina-Reyna C.E. & Acosta-Ruiz M.J. 2000. Uso de Ficcocoloides en la Nebulizacion de Microdietas para Larvicultura Marina. *Revista Ciencia y Mar*: 27-34.
41. Pedroza-Islas, R., 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos paralarvas de especies acuicolas. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. 438-447.
42. Person-Le Ruyet J. 1991. Feeding of Marine Fish Larvae: Microdiet or Live Preys?. Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium nº15: 168.
43. Rice M., Bengston D.A. & Jaworski C. 1994. Evaluation of Artificial Diets for Cultured Fish. *Northeastern regional Aquaculture Center Fact Sheet* (1994) 222: 1-4.
44. Robaina L. & M. Izquierdo. 2000. Methodological Strategies for the Determination of Nutrient Requirements in Finfish. *CIHEAM-Options Mediterraneeennes* (2000): 25-41.
45. Ronnestad I., Conceicao L. E. C., Aragao C. & Dinis M. T. 2000. Free Aminoacids are Absorbed Faster and Assimilated More Efficiently than Protein in Postlarval Senegal Sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Nutrition* (2000) 130: 2809-2812.

46. Ronnestad I., Rojas.García C.R., Tonheim S.K. & Conceicao L.E.C. 2001. In Vivo Studies of Digestion and Nutrient Assimilation in Marine Fish Larvae. *Aquaculture* (2001) 201: 161-175.
47. Ronnestad I. 2002. Control and Efficiency of Digestive Function of Marine Fish Larvae. Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, Mexico. 152-165.
48. Ruuhijärvi J., Virtanen E., Salminen M. & Muyunda M. 1991. The Growth and Survival of Pike-Perch, *Stizostedion lucioperca* L. Larvae Fed on Formulated Feeds. *Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium*. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium n°15: 154-156.
49. Salhi M., Izquierdo M. S., Hernández-Cruz C. M., González M. & Fernández-Palacios H. 1994. Effect of Lipid and n-3 HUFA Levels in Microdiets in Growth, Survival and Fatty Acid Composition of Larval Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* (1994) 124: 275-282.
50. Sargent J., Mc Evoy L., Estevez A., Bell G., Bell M., Henderson J. & Tocher D. 1999. Lipid Nutrition of Marine Fish During Early Development: Current Status and Future Directions. *Aquaculture* (1999) 179: 217-229.
51. Shields R.J., Gordon-Bell J., Luizi F.S., Gara B., Bromage N.R. & Sargent J.R. 1999. Natural Copepods Are Superior to Enriched *Artemia* Nauplii as Feed for Halibut Larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in Terms of Survival, Pigmentation and Retinal Morphology: Relation to Dietary Essential Fatty Acids. *Journal of Nutrition* (1999) 129: 1186-1194.
52. Stottrup J.G. 1993. First Feeding in Marine Fish Larvae: Nutritional and Environmental Aspects. *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. Bern T., Walther T., Jorgen-Fyhn H. (Eds.): 124-138.
53. Takeuchi T., Wang Q., Furuita H., Hirota T., Ishida S & Hayasawa H. 2003. Development of Microparticle Diets for Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* Larvae. *Fisheries Science* (2003) 69: 547-554.
54. Tandler A. & Kolkovski S. 1991. Rates of Ingestion and Digestibility as Limiting Factors in the Successful Use of Microdiets in *Sparus aurata* Larval Rearing. *Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium*. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium n°15: 169-171.
55. Tovar-Ramírez D., Zambonino-Infante J.L., Cahu C., Gatesoupe F.J. & Vázquez-Juárez R. 2000. Efecto de la Administración de Levaduras en el Proceso de Maduración del Tracto Digestivo de Peces. Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Golvera-Novoa M.A., Civera-Cerecedo R. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19 al 22 de Noviembre del 2000. Mérida, Yucatán, Mexico. 33-46.
56. Vazquez R., González S., Rodríguez A. & Mourente G. 1994. Biochemical Composition and Fatty Acid Content of Fertilized Eggs, Yolk Sac Stage Larvae and First-Feeding Larvae of the Senegal Sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* (1994) 119: 273-286.
57. Villanueva R., Koueta N., Riba J. & Boucaud-Camoud E. 2002. Growth and proteolytic Activity of Octopus *vulgaris* paralarvae with different food rations during first Feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture* (2002) 205: 269-286.
58. Walford J. & Lam T.J. 1991. Growth and Survival of Seabass (*Lates calcarifer*) Larvae Fed Microencapsulated Diets Alone or Together with Live Food. *Larvi '91- Fish & Crustacean Larviculture Symposium*. P. Lavens, P. Sorgeloos y F. Ollevier (Eds.). 1991 European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium n°15: 184-187.
59. Watanabe T., Izquierdo M.S., Takeuchi T., Satoh S. & Kitajima Ch. 1989. Comparison Between Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Terms of Essential Fatty Acids Efficacy in Larval Red Seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi* (1989) 55: 1635-1640.
60. Wu F.Ch., Ting Y.Y. & Cheng H.Y. 2002. Docosahexaenoic Acid Is Superior to Eicosapentaenoic Acid as the Essential Fatty Acid for Growth of Grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Journal of Nutrition* (2002) 132: 72-79.
61. Yufera M., Pascual E., Polo A. & Sarasquete M.C. 1993. Effect of Starvation on the Feeding Ability of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Larvae at First Feeding. *Exp. Mar. Biol. Ecol.*(1993) 169: 259-272.
62. Yufera M., Pascual E. & Fernández-Diaz C. 1999. A Highly Efficient Microencapsulated Food for Rearing Early Larvae of Marine Fish. *Aquaculture* (1999) 177: 249-256.
63. Zambonino J. L., Cahu Ch. L. & Peres A. 1996. Partial Substitution of Di- and Tripeptides for Native Proteins in Sea Bass Diet Improves *Dicentrarchus labrax* Larval Development. *Journal of Nutrition* (1997) 127: 608-614.

-
64. Zambonino-Infante J.L. & Cahu Ch. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp Biochem Physiol C* Toxicol Pharmacol. 2001 Dec;130(4):477-487.