

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
31 de Diciembre de 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/000285 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: **A61K 9/50**,
A23P 1/04, A23K 1/18

Andalucía, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. República Saharaui, S/n, 11510 Puerto Real (CADIZ) (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2003/000304

(74) Mandatario: **REPRESA SÁNCHEZ, Domingo**; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Oficina de Transferencia de Tecnología, C/Serrano, 113 - 2ª planta, 28006 MADRID (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
18 de Junio de 2003 (18.06.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200201435 21 de Junio de 2002 (21.06.2002) ES

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; Serrano, 117, 28006 MADRID (ES).

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **FÉRNANDEZ DÍAZ, Catalina** [ES/ES]; Insto. Ciencias Marinas de Andalucía, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. República Saharaui, S/n, 11510 Puerto Real (CADIZ) (ES). **YÚFERA GINÉS, Manuel** [ES/ES]; Insto. Ciencias Marinas de Andalucía, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. República Saharaui, S/n, 11510 Puerto Real (CADIZ) (ES). **PASCUAL VÁZQUEZ, Emilio** [ES/ES]; Insto. Ciencias Marinas de

Publicada:

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: MICROENCAPSULATED FOOD FOR FISH LARVAE AND PRODUCTION METHOD THEREOF

(54) Título: ALIMENTO MICROENCAPSULADO PARA LARVAS DE PECES Y PROCEDIMIENTO PARA SU ELABORACIÓN

(57) Abstract: The invention relates to a microcapsule containing a complete diet for fish larvae, preferably marine fish, which is produced using a low-cost method. In this way, isolated cells or isolated ingredients can be microencapsulated and used in nutritional studies. The microcapsules produced are provided with an optimum size and texture for use by marine fish larvae and said microcapsules are accepted and digested by both pelagic and benthic larvae. The inventive microcapsules disperse easily in water and can be dry-stored for long periods without the characteristics thereof being altered.

(57) Resumen: Con el presente invento se consigue una microcápsula que incluye una dieta completa para larvas de peces, e marinos por medio de una técnica de bajo coste. Así mismo, se puede microencapsular células aisladas o ingredientes aislados que permite su utilización en estudios de nutrición. Las microcápsulas obtenidas tienen un tamaño y textura óptimos para ser utilizado por larvas de peces marinos, siendo aceptadas y digeridas tanto por larvas de especies pelágicas como bentónicas. Las microcápsulas conseguidas se dispersan fácilmente en agua y se pueden almacenar en seco durante largos periodos sin que se vean modificadas sus características.



WO 2004/000285 A2

TITULO**ALIMENTO MICROENCAPSULADO PARA LARVAS DE PECES Y
PROCEDIMIENTO PARA SU ELABORACIÓN****5 SECTOR DE LA TÉCNICA:**

Destinado principalmente al sector de la Acuicultura. El presente invento puede ser utilizado en la alimentación larvaria de peces. Dada la versatilidad del método, éste puede ser empleado en otras áreas como biotecnología, nutrición y para la administración de agentes terapéuticos.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA:

En los sistemas de cultivos piscícolas marinos, el empleo de dietas artificiales como sustituto de las presas vivas en la alimentación larvaria de peces es una cuestión de gran interés tanto desde el punto de vista científico como comercial. La consecución de un
15 alimento de calidad controlada y reproducible junto a la facilidad de conservación y almacenaje haría idóneo este tipo de producto. La necesidad de ésta sustitución surge en respuesta a la alta demanda de presas vivas (principalmente rotífero y Artemia) y la dificultad que plantea su obtención. En los últimos años, se ha realizado un importante esfuerzo de investigación en la búsqueda de una partícula capaz de sustituir con eficacia
20 dichas presas, obteniéndose resultados interesantes y prometedores. La idoneidad de un alimento microencapsulado para larvas de peces depende de determinados factores y su interrelación. La dificultad de separar continente de contenido en una dieta microencapsulada hace que cualquier modificación tanto en la metodología de fabricación como en la formulación vayan intrínsecamente unidas. La composición de la
25 dieta y la naturaleza de la matriz debe ajustarse a las necesidades nutricionales y al comportamiento alimentario de las larvas. Por ello, se han realizado estudios encaminados a conocer aspectos relacionados con la fisiología, comportamiento y nutrición durante el desarrollo larvario de peces marinos (Fernández-Díaz et al. Journal of Fish Biology., 2001 58: 1086-1097; Cañavate y Fernández-Díaz. Aquaculture., 1999,
30 174: 255-263; Yúfera et al. Aquaculture., 1999, 177: 249-256) así como sobre el diseño y procesos de fabricación de diferentes partículas (Yúfera et al. Aquaculture Nutrition., 2000, 6: 143-152).

Fernández-Díaz et al. (1997), en su patente N° ES-2127140 presentan una dieta microencapsulada destinada a la alimentación de estadios larvarios de peces marinos y el método de utilización de dicho alimento, cubriendo así la laguna existente en éste área hasta ese momento. El invento citado supone ya un interesante avance para llevar a cabo estudios sobre nutrición y fisiología larvaria de peces, con el que es posible obtener una dieta microencapsulada de tamaño, digestibilidad y características organolépticas adecuadas para esta fase de desarrollo. Sin embargo, este tipo de alimento microencapsulado tiene una serie de condicionantes que lleva a plantearse restringir su uso a estudios de alimentación a escala de laboratorio. En la elaboración de las microcápsulas de la patente citada anteriormente (polimerización interfacial de la proteína) se emplean compuestos no sólo de elevado coste sino también de difícil disponibilidad en el mercado. Debido a las oscilaciones y bajos valores de pH que tiene lugar durante el proceso de fabricación, determinados ingredientes de la dieta pueden verse modificados. Las microcápsulas referidas precisan para su manufacturación que al menos el 30% de su composición sea proteína con largas cadenas de polipéptidos como caseína o albúmina, esto condiciona en cierta medida la formulación de la dieta que queremos preparar así como la posibilidad de encapsular ciertos compuestos aislados. La ventaja que supone la elevada retención de determinados compuestos solubles que presentan estas microcápsulas, puede ser un condicionante no deseado en ciertas formulaciones que requieren una adecuada liberación del contenido.

Por todo esto, es necesario seguir buscando una partícula que manteniendo las ventajas que presentan las microcápsulas referidas en la patente N° ES-2127140 (partículas de pequeño diámetro, en forma de polvo seco, de fácil dispersión en agua, con buena flotabilidad, estables durante horas en agua de mar, de fácil disgregación en el tubo digestivo de una larva), pueda ser fabricada utilizando únicamente materiales de grado alimentario, de fácil disponibilidad en el mercado y de bajo costo. Además, es necesario obtener una micropartícula que permita transportar cualquier compuesto. Estas premisas nos conducen a considerar la adaptación de métodos y materiales utilizados en farmacia y alimentación como referencia para su utilización en la fabricación de microcápsulas destinadas a acuicultura.

Uno de los materiales ampliamente utilizado para la inmovilización de células y usado como aglutinante en la fabricación de alimentos es el alginato. El alginato es un polímero natural que en presencia de calcio puede producir geles. Desde hace años se han utilizado estos materiales para inmovilizar compuestos mediante el proceso denominado gelificación externa, por el que se producen partículas de calidad y tamaño uniforme aunque limitadas básicamente al diámetro de aguja de la jeringa utilizada, no siendo posible conseguir tamaños inferiores a 1 mm y difícilmente reproducibles a escala industrial (Poncelet et al. 1992., In: Goosen MFA (eds) CRC, Boca Raton, Fla, 113-142). La patente US N° 4,822,534 desarrollada por Lencky et al. (1989), permite solventar los inconvenientes que presenta la gelificación externa y obtener micropartículas utilizando una técnica de gelificación interna. Esta técnica consiste en la emulsión W/O incluyendo alginato y una fuente de calcio, para posteriormente insolubilizar el alginato acidificando la solución. Sin embargo, el protocolo de microencapsulación descrito en la mencionada patente no permite conseguir partículas con las características adecuadas para su utilización como alimento de larvas de peces. Determinados aspectos necesitan ser investigados y/o mejorados entre ellos:

- Control de tamaño y flotabilidad de las partículas, para facilitar su accesibilidad.
- Ajuste en la viscosidad de la mezcla para evitar excesiva rigidez de la matriz sin repercutir en la estabilidad de la microcápsula.
- Control de la acidez durante la elaboración para mantener las propiedades de los compuestos encapsulados.
- Obtención de un producto de fácil dispersión en agua, en forma de polvo seco y que se pueda almacenar durante meses hasta su utilización.

25

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es un alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces, preferentemente marinos, formado por partículas esféricas de 40-1000 µm de diámetro solidificadas, aisladas y estables. El contenido de las partículas es homogéneo y uniforme, y comprende un ingrediente activo de interés alimentario y

30

farmacéutico, un agente inmovilizante y una sustancia que causa la gelación de dicho agente.

El ingrediente activo es una dieta acuosa completa, compuesta por:

- 5 - material proteico (50-75%), compuesto por harinas de animales marinos de los que como máximo el 40% está hidrolizado
- lípidos (5-35 %), de los que el 20-30 % es un fosfolípido.
- carbohidratos (2-25 %, preferiblemente 3-10%)
- complejos vitamínicos (1-10%, preferiblemente 4-7%)

10 El ingrediente activo puede ser también un compuesto único (colorantes, células aisladas, enzimas, materiales inorgánicos) o mezcla de varios.

El agente inmovilizante es un polisacárido (alginato sódico) utilizado en una proporción comprendida entre el 1 y el 20% respecto al ingrediente activo. El agente gelificante es un compuesto con iones calcio, preferentemente citrato de calcio (0,5-13% respecto al ingrediente activo).

15 Las micropartículas permanecen dispersas por la acción de un agente dispersante (lecitina de soja) en un líquido hidrofóbico (aceite vegetal, preferentemente aceite de girasol), y se solidifican con la adición de un ácido orgánico soluble (ácido acético). Estas partículas retienen más del 80% del producto encapsulado manteniendo su morfología y permaneciendo accesibles durante al menos 4 horas de exposición en agua
20 de mar.

El procedimiento de preparación de este alimento microencapsulado incluye la mezcla en agua del ingrediente activo con el agente inmovilizante y la sustancia que causa la gelificación de dicho agente, resultando una solución de concentración comprendida
25 entre 1-15% en peso. Esta solución acuosa se añade a un líquido hidrofóbico, en una proporción entre 1:1 y 1:2, y un dispersante natural, en una proporción del 1-2% respecto al líquido hidrofóbico, que produce la dispersión de la mezcla acuosa formando gotas. Posteriormente se añade un ácido orgánico soluble en aceite (ácido acético) en una proporción comprendida entre 0.3-1.4% respecto a la mezcla total, para producir
30 la solidificación de dichas gotas que forman las micropartículas aisladas. Mediante una sal multivalente (cloruro cálcico) se estabilizan las partículas. Finalmente dichas partículas son lavadas en una solución tensioactiva (para eliminar cualquier residuo de aceite),

enjuagadas con agua, tamizadas, congeladas y liofilizadas para la obtención del producto final en forma de polvo seco. Este procedimiento presenta una eficiencia de encapsulación de un compuesto único superior al 95%.

- 5 Este alimento microencapsulado puede utilizarse para el crecimiento de larvas de peces marinos (doradas, sargos y lenguados) desde los primeros días de alimentación. Con una dosis diaria de 1 a 5 veces el peso seco de las larvas se consigue un adecuado crecimiento de larvas de lenguado.
- 10 El invento pretende conseguir los siguientes objetivos:
- Elaboración de una partícula que incluya una dieta completa por medio de una técnica de bajo coste para satisfacer la demanda bioenergética y nutricional de larvas de peces marinos eliminando total o parcialmente las actuales presas vivas que se utilizan en acuicultura.
- 15 - La inmovilización de células o compuestos independientes como suplemento a una dieta para ser utilizado como enriquecimiento puntual durante el cultivo y posibilitar su estudio nutricional.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

- 20 **Figura 1.** Aspecto morfológico que presentan las microcápsulas según los ejemplos: A) y C) descritos en el presente invento.
- Figura 2.** Microfotografía del tubo digestivo de larvas de peces marinos en las que se observa la disgregación de las microcápsulas del presente invento. Larvas de *Solea senegalensis* (22 días) alimentadas con microcápsulas elaboradas según el ejemplo A.
- 25 Larvas de *Diplodus sargus* (8 días) alimentadas con microcápsulas elaboradas según el ejemplo B.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- Se han tenido en cuenta los avances que se están produciendo en la elaboración de micropartículas, tanto en áreas de alimentación como en farmacia, para la consecución
- 30 de una partícula que incluya una dieta completa, elaborada con compuestos no tóxicos

que pueda ser utilizada en acuicultura como alimento en fases larvarias de peces marinos.

Las microcápsulas del presente invento nos permite además de mantener las características favorables conseguidas en las microcápsulas de la patente N° ES-
5 2127140, solucionar ciertos problemas planteados en el apartado anterior.

Los materiales empleados en la elaboración de las microcápsulas del presente invento además de ser digeribles, pueden ser utilizados en alimentación, son de fácil
10 disponibilidad en el mercado y de bajo costo. El alginato presente en la mezcla inicial reacciona con sales de calcio mediante un proceso de polimerización iónica formando geles que sometidos a bajo pH permite la formación de ácido algínico, compuesto éste, insoluble en agua. Dado que el pH durante la elaboración de este tipo de partículas no
15 desciende de 4, es posible encapsular compuestos de diferente naturaleza sin que se vea modificada su estructura.

Un requisito a tener en cuenta es que en la composición inicial además del ingrediente o ingredientes que queramos incluir se precisa material gelificante (alginato y calcio). Este material se puede encontrar en un porcentaje hasta el 20% respecto al ingrediente activo y no presenta problemas adicionales al ser compuestos digeribles.

20 El componente mayoritario de la dieta larvaria de peces es proteína, pero esa fuente de proteína debe de encontrarse en forma de péptidos pequeños para facilitar su digestión ya que los niveles de actividad enzimática del tipo proteasas aún son bajos en esta fase de desarrollo. En el presente invento la fuente de proteína supera el 50 % de la dieta con
25 un máximo del 40% hidrolizado de dicho porcentaje.

En la formulación de un alimento para larvas de peces marinos los lípidos en general y determinados ácidos grasos en particular juegan un papel determinante en el desarrollo larvario. En la preparación de estas cápsulas se empleará un aceite de pescado entre un
30 5-35% del total de lípidos, enriquecido con ácidos grasos poliinsaturados y convenientemente estabilizados para prevenir la oxidación de los mismos. La dieta incluirá como fuente de fosfolípidos al menos un 1% de lecitina de soja, para facilitar la

absorción de los lípidos de la dieta y asegurar que al menos un 20% de los lípidos de la dieta están constituidos por un fosfolípido.

La dieta incluirá vitaminas y elementos traza, entre 1-10%, necesarios para el desarrollo larvario. La fuente de carbohidratos que incluye la formulación se compone de almidón soluble (dextrina), en un porcentaje entre el 1 y el 20% del peso de la mezcla, y de alginato sódico.

Se dispone de una dieta formulada que es encapsulada mediante el proceso de gelificación interna. Las microcápsulas obtenidas tienen un tamaño y textura óptimos para ser utilizado por larvas de peces marinos, tanto por larvas de especies pelágicas como bentónicas.

El alimento microencapsulado resultante posee una estructura "multicore" que permite incluir materiales de distinto grado de solubilidad y mantenerlos dentro de su estructura, inalterables durante horas de permanencia en agua de mar. Estas características básicas hacen que la microcápsula obtenida en el presente invento pueda incluir células, ingredientes aislados o una dieta formulada completa, siendo el producto final estable en agua, digerible y accesible, y por tanto adecuado para la alimentación de especies acuícolas marinas.

Para que este proceso de microencapsulación ocurra, tiene que producirse primero una emulsión de agua en aceite. La fase acuosa de la emulsión incluye la dieta o sustancia a encapsular junto a un polisacárido (alginato sódico) y una fuente externa de calcio para que se produzca la gelificación.

La fase oleosa consiste en un aceite vegetal y un dispersante natural como la lecitina de soja que favorece la obtención de partículas con un tamaño uniforme. Una vez la dieta ha sido emulsionada y gelificada, la preparación recibe una pequeña cantidad de ácido acético que produce la modificación (reversible) de alginato a ácido algínico, compuesto éste insoluble en agua. El ácido acético es un compuesto ampliamente utilizado en el área de productos culinarios y no se restringe su uso en alimentación. Un

baño, durante unos minutos, en una solución de cloruro cálcico proporciona mayor estabilidad a la partícula consiguiéndose así una partícula redondeada, estable en agua y de contenido homogéneo. La permanencia durante unos minutos en una solución de Tween 80 y sus posteriores lavados en agua garantiza una cubierta libre de residuos de
5 aceite.

La partícula así formada puede congelarse y posteriormente liofilizarse sin que se vean alteradas sus propiedades, obteniéndose un producto final en forma de polvo seco que permite su almacenamiento prolongado.

10

En la presente invención, la eficiencia de encapsulación de un compuesto único, según el procedimiento descrito, es superior al 95 % .

La dieta microencapsulada obtenida puede ser utilizada como alimento para larvas de peces. Una vez añadidas al agua, estas partículas retienen más del 80% de un compuesto
15 único, manteniendo su morfología y permaneciendo accesibles para las larvas durante al menos 4 horas de exposición en agua de mar.

Las microcápsulas del presente invento presentan un contenido homogéneo y un tamaño que puede oscilar entre 40-1000 μm de diámetro. Las modificaciones en la viscosidad de la dieta y la velocidad de agitación empleadas durante el proceso inciden en la distribución de tamaños y diámetro medio de partícula. Así, es posible conseguir directamente o previa tamización, partículas que por su tamaño pueden ser utilizadas durante toda la fase larvaria de peces.

20 Las diferentes proporciones de alginato-citrato empleadas en la fabricación de las microcápsulas, modifican la viscosidad de la fase acuosa. Esta característica junto a las concentraciones de ácido acético empleadas inciden en el grado de flotabilidad de la partícula, por lo que manipulando estos parámetros se conseguirán dietas microencapsuladas que pueden ser utilizadas en la alimentación de especies con
25 diferentes hábitos de alimentación ya sean pelágicas (Ej.: Doradas, Sargos) o bentónicas (Ej.: Lenguados).

30

La dieta microencapsulada del presente invento presenta una composición en principios inmediatos similar a la que presentan las presas vivas. Son aceptadas perfectamente por las larvas desde el inicio de su alimentación y son visiblemente disgregadas en su tubo digestivo.

- 5 Este alimento microencapsulado se ha utilizado para el crecimiento de larvas de dorada, sargo y lenguado desde los primeros días de alimentación, las partículas eran aceptadas y digeridas por dichas larvas (ejemplos A y B; Figura 2).

10 Este alimento puede suministrarse en seco en el tanque de cría larvaria siendo fácilmente dispersado al entrar en contacto con el agua. El suministro diario de esta dieta microencapsulada a los tanques larvarios, como único alimento, permite que larvas de lenguado (*Solea senegalensis*) puedan mantenerse con altas tasas de supervivencias y creciendo al menos durante un mes de cultivo (ejemplo A).

15 **EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**

A) El proceso de microencapsulación de la dieta expuesta en la Tabla 1 se desarrollo del siguiente modo:

20 20 gramos de dieta fueron mezclados con 200 mililitros de una solución de alginato sódico al 1,5 % (p/v) y con 2 gramos de citrato cálcico previamente dispersados en 10 mililitros de agua.

25 La mezcla anterior fue añadida suavemente a 500 mililitros de aceite de girasol incluyendo 10 gramos de lecitina de soja y sometidos a agitación mecánica con la ayuda de un agitador de hélices utilizando para ello una velocidad de 1000 r.p.m.

30 Después de 10 minutos y sin cesar la agitación, 20 mililitros de una solución oleosa incluyendo ácido acético en proporción 1:1 fueron añadidas continuando la reacción 10 minutos más.

Una vez detenida la agitación y retirado el sobrenadante, la pasta fue dispersada durante 3 minutos en una solución al 0,5% de cloruro cálcico en agua.

5 Posteriormente la suspensión de microcápsulas fue tamizada. Las microcápsulas resultantes fueron colocadas durante 2 minutos en una solución de Tween 80 al 1% y posteriormente lavadas en agua varias veces para eliminar posibles restos indeseable de detergente.

10 La pasta de microcápsulas fue recogida en un tamiz, congelada y posteriormente liofilizada obteniéndose un producto final de microcápsulas (Figura 1) perfectamente formadas con un tamaño medio de $180 \pm 82,7 \mu\text{m}$ de diámetro y un peso seco medio unitario de $0,24 \pm 0,008 \mu\text{g}$.

15 La dieta microencapsulada así obtenida se utilizó como único alimento de larvas de *Solea senegalensis* desde el día 14 de cultivo hasta el día 45 empleando una dosis diaria de 1 a 5 veces el peso seco de las larvas en el tanque de cultivo, consiguiéndose una supervivencia final del 65% y un peso seco medio de 1600 μg por larva (Tabla2).

20

B) 20 gramos de dieta fueron mezclados con 200 mililitros de una solución de alginato sódico al 0,75 % (p/v) y con 1 gramo de citrato cálcico previamente dispersado en 10 mililitros de agua.

25 La mezcla anterior fue añadida suavemente a 500 mililitros de aceite de girasol incluyendo 10 gramos de lecitina de soja y sometidos a agitación mecánica con la ayuda de un agitador de hélices utilizando para ello con una velocidad de 1000 r.p.m.

30 Después de 10 minutos y sin cesar la agitación, 20 mililitros de una solución oleosa incluyendo ácido acético en proporción 1:2 fue añadido continuando

la reacción 5 minutos más. Siguiendo a continuación el proceso como se detalla en el ejemplo A).

5 Se obtuvieron partículas esféricas, con un diámetro medio de $200 \pm 85 \mu\text{m}$ y $0,28 \pm 0,02 \mu\text{g}$ de peso seco medio unitario; contenido homogéneo y con mayor tiempo de residencia en una columna de agua con respecto a las elaboradas en el ejemplo A)

10 La dieta microencapsulada así obtenida se utilizó como único alimento de larvas de *Diplodus sargus* desde la apertura de la boca y hasta el día 25 así como en larvas de *Sparus aurata* desde los 11 hasta los 30 días obteniéndose en ambos casos aceptables resultados.

15 C) 15 gramos de algas unicelulares de la especie *Nannochloropsis gaditana* liofilizada en una proporción del 100% respecto al total de la dieta seca fueron mezclados con una solución de alginato sódico al 0,75 % (p/v) y con 1 gramos de citrato cálcico previamente dispersados en 10 mililitros de agua. Siguiendo a continuación el proceso como se detalla en el ejemplo A). Se
20 obtienen partículas esféricas, de $281 \pm 114 \mu\text{m}$ de diámetro medio; $0,49 \pm 0,04 \mu\text{g}$ de peso seco medio unitario y de contenido denso y homogéneo de células (Figura 1). Este microencapsulado es estable, se dispersa fácilmente en agua y mantiene sus características durante horas en agua.

Tabla 1. Formulación empleada en la elaboración del alimento microencapsulado (gramos por 100 gramos de dieta seca).

	Harina de pescado¹	50
	Harina de calamar²	10
5	Harina predigerida³	12
	Dextrina⁴	6
	Emulsión de lípidos⁵	12
	Lecitina de soja⁶	3
	Complejo vitamínico⁷	3
10	Vitamina C⁸	3
	Vitamina E⁹	1

¹ Aglonorse. Nosildmel innovation AS, Noruega.

² Squid powder. Rieber & Son ASA, Noruega.

15 ³ C.P.S.P. 90 Sopropain-Sopropeche, Francia.

⁴ ICN

⁵ Kurios Lipids. Kurios, Francia.

⁶ ICN

⁷ Vitacomplex. Kurios, Francia.

20 ⁸ Phospitan C. Showa Denko K.K. Japón.

⁹ ICN.

Tabla 2. Resultados de crecimiento (media \pm error estándar) en peso seco (μg), y supervivencia (%) de lenguados (*Solea senegalensis*) en cultivo, alimentados durante 1 mes con la dieta microencapsulada descrita en la presente invención.

	<u>Día 14</u>	<u>Día 30</u>	<u>Día 45</u>
Peso seco (μg)	545 \pm 35	957 \pm 43	1627 \pm 16
Supervivencia (%)	100	84 \pm 5	66 \pm 02

REIVINDICACIONES:

- 1.- Alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces, preferentemente peces marinos, caracterizado porque está formado por partículas esféricas de 40-1000 μm de diámetro solidificadas, aisladas y estables de contenido homogéneo y uniforme, y porque dichas partículas están formadas por un ingrediente activo de interés alimentario y farmacéutico, un agente inmovilizante y una sustancia que causa la gelificación de dicho agente dispersas, mediante la acción de un agente dispersante, en un líquido hidrofóbico y posteriormente solidificadas por adición de un ácido orgánico soluble.
- 2.- Alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho ingrediente activo de interés alimentario y farmacéutico es una dieta acuosa completa formada por:
- entre un 50-75% de material proteico compuesto por harinas de animales marinos de los que como máximo el 40% está hidrolizado.
 - entre un 5 y un 35 % de lípidos de los que el 20-30 % es un fosfolípido.
 - entre un 2 y un 25 % de carbohidratos (preferiblemente 3-10%)
 - entre un 1 y un 10% de complejos vitamínicos. (preferiblemente 4-7%)
- 3.- Alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho ingrediente activo de interés alimentario y farmacológico es un compuesto único seleccionado de entre cualquiera de los siguientes:
- materiales inorgánicos
 - colorantes
 - células aisladas
 - enzimas
- o mezclas de los mismos.
- 4.- Alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque el agente inmovilizante es un polisacárido presente en una proporción comprendida entre el 1 y el 20% respecto al ingrediente activo de interés alimentario y farmacéutico.

- 5.- Alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según la reivindicación 4, caracterizado porque el polisacárido utilizado es alginato sódico.
- 6.- Alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el agente gelificante es un compuesto con iones calcio, preferentemente citrato de calcio, presente en una proporción comprendida entre el 0,5 y el 13% respecto al ingrediente activo de interés alimentario y farmacéutico.
- 7.- Alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el líquido hidrofóbico en el cual se dispersa el ingrediente activo de interés alimentario y farmacológico es un aceite vegetal, preferentemente aceite de girasol.
- 8.- Alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el agente dispersante es lecitina de soja.
- 9.- Alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según las reivindicaciones 1-8 caracterizado por estar constituido por partículas que retienen más del 80% del producto encapsulado manteniendo su morfología y permaneciendo accesibles durante al menos 4 horas de exposición en agua de mar.
- 10.- Procedimiento de preparación de un alimento microencapsulado según las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque consta de los siguientes pasos:
- a) mezclar en agua el ingrediente activo de interés alimentario y farmacéutico con un agente inmovilizante y una sustancia que causa la gelificación de dicho agente, que resulta en una solución de concentración comprendida entre 1-15% en peso
 - b) añadir la solución acuosa obtenida en el paso anterior a un líquido hidrofóbico, en una proporción entre 1:1 y 1:2, y un dispersante natural, en una proporción del 1-2% respecto al líquido hidrofóbico, que produce una dispersión de la mezcla acuosa formando gotas

c) añadir un ácido orgánico soluble en aceite, preferentemente ácido acético, a la mezcla anterior en una proporción comprendida entre 0.3-1.4% respecto a la mezcla total, para producir una solidificación de dichas gotas que forman micropartículas aisladas y estables

5 d) añadir a una sal multivalente, preferentemente cloruro cálcico, para estabilizar las partículas formadas en el paso c)

e) lavar las partículas en una solución que contiene un compuesto tensioactivo para eliminar cualquier residuo de aceite y posteriormente enjuagar con agua

10 f) tamizar, congelar y liofilizar para la obtención del producto final en forma de polvo seco.

11.- Procedimiento de preparación de un alimento microencapsulado según la reivindicación 10, caracterizado porque presenta una eficiencia de encapsulación de un compuesto único superior al 95%.

15

12.- Utilización de un alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según las reivindicaciones 1-9, para el crecimiento de larvas de dorada, sargos y lenguado desde los primeros días de alimentación.

20 13.- Utilización de un alimento microencapsulado para los primeros estadios de peces según las reivindicaciones 1-9 para el crecimiento de larvas de Lenguado, empleando una dosis diaria de 1 a 5 veces el peso seco de las larvas en el tanque de cultivo.

25

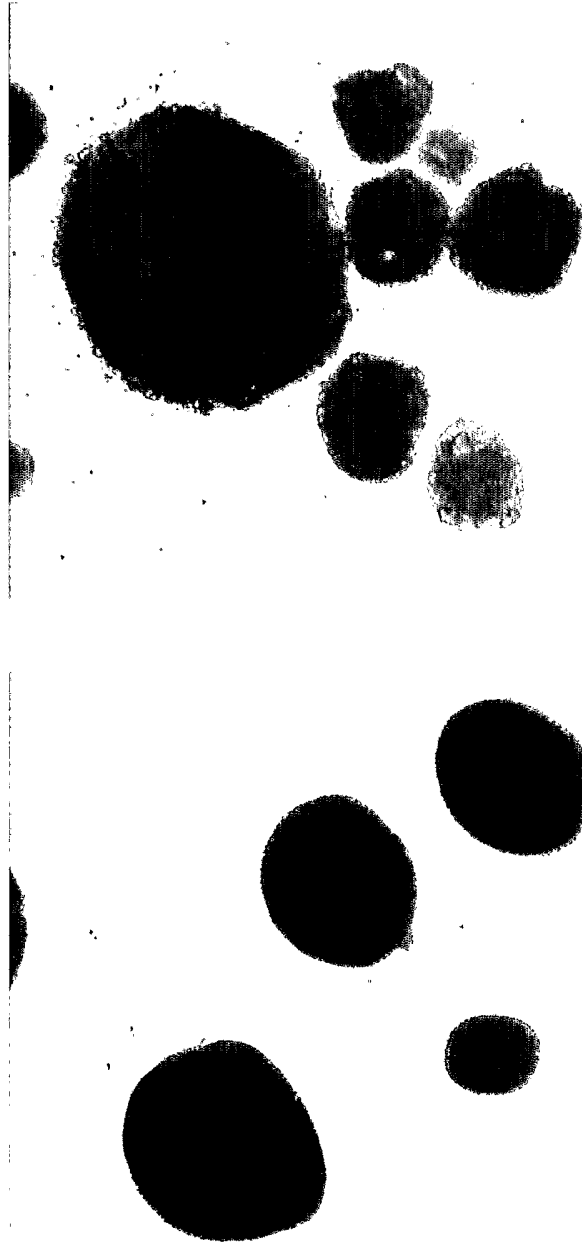


Figura 1

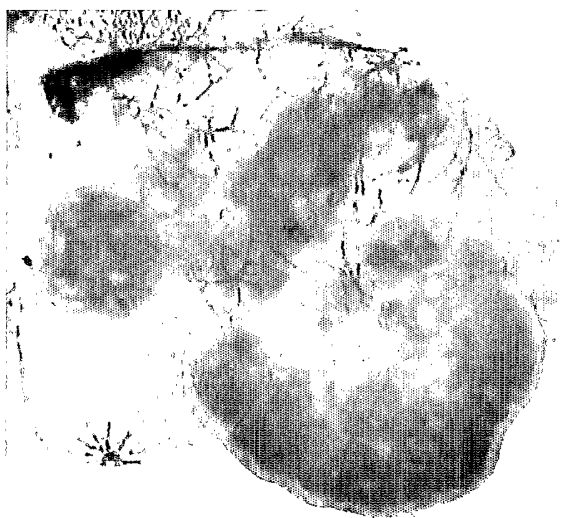
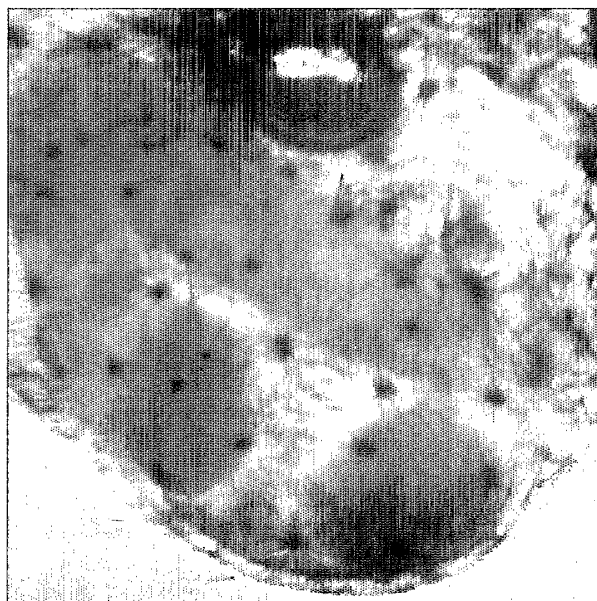


Figura 2