

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 062**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/54</b>	(2015.01)
<b>A61K 35/56</b>	(2015.01)
<b>A23K 50/80</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/612</b>	(2015.01)
<b>A23L 17/00</b>	(2006.01)
<b>A01K 61/00</b>	(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2013 PCT/NO2013/050192**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14073980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2013 E 13808272 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2916664**

54 Título: **Material marino derivado de estadios de desarrollo iniciales de percebes**

30 Prioridad:

**08.11.2012 NO 20121315**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.10.2017**

73 Titular/es:

**PLANKTONIC AS (100.0%)  
Bynesveien 48  
7018 Trondheim, NO**

72 Inventor/es:

**TOKLE, NILS EGIL y  
AAKERØY, HÅVARD JOHAN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 636 062 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Material marino derivado de estadios de desarrollo iniciales de percebes

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un pienso y a su uso. La presente invención también se refiere al uso de huevos y nauplio de estadio I de un percebe.

Además, la presente invención se refiere a métodos para recolectar y aislar huevos y/o nauplios de estadio I de un percebe maduro, sésil, fijado a una superficie. Finalmente, la presente invención se refiere a métodos para conservar un material de percebe para un producto nutricional así como a una composición.

**Antecedentes de la invención**

10 Los alimentos que contienen un alto contenido de ácidos grasos insaturados marinos han demostrado ser beneficiosos para el desarrollo normal y la calidad nutricional de muchas especies acuáticas criadas usadas en el consumo para seres humanos. En la actualidad, la cría de muchas especies de peces marinos y crustáceos depende en gran medida de la alimentación de presas vivas durante sus primeros estadios de desarrollo.

15 Las dietas artificiales, tales como microdietas, son en general poco satisfactorias en las primeras alimentaciones de las larvas precoces de peces marinos y crustáceos. Se han sugerido varios motivos que podrían provocar que las microdietas no sean satisfactorias en las primeras alimentaciones de larvas marinas. Aparte de tasas de alimentación reducidas debido a una menor aceptación, se ha sugerido que una calidad nutricional insuficiente de la dieta que no cubre los requisitos de las larvas y/o la alta carga de compuestos orgánicos que provoca problemas microbianos y la calidad reducida del agua que la acompaña son causas de que fracasen las dietas artificiales. Otros motivos sugeridos son una digestibilidad reducida de las dietas, que se ha sugerido que es el resultado de una posible falta de enzimas en las microdietas. Este último motivo se basa en el hecho de que las larvas de peces marinos carecen de estómago en la fase larvaria y, por tanto, de una digestión péptica eficaz de los alimentos. Se ha sugerido que las enzimas, incluidas de manera natural en la presa de alimentación viva, pueden ser necesarias para una digestión eficaz de los alimentos en los estadios tempranos o como factor estimulante/activante de la excreción endógena y síntesis de enzimas digestivas larvarias. Además de otros factores, la alimentación inadecuada durante los primeros estadios de vida de larvas de peces marinos tales como el bacalao del Atlántico, halibut del Atlántico y rodaballo no sólo dan como resultado un crecimiento reducido, sino también altas mortalidades, reducción de la calidad de las larvas y malas pigmentaciones y malos desarrollos.

20 En la acuicultura, los organismos de presa más comunes usados para alimentar larvas de peces marinos pertenecen al grupo de los rotíferos, especialmente algunas especies que pertenecen a la familia de *Brachionidae* y a la especie de camarón salino *Artemia*. Sin embargo, la composición nutricional de ambos, rotíferos y *Artemia*, es mala de manera natural y no es adecuada para la alimentación de larvas de peces marinos. Por tanto, estos organismos tienen que criarse en criaderos intensivos y deben enriquecerse con lípidos marinos, especialmente ácidos grasos omega-3 para mejorar su calidad nutricional como organismos de presa para larvas de peces marinos. Esto hace que la cría de estos organismos de presa sea laboriosa y cara. Pero, a pesar del enriquecimiento mencionado, todavía no se encuentra que ni la *Artemia* ni los rotíferos sean nutricionalmente óptimos para muchas especies de larvas. Esto se refleja en las tasas de mortalidad, tasas de crecimiento, malas pigmentaciones y malos desarrollos. Por tanto, existe una clara necesidad de dietas de sustitución más óptimas para la primera alimentación de larvas así como para estadios de vida tempranos de muchos crustáceos de criadero que usa, por ejemplo, *Artemia* enriquecida como dieta.

25 Además, existe una gran necesidad de material biológico de origen marino rico en ácidos grasos omega-3 que sea adecuado para su uso en el consumo por animales y seres humanos. El creciente conocimiento de los efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3 (véase por ejemplo el documento WO 93/11675) en sectores tales como el consumo por seres humanos, composiciones farmacéuticas y para fines de salud en seres humanos y otros animales distintos de los peces aumenta adicionalmente la demanda cuantitativa de estos ácidos grasos. En la actualidad, la principal fuente de materia prima biológica marina son el aceite de pescado y las harinas de pescado. Sin embargo, debido a la pesca excesiva acompañada por una demanda creciente a nivel mundial, existe una necesidad creciente de nuevas fuentes marinas biológicas no explotadas para cubrir la demanda.

30 Los percebes son un organismo apenas explotado a nivel industrial. Los percebes son un tipo de artrópodo que pertenecen a la infraclase *Cirripedia* en el subfilo *Crustacea*. Los percebes son exclusivamente marinos y tienden a vivir en aguas poco profundas y con mareas. Son animales que se alimentan en suspensión sésiles (no móviles). Actualmente se conocen aproximadamente 1.220 especies de percebes. En los océanos se encuentran dos tipos principales de percebes, los percebes del Cantábrico y los balanos.

35 Los percebes incuban sus huevos en la cavidad corporal, en la que se desarrollan adicionalmente para dar el nauplio de estadio I de un ojo. Los nauplios I se liberan del progenitor a la columna de agua en la que se desarrollan para dar nauplios de estadio II tras un breve tiempo, normalmente en el plazo de un día. Los nauplios de estadio II tienen una vida planctónica en la que nadan libremente, que dura varias semanas durante las cuales el nauplio II

inicia un comportamiento de alimentación activa. Los estadios de nauplio planctónico libres desarrollan diferentes apéndices tales como cuernos frontales que ya pueden observarse en el nauplio de estadio II. Entonces se completan varios estadios de nauplios como plancton (de larvas de nauplio II a larvas de nauplio VI), hasta que se convierten en larvas cypriis competentes. Cypriis es el estadio planctónico final, que se adhiere a un sustrato, y posteriormente experimenta una metamorfosis para dar la forma de un espécimen adulto.

Se ha propuesto una comparación de cambios en la composición de lípidos durante el ciclo de vida temprano de diferentes crustáceos incluyendo percebes por Lee y Nevenzel (Lee, R. F. y Nevenzel, J. C. 1974. Lipid changes during life cycle of marine copepod *Euchaeta japonica* Marukawa. Lipids. vol. 9, n.º 11,1, páginas 891-898).

Dado que los percebes se fijan a estructuras construidas por el hombre, especialmente a barcos, así como a material biológico tal como las conchas de mejillones para consumo, se reconocen principalmente, y de manera casi exclusiva, como organismos de incrustación, teniendo su presencia consecuencias económicas negativas. Por tanto, hasta ahora los estudios sobre los percebes se han centrado principalmente en factores que influyen en la fijación de percebes así como en métodos de eliminación de percebes de superficies. Algunos percebes maduros se consideran comestibles por seres humanos, especialmente los percebes del Cantábrico y percebes gigantes. Por ejemplo, los percebes del Cantábrico se crían con este fin.

Se han criado percebes con aplicaciones comerciales y fines de investigación con el objetivo de recolectarlos en su estadio sésil. Lopez *et al.* 2012 describen la cría de larvas de percebes para dar especies adultas para consumo por seres humanos (López, D. A.; López B. A., Pham, C. K., Isidro, E. J. 2012. Potency of barnacle in aquaculture industry. En: Aquaculture, Editor: Muchlisin, Z., ISBN 978-953-307-374-5, Intech.). Los percebes también se recolectan del entorno natural o bien recogidos en el estadio planctónico o bien mediante retirada de los organismos sésiles.

Se han filtrado larvas de percebes planctónicas que nadan libremente del agua y se han sometido a prueba como dieta para langosta juvenil (Daniel, P.C., Bayer, R. C., Chapman, S. 1985. Barnacle larvae (*Balanus spp.*) as a potential diet for juvenile lobster (*Homarus americanus*). Aquaculture 46, págs. 67-70). También se mencionan pruebas llevadas a cabo con nauplios de percebes planctónicos como alimento vivo para larvas de peces (véase Wullur S., Sakakura, Y., Hagiwara, A. 2009. The minute monogonont rotifer *Proales similis* de Beauchamp: Culture and feeding to small mouth marine fish larvae. Aquaculture 293, pág. 67), pero no se consideraron óptimos para este fin.

Otra aplicación de materia prima de percebe se describe en el documento CN1593464, que da a conocer un producto sanitario antiinflamatorio y de alivio del dolor que se extrae de una materia prima de percebe.

El problema técnico objetivo que va a resolverse mediante la presente invención es proporcionar un nuevo recurso biológico para productos nutricionales tales como alimentos así como métodos para la explotación de un nuevo recurso biológico marino que puedan aplicarse a nivel industrial para diferentes fines. Por tanto, la presente invención se refiere a proporcionar un nuevo recurso biológico para productos marinos y a un método para explotar y producir el mismo.

Un objetivo adicional es proporcionar el nuevo recurso biológico para el producto marino en una forma pura particular sin mezclarse con otro material biológico.

En particular, la presente invención tiene el objetivo de proporcionar una dieta optimizada útil para la alimentación de animales acuáticos tales como peces y crustáceos, especialmente en sus estadios de vida tempranos así como para especies acuáticas ornamentales.

### Sumario de la invención

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un pienso que comprende huevos y/o nauplios de estadio I de un percebe.

El pienso puede comprender además nauplio de estadio II de un percebe. Preferiblemente, al menos el 70% del material comprendido en el pienso es nauplio de estadio I, más preferiblemente al menos el 80%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, incluso más preferiblemente al menos el 95%, y lo más preferiblemente al menos el 99% del material en relación con el peso en húmedo total o el número total de organismos. Preferiblemente, el pienso tiene un contenido de huevos que es de menos del 30%, más preferiblemente menos del 20%, incluso más preferiblemente menos del 10% y lo más preferiblemente menos del 5% en relación con el peso en húmedo o el número de organismos comprendidos en el producto. Otra realización preferida según la presente invención tiene un contenido de nauplio de percebes de estadio II que es de menos del 50%, más preferiblemente el 20%, incluso más preferiblemente menos del 10% y lo más preferiblemente menos del 5% en relación con el peso en húmedo o el número de organismos comprendidos en el producto.

También se prefiere que el material de percebe comprendido en el pienso sólo comprenda nauplio de estadio I, o sólo comprenda huevos, o sólo comprenda una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o nauplio de estadio II de un percebe.

Además se prefiere que el pienso no comprenda estadios de desarrollo vivos de percebes.

5 El pienso es producto alimenticio para un animal acuático, preferiblemente para un animal acuático de criadero seleccionado de peces y crustáceos, para un vertebrado ornamental o para invertebrado ornamental y lo más preferiblemente para estadios vivos tempranos de un pez o de un crustáceo, que es preferiblemente una especie seleccionada de larvas de peces marinos, un cangrejo, un camarón, una gamba y una langosta.

En otra realización preferida, dicho pienso comprende o consiste en un aceite derivado de huevos y/o nauplio de estadio I o una combinación de huevos y/o nauplio de estadio I con nauplio de estadio II de un percebe.

10 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un uso de huevos y/o nauplio de estadio I de un percebe para consumo por animales y seres humanos, como suplemento alimenticio, producto sanitario y/o alimento funcional.

Preferiblemente, un animal acuático de criadero, un vertebrado ornamental o un invertebrado ornamental, se alimenta con un producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o bien directamente o bien comprendido en un alimento con otros ingredientes.

15 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método para recolectar y aislar huevos y/o nauplios de estadio I de un percebe maduro, sésil, fijado a una superficie en el que los huevos y/o nauplios de estadio I se retiran directamente del percebe sésil retirando mediante lavado dichos huevos y nauplios de estadio I de los percebes maduros sésiles mediante chorros de agua, y recogiendo posteriormente.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para recolectar y aislar huevos y/o nauplios de estadio I de un percebe maduro, sésil, fijado a una superficie para su uso en un producto según la reivindicación 1 en el que los huevos y/o nauplios de estadio I:

- se retiran del percebe sésil tras haberse desprendido dicho percebe de dicha superficie mediante fuerzas mecánicas y/o chorros de agua, y se recogen los percebes maduros retirados junto con los huevos y/o nauplios de estadio I, y

25 - liberar opcionalmente huevos y/o nauplios de estadio I todavía fijados al percebe tras dicho desprendimiento mediante el uso de fuerzas mecánicas y/o lavado; y

- separar los huevos y/o nauplios de los percebes maduros mediante un método de separación.

Los huevos y nauplios de estadio I obtenidos pueden fraccionarse tras la liberación de los percebes maduros en fracciones de diferente tamaño o bien

30 - mediante un método de separación mecánica, seleccionado preferiblemente de tamizado, filtración y/o centrifugación, o bien

- mediante aplicación de luz que provoca una respuesta fototáctica de las larvas de nauplio.

35 El método para recolectar aplicado puede comprender una etapa adicional para aumentar el contenido de nauplio de estadio I en el material tras la recolección mediante incubación de los huevos y/o nauplios de estadio I vivos aislados todavía comprendidos en la membrana de huevo durante un periodo de tiempo definido en agua de mar para la eclosión/liberación de nauplios I que todavía están situados en la membrana de huevo para dar nauplios I que nadan libremente.

Preferiblemente, la temperatura de incubación es de entre 5 y 10°C, más preferiblemente de aproximadamente 8°C y el tiempo de incubación es de entre 5 y 12 horas, preferiblemente de aproximadamente 10 horas.

40 La presente invención también se refiere a un método para conservar un material de percebe para un producto según de los párrafos anteriores, en el que los nauplios y/o huevos recolectados comprendidos se tratan mediante uno o varios de los métodos seleccionados de enfriamiento por debajo del punto de congelación de los animales, tratamiento térmico, secado, liofilización, almacenamiento en una atmósfera modificada y adición de productos químicos conservantes.

45 Preferiblemente, el material de percebe se conserva mediante un tratamiento térmico que se elige de calentamiento hasta una temperatura de entre 55°C y menos de 70°C, pasteurización mediante calentamiento hasta al menos 70°C, preferiblemente por encima de 75°C y esterilización por encima de 100°C y opcionalmente se almacena.

Preferiblemente, el material se almacena por debajo del punto de congelación, preferiblemente a -18°C o menos, más preferiblemente a -80°C o menos con o sin conservación previa.

50 También se prefiere que el material se almacene en una atmósfera modificada, preferiblemente en gas nitrógeno, más preferiblemente almacenado en una atmósfera modificada y a una temperatura por debajo de 4°C con o sin conservación previa.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende huevos y/o nauplio de estadio I de percebes o un material derivado de los mismos para su uso en un tratamiento profiláctico o médico. Preferiblemente, dicha composición se usa para mejorar el crecimiento, la supervivencia y/o mala pigmentación de un animal, preferiblemente de un animal acuático.

5 También se definen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

Una especie particularmente preferida según la presente invención es el balano *Semibalanus balanoides*. Se sabe que los *S. balanoides* adultos crecen hasta 15 milímetros de diámetro, viviendo fijados a rocas y otros sustratos sólidos. *S. balanoides* se encuentra en la zona intermareal en los océanos del norte del planeta. Su distribución está limitada en el norte por el alcance de la barrera de hielo y en el sur por la temperatura creciente que impide la maduración de gametos. *S. balanoides*, como la mayoría de los demás percebes, es hermafrodita, pero no puede fecundarse a sí mismo. Pueden producirse hasta 10.000 huevos por individuo, y se almacenan en sacos dentro de la cavidad de la concha. Mientras los huevos están desarrollándose, el percebe adulto no muda. Los huevos eclosionan para dar larvas de nauplio, que tienen tres pares de patas, un par de antenas y un único ojo y se liberan como estadio de desarrollo de nauplio I tras lo cual se desarrollan rápidamente para dar nauplio de estadio II para coincidir con la proliferación de algas en primavera.

Otras especies de percebes útiles según la presente invención son cualquier percebe adecuado elegido de la infraclase *Cirripedia*. Sin limitarse a los siguientes ejemplos, son de particular interés las especies seleccionadas de los géneros *Semibalanus*, *Balanus*, *Austrominius*, *Amphibalanus*, *Verruca*, *Chirona*, *Notoch-thamalus*, *Jehlius*, *Chthalamus* y *Belanus*.

20 Se apreciará que las características de la invención descritas anteriormente pueden combinarse en cualquier combinación sin apartarse del alcance de la invención.

#### Descripción detallada de la invención

Ahora se describirán en detalle realizaciones de la presente invención y se ilustrarán y respaldarán adicionalmente mediante ejemplos con referencia al siguiente diagrama, en el que

25 la figura 1 muestra el peso medio ( $\pm$  DE) de larvas de *Solea solea* alimentadas con nauplios de percebes en combinación con alimento vivo tradicional usado en criaderos tradicionales (grupo B) en comparación con el control (grupo A) que sólo recibió la dieta con alimento vivo.

Los percebes usados en las siguientes pruebas y experimentos según la presente invención fueron de la especie *Semibalanus balanoides* y todos se recolectaron en Noruega. *S. balanoides* es una especie de balano común y extendida, que es común sobre rocas y otros sustratos en la zona intermareal del noroeste de Europa y ambas costas de América del Norte y por tanto también puede recolectarse normalmente de otras ubicaciones distintas de Noruega.

Si no se da a conocer lo contrario, se usó el siguiente método para preparar el producto de percebe usado en los siguientes experimentos descritos: Se recogieron los organismos del entorno natural en aguas costeras noruegas mediante el método de retirada mecánica de animales progenitores de roca costera y retirando posteriormente los nauplios de los animales progenitores mediante trituración mecánica y tamizado sobre filtros de acero inoxidable de 1000, 500 y 100  $\mu\text{m}$ , en los que se recogieron los nauplios I entre los filtros de 100-500  $\mu\text{m}$ . Se transfirieron directamente los nauplios a agua de mar a 70°C durante un mínimo de 15 minutos, y posteriormente se empaquetaron en bolsas laminadas de aluminio tratables en retorta con gas  $\text{N}_2$  y se esterilizaron en una retorta a 112°C y 1,7 bar durante 40 minutos.

#### I. Recolección de huevos de percebe, nauplios de estadio I de percebes sésiles:

Los percebes adultos maduros son sésiles y normalmente se fijan a diferentes sustratos. Dado que los huevos y nauplios de estadio I se incuban en el percebe sésil y posteriormente se liberan, un método de recolección preferido para estos estadios de vida incluye retirar el percebe sésil de los sustratos en los que está fijado junto con los huevos y las larvas de nauplio I. Tales sustratos pueden ser normalmente superficies de materiales tales como piedras, madera, hormigón y material de plástico. Los huevos y nauplios de estadio I pueden recolectarse y aislarse de criaderos naturales o artificiales de percebes.

Los percebes sésiles se retiran normalmente mediante fuerzas mecánicas tales como raspado, rotura, trituración, uso de presión, etc. Otro método preferido particular son los chorros de agua usando agua a alta presión.

50 El material biológico retirado que comprende huevos y nauplios de estadio I se recoge para su procesamiento adicional. Si los percebes adultos se desprenden de la superficie junto con los huevos y nauplios de estadio I, se recogen junto con los estadios de vida tempranos y se separan preferiblemente unos de otros en una etapa realizada adicionalmente.

Si los huevos y nauplios de estadio I no se liberan de los organismos adultos tras desprenderse los organismos

sésiles de la superficie, se realiza una separación adicional de los organismos. Normalmente se usan fuerzas mecánicas tales como rotura y trituración. Una ventaja es que los nauplios o huevos no se destruyan o se destruyan lo menos posible. Un método alternativo incluye lavar con agua a alta presión (chorros de agua) para liberar los huevos y nauplios de estadio I del percebe adulto.

- 5 Posteriormente se separan los animales adultos de los huevos y nauplios de estadio I usando un método de separación adecuado. Se prefiere usar un método de separación mecánica tal como tamizado, filtración y/o centrifugación.

El tamizado puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando filtros con un tamaño de malla de 1000, 500 y 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, un filtro de acero inoxidable), en los que los nauplios I se recolectan entre los filtros de 100-500  $\mu\text{m}$ .

- 10 Un método de recolección alternativo es un método en el que los percebes maduros que comprenden los huevos, nauplios de estadio I no se retiran de sus sustratos. En estos métodos, los huevos y nauplios de estadio I se retiran mediante lavado de los percebes maduros mediante chorros de agua sin desprender los organismos adultos de la superficie. Posteriormente se recogen los huevos y nauplios de estadio I para su procesamiento adicional. Opcionalmente, se separan los huevos y nauplios de estadio I aislados en fracciones de diferentes tamaños  
15 mediante un método de separación mecánica, seleccionado preferiblemente de tamizado, filtración y/o centrifugación.

Por tanto, según la presente invención se realizan normalmente las siguientes etapas de método para recolectar y aislar huevos y nauplios de estadio I de un percebe sésil:

- 20 i.) retirar el percebe maduro sésil de la superficie en la que está fijado mediante fuerzas mecánicas y/o chorros de agua;  
ii.) recoger los percebes maduros retirados junto con los huevos y nauplios de estadio I para procesamiento adicional;  
iii.) si es necesario, liberar los huevos y nauplios de estadio I del percebe maduro mediante el uso de fuerzas mecánicas y/o lavado; y  
25 iv.) separar el material de huevos/nauplios de los percebes maduros mediante un método de separación mecánica, seleccionado preferiblemente de tamizado, filtración y centrifugación.

De manera opcional y adicional, se lleva a cabo una separación de los huevos y nauplios de estadio I aislados en fracciones de diferentes tamaños mediante un método de separación mecánica, seleccionado preferiblemente de tamizado, filtración y/o centrifugación, o bien simultáneamente a la etapa iv.) o bien después de la misma.

- 30 Alternativamente, como método para recolectar y aislar huevos y nauplios de estadio I a partir de un percebe sésil se llevan a cabo las siguientes etapas:  
i.) retirar mediante lavado huevos y nauplios de estadio I de los percebes maduros adultos mediante chorros de agua,  
ii.) recoger los huevos y nauplios de estadio I para su procesamiento adicional;  
35 iii.) opcionalmente separar los huevos y nauplios de estadio I aislados en fracciones de diferentes tamaños mediante un método de separación mecánica, seleccionado preferiblemente de tamizado, filtración y/o centrifugación.

- Los estadios de vida tempranos recolectados de percebes progenitores consisten en una amplia mayoría de nauplio de estadio I. Normalmente, sólo se encuentran pequeñas cantidades de huevos y dependiendo de la estación apenas se encuentran huevos en algunos casos. De esta manera, los estadios de vida tempranos recolectados sólo  
40 comprenden sustancialmente nauplio de estadio I justo después de la recolección. Con frecuencia, se observan algunas cantidades minoritarias de nauplio de estadio II en el material aislado. Esto está provocado probablemente porque algunas de las larvas de nauplio en estadio I se desarrollan para dar el estadio II durante la recolección. La cantidad/el número de larvas de nauplio de estadio II depende del tiempo empleado para recolectar y desde la recolección hasta que se conservan las muestras. Si se lleva a cabo conservación directamente o dentro de un  
45 breve periodo de tiempo tras la recolección, no se encuentran nauplios de estadio II o su presencia es tan baja que es despreciable. Un producto preferido según la presente invención tiene una alta cantidad de larvas de nauplio de estadio I y, por tanto, se prefiere que el periodo de tiempo entre la recolección y conservación sea breve con el fin de detener el desarrollo adicional del nauplio de estadio I para dar nauplio de estadio II. Lo más preferido es una conservación directa tras la recolección para detener el desarrollo adicional así como para mantener la calidad más  
50 óptima del material recolectado.

Un pienso preferido según la presente invención tiene una composición inicial (lo que significa una composición antes de la adición opcional de cualquier ingrediente adicional) en la que al menos el 70% del material aislado es nauplio de estadio I, más preferiblemente al menos el 80%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, incluso

más preferiblemente al menos el 95%, y lo más preferiblemente al menos el 99% del material aislado es nauplio de estadio I en relación con el peso total o número total de organismos comprendidos en el producto.

Además, un pienso preferido según la presente invención para su uso como alimentación para estadios de vida iniciales de animales acuáticos tales como larvas de peces marinos tiene una baja cantidad de huevos. El motivo para esto es que se encuentra que los huevos de percebes son menos digeribles que las larvas de nauplio I en pruebas de alimentación llevadas a cabo con larvas de peces marinos en el contexto de la presente invención. Sin limitarse a ninguna teoría, se supone que particularmente la cáscara/membrana de huevo es difícil de digerir para un pez marino precoz. Por tanto, se prefiere que un producto alimenticio, especialmente para su uso por larvas de peces marinos, según la presente invención tenga una cantidad de huevos que sea de menos del 30%, más preferiblemente menos del 20%, incluso más preferiblemente menos del 10% y lo más preferiblemente menos del 5% en relación con el peso o número de organismos comprendidos en el producto.

Además, un pienso preferido según la presente invención para su uso como alimento para estadios de vida iniciales de animales acuáticos tales como larvas de peces marinos tiene una baja cantidad de larvas de nauplio de estadio II. La forma exterior del nauplio de estadio II, que ha desarrollado cuernos frontales y otros apéndices como los estadios de nauplio posteriores, puede ser menos adecuada como partículas de alimentación en comparación con los primeros estadios sin cuernos ni otros apéndices.

En casos en los que los estadios vivos tempranos retirados de percebes se mantienen vivos y se incuban en agua en condiciones adecuadas (por ejemplo, se mantienen en agua de mar, y se almacenan en la oscuridad y en frío) hasta que tiene lugar el procesamiento durante un periodo de tiempo tras la recolección, el desarrollo de huevos y larvas de nauplio I aislados de la cavidad de los percebes maduros avanza fuera del progenitor. Por tanto, los nauplios de primer estadio pueden posiblemente eclosionar de los huevos y los nauplios de estadio I se desarrollan adicionalmente para dar nauplios de estadio II durante tal incubación. Al incubar los animales durante un tiempo definido en condiciones adecuadas, es posible por tanto influir en la composición del producto conservado posteriormente en cuanto a la cantidad de huevos y nauplios de estadio I o II. Por tanto, si es deseable, también es posible obtener un producto nutricional con una alta cantidad de nauplios de estadio II. Dado que la conservación detendrá el desarrollo adicional, es posible controlar la composición según la duración de la incubación tras la recolección. En el contexto de la presente invención, se mostró que los nauplios de estadio I recolectados y fraccionados, que se incubaron en agua de mar a 8°C, dieron como resultado una cantidad del 92% de estadio II tras 12 horas de incubación.

En casos en los que hay una mezcla de diferentes estadios de nauplios y/o huevos, puede realizarse una etapa de separación opcional de los huevos, nauplios de estadio I y nauplios de estadio II aislados en fracciones de diferentes tamaños mediante un método de separación mecánica, seleccionado preferiblemente de tamizado, filtración y/o centrifugación.

Alternativamente, puede usarse luz para separar larvas de nauplio de huevos, ya que se sabe que las larvas de nauplio de los percebes son fototácticas. Se encuentra que longitudes de onda en el intervalo de 520 a 530 nm son óptimas en la atracción de nauplios cirrípedos de dos especies diferentes, pero también se encontró que otras longitudes de onda eran eficaces (Barnes, H.; Klepal, W. 1972. Phototaxis in stage I nauplius larvae of two cirripedes. J. Exp. Mar. Biol. And Ecol. vol. 10 (3), págs. 267-273).

Los métodos descritos para recolectar tienen la gran ventaja de que el material obtenido está libre de cualquier otra especie planctónica. Los métodos de recolección que incluyen tomas de plancton de organismos que nadan libremente a partir del entorno natural siempre tendrán otras especies de la misma fracción y, por tanto, un producto no puro. Usando los métodos de la presente invención, esto puede evitarse. Además, es posible obtener y recolectar sólo los estadios de desarrollo más tempranos de percebes mediante estos métodos de aislamiento directo a partir de los percebes maduros.

#### 45 II. Conservación de huevos, nauplios de estadio I y/o nauplios de estadio II de percebes

Se prefiere además que el material biológico aislado obtenido que comprende o consiste sustancialmente en huevos y/o nauplios de estadio I de percebes, o en combinación con nauplio de estadio II, se conserve para su almacenamiento adicional. Los métodos según la presente invención incluyen preferiblemente uno o varios métodos elegidos de enfriamiento y/o congelación de los animales, tratamiento térmico, uso de una atmósfera de gas modificada o controlada, secado, irradiación, conservación a alta presión y tratamiento con productos químicos conservantes. Preferiblemente, se combinan varios métodos entre sí para obtener una estabilidad en almacenamiento y conservación óptima del producto. El método aplicado depende del uso posterior del material, los requisitos en cuanto a su calidad así como la duración del periodo de tiempo para el almacenamiento y las condiciones de almacenamiento en general.

55 Dependiendo del tiempo de almacenamiento, se usa enfriamiento por debajo de la temperatura ambiente, preferiblemente a 4°C o menos. Una realización preferida incluye el almacenamiento del producto por debajo del punto de congelación de los animales, más preferiblemente hasta una temperatura de -18°C o menos y lo más preferiblemente hasta una temperatura de -80°C o menos. Si se desea un almacenamiento estable particular puede

- usarse incluso nitrógeno líquido para el almacenamiento. La congelación del material por debajo del punto de congelación, preferiblemente a o por debajo de  $-80^{\circ}\text{C}$ , directamente o poco después de la recolección es un método de conservación sencillo y eficaz que da como resultado una calidad suficiente del material conservado también después del almacenamiento a largo plazo de 6 meses para muchas aplicaciones posteriores. Sin embargo, la estabilidad en almacenamiento del producto puede aumentarse si se combina el enfriamiento/congelación con otros métodos de conservación. Se prefiere si se proporciona una calidad y estabilidad muy altas del producto final. Por tanto, en una realización preferida el material biológico conservado mediante enfriamiento se somete a tratamiento térmico antes del enfriamiento o la congelación. También puede combinarse el enfriamiento con almacenamiento bajo una atmósfera de gas controlada o modificada.
- El almacenamiento en una atmósfera de gas modificada incluye preferiblemente almacenamiento bajo una atmósfera de nitrógeno, por ejemplo en un recipiente estanco a los gases tal como un envase de plástico. En una realización preferida, el tratamiento en atmósfera controlada se combina con una temperatura reducida tal como se describió anteriormente. Alternativamente, puede usarse envasado a vacío.
- Métodos de conservación preferidos que comprenden tratamiento térmico pueden ser, por ejemplo, calentamiento del material hasta menos de  $70^{\circ}\text{C}$ , un tratamiento de pasteurización mediante tratamiento térmico a al menos  $70\text{-}75^{\circ}\text{C}$ , o esterilización mediante al menos  $100^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente mediante  $112^{\circ}\text{C}$  o más durante un periodo de tiempo predefinido. El método preferido elegido dependerá del uso posterior del material así como del periodo de almacenamiento previsto.
- Un método de conservación preferido particular según la presente invención es la pasteurización a una temperatura de al menos  $70^{\circ}\text{C}$  durante, preferiblemente, al menos 15 minutos, preferiblemente al menos a  $75^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el material preferiblemente se congela y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$  o menos. Pruebas han mostrado que se encuentran altas calidades del material obtenido si se almacena hasta 6 meses en esas condiciones. Ventajas con el método son que se destruyen todas las enzimas autolíticas y se destruyen los estadios vegetativos de microorganismos lo que contribuye a un producto más estable. El procedimiento puede adaptarse según el tipo de producto, pH, contenido en sales, contenido en agua, contenido en proteínas, etc.
- Otro método de conservación preferido incluye el calentamiento del material hasta una temperatura de menos de  $70^{\circ}\text{C}$  durante al menos 15 minutos, seguido por congelación y posterior almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  o menos. Preferiblemente, la temperatura debe ser de al menos  $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente  $60^{\circ}\text{C}$  o más, con el fin de desactivar la mayor parte de las enzimas inherentes. Pruebas han mostrado que se encuentran altas calidades del material obtenido si se almacena hasta 6 meses en esas condiciones. Una ventaja del método es que el producto se vuelve más estable frente a la descomposición y autólisis. Sin embargo, algunos grupos de enzimas autolíticas todavía permanecerán intactas y no se destruirán necesariamente todos los estadios vegetativos de microorganismos. El hecho de que todavía están presentes al menos algunas de las enzimas puede ser una ventaja si se usa como alimento para larvas de peces marinos en sus estadios de vida iniciales. Estas pueden requerir enzimas intactas que vienen con el alimento para poder digerirlo.
- Sin limitarse a lo siguiente, ejemplos típicos para métodos de conservación y tiempo de almacenamiento combinados según la presente invención son:
- Semipasteurización mediante calentamiento a entre  $55$  y menos de  $70^{\circ}\text{C}$  durante al menos 15 minutos, seguido por congelación y posterior almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  o menos durante hasta seis meses.
  - Pasteurización a  $70^{\circ}\text{C}$  o más durante 20 minutos y después congelación y almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  o menos durante hasta seis meses.
  - Congelación y almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  o menos durante hasta seis meses con o sin conservación anterior. Para aumentar adicionalmente la estabilidad en almacenamiento, las temperaturas elegidas para el almacenamiento pueden ser incluso inferiores. Preferiblemente, la temperatura usada para el almacenamiento puede ser de  $-86^{\circ}\text{C}$  o menos, más preferiblemente  $-160^{\circ}\text{C}$  o menos, lo más preferiblemente  $-196^{\circ}\text{C}$ .
  - Pasteurización a una temperatura de al menos  $70^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos y después esterilización a  $112^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos, almacenamiento durante hasta 6 meses a temperatura ambiente con aire o gas  $\text{N}_2$  dentro del material de envasado.
- El material biológico, que comprende o que comprende sustancialmente huevos y nauplios de estadio I de percebes, también puede conservarse mediante adición de productos químicos conservantes. Normalmente, estos productos químicos pueden incluir benzoato de sodio, sorbato de potasio, sulfitos, etc. Estos se añaden preferiblemente en bajas cantidades para inhibir y/o estancar el crecimiento bacteriano en la materia prima.
- Hacer que la materia prima sea alcalina, es decir ajustar a un pH de más de 9 mediante la adición de un producto químico alcalino, impedirá que muchas especies bacterianas se desarrollen para dar estadios vegetativos. Alternativamente, acidificar el material por debajo de pH 4,6 también impedirá que la mayoría de las bacterias, incluyendo *Clostridium botulinum*, se desarrollen a partir de esporas para dar estadios vegetativos.

El material biológico recolectado también puede conservarse mediante secado, más preferiblemente mediante liofilización. El secado o la liofilización pueden llevarse a cabo directamente o después de uno de los métodos de conservación descritos anteriormente.

III. Composición bioquímica

5 Los huevos y nauplios de estadio I son ricos en ácidos grasos altamente insaturados, especialmente de DHA y EPA (véase la tabla 2 para un material que consiste sustancialmente en nauplio de estadio I, es decir, más del 90% en número de individuos), lo que hace que sean adecuados y beneficiosos para el consumo por seres humanos y animales.

10 Los nauplios I de percebes comprenden hasta aproximadamente el 70% de fosfatidilcolina en sus lípidos polares. Se reconoce que la fosfatidilcolina es beneficiosa para el crecimiento y la supervivencia de larvas de peces marinos.

En la presente invención, se encontró sorprendentemente que los huevos y nauplios de estadio I de percebes, que tampoco son un alimento natural para estadios de vida tempranos de peces y crustáceos, son adecuados como alimento para estas especies.

15 En una realización preferida según la presente invención, se extrae un producto lipídico tal como un aceite de una materia prima que comprende principalmente huevos y/o nauplios de estadio I. Este producto lipídico puede usarse, por ejemplo, en aplicaciones en las que se usan actualmente otros aceites marinos tales como de pescado, kril, copépodos o mamíferos marinos.

Composición tras el tratamiento de conservación y el almacenamiento:

20 Se recolectaron nauplios de percebes de estadio I de *S. balanoides* y posteriormente se trataron mediante diferentes métodos para la conservación y el almacenamiento. Tras la conservación y el almacenamiento, se analizó la composición de lípidos. Se extrajeron lípidos según el método de Blight y Dyer 1959 (Blight, E. G. y Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Cand. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917) y se analizó el contenido en lípidos total mediante gravimetría. La cantidad total de lípidos con respecto al peso en seco estaba en el intervalo del 10-12%.

25 Se analizaron las clases de lípidos basándose en Reynold Homan, Maureen K. Anderson, *Journal of Chrom. B.* 708 (1998) 21-26 y Robert A. Moreau, *Lipids*, vol. 41, n.º 7 (2006). Se realizaron análisis cuantitativos de ácidos grasos según el método oficial de la AOCS Ce 1b-89.

Se usaron los siguientes tratamientos experimentales para la conservación y el almacenamiento:

- 30 A) Pasteurización a 70°C durante 20 min y después congelación y almacenamiento a -80°C durante seis meses.
- B) Congelación y almacenamiento a -80°C durante seis meses.
- C) Pasteurización a 70°C durante 20 min y después esterilización a 112°C durante 40 min, almacenamiento durante 6 meses a temperatura ambiente con aire dentro del material de envasado.
- D) Pasteurización a 70°C durante 20 min y después esterilización a 112°C durante 40 min, almacenamiento durante 6 meses a temperatura ambiente con gas nitrógeno dentro del material de envasado.

35 Tabla 1. Porcentaje de lípidos polares y neutros y ácidos grasos de nauplio I de *S. balanoides* usando diferentes métodos de conservación; A) Pasteurización a 70°C durante 20 min y después congelación y almacenamiento a -80°C durante seis meses; B) Congelación y almacenamiento a -80°C durante seis meses; C) Pasteurización a 70°C durante 20 min y después esterilización a 112°C durante 40 min, almacenamiento durante 6 meses con aire dentro del material de envasado a temperatura ambiente; D) Pasteurización a 70°C durante 20 min y después esterilización a 112°C durante 40 min, almacenamiento durante 6 meses con gas nitrógeno dentro del material de envasado a temperatura ambiente.

	Conservación y método de almacenamiento			
	A	B	C	D
% de grasa total				
Lípidos polares	71	52	71	66
Lípidos neutros	29	48	29	34
- ácidos grasos libres	1	18	3	3
% de ácidos grasos totales (analizados en el tratamiento A)				
DHA	24			
EPA	27			
Suma de ácidos grasos poliinsaturados (n-3)	53			

El porcentaje de ácidos grasos omega-3 poliinsaturados (ácidos grasos n-3) fue alto en todas las muestras analizadas (tabla 1), principalmente debido al alto contenido en ácido docosahexanoico (DHA, 22:6n-3) y ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3). Se reconoce que estos dos ácidos grasos son particularmente importantes durante el desarrollo temprano de animales marinos, especialmente de larvas de peces marinos. Pero también se encuentra que son beneficiosos en el desarrollo y la nutrición de otros animales, incluyendo seres humanos.

El método de conservación afectó a la cantidad de lípidos neutros y polares en el material almacenado. El método de conservación sin tratamiento térmico (tratamiento B), que sólo incluía congelación del material, dio como resultado un porcentaje reducido de lípidos polares y una cantidad aumentada de lípidos neutros en relación con los lípidos totales. Además, se aumentó la cantidad de material graso libre cuando sólo se usó congelación. Esto puede indicar una actividad lipolítica en estas muestras, mientras que enzimas sensibles al calor tales como las lipasas parecen inactivarse por calor en los demás tratamientos. Aunque el tratamiento térmico dio como resultado un producto más estable durante el almacenamiento en cuanto a la composición de lípidos, puede usarse sólo congelación en aplicaciones en las que la calidad obtenida es suficiente para el propósito seleccionado ya que todavía dio como resultado una composición aceptable incluso después del almacenamiento durante 6 meses. Por tanto, dependiendo de la aplicación posterior y de la calidad requerida, puede usarse congelación como método alternativo y más sencillo para la conservación en comparación con los métodos en los que se combina la congelación/enfriamiento con tratamiento térmico.

Tabla 2. % de composición de ácidos grasos de ácidos grasos totales en nauplio I de *S. balanoides* de tratamiento A, analizado mediante el laboratorio noruego de análisis NOFIMA Biolab. AGPI son ácidos grasos poliinsaturados.

Ácidos grasos	% de ácidos grasos totales
14:0	1,5
16:0	15,6
18:0	3,4
20:0	<0,2
22:0	<0,2
16:1 n-7	2,4
18:1 (n-9)+ (n-7)+ (n-5)	15,1
20:1 (n-9)+ (n-7)	4,5
22:1 (n-11)+ (n-9)+ (n-7)	1,1
24:1 n-9	0,2
16:2 n-4	0,2
16:3 n-4	<0,2
18:2 n-6	0,8
18:3 n-6	0,2
20:2 n-6	0,6
20:3 n-6	<0,2
20:4 n-6	1,1
22:4 n-6	<0,2
18:3 n-3	0,4
18:4 n-3	0,9
20:3 n-3	<0,2
20:4 n-3	0,2
20:5 n-3	27
21:5 n-3	0,4
22:5 n-3	0,2
22:6 n-6	24
Suma de ácidos grasos saturados	20,5
Suma de ácidos grasos monoinsaturados	23,4
Suma de ácidos grasos AGPI (n-6)	2,6
Suma de ácidos grasos AGPI (n-3)	53,3
Suma de ácidos grasos AGPI en total	56,1

#### 20 IV. Ensayos de alimentación usando nauplio de percebes I conservados según la presente invención

Se sometió a prueba un alimento que consistía principalmente en nauplios de percebes de estadio I de *Semibalanus balanoides* en experimentos de cría semiintensa e intensa con larvas de crustáceos y peces marinos. La materia prima conservada usada como alimentación se preparó tal como se describió anteriormente al comienzo de la sección de descripción detallada. La alimentación tenía una composición de al menos el 90% en número de individuos de nauplios I y entre el 0-10% de nauplios de estadio II.

Experimento 1: Ensayo con lenguado común, *Solea solea*

Se dividieron larvas en dos grupos experimentales cada uno de 500 ± 10 individuos (tres tanques de repetición para

cada grupo de dieta) a una concentración de 10 ind/l. A los grupos de experimento se les alimentó de la siguiente manera:

5 Grupo A (control): alimentado con una dieta de rotíferos enriquecidos (6 ind/ml) desde los días 3-9 tras la eclosión (ph), seguido por una dieta de rotíferos (3 ind/ml) en combinación con nauplios de *Artemia* (2 ind/ml, respectivamente) desde los días 9-12 y finalmente seguido por una dieta que consistía únicamente en nauplios de *Artemia* (4 ind/ml) desde el día 12 hasta el final del experimento.

Grupo B: alimentado con el 50% de rotíferos (3 ind/ml) más el 50% de nauplios de percebes (3 ind/ml), anteriormente conservados, desde los días 3-9, seguido por el 50% de *Artemia* (3 ind/ml) más el 50% de nauplios de percebes (3 ind/ml) los días 9-14.

10 Se realizaron tomas de muestras de larvas en los días 6 ph (estadio de rotífero temprano), 9 ph (estadio de rotífero tardío), 12 ph (estadio de rotíferos/*Artemia* mixtos) y 14 ph (comienzo del estadio de *Artemia*).

Se enriquecieron nauplios de rotíferos y *Artemia* con Algamac 3000 (Aquafauna Bio-Marine, Inc., Hawthorne, CA, EE.UU.) usando 0,5 g/millón de rotíferos y 0,2 g/100.000 nauplios de *Artemia* antes de la alimentación.

15 El crecimiento fue mayor en el grupo alimentado con nauplios de percebes I que en el grupo alimentado con la dieta de control (figura 1). El peso medio de las larvas de peces a los que se les ofrecieron nauplios de percebes (grupo B) fue un 21% mayor que en el control (grupo A) en el día 14, y la longitud media de las larvas fue un 14% más larga en el grupo B que en el grupo de control. La supervivencia fue significativamente mayor en el grupo B (el 69%  $\pm$ 2) en comparación con el control (65%  $\pm$ 2). Adicionalmente, se redujeron larvas de lenguado con mala pigmentación desde el 5% en el control hasta el 3% en las larvas de peces a las que se les ofrecieron nauplios I de *S. balanoides*.

20 Experimento 2: Ensayo con camarones, *L. vannamei*

Se realizó un ensayo con camarones en un criadero comercial y se comparó con regímenes de alimentación viva tradicionales comúnmente usados que incluyen plancton vivo, que son nauplios de *Artemia*. Se ofrecieron nauplios de percebes I como sustituto de nauplios de *Artemia* (grupo A). El grupo de control recibió nauplios de *Artemia* (grupo B).

25 Cuando se completó el ensayo de alimentación, el peso de camarones en tanques de criadero a los que se les ofrecieron nauplios de percebes I (grupo A) fue un 16% mayor que en el grupo de control sin percebes. Esto se debe tanto a una tasa de crecimiento como a una supervivencia superior de los camarones.

Experimento 3. Ensayo comercial con lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)

30 Se realizó un ensayo comercial con lenguado senegalés en tanques de criadero de 2,7 m<sup>3</sup>, usando los nauplios I de *S. balanoides* en uno de los tanques de criadero y nauplios I de *Artemia* vivos enriquecidos de manera convencional, tal como se usan comúnmente en criaderos comerciales, en varios de los otros tanques de criadero. Las larvas de peces a las que se les ofrecieron nauplios I de *S. balanoides* no tenían mala pigmentación, mientras que el 5% de los tanques de control presentaron tal deformación. Además, *S. senegalensis* a los que se les ofrecieron nauplios de estadio I de *S. balanoides* tenían una dispersión de tamaño significativamente más homogénea que los del control.

35 Experimento 4. Ensayos de alimentación con larvas de halibut del Atlántico, de bacalao del Atlántico y de maragota

Se realizaron tres ensayos de alimentación industriales usando los nauplios I de *S. balanoides* conservados mencionados anteriormente en tanques de criadero de 5 a 6,6 m<sup>3</sup> que contenían larvas de halibut del Atlántico, de bacalao del Atlántico y de maragota, respectivamente. El objetivo del estudio era observar la velocidad de decantación de la dieta que era nauplios de *S. balanoides*, y el apetito de las larvas de peces a las que se les ofreció la nueva dieta. Tras una hora, se tomaron muestras del agua de superficie, y se observó una decantación despreciable en ambos tanques de criadero. Cuando se tomaron muestras 4 horas tras la adición de la dieta, el 25% de los nauplios de *S. balanoides* todavía estaban en la capa de agua superior y estaba disponible para las larvas de peces. Se tomaron como muestras 25 larvas de maragota tras una hora, y se encontraron 3-20 nauplios de *S. balanoides* en los intestinos excepto por dos peces que no contenían nada de alimento. Se observaron directamente las larvas de halibut en los tanques de criadero y se alimentaron activamente con nauplios I de *S. balanoides*. Para el bacalao del Atlántico, se estudiaron el crecimiento y la supervivencia además de las velocidades de decantación. El criadero de bacalao del Atlántico comercial experimentó una tasa de crecimiento un 47% superior en cuanto al peso en comparación con el control al que se le alimentaron rotíferos enriquecidos. Estas tasas de supervivencia obtenidas fueron las más altas jamás alcanzadas en este criadero de bacalao.

50 Usar dietas de alimentación no viva como la descrita en el presente documento siempre supone un desafío, porque la velocidad de decantación es con frecuencia demasiado alta, y las larvas de peces muestran muy poco apetito por una presa que no se mueve. En estos tres ensayos industriales se documenta que este problema se ha superado usando los nauplios I de *S. balanoides* como presa.

Los experimentos descritos mostraron altas tasas de supervivencia así como un buen crecimiento y calidad de

larvas cuando se usaron nauplios de percebes como dieta. Los huevos y nauplios I de percebes tienen intervalos de tamaños típicos de desde 100 hasta 500  $\mu\text{m}$ , y por tanto, cubren el espectro de tamaño de la alimentación viva actual en acuicultura marina (rotíferos de 100 - 300  $\mu\text{m}$  y nauplios de *Artemia* normalmente de entre 350 - 800  $\mu\text{m}$ ).

5 Los resultados de los experimentos de alimentación inicial llevados a cabo indican que los nauplios de percebes de estadio I son particularmente adecuados como primera alimentación para larvas/juveniles de animales acuáticos en acuicultura. El material también puede usarse para animales ornamentales en general (vertebrados e invertebrados ornamentales). Usándolos como alimentación o como suplemento alimenticio pueden superarse muchos de los problemas conocidos en la alimentación inicial de larvas de peces, especialmente de larvas de peces marinos precoces. Las tasas de crecimiento, calidad de larvas y supervivencia mejoradas mostradas indican claramente esto.

10 Otros ensayos de alimentación en los que el material también incluyó huevos y nauplios de estadio I que aún no habían eclosionado completamente, sino que todavía estaban rodeados por la cáscara/membrana de huevo, indicaron que estos no eran tan adecuados en la alimentación inicial de larvas de peces marinos ya que su digestibilidad en el intestino parece limitada. Esto puede deberse a que la cáscara/membrana de huevo es más difícil de digerir.

15 Además, se supone que los nauplios de estadio I son más adecuados para la primera alimentación que nauplios de estadio II o incluso estadios de nauplios más avanzados ya que estas últimas han desarrollado cuernos y otros apéndices que pueden reducir su ingestibilidad. Es probable que estos cuernos/apéndices puedan servir como defensa frente a depredadores al menos para larvas de peces marinos en los estadios de vida iniciales. Por tanto, los cuernos en nauplios de estadio II pueden hacer que sean menos atractivos y adecuados como dieta para las larvas en comparación con nauplios de estadio I.

20 Los resultados experimentales dados a conocer indican que puede usarse una alimentación que comprende nauplios de estadio I de percebes o un material derivado de los mismos, como composición farmacéutica, es decir, medicamento, en particular para curar y/o prevenir malos desarrollos así como enfermedades que conducen a un crecimiento reducido y mortalidades superiores. Los resultados obtenidos dados a conocer en la cría de peces y camarones indican claramente que una composición de este tipo mejora el crecimiento y la supervivencia de un animal tal como una larva de pez marino (experimentos 1 y 3) o un crustáceo (experimento 2).

25 Además, demuestra que el uso de esta composición dio como resultado una reducción de la mala pigmentación en peces (experimentos 1 y 3). Especialmente en los peces planos, el desarrollo de anomalías tales como migración incompleta del ojo, mala pigmentación y deformaciones del esqueleto son desafíos principales, observados y experimentados con frecuencia en la producción intensa. Puede usarse una composición según la presente invención para reducir estos efectos negativos y anomalías en el desarrollo temprano.

30 El alimento natural para larvas de peces de especies marinas tales como bacalao, rodaballo y halibut consiste normalmente y en gran medida en especies pequeñas y estadios jóvenes de copépodos marinos, que están presentes en las aguas costeras. Los huevos y nauplios de percebes que están comprendidos dentro de los percebes maduros no están disponibles para las larvas de peces y, por tanto, no sirven como alimentación natural típica para estadios de vida tempranos de peces.

35 En general, todos los percebes que incuban huevos y nauplios I en el animal progenitor son de interés en el contexto de la presente invención. Una de las aplicaciones preferidas de la invención descrita es útil como primera alimentación para larvas/juveniles de animales acuáticos en acuicultura o para animales ornamentales en general.

40 Pueden usarse huevos y nauplios de percebes como artículos/ingredientes alimenticios para larvas de peces. Sin embargo, el material biológico aislado también puede usarse para otros fines de alimentación tales como para alimentación para vertebrados ornamentales (por ejemplo, peces) e invertebrados o crustáceos.

45 Un método para la alimentación de animales acuáticos de criadero y/u organismos acuáticos ornamentales comprende preferiblemente las etapas de preparar un alimento que comprende nauplios de estadio I como ingrediente principal y opcionalmente otros ingredientes alimenticios convencionales. El alimento puede comprender adicionalmente huevos de percebes y nauplio de estadio II de percebe. Alternativamente, se usan directamente nauplio de estadio I o una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o estadio II nauplio como alimento sin aditivos adicionales. En una realización preferida, la alimentación del material aislado de percebe (huevos/nauplios) especialmente para estadios vivos tempranos de peces y crustáceos, se combina con alimentación de otro alimento vivo tal como rotíferos o *Artemia*. La dieta que comprende nauplios I o una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o nauplio de estadio II de percebes también puede usarse en combinación con dietas artificiales tales como microdietas, especialmente en el periodo de transición de alimentación con presa viva a alimentación con alimento seco. El material que comprende nauplios I o una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o nauplio de estadio II puede usarse como sustitución parcial o total de alimento vivo durante la alimentación inicial de larvas de peces marinos.

55 En una realización preferida, el pienso según la presente invención, especialmente el producto alimenticio, comprende sustancialmente sólo material de percebe que consiste en nauplios I o una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o nauplio de estadio II de dicho percebe.

En otra realización preferida, el pienso según la invención consiste sustancialmente sólo en material biológico derivado de nauplios I o una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o nauplio de estadio II de un percebe y ningún otro ingrediente añadido.

5 Un método típico para la alimentación de animales acuáticos de criadero y/o vertebrados o invertebrados ornamentales (por ejemplo, según las presentes invenciones) comprende las siguientes etapas:

i.) preparar un alimento que comprende nauplio de estadio I o una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o nauplio de estadio II y otros ingredientes de alimentos convencionales; o

ii.) usar nauplios de estadio I o una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o nauplio de estadio II directamente como alimento sin aditivos adicionales, y

10 iii.) añadir el alimento a la unidad que comprende el animal que va a alimentarse mediante alimentación manual o mediante medios de alimentación automática.

Por tanto, el alimento que comprende nauplios de percebes de estadio I o una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o nauplio de estadio II puede añadirse a la unidad que comprende el animal que va a alimentarse mediante alimentación manual o mediante medios de alimentación automática. La alimentación puede llevarse a cabo de una manera discontinua o continua dependiendo de la aplicación. Puede añadirse directamente tras la recolección o tras la conservación y opcionalmente almacenamiento. Si se almacena a bajas temperaturas, puede añadirse, por ejemplo, tras descongelarse, descongelarse parcialmente o en un estado congelado.

15 En una realización preferida, el alimento se usa para larvas de peces marinos tales como larvas de bacalao del Atlántico, rodaballo, lubina, besugo, halibut.

20 En otra realización preferida, el alimento según la presente invención se usa para especies de criadero de crustáceos incluyendo especies que pertenecen al grupo de gambas, langosta, camarón, cangrejos, etc.

Por tanto, en la presente invención se ha inventado un nuevo alimento para animales acuáticos, especialmente animales acuáticos de criadero en sus estadios vivos tempranos. En otra realización preferida, el alimento según la presente invención se usa para vertebrados ornamentales tales como peces así como invertebrados tales como corales, anémonas, erizos de mar.

25 Basándose en su composición bioquímica, son posibles otras aplicaciones tales como para productos sanitarios, consumo por seres humanos, aditivos y suplementos alimenticios, productos medicinales, alimento funcional. Existe una necesidad de fuentes nuevas y alternativas de aceites marinos con un alto contenido en ácidos grasos omega-3. Un material o aceite derivado/extraído de huevos y/o nauplios de percebes según la invención puede servir como tal nuevo recurso.

30 Se apreciará que las características de la invención descritas anteriormente pueden modificarse sin apartarse del alcance de la invención.

Definiciones de términos:

35 *Percebe*: Por percebe quiere decirse un tipo de artrópodo que pertenece a la infraclase *Cirripedia* en el subfilo *Crustacea*.

*Percebe sésil*: Percebe no móvil fijado a una superficie.

*Alimento funcional*: Por alimento funcional quiere decirse un alimento que proporciona otras ventajas, no sólo simplemente efectos nutricionales, sino también efectos tales como efectos para la salud, estimulación de la respuesta inmunitaria, prevención del riesgo de enfermedades, etc.

40 *Pasteurización*: Por pasteurización quiere decirse un procedimiento de calentamiento de un material mediante el cual se ralentiza la degradación del material tratado al reducir el número de microorganismos viables y/o inhibir el crecimiento de microorganismos en el producto pasteurizado.

*Esterilización*: Un procedimiento mediante el cual se destruye o se elimina toda la vida microbiana en el producto, incluyendo agentes transmisibles tales como hongos, bacterias, virus, esporas, etc.

45 *Conservación*: Por conservación del material biológico quiere decirse un procedimiento de tratamiento y manipulación del material para detener o ralentizar la degradación (por ejemplo, por microorganismos), pérdida de calidad (por ejemplo, mediante oxidación, rancidez), deterioro visual, actividades enzimáticas inertes, etc.) y/o valor nutricional y, por tanto, permite un almacenamiento del alimento más duradero.

50 *Producto nutricional*: Por el término producto nutricional quiere decirse cualquier producto nutricional que puede usarse/consumirse por seres humanos y/o animales, que comprende productos tales como un alimento, un producto sanitario, un suplemento alimenticio y/o un alimento funcional.

**REIVINDICACIONES**

1. Pienso caracterizado porque el pienso comprende huevos y/o nauplios de estadio I de un percebe.
2. Pienso según la reivindicación 1, en el que el pienso comprende además nauplio de estadio II de un percebe.
- 5 3. Pienso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos el 70% del material comprendido es nauplio de estadio I, más preferiblemente al menos el 80%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, incluso más preferiblemente al menos el 95%, y lo más preferiblemente al menos el 99% del material en relación con el peso en húmedo total o el número total de organismos.
- 10 4. Pienso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el contenido de huevos es de menos del 30%, más preferiblemente menos del 20%, incluso más preferiblemente menos del 10% y lo más preferiblemente menos del 5% en relación con el peso en húmedo o el número de organismos comprendidos en el producto.
- 15 5. Pienso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el contenido de nauplio de percebes de estadio II es de menos del 50%, más preferiblemente el 20%, incluso más preferiblemente menos del 10% y lo más preferiblemente menos del 5% en relación con el peso en húmedo o el número de organismos comprendidos en el producto.
- 20 6. Pienso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el material de percebe comprendido en el pienso sólo comprende nauplio de estadio I, o sólo comprende huevos, o sólo comprende una combinación de nauplio de estadio I con huevos y/o nauplio de estadio II de un percebe.
- 25 7. Pienso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material no comprende estadios de desarrollo vivos de percebes.
8. Pienso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho pienso es un producto alimenticio para un animal acuático, preferiblemente para un animal acuático de criadero seleccionado de peces y crustáceos, para un vertebrado ornamental o para invertebrado ornamental y lo más preferiblemente para estadios vivos tempranos de un pez o de un crustáceo, que es preferiblemente una especie seleccionada de una larva de pez marino, un cangrejo, un camarón, una gamba y una langosta.
- 30 9. Pienso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho pienso comprende o consiste en un aceite derivado de huevos y/o nauplio de estadio I o una combinación de huevos y/o nauplio de estadio I con nauplio de estadio II de un percebe.
10. Uso de huevos y/o nauplio de estadio I de un percebe para consumo por animales y seres humanos, como suplemento alimenticio, producto sanitario y/o alimento funcional.
- 35 11. Uso según la reivindicación 10, mediante el cual un animal acuático de criadero, un vertebrado ornamental o un invertebrado ornamental, se alimenta con un producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o bien directamente o bien comprendido en un alimento con otros ingredientes.
- 40 12. Método para recolectar y aislar huevos y/o nauplios de estadio I de un percebe maduro, sésil, fijado a una superficie, caracterizado porque los huevos y/o nauplios de estadio I se retiran directamente del percebe sésil mediante lavado dichos huevos y nauplios de estadio I de los percebes maduros sésiles mediante chorros de agua, y recogiendo los posteriormente.
- 45 13. Método para recolectar y aislar huevos y/o nauplios de estadio I de un percebe maduro, sésil, fijado a una superficie para su uso en un producto según la reivindicación 1, caracterizado porque los huevos y/o nauplios de estadio I:
  - se retiran del percebe sésil tras haberse desprendido dicho percebe de dicha superficie mediante fuerzas mecánicas y/o chorros de agua, y los percebes maduros retirados se recogen junto con los huevos y/o nauplios de estadio I, y
  - liberar opcionalmente huevos y/o nauplios de estadio I todavía fijados al percebe tras dicho desprendimiento mediante el uso de fuerzas mecánicas y/o lavado; y
  - separar los huevos y/o nauplios de los percebes maduros mediante un método de separación.
- 50 14. Método según la reivindicación 12 ó 13, en el que los huevos y nauplios de estadio I obtenidos se fraccionan tras la liberación de los percebes maduros en fracciones de diferentes tamaños o bien
  - mediante un método de separación mecánica, seleccionado preferiblemente de tamizado, filtración y/o

centrifugación, o bien

- mediante aplicación de luz que provoca una respuesta fototáctica de las larvas de nauplio.

- 5 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende una etapa adicional para aumentar el contenido de nauplios de estadio I en el material tras la recolección mediante incubación de los huevos y/o nauplios de estadio I vivos aislados todavía comprendidos en la membrana de huevo durante un periodo de tiempo definido en agua de mar para la eclosión/liberación de nauplios I que todavía están situados en la membrana de huevo para dar nauplios I que nadan libremente.
- 10 16. Método según la reivindicación 15, en el que la temperatura de incubación es de entre 5 y 10°C, más preferiblemente de aproximadamente 8°C y el tiempo de incubación es de entre 5 y 12 horas, preferiblemente de aproximadamente 10 horas.
- 15 17. Método para conservar un material de percebe para un producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que los nauplios y/o huevos recolectados comprendidos se tratan mediante uno o varios de los métodos seleccionados de enfriamiento por debajo del punto de congelación de los animales, tratamiento térmico, secado, liofilización, almacenamiento en una atmósfera modificada y adición de productos químicos conservantes.
- 20 18. Método según la reivindicación 17, en el que el material de percebe se conserva mediante un tratamiento térmico que se elige de calentamiento hasta una temperatura de entre 55°C y menos de 70°C, pasteurización mediante calentamiento hasta al menos 70°C, preferiblemente por encima de 75°C y esterilización por encima de 100°C y opcionalmente se almacena.
- 20 19. Método según la reivindicación 17 ó 18, en el que el material se almacena por debajo del punto de congelación, preferiblemente a -18°C o menos, más preferiblemente a -80°C o menos con o sin conservación previa.
- 25 20. Método según la reivindicación 17 ó 18, en el que el material se almacena en una atmósfera modificada, preferiblemente en gas nitrógeno, más preferiblemente se almacena en una atmósfera modificada y a una temperatura por debajo de 4°C con o sin conservación previa.
21. Composición que comprende huevos y/o nauplio de estadio I de percebes para su uso en un tratamiento profiláctico o médico.
- 30 22. Composición según la reivindicación 21, para la mejora del crecimiento, la supervivencia y/o mala pigmentación de un animal, preferiblemente de un animal acuático.

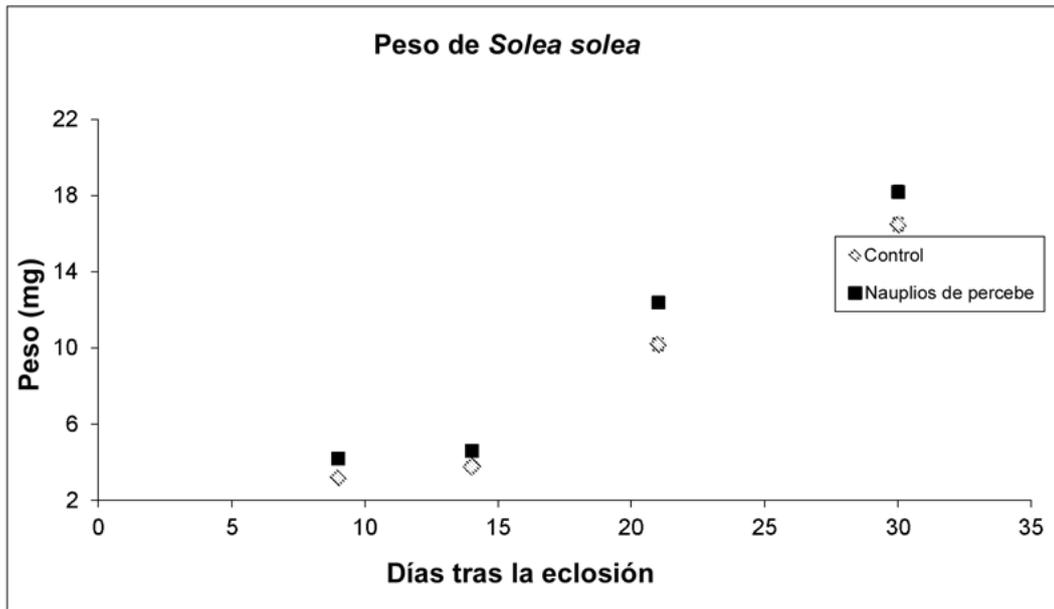


Fig.1