

EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE VITAMINAS EN EL ENRIQUECIMIENTO DEL ALIMENTO VIVO SOBRE CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LARVAS DE CHITA *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1861)

EFFECT OF THE INCLUSION OF VITAMINS IN LIVE FOOD FORTIFICATION ON GROWTH AND SURVIVAL OF *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1861) LARVAE

Angélica Castro¹
Leenin Flores²

Noemí Cota¹
Wilmer Gaspar³

Melissa Montes¹
Lili Carrera¹

<https://doi.org/10.53554/boletin.v37i2.374>

RESUMEN

CASTRO, A., COTA, N., MONTES, M., FLORES, L., GASPAR, W., CARRERA, L. (2022). Efecto de la inclusión de vitaminas en el enriquecimiento del alimento vivo sobre crecimiento y supervivencia de larvas de chita *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1861). *Bol Inst Mar Perú*. 37(2): 302-318.- El desarrollo larval de peces obtenidos en cautiverio, se encuentra relacionado a nutrición, y búsqueda de técnicas de habituación a dietas comerciales. En tal sentido, la presente investigación está dirigida a conocer el efecto de adicionar vitaminas a un enriquecedor comercial para conocer su influencia en crecimiento, supervivencia, presencia de malformaciones y perfil bioquímico en larvas de *Anisotremus scapularis*. Se utilizaron 1500 larvas, con $2,19 \pm 1,30$ mg de peso seco y $3,00 \pm 0,23$ mm de longitud total inicial, que fueron sembradas en tanques de 100 L a densidad de 10 larvas/L, con una mezcla de microalgas *Nannochloropsis oceanica* e *Isochrysis galbana*. Se elaboraron 4 tratamientos; teniendo como base al enriquecedor comercial Selco Spresso®, al que se añadieron las vitaminas: Enriquecedor 100 g (E1), Enriquecedor 99,95 g + 45.000 µg/100g vit A (E2), Enriquecedor 99,63 g + 45.000 µg/100g vit A + 180.000 µg/100g vit C + 136.000 µg/100g vit E (E3) y Enriquecedor 99,63 g + 180.000 µg/100g vit C + 136.000 µg/100g vit E (E4) y fueron añadidos al alimento vivo 6 h antes de ser suministrados a las larvas. La alimentación inició 2 días después de la eclosión (DDE) con *Brachionus plicatilis* hasta el día 20 DDE y luego con nauplios de artemia hasta el 35 DDE cuando inició el destete, agregando alimento inerte micro particulado comercial hasta el 60 DDE que finalizó el experimento. La calidad del agua del cultivo larval se mantuvo según parámetros del laboratorio: temperatura ($19,9 \pm 0,71$ °C), pH ($8,58 \pm 0,37$), oxígeno disuelto ($7,33 \pm 0,46$ mg/L) y porcentaje de saturación ($80,53 \pm 4,68\%$). Al final del experimento, se obtuvieron promedios del peso total $29,22 \pm 8,18$ mg; longitud total $18,68 \pm 8,53$ mm; tasa de crecimiento específico $4,36 \pm 0,51\%/día$, supervivencia $42,78 \pm 5,98\%$, malformaciones $11,72 \pm 7,80\%$, DHA/EPA $0,87 \pm 0,09$. Los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$); sin embargo, el tratamiento E2 obtuvo los mejores resultados. Este estudio nos permitió conocer la influencia de las vitaminas en el desarrollo de larvas de *Anisotremus scapularis* bajo condiciones de laboratorio, asimismo las vitaminas utilizadas deberían servir como base para realizar otros ensayos que nos acerquen a conocer la nutrición larval de chita.

PALABRAS CLAVE: chita, nutrición larval, malformaciones, vitaminas, lípidos

ABSTRACT

CASTRO, A., COTA, N., MONTES, M., FLORES, L., GASPAR, W., CARRERA, L. (2022). Effect of the inclusion of vitamins in live food fortification on growth and survival of *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1861) larvae. *Bol Inst Mar Perú*. 37(2): 302-318.- Nutrition and habituation techniques to commercial diets are related to the larval development of fish cultured under captivity. Thus, we aimed to determine the effect of adding vitamins to a commercial fortifier to assess its influence on growth, survival, presence of malformations, and biochemical profile in *Anisotremus scapularis* larvae. A total of 1500 larvae, with 2.19 ± 1.30 mg dry weight and 3.00 ± 0.23 mm initial total length, were seeded in 100 L tanks at a density of 10 larvae/L, with a mixture of microalgae *Nannochloropsis oceanica* and *Isochrysis galbana*. We elaborated 4 treatments with the commercial enricher Selco Spresso® as a base, to which the vitamins were added: Enricher 100 g (E1), Enricher 99.95 g + 45,000 µg/100g vit. A (E2), Enricher 99.63 g + 45,000 µg/100g vit. A + 180,000 µg/100g vit. C + 136,000 µg/100g vit. E (E3), and Enricher 99.63 g + 180,000 µg/100g vit. C + 136,000 µg/100g vit. E (E4) and were added to the live food 6 h before being provided to the larvae. Feeding began 2 days after hatching (DAE) with *Brachionus plicatilis* until 20 DAE; then, larvae were fed with artemia nauplii until 35 DAE when weaning started, adding commercial microparticulate inert food until 60 DAE when the experiment ended. The quality of the larval culture water was maintained according to laboratory parameters: temperature (19.9 ± 0.71 °C), pH (8.58 ± 0.37), dissolved oxygen (7.33 ± 0.46 mg/L), and saturation percentage ($80.53 \pm 4.68\%$). By the end of the experiment, we

1 IMARPE, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, 1Laboratorio de Cultivo de Peces. acastro@imarpe.gob.pe

2 IMARPE, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, Laboratorio de Análisis Instrumental

3 IMARPE, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, Laboratorio de Alimento vivo

obtained averages of total weight 29.22 ± 8.18 mg, total length 18.68 ± 8.53 mm, specific growth rate $4.36 \pm 0.51\%$ /day, survival 42.78 ± 5.98 %, malformations 11.72 ± 7.80 %, DHA/EPA 0.87 ± 0.09 . No significant differences were found between treatments ($p > 0.05$), although treatment E2 obtained the best results. Our study provided information on the influence of vitamins on the development of *Anisotremus scapularis* larvae under laboratory conditions, and the vitamins used should also serve as a basis for other trials that bring us closer to knowing the larval nutrition of the species.

KEYWORDS: *Anisotremus scapularis*, larval nutrition, malformations, vitamins, lipids

1. INTRODUCCIÓN

La chita *Anisotremus scapularis* es una de las especies que sustentan la pesquería costera artesanal del Perú, se pesca con redes de cerco y de enmalle (MENDO y WOSNITZA-MENDO, 2014). Sin embargo, su gran demanda para el consumo humano directo y la escasa regulación de su pesquería han ocasionado que en los últimos años se observe disminución en sus capturas, de 271 TM el 2004 a 190 TM el 2017 (MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN, 2017). Es una especie bentopelágica que habita en la costa, en zonas rocosas y arenosas del Perú, se distribuye desde Manta, Ecuador hasta Chile e islas Galápagos (CHIRICHIGNO y CORNEJO, 2001). El 2013, el laboratorio de Cultivo de Peces del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) inició sus investigaciones con el proyecto "Acondicionamiento y Reproducción de chita *Anisotremus scapularis* dentro del Programa Presupuestal (PpR) N° 0094 "Ordenamiento y Desarrollo de la Acuicultura". Como resultado de las experiencias obtenidas en diversas investigaciones se elaboró un manual de acondicionamiento (CARRERA *et al.*, 2018), asimismo, se han realizado trabajos en las diferentes fases de cultivo, pero aún los estudios en su cultivo larval son escasos.

El cultivo de peces marinos en cautiverio presenta retos, pero en gran medida el éxito depende de contar con alimentos adecuados para la etapa larval y de controlar la calidad nutricional de los primeros estadios (IZQUIERDO & FERNÁNDEZ-PALACIOS, 1997). A la vez, se encuentra relacionado con la supervivencia larval que presenta altas fluctuaciones debido a diversos factores, como los fisicoquímicos, biológicos y nutricionales, que confieren a las larvas la energía necesaria para mantener su metabolismo, crecer y asegurar su sobrevivencia, por lo cual, se utilizan enriquecedores en la alimentación larval (CIVERA *et al.*, 2004).

En los cultivos larvales, en sistemas controlados se utiliza el enriquecimiento del alimento vivo, para completar los requerimientos de ácidos gra-

1. INTRODUCTION

Anisotremus scapularis is one of the species that sustains Peru's artisanal fisheries, mainly gillnetters and purse seiners (MENDO & WOSNITZA-MENDO, 2014). Its high demand for direct human consumption and the scarce regulation of its fishery have led to a decrease in catches in recent years, from 271 MT in 2004 to 190 MT in 2017 (PERUVIAN MINISTRY OF PRODUCTION, 2017). It is a benthopelagic species inhabiting the coast, of rocky and sandy areas of Peru, ranging from Manta, Ecuador to Chile and the Galapagos Islands (CHIRICHIGNO & CORNEJO, 2001). In 2013, IMARPE's Fish Culture Laboratory researched this species with the project "Conditioning and Reproduction of *Anisotremus scapularis* within the Budgetary Program N° 0094 "Management and Development of Aquaculture". A conditioning manual (CARRERA *et al.*, 2018) was elaborated as a result of the experiences obtained from different investigations, likewise, work has been carried out in the different stages of its culture, but there are still few studies on its larval culture.

The culture of marine fish in captivity is challenging, but to a large extent, success depends on having adequate food for the larval stage and controlling the nutritional quality of the first stages (IZQUIERDO & FERNÁNDEZ-PALACIOS, 1997). It is also related to larval survival, which presents high fluctuations due to various factors, such as physicochemical, biological, and nutritional factors, which provide the larvae with the necessary energy to maintain their metabolism, grow and ensure their survival, hence the use of fortifiers in larval feeding (CIVERA *et al.*, 2004).

The fortification of live food is used in larval cultures, under controlled systems, to meet the requirements of fatty acids and vitamins needed by the larvae to complete their development.

tos y vitaminas que requieren las larvas para culminar su desarrollo. La falta del enriquecimiento causa desequilibrios nutricionales, depresión del crecimiento, altas tasas de mortalidad, susceptibilidad a estrés (ANDRADES *et al.*, 1996; BOGLIONE *et al.*, 2001), malformaciones muy frecuentes y evidentes en larvas de *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) (BARAHONA-FERNANDES, 1982; CHATAIN, 1994; ANDRADES *et al.*, 1996; KOUMOUNDOUROS *et al.*, 1997; GALEOTTI *et al.*, 2000; VERHAEGEN *et al.*, 2007; BERALDO *et al.*, 2011), *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) (PAZ, 2014), *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) (ABDO-DE LA PARRA *et al.*, 2010; CHACON *et al.*, 2020), *Archosargus probatocephalus* (Walbaum, 1792) (MERINO, 2018) y *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758) (ARISTIZABAL *et al.*, 2006). Al menos, parte de estos problemas derivan de una nutrición subóptima (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010).

En el caso de las vitaminas, la falta de conocimiento en el requerimiento de este ocasiona que se usen las dietas de otros peces tratando de cubrir las necesidades nutricionales de la especie (CHAVEZ, 2013). En el caso de peces marinos, se ha demostrado la influencia de la vitamina A asociado a la pigmentación y malformación de larvas (CAHU & INFANTE, 2001), la vitamina C en el equilibrio y pigmentación (HENRIQUE *et al.*, 1998) y la vitamina E es un nutriente antioxidante para el funcionamiento del sistema inmune de larvas (LEITH & KAATTARI, 1989; MONTERO *et al.*, 1999). Todas estas vitaminas también tienen influencia durante la ontogenia de los peces marinos (HAMRE *et al.*, 2010). Se han realizados estudios con las vitaminas A y C en larvas de *Sparus aurata* (HENRIQUE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; BERALDO *et al.*, 2010; MOREL *et al.*, 2010), vitamina E en larvas de *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (GATTA *et al.*, 2000; VILLENEUVE *et al.*, 2005; MAZURASIS *et al.*, 2009).

En la presente investigación, se utilizaron como base las dosis de vitamina A, C y E adicionados al enriquecimiento del alimento de larvas de *Sparus aurata*. Según FERNÁNDEZ *et al.* (2008) analizaron la inclusión de 45.000 µg/100 g de vitamina A, la cual disminuyó las malformaciones operculares y mandibulares larvales. Para la vitamina E, GONZÁLES *et al.* (1995) utilizó dosis de 136.000 µg/100 g, la cual influyó en el desarrollo del tejido esquelético larval. La vitamina C, se utilizó en el experimento según IZQUIERDO *et al.* (2018) con dosis de 180.000 µg/100 g, observando influen-

The lack of fortification causes nutritional imbalances, growth depression, high mortality rates, susceptibility to stress (ANDRADES *et al.*, 1996; BOGLIONE *et al.*, 2001), and very frequent and evident malformations in larvae of *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) (BARAHONA-FERNANDES, 1982; CHATAIN, 1994; ANDRADES *et al.*, 1996; KOUMOUNDOUROS *et al.*, 1997; GALEOTTI *et al.*, 2000; VERHAEGEN *et al.*, 2007; BERALDO *et al.*, 2011), *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) (PAZ, 2014), *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) (ABDO-DE LA PARRA *et al.*, 2010; CHACON *et al.*, 2020), *Archosargus probatocephalus* (Walbaum, 1792) (MERINO, 2018), and *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758) (ARISTIZABAL *et al.*, 2006). Some of these problems resulted from suboptimal nutrition (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010).

Regarding vitamins, there is a lack of knowledge of their requirements, so diets of other fish are used in an attempt to cover the nutritional needs of the species (CHAVEZ, 2013). For marine fish, there is evidence of the influence of vitamin A associated with pigmentation and malformation of larvae (CAHU & INFANTE, 2001), vitamin C in the balance and pigmentation (HENRIQUE *et al.*, 1998), and vitamin E is an antioxidant nutrient for the functioning of the immune system of larvae (LEITH & KAATTARI, 1989; MONTERO *et al.*, 1999). All these vitamins are also influential during the ontogeny of marine fish (HAMRE *et al.*, 2010). Studies have been carried out with vitamins A and C in *Sparus aurata* larvae (HENRIQUE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; BERALDO *et al.*, 2010; MOREL *et al.*, 2010) and vitamin E in *Dicentrarchus labrax* larvae (Linnaeus, 1758) (GATTA *et al.*, 2000; VILLENEUVE *et al.*, 2005; MAZURASIS *et al.*, 2009).

In our case, we used as a basis the doses of vitamins A, C, and E added to the fortification of the feed of *Sparus aurata* larvae. According to FERNÁNDEZ *et al.* (2008), they analyzed the inclusion of 45,000 µg/100g of vitamin A, which decreased larval opercular and mandibular malformations. For vitamin E, GONZÁLES *et al.* (1995) used doses of 136,000 µg/100 g, which influenced the development of larval skeletal tissue. For vitamin C, we followed the experiment carried out by IZQUIERDO *et al.* (2018) with doses of 180,000 µg/100 g and

cia en la supervivencia y en la baja incidencia de malformaciones.

En tal sentido, el objetivo del experimento fue conocer la influencia de añadir vitaminas A, C y E al enriquecedor comercial para mejorarlo y conocer su efecto en el desarrollo larval a través del crecimiento, supervivencia, presencia de malformaciones y análisis bioquímicos en larvas de chita *Anisotremus scapularis*, brindando una base para iniciar con los estudios nutricionales que afectan al cultivo larval de esta especie.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y manejo de huevos

Los huevos fertilizados de *Anisotremus scapularis* se obtuvieron de reproductores acondicionados en tanques de fibra de vidrio de 2,5 m³ adaptados a un sistema de recirculación de agua de mar en el Laboratorio de Cultivo de Peces del IMARPE (CARRERA *et al.*, 2018). Se colectaron 25.328 huevos viables que fueron colocados en tanques de 700 L de volumen a 36 huevos/L hasta su eclosión después de 48 horas y a 19 °C de temperatura. Las larvas se mantuvieron en ese tanque hasta la siembra en las unidades experimentales.

Cultivo larval

Para el experimento, se utilizaron 1.500 larvas de $2,19 \pm 1,30$ mg de peso seco total promedio y $3,00 \pm 0,23$ mm de longitud total promedio, a densidad de 10 larvas/L provenientes de un solo desove. Las larvas fueron trasladadas el primer día después de su eclosión (DDE) a 12 tanques de fibra de vidrio (0,60 cm de diámetro y 0,50 cm altura) con volumen efectivo de 100 L, con agua de mar esterilizada con luz ultravioleta (UV), provistos de aireación constante usando piedras difusoras e iluminación con luz blanca entre 915 y 1.100 lux. Durante los 10 primeros días de cultivo se utilizó un fotoperiodo 24 horas luz (HL): 0 horas oscuridad (HO) y luego se cambió a 12 HL: 12 HO hasta el final del experimento. Diariamente, se monitoreó los parámetros de calidad de agua, como temperatura ($19,9 \pm 0,71$ °C), pH ($8,58 \pm 0,37$), oxígeno disuelto ($7,33 \pm 0,46$ mg/L) y porcentaje de saturación de oxígeno ($80,53 \pm 4,68\%$).

observed an influence on survival and a low incidence of malformations.

Therefore, we aimed to know the influence of adding vitamins A, C, and E to the commercial enricher to improve it and to know its effect on larval development through growth, survival, presence of malformations, and biochemical analysis in *Anisotremus scapularis* larvae, providing a basis for further nutritional studies that affect the larval culture of this species.

2. MATERIAL AND METHODS

Egg collection and handling

Fertilized *Anisotremus scapularis* eggs were obtained from broodstock conditioned in 2.5 m³ fiberglass tanks adapted to a seawater recirculation system at IMARPE's Fish Culture Laboratory (CARRERA *et al.*, 2018). A total of 25,328 viable eggs were collected and placed in 700 L volume tanks at 36 eggs/L until hatching after 48 h and at 19 °C temperature. Larvae were kept in that tank until seeding in the experimental units.

Larval culture

A total of 1,500 larvae with an average total dry weight of 2.19 ± 1.30 mg and an average total length of 3.00 ± 0.23 mm, at a density of 10 larvae/L from a single spawning, were used for the trial. Larvae were transferred on the first day after hatching (DAH) to 12 fiberglass tanks (0.60 cm diameter and 0.50 cm height) with an effective volume of 100 L, with seawater sterilized with ultraviolet (UV) light, provided with constant aeration using a diffuser stones and illumination with white light between 915 and 1,100 lux. During the first 10 days of culture, a 24 hours light (HL): 0 hours dark (HD) photoperiod was used and then changed to 12 HL: 12 HD until the end of the trial. Parameters such as temperature (19.9 ± 0.71 °C), pH (8.58 ± 0.37), dissolved oxygen (7.33 ± 0.46 mg/L), and oxygen saturation percentage ($80.53 \pm 4.68\%$) were monitored daily to assess water quality.

The larval culture was carried out in static systems (without continuous water flow),

El cultivo larval se llevó a cabo en sistemas estáticos (sin flujo continuo de agua), se llenó el 50% del tanque y se incrementó 10% diario hasta el 5 DDE. A los 6 DDE se retiró 50% del nivel y se comenzó a llenar 10% diario hasta los 10 DDE; posteriormente, se realizaron recambios de agua de 10 a 100% diario hasta el final del experimento. Se utilizó la técnica de “agua verde” (SKIFTESVIK *et al.*, 2003; SANAYE *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019), adicionando a los tanques de cultivo las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*, a densidad de 635.800 células/mL y 8.065.000 células/mL, con relación de 1:4, respectivamente. La alimentación larval inició el día 2 DDE al observarse la pigmentación de los ojos, abertura del ano y boca y ser consumida la reserva del saco vitelino. El primer alimento fue rotífero *Brachionus plicatilis* a densidad de 5 individuos/mL hasta el 20 DDE cuando inició la alimentación con nauplios de *Artemia* sp., a densidad entre 1 y 3 individuos/mL hasta el 35 DDE, comenzando el destete por periodo de 5 días, se utilizó el alimento microparticulado comercial de la marca Otohime® hasta los 60 DDE, cuando finalizó el experimento (Fig. 1).

starting with a volume of 50% of the tank and increasing 10% daily until 5 DAH. At 6 DAH, 50% of the level was withdrawn and the tank was refilled 10% daily until 10 DAH; then, water was changed from 10% to 100% daily until the end of the trial. The “green water” technique was used (SKIFTESVIK *et al.*, 2003; SANAYE *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019), by adding the microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oceanica*, at densities of 635,800 cells/mL and 8,065,000 cells/mL with 1:4 ratio, respectively. Larval feeding began on day 2 DAH when eye pigmentation, anus and mouth opening were observed and the yolk sac reserve was consumed. The first food was rotifer *Brachionus plicatilis* at a density of 5 individuals/mL until 20 DAH, when feeding began with *Artemia* sp. nauplii, at a density between 1 and 3 individuals/mL until 35 DAH, when weaning began for 5 days, the commercial microparticulate food of the Otohime® brand was used until 60 DAH, when the trial ended (Fig. 1).

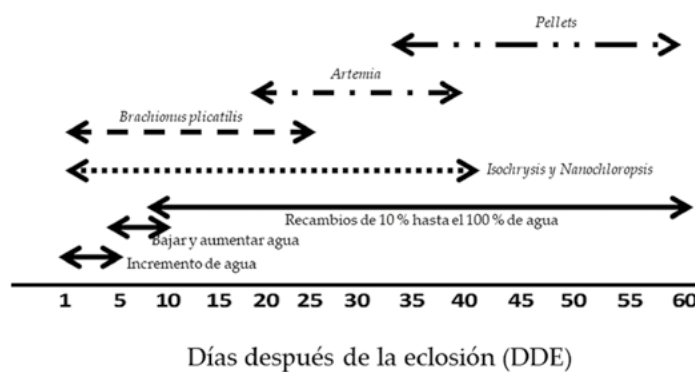


Figura 1.- Condiciones de cultivo y alimentación larval de chita *Anisotremus scapularis*

Figure 1. Culture and larval feeding conditions of *Anisotremus scapularis*

Tabla 1.- Ingredientes y cantidades utilizados para preparar 100 g de enriquecedor

Table 1. Ingredients and quantities used to prepare 100 g of enricher

| Ingredientes/ Ingredients | E1 | E2 | E3 | E4 |
|---------------------------|------|--------|---------|---------|
| Selco expreso® (g) | 100 | 99,95 | 99,63 | 99,68 |
| *VIT C µg/100g | ---- | ---- | 180.000 | 180.000 |
| **VIT E µg/100g | ---- | ---- | 136.000 | 136.000 |
| ***VIT A µg/100g | ---- | 45 000 | 45.000 | -- |

(*) FERNÁNDEZ *et al.*, (2008); (**) GONZÁLES *et al.*, (1995), (***) IZQUIERDO *et al.*, (2018)

Diseño experimental

Elaboración del enriquecedor y tratamientos

Se realizaron 4 tratamientos: Tratamiento 1 (E1), Tratamiento 2 (E2), Tratamiento 3 (E3) y Tratamiento 4 (E4) con tres replicas cada una. La emulsión para realizar el enriquecimiento del alimento vivo se elaboró utilizando Selco Spresso® como base añadiendo diferentes dosis de vitaminas (Tabla 1). Las emulsiones se utilizaron para enriquecer el alimento vivo durante 8 h antes de ser suministrado a las larvas. La densidad de alimento vivo en los tanques de cultivo larval se controló tres veces al día.

Crecimiento

Las larvas fueron sometidas a una concentración letal de anestésico MS-222 de 250 mg/L (AVMA, 2020) para determinar el peso seco (mg) siguiendo a PEPÍN (1995), a 4 y 60 DDE. La longitud total (mm) fue evaluada a 4, 27, 46 y 60 DDE usando un microscopio LEICA DM 1000 LED con el programa de análisis de imágenes LAS versión 3.4.

Se calculó la tasa de crecimiento específico (TCE) con relación a la longitud y peso de cada tratamiento de emulsión, con la siguiente ecuación (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; LUGERT *et al.*, 2014):

$$TCE = 100 \times \frac{(\ln W_{tf} - \ln W_{ti})}{t}$$

Donde:

TCE: tasa de crecimiento específico (% mg/día)

W_{tf}: peso final

W_{ti}: peso inicial

t : tiempo

Supervivencia

La supervivencia se evaluó al final y se calculó:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Larvas al final del experimento}}{\text{Larvas sembradas al inicio}} \times 100$$

Análisis bioquímicos

Análisis de lípidos y ácidos grasos se realizaron al final del experimento. Los lípidos fueron extraídos mediante el método de FOLCH *et al.* (1957), se pesaron 0,2 g de la muestra y se homogenizaron

Experimental design

Processing of the enricher and treatments

We carried out 4 treatments: Treatment (E1), Treatment 2 (E2), Treatment 3 (E3), and Treatment 4 (E4) with three replicates each. The emulsion to enrich the live food was prepared using Selco Spresso® as a base and adding different doses of vitamins (Table 1). The emulsions were used to fortify the live food for 8 h before being supplied to the larvae. The density of live food in the larval culture tanks was monitored three times a day.

Growth

Following PEPÍN (1995), larvae were subjected to a lethal concentration of MS-222 anesthetic of 250 mg/L (AVMA, 2020) to determine the dry weight (mg) at 4 and 60 DAH. Total length (mm) was evaluated at 4, 27, 46, and 60 DAH using a LEICA DM 1000 LED microscope with the image analysis software LAS version 3.4.

The specific growth rate (SGR) was estimated in relation to the length and weight of each emulsion treatment, with the following equation (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; LUGERT *et al.*, 2014):

$$SGR = 100 \times \frac{(\ln W_{tf} - \ln W_{ti})}{t}$$

Where:

SGR: specific growth rate (% mg/day)

W_{tf}: final weight

W_{ti}: initial weight

t : time

Survival

At the end of the study, survival was evaluated and estimated as follows:

$$\text{Survival (\%)} = \frac{\text{Larvae at the end of the experiment}}{\text{Larvae sown at the beginning}} \times 100$$

Biochemical analysis

At the end of the trial, we performed lipid and fatty acid analyses. Lipids were extracted following the method of FOLCH *et al.* (1957), 0.2 g of the sample was weighed and homogenized with 10 mL of 2:1 chloroform-methanol, and a Branson 2510 ultrasonic bath was used for 10 min to enhance

con 10 mL de cloroformo-metanol 2:1, se utilizó un baño de ultrasonido Branson 2510 durante 10 min para mejorar la extracción. La fase de cloroformo-lípidos fue separada con agua ultrapura y evaporada con nitrógeno gas para obtener los lípidos secos.

La derivatización de los ácidos grasos a sus correspondientes metilésteres fue realizada mediante el método de ICHIHARA & FUKUBAYASHI (2010), que consiste en añadir tolueno, metanol y ácido clorhídrico concentrado a los lípidos extraídos e incubar la mezcla a 45 °C, luego se extrajeron las FAMES con hexano. Las condiciones del cromatógrafo de gases Varian CP-3800 fueron: modo de inyección *splitless*, tiempo de inyección 0,5 min, volumen de inyección 1 µL, temperatura del inyector 250 °C, temperatura del detector 260 °C, columna capilar Restek, FAMEWAX® WCOT fused silica 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, gas de arrastre Helio, flujo de gas 1 mL/min, rampa de temperatura 120 °C por 1 min, 30 °C/min hasta 160 °C, 160 °C por 1 min, 4 °C/min hasta 240 °C, 240 °C por 7 min, tiempo total de la rampa de temperatura 30 min.

Técnica de tinción y aclaramiento de cartílago y hueso (deformación)

Las larvas fueron procesadas al final del experimento utilizando la técnica de tinción selectiva en tejidos óseos y cartilagosos por colorantes específicos como el rojo de alizarina y el azul alcian (DARIAS *et al.*, 2010). El primero tiñe la matriz mineralizada del hueso, mientras que el segundo colorea los condrocitos y matriz cartilaginosa. Durante la inspección del cuerpo se utilizaron las descripciones de MATSUOKA (1985, 1987) para determinar el estadio de desarrollo y las deformidades se establecieron de acuerdo con las descripciones de BOGLIONE *et al.* (2001). Se dividieron en 2 grupos: deformes y normales, las deformidades se tabularon en reducción del opérculo 1 (OP1), reducción del opérculo 2 (OP2), malformación de la mandíbula inferior (MI), OP1+OP2 y OP2 + MI (COTA *et al.*, 2018).

Análisis estadísticos

Se utilizó el programa estadístico R (R CORE TEAM, 2019). Las pruebas utilizadas para la

the extraction. The chloroform-lipid phase was separated with ultrapure water and evaporated with nitrogen gas to obtain the dried lipids.

The derivatization of fatty acids to their corresponding methyl esters was performed by the method of ICHIHARA & FUKUBAYASHI (2010), which consists of adding toluene, methanol, and concentrated hydrochloric acid to the extracted lipids and incubating the mixture at 45 °C, then the FAMES were extracted with hexane. The Varian CP-3800 gas chromatograph settings were as follows: splitless injection mode, injection time 0.5 min, injection volume 1 µL, injector temperature 250 °C, detector temperature 260 °C, Restek capillary column, FAMEWAX® WCOT fused silica 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Helium carrier gas, gas flow 1 mL/min, temperature ramp 120 °C for 1 min, 30 °C/min to 160 °C, 160 °C for 1 min, 4 °C/min to 240 °C, 240 °C for 7 min, total temperature ramp time 30 min.

Cartilage and bone staining and clearing technique (deformation)

At the end of the trial, the larvae were processed using the technique of selective staining of bone and cartilage tissues with specific dyes such as alizarin red and alcian blue (DARIAS *et al.*, 2010). The former stains the mineralized matrix of the bone, while the latter stains the chondrocytes and cartilaginous matrix. During the inspection of the body, the descriptions of MATSUOKA (1985, 1987) were used to determine the stage of development, and the deformities were determined following the descriptions of BOGLIONE *et al.* (2001). They were classified into 2 groups: deformed and normal, deformities were tabulated into operculum reduction 1 (OP1), operculum reduction 2 (OP2), lower jaw malformation (MI), OP1+OP2 y OP2 + MI (COTA *et al.*, 2018).

Statistical analysis

We used the R statistical software (R CORE TEAM, 2019) was used. The Shapiro-Wilk and Bartlett tests were used for normality and homogeneity of variances. For length and weight, Kruskal-Wallis statistical analysis was applied because they did not meet the assumptions. For the SGR, survival, and malformations, we applied the Anova test because they complied with the assumptions of normality and homogeneity. The significance level established for all analyses was 0.05.

normalidad y homogeneidad de varianzas fueron Shapiro Wilk y Bartlet. En lo que respecta a la longitud y peso, se aplicó el análisis estadístico Kruskal-Wallis porque no cumplieron con los supuestos. En el caso del TCE, supervivencia y malformaciones se aplicó la prueba de Anova ya que cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad. El nivel de significancia establecido para todos los análisis fue de 0,05.

3. RESULTADOS

Al final del experimento, a los 60 DDE, se observó que el peso final (mg) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$), no obstante, en cuanto a la longitud (mm) se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), siendo los mejores tratamientos E1 y E2 seguidos por E3 y E4. Con relación al TCE (%mg/día) no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Tabla 2, Figs. 2, 3).

En supervivencia, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos E1, E2 y E3 y E4 que tuvieron promedios de $41,22 \pm 7,91$; $39,69 \pm 9,32$; $41,78 \pm 0,59$ y $42,67 \pm 5,28\%$, respectivamente (Fig. 4).

A larvas expuestas a diferentes dosis de vitaminas, se analizó el contenido de ácidos grasos, las que no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos al final para las variables lípidos, EPA, DHA/EPA y ARA. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el contenido de DHA ($p < 0,05$) para el tratamiento E2 al compararlo con los tratamientos E3 y E4, los que tuvieron los valores más bajos (Tabla 3).

Se observaron larvas normales y con presencia de deformidades. Las deformaciones no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$). Se tabularon las deformidades según COTA *et al.* (2018), las deformidades encontradas fueron: reducción del opérculo 1 (OP1) (13,24%) y del opérculo 2 (OP2) (6,21%), malformación de la mandíbula inferior (MI) (3,95%), OP1+OP2 (0,65%) y OP2 + MI (0,32%) (Tabla 4, Figs. 5, 6).

3. RESULTS

At 60 DAH, when the trial ended, there were no significant differences between treatments in final weight (mg) ($p > 0.05$); but significant differences were observed in length (mm) ($p < 0.05$), with the best treatments being E1 and E2, followed by E3 and E4. Regarding SGR (%mg/day), no significant differences were found ($p > 0.05$) (Table 2, Figs. 2, 3).

No significant differences ($p > 0.05$) were found in survival between treatments E1, E2, E3, and E4, with averages of 41.22 ± 7.91 , 39.69 ± 9.32 , 41.78 ± 0.59 , and $42.67 \pm 5.28\%$, respectively (Fig. 4).

We analyzed the fatty acid content of larvae exposed to different doses of vitamins, which did

Tabla 2.- Peso seco (mg), longitud total (mm) y TCE (%mg/día) de larvas de chita *A. scapularis* en el experimento expresado en valores promedio \pm desviación estándar; $n=3$

Table 2. Dry weight (mg), total length (mm), and SGR (%mg/day) of *A. scapularis* larvae in the trial expressed as mean values \pm standard deviation; $n=3$

| Tratamiento/ Treatment | Peso final/ Final weight (mg) | Longitud final/ Final longitude (mm) | TCE/SGR (%mg/día) |
|---------------------------|-------------------------------------|--|----------------------|
| E1 | $30,44 \pm 10,30$ | $19,06 \pm 0,98a$ | $4,76 \pm 0,23$ |
| E2 | $30,11 \pm 6,28$ | $19,23 \pm 1,61a$ | $4,53 \pm 0,71$ |
| E3 | $29,84 \pm 8,02$ | $18,56 \pm 1,50ab$ | $4,17 \pm 0,17$ |
| E4 | $26,47 \pm 7,37$ | $17,86 \pm 1,63b$ | $3,97 \pm 0,55$ |

Letras diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)
Different letters present significant differences ($p < 0.05$)

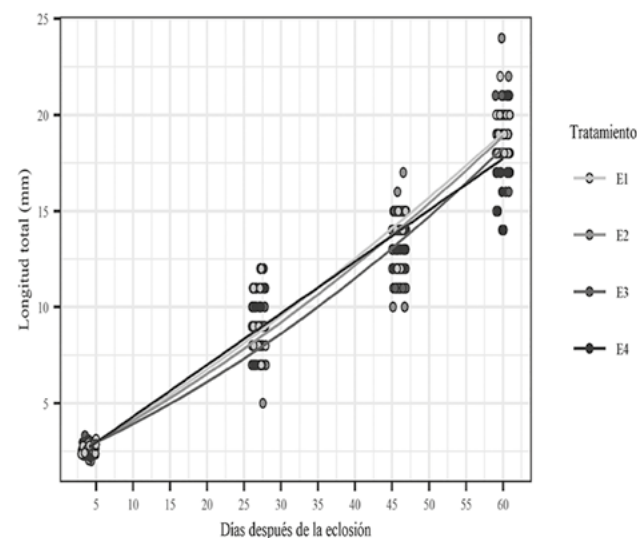


Figura 2.- Longitud total (mm) de larvas de chita *A. scapularis* durante el experimento

Figure 2. Total length (mm) of *A. scapularis* larvae during the trial

Tabla 3.- Ácidos grasos y lípidos (mg/g) analizados a larvas de chita *A. scapularis* expuestas a diferentes dosis de vitaminas (expresado en valores promedio \pm desviación estándar; n=3)

Table 3. Fatty acids and lipids (mg/g) analyzed in *A. scapularis* larvae exposed to different doses of vitamins (expressed as mean values \pm standard deviation; n=3)

| Estadio | E1 | E2 | E3 | E4 |
|-----------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Larva (inicio) | | | | |
| Lípidos | 2,81 \pm 0,00 | 2,74 \pm 0,04 | 2,65 \pm 0,11 | 2,83 \pm 0,00 |
| DHA | 0,61 \pm 0,11 | 0,87 \pm 0,03 | 0,43 \pm 0,36 | 0,71 \pm 0,16 |
| EPA | 0,74 \pm 0,10 | 0,98 \pm 0,12 | 0,50 \pm 0,43 | 0,81 \pm 0,15 |
| DHA/EPA | 0,79 \pm 0,10 | 0,96 \pm 0,06 | 0,86 \pm 0,13 | 0,84 \pm 0,04 |
| ARA | 0,33 \pm 0,04 | 0,38 \pm 0,01 | 0,29 \pm 0,04 | 0,30 \pm 0,06 |
| Larva (final) | | | | |
| lípidos | 3,37 \pm 0,72 | 3,03 \pm 0,03 | 2,99 \pm 0,00 | 3,05 \pm 0,14 |
| DHA | 3,93 \pm 0,43a | 3,13 \pm 1,02ab | 1,97 \pm 0,03b | 1,85 \pm 0,09b |
| EPA | 2,47 \pm 0,46 | 1,81 \pm 0,63 | 1,13 \pm 0,02 | 1,09 \pm 0,09 |
| DHA/EPA | 1,59 \pm 0,16 | 1,72 \pm 0,07 | 1,74 \pm 0,08 | 1,73 \pm 0,05 |
| ARA | 0,36 \pm 0,05 | 0,26 \pm 0,11 | 0,18 \pm 0,00 | 0,16 \pm 0,01 |

Las letras diferentes presentan diferencias significativas (p<0,05)
 Different letters present significant differences (p<0.05)

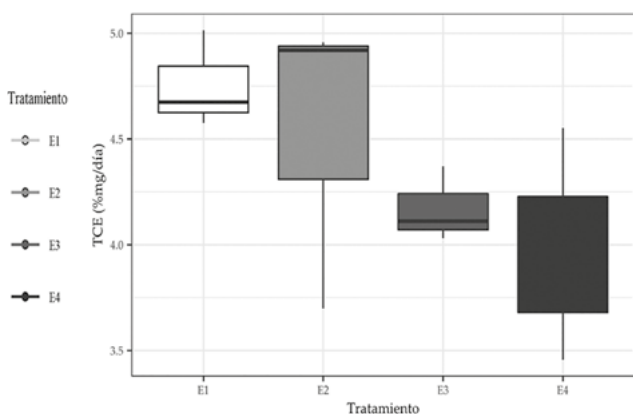


Figura 3.- Resultado de la tasa de crecimiento específico (%mg/día) de larvas de chita *A. scapularis* en el experimento

Figure 3. Result of the specific growth rate (%mg/day) of *A. scapularis* larvae in the trial

not have significant differences ($p > 0.05$) between treatments at the end for lipids, EPA, DHA/EPA, and ARA. Nevertheless, significant differences were found in the DHA content ($p < 0.05$) of treatment E2 when compared to treatments E3 and E4, which had the lowest values (Table 3).

Normal larvae and larvae with deformities were observed. Deformities did not show significant differences between treatments ($p > 0.05$). Deformities were tabulated following Cota *et al.* (2018), including: reduction of operculum 1 (OP1) (13.24%) and reduction of operculum 2 (OP2) (6.21%), malformation of the lower jaw (MI) (3.95%), OP1+OP2 (0.65%), and OP2 + MI (0.32%) (Table 4, Figs. 5, 6).

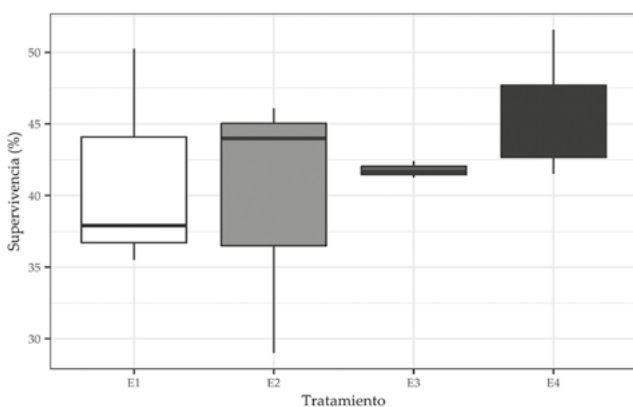


Figura 4.- Supervivencia (%) de larvas de chita *A. scapularis* expuestas a diferentes dosis de vitaminas bajo condiciones de laboratorio

Figure 4. Survival (%) of *A. scapularis* larvae exposed to different doses of vitamins under laboratory conditions

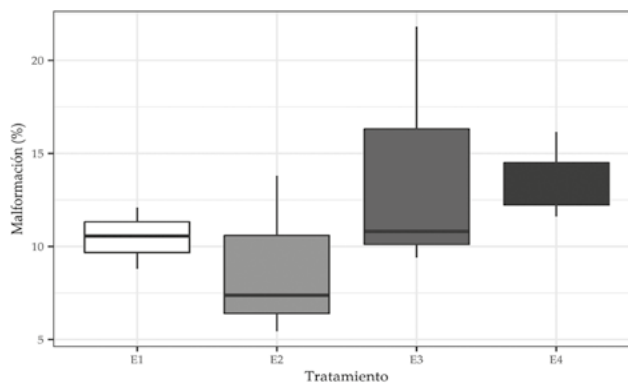


Figura 5.- Malformaciones (%) encontradas en larvas de chita *A. scapularis* expuestas a diferentes dosis de vitaminas bajo condiciones de laboratorio

Figure 5. Malformations (%) found in *A. scapularis* larvae exposed to different doses of vitamins under laboratory conditions

Tabla 4.- Presencia de larvas de chita *A. scapularis* normales y con malformaciones expuestas a diferentes dosis de vitaminas (expresado en valores promedio ± desviación estándar)

Table 4. Presence of normal and malformed *A. scapularis* larvae exposed to different doses of vitamins (expressed as mean values ± standard deviation)

| Tratamiento | Deformes (%) | Normales (%) |
|-------------|--------------|--------------|
| E1 | 10,48 ± 1,65 | 89,51 ± 1,65 |
| E2 | 8,86 ± 4,37 | 91,13 ± 4,37 |
| E3 | 14,00 ± 6,80 | 85,99 ± 6,80 |
| E4 | 13,53 ± 2,35 | 86,46 ± 2,35 |

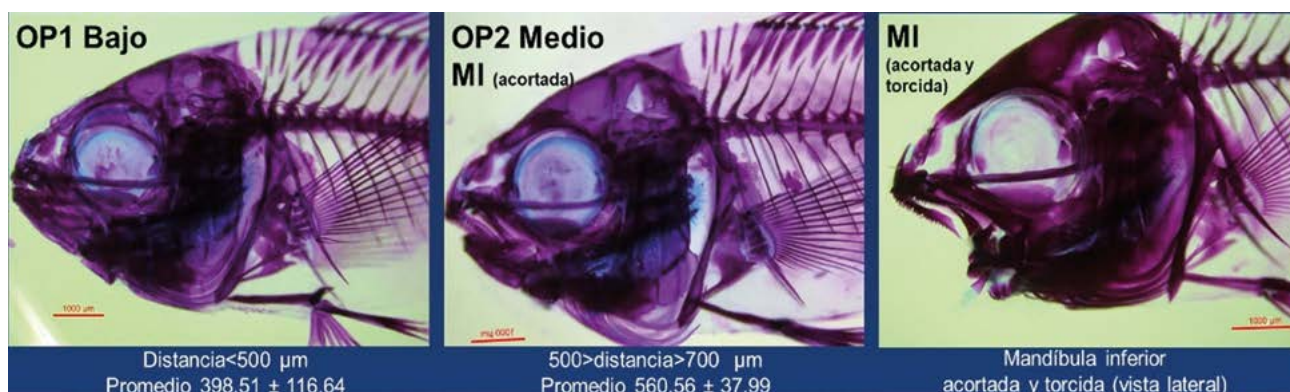


Figura 6.- Morfología de malformaciones encontradas en evaluación larvas de chita *A. scapularis* expuestas a diferentes dosis de vitaminas bajo condiciones de laboratorio

Figure 6. Morphology of malformations found in evaluation of *A. scapularis* larvae exposed to different doses of vitamins under laboratory conditions

4. DISCUSIÓN

GISBERT *et al.* (2008), RIVERA *et al.* (2009) indican que la alimentación suele ser lo más limitante en condiciones naturales para las larvas de peces marinos, que pueden ser organismos muy delicados y cuya supervivencia depende de una adecuada combinación de numerosos factores. Por ello, el éxito en sus cultivos en cautiverio ha sido ligado a la obtención de presas de tamaño y valor nutritivo adecuados para las diferentes fases del desarrollo larvario. La alimentación larval de peces marinos en laboratorio inicia con el rotífero *Brachionus plicatilis*, seguido con nauplios del crustáceo *Artemia* (AMAT, 2018). Ambos alimentos son filtradores no selectivos, lo que permite que sirvan como bioencapsuladores, a los que se les puede añadir nutrientes necesarios para que las larvas de peces marinos puedan completar su desarrollo, mejorar su crecimiento, no presentar deformaciones y tener alta supervivencia (COPEMAN *et al.*, 2002; EL-DAHAR *et al.*, 2013; CHAVEZ, 2016).

4. DISCUSSION

GISBERT *et al.* (2008), RIVERA *et al.* (2009) report that feeding is usually the most limiting factor under natural conditions for marine fish larvae, which are usually very delicate organisms whose survival depends on an adequate combination of numerous factors. Therefore, success in the culture of marine fish larvae under captivity has been linked to obtaining prey of adequate size and nutritional value for the different stages of larval development. Larval feeding of marine fish in the laboratory starts with the rotifer *Brachionus plicatilis*, followed by *Artemia* nauplii (AMAT, 2018). Both foods are non-selective filter feeders, which allows them to serve as bioencapsulators, to which the necessary nutrients can be added so that marine fish larvae can complete their development, improve their growth, not present deformations, and have high survival (COPEMAN *et al.*, 2002; EL-DAHAR *et al.*, 2013; CHAVEZ, 2016).

Los métodos de enriquecimiento de las presas vivas han proporcionado grandes avances en el éxito del cultivo de larvas de especies marinas, empleándose diferentes modalidades de uso de formulaciones de composición diversa, como emulsiones y/o liposomas (HONTORIA *et al.*, 1994; RAINUZZO *et al.*, 1997; NAVARRO *et al.*, 1997; MONROIG, 2006), a los cuales se puede añadir aditivos como antibióticos, probióticos y vitaminas, entre otros (LAZO *et al.*, 2000; CAHU & ZAMBONINO-INFANTE, 2001). Se han empleado vitaminas en larvas de diferentes especies como: *Pagrus major* (Temminck y Schlegel, 1843) (KOLKOVSKI, 2001; OGATA & OKU, 2001; TESHIMA *et al.*, 2004; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006), *Sparus aurata* (HENRIQUE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; GONZÁLES *et al.*, 1995; IZQUIERDO *et al.*, 2018), *Acanthopagrus latus* (Houttuyn, 1782) (ADLO *et al.*, 2012) y de peces planos como *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) (ESTÉVEZ & KANAZAWA, 1995), *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ, 2017) así como *Paralichthys olivaceus* (Temminck y Schlegel, 1846) (DEDI *et al.*, 1995).

Las vitaminas son esenciales para el crecimiento y mantenimiento de larvas de peces marinos, las cuales no son sintetizadas por el organismo de los peces, o bien si lo son, es a una tasa inferior, por ello es importante la inclusión de estas en las dietas (GISBERT *et al.*, 2008). La vitamina C destaca por su papel antioxidante y necesaria para la formación de elementos esqueléticos como matriz ósea, colágeno y tejido conectivo. Dietas con deficiencias de vitamina C, producen malformaciones derivadas de una pobre calcificación (LALL & LEWIS, 2007). GAPASIN *et al.* (1998) estudiaron larvas de *Chanos chanos* (Forsskål, 1775) utilizando alimento vivo enriquecido con vitamina C usando dosis de 33 mg/g obteniendo los mejores valores entre 24-27 mg de peso seco a los 40 DDE, siendo esta dosis superior a las recomendadas para larvas del orden Perciforme (IZQUIERDO *et al.*, 2018) a la que pertenece *A. scapularis*, sin embargo, los valores de peso seco coinciden con los encontrados en los tratamientos E1 y E2; BETANCOR *et al.* (2012) reportaron valores del peso total de $1,01 \pm 0,07$ mg y longitud de $11,24 \pm 1,08$ mm a los 21 DDE en larvas de *Dicentrarchus labrax* con dosis de 3.600 mg/kg de vitamina C, siendo los valores de peso y longitud inferiores a los encontrados en el tratamiento E3 y E4 al obtener el menor crecimiento, en comparación con los otros tratamientos y, la dosis

The methods for enrichment of live prey have provided great advances in the successful culture of larvae of marine species. Different modalities of formulations, with different compositions, have been used such as emulsions and/or liposomes (HONTORIA *et al.*, 1994; RAINUZZO *et al.*, 1997; NAVARRO *et al.*, 1997; MONROIG, 2006), to which additives such as antibiotics, probiotics, and vitamins, among others, can be added (LAZO *et al.*, 2000; CAHU & ZAMBONINO-INFANTE, 2001). Several authors have used vitamins in *Pagrus major* larvae (Temminck & Schlegel, 1843) (KOLKOVSKI, 2001; OGATA & OKU, 2001; TESHIMA *et al.*, 2004; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006), *Sparus aurata* larvae (HENRIQUE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; GONZÁLES *et al.*, 1995; IZQUIERDO *et al.*, 2018), *Acanthopagrus latus* larvae (Houttuyn, 1782) (ADLO *et al.*, 2012), and larvae of flatfishes such as *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) (ESTÉVEZ & KANAZAWA, 1995), *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ, 2017), *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846) (DEDI *et al.*, 1995).

Vitamins are essential for the growth and maintenance of marine fish larvae, but since they are not synthesized by the fish body, or if they are, it is at a lower rate, it is important to include them in diets (GISBERT *et al.*, 2008). Vitamin C is an important antioxidant and is necessary for the formation of skeletal elements such as bone matrix, collagen, and connective tissue. Malformations resulting from poor calcification are caused by diets deficient in vitamin C (LALL & LEWIS, 2007). GAPASIN *et al.* (1998) studied *Chanos chanos* larvae (Forsskål, 1775) using live food fortified with vitamin C at doses of 33 mg/g obtaining the best values between 24-27 mg dry weight at 40 DAH, being this dose higher than those recommended for larvae of the order Perciforme (IZQUIERDO *et al.*, 2018) to which *A. scapularis* belongs; nevertheless, the dry weight values coincide with those found in the E1 and E2 treatments. BETANCOR *et al.* (2012) reported total weight values of 1.01 ± 0.07 mg and length of 11.24 ± 1.08 mm at 21 DAH in *Dicentrarchus labrax* larvae with doses of 3,600 mg/kg of vitamin C, being the weight and length values lower than those found in treatment E3 and E4 as they obtained the lowest growth compared to the other treatments and the dose used was

utilizada fue 4,12 veces mayor a la usada en los tratamientos de este experimento.

FERNÁNDEZ *et al.* (2008) estudiaron en larvas de *Sparus aurata* dosis de 450 ng/mg de vitamina A en el enriquecimiento, consiguieron peso de 74,61 mg y longitud de 16,90 mm a los 60 DDE, esta es la dosis que se utilizó en larvas *A. scapularis* pero no se obtuvieron resultados similares en cuanto al peso debido a que los valores más altos fueron los tratamientos E1 y E2 con $30,44 \pm 10,30$ y $30,11 \pm 6,28$ mg, respectivamente, sin embargo la longitud final sí fue mayor con valores de $19,06 \pm 0,98$ y $19,23 \pm 1,61$ mm para los tratamientos mencionados. HERNÁNDEZ *et al.* (2006) utilizaron dosis de 165 mg/100g de vitamina A en larvas de *Pagrus major* obteniendo peso total de 3,9 mg a los 15 DDE, (quienes concluyeron que la vitamina A en la dieta podría estar vinculada a las deformidades vertebrales en larvas del pargo rojo), siendo esa dosis superior a la usada en *A. scapularis*. GONZÁLES *et al.* (1995) observaron que la dosis de 136 mg/kg de vitamina E en larvas de *Sparus aurata* obtienen mejor tasa de crecimiento, así como la influencia de esta vitamina en el tejido larval; a la vez IzQUIERDO *et al.* (2018) mencionan que con dosis de 1.783 mg/kg de vitamina E en esas larvas obtienen mayor crecimiento, sin embargo, esa dosis es 7,62 veces mayor a la utilizada en larvas de *A. scapularis*. Así mismo, el exceso de vitaminas en la dieta juega un papel importante en el origen de deformidades, particularmente en las concentraciones más altas (HERNÁNDEZ, 2006).

Las malformaciones esqueléticas pueden ser causadas por diversos motivos, siendo la nutrición uno de los más importantes (GISBERT *et al.*, 2008). MAZURAS *et al.* (2009) investigaron la influencia de la vitamina A en larvas de *Dicentrarchus labrax* dosis de 5 mg/kg y 70 mg/kg obtuvieron supervivencia de 69,00% y 72,10% respectivamente y en ambos casos presencia de malformaciones craneales a los 45 DDE, siendo estos resultados superiores a los encontrados en el tratamiento E2 que fue el que obtuvo el valor más alto de supervivencia. También, se han realizado estudios en peces planos adicionándoles vitamina A en su alimentación, como el de JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ (2018) con larvas de *Solea senegalensis* donde obtuvieron supervivencia de $79,7 \pm 10,1\%$ y deformidad en la vértebra de 57,9% a los 28 DDE, valores diferentes a los encontrados en el tratamiento E2 donde se obtuvo el mayor valor de larvas normales.

4.12 times higher than the dose used in the treatments of this trial.

FERNÁNDEZ *et al.* (2008) studied doses of 450 ng/mg of vitamin A in enrichment for *Sparus aurata* larvae, which obtained weight of 74.61 mg and a length of 16.90 mm at 60 DAH, this is the dose used in *A. scapularis* larvae but similar results were not obtained in terms of weight because the highest values were in treatments E1 and E2 with 30.44 ± 10.30 and 30.11 ± 6.28 mg respectively, but the final length was higher with values of 19.06 ± 0.98 and 19.23 ± 1.61 mm for the aforementioned treatments. HERNÁNDEZ *et al.* (2006) used doses of 165 mg/100g of vitamin A in *Pagrus major* larvae obtaining a total weight of 3.9 mg at 15 DAH, (who concluded that vitamin A in the diet could be linked to vertebral deformities in red snapper larvae), this dose is higher than that used in *A. scapularis*. GONZÁLES *et al.* (1995) observed that the dose of 136 mg/kg of vitamin E in *Sparus aurata* larvae obtain a better growth rate, as well as the influence of this vitamin in the larval tissue. Likewise, IzQUIERDO *et al.* (2018) mentioned that with doses of 1,783 mg/kg of vitamin E in these larvae they obtain better growth, but this doses is 7.62 times higher than that used in larvae of *A. scapularis*. Likewise, the excess of vitamins in the diet plays an important role in the origin of deformities, particularly in the higher concentrations of vitamin E in the larvae (HERNÁNDEZ, 2006).

Skeletal malformations can be caused by several reasons, of which nutrition is one of the most important (GISBERT *et al.*, 2008). MAZURAS *et al.* (2009) studied the influence of vitamin A in *Dicentrarchus labrax* larvae, doses of 5 mg/kg and 70 mg/kg obtained survival of 69.00% and 72.10%, respectively, and in both cases the presence of cranial malformations at 45 DAH. These results were superior to those found in the E2 treatment which was the one that obtained the highest survival value. Also, studies have been carried out on flatfish by adding vitamin A to their diet, such as that of JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ (2018) with *Solea senegalensis* larvae where they obtained a survival of $79.7 \pm 10.1\%$ and vertebral deformity of 57.9% at 28 DAH, values different from those found in the E2 treatment

Los lípidos son importantes en la nutrición de la larva no solo por la energía calórica proporcionada y para el catabolismo de las proteínas (VERRETH, 1999), sino por proveer ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y altamente insaturados (AGAI) requeridos para el normal funcionamiento de la membrana celular (IZQUIERDO *et al.*, 1989; SARGENT *et al.*, 1995), como el caso del ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5 ω 3), el ácido docosahexaenoico (DHA 22:6 ω 3) y el ácido araquidónico (ARA 20:4 ω 6) los cuales cumplen un rol importante en desarrollo, crecimiento y supervivencia de larvas de peces marinos (WATANABE *et al.*, 1989; IZQUIERDO *et al.*, 1992; DÍAZ, 2004). CURE *et al.* (1996), RODRÍGUEZ *et al.* (1997) e IZQUIERDO y KOVEN (2011) mencionan que una relación de DHA/EPA de 2:1 es adecuada para un buen crecimiento, desarrollo y formación del tejido nervioso de las larvas de peces marinos y en el presente estudio los valores de DHA/EPA fueron de $1,59 \pm 0,16$; $1,72 \pm 0,07$; $1,74 \pm 0,08$ y $1,73 \pm 0,05$, respectivamente, siendo valores menores en comparación a los autores citados.

Por otra parte, COPEMAN *et al.* (2002), realizaron estudios con larvas de lenguado cola amarilla *Limanda ferruginea* utilizando alimento vivo enriquecido con cuatro emulsiones, alto DHA (43,30% del total de ácidos grasos), DHA + EPA (37,40 y 14,20%), DHA + ARA (36,00 y 8,90%) y la emulsión control que contenía únicamente aceite de oliva sin DHA, EPA y ARA, los autores encontraron que las larvas del tratamiento alto en DHA alcanzaron longitud y supervivencia significativamente mayores con $9,70 \pm 0,20$ mm y $22,10 \pm 0,40\%$, respectivamente que las alimentadas con la emulsión control con $7,30 \pm 0,20$ mm y $5,10 \pm 1,90\%$. VIZCAÍNO-OCHOA *et al.* (2010) evaluaron el efecto de diferentes dosis de DHA 0,16; 0,85; 1,61 y 3,25% en larvas de *Paralichthys californicus* utilizando nauplios de artemia, determinando que el incremento del nivel de DHA en el alimento vivo aumenta el crecimiento y supervivencia, estos estudios concuerdan con la presente investigación, donde el tratamiento E2 obtuvo la mayor concentración de DHA, consiguiendo mayor longitud y TCE. IZQUIERDO & KOVEN (2011) recomiendan que los valores deben estar en el rango de 3-5 mg ARA/g para larvas de *Sparus aurata*, siendo estos valores superiores a los encontrados en larvas de *A. scapularis*. Sin embargo, ESTÉVEZ *et al.* (2001) mencionan que valores de 0,30 a 4,10 de EPA/ARA resulta beneficioso para larvas de *Paralichthys olivaceus*.

where the highest value of normal larvae was obtained.

Lipids are important in larval nutrition not only for the caloric energy provided and for protein catabolism (VERRETH, 1999), but also for providing polyunsaturated (PUFA) and highly unsaturated fatty acids (UFA) required for the normal functioning of the cell membrane (IZQUIERDO *et al.*, 1989; SARGENT *et al.*, 1995), such as eicosapentaenoic acid (EPA 20:5 ω 3), docosahexaenoic acid (DHA 22:6 ω 3), and arachidonic acid (ARA 20:4 ω 6) which are important in the development, growth, and survival of marine fish larvae (WATANABE *et al.*, 1989; IZQUIERDO *et al.*, 1992; DÍAZ, 2004). CURE *et al.* (1996); RODRÍGUEZ *et al.* (1997), and IZQUIERDO & KOVEN (2011) mention that a DHA/EPA ratio of 2:1 is adequate for good growth, development, and formation of nervous tissue of marine fish larvae and the DHA/EPA values in our study were as follows: 1.59 ± 0.16 ; 1.72 ± 0.07 ; 1.74 ± 0.08 , and 1.73 ± 0.05 , respectively, being lower than those of the cited authors.

COPEMAN *et al.* (2002) conducted studies with *Limanda ferruginea* larvae using live food fortified with four emulsions, high DHA (43.30% of total fatty acids), DHA + EPA (37.40 and 14.20%), DHA + ARA (36.00 and 8.90%), and the control emulsion containing only olive oil without DHA, EPA, and ARA. The authors found that larvae from the high DHA treatment reached a significantly greater length and survival with 9.70 ± 0.20 mm and $22.10 \pm 0.40\%$, respectively than those fed with the control emulsion with 7.30 ± 0.20 mm, and $5.10 \pm 1.90\%$. VIZCAÍNO-OCHOA *et al.* (2010) evaluated the effect of different doses of DHA 0.16; 0.85; 1.61, and 3.25% in *Paralichthys californicus* larvae using artemia nauplii, finding that increasing the level of DHA in live food increases growth and survival. These studies agree with our investigation, where the E2 treatment obtained the highest concentration of DHA, achieving greater length and SGR. IZQUIERDO & KOVEN (2011) for *Sparus aurata* larvae, these values are higher than those found in *A. scapularis* larvae. Nevertheless, ESTÉVEZ *et al.* (2001) mention that values of 0.30 to 4.10 EPA/ARA are beneficial for *Paralichthys olivaceus* larvae.

5. CONCLUSIONES

Esta investigación permitió conocer el efecto de adicionar las vitaminas A, C y E en el enriquecimiento del alimento vivo. Sin embargo, a pesar de que no mostraron diferencias significativas, el tratamiento E2 usando la vitamina A exhibió los valores más altos en longitud, TCE, supervivencia, mayores niveles de DHA y menor presencia de malformaciones. En tal sentido, la dosis de vitamina A se podrá utilizar como base para investigaciones relacionadas a la nutrición de larvas de chita.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado como parte del programa presupuestal por resultado – PpR N° 0094 Ordenamiento y Desarrollo de la Acuicultura con el proyecto “Acondicionamiento y Reproducción de especies priorizadas” perteneciente al Área Funcional de Investigaciones en Acuicultura de la Dirección General de Investigaciones en Acuicultura del Instituto del Mar del Perú.

5. CONCLUSIONS

Our research provided knowledge of the effect of adding vitamins A, C, and E into the live food fortification. Even though they did not show significant differences, the E2 treatment using vitamin A showed the highest values in length, SGR, survival, higher levels of DHA, and lower presence of malformations. Therefore, the vitamin A dose could be used as a basis for research on the nutrition of *A. scapularis* larvae.

Acknowledgments

This work was financed as part of the budgetary program by result N° 0094 Management and Development of Aquaculture with the project “Conditioning and Reproduction of prioritized species” belonging to the Functional Area of Aquaculture Research of the Directorate General for Aquaculture Research of the Instituto del Mar del Peru.

6. REFERENCIAS / REFERENCES

- ABDO-DE LA PARRA, M., RODRÍGUEZ-IBARRA, L., CAMPILLO-MARTÍNEZ, F., VELASCO-BLANCO, G., GARCÍA-AGUILAR, N., ÁLVAREZ-LAJONCHÈRE, L., VOLTOLINA, D. (2010). Effect of stocking density on survival and growth of larval spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* larvae. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(1), 141-146.
- ADLO, M., MATINFAR, A., SOURINEZHAD, I. (2012). Effects of feeding enriched *Artemia franciscana* with HUFA, Vitamin C and E on growth performance, survival and stress resistance of *Yellowfin seabream* larvae. *J. Aquacult. Res. Dev.*, 3, 8.
- AMAT, F. (2018). Acuicultura Marina: Cría Larvaria de Peces. *Cienciaprop*®, 1(4), 1-14.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION -AVMA. (2020). AVMA Guidelines on euthanasia (Formerly: report of the AVMA Panel on Euthanasia). pp. 39.
- ANDRADES, J., BECERRA, J., FERNÁNDEZ-LLEBRES, P. (1996). Skeletal deformities in larval, juveniles and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 141, 1-11.
- ARISTIZABAL, E. (2006). Desove en cautiverio y calidad de los huevos y larvas del besugo, *Pagrus pagrus* (L.). INIDEP, Argentina, Informe técnico, 59, 2-13.
- BARAHONA-FERNANDES, M. (1982). Body deformation in hatchery reared European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L). Types, prevalence, and effect on fish survival. *Journal of Fish Biology*, 21(3), 239-249.
- BERALDO, P., CANAVESE, B. (2011). Recovery of opercular anomalies in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.: morphological and morphometric analysis. *Journal of fish diseases*, 34(1), 21-30.
- BETANCOR, M., CABALLERO, M., TEROVA, G., CORA, S., SALEH, R., BENITEZ-SANTANA, T., IZQUIERDO, M. (2012). Vitamin C enhances vitamin E status and reduces oxidative stress indicators in sea bass larvae fed high DHA microdiets. *Lipids*, 47(12), 1193-1207.
- BOGLIONE, C., GAGLIARDI, F., SCARDI, M., CATAUDELLA, S. (2001). Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758). *Aquaculture*, 192, 1-22.
- CAHU, C., ZAMBONINO-INFANTE, J. (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200(1-2), 161-180.
- CARRERA, L., COTA, N., LINARES, J., CASTRO, A., ORIHUELA, L., SILVA, E., MONTES, M. (2018). Manual para acondicionamiento y reproducción de chita *Anisotremus scapularis*. *Bol Inst Mar Perú*, 45(2), 263-276.
- CHACON-GUZMÁN, J., CARVAJAL-OSÉS, M., TOLEDO-AGÜERO, P., FLORES-GATICA, H. (2020). Comparison of fatty acids profile of the gonads and eggs of *Lutjanus guttatus* (Perciformes: *Lutjanidae*) obtained from wild and captive broodstock. *Uniciencia*, 34(1), 32-59.
- CHATAIN, B. (1994). Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture*, 119(4), 371-379.
- CHAVEZ, C. (2013). Avances en el Requerimiento de Vitaminas en Peces Marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J.,

- Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 507-520.
- CHIRICHIGNO, F., CORNEJO, U. (2001). Catálogo comentado de los peces marinos del Perú. Publicación Especial del Instituto del Mar del Perú, Callao. 500 pp.
- CIVERA-CERECEDO, R., ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C., MOYANO-LÓPEZ, J. (2004). Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. Avances en Nutrición Acuícola.
- CONCEIÇÃO, L., YÚFERA, M., MAKRIDIS, P., MORAIS, S., DINIS, M. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41(5), 613-640.
- COPEMAN, L., PARRISH, C., BROWN, J., HAREL, M. (2002). Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*, 210(1-4), 285-304.
- COTA, N., CASTRO, A., CARRERA, L., MONTES, M. (2018). Incidencia de malformaciones esqueléticas en juveniles de chita *Anisotremus scapularis* bajo condiciones de laboratorio. En LAQUA18. Latin American & Caribbean Aquaculture. VIII Congreso de Acuicultura, Colombia.
- CURE, K., GAJARDO, G., COUTTEAU, P. (1996). The effect of DHA/EPA ratio in live feed on the fatty acid composition, survival, growth, and pigmentation of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L., in: Gajardo, G. *et al.* Improvement of the Commercial Production of Marine Aquaculture Species. Proceedings of a workshop on Fish and Mollusc Larviculture, 57-67.
- DARIAS, M., LAN CHOW, WING., CAHU, J., ZAMBONINI-INFANTE, D., MAZURAS. (2010, b). Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Applied Ichthyology*, 26, 280-285.
- DEDI, J., TAKEUCHI, T., SEIKAI, T., WATANABE, T. (1995). Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder *Paralichthys olivaceus* fed Artemia nauplii. *Aquaculture*, 133(2), 135-146.
- DE OLIVEIRA, E., PINHEIRO, A., DE OLIVEIRA, V., DA SILVA, A., DE MORAES, M., ROCHA, I., DE SOUSA, R., COSTA, F. (2012). Effects of stocking density on the performance of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) in cages. *Aquaculture*, 370-371, 96-101.
- DÍAZ, N. (2004). Efecto de la relación EPA/ADH en larvas de puye (*Galaxias maculatus*, Jenyns. 1842), cultivadas en diferentes salinidades. Universidad Católica de Temuco. Tesis de grado, Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias, Chile. 70 pp.
- EL-DAHAR, A., SALAMA, A., EL-GREESY, Z., SHAHEEN, S. (2013). Effect of live food enrichment and temperature on growth performance survival and digestive tract development of grey mullet, *Liza ramada* larvae. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 8(1), 87-104.
- ESTÉVEZ, A., KANAZAWA, A. (1996). Fatty acid composition of neural tissues of normally pigmented and unpigmented juveniles of Japanese flounder using rotifer and Artemia enriched in n-3 HUFA. *Fisheries Science*, 62, 88-93.
- ESTÉVEZ, A., KANEKO, T., SEIKAI, T., TAGAWA, M., TANAKA, M. (2001). ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachidonic acid-enriched live prey. *Aquaculture*, 192(2-4), 309-319.
- FERNÁNDEZ, E. (2017). Incorporación de vitamina C en dietas larvianas y su implicación en el desarrollo de *Solea senegalensis*. *Revista AquaTIC*, (45), 5-6.
- FERNÁNDEZ, I., HONTORIA, F., ORTIZ-DELGADO, J., KOTZAMANIS, Y., ESTÉVEZ, A., ZAMBONINO-INFANTE, J., GISBERT, E. (2008). Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 283(1-4), 102-115.
- FERNÁNDEZ, I., PIMENTEL, M., ORTIZ-DELGADO, J., HONTORIA, F., SARASQUETE, C., ESTÉVEZ, A., GISBERT, E. (2009). Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture*, 295(3-4), 250-265.
- FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- GAPASIN, R., BOMBEO, R., LAVENS, P., SORGELOOS, P., NELIS, H. (1998). Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture*, 162(3-4), 269-286.
- GATTA, PIRINI, TESTI, VIGNOLA, MONETTI. (2000). The influence of different levels of dietary vitamin E on sea bass *Dicentrarchus labrax* flesh quality. *Aquaculture Nutrition*, 6, 47-52. doi: 10.1046/j.1365-2095.2000.00127.x
- GALEOTTI, M., BERALDO, P., DE DOMINIS, S., D'ANGELO, L., BALLESTRAZZI, R., MUSETTI, R., PINOSA, M. (2000). A preliminary histological and ultrastructural study of opercular anomalies in gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 22(2), 151-157.
- GISBERT, E., ORTIZ-DELGADO, J., SARASQUETE, C. (2008). Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and histopathology*, 23, 1525-1539.
- GONZÁLEZ, M., IZQUIERDO, M., SALHI, M., HERNANDEZ-CRUZ, C., FERNANDEZ-PALACIOS, H. (1995). Dietary vitamin E for *Sparus aurata* larvae. In: Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, Y. Eds. Larvi'95-Fish and Shellfish Larviculture Symposium, Gent, Belgium. *European Aquacult. Soc. Special Publ.*, 24, 239-242.
- HAMRE, K., KROSS, C., LOCK, E., MOREN, M. (2010). Review article. Roles of lipid-soluble vitamins during ontogeny of marine fish larvae. *Aquaculture Research*, 41, 745-750.
- HENRIQUE, M., GOMES, E., GOUILLOU-COUSTANS, M., OLIVA-TELES, A., DAVIES, S. (1998). Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 61(1-4), 415-426.
- HERNÁNDEZ, H. L., TESHIMA, S., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., GALLARDO-CIGARROA, F., ALAM, M., UYAN, O. (2006). Efectos del palmitato de vitamina A, el β-caroteno

- y el ácido retinoico en el crecimiento e incidencia de deformidades en larvas de pargo rojo *Chrysophrys major*. *Ciencias marinas*, 32(1b), 195-204.
- HONTORIA, F., CROWE, J., CROWE, L., AMAT, F. (1994). Potential use of liposomes in larviculture as a delivery system through *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 127, 255-264.
- HU, J., LIU, Y., MA, Z., QIN, J. (2018). Feeding and development of warm water marine fish larvae in early life. In: *Emerging Issues in Fish Larvae Research*, 275-296.
- ICHIHARA, K., FUKUBAYASHI, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of lipid research*, 51(3), 635-640.
- IZQUIERDO, M., FERNANDEZ-PALACIOS, H. (1997). Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cah. Options Mediterr.*, 22, 243-264.
- IZQUIERDO, M. S., KOVEN, W. (2011). Lipids. In: Holdt (ed.) *Larval fish nutrition*. p. 47-81. Wiley-Blackwell, John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- IZQUIERDO, M., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., ARAWA, T., KITAJIMA, C. (1989). Optimal EFA levels in artemia to meet the EFA requirements of red seabream (*Pargos major*) Proc. 3rd int. Symp. Feeding and Nutrition in Fish. Toba (Japan). Pp. 221-232.
- IZQUIERDO, M., ARAKAWA, T., TAKEUCHI, R., HAROUN, R., WATANABE, T. (1992). Effect of μ -3 HUFAs levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 105, 73-82.
- IZQUIERDO, M., DOMÍNGUEZ, D., JIMÉNEZ, J., SALEH, R., HERNÁNDEZ-CRUZ, C., ZAMORANO, M., HAMRE, K. (2018). Interaction between taurine, vitamin E and vitamin C in microdiets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 498, 246-253.
- JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, E., PONCE, M., RODRÍGUEZ-RÚA, A., MANCHADO, M., FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. (2018). Assessing the role of vitamin C and iron in early larvae stages of *Solea senegalensis* fed enriched *Artemia*. *Aquaculture*, 488, 145-154.
- KOLKOVSKI, S., CZESNY, S., YACKEY, C., MOREAU, R., CIHLA, F., MAHAN, D., DABROWSKI, K. (2001). The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched *Artemia* nauplii on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae. *Aquaculture Nutrition*, 6(3), 199.
- KOUMOUNDOUROS, G., GAGLIARDI, F., DIVANACH, P., BOGLIONE, C., CATAUDELLA, S., KENTOURI, M. (1997). Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture*, 149, 215-226.
- LALL, S., LEWIS-MCCREA, L. (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish an overview. *Aquaculture*, 267, 3-19.
- LAZO, J., DINIS, M., HOLT, G., FAULK, C., ARNOLD, C. (2000). Co-feeding microparticulate diets UIT algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 188, 339-351.
- LEITH, D., KAATTARI, S. (1989). Effects of vitamin nutrition on the immune response of hatchery-reared salmonids. US Department of Energy, Bonneville Power Administration, Division of Fish & Wildlife.
- LUGERT, V., THALLER, G., TETENS, J., SCHULZ, C., KRIETER, J. (2014). A review on fish growth calculation: multiple functions in fish production and their specific application. *Reviews in Aquaculture*, 6, 1-13.
- MATSUOKA, M. (1985). Osteological development in the red sea bream, *Pagrus major*. *Japan J. Ichthiol*, 32, 35-51.
- MATSUOKA, M. (1987). Development of skeletal tissue and skeletal muscle in the red sea bream, *Pagrus major*. *Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab.*, 65, 1-102.
- MAZURAI, D., GLYNATSI, N., DARIAS, M., CHRISTODOULOPOULOU, S., CAHU, C., ZAMBONINO-INFANTE, J., KOUMOUNDOUROS, G. (2009). Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. *Aquaculture*, 294, 262-270.
- MENDO, J., WOSNITZA-MENDO, C. (2014). Reconstruction of total marine fisheries catches for Peru: 1950-2010. Vancouver, BC.
- MERINO-CONTRERAS, M., SÁNCHEZ-MORALES, F., JIMÉNEZ-BADILLO, M., ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C., MEINERS-MANDUJANO, C., PEÑA-MARÍN, E. (2018). Aclimatación en cautiverio del sargo *Archosargus probatocephalus* (Perciformes: Sparidae). *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 5(15), 511-521.
- MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN DEL PERÚ -PRODUCE. (2017). Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola 2017. <http://ogeie.produce.gob.pe/index.php/shortcode/oe-documentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/825-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2017>. Reviewed: 1 July 2020.
- MONTERO, D., MARRERO, M., IZQUIERDO, M., ROBAINA, L., VERGARA, J., TORT, L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171(3-4), 269-278.
- MONROIG, O. (2006). Diseño y optimización de liposomas para su uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- MOREL, C., ADRIAENS, D., BOONE, M., DE WOLF, T., VAN HOOREBEKE, L., SORGELOOS, P. (2010). Visualizing mineralization in deformed opercular bones of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Applied Ichthyology*, 26(2), 278-279.
- NAVARRO, J., McEVOY, L., BELL, M., HONTORIA, F., SARGENT, J. (1997). Effect of different dietary levels of docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6 ω 3) on the DHA composition of lipid classes in sea bass larvae eyes. *Aquaculture International*, 5, 509- 516.
- OGATA, H., OKU, H. (2001). The effects of dietary retinoic acid on body lipid deposition in juvenile red sea bream (*Pagrus major*), a preliminary study. *Aquaculture*, 193(3-4), 271-279.
- PAZ, B. (2014). Efecto del DHA sobre la expresión de la Δ 6-desaturasa durante el desarrollo larvario del

- pargo amarillo, *Lutjanus argentiventris*. Tesis de maestro del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México.
- PEPÍN, P. (1995). An analysis of the length-weight relationship of larval fish: limitations of the general allometric model. *Fishery Bulletin*, 93(2), 419-426.
- R CORE TEAM. (2019). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. [https://www.R-project.org/]. Reviewed: 4 July 2020.
- RAINUZZO, J., REITAN, K., OLSEN, Y. (1997). The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155(1-4), 103-115.
- RIVERA C., BOTERO M. (2009). Alimento vivo enriquecido con ácidos grasos para el desarrollo larvario de peces. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(4), 607-618.
- RODRÍGUEZ, C., PÉREZ, J., DIAZ, M., IZQUIERDO, M., FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., LORENZO, A. (1997). Influence of the EPADHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. *Aquaculture*, 150(1-2), 77-89.
- SANAYE, S., DHAKER, H., TIBILE, R., MHATRE, V. (2014). Effect of green water and mixed zooplankton growth and survival in neon tetra, *Paracheirodon innesi* (Myers, 1936) during larval and early fry rearing. *World Academy of Science, Engineering and Technology International, Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 8(2), 159-163.
- SARGENT, J., BELL, J., BELL, M., HENDERSON, R., TOCHER, D. (1995). Evolution and roles of (μ -3) polyunsaturated fatty acids in marine organisms in: phospholipids: characterization metabolism and Novel Biological Applications, 248-259, AOCS Press. Champaign Il.
- SKIFTESVIK, A., BROWMAN, H., ST-PIERRE, J. (2003). Life in green water: the effect of microalgae on the behavior of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. In: Browman, H.I., & Skiftesvik, A.B. (Eds.). *The big fish bang. Proceedings of the 26th annual larval fish conference.* Institute of Marine Research, Bergen, 97-103.
- TESHIMA, S., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., ALAM, M., HERNANDEZ, L. (2004). Effects of protein and lipid sources on the growth and survival of red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* receiving micro-bound diets during larval and early juvenile stage. *Aquaculture Nutrition*, 10(4), 279-287.
- VERHAEGEN, Y., ADRIAENS, D., DE WOLF, T., DHERT, P., SORGELOOS, P. (2007). Deformities in larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A qualitative and quantitative analysis using geometric morphometrics. *Aquaculture*, 268, 156-168.
- VERRETH, J. (1999). I curso internacional sobre nutrición de larvas de peces. Universidad de Antioquia. Medellín, 15-17.
- VILLENEUVE, L., GISBERT, E., LE DELLIU, H., CAHU, C. L., ZAMBONINO-INFANTE, J. L. (2005). Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br. J. Nutr.*, 93, 1-12.
- VIZCAÍNO-OCHOA, V., LAZO, J., BARÓN-SEVILLA, B., DRAWBRIDGE, M. (2010). The effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) on growth, survival and pigmentation of California halibut *Paralichthys californicus* larvae (Ayres, 1810). *Aquaculture*, 302(3-4), 228-234.
- WANG, J., SHU, X., WANG, W. (2019). Micro-elemental retention in rotifers and their trophic transfer to marine fish larvae: influences of green algae enrichment. *Aquaculture*, 499, 374-380.
- WATANABE, T., IZQUIERDO, M., TAKEUCHI, S., KITAJIMA, C. (1989). Comparison between eicosapentaeoic acid and docosahexaenoic acid in terms of essential fatty acid efficacy in larval red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1635-1640.