

Composición de ácidos grasos en huevos y adultos de *Tigriopus angulatus* (Copepoda: Harpacticoida)

Fatty acid composition in eggs and adults of *Tigriopus angulatus* (Copepoda: Harpacticoida)

Paulina A. Fornes^{1, 2}, Bernardo R. Broitman^{1, 4}, Marcela Escobar² y Pedro Báez³

¹Universidad Católica del Norte, Facultad de Ciencias del Mar, Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile. paulinafornes@gmail.com

²Universidad de Valparaíso, Facultad de Farmacia, Av. Gran Bretaña 1093, Valparaíso, Chile

³Museo Nacional de Historia Natural, Área de Invertebrados, Interior Parque Quinta Normal S/N, Santiago, Chile

⁴Pontificia Universidad Católica de Chile, Center for Advanced Studies in Ecology and Biodiversity (CASEB), Alameda 340, Santiago, Chile

Abstract.- *Tigriopus angulatus* is a harpacticoid copepod, which inhabits intertidal pools in the South Pacific coasts. Through analysis of fatty acids by gaseous chromatography of specimens collected in Montemar area, Valparaíso Bay, central Chile, we determined the relative composition (mass percentage of fatty acids) and quantity of fatty acids (ng ind⁻¹) of the following ontogenetic stages: eggs, non-ovigerous females, ovigerous females and males. All analyzed stages had higher relative percentages of saturated and mono-unsaturated fatty acids than high-unsaturated and poli-unsaturated fatty acids. The omega 3 family showed higher relative percentages than omega 6. The more abundant fatty acids were palmitic, stearic, oleic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. The fatty acids quantity per individual was significantly different between eggs and adult females. The adult non-ovigerous and ovigerous females showed more total fatty acids than males and eggs, and only male were quantitatively similar in fatty acids to the eggs.

Key words: Harpacticoid copepods, polyunsaturated fatty acids, high-unsaturated fatty acids, oil droplets, lipids

Resumen.- *Tigriopus angulatus* es un copépodo harpacticóideo bentónico, que habita en pozas intermareales de las costas del Pacífico Sur. Ejemplares de esta especie fueron recolectados en Montemar, Bahía de Valparaíso, Chile central, para determinar, mediante análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa, la composición relativa (masa porcentual de ácidos grasos) y cantidad (ng ind⁻¹) de ácidos grasos de las fases ontogenéticas de huevos, hembras no ovígeras, hembras ovígeras y machos. Todas las fases analizadas presentaron altos porcentajes relativos de ácidos grasos saturados y mono-insaturados y menores porcentajes relativos de ácidos grasos altamente-insaturados y poli-insaturados. La composición de la familia de los omega tres presentó mayores porcentajes relativos que los omega seis. Los ácidos grasos más abundantes fueron los siguientes: palmítico, esteárico, oleico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico. La cuantificación de ácidos grasos por individuo, demostró ser significativamente distinta entre los huevos y hembras adultas. Hembras no ovígeras y ovígeras presentaron más ácidos grasos totales que los machos y huevos, y de estos sólo los machos mostraron cantidades similares a los huevos.

Palabras clave: Copépodos harpacticoides, ácidos grasos poli-insaturados, ácidos grasos altamente-insaturados, gotas oleosas, lípidos

INTRODUCCIÓN

Los copépodos, subphylum Crustacea, adaptados a vivir en diversos ambientes, constituyen un grupo diverso conformado por más de 12.000 especies descritas. Éstos forman parte del zooplancton marino y ocupan el segundo eslabón de la cadena trófica como consumidores primarios. Las poblaciones de copépodos constituyen los ítems más abundantes en la dieta natural de especies pelágicas de vertebrados (Björnberg 1981, Hickman *et al.* 2000).

La mayoría de los copépodos planctónicos de la clase *Calanoida* presentan estructuras lipídicas como triglicéridos, ceras esterificadas y fosfolípidos que cumplen un rol importante durante los períodos de reproducción, escasez de comida, escape a la depredación, migración vertical y diapausa (Hagen & Auel 2001). Las concentraciones de lípidos en estas estructuras varían temporal y espacialmente (Lee *et al.* 2006) y son

acumulados en grandes sacos de aceite como dispositivos de flotación o reservas energéticas y en gotas oleosas dedicadas al desarrollo de los ovocitos y posteriormente convertidas en fosfolípidos (predominantemente fosfatidilcolina) para el desarrollo de los embriones (Lee *et al.* 2006).

Los copépodos costeros harpacticóideos carecen de sacos oleosos, debido a que no efectúan migraciones verticales que les demanden mucha energía o boyantes. Sin embargo, poseen gotas oleosas y acumulan lípidos que tienen como constituyente elemental ácidos grasos altamente-insaturados (AGAI) como el docosahexaenoico (DHA) y el eicosapentaenoico (EPA) (Nanton & Castell 1999). Estos copépodos viven a densidades poblacionales altas y toleran un amplio rango de condiciones físicas y químicas, habituales en las zonas intermareales (Kahan *et al.* 1982, Støtrup 2003). Las especies del género *Tigriopus* son cosmopolitas y omnívoras (Ki *et al.* 2009) y en el caso de *Tigriopus angulatus* Lang, 1933 habita en pozas del intermareal alto y se distribuye geográficamente desde la región de Arica y Parinacota, norte de Chile (20,24°S, 70,13°O) hasta la región de Los Ríos (39,82°S, 73,17°O) (Goddard, com. pers.)¹.

Los cultivos experimentales de *Tigriopus angulatus* han permitido establecer que esta especie presenta una amplia tolerancia térmica (21°C a 25°C) y de salinidad (26 a 40,6 ups, Mujica *et al.* 1995), lo que favorece su mantención en el laboratorio y es fácilmente cultivable. Estas características y experiencias previas con otras especies de copépodos permiten posicionar a *T. angulatus* como un potencial ítem presa para suplementar la alimentación de cultivos de larvas de peces (McEvoy *et al.* 1998, Rønnestad *et al.* 1998, Payne & Rippingale 2000, Grageda *et al.* 2008).

Estudios referentes a la optimización de las dietas de larvas de peces han establecido que los copépodos harpacticóideos presentan mejores calidades nutritivas que otras dietas comúnmente utilizadas, tales como aquellas basadas en nauplius de *Artemia* sp. y rotíferos enriquecidos (Kahan *et al.* 1982, McEvoy *et al.* 1998, Pandey *et al.* 2008). La necesidad de buscar dietas nutritivas se fundamenta en que las larvas de peces marinos como el halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, y el turbot *Scophthalmus maximus* presentan una capacidad enzimática limitada para sintetizar, elongar y desaturar cadenas de ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) a largas cadenas de ácidos grasos altamente-

insaturados (AGAI) (Castell *et al.* 1994, McEvoy *et al.* 1998, Nanton & Castell 1999). Por lo tanto, es esencial que estas larvas consuman dietas enriquecidas con AGAI que forman importantes estructuras celulares del sistema nervioso, la retina y otros tejidos pigmentados (Støtrup 2003).

Tigriopus angulatus se caracteriza por almacenar gotas oleosas en su cuerpo y ácidos grasos en las fases de huevos y adultos, los cuales se presentarían en mayores cantidades en las hembras adultas. De este modo, y a fin de evaluar el potencial del uso de *T. angulatus* como ítem presa en cultivos de larvas de peces, el objetivo central de este estudio fue caracterizar y cuantificar el contenido de ácidos grasos en una población natural de *T. angulatus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron individuos de *Tigriopus angulatus* durante noviembre del 2007, mediante muestreos diarios desde pozas intermareales de la localidad de Montemar, sector costero noreste de la Bahía de Valparaíso (32°57'S-71°33'O), Chile central. En este hábitat coexisten altas densidades de *T. angulatus* de ambos sexos y en distintas fases del ciclo de vida los cuales se obtuvieron bajo un estrato de algas del género *Ulva* sp. mediante un colector de muestras de agua de 1 L de capacidad.

De las muestras de copépodos se aislaron machos (MAC) y hembras adultas. Las sacos ovígeros de las hembras fueron retirados, resultando hembras ovígeras sin sus huevos (HOV) y huevos aislados (HUE). Las hembras adultas con óvulos en desarrollo pero sin sacos ovígeros, se agruparon como hembras adultas no ovígeras (HNO); la separación se realizó de acuerdo a los caracteres de las distintas fases de desarrollo definidas por Goddard (1993). Para obtener los ácidos grasos de los copépodos, se separaron varios ejemplares por fase de desarrollo y sexo, registrándose entre 400 a 1000 individuos por grupo. Posteriormente, cada uno de estos grupos fueron concentrados en tubos Eppendorf de 1,5, ml, rotulados según fase y replica (n = 3) respectiva. Cada muestra pesó sobre 100 mg según requerimiento cromatográfico. Luego, los tubos fueron guardados y congelados a -55°C, hasta su posterior análisis.

Las muestras descongeladas fueron concentradas y centrifugadas a 2.200 rpm durante 10 min. La extracción de lípidos se llevó a cabo según lo establecido en el método por Bligh & Dyer (1959) y se derivatizaron de acuerdo a lo establecido por Tennyson & Winters (2005)

¹Prof. Marcela Goddard, Universidad de Valparaíso, Chile

en el método para aceite de pescado. Todas las muestras fueron reconstituidas con 500 µl de hexano y posteriormente inyectadas en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer modelo Autosystem XL columna SP 2560, 100 m x 0,25 mm ID x 0,20 µm film, utilizando Helio 20 cm s⁻¹ a una temperatura 140°C (5 min) hasta 240°C a 4°C min⁻¹ como eluyente. Los datos se analizaron a través del software TotalChrom Workstation (PerkinElmer, Inc.). La integración de las curvas de composición lipídica de los ácidos grasos reconocidos fueron transformadas a composición porcentual (% ácidos grasos totales) relativa al 100% del total del área bajo la curva, basándose en el estándar conocido. La cantidad total obtenida de los ácidos grasos totales fue calculada basándose en un estándar previamente inyectado al cromatógrafo y en concordancia con el número de copépodos por muestra. El estándar entregado por el fabricante indica la cantidad en mg de cada ácido graso por ml del compuesto metileno clorhídrico, estimándose así la cantidad en nanogramos de ácido graso por individuo (ng ind⁻¹). Los ácidos grasos reconocidos se clasificaron de acuerdo al grado de insaturación en las cuatro categorías siguientes: saturados, mono-insaturados, poli-insaturados y altamente-insaturados (Nelson & Cox 2001).

La comparación estadística de la cantidad o concentración absoluta de ácidos grasos por ejemplar (ng ind⁻¹) entre las fases por cada categoría fueron analizadas estadísticamente mediante análisis de varianza (ANDEVA) de doble vía. Posteriormente, se determinaron las diferencias específicas entre las fases sin considerar la categoría y entre los ácidos grasos por cada categoría con la prueba *a posteriori* de Tukey con el programa estadístico R CRAN².

RESULTADOS

Las mayores abundancias en cuanto a composiciones relativas (% área) de ácidos grasos fueron observadas en orden decreciente para hembras no ovígeras, hembras ovígeras sin huevos, sacos ovígeros aislados y por último los machos (Tabla 1). El palmítico (16:0) fue el ácido graso observado en mayor proporción, excepto para las hembras ovígeras, en que el ácido oleico (18:1n-9c) fue el de mayor proporción. Al agrupar los ácidos grasos por saturación, familia y relación DHA/EPA (Tabla 2), todas las fases analizadas presentan altas abundancias de ácidos grasos saturados (cadena de carbono sin dobles enlaces) y mono-insaturados (cadena de carbono con un doble enlace) y

Tabla 1. Composición promedio (% de área de ácidos grasos totales y desviación estándar) de ácidos grasos de huevos y adultos de *Tigriopus angulatus* (HUE= huevos, HNO= hembras no ovígeras, HOV= hembras ovígeras sin sus huevos y MAC= machos adultos) / Average fatty acid composition (% total fatty acids area and standard deviation) of fatty acids from eggs and adults of *Tigriopus angulatus* (HUE=eggs, HNO= non-ovigerous females, HOV= ovigerous female without eggs and MAC= adult males)

| Ácidos grasos | HUE | HNO | HOV | MAC |
|------------------------------|------------|------------|------------|-------------|
| Saturados | | | | |
| 16:0 | 27,2 ± 2,2 | 27,9 ± 4,3 | 25,9 ± 1,1 | 35,3 ± 9,5 |
| 17:0 | - | 0,8 ± 0,8 | 0,5 ± 0,8 | - |
| 18:0 | 11,0 ± 0,9 | 9,9 ± 1,0 | 13,5 ± 1,9 | 13,5 ± 3,7 |
| 20:0 | - | - | - | 0,1 ± 0,2 |
| 21:0 | - | 0,8 ± 0,7 | - | - |
| 22:0 | - | 0,7 ± 0,7 | - | - |
| Mono-insaturados | | | | |
| 16:1 | 6,7 ± 2,6 | 7,7 ± 2,5 | 4,5 ± 0,4 | 1,7 ± 2,2 |
| 18: 1n-9c | 15,0 ± 1,5 | 9,8 ± 0,8 | 30,8 ± 6,9 | 19,2 ± 10,2 |
| 18: 1n-9t | 11,2 ± 0,3 | 9,8 ± 0,7 | 4,1 ± 3,5 | 5,2 ± 3,5 |
| 22:1n-9 | - | 2,1 ± 1,5 | 0,9 ± 0,8 | 1,9 ± 3,2 |
| 24:1 | - | 0,7 ± 0,6 | - | 1,1 ± 1,9 |
| Poli-insaturados | | | | |
| 18: 2n-6c | 4,2 ± 0,2 | 4,4 ± 1,1 | 2,7 ± 2,3 | 2,9 ± 5,1 |
| 18:3n-6γ | 3,9 ± 0,3 | - | 1,5 ± 1,4 | - |
| 18:3n-3α | - | 3,4 ± 1,0 | - | 0,2 ± 0,4 |
| 20:2 | - | 0,9 ± 0,9 | - | - |
| 20:3n-3 | - | 2,0 ± 0,3 | 0,9 ± 0,8 | 0,6 ± 1,1 |
| Altamente-insaturados | | | | |
| 20:4n-6 | - | 0,8 ± 0,7 | 0,3 ± 0,5 | - |
| 20:5n-3 | 10,0 ± 0,6 | 7,3 ± 0,7 | 6,0 ± 1,0 | 6,3 ± 4,7 |
| 22:6n-3 | 10,9 ± 2,3 | 10,9 ± 2,0 | 8,4 ± 0,8 | 11,9 ± 8,5 |

menores proporciones de los poli-insaturados (cadena de carbono con dos o más dobles enlaces). También se evidenció que la familia *n-3* fue más abundante que los *n-6*. Por último, todas las fases de *T. angulatus* presentaron una relación DHA/EPA mayor que 1 (Tabla 2).

En cuanto a la concentración absoluta (ng ind⁻¹) se detectaron diferencias significativas entre huevos y hembras adultas (Fig. 1). Los análisis de la varianza entre las fases identificaron diferencias significativas para ácidos grasos saturados (ANDEVA, $F_{(3,69)} = 5,3, P < 0,02$), mono-insaturados (ANDEVA, $F_{(3,57)} = 3,7, P < 0,01$), poli-insaturados (ANDEVA, $F_{(3,57)} = 6,9, P < 0,001$) y altamente-insaturados (ANDEVA, $F_{(3,33)} = 5,3, P < 0,005$). La prueba de Tukey evidenció diferencias entre fases, donde la concentración absoluta de ácidos grasos fue mayor en las hembras no ovígeras que en los huevos y en los machos (Tukey $P < 0,001$). También las hembras ovígeras sin sus huevos presentaron mayor concentraciones de

²The Comprehensive R Archive Network. <<http://cran.r-project.org/>>

Tabla 2. Composición promedio total (% de área de ácidos grasos totales y desviación estándar) de cada categoría y familia de ácidos grasos en huevos y adultos (abreviaciones como en Tabla 1) encontrados en *Tigriopus angulatus* / Total average composition (% total fatty acids area and standard deviation) for every group and family of fatty acids in eggs and adults of *Tigriopus angulatus* (abbreviations as in Table 1)

| Ácidos grasos | HUE | HNO | HOV | MAC |
|---------------|------------|------------|-------------|-------------|
| SAT | 38,2 ± 3,1 | 40,1 ± 7,5 | 39,9 ± 3,8 | 48,9 ± 13,4 |
| MONO | 32,9 ± 4,4 | 30,1 ± 6,1 | 40,3 ± 11,6 | 29,1 ± 21 |
| POLI | 29,0 ± 3,4 | 29,7 ± 6,7 | 19,8 ± 6,8 | 21,9 ± 19,8 |
| n-3 | 20,9 ± 2,9 | 23,6 ± 4,0 | 15,3 ± 2,6 | 19,0 ± 14,7 |
| n-6 | 8,1 ± 0,5 | 5,2 ± 1,8 | 4,5 ± 4,2 | 2,9 ± 5,1 |
| DHA/EPA | 1,1 ± 4,1 | 1,5 ± 2,8 | 1,4 ± 0,8 | 1,9 ± 1,8 |

ácidos grasos (Tukey, $P < 0,001$) que los machos y los huevos aislados (Tukey, $P < 0,01$). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de ácidos grasos de machos y huevos (Tukey, $P = 0,238$, Fig. 1). Al comparar las cantidades de ácidos grasos por categoría, sin considerar las fases, los ácidos grasos más abundantes, secuencialmente fueron el palmítico que presentó diferencias con todos los de su grupo (16:0, Tukey, $P < 0,01$), seguido por el esteárico (18:0) que presentó diferencias solo con el palmítico (16:0, Tukey $P < 0,01$), saturados, oleico (18:1n-9c) que presentó diferencias con el erúcido (22:1n-9, Tukey $P < 0,002$) y nervónico (24:1, Tukey $P < 0,003$), mono-insaturados. El docosahexaenoico (22:6n-3 Tukey, $P < 0,01$) y el eicosapentaenoico (20:5n-3 Tukey, $P < 0,01$) presentaron diferencias significativas con el ácido araquidónico (20:4n-6), altamente-insaturados y por ultimo el ácido linoleico (18:2n-6c) presentó diferencias con el ácido γ -linolénico (18:3n-6 γ Tukey, $P < 0,03$), eicosadienoico (20:2, Tukey, $P < 0,01$), poli-insaturados (Fig. 2).

Las diferencias entre los grupos analizados fueron calculadas con un tamaño muestral bajo ($n=3$), que responde a las limitaciones de los costos de uso cromatográfico y reactivos. No obstante, desde el punto de vista estadístico y del conocimiento *a priori* de los patrones de ácidos grasos de este grupo de organismos, con diferencias importantes y baja variabilidad, permiten comparar los grupos e inferir sobre las diferencias observadas.

DISCUSIÓN

Las categorías de ácidos grasos más abundantes en *T. angulatus*, según composiciones relativas (% de área) y concentraciones absolutas (ng ind^{-1}), fueron los saturados y mono-insaturados (Tabla 1, Fig. 1),

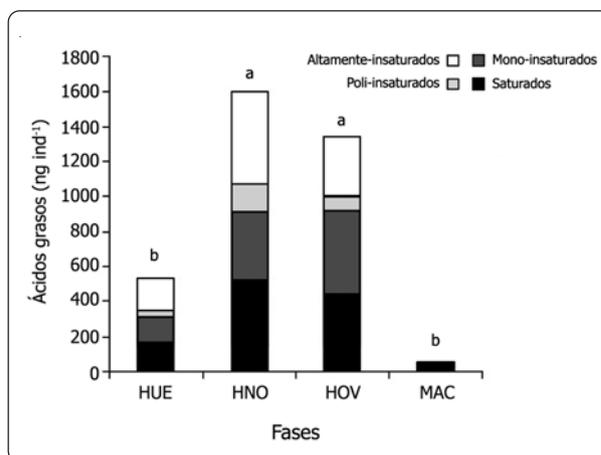


Figura 1. Cantidad promedio total de los ácidos grasos por fase de desarrollo de *Tigriopus angulatus* (abreviaciones como en Tabla 1); a vs b estadísticamente distintos ($P < 0,001$) / Total average quantity of fatty acids by group in each development phase of *Tigriopus angulatus* (abbreviations as in Table 1); a vs b are statistically different ($P < 0,001$)

específicamente los ácidos palmítico, esteárico y oleico, respectivamente (Fig. 2). La importancia de los ácidos grasos palmítico (16:0) y esteárico (18:0) radica en que son precursores de cadenas de 20 carbonos con o sin alguna insaturación, que participan en la estructuración de triglicéridos y ceras esterificadas. Estas estructuras son utilizadas como reserva energética y acumuladas en forma de gotas oleosas y sacos de aceite durante la primavera y verano, para luego ser utilizadas como energía durante el otoño e invierno (Hagen & Auel 2001). En el zooplancton marino estas estructuras se encuentran asociadas a ovocitos o al intestino (Lee *et al.* 2006), y son de fácil degradación y síntesis, por lo que podrían suplir requerimientos energéticos inmediatos para el metabolismo y/o expansión térmica de *T. angulatus*. Por otro lado el ácido oleico (18:1n-9c) es conocido como 'esencial' debido a que no es sintetizado por consumidores terciarios por lo que su presencia en el ítem presa es fundamental para el crecimiento de larvas y adultos de especies pelágicas de vertebrados marinos.

Las categorías de ácidos grasos presentes en menores composiciones relativas (% de área) y concentraciones absolutas (ng ind^{-1}) fueron los altamente-insaturados y poli-insaturados (Tabla 1 y Fig. 1), específicamente los ácidos docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y linoleico (18:2n-6) fueron mas abundantes. Los ácidos docosahexaenoico y eicosapentaenoico de la familia omega 3, son necesarios en la formación de estructuras más complejas como fosfolípidos de membranas celulares, específicamente la fosfatidilcolina,

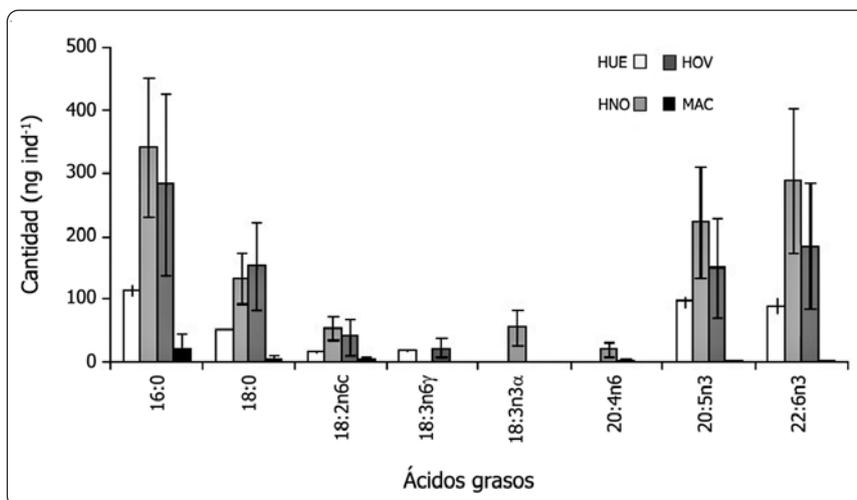


Figura 2. Cantidad promedio (\pm desviación estándar) de ácidos grasos más abundantes en cada fase de desarrollo de *Tigriopus angulatus* (abreviaciones en Table 1) / Average quantity (\pm standard deviation) of the most abundant fatty acids in each development phase of *Tigriopus angulatus* (abbreviations as in Table 1)

que presenta una cadena saturada y dos cadenas insaturadas de ácidos grasos que pueden ser el DHA y/o EPA (Hagen & Auel 2001, Lee *et al.* 2006). Los porcentajes de ácidos grasos de la familia omega 3 de mayor abundancia en las diferentes fases fueron $20,9 \pm 2,9\%$ y $23,6 \pm 4,0\%$ (HUE y HNO, respectivamente, Tabla 2). Estos porcentajes son intermedios si se comparan con aquellos de copépodos calanoideos subantárticos y antárticos, los que varían entre un rango de 8% en *Neocalanus tonsus* a 69% en *Calanoides acutus*, respectivamente. Es interesante notar que estos calanidos de altas latitudes se alimentan de fitoplancton y pequeños zooplancteres marinos (Lee *et al.* 2006), pero las abundancias relativas de los omega 3 en *T. angulatus* resultan similares a otros copépodos como *Amonardia* sp. y *Tisbe* sp. alimentados con dietas enriquecidas ($19,9 \pm 4,7\%$ y $26,5 \pm 1,9\%$, respectivamente Nanton & Castell 1999).

La presencia de ácidos grasos de la familia de los omega 3 como el DHA y EPA (Tabla 1, Fig. 2) en huevos de *T. angulatus* sugiere que podrían estar ocurriendo actividades enzimáticas de elongación y desaturación del ácido α -linolénico (18:3n-3 α) para obtener como producto DHA y EPA, y/o que los ejemplares están consumiendo dinoflagelados y diatomeas que presentan DHA y EPA, respectivamente (Lee *et al.* 2006). Este patrón metabólico de biosíntesis de DHA y EPA ha sido observado en especies de los géneros *Amonardia* y *Tisbe*, que presentan las enzimas $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasa, sintetizadoras de cadenas de ácidos grasos altamente insaturadas (Nanton & Castell 1999). Alternativamente, los

dinoflagelados y diatomeas resultan importantes en la dieta del zooplancton marino debido a la alta concentración que exhiben de los omega 3 16:1n-7 y 20:5n-3 (EPA) y 18:4n-3 y 22:6n-3 (DHA), respectivamente. Estas observaciones deberán corroborarse realizando un análisis enzimático, complementado con un estudio de los ítems alimenticios de la especie y determinar si las algas ulvales u diatomeas, dinoflagelados o incluso pequeños zooplancteres que se encuentran en la poza son parte de su dieta. Un estudio de alimentación realizado en anfípodos permitió observar que la proporción entre ácidos grasos poli-insaturados y saturados puede ser utilizada como biomarcador a fin de conocer el tipo de alimentación del organismo (Maazouzi *et al.* 2007). Si la proporción esta marcada por ácidos grasos poli-insaturados implica que el organismo es carnívoro, mientras que si está influenciada por ácidos grasos saturados implica un herbívoro. Un mayor porcentaje del ácido graso palmítico sugiere que el organismo presenta una dieta herbívora y detritívora (Lee *et al.* 2006). De acuerdo a estos antecedentes, la población estudiada de *T. angulatus* presentaría una alimentación herbívora y detritívora debido a la mayor proporción de ácidos grasos saturados y a los altos porcentajes del ácido palmítico observados en este estudio. Es importante considerar que una serie de tiempo anual podría mostrar variabilidad en la proporción de ácidos grasos poli-insaturados con respecto a los ácidos grasos saturados debido a la temperatura ambiental o la disponibilidad de alimento (Maazouzi *et al.* 2007).

Los resultados de la cantidad de ácidos grasos por ejemplar indicaron que las hembras no ovígeras y las hembras ovígeras presentaron más ácidos grasos que los machos y los huevos (Fig. 1). Aún cuando estas observaciones se basaron en un número de replicas bajo, los supuestos asociados a la prueba análisis de la varianza se cumplen y las diferencias de magnitud del efecto son importantes, por lo cual el patrón en la concentración de ácidos grasos entre las fases de *T. angulatus* se podría repetir. Además, durante los períodos de reproducción las hembras tienen altos requerimientos de energía para generar biomasa, lo que se manifiesta en una acumulación de gotas oleosas (triglicéridos y ésteres de cera) y una vez ocurrida la oviposición, disminuye tanto el contenido lipídico como el volumen de las gotas oleosas que presentaban los copepoditos en el estado 5 (Fig. 1; comparar hembras HNO y HOV). Por lo tanto, la energía de las gotas oleosas se utiliza para gasto energético gonadal durante la acumulación del vitelo en los ovocitos, función que es facilitada por la proteína lipovitelina, como fue observado en *Calanoida* (Lee *et al.* 2006). Esta proteína se encuentra asociada con esferas de vitelo o gránulos dentro de los ovocitos y son utilizadas por los embriones zooplanctónicos en el desarrollo de membranas y hormonas (ver Fig. 1; comparar HNO y HUE) (Lee *et al.* 2006).

Los ácidos grasos esenciales 18:3n-3 α y 18:2n-6c y su precursor 18:1n-9c fueron detectados en cantidades importantes (Fig. 2), sugiriendo su presencia en la dieta de la población de *T. angulatus* analizada en este estudio. Esto resulta de interés ya que estos actúan como precursores de cadenas de ácidos grasos largas, altamente insaturadas, como el docosahexaenoico, eicosapentaenoico, ácidos grasos esenciales que no pueden ser sintetizados por las larvas de peces (Castell *et al.* 1994, McEvoy *et al.* 1998, Nanton & Castell 1999, Støttrup 2003). Del mismo modo, el contenido de ácidos grasos de la familia omega 3 y la relación DHA/EPA superior a 1 (Tabla 2) sugiere a *T. angulatus* como un recurso de interés para enriquecer nutritivamente las dietas actualmente utilizadas en cultivos de larvas de peces (Støttrup 2003).

Larvas de peces alimentadas con dietas basadas en copepodos presentan elevadas tasas de supervivencia y crecimiento que en controles alimentados con otros microcrustáceos, debido a los altos contenidos de ácidos grasos esenciales, *e.g.*, en *Hippoglossus hippoglossus* (McEvoy *et al.* 1998, Rønnestad *et al.* 1998), *Hippocampus subelongatus* (Payne & Rippingale 2000) y *Rivulus marmoratus* (Grageda *et al.* 2008). Futuros

estudios tendientes a evaluar este potencial deberán establecer perfiles de ácidos grasos en cultivos de *T. angulatus* con dietas enriquecidas, cuantificadas y en proporciones adecuadas como un próximo paso hacia el desarrollo de este copepodo como dieta para cultivos acuícolas.

AGRADECIMIENTOS

Paulina Fornes agradece en particular a la profesora Marcela Goddard por su colaboración en la confección del manuscrito, al personal del laboratorio QUIFAC, a la profesora Gloria Collantes del Laboratorio de Fisiología y al Dr. Nelson Valdivia por su apoyo en el manuscrito final y los análisis estadísticos.

LITERATURA CITADA

- Björnberg TKS. 1981.** Copepoda. En: Boltovskoy D (eds). Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino, pp 587-679. Publicación Especial, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata.
- Bligh EG & WJ Dyer. 1959.** Extraction of lipids in solution by the method of Bligh & Dyer. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Castell JD, JG Bell, DR Tocher & JR Sargent. 1994.** Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 128: 315-333.
- Goddard MR. 1993.** Poblaciones planctónicas de pozas de mareas sometidas a perturbaciones térmicas y salinas. Tesis de Magister, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, 157 pp.
- Grageda MVC, T Kotani, Y Sakakura & A Hagiwara. 2008.** Effect of feeding copepod and Artemia on early growth and behaviour of the self-fertilizing fish, *Rivulus marmoratus* under laboratory conditions. *Aquaculture* 281(1-4): 100-105.
- Hagen W & H Auel. 2001.** Seasonal adaptations and the role of lipids in oceanic zooplankton. *Zoology* 104(3-4): 313-326.
- Hickman CP, A Larson & LS Roberts. 2000.** Principios integrales de zoología, 921 pp. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Kahan D, G Uhlig, D Schwensen & L Horowitz. 1982.** A simple method for cultivating harpacticoid copepod and offering them to fish larvae. *Aquaculture* 26(3-4): 303-310.
- Ki JS, KW Lee, HG Park, S Chullasorn, HU Dahms & JS Lee. 2009.** Phylogeography of the copepod *Tigriopus japonicus* along the Northwest Pacific rim. *Journal of Plankton Research* 31(2): 209-221.
- Lee RF, W Hagen & G Kattner. 2006.** Lipid storage in marine

zooplankton. Marine Ecology Progress Series 307: 273-306.

Maazouzi C, G Mazzon, MS Izquierdo & JC Pihan. 2007. Fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: Feeding strategies and trophic links. Comparative Biochemistry and Physiology A 147: 868-875.

McEvoy LA, T Naess, JG Bell & O Lie. 1998. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. Aquaculture 163(3-4): 237-250.

Mujica AR, CU Carvajal & OE Miranda. 1995. Cultivo experimental de *Tigriopus* sp. (Copepoda: Harpacticoida). Investigaciones Marinas 23: 75-82.

Nanton DA & JD Castell. 1999. The effects of temperature and dietary fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as a live food for marine fish larvae. Aquaculture 175(1-2): 167-181.

Nelson DL & MM Cox. 2001. Lehninger, Principios de bioquímica, 1152 pp. Omega, Barcelona.

Pandey BD, A Hagiwara & Y Sakakura. 2008. Feeding

behavior, feed selectivity and growth studies of mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*, larvae using various live and formulated feeds. Environmental Biology of Fishes 82(4): 365-375.

Payne RF & RJ Rippingale. 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. Aquaculture 188(3-4): 353-361.

Rønnestad I, S Hellan & Ø Lie. 1998. Feeding *Artemia* to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. Aquaculture 165(1-2): 159-164.

Støttrup JG. 2003. Production and nutritional value of copepods. En: Støttrup JG & LA McEvoy (eds). Live feeds in marine aquaculture, pp. 145-205. Blackwell Science, Oxford.

Tennyson J & RS Winters. 2005. Fish and other marine products. En: Horwitz W & GW Latimer (eds). Official methods of analysis of A.O.A.C International, pp. 17-19. Association of Official Analytical Chemist, Gaithersburg.

Recibido el 18 de diciembre de 2009 y aceptado el 14 de septiembre de 2010