



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 300**

51 Int. Cl.:
A01K 61/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08151381 .4**

96 Fecha de presentación : **13.02.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2090160**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **Método para tratar quistes de *Artemia*.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2010

73 Titular/es: **INVE Technologies N.V.**
Hoogveld 93
9200 Dendermonde, BE

72 Inventor/es: **Rombaut, Geert;**
Van Nieuwenhove, Luciaan, Alex, Johan y
Naessens-Foucquaert, Eddy, Marie, Jules

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 347 300 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para tratar quistes de *Artemia*.

5 La presente invención se refiere a un método para tratar quistes, en particular quistes de *Artemia*, que se destinan a ser incubados en un medio de eclosión líquido para producir organismos alimenticios vivos, en particular nauplios de *Artemia*.

10 La producción de nauplios de *Artemia* como alimento vivo para peces y larvas de crustáceos se considera una operación esencial en las piscifactorías marinas. Las etapas de producción de los nauplios de *Artemia* normalmente incluyen la eclosión, separación, enriquecimiento, enjuague y cosecha, en tanto que se necesita un tamiz o concentrador/aparato de enjuague para cosechar y enjuagar los nauplios de *Artemia*. En realidad, un concentrador es un filtro, que se utiliza para separar el agua residual de los nauplios, para eliminar el exceso de agua de los nauplios después de la eclosión, a un volumen final adecuado para la distribución o almacenamiento, y para eliminar por lavado el recubrimiento aceitoso de los nauplios después del enriquecimiento.

Después de la eclosión, es necesario separar los nauplios de *Artemia* de los quistes no eclosionados y de las cáscaras vacías de los quistes, dado que estos quistes y cáscaras pueden causar grandes problemas en los tanques de las larvas. Por cierto, cuando el depredador lo ingiere, no puede digerirlos, por lo cual tienen el potencial de obstruirle los intestinos, causando la muerte de los peces en estado larval o de otros depredadores. En la mayoría de las piscifactorías, la separación se logra retirando el tubo de aireación del tanque de eclosión, permitiendo la separación de los diferentes objetos (nauplios de *Artemia*, quistes llenos y cáscaras vacías de los quistes) que se encuentran en el tanque de eclosión. Los nauplios de *Artemia* nadan libremente en el tanque de eclosión y se pueden acumular en el fondo, en la punta del cono de eclosión, utilizando la luz (los nauplios de *Artemia* son atraídos por la fuente de luz). Por otra parte, las cáscaras vacías de los quistes tienden a flotar, mientras que los quistes de *Artemia* llenos y no eclosionados tienden a hundirse. Estos últimos objetos pueden interferir con la calidad de los nauplios de *Artemia* después de cosechar los nauplios eclosionados. Cuando se encuentran muchos quistes (llenos o vacíos) entre los nauplios eclosionados de *Artemia*, se requiere de una etapa de separación extra para separar estos quistes de los nauplios de *Artemia*. Normalmente, se emplea un tamiz para retirar los quistes de los nauplios de *Artemia*, recogiendo los quistes en el tamiz. El tamiz se escoge de manera tal que los nauplios puedan pasar por el mismo y que los objetos tales como quistes se acumulen sobre el tamiz. En general, el tamaño de malla del tamiz es de aproximadamente 212 μm . Los nauplios en sí luego se recogen en un tamiz más fino. Normalmente se utiliza el método de doble tamiz: un primer tamiz retiene los quistes no eclosionados y un segundo tamiz que captura los nauplios. Este procedimiento de separación basado en el método de doble tamiz es un procedimiento delicado y que demanda tiempo.

Dependiendo de la relación quistes/nauplios de *Artemia* en la *Artemia* concentrada en la punta del tanque de eclosión, esta etapa de filtrado se puede hacer de manera eficiente o ineficiente. Cuanto más sean los quistes presentes, más rápido se tapan las mallas de filtrado. El taponamiento no sólo reduce la velocidad de flujo sino que también aumenta el riesgo de dañar los nauplios y, por lo tanto, esto se ha reconocido como un problema principal para el procedimiento de eclosión/separación. Para evitar el taponamiento, las partículas que estén sobre la malla de filtrado deben eliminarse efectivamente durante la filtración. En la práctica, se usa un chorro de agua para rociar los nauplios a través del filtro. La etapa de filtrado por cierto debe llevarse a cabo con bastante rapidez, dado que normalmente la aireación del tanque de eclosión se detiene para permitir que las cáscaras vacías de los quistes suban en el tanque de eclosión y que los nauplios se concentren en la parte del fondo. No debe permitirse que los nauplios se asienten durante demasiado tiempo en el punto del recipiente cónico, para evitar que mueran por falta de oxígeno.

Una de las soluciones empleadas en las piscifactorías para superar el problema de tener que separar los quistes no eclosionados de los nauplios consiste en desencapsular los quistes de *Artemia*. El desencapsulamiento de los quistes (es decir, la eliminación de la capa externa de la cáscara del quiste del embrión de la *Artemia*) es un procedimiento químico ampliamente conocido, desarrollado en los años setenta. El procedimiento clásico de desencapsulamiento consiste en disolver las cáscaras (coriones) de los quistes con NaOCl (hipoclorito de sodio), incorporando NaOH (para mantener un pH elevado) durante un período limitado. La capa externa del quiste se disuelve por oxidación. Tan pronto como finaliza la reacción exotérmica, los quistes descascarados deben neutralizarse de inmediato con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, para proteger a los embriones de la oxidación. Cuando el procedimiento de desencapsulamiento se lleva a cabo correctamente, la viabilidad de los embriones no se ve afectada, y estos pueden eclosionar en nauplios o ser deshidratados para su almacenamiento. El desencapsulamiento de los quistes elimina la necesidad de separar las cáscaras vacías de los quistes y los quistes no eclosionados. Sin embargo, los quistes no eclosionados y desencapsulados se hunden rápidamente en los tanques de larvas de peces o langostinos y pueden descomponerse y deteriorar el medio de cultivo, causando posiblemente enfermedades e infecciones bacterianas.

Aunque la mayoría de las piscifactorías aplican este procedimiento, una de las principales desventajas de dicho procedimiento de desencapsulamiento reside en que el agua residual puede contener niveles muy elevados de productos tóxicos y, por lo tanto, es muy difícil de purificar -por ejemplo, el agua residual puede contener altos niveles de COD, Cl y AOX. En la actualidad, es imposible llevar a cabo este procedimiento a gran escala debido a las inquietudes ambientales que surgen del desecho de estos productos químicos. Otra desventaja radica en que el proceso de desencapsulamiento requiere bastante mano de obra y, además, debe llevarse a cabo con precisión, pues de otro modo puede verse afectada la viabilidad de los quistes. Debido a la reacción exotérmica, el medio de desencapsulamiento tiene que enfriarse y el procedimiento de desencapsulamiento debe detenerse exactamente en el momento correcto, para

evitar la oxidación de los embriones en sí (véase, por ejemplo, la Publicación N.º 702 del SRAC [Southern Regional Aquaculture Center, Centro de Acuicultura Regional del Sur], de octubre de 2000 “*Artemia* Production for Marine Larval Fish Culture”, de Granvil D. Treece).

5 Por lo tanto, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un nuevo método que permita separar de manera efectiva los quistes no eclosionados y, opcionalmente, también las cáscaras vacías de los quistes, de los organismos alimenticios vivos que nadan libremente, en particular de los nauplios de *Artemia*, con menos riesgo de dañar o matar a los organismos alimenticios vivos que nadan libremente.

10 Con este propósito, el método de acuerdo con la invención se *caracteriza porque* comprende la etapa de aplicar partículas magnéticas sobre los quistes, lo cual hace posible atraer magnéticamente a dichos quistes, en particular en dicho medio de eclosión líquido.

Debido a la presencia de las partículas magnéticas sobre los quistes, pero no así sobre los organismos alimenticios vivos que nadan libremente, los cuales han eclosionado y salido de los quistes, estos últimos pueden ser atraídos magnéticamente y de este modo, pueden separarse efectivamente de estos organismos, sin dañar a los organismos alimenticios vivos. Por ejemplo, es posible aplicar un imán en el medio de eclosión para atraer a los quistes no eclosionados y las cáscaras vacías de los quistes, a fin de retirarlos del medio de eclosión, ya sea retirando el imán con los quistes y las cáscaras de los quistes adheridas a él del tanque de eclosión o retirando el medio de eclosión con los organismos alimenticios vivos que nadan libremente del tanque de eclosión, aunque conservando al mismo tiempo el imán en el tanque. En el último caso, el imán también se puede aplicar en o a la pared del tanque, para que los quistes no eclosionados y las cáscaras vacías de los quistes se adhieran a la pared del tanque. Alternativa o adicionalmente, el medio de eclosión también puede ser conducido, después de la etapa de eclosión, a través de un dispositivo separador, en particular un dispositivo de flujo directo, que contenga un imán que retenga a los quistes no eclosionados y a las cápsulas vacías de los quistes.

Por la frase partículas magnéticas debe entenderse partículas que son capaces de ser atraídas por un imán. Las partículas pueden hacerse así, de un material ferromagnético, un material ferrimagnético o incluso, de un material paramagnético (fuerte). Las partículas fabricadas en un material ferro magnético o ferrimagnético pueden magnetizarse, es decir, convertirse en imanes pequeños. En dicho caso, aunque todavía se prefiera usar imanes para atraer a los quistes o a las cáscaras de los quistes, los imanes podrían ser reemplazados por materiales magnéticos no magnetizados.

En una forma de realización preferida del método de acuerdo con la invención, las partículas magnéticas se aplican en forma de una suspensión líquida, en particular, en forma de una suspensión acuosa, sobre los quistes, preferiblemente cuando los quistes tienen una superficie seca, para que fluyan libremente. En otra forma de realización, las partículas magnéticas se aplican en forma de un polvo sobre los quistes. La frase “fluir libremente” en la presente memoria descriptiva se refiere a que los quistes no se conglomeran entre sí formando aglomeraciones pequeñas sino que están presentes como entidades individuales, que pueden verse fácilmente sobre un trozo de papel.

Se ha descubierto que, aun sin ningún adhesivo o recubrimiento adhesivo sobre las partículas magnéticas, éstas se adhieren a los quistes lo suficiente y permanecen adheridos a ellos en el medio de eclosión, para que después de la eclosión, tanto los quistes como las cáscaras vacías de los mismos puedan separarse por atracción magnética de los organismos alimenticios vivos que nadan libremente. Una ventaja de no tener que usar un adhesivo reside en que es mucho más fácil evitar que los quistes se agrupen entre sí. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de usar un adhesivo en el método de acuerdo con la invención. Por ejemplo, puede usarse un adhesivo, tal como la CMC (carboximetilcelulosa), que se disuelve cuando los quistes se introducen en el medio de eclosión.

En otra forma de realización preferida más del método de acuerdo con la invención, antes de ser aplicadas sobre los quistes, al menos el 90% en peso de las partículas magnéticas tienen un tamaño inferior a 10 μm , preferiblemente, inferior a 5 μm , más preferiblemente, inferior a 1 μm y lo más preferiblemente, inferior a 0,5 μm .

Una ventaja de esa forma de realización reside en que dichas partículas pequeñas se adhieren mejor a los quistes que las partículas de mayor tamaño. Una vez que recubren los quistes, las partículas magnéticas pueden formar depósitos más grandes (cristales) sobre los quistes, lo cual en particular puede deberse, parcialmente, a las fuerzas de atracción magnética entre las partículas magnéticas.

La invención también se refiere a quistes, en particular, a quistes de *Artemia*, que pueden obtenerse mediante el método de acuerdo con la invención. Estos quistes se *caracterizan porque* tienen partículas magnéticas aplicadas sobre su superficie exterior.

La invención finalmente también se refiere al uso de los quistes para producir organismos alimenticios vivos que nadan libremente, a partir de quistes de acuerdo con la invención, donde los quistes se incuban en un medio de eclosión, para que una porción de ellos eclosionen y libere organismos alimenticios vivos que nadan libremente, y donde los organismos alimenticios vivos que nadan libremente se separan de los quistes que no han eclosionado y de las cáscaras vacías de los quistes. De acuerdo con la invención, los quistes no eclosionados, que tienen partículas magnéticas aplicadas sobre su superficie exterior, se separan después de la etapa de incubación, por atracción magnética de los organismos alimenticios vivos que nadan libremente que no tienen partículas magnéticas aplicadas sobre su superficie exterior.

Otras particularidades y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción de algunas formas de realización particulares de los métodos y los quistes de acuerdo con la presente invención. Los numerales de referencia usados en esta descripción se refieren a los dibujos adjuntos, en los cuales:

La figura 1 muestra esquemáticamente un tanque de eclosión, en el cual hay un dispositivo con imanes para retirar quistes, cuyo propósito es el de separar a los quistes no eclosionados, de los nauplios producidos, después de la eclosión de los quistes.

Y la figura 2 muestra, en una mayor escala, una forma de realización de un dispositivo de flujo directo que permite separar magnéticamente a los quistes no eclosionados de los nauplios, conduciendo al medio de eclosión, después de la etapa de eclosión, a través de este dispositivo.

La presente invención tiene el propósito de proveer un nuevo y ventajoso método para separar quistes no eclosionados y opcionalmente, también las cáscaras vacías de los quistes, de los organismos alimenticios vivos que nadan libremente que han eclosionado y salido de los quistes. En particular, los quistes son quistes de *Artemia*, pero la invención también se puede aplicar a otros tipos de quistes. El término quiste, además, abarca no sólo a los embriones que están encerrados en una cáscara externa y que eclosionan relativamente rápido (en el transcurso de uno o dos días), sino que también abarca a los huevos en los que el embrión todavía debe desarrollarse, antes de poder eclosionar. Por lo tanto, la presente invención también es aplicable, por ejemplo, a los quistes (huevos) de otros animales acuáticos, como rotíferos, *Artemia* de agua dulce, etc. La principal aplicación de la presente invención es, sin embargo, los quistes de *Artemia*, de modo que la descripción proporcionada a continuación sólo se hará con referencia a dichos quistes de *Artemia* y a los nauplios que nadan libremente y que eclosionan y salen de los quistes de *Artemia*.

Los quistes de *Artemia* están disponibles en grandes cantidades por las líneas costeras de lagos hipersalinos, lagunas costeras y salinas solares dispersas en los cinco continentes. Después de la cosecha, los quistes se lavan y almacenan en una solución de salmuera, durante varios meses. Posteriormente, después de procesar (lavar/enjuagar con agua dulce), se secan hasta alcanzar un contenido de agua inferior al 15% en peso. Al incubar en agua de mar, estos quistes liberan nauplios que nadan libremente y que pueden suministrarse directamente a modo de comida, como una fuente nutritiva de alimento vivo, a las larvas de una variedad de organismos marinos, como así también de aguas dulces, lo cual los convierte en un alimento vivo altamente conveniente y que requiere el mínimo de mano de obra para la acuicultura.

Un ejemplo de un recipiente 1 que puede utilizarse para eclosionar los quistes de *Artemia* se ilustra en la figura 1. Los mejores resultados de eclosión se consiguen en la práctica en un recipiente 1, que tiene una pared 2, la cual forma un fondo cónico 3 y que se airea desde el fondo. Los tanques de base cilíndrica o cuadrada tienen puntos muertos en los que se acumulan los quistes de *Artemia* y los nauplios y adolecen de carencia de oxígeno. Los recipientes transparentes o translúcidos facilitan la inspección de la suspensión de eclosión, en especial, en el momento de cosechar. Además, el recipiente 1 puede estar equipado con al menos una fuente de luz 4, que está ubicada en la parte del fondo cónico, a fin de atraer a los nauplios hacia el fondo antes de cosecharlos.

Después de la eclosión de los quistes en el recipiente 1, la aeración se detiene, para que la mayoría de los quistes no eclosionados se deposite en el fondo 3 y que la mayoría de las cáscaras vacías de los quistes floten hacia la superficie del medio de eclosión. El recipiente 1 está equipado en el fondo con una salida 5, para que el medio de eclosión que contiene los nauplios que nadan libremente pueda ser vaciado sobre un tamiz. Para evitar tener que tamizar los quistes no eclosionados del medio de eclosión o para reducir la cantidad de quistes no eclosionados que tienen que tamizarse del medio de eclosión, ahora se usa un método de separación magnética.

De acuerdo con la presente invención, los quistes introducidos en el medio de eclosión están provistos de partículas magnéticas sobre su superficie exterior. De esta manera, los quistes no eclosionados y las cáscaras vacías de los quistes pueden separarse por atracción magnética de los nauplios que nadan libremente, los cuales han eclosionado y salido de los quistes y no contienen partículas magnéticas. Esta separación se puede realizar de diferentes maneras.

Después de la etapa de eclosión, un dispositivo para retirar los quistes 6, que comprende uno o más imanes 7 puede bajarse por el medio de eclosión, para que los quistes no eclosionados y las cáscaras vacías de los mismos sean atraídos por este dispositivo 6 y se peguen a los imanes 7. Para poder retirar también los quistes no eclosionados que se encuentran situados en la parte del fondo del recipiente, el medio de eclosión puede hacerse circular desde el fondo del recipiente hacia la parte superior del mismo. De esta manera, serán menos los quistes no eclosionados que lleguen al tamiz de quistes para que, cuando la separación magnética sea lo suficientemente eficiente, ya no sea necesario tamizar ningún quiste no eclosionado retirándolo del medio de eclosión.

En lugar de hacer bajar un dispositivo para retirar los quistes 6 por el recipiente de eclosión -o además de ello- también es posible equipar a la pared del recipiente de eclosión 1 -en particular, al fondo cónico 3 del mismo- con uno o más imanes 8. De esta manera, al vaciar el recipiente 1 por la salida 5, los quistes no eclosionados y las cáscaras vacías de los quistes se pegarán a la pared del recipiente 1 en el lugar donde se encuentran los imanes 8.

Durante la incubación de los quistes en el medio de eclosión, los imanes 8 preferiblemente deben ser retirados para que los quistes se distribuyan de un modo más uniforme en el medio de eclosión por el aire introducido allí. Cuando los imanes 8 no son imanes permanentes sino electroimanes 8, también se puede interrumpir la corriente eléctrica, en

ES 2 347 300 T3

lugar de retirar los imanes. Los imanes 7 del dispositivo para retirar los quistes 6, el cual se hace bajar por el medio de eclosión, también pueden ser electroimanes, aunque preferiblemente son imanes permanentes, a fin de reducir un peligro eléctrico.

5 En lugar o además de separar los quistes no eclosionados magnéticamente en el recipiente de eclosión propiamente dicho, los quistes no eclosionados y las cáscaras vacías de los quistes pueden separarse de los nauplios en un dispositivo de flujo directo, en el cual el medio de eclosión se guía por al menos un imán, para que los quistes no eclosionados y toda cáscara vacía de los quistes se peguen al imán, mientras que los nauplios no son atraídos y pasan por el imán. Un ejemplo de dicho dispositivo de flujo directo se ilustra esquemáticamente en la figura 2. El mismo comprende una
10 cámara alargada 9, que tiene una entrada 10 y una salida 11. La cámara alargada 9 está rellena de lana de acero 12, de acero inoxidable de grado magnético (o de otra lana ferromagnética resistente a la corrosión) y está rodeada por una bobina eléctrica 13, para que pueda generarse un campo magnético en la cámara alargada 9. La lana de acero 12 puede magnetizarse así para que forme imanes que atraigan a los quistes no eclosionados o a las cáscaras vacías de los quistes cargados con las partículas magnéticas. Debido a la gran área superficial de la lana de acero 12, hay una
15 gran superficie disponible para retener los quistes no eclosionados o las cáscaras vacías de los quistes a fin de que el dispositivo de flujo directo pueda fabricarse en un tamaño bastante compacto. Pueden hallarse más detalles sobre dicho dispositivo de separación magnética en el documento de patente de los Estados Unidos, con el número US 3.676.337, que se incorpora en la presente por referencia.

20 Tal como se ha descrito en la presente con anterioridad, una característica esencial de la presente invención reside en que los quistes están provistos de partículas magnéticas sobre su superficie exterior. Los presentes inventores han hallado que al aplicar las partículas magnéticas sobre los quistes, los quistes no eclosionados y las cáscaras vacías de los mismos no sólo pueden ser separados eficientemente de los nauplios producidos sino que también, lo más importante es que los quistes también se pueden recubrir de manera económica con la cantidad requerida de partículas
25 magnéticas.

Las partículas magnéticas pueden aplicarse en forma de un polvo sobre los quistes. En este caso, los quistes tienen preferiblemente una superficie mojada (no fluyen libremente) cuando se aplica el polvo sobre ellos, de modo que las partículas magnéticas se adhieran mejor a los quistes. El polvo, en particular se puede aplicar sobre los quistes
30 después de haber retirado los quistes de la solución de salmuera, pero antes de secarlos, para que todavía tengan la superficie mojada. De esta manera, los quistes deben secarse sólo una vez, en particular hasta alcanzar un contenido de agua inferior a 25% en peso, preferiblemente, hasta alcanzar un contenido de agua inferior a 20% en peso y más preferiblemente, hasta alcanzar un contenido de agua inferior a 15% en peso.

35 Como una suspensión líquida se puede aplicar con mayor facilidad, las partículas magnéticas se aplican preferiblemente a los quistes en forma de una suspensión líquida. Las partículas magnéticas pueden estar suspendidas en un solvente orgánico, por ejemplo, en un aceite vegetal o en etanol, pero preferiblemente están suspendidas en un medio acuoso para lograr una suspensión acuosa. Esta suspensión puede aplicarse -en particular, puede rociarse- según se ha descrito en la presente anteriormente, sobre los quistes mojados antes de secarlos, hasta alcanzar los contenidos de
40 agua antes descritos, o pueden rociarse sobre los quistes secos, que fluyen libremente. Cuando se usa una suspensión acuosa, la superficie de los quistes secos se moja, pero el agua es absorbida con bastante rapidez por los quistes secos, de manera que al agitar los quistes estos readquieren rápidamente su condición de fluir libremente. Cuando los quistes están lo suficientemente secos y cuando se usa una cantidad suficientemente pequeña de suspensión acuosa, el contenido de agua (interno) del quiste tratado puede permanecer por debajo del 25% en peso, preferiblemente, por
45 debajo del 20% en peso o incluso, por debajo del 15% en peso. Sin embargo, después de haber aplicado la suspensión acuosa, los quistes pueden volver a secarse para alcanzar estos bajos contenidos de agua. Una ventaja de estos bajos contenidos de agua reside en que, después de haber aplicado las partículas magnéticas, los quistes pueden envasarse y almacenarse como es habitual, durante varios meses antes de usarlos. Otra ventaja de secar los quistes nuevamente consiste en que las partículas magnéticas se adhieren aparentemente con mayor firmeza a los quistes, dado que la
50 separación magnética fue más efectiva al secar los quistes primero, antes de introducirlos en el medio de eclosión.

En lugar de aplicar partículas magnéticas preformadas sobre los quistes, las partículas magnéticas también pueden formarse *in situ* sobre los quistes; por ejemplo, en forma de un revestimiento. En la presente memoria descriptiva y reivindicaciones también debe considerarse que el revestimiento de material magnético son partículas magnéticas que
55 se aplican a los quistes, pues el revestimiento, aun cuando es continuo, de todos modos debe ser más bien quebradizo y debe poder romperse fácilmente en partículas magnéticas, para permitir la eclosión de los quistes. Tal como se describe en el documento de patente con el número WO 04/057952, las cáscaras de los quistes pueden reaccionar con permanganato (en particular, con permanganato de potasio) para producir una capa de dióxido de manganeso sobre los quistes. En el documento de patente con el número WO 04/057952, esta capa de dióxido de manganeso posteriormente
60 se retiraba para obtener los quistes desencapsulados, aunque de acuerdo con la presente invención, la capa de dióxido de manganeso no tiene que ser retirada sino que se puede usar para separar los quistes y las cáscaras de los quistes magnéticamente de los nauplios producidos.

Las partículas magnéticas pueden estar hechas de materiales ferromagnéticos, ferrimagnéticos o incluso, de materiales paramagnéticos. Sin embargo, se prefieren los materiales ferromagnéticos y materiales ferrimagnéticos porque necesitan campos magnéticos más pequeños para lograr las fuerzas magnéticas requeridas con el propósito de separar los quistes y cáscaras de los quistes de los nauplios. Las partículas magnéticas comprenden, preferiblemente, un óxido de uno o más metales de transición, en particular, uno o más óxidos seleccionados del grupo que consiste en CrO_2 (óxi-

ES 2 347 300 T3

do de cromo (IV)), CoFe_2O_4 (ferrita de cobalto), CuFe_2O_4 (ferrita de cobre), $\text{Dy}_3\text{Fe}_5\text{O}_{12}$ (ferrogranate de disprosio), DyFeO_3 (ortoferrita de disprosio), ErFeO_3 (ortoferrita de erbio), $\text{Fe}_5\text{Gd}_3\text{O}_{12}$ (ferrogranate de gadolinio), $\text{Fe}_5\text{Ho}_3\text{O}_{12}$ (granate de hierro-holmio), FeMnNiO_4 (óxido de manganeso de hierro-níquel), Fe_2O_3 (magemita), Fe_3O_4 (magnetita), Fe_2O_3 (hematita), FeLaO_3 (ferrita de lantano), MgFe_2O_4 (ferrita de magnesio), Fe_2MnO_4 (ferrita de manganeso), MnO_2 (dióxido de manganeso), $\text{Nd}_2\text{O}_7\text{Ti}_2$ (dititanato de neodimio), $\text{Al}_{0.2}\text{Fe}_{1.8}\text{NiO}_4$ (ferrita de aluminio-níquel), $\text{Fe}_2\text{Ni}_{0.5}\text{O}_4\text{Zn}_{0.5}$ (ferrita de níquel-zinc), $\text{Fe}_2\text{Ni}_{0.4}\text{O}_4\text{Zn}_{0.6}$ (ferrita de níquel-zinc), $\text{Fe}_2\text{Ni}_{0.8}\text{O}_4\text{Zn}_{0.2}$ (ferrita de níquel-zinc), NiO (óxido de níquel (II)), Fe_2NiO_4 (ferrita de níquel), $\text{Fe}_5\text{O}_{12}\text{Sm}_3$ (ferrogranate de samario), $\text{Ag}_{0.5}\text{Fe}_{12}\text{La}_{0.5}\text{O}_{19}$ (ferrita de plata-lantano), $\text{Fe}_5\text{O}_{12}\text{Y}_3$ (granate de itrio-hierro) y FeO_3Y (ortoferrita de itrio). Las partículas magnéticas, preferiblemente, comprenden Fe_2O_3 (hematita o magnemita), MnO_2 (dióxido de manganeso) o una ferrita, preferiblemente, Fe_3O_4 (magnetita). La magnetita es la que más se prefiere, en vista de sus fuertes propiedades magnéticas.

Antes de que se las aplique sobre los quistes, las partículas magnéticas empleadas para recubrir los quistes, preferiblemente son tan pequeñas que al menos el 90% en peso de ellas tiene un tamaño menor que $10\text{ }\mu\text{m}$, preferiblemente, menor que $5\text{ }\mu\text{m}$, más preferiblemente, menor que $1\text{ }\mu\text{m}$ y, lo más preferiblemente, menor que $0,5\text{ }\mu\text{m}$. Cuanto más pequeñas sean las partículas, mejor se adhieren a los quistes, sin tener que emplear un adhesivo. Además, las partículas más pequeñas dan como resultado una suspensión más estable, en especial cuando no se usa estabilizador (tensioactivo) para preparar la suspensión. Después de que las partículas magnéticas se aplican sobre los quistes, estos pueden tener un tamaño mayor. En las vistas microscópicas de los quistes recubiertos, puede verse por cierto que las partículas magnéticas se han acumulado sobre la superficie de los quistes para formar agrupaciones/cristales de mayor tamaño. Esto puede explicarse, posiblemente, por el hecho de que el agua se retira de la suspensión para que se formen cristales más grandes, pero especialmente también, por el hecho de que las partículas magnéticas pueden atraerse magnéticamente entre sí para formar conglomerados/agrupaciones más grandes.

El polvo de material magnético puede obtenerse moliendo el material magnético. Este polvo puede mezclarse posteriormente con agua, para obtener una suspensión acuosa. Una desventaja de este método de molienda método consiste en que tarda bastante en lograr un polvo fino y que el tamaño de partícula no es muy uniforme. Además, es difícil lograr tamaños de partícula muy pequeños.

En la práctica, existen los denominados ferrofluidos, que se pueden definir como suspensiones coloidales estables de partículas ferromagnéticas o ferrimagnéticas. Tal como se describe en el documento de patente de los Estados Unidos con el número US 4.329.241, dichos ferrofluidos pueden obtenerse por ejemplo, moliendo la ferrita durante varias semanas, en presencia de querosén o de ácido oleico, hasta que las partículas sean lo suficientemente pequeñas (en el orden de magnitud de los 10 nm) para permitir la estabilización de la suspensión por el movimiento Browniano. Sin embargo, este procedimiento es bastante costoso. Un método más económico consiste en la precipitación de magnetita coloidal haciendo reaccionar las soluciones de sales ferrosas y férricas con sustancias alcalinas, tales como hidróxido de sodio o una solución de amoníaco. El tamaño de partícula puede controlarse por agitación. Cuando se agita en forma suficientemente vigorosa, el tamaño de partículas puede incluso ser menor que 10 nm . Para lograr un ferrofluido estable, es posible aplicar un revestimiento de un agente de suspensión sobre las partículas magnéticas. Los métodos para producir dichos ferrofluidos se describen, por ejemplo, en los documentos de patente de los Estados Unidos, con los siguientes números: US 4.329.241, US 4.906.382, US 5.240.626, US 6.120.856, US 6.277.298, US 6.068.785 y WO 91/02083.

En el método de acuerdo con la presente invención, es posible usar estos ferrofluidos estables para aplicar las partículas magnéticas sobre los quistes. Sin embargo, se ha descubierto que también se pueden usar suspensiones más baratas, a saber, suspensiones que se hacen sin usar ningún agente de dispersión y que no son estables pero que se asientan en cuestión de minutos. Una suspensión de partículas de magnetita puede hacerse fácilmente como se ha descrito en la presente con anterioridad, permitiendo que las sales ferrosas y férricas reaccionen en condiciones alcalinas en un medio acuoso, para que se formen partículas de magnetita, cuyo tamaño se pueden controlar agitando el medio acuoso. Esta suspensión puede rociarse sobre los quistes, en particular, sobre los quistes secos. Se ha descubierto que independientemente del hecho de que las partículas magnéticas no estén recubiertas con un tensioactivo, o con sustancias de unión específicas, según se describe en el documento de patente con el número WO 91/02083, se adhieren lo suficientemente bien a los quistes. El método de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo de este modo, con materiales baratos y en una manera relativamente simple, para que permita convertir, en particular, quistes de menor calidad (alto porcentaje de separación, según se determina mediante el método de separación general que se describe en la presente, sin el uso de un imán) en un producto valioso. El tratamiento de acuerdo con la presente invención permite, por cierto, retirar los quistes no eclosionados fácilmente de los nauplios que se usan como organismos alimenticios vivos.

Las partículas magnéticas se aplican, preferiblemente, sobre los quistes en una cantidad de al menos $0,75$, preferiblemente de al menos $1,0$, más preferiblemente, de al menos $1,5$ y lo más preferiblemente, de al menos $2,0\text{ mg/g}$ de materia seca del quiste. Las pruebas han demostrado que con estas cantidades, los quistes no eclosionados pueden atraerse efectivamente y de este modo, separarse de los nauplios por medio de un imán. La cantidad de partículas magnéticas suministradas sobre los quistes es, preferiblemente, menor que 200 , más preferiblemente, menor que 100 y lo más preferiblemente, menor que 50 mg/g de materia seca del quiste. En la práctica, los quistes incluso podrían atraerse efectivamente cuando esta cantidad partículas magnéticas fuera menor que 20 y, en particular, incluso menor que 15 mg/g de materia seca del quiste.

Una suspensión acuosa de partículas de magnetita preparada dejando que reaccionen el cloruro ferroso ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) entre sí, en presencia de hidróxido de sodio (NaOH) puede dar como resultado, al usar soluciones saturadas, una suspensión que contenga alrededor de 100 g/l partículas de magnetita. Cuando se rocía y/o mezcla dicha suspensión sobre los quistes secos, es absorbida de inmediato por los quistes. Así, se eleva el contenido de agua de los quistes, pero sólo hasta un punto limitado, por ejemplo, del 10% al 20%, para que los quistes permanezcan latentes y de este modo, puedan almacenarse. Para el almacenamiento prolongado, los quistes, preferiblemente, vuelven a secarse. La suspensión producida se puede concentrar fácilmente permitiendo que las partículas magnéticas se asienten y eliminando una parte del líquido sobrenadante. Sin embargo, la concentración de partículas magnéticas se mantiene preferiblemente, por debajo de los 200 g/l, más preferiblemente, por debajo de los 150 g/l, para permitir pulverizar la suspensión fácilmente sobre los quistes. La concentración de partículas magnéticas en la suspensión aplicada sobre los quistes es preferiblemente mayor que 5 g/l, más preferiblemente, mayor que 10 g/l y lo más preferiblemente, mayor que 20 g/l para limitar el incremento del contenido de agua de los quistes tratados.

Ejemplos

Todos los reactivos y productos químicos usados en estos experimentos eran de grado analítico y se obtuvieron en Sigma Aldrich (Bélgica). Se preparó una suspensión de magnetita (MS, *magnetite suspension*) mezclando tetrahidrato de cloruro ferroso ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), hexahidrato de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sodio (NaOH) y agua, en una relación de 1:2:2:10 mientras se agitaba/con agitación. Esta mezcla dio como resultado la formación de nanopartículas de Fe_3O_4 suspendidas. La preparación elaborada de esta manera contenía aproximadamente 0,1 g de Fe_3O_4 /ml.

Se suspendió magnetita en polvo (óxido de hierro (II,III), de Sigma Aldrich, polvo $<5 \mu\text{m}$) (MP, *magnetite powder*) en agua, antes de recubrir los quistes con él.

Para recubrir las partículas de magnetita mediante el método de esta invención, se mezclaron alícuotas de 5 ml de diversas concentraciones de varios materiales de revestimiento (MS y MP) con 50 g de diferentes tipos de quistes (el contenido de humedad de los quistes era de + 10%). Mediante una inspección visual de los quistes, se observó un resultado positivo del revestimiento.

Se usaron conos de un litro, en los cuales se incubaron 2 g de quistes de *Artemia* en agua marina artificial (25 g/L), preferiblemente durante 24 horas (pero no limitado a ello). La temperatura del agua en los conos se mantuvo constante, alrededor de los 30°C; el agua se aireó e iluminó constantemente. El criterio aplicado para determinar si los quistes se habían recubierto lo suficiente fue determinar la cantidad de quistes y cáscaras de quistes respecto de la cantidad total de quistes, cáscaras de quistes, nauplios en estadio de “parasol” (*umbrella*) y eclosionados. Más adelante en el texto, este número se presenta como “porcentaje de separación”.

Para determinar el porcentaje de separación, los imanes se suspendieron en el medio de eclosión, en un cono de 1 litro, aproximadamente a 5 cm del fondo del cono (es decir, en la marca de los 20-30 ml). La aireación se detuvo y el tubo de aireación se retiró. Después de 30 segundos, 30 ml del medio de eclosión, que contenía nauplios de *Artemia*, quistes en estadio de “parasol”, quistes no eclosionados y cáscaras vacías de los quistes se recogieron y volvieron a transferirse en el cono de cría, usando un sifón que se colocó en el fondo del cono de cría. Después de 2 minutos -período para el cual el material magnético se había acumulado en los imanes- se retiraron otros 200 ml del medio de eclosión, usando el sifón y se transfirieron a un nuevo recipiente. Posteriormente, se adicionaron 800 ml de agua marina artificial al nuevo cono, para aumentar el volumen hasta 1 litro. Se tomaron unas muestras para determinar el porcentaje de separación.

El efecto de la dosis de la MS y MP sobre el porcentaje de separación se ilustra en las tablas 1 y 2. Con las diferentes dosis de magnetita se recubrieron los quistes del lote 1 (tabla 1) y del lote 2 (tabla 2), de acuerdo con el método de la invención, como una solución de MS o MP. Cada tratamiento se evaluó por triplicado, siendo el resultado del tratamiento el promedio de los triplicados. De la tabla resulta evidente que, en este ejemplo, el recubrimiento de los quistes del lote 1, con 4,5 mg de Fe_3O_4 /g de peso seco de los quistes de MS dio el menor porcentaje de separación de todos, del 4%, mientras que el porcentaje de separación de los quistes no tratados fue del 22%.

Lo más importante es que, a una concentración de 1,5 mg de Fe_3O_4 /g de quistes, el porcentaje de separación ya se reduce considerablemente al 14%. A concentraciones de 3 mg de Fe_3O_4 /g de quistes, el porcentaje de separación parece ser menor que 7% y esto permanece por debajo de 7% cuando se introducen mayores cantidades de MS. Lo más importante es que a una concentración superior a 4,5 mg de Fe_3O_4 /g peso seco de los quistes usando MS para recubrir los quistes, el porcentaje de separación no se redujo más.

En el caso de la MP, hubo una clara mejoría del porcentaje de separación, comenzando del 22% a un mínimo del 8%. Para el lote 1, se alcanzó un porcentaje mínimo de separación del 8% cuando los quistes se recubrieron con 7,8 mg de Fe_3O_4 /g de peso seco de los quistes. Lo más importante es que a una concentración de 4,4 mg de Fe_3O_4 /g de quistes, el porcentaje de separación ya se redujo considerablemente, a 15%. Para el lote 2, el porcentaje de separación de partida fue de 8% a 10%. Este porcentaje de separación mejora a un mínimo del 1% al 0% con la adición de MS y MP. Sin embargo, con la adición de MP, gran parte de las partículas de magnetita no se unió completamente a los quistes y se liberaron hacia el medio de eclosión durante la eclosión.

ES 2 347 300 T3

La tabla 3 ilustra el efecto de secar los quistes recubiertos sobre el porcentaje de separación de los quistes recubiertos con MS. Los quistes del lote 1, recubiertos de acuerdo con la metodología de la invención, se secaron hasta alcanzar su contenido de humedad original del 10%. Se midió el porcentaje de separación de ambas muestras, es decir, antes de secar (20% del contenido de humedad) y después de secar (10% del contenido de humedad). Aparentemente, fue posible mejorar el porcentaje de separación de los quistes recubiertos con Fe_3O_4 secando los quistes. Se observó que los quistes recubiertos con Fe_3O_4 y posteriormente secados eran atraídos con mucha mayor rapidez por los imanes suspendidos en el medio de eclosión que los quistes recubiertos que no se habían secado.

TABLA 1

Efecto de la dosis de MS y MP después del revestimiento sobre los quistes del lote 1, sobre el porcentaje de separación

Quistes	Suspensión de magnetita	Mg de Fe_3O_4 /g de peso seco de los quistes	Porcentaje de separación
Lote 1	MS	0,00 mg	22%
Lote 1	MS	0,75 mg	19%
Lote 1	MS	1,50 mg	14%
Lote 1	MS	3,00 mg	6%
Lote 1	MS	4,00 mg	7%
Lote 1	MS	4,50 mg	4%
Lote 1	MS	6,00 mg	4%
Lote 1	MS	7,50 mg	5%
Lote 1	MS	10,00 mg	6%
Lote 1	MS	12,50 mg	6%
Lote 1	MP	0,00 mg	22%
Lote 1	MP	4,40 mg	15%
Lote 1	MP	6,00 mg	10%
Lote 1	MP	7,80 mg	8%

ES 2 347 300 T3

TABLA 2

Efecto de la dosis de MS y MP después del revestimiento sobre los quistes del lote 2, sobre el porcentaje de separación

Quistes	Suspensión de magnetita	Mg de Fe_3O_4 /g de peso seco de los quistes	Porcentaje de separación
Lote 2	MS	0,00 mg	8%
Lote 2	MS	7,50 mg	1%
Lote 2	MS	10,00 mg	1%
Lote 2	MS	12,50 mg	1%
Lote 2	MP	0,00 mg	10%
Lote 2	MP	5,80 mg	1%
Lote 2	MP	6,10 mg	1%
Lote 2	MP	7,30 mg	0%
Lote 2	MP	7,60 mg	1%

TABLA 3

Efecto del secado sobre el porcentaje de separación de los quistes del lote 1, recubiertos con MS

Quistes	Suspensión de magnetita	Mg de Fe_3O_4 /g de quiste	Separación	Contenido de agua
Lote 1	MS	0 mg	22%	10%
Lote 1	MS	10 mg	6%	20%
Lote 1	MS	10 mg	0,4%	10%

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar quistes, en particular quistes de *Artemia*, destinados a ser incubados en un medio de
eclosión líquido, para producir organismos alimenticios vivos, **caracterizado** porque el método comprende la etapa
de aplicar partículas magnéticas sobre los quistes, permitiendo atraer magnéticamente a dichos quistes, en particular,
en el citado medio de eclosión líquido.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque dichas partículas magnéticas se aplican en
forma de una suspensión líquida, en particular, en forma de una suspensión acuosa, sobre los quistes, preferiblemente,
cuando los quistes tienen una superficie seca para que fluyen libremente.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque las citadas partículas magnéticas se aplican
en forma de un polvo sobre los quistes.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque, después de haber
aplicado las mencionadas partículas magnéticas sobre los quistes, los quistes tienen un contenido de agua menor que
25% en peso, preferiblemente, menor que 20% en peso o porque se secan hasta alcanzar un contenido de agua menor
que 25% en peso, preferiblemente, menor que 20% en peso y más preferiblemente, menor que 15% en peso.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque antes de aplicarse
sobre los quistes, al menos el 90% en peso de dichas partículas magnéticas tienen un tamaño menor que 10 μm ,
preferiblemente menor que 5 μm , más preferiblemente, menor que 1 μm y, lo más preferiblemente, menor que 0,5 μm .
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque dichas partícu-
las magnéticas comprenden un material ferromagnético, un ferrimagnético o un paramagnético, donde las partículas
magnéticas comprende, preferiblemente, un óxido de uno o más metales de transición, en particular Fe_2O_3 (hematita
o magnemita), MnO_2 (dióxido de manganeso) o una ferrita, preferiblemente Fe_3O_4 (magnetita).
7. Los quistes, en particular, los quistes de *Artemia*, que pueden obtenerse mediante un método de acuerdo con
una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizados** porque los quistes tienen partículas magnéticas
aplicadas sobre su superficie exterior.
8. Los quistes de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizados** porque los quistes comprenden dichas partículas
magnéticas en una cantidad de al menos 0,75, preferiblemente, de al menos 1,0, más preferiblemente, de al menos 1,5
y, lo más preferiblemente, de al menos 2,0 mg/g de materia seca de los quistes.
9. Los quistes de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizados** porque dichas partículas magnéticas comprenden
un material ferromagnético, un material ferrimagnético o paramagnético, donde las partículas magnéticas comprende,
preferiblemente, un óxido de uno o más metales de transición, en particular Fe_2O_3 (hematita o magnemita), MnO_2
(dióxido manganeso) o una ferrita, preferiblemente, Fe_3O_4 (magnetita).
10. El uso de los quistes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para producir organismos
alimenticios vivos que nadan libremente, uso que comprende la etapa de incubar los quistes en un medio de eclosión,
para que una parte de los quistes eclosionen y libere organismos alimenticios vivos que nadan libremente, y la etapa de
separar los organismos alimenticios vivos que nadan libremente de los quistes que no han eclosionado, **caracterizado**
porque después de la etapa de eclosión, los quistes no eclosionados, que tienen partículas magnéticas aplicadas sobre
su superficie exterior, se separan por atracción magnética de los organismos alimenticios vivos que nadan libremente,
los cuales no tienen partículas magnéticas aplicadas sobre su superficie exterior.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque los quistes se incuban en un recipiente de
eclosión, en el cual se encuentra dispuesto al menos un imán para separar los quistes no eclosionados de los organismos
alimenticios vivos que nadan libremente.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, **caracterizado** porque los quistes se incuban en un recipiente
de eclosión que tiene una pared, la cual está equipada con al menos un imán para atraer magnéticamente a los quistes
no eclosionados hacia la pared del recipiente.
13. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizado** porque después de la
etapa de eclosión, al menos una parte del medio de eclosión, el cual contiene organismos alimenticios vivos que nadan
libremente y quistes no eclosionados, es retirada del recipiente de eclosión y guiada por al menos un imán, para que
los quistes no eclosionados se adhieran a dicho imán mientras los organismos alimenticios vivos que nadan libremente
pasan dicho imán.

