



0038
(X)
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASTAXANTINA DE LA LANGOSTILLA,
Pleuroncodes planipes, (STIMPSON) Y SU
EFECTO EN LA PIGMENTACIÓN
MUSCULAR DE LA TRUCHA ARCOIRIS,
Oncorhynchus mykiss, (WALBAUM).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

GLADIS NANCY CORAL HINOSTROZA

DIRECTORES DE TESIS: DRA. GUADALUPE DE LA LANZA E.
DR. ALBERTO HUBERMAN W.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

No confundas la paciencia,
coraje de la virtud,
con la torpe lasitud
del que se da por vencido.

Mariano Aguio

Esta obra, es parte del proyecto de una vida que me hubiera negado, de no haber contado con el amor, el respeto y la comprensión de mi familia.

*A mis hijos: Daniel, Oscar y César.
A mi esposo Luis.
Cuatro capítulos trascendentales del contenido inédito de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Gobierno de México, que a través de la Secretaría de Relaciones Exteriores me concedió la oportunidad de continuar mis estudios en este maravilloso país.

A la noble y prestigiada Universidad Nacional Autónoma de México, por acogerme y formarme durante mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, por la Beca otorgada durante mi Doctorado.

A los miembros del Jurado: Dra. Guadalupe De la Lanza Espino, Dr. Luis Arturo Soto González, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Dr. Alberto Huberman Wajzman, Dr. Roberto Civera Cerecedo, Dr. Carlos Rosas Vázquez, y la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, por sus valiosas sugerencias para lograr la versión final de la presente Tesis.

A la Dra. Guadalupe De la Lanza, ejemplo de coraje, por su apoyo desde que me conoce, por rescatarme académicamente, por su valiosa amistad.

Al Dr. Alberto Huberman, mi maestro, un profundo agradecimiento por su confianza depositada en mí, por sus exigencias, sus consejos, y sobre todo por su generosa y enriquecedora amistad.

Al M. en C. José Monroy Ruiz, por su amistad y su compañerismo en el trabajo de campo, laboratorio u oficina.

A la Q.F.B. Hortensia Villavicencio, por su apoyo técnico en los albores de esta investigación.

A los doctores Roberto Civera (CIBNOR) y Virgilio Arenas (ICMyL), por haberme apoyado con la obtención del elemento principal de esta investigación ... la langostilla.

Al Biólogo Juan Antonio Pérez Hernández, de la Estación Piscícola El Zarco (Instituto Nacional de la Pesca, SEMARNAP), y al Ing. Alejandro Medina, del Centro Acuícola de Amanalco de Becerra, por su interés en la investigación y permitirme el uso de las instalaciones de las granjas durante la fase experimental. Muchas gracias.

A mis compañeros de Laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y de Bioquímica del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por su desinteresada ayuda, su alegría y su amistad.

A todos los que de una u otra forma me han ayudado y me siguen ayudando, gracias por su mano, gracias por su aliento.

Por último, a Luis Manuel, compañero de mi vida, por su optimismo y por su tenaz apoyo.

A mis hijos, alegría de mi vida, gracias por ser como son.

A la familia Sanginés, por estar siempre presente. No cesaré de agradecerles.

PREFACIO

La presente tesis ha sido preparada de acuerdo a las especificaciones de la Coordinación de Estudios de Posgrado de Biología. En su contenido se encuentran los resultados de dos experimentos llevados a cabo con la trucha arcoiris, el primero en condiciones de laboratorio y el segundo en condiciones piloto. Los resultados del primer experimento fueron presentados en el VI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar en Mar del Plata, Argentina (Octubre, 1995) y en el Taller Internacional La Bioquímica en la Biotecnología Marina, La Habana, Cuba (Diciembre, 1997). Igualmente, se encuentran publicados en la revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición, vol. 47(3):237-241 (1997) y en la revista Journal of Aquatic Food Product Technology, vol. 7(2):31-45 (1998). Los resultados del segundo experimento se encuentran en preparación para su publicación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El carotenoide astaxantina	4
1.2. Importancia biológica de la astaxantina en los salmónidos	7
1.3. Astaxantina de langostilla, <i>Pleuroncodes planipes</i> , y su empleo en la pigmentación de salmónidos	9
1.4. Pigmentación de la trucha arcoiris, <i>Oncorhynchus mykiss</i> , en México	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3A. Experimento en condiciones de laboratorio	
◦ 3A.1. Materia prima: langostilla, <i>Pleuroncodes planipes</i> .	13
◦ 3A.2. Extracción de astaxantina de la langostilla, <i>Pleuroncodes planipes</i> .	13
◦ 3A.3. Organismos y condiciones experimentales	16
◦ 3A.4. Diseño del experimento	17
◦ 3A.5. Preparación de las dietas	17
◦ 3A.6. Toma de muestras	19
◦ 3A.7. Análisis de carotenoides	19
◦ 3A.7.a. De la langostilla <i>Pleuroncodes planipes</i> .	20
◦ 3A.7.b. De las dietas	21
◦ 3A.7.c. Del músculo de la trucha arcoiris, <i>O. mykiss</i> .	22
◦ 3A.7.d. Análisis cromatográfico en capa fina (TLC)	22
◦ 3A.8. Retención de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris	23
◦ 3A.9. Medición colorimétrica del músculo de la trucha arcoiris	23

• 3A.10. Tasa específica de crecimiento de la trucha arcoiris (TEC)	24
• 3A.11. Factor de conversión alimenticia de la trucha arcoiris (FCA)	24
• 3A.12. Signos patológicos y mortalidad de la trucha	25
• 3A.13. Análisis estadístico de los resultados	25
3B. Experimento en condiciones piloto	
• 3B.1. El aceite de langostilla, <i>Pleuroncodes planipes</i> .	26
• 3B.2. Organismos y condiciones experimentales	26
• 3B.3. Preparación de las Dietas	27
• 3B.4. Toma de muestras	28
• 3B.5. Análisis de los carotenoides	28
• 3B.5.a. Del aceite de langostilla	28
• 3B.5.b. De las dietas	28
• 3B.5.c. Del músculo de la trucha arcoiris, <i>O. mykiss</i> .	29
• 3B.5.d. Análisis cromatográfico en capa fina (TLC)	30
• 3B.6. Retención de carotenoides en el músculo de la trucha	30
• 3B.7 Medición colorimétrica del músculo de la trucha	30
• 3B.8 Tasa de crecimiento específico de la trucha arcoiris (TEC)	30
• 3B.9. Factor de conversión alimenticia de la trucha arcoiris (FCA)	30
• 3B.10. Signos patológicos y mortalidad de la trucha	31
• 3B.11. Análisis estadístico de los resultados	31
4. RESULTADOS	32
4A. Del experimento en condiciones de laboratorio	
• 4A.1. Astaxantina en la langostilla, <i>Pleuroncodes planipes</i> .	32
• 4A.2. Astaxantina en el extracto de aceite y en las dietas	33
• 4A.3. Composición química de las dietas	35
• 4A.4. Depósito de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris, <i>O. mykiss</i> .	36
• 4A.5. Retención de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris	38

• 4A.6 Pigmentación del músculo de la trucha arcoiris	38
• 4A.7. Comportamiento de la trucha durante el experimento	42
• 4A.8. Tasa específica de crecimiento de la trucha arcoiris (TEC)	42
• 4A.9. Factor de conversión alimenticia de la trucha arcoiris (FCA)	44
• 4A.10. Signos patológicos y mortalidad de la trucha	45
4B. Del experimento en condiciones piloto	
• 4B.1. Astaxantina en el aceite de langostilla, <i>Pleuroncodes planipes</i> , y en las dietas	46
• 4B.2. Composición química de las dietas	49
• 4B.3. Composición y contenido de carotenoides en el músculo de la trucha arcoiris	49
• 4B.4. Retención de carotenoides en el músculo de la trucha arcoiris	54
• 4B.5. Pigmentación muscular de la trucha arcoiris	55
• 4B.6. Comportamiento de la trucha durante el experimento	60
• 4B.7. Tasa específica de crecimiento de la trucha (TEC)	60
• 4B.8. Factor de conversión alimenticia (FCA)	60
• 4B.9. Signos patológicos y mortalidad de la trucha	61
5. DISCUSIÓN	62
6. CONCLUSIONES	74
7. LITERATURA CITADA	77
8. ANEXOS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura molecular de la astaxantina	5
Figura 2. Método de extracción de astaxantina de langostilla, <i>Pleuroncodes planipes</i> , con aceite de bacalao adaptado en el laboratorio.	14
Figura 3. Efecto de la temperatura y el tiempo en la concentración de astaxantina en el aceite de bacalao.	16
Figura 4. Porción muscular de la trucha arcoiris, <i>Oncorhynchus mykiss</i> , utilizada en los análisis.	19
Figura 5. Espectro de absorción de la astaxantina en los organismos enteros de langostilla.	32
Figura 6. Separación cromatográfica (TLC) de la astaxantina de langostilla, <i>P. planipes</i> .	33
Figura 7. Separación cromatográfica (TLC) de la astaxantina en el extracto de aceite de bacalao y en las dietas utilizadas en los tratamientos del experimento en condiciones de laboratorio	34
Figura 8. Depósito de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris en función de las fuentes del carotinoide en el alimento y el tiempo de ingestión, en el experimento de laboratorio.	36
Figura 9. Retención de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris a las seis semanas en el experimento de laboratorio.	38
Figura 10. Efecto de la fuente de astaxantina en los tratamientos y el tiempo de ingestión del alimento sobre la cromaticidad roja (a^*) del músculo de la trucha arcoiris cultivada en condiciones de laboratorio.	40
Figura 11. Correlación entre el contenido de astaxantina en el músculo y la cromaticidad roja (a^*) del tejido en todos los ejemplares de trucha arcoiris que recibieron astaxantina en la dieta	41
Figura 12. Tonalidad del color (H°) _{ab} y croma (C^*) del músculo de la trucha arcoiris, en función de las diferentes fuentes de astaxantina en los tratamientos y del tiempo de ingestión del alimento.	43
Figura 13. Separación cromatográfica (TLC) de los carotenoides en el aceite de langostilla y en las dietas utilizadas en el experimento en condiciones piloto.	46
Figura 14. Espectro de absorción de la luteína en la dieta basal empleada en el experimento en condiciones piloto.	47
Figura15. Depósito de carotenoides en el músculo de la trucha en función de los niveles de inclusión de astaxantina en el alimento y el tiempo de ingestión, en el experimento piloto.	50

Figura 16. Espectro de absorción de la zeaxantina y astaxantina detectados a partir de la cuarta semana en el músculo de la trucha arcoiris que recibieron astaxantina en el experimento piloto.	51
Figura 17. Separación cromatográfica de los carotenoides del músculo de la trucha a las ocho semanas de ingestión de alimentos con diferentes niveles de inclusión de astaxantina de langostilla en el cultivo piloto.	52
Figura 18. Contenido proporcional de los carotenoides depositados en el músculo de la trucha arcoiris a las ocho semanas de experimentación en condiciones piloto.	53
Figura 19. Retención de carotenoides en el músculo de la trucha arcoiris a las ocho semanas de experimentación en condiciones piloto.	54
Figura 20. Efecto de los niveles de inclusión de la astaxantina de langostilla en el alimento de la trucha y el tiempo de ingestión, sobre la rojicidad (a^*) del músculo en el experimento piloto.	56
Figura 21. Tonalidad del color (H°) _{ab} y croma (C^*) en el músculo de la trucha arcoiris, en función de los niveles de inclusión de astaxantina de langostilla en la dieta y del tiempo de ingestión.	58

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Contenido y composición de carotenoides en la langostilla, <i>Pleuroncodes planipes</i> , en el extracto de aceite; y en las dietas empleadas en el experimento de laboratorio.	33
Tabla 2. Composición química proximal y contenido energético de las dietas empleadas en el experimento de laboratorio.	35
Tabla 3. Contenido de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris y cinética de depósito durante el experimento en condiciones de laboratorio.	37
Tabla 4. Variación colorimétrica del músculo de la trucha arcoiris bajo la influencia de las diferentes fuentes de astaxantina en el alimento, en el experimento de laboratorio.	39
Tabla 5. Correlación entre los índices de color y el contenido de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris, en el experimento en condiciones de laboratorio.	41
Tabla 6. Tasa específica de crecimiento de la trucha arcoiris y otros parámetros fisiológicos bajo la influencia de las diferentes fuentes de astaxantina en la dieta, en el experimento de laboratorio.	44
Tabla 7. Contenido de carotenoides en las dietas empleadas en el experimento en condiciones piloto.	46
Tabla 8. Composición química proximal y contenido energético de las dietas empleadas en el experimento en condiciones piloto.	48
Tabla 9. Contenido de carotenoides en el músculo de la trucha arcoiris y cinética de depósito durante el experimento en condiciones piloto.	49
Tabla 10. Variación colorimétrica del músculo de la trucha arcoiris bajo la influencia de diferentes niveles de inclusión de astaxantina de langostilla en el alimento, en el experimento en condiciones piloto.	55
Tabla 11. Correlación entre los índices de color L*, a*, b*, parámetros (H°)ab, (C*) y el contenido de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris del experimento piloto	56
Tabla 12. Tasa de crecimiento de la trucha arcoiris, y otros parámetros fisiológicos frente a los diferentes niveles de inclusión de astaxantina de langostilla en el alimento, a las ocho semanas de experimentación en condiciones piloto.	60

RESUMEN

La composición esterificada de la astaxantina de langostilla (AxLg), *Pleuroncodes planipes*, en la dieta de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, puede limitar la pigmentación muscular de dichos peces.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la AxLg en el alimento de la trucha sobre el depósito del carotenoide en el músculo y la pigmentación del tejido en relación al tiempo de ingestión, y sobre algunos parámetros fisiológicos de los peces en comparación con otras fuentes comerciales de astaxantina.

El estudio fue hecho en dos experimentos: A) En condiciones de laboratorio por 6 semanas, con los tratamientos: T1, con AxLg (92% esterificada); T2, con astaxantina de levadura, *Phaffia rhodozyma* (AxLv); con Ax sintética (AxS) (Carophyll Pink) (0% esterificada), y un grupo testigo (T4). B) En condiciones piloto por 8 semanas, con tres tratamientos experimentales (T1, T2, T3) con 50, 75 y 100 mg/kg de AxLg en la dieta, respectivamente; un tratamiento con los carotenoides sintéticos astaxantina y cantaxantina (Ax-Cx) (0% esterificados) (T4), y un grupo testigo (T5). En ambos ensayos se utilizaron truchas inmaduras (de 200 a 400g). A las 0, 3 y 6 semanas (en A) ó a las 0, 2, 4, 6 y 8 semanas (en B), se hizo el análisis cualitativo y cuantitativo de los carotenoides en el músculo; se calcularon: tasa de depósito de la Ax, color muscular (a^* , rojicidad; b^* , amarillo; L^* , luminosidad), tonalidad (H°_{ab}) y croma (C^*). Al término del estudio se calculó la tasa específica de crecimiento (TEC), factor de conversión alimenticia (FCA) y mortalidad.

La astaxantina fue encontrada en el músculo sólo en forma libre. La tasa de depósito de la AxLg en las primeras semanas fue menor que la observada con AxS, y a partir de la tercera semana ambas tasas fueron semejantes. En el experimento de laboratorio, el depósito de astaxantina en el músculo en T1 fue 3.68 ± 0.75 mg/kg, semejante ($P > 0.05$) al alcanzado en T2 (3.54 ± 0.63 mg/kg) y 38% menor que el obtenido en T3 (5.91 ± 1.36 mg/kg); mientras que a^* en T1 fue sólo 12% menor que en T3. En el experimento piloto, los depósitos de Ax en el músculo en los tratamientos experimentales T1, 4.32 ± 1.01 mg/kg; T2, 4.77 ± 0.81 mg/kg; T3, 5.20 ± 1.11 mg/kg, fueron semejantes ($P > 0.05$) al obtenido con Ax-Cx (5.19 ± 0.74) (T4). Los niveles de a^* en los 4 tratamientos fueron semejantes ($P > 0.05$) entre sí y diferentes ($P < 0.01$) al obtenido en T5. Los resultados de TEC, FCA y mortalidad al finalizar ambos experimentos fueron semejantes ($P > 0.05$) a los del grupo testigo.

Se concluye: i) la AxLg en la dieta de la trucha posee el mismo efecto pigmentante que la AxLv a las 6 semanas y que la AxS a las 8 semanas. ii) La adición de AxLg y su concentración en la dieta no influyen sobre la TEC, el FCA y mortalidad de la trucha de 200 a 400g.

ABSTRACT

The esterified composition of langostilla, *Pleuroncodes planipes*, astaxanthin (LgAx) in the diet of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, can be a limiting factor in the muscle pigmentation of these fish.

The aim of the study was to determine whether carotenoid deposition, muscle pigmentation, and other physiological parameters in the fish are influenced by dietary LgAx and time of feeding. Two experiments were done: A) under laboratory conditions, where a diet supplemented with LgAx (92% esterified, T1) was tested for 6 weeks versus the yeast, *Phaffia rhodozyma*, astaxanthin (Yax, T2) and synthetic astaxanthin (Sax, T3) (Carophyll Pink) (0% esterified) in parallel with a control fed without Ax. B) under pilot conditions, where three feed inclusion levels of LgAx (50, 75, and 100 mg/kg, T1, T2, T3, respectively), a synthetic mixture astaxanthin-canthaxanthin (Ax-Cx, T4), and a control feed (T5) were tested for 8 weeks. Both experiments included sexually immature trout from 200 to 400g. At 0, 3 and 6 weeks or 0, 2, 4, 6 and 8 weeks, qualitative and quantitative analyses of muscle carotenoids were carried out, and muscle color (a^* , redness; b^* , yellowness; L^* , lightness), hue (H°_{ab}), and chroma (C^*), were measured. Specific growth rate (SGR), feed conversion (FC), and mortality were calculated at the end of the experiment.

Only free Ax was found in the muscle. The first 3 weeks deposition rate of the LgAx was less than Sx, but after the third both were similar. Under laboratory conditions, muscle Ax content of fish from T1 was 3.68 ± 0.75 mg/kg similar ($P > 0.05$) to that in T2 (3.54 ± 0.63 mg/kg), and 38% lower than fish from T3 (5.91 ± 1.36 mg/kg). Nevertheless, muscle redness (a^*) in T1 was only 12% lower than a^* in T3. Under pilot test conditions, the muscle carotenoid content in experimental fish (T1, 4.32 ± 1.01 mg/kg; T2, 4.77 ± 0.81 mg/kg; T4, 5.20 ± 1.11 mg/kg) were similar ($P > 0.05$) to that in T4 (5.19 ± 0.74 mg/kg). Redness (a^*) levels in T1, T2, T3 and T4 were all similar but different ($P < 0.01$) to T5. At the end of the experiments there were no significant differences ($P > 0.05$) in specific growth rate, feed conversion or mortality between the experimental treatments and control groups.

It was concluded: i) the pigmentation effect of LgAx at six weeks is similar to that with YAx and to Sx at eight weeks. ii) given that LgAx is metabolized more slowly, the most appropriate inclusion level of LgAx in the feed to achieve a good muscle color is 75 mg/kg. iv) neither the addition of LgAx nor its concentration in the diet affect the SGR, FC or mortality of the trout ranging from 200 to 400g.

1. INTRODUCCIÓN

La coloración de muchos organismos acuáticos es atribuida principalmente al contenido de carotenoides en sus tejidos. La astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β , β -caroteno), un oxicarotenoide derivado del β -caroteno, es entre ellos, el compuesto más abundante y ampliamente distribuido en dicho ambiente (Goodwin, 1954). En particular, el color rojo del músculo y de la piel de los salmónidos silvestres, es producido por el depósito de este carotenoide el cual es incorporado a partir de la dieta (Steven, 1948).

Entre las familias de peces de mayor importancia comercial se encuentran los salmónidos. La coloración de su carne representa un parámetro importante en el control de calidad de la misma, determinando el valor comercial del producto (Goodwin, 1986; Latscha, 1990). Por esta razón, investigadores y tecnólogos se abocaron en las últimas décadas a la búsqueda de fuentes de astaxantina para su aplicación en la producción intensiva tanto de salmones como de la trucha arcoiris. Entre las fuentes naturales, los organismos más utilizados para este propósito fueron los crustáceos. La incorporación de estos organismos como el camarón, *Penaeus japonicus* (Peterson *et al.*, 1966; Saito y Regier, 1971; Kamata 1977; Choubert y Luquet, 1983), la langostilla, *Pleuroncodes planipes* (Spinelli y Mahnken, 1978), el krill, *Euphasia sp.* (Scott *et al.*, 1994), el acocil, *Procambarus clarkii* (Chen *et al.*, 1984; Omara-Alwala *et al.*, 1985), a las dietas en forma fresca o deshidratada, produce pigmentación de la carne de diferentes niveles de intensidad. Sin embargo, una desventaja importante del empleo directo de estos organismos es el alto contenido de minerales que dificulta la formulación de alimentos balanceados y la integridad de los peletizados (Meyers y Rutledge, 1971), factores que influyen en la buena pigmentación de los peces (Torrissen *et al.*, 1989).

Con el mismo propósito, también fueron empleadas algunas fuentes vegetales como las flores de cempazúchitl, *Tagetes erecta*, y la calabaza, *Cucurbita maxima* (Lee *et al.*, 1978; Vernon *et al.*, 1994), ambas con alto contenido de luteína; el alga *Spirulina sp.* (Choubert, 1979), cuyo principal carotenoide es el β -caroteno; el alga, *Haematococcus pluvialis* (Peterson *et al.*, 1966), y la levadura, *Phaffia rhodozyma*, fuentes importantes de astaxantina y cuya

eficiencia en la pigmentación de salmónidos fue demostrada por Johnson *et al.* (1977) y Binkowski *et al.* (1993).

Al margen de la función pigmentante de la astaxantina y otros carotenoides como la cantaxantina (4,4'-diceto- β,β -caroteno), los conocimientos sobre su metabolismo en los salmónidos son escasos y relativamente nuevos. Uno de los conceptos más importantes en cuanto a la utilización metabólica de la astaxantina se refiere a la biodisponibilidad del compuesto. En una investigación preliminar en la que después de purificar las fracciones libre y esterificada de astaxantina del copépodo, *Calanus finmarchicus*, Torrissen y Braekkan (1979), demostraron que la astaxantina libre es más rápidamente absorbida con respecto a la esterificada. Estudios posteriores en los que se emplearon astaxantina sintética confirmaron dicho resultado (Schiedt *et al.*, 1985; Foss *et al.*, 1987; Torrissen *et al.*, 1989). Los autores señalan que previa a la absorción, la fracción esterificada debe ser hidrolizada mediante estererasas específicas, razón por la cual, esta forma de astaxantina es menos eficiente para fines de pigmentación. Escasos antecedentes como los trabajos de Kamata, (1977) y Mori *et al.* (1989), demostraron que la astaxantina esterificada de crustáceos es mejor absorbida que la astaxantina libre. Los autores atribuyen tal efecto, a la asociación del pigmento con lípidos u otros compuestos que podrían facilitar su aprovechamiento.

Con la aparición de la astaxantina sintética (Carophyll Pink), fue posible ampliar los conocimientos sobre el metabolismo del carotenoide. Las primeras investigaciones sobre la utilización de los diferentes isómeros de la astaxantina pertenecen a Schiedt *et al.* (1981), y Storebakken *et al.* (1985), quienes afirman que no existe epimerización metabólica de la astaxantina en el salmón del Atlántico, de tal forma que se deposita en el músculo conservando la misma naturaleza isomérica que en la dieta. En contraste, Arai *et al.* (1987), establecieron que los isómeros Z de la astaxantina del krill del Antártico, son depositados en el músculo del salmón coho en proporciones de sólo 3 a 8%, lo que permite suponer que la absorción del carotenoide en dichos peces es selectiva. Publicaciones más recientes confirmaron dicha hipótesis al demostrar que los isómeros ópticos y geométricos del carotenoide son distribuidos

selectivamente en los diferentes tejidos de la trucha arcoiris (Bjerkeng *et al.*, 1997; Osterlie *et al.*, 1999).

La absorción del pigmento es llevada a cabo en la pared intestinal, de donde es transportado a los diferentes tejidos como piel, músculo y gónadas por las diferentes fracciones de las lipoproteínas del suero (March *et al.*, 1990; Choubert *et al.*, 1994a), principalmente por la fracción de alta densidad (HDL) (Nakamura *et al.*, 1985). Se ha observado por ejemplo que durante la madurez sexual del salmón, *Oncorhynchus keta*, estas lipoproteínas movilizan el carotenoide del músculo hacia los ovarios (Nakamura *et al.*, 1985; Gobantes *et al.*, 1998). Otros compuestos como las lipovitelininas, pueden también participar en el traslado del carotenoide hacia otros tejidos como piel, ovarios y óvulos (Ando y Hatana, 1991).

El depósito de la astaxantina en los tejidos fluctúa en los diferentes estadios de desarrollo, siendo más intenso en los individuos sexualmente inmaduros (Bjerkeng *et al.*, 1992), en los cuales, el músculo es el principal tejido depositario (Kitahara, 1983; Schiedt *et al.*, 1985; Torrissen y Torrissen, 1985; Gobantes *et al.*, 1998). Además del estado fisiológico de los peces, otros factores intrínsecos como la edad (Spinelli y Mahnken, 1978), las características genéticas de las poblaciones (Torrissen y Nævdal, 1984; Choubert y Blanc, 1985; McCallum *et al.*, 1987), y factores exógenos como la composición de los carotenoides en la dieta (Torrissen, 1985; Hardy *et al.*, 1987; Latscha, 1990), su concentración (Torrissen *et al.*, 1989; Bjerkeng *et al.*, 1990), el tiempo de ingestión del pigmento (Choubert y Luquet, 1982), la temperatura del agua (No y Storebakken, 1991), pueden afectar el metabolismo de los carotenoides en los salmónidos.

En condiciones de cautiverio el contenido de astaxantina en el músculo puede oscilar de 1.4 a 19.3 mg/kg (Bjerkeng *et al.*, 1992), mientras que en la naturaleza se han registrado concentraciones hasta de 25 mg/kg en ejemplares de tamaño mayor a 1.5 kg (Schiedt *et al.*, 1981). La retención del carotenoide en el músculo es favorecida durante la etapa previa a la madurez sexual, en la que el pigmento es relativamente estable y no expuesto a metabolismo una vez depositado en el tejido (Torrissen *et al.*, 1995). Dicho parámetro en esta etapa

fisiológica es de 4% a 8% como corresponde a los cálculos de Schiedt *et al.* (1985), en la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, de 200 a 250g de tamaño. En los diferentes estadios fisiológicos de los organismos, la astaxantina puede sufrir modificaciones estructurales durante su metabolismo. Por ejemplo, se ha observado que durante la migración anádroma del salmón del Atlántico, *Salmo salar*, el pigmento muscular es transformado en zeaxantina para ser depositado en la piel (Al-Khalifa y Simpson, 1988). Este hecho atrajo la atención de algunos investigadores por su posible relación con el proceso reproductivo. En la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, dicha conversión es menos frecuente. Un antecedente al respecto es la investigación de Schiedt *et al.* (1986), quienes afirman que el pigmento puede ser convertido en di-epoxineoxantina vía la zeaxantina como compuesto intermediario. A su vez, en la trucha café, *Salmo trutta*, y en truchas del género *Salvelinus sp.* la astaxantina del músculo es rápidamente reducida en zeaxantina vía la idoxantina (Ando *et al.*, 1989). Dicha conversión es atribuida en primera instancia a la ingestión de astaxantina esterificada (Schiedt *et al.*, 1986), y a la capacidad enzimática de algunos organismos (Ando *et al.*, 1989).

El particular papel funcional de la astaxantina en el músculo de los salmónidos, así como su mecanismo de asociación bioquímica con la miosina, aún permanecen oscuros. Henmi *et al.* (1989), citado por Storebakken y No (1992), sostienen que el anillo β -ionona del carotenoide es posiblemente atraído por un sitio hidrofóbico no específico de la superficie de la actomiosina, en el que podría establecerse la unión con los átomos de oxígeno del pigmento mediante enlaces débiles de hidrógeno. Esta hipótesis explicaría el hecho de por qué existe una mayor retención de la astaxantina en el músculo, comparado al de otros carotenoides como la cantaxantina o luteína (3,3'-dihidroxi- α -caroteno), en cuyas estructuras existen menor número de átomos de oxígeno. Por consiguiente, la coloración del músculo de estos organismos, singular característica de la familia, es una consecuencia directa de la composición de los carotenoides ingeridos con la dieta (Torrissen *et al.*, 1989).

1.1. El carotenoide astaxantina

Este compuesto fue aislado por primera vez por Khun y Ledere en 1933, a partir de huevos del decápodo, *Homarus americanus*, (Karrer y Jucker, 1950). Los investigadores creyendo en primera instancia que tal molécula correspondía a una modalidad estructural del carotenoide astaceno (3,3',4,4'-tetra-ceto- β,β -caroteno), le asignaron provisionalmente el nombre de "ovoéster". Años más tarde, en 1938, Khun y Sørensen aislaron el mismo compuesto de otro decápodo, *Astacus gammarus*, al que describieron y asignaron el nombre de astaxantina (Karrer y Jucker, 1950; Johnson, 1991).

La astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β,β -caroteno), cuya fórmula molecular es $C_{40}H_{52}O_4$, se distingue por una cadena poliénica de once dobles enlaces conjugados, responsables del intenso color rojo brillante del cromóforo. Presenta un anillo cíclico en cada extremo de la molécula, un grupo funcional hidroxílico en cada uno de los carbonos 3 y 3', y un grupo cetónico en los carbonos 4 y 4', como se ilustra en la Figura 1. La existencia de dichos radicales oxigenados en los extremos lo caracterizan, entre los carotenoides, como un oxicarotenoide o xantofila.

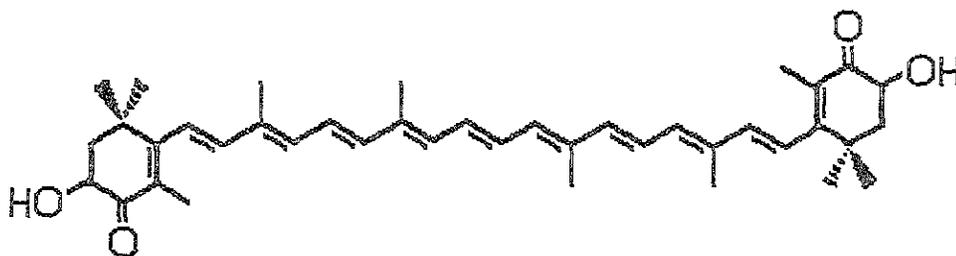


Figura 1. Estructura molecular de la astaxantina

Los dos carbonos asimétricos (C3 y C3') permiten a la molécula presentar isómeros ópticos y existir en la naturaleza como enantiómeros 3S,3'S y 3R,3'R y la forma *meso* 3R,3'S; las cuales se combinan para formar la estructura racémica 3R,3'R:3R,3'S:3S,3'S en una proporción 1:2:1 como es el caso de la astaxantina en los crustáceos, *Pandalus borealis*, *Homarus gammarus*, (Andrewes *et al.*, 1976; Renstrom *et al.*, 1981), *Penaeus sp.* (Schiedt *et al.*, 1993), y

en peces salmónidos como *Salmo salar*, *Oncorhynchus spp.*, *Salmo trutta* (Schiedt *et al.*, 1981). En otras ocasiones, puede predominar la forma 3S,3'S como en el equinodermo *Asterias rubens*, en los decápodos, *Procambarus clarki*, y *Homarus gammarus*, en el alga *Haematococcus pluvialis* (Renstrom *et al.*, 1981) y en la alopোরina de corales calcáreos (Liaaen-Jensen, 1990). La forma 3R,3'R, es característica de la astaxantina de la levadura, *Phaffia rhodozyma* (Andrewes, 1976). Hasta el momento, no se dispone de información sobre la presencia de la forma *meso* como isómero único en la naturaleza.

Dada la presencia de dos centros quirales en la molécula (C-3 y C-3') y nueve dobles enlaces en la cadena central, la astaxantina puede formar teóricamente hasta 271 isómeros geométricos *E/Z* (Zechmeister, 1944). Entre ellos, el isómero *trans* o forma extendida *E* es el más abundante en la naturaleza, seguido por los isómeros *9-Z*, *13-Z* y *15-Z* (Osterlie, 1999), o isómeros *cis*. Las proporciones de dichos isómeros en los diferentes organismos vivos varían de especie a especie (Schiedt *et al.*, 1981; Liaaen-Jensen, 1990).

A partir de su descubrimiento, este carotenoide fue encontrado principalmente en los invertebrados marinos y con mayor predominancia en los crustáceos, los cuales se caracterizan por poseer entre 65% a 98% de astaxantina (Goodwin, 1952; Czezug, 1974). Su distribución también alcanza a algunos invertebrados terrestres como los insectos ortópteros *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria* y *Nomadacris septemfasciata* (Goodwin, 1954), y a muy pocos vertebrados como las aves (Schiedt *et al.*, 1985). Dada su abundancia en los invertebrados, la astaxantina fue considerada desde su descubrimiento como un pigmento típicamente de origen animal. Sin embargo, estudios posteriores demostraron su existencia también en el reino vegetal como en las flores de la planta, *Adonis annua*, L. (Seybold y Goodwin, 1958), en la levadura, *Phaffia rhodozyma* (Andrewes *et al.*, 1976), en el alga, *Haematococcus pluvialis* (Renstrom *et al.*, 1981), y en las bacterias marinas *Agrobacterium aurantiacum* y *Alcaligenes sp.* (Fraser *et al.*, 1992; Misawa *et al.*, 1995).

En dichos organismos vivos la astaxantina se encuentra ligada a una proteína mediante enlaces no covalentes, formando compuestos estables e hidrosolubles de color azul grisáceo o

verdoso, llamados carotenoproteínas (Milicua *et al.*, 1985). Las principales carotenoproteínas aisladas de los organismos son la crustacianina, aislada del caparazón de *Homarus americanus* (Zagalsky, 1995), y *Procambarus clarkii* (Milicua *et al.*, 1985); y la ovoverdina de los huevos de *Homarus vulgaris* y *H. americanus* (Renstrom, 1982). En menor frecuencia se han registrado otras carotenoproteínas, como la linkyacianina del asteroideo, *Linckya laevigata* (Liaaen-Jensen, 1990) y la ovorrubina, en huevos y albúmina del gasterópodo, *Pomacea canadicularata* (Goodwin, 1952). Al ser hidrolizados estos compuestos, ya sea por calentamiento (como sucede durante el cocimiento de los invertebrados comestibles), o por solventes orgánicos, se libera la astaxantina exhibiendo su característico color rojo-naranja. En algunos casos, el compuesto puede estar asociado firmemente con el material tegumentario como la quitina o el carbonato de calcio, impidiendo su completa extracción aún con solventes orgánicos (Gillou *et al.*, 1994).

Gracias al aislamiento de los genes responsables de la actividad enzimática en la biosíntesis de la astaxantina, a partir de microorganismos productores como la levadura, *Phaffia rhodozyma*, el alga, *Haematococcus pluvialis*, las bacterias marinas, *Agrobacterium aurantiacum* y *Alcaligenes sp*, fue posible entender el proceso de producción natural del carotenoide. El ácido mevalónico, considerado precursor en la síntesis de los carotenoides (Fraser *et al.*, 1992; Misawa *et al.*, 1995), se convierte en dos moléculas de geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP), las cuales son condensadas mediante la enzima fitoeno sintetasa y permiten la formación del primer carotenoide intermediario, el fitoeno (C_{40}) (Misawa *et al.*, 1995), el cual es modificado por la fitoeno desaturasa, introduciendo dobles ligaduras en su estructura molecular y transformándolo en licopeno. Este compuesto es a su vez modificado por dos ciclizaciones catalizadas por la licopeno-ciclasa, y transformado en β -caroteno. A partir de este intermediario se realiza la síntesis de la astaxantina por hidroxilación de la molécula en los carbonos C3 y C3', con la participación de la 3, 3'- β -ionona hidroxilasa y la modificación de los grupos metileno a cetónicos en las posiciones C4 y C4', mediada por la 4, 4'- β -ionona oxigenasa (Fraser *et al.*, 1992).

1.2. Importancia biológica de la astaxantina en los salmónidos

Muchas de las funciones biológicas atribuidas a los carotenoides en los peces, discutido ampliamente por Tacon, (1981) y Miki, (1991), aún no han sido demostradas en los salmónidos. Steven (1948), después de observar la transferencia de la astaxantina del saco vitelino a los embriones en la trucha café, *Salmo trutta*, postuló la posible importancia funcional del pigmento en la formación de cromatóforos, o como reserva de nutrimentos durante el desarrollo embrionario. Dicha hipótesis fue respaldada posteriormente por Takeuchi (1960), al hacer la misma observación en embriones del pez japonés, *Orzyas latipes*. Otras investigaciones sugieren su posible relación con la reproducción en su papel de hormona fertilizante (Goodwin, 1952). Sin embargo, Gámez (1990), demostró que la adición de astaxantina a la dieta de la trucha arcoiris, *Ocorhynchus mykiss*, no ejerce ningún efecto sobre su fecundidad. A partir de algunos trabajos realizados con moluscos marinos en los que se observó que los organismos altamente pigmentados mostraban mayor tolerancia a condiciones de bajo contenido de oxígeno y contaminación (Goodwin, 1954 y Czecsuga, 1979), se supuso que los carotenoides oxigenados como la astaxantina, podrían participar en el metabolismo oxidativo cediendo su átomo de oxígeno cuando las condiciones lo requieren. Esta hipótesis fue extendida hacia los salmónidos, cuyos huevos se desarrollan en ambientes con poca disponibilidad de oxígeno, como fondos arenosos o cuevas donde la astaxantina representaría una reserva de dicho elemento para el embrión (Mikulín y Soin, 1975). Torrissen (1984), puso en evidencia que en condiciones de iluminación, los huevos de salmónes con alto contenido de astaxantina sufren mayor mortandad con respecto a aquellos de menor concentración del pigmento. Así mismo, Velásquez y Espinoza (1989), demostraron que la exposición a la luz de huevos de la trucha arcoiris por un período de 24 a 31 horas puede llegar a causar una mortandad total de los mismos. Es posible entonces, que el conocido papel fotoprotector que ejercen los carotenoides en sistemas vegetales (Donkin, 1976; Yong y Lee, 1991), no exista en los salmónidos.

Algunas investigaciones sobre el papel biológico de los carotenoides han sido orientadas hacia la función antioxidante (Olson, 1989). Al respecto, se sabe que la astaxantina protege de la oxidación a las membranas biológicas inhibiendo la peroxidación de los lípidos mitocondriales

y la acción de los singuletes de oxígeno y radicales libres (Kurashige *et al.*, 1990; Miki, 1991; Schroeder y Johnson, 1995). Se estima que la astaxantina es un antioxidante 10 veces superior al β -caroteno y 100 veces más que el α -tocoferol (Terao, 1989; Meyers y Sanderson, 1992). El papel protector de la astaxantina en el sistema inmunológico de los salmónidos se discute en el trabajo de Nakano *et al.* (1995). Utilizando indicadores bioquímicos en el hígado y en la sangre de la trucha arcoiris, dichos investigadores observaron su efecto estimulante sobre el sistema inmune, hallazgo que confirma lo antedicho por Segner *et al.* (1989), quienes después de un estudio histológico del hígado de las especies *Oreochromis niloticus* y *Colisa labiosa*, concluyeron que la inclusión del carotenoide en la dieta influye positivamente sobre el metabolismo intermediario.

El papel de la astaxantina como precursor en la síntesis de vitamina A en los salmónidos fue abordado en primera instancia por Schiedt *et al.* (1985) y después por Al-Khalifa y Simpson (1988). Estos investigadores demostraron que la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, convierte astaxantina en vitamina A, siempre y cuando la dieta carezca de este micronutriente; sin embargo, en el salmón del Atlántico, *Salmo salar*, esa conversión ocurre aún con cantidades superiores a la requerida de vitamina A en el alimento (Torrissen *et al.*, 1995). Otra función que se le atribuye al carotenoide es el de promover el crecimiento en salmones juveniles del Atlántico, *Salmo salar* (Torrissen, 1984; Torrissen *et al.*, 1995). No obstante, Bjerkeng *et al.* (1992), al experimentar con la trucha arcoiris durante 140 semanas a partir del estadio de alevines, no observaron influencia significativa de la astaxantina en el crecimiento de dichos organismos. La observación de ciertos cambios en los salmónidos frente a las variaciones del contenido de astaxantina en los tejidos, como la intensa coloración roja de la piel de los machos y de los ovocitos de las hembras durante la madurez sexual (Ando y Hatano, 1987), las fluctuaciones en la concentración del carotenoide en el plasma y en el músculo (Choubert *et al.*, 1994a; 1994b) y la variación intraespecífica del color muscular (Ando *et al.*, 1989), entre otros, estimularon posteriormente el surgimiento de nuevas investigaciones orientadas a dilucidar el papel fisiológico y metabólico de la astaxantina en los peces.

1.3. Astaxantina de langostilla, *Pleuroncodes planipes*, y su empleo en la pigmentación de salmónidos

Más del 95% de los carotenoides totales en la langostilla está constituido por astaxantina (Wilkie, 1972). Este conocimiento motivó a investigadores de la década de los 70 a emplear el crustáceo como posible fuente del carotenoide en la pigmentación de salmónidos. Spinelli *et al.* (1974) y Scurman *et al.* (1978), después de utilizar langostilla como ingrediente del alimento de la trucha arcoiris, realizaron evaluaciones sensoriales de la carne y demostraron por primera vez su efecto pigmentante. Posteriormente, con el propósito de superar las desventajas que representa la inclusión directa de los crustáceos en el alimento de los peces, Spinelli y Mahnken (1978), prepararon con buenos resultados extractos del pigmento en aceite. Después de aplicar inclusiones de 30, 60 y 90 mg/kg de dicha astaxantina en la dieta del salmón coho, *Oncorhynchus kisutch*, Spinelli y Mahnken (1978), definieron la relación entre los niveles de depósito de pigmento en el músculo y la coloración de la carne, medida sensorialmente, siendo hasta el momento el principal antecedente sobre este tema de investigación.

Una nueva atención a la langostilla, *Pleuroncodes planipes*, crustáceo de alta abundancia poblacional en la costa occidental de la Península de Baja California (Auriolos-Gamboa, 1992 y 1995), obedece al interés de utilizar este recurso como fuente de astaxantina para el cultivo de la trucha arcoiris, una de las especies más importantes en la acuicultura de México. Sin embargo, debido a la composición química altamente esterificada del pigmento en el crustáceo, 88% esterificada y 12% libre (Wilkie, 1972), es sospechable que la utilización metabólica del carotenoide en dichos peces sea limitada, afectando en consecuencia su eficiencia como pigmentante para uso acuícola en relación con otras fuentes comerciales del carotenoide. Por otro lado, la posible modificación isomérica ocasionada por el proceso de extracción con calor podría repercutir en la absorción y depósito del compuesto en el músculo disminuyendo su efecto pigmentante. Un estudio comparativo de la influencia de esta fuente de astaxantina sobre los parámetros fisiológicos y físicos más importantes en la trucha arcoiris, con respecto a las principales fuentes comerciales de astaxantina empleadas en la producción industrial de salmónidos, permitirá establecer con mayor precisión la importancia particular de este

carotenoide. Igualmente, establecer los criterios de su utilización en el cultivo de esta especie ayudaría a un aprovechamiento razonado del recurso langostilla.

1.4. Pigmentación de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, en México

A partir de la incorporación de la trucha arcoiris a la categoría de especie SAM (Sistema Alimentario Mexicano) en la década de los 80, el desarrollo de la actividad trutícola en el país fue impulsado en forma importante. En el afán de lograr una mejor comercialización de este producto y debido al alto costo que representa la utilización de los carotenoides sintéticos, estimado en 20-25% del costo del alimento concentrado (Meyers, 1993; Torrissen *et al.*, 1995), los criadores locales mostraron gran interés por encontrar pigmentos naturales accesibles y de bajo precio. En ese intento, uno de los recursos ensayados empíricamente para pigmentar la trucha arcoiris fue el chile ancho (*Capsicum annuum*), cuyo principal carotenoide es la capsantina. Este producto fue incorporado en forma deshidratada y molida al alimento. Semanas después de su ingestión, se obtuvo una coloración café rojiza de la carne, de poca estabilidad y desagradable a la vista del consumidor (productor J. Almazán, com. pers.). Los pocos estudios documentados sobre experimentos de pigmentación de la trucha arcoiris en el país, corresponden a Vernon *et al.* (1994) e Ingle y Arredondo (1996), quienes utilizaron pigmentos saponificados del mismo recurso, *Capsicum annuum*, y de la flor de cempazúchitl, *Tagetes erecta*, en forma de óleo-resinas. En la opinión de los autores, los niveles de coloración de la carne obtenidos con estos compuestos fueron aceptables, aunque inferiores a los obtenidos con astaxantina sintética, con predominancia del tono amarillo en el caso de los peces que recibieron luteína de *Tagetes erecta*.

Actualmente, en la pigmentación comercial de la trucha y otros salmónidos se utilizan principalmente los carotenoides sintéticos astaxantina y cantaxantina. No obstante, su empleo se encuentra limitado solo a algunos Centros trutícolas privados, los cuales representan el 20% de las unidades de producción en el país y poseen los mayores niveles de comercialización, mientras que, el 80% restante corresponde a Centros del sector social cuya producción se queda a nivel local.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente investigación fue determinar el efecto de la inclusión de astaxantina de langostilla, *Pleuroncodes planipes*, en la dieta de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, sobre el depósito del pigmento en el músculo, la retención y la pigmentación producida, así como en el crecimiento de los peces en comparación con otras fuentes comerciales de astaxantina.

Los objetivos particulares fueron:

- 1) Adaptar en el laboratorio un procedimiento de extracción de astaxantina de langostilla con aceite de bacalao, para su aplicación en el alimento de la trucha cultivada en condiciones de laboratorio e identificar las posibles ventajas y desventajas del empleo de dicho extracto.
- 2) Establecer la diferencia entre la astaxantina de la langostilla, *P. planipes*, extraída con aceite y la astaxantina comercial de *Phaffia rhodozyma*, y el compuesto sintético (Carophyll Pink) incluidas en el alimento de la trucha arcoiris, en función de su depósito en el músculo, la retención y la pigmentación producida en condiciones experimentales de laboratorio.
- 3) Determinar el efecto de la inclusión de astaxantina de langostilla, *P. planipes*, a diferentes niveles de inclusión (50, 75 y 100 mg/kg), en el alimento de la trucha arcoiris, sobre el depósito del carotenoide en el músculo, la retención y la pigmentación producida en condiciones experimentales piloto.
- 4) Establecer la importancia del carotenoide de langostilla, *P. planipes*, como pigmento alternativo en el cultivo de la trucha, *Oncorhynchus mykiss*, señalando el tiempo mínimo de su ingestión y la dosis mínima de su aplicación en el alimento para alcanzar niveles de pigmentación muscular comercialmente aceptables.
- 5) Identificar los posibles efectos de la ingestión del carotenoide de langostilla, *P. planipes*, sobre el factor de conversión alimenticia y mortalidad de la trucha, *O. mykiss*, tanto en condiciones de laboratorio como piloto.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3A. Experimento en condiciones de laboratorio

3A.1. Materia prima: langostilla, *Pleuroncodes planipes*. La procedencia y fechas de colecta de estos organismos fueron diferentes. Los primeros, se colectaron a bordo del barco oceanográfico El Puma, durante el crucero SIMPSUP-IV, frente a la costa occidental de la Península de Baja California (30° 13.09' Lat. N., 116° 01.76 Long. O.), en el mes de noviembre de 1994. Los organismos congelados fueron transportados al laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ) de la Ciudad de México. Dicho material fue utilizado en las pruebas preliminares de extracción con aceite y estandarización del método. Siendo insuficientes estos organismos para fines del experimento, se solicitó al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, BCS, la donación de más ejemplares. Éstos fueron colectados manualmente en la playa de Punta Arenas (Bahía Magdalena, Baja California Sur), por el personal de dicho Centro de Investigación durante una de las arribaciones naturales acaecida en el mes de Mayo de 1995 (Fotografías 1 y 2, ANEXO I). Los organismos fueron igualmente transportados en congelación a las instalaciones del INNSZ. Los crustáceos colectados en ambas localidades presentaron una longitud del caparazón variable entre 19 a 26 mm correspondiendo a ejemplares adultos de alrededor de un año de edad de acuerdo con los criterios de Boyd (1962) (Fotografía 3, ANEXO I).

3A.2. Extracción de astaxantina de la langostilla, *Pleuroncodes planipes*. Tomando como base los métodos descritos por Chen y Meyers (1982), y Meyers y Chen (1985), se desarrolló un procedimiento de extracción contemplando las condiciones particulares de trabajo. La Figura 2, resume en forma esquematizada dicho procedimiento. La langostilla fue descongelada, limpiada de organismos acompañantes y molida en molino de carne (Hobart-Dayton, 84181-DG), con criba de 2 mm de diámetro. Debido al alto contenido de agua de los crustáceos (80%), la pasta resultante fue un material de difícil manejo durante el molido y con altos niveles de pérdida ocasionado por derrame y salpicadura a partir de la criba. Para

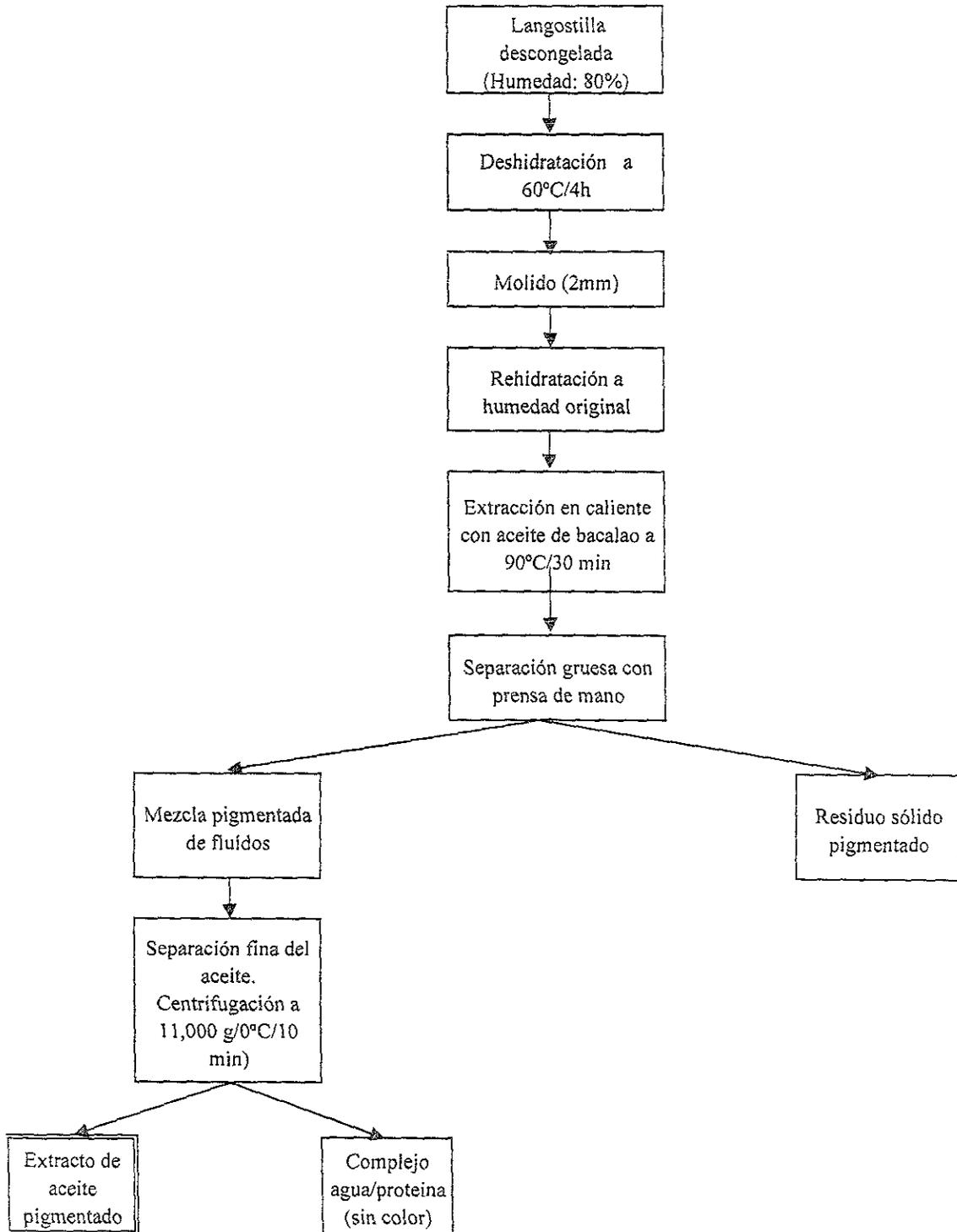


Figura 2. Método de extracción de astaxantina de langostilla, *Pleuroncodes planipes*, con aceite de bacalao adaptado en el laboratorio.

evitar tal merma, y por consecuencia la pérdida de pigmento, se decidió reducir la humedad de los organismos colocándolos en una estufa APEX (tipo 48 BE) con circulación continua de aire a 60°C durante 4 h, tiempo después del cual el contenido de agua fue de 46%. Los organismos se molieron con facilidad. El material molido fue colocado en bolsas negras de polietileno en cantidades aproximadas de 2 kilos por bolsa, con aplicación de vapores de N₂ antes de cerrar y congelado a -20°C hasta el momento de su empleo. Previo a la extracción, el material fue descongelado y colocado en un recipiente de aluminio de peso conocido. Se restituyó la humedad original de los organismos (a 80%) y se le añadió 10% (p/p) de aceite de bacalao (Meyers y Chen, 1985). A diferencia del método de Chen y Meyers (1982), quienes utilizaron aceite de soya para la extracción, en el presente trabajo se utilizó aceite de bacalao con el objeto de dar mayor palatabilidad al alimento y no añadir a las dietas compuestos diferentes a los insumos más importantes en la formulación de la dieta basal, como el aceite y la harina de pescado (J. Almazán, com. pers.). Además del aceite de bacalao, se añadió a la mezcla 0.05% (p/p) de Etoxiquín (6-etoxi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilquinolina), compuesto cuya acción protectora de la astaxantina fue demostrada por Chen y Meyers (1982). La mezcla resultante fue protegida de la luz con papel aluminio y llevada a calentamiento con movimientos periódicos para favorecer una distribución homogénea de calor. Con el propósito de precisar el tiempo de calentamiento y la temperatura puntual de extracción se realizaron ensayos preliminares. En primer lugar, una vez alcanzada la temperatura de 30°C se tomaron alícuotas de 1 ml de aceite a cada 10° C de ascenso hasta llegar a 100°C. En segundo lugar, una vez alcanzado los 100°C de temperatura, se tomaron nuevamente alícuotas de 1 ml a intervalos de 10 min durante un lapso de 60 min. Después de calcular las concentraciones de astaxantina en las alícuotas y de observar que el tiempo y la temperatura tienen un notable efecto en el nivel de recuperación del pigmento, como se ilustra en la Figura 3, se eligió extraer el aceite pigmentado a los 30 min de exposición a una temperatura de 90°C. La fracción fluida de la mezcla fue separada de la parte sólida mediante un colador de 2 mm de abertura y para extraer el aceite de los intersticios, se utilizó una prensa de mano con abertura de 0.5 mm. Para realizar una separación más fina del aceite pigmentado, la mezcla fluida fue llevada a centrifugación a 11,000 g por 10 min a una temperatura de 0°C (Chen y Meyers, 1982). Después de determinar el volumen total del aceite, se hizo el análisis cualitativo y cuantitativo

de astaxantina. Posteriormente se colocó en frascos oscuros de plástico de 100 ml de capacidad, los cuales fueron guardados en congelación a -20°C hasta el momento de su empleo.

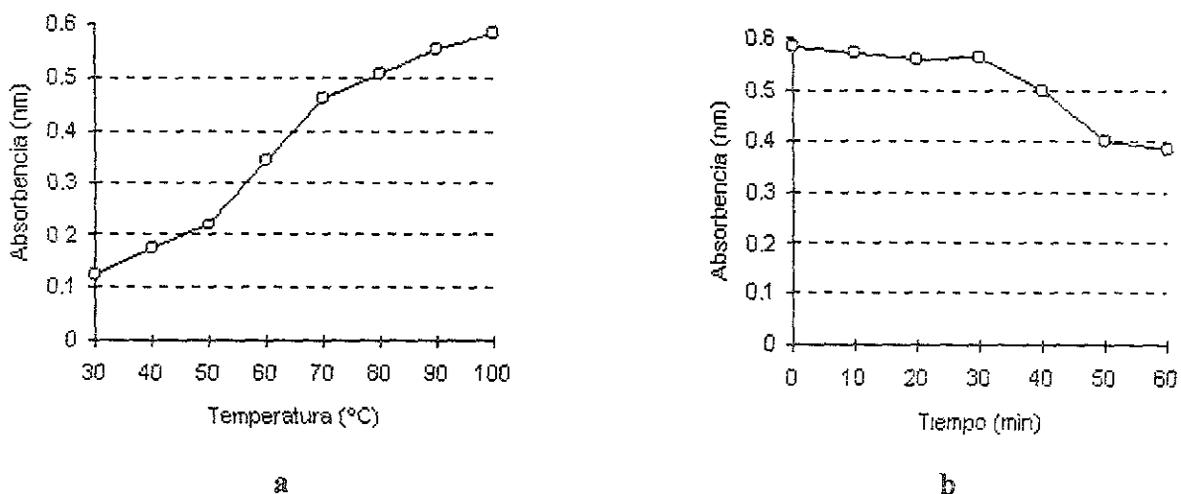


Figura 3. Efecto de la temperatura y el tiempo en la concentración de astaxantina en el aceite de bacalao. (a), Variación de la concentración en relación a la temperatura (b), Variación de la concentración en relación al tiempo de exposición a temperatura constante (100°C).

3A.3. Organismos y condiciones experimentales. El experimento fue llevado a cabo en los meses de julio, agosto y septiembre en el laboratorio húmedo del Centro trutícola “El Zarco”, Edo. de México, la cual se encuentra ubicada en el km 34 de la carretera antigua a Toluca, a 3,400 m snm. Doscientos dieciséis truchas arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, de la variedad “kamloops”, fueron obtenidas de la granja trutícola “Rancho El Pedregal”. Estos ejemplares provinieron de un mismo lote de huevos importados del Canadá por el productor. Las truchas tuvieron al llegar al Centro un peso aproximado de de 185g, todas hembras y en estado de inmadurez sexual. Éstas fueron aclimatizadas en el laboratorio durante cuatro semanas con alimento para truchas 38-10, de 4 mm de diámetro y sin adición de carotenoides, fabricado por Alimentos El Pedregal (Silver Cup) (Edo. de México). Después de dicha etapa, los organismos fueron pesados para dar comienzo al experimento, obteniéndose un peso promedio de $218 \pm 7\text{g}$.

Los peces fueron instalados en 12 tanques de fibra de vidrio con dimensiones de 3.2m x 0.38m x 0.54m, y distribuidos en cuatro tratamientos con tres réplicas cada uno: T1, organismos que recibieron con el alimento astaxantina de langostilla; T2, organismos que recibieron astaxantina de levadura, *Phaffia rhodozyma*; T3, los que consumieron astaxantina sintética del producto Carophyll Pink[®], elaborado por Hoffmann – La Roche, Ltd., Basilea Suiza y T4, grupo testigo sin adición de carotenoides. Los tanques recibieron agua de manantial filtrada con malla de 1 mm de abertura, con circulación abierta a una velocidad de flujo de 16 l/min. La temperatura promedio del agua durante el experimento fue de $9.5 \pm 1.2^\circ\text{C}$, el contenido de oxígeno de 8.32 ± 0.77 ppm y pH de 7.2 ± 0.5 . Dichos tanques estuvieron colocados en el interior del laboratorio a una altura de 1 m, expuestos a un fotoperíodo de 12h x 12h. Para evitar la fuga accidental de los peces estos contenedores fueron protegidos con cubiertas de tul. La limpieza se realizó mediante barrido diario, confinando a los peces en un extremo de los tanques. Dicho procedimiento se intercaló con la extracción del material sólido con un sifón, a partir de la segunda semana.

El período experimental tuvo una duración de seis semanas, con un muestreo intermedio a las tres semanas. Los organismos fueron alimentados manualmente (procurando cubrir la mayor superficie del agua para que todos pudieran comer), en dos aplicaciones diarias. Las raciones suministradas fueron equivalentes a 1.5% de la biomasa por día, siendo corregida en la etapa intermedia del experimento. En la tercera semana y después de 18 h de ayuno, se pesaron individualmente todos los organismos. Tres de ellos fueron extraídos aleatoriamente de cada tina para los análisis de color y concentración de carotenoides en el músculo. El último día del experimento, se registraron nuevamente los pesos de todos los organismos en forma individual y se sacrificaron diez ejemplares por tina para los respectivos análisis.

3A.4. Diseño del experimento. El diseño experimental fue elaborado bajo un modelo aleatorio en donde las variables de respuesta fueron: depósito de astaxantina en el músculo, retención relativa de astaxantina en el músculo, pigmentación muscular medida a partir de los índices luminosidad (L^*), cromaticidad roja o rojicidad (a^*), y cromaticidad amarilla (b^*), tasa específica de crecimiento, factor de conversión alimenticia y mortalidad.

3A.5. Preparación de las dietas. Las dietas elaboradas fueron: D1) Con inclusión de astaxantina de langostilla en extracto de aceite de bacalao; D2) con inclusión de levadura deshidratada, *Phaffia rhodozyma*; D3) con astaxantina sintética (Carophyll Pink®); y D4) sin adición de carotenoides. El alimento basal utilizado en la elaboración de todas las dietas fue el alimento comercial que se empleó en el período de aclimatación, pero adquirido del fabricante antes de ser peletizado, es decir, en forma de harina y sin adición de aceite. Para preparar la dieta con la astaxantina de langostilla (D1), se hidrató la harina previamente a 10% de humedad y se pasó a una peletizadora California® del que se obtuvo un tamaño de partícula de 4 mm de diámetro. A dicho alimento se le añadió un volumen de extracto pigmentado de aceite suficiente para incorporar 75 mg de astaxantina por kg de material. La proporción de aceite añadido fue de 6.2% (p/p). El alimento fue cubierto con el extracto mediante movimientos giratorios de la mezcla en un recipiente circular para permitir una adsorción homogénea del pigmento. Para prevenir el deterioro del carotenoide en el alimento y por carecer de un congelador en el lugar del experimento, dicha astaxantina experimental fue añadida a la dieta cada cuatro días. La dieta para el tratamiento con la levadura, *Phaffia rhodozyma* (D2), se preparó incorporando directamente la levadura deshidratada al alimento basal antes del peletizado, en cantidad calculada para conferirle una concentración de 75 mg de astaxantina por kg de alimento. La levadura fue donada por la empresa Universal Bioventures (Milwaukee, WI, USA), con una concentración de astaxantina en el compuesto de 3%. Análogamente, para elaborar la dieta con la astaxantina sintética (D3), se utilizó el producto comercial Carophyll Pink®, el cual posee una concentración de 8% de astaxantina. Como en el caso anterior, este compuesto fue adicionado al alimento antes del peletizado en cantidad suficiente para incluir 75 mg de astaxantina por kg. Por dieta testigo (D4) se utilizó el alimento comercial de Alimentos El Pedregal (Silver Cup), sin carotenoides añadidos. Una vez peletizadas las dietas D2, D3 y D4, fueron complementadas con 6.2% (p/p) de aceite de bacalao para uniformizar el contenido de este compuesto en el alimento. Todas las dietas fueron protegidas en bolsas negras de plástico y guardadas en refrigeración (4°C) durante el experimento, después de someterse al análisis químico proximal en pruebas por duplicado. Con tal propósito se utilizaron los métodos descritos en el AOAC (1990), e incluidos en el APÉNDICE II de la presente tesis. Para la determinación de la proteína cruda se utilizó el

método 976.05; para el extracto etéreo el método 920.39; para cenizas el 942.05; para fibra cruda el 962.09; y para humedad el 934.01. El extracto libre de nitrógeno fue estimado por diferencia de $100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Proteínas} + \% \text{ EE} + \% \text{ FC} + \% \text{ Cenizas})$. El contenido de energía bruta se calculó empleando una bomba de oxígeno adiabática (Parr Instrument Co., Moline, IL), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3A.6. Toma de muestras. Antes de distribuir los peces en los tanques de experimentación, se tomaron ocho ejemplares al azar para hacer la determinación de pigmentos basales del músculo y la medición colorimétrica del mismo. En la tercera semana después de un ayuno de 24 h, se tomaron aleatoriamente tres peces de cada tanque los cuales fueron pesados, sacrificados, eviscerados y fileteados. Se tomaron las dos porciones laterales del músculo, correspondientes a la parte inferior de la aleta dorsal, de tamaño aproximado de 5x6 cm como se indica en la Figura 4. Éstos fueron utilizados para los análisis de color y contenido de carotenoides, respectivamente. Las muestras para los análisis químicos fueron protegidas de la luz y congeladas a -20°C hasta su empleo, mientras que las destinadas a la medición de color fueron analizadas el mismo día del muestreo. Al finalizar el experimento, se utilizaron diez ejemplares de cada unidad experimental para estos análisis.

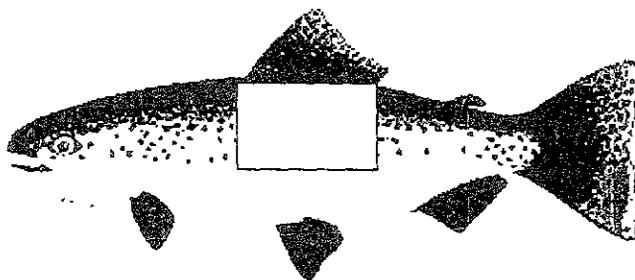


Figura 4. Porción muscular de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, utilizada en los análisis.

3A.7. Análisis de carotenoides

La extracción y análisis de pigmentos se realizó en condiciones de luz reducida y cuando fue necesario, bajo atmósfera de nitrógeno. En todos los casos se utilizaron disolventes orgánicos de grado analítico y como pigmento patrón la astaxantina sintética (Carophyll Pink)

extraída y purificada por cromatografía en capa fina (TLC) antes de cada etapa analítica. Dado a que el carotenoide en el Carophyll Pink posee otros constituyentes como sucrosa, almidón, gelatina y 1% de Etoxiquín como antioxidante (Jyonouchi *et al.*, 2000), la purificación es un procedimiento obligado. Con este propósito, a 0.05g del compuesto se añadió 1 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer y se calentó al baño de María (40°C) durante 5 a 10 segundos para deshacer la cubierta de gelatina de las microcápsulas. Una vez disperso el pigmento, éste se diluyó con 100 ml de acetona. Para separar el carotenoide de la mezcla pigmentada acetona-agua, se puso en un embudo de separación aproximadamente 50 ml de éter de petróleo (EP), 30 ml de disolución pigmentada y 100 ml de agua dejando correr éste por la pared interna del embudo para prevenir formación de emulsión. La fase polar fue drenada. El procedimiento se repitió hasta terminar de lavar la disolución pigmentada. El EP obtenido fue filtrado con filtro de porosidad media provisto de una capa de sulfato de sodio anhidro como deshidratante y con la ayuda de vacío. Al finalizar, se aforó a volumen conocido para llevar al espectrofotómetro y determinar la concentración de astaxantina en la disolución. Para la purificación del carotenoide por cromatografía se tomó una alícuota de 20 ml de disolución, se evaporó con N₂ gaseoso y se redisolvió el pigmento en 5 ml de hexano. La separación cromatográfica se describe en el párrafo 3A.7.d.

3A.7.a. De la langostilla, *Pleuroncodes planipes*. Para este propósito, la langostilla fue descongelada, escurrida y molida en licuadora hasta obtenerse una pasta homogénea. Diez gramos de dicha pasta fue colocada en un mortero en donde se extrajeron los pigmentos con acetona hasta agotar su coloración. La disolución pigmentada fue filtrada con filtro de porosidad media y aforada a volumen conocido. Se registró el espectro de absorción en el intervalo de 300 a 600 nm (UV/VIS), en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-64. Para calcular la concentración de astaxantina se utilizó el dato de la absorbencia del compuesto a 475 nm, pico máximo de absorción del carotenoide en acetona (Buchwald y Jenks, 1968), y el coeficiente de extinción $E_{1\%,1\text{cm}} = 1900$ en el mismo disolvente (Foss *et al.*, 1984), mediante la fórmula de Lambert y Beer:

$$\text{Concentración de astaxantina (mg/kg)} = AD * 10^6 / 100GdE_{1\%,1\text{cm}}$$

donde A = absorbencia (nm), D = volumen total del aceite pigmentado (ml), G = peso de la muestra (g), d = amplitud de la celda (1cm) y $E_{1\%,1\text{cm}}$ = coeficiente de extinción de la astaxantina en el disolvente (Kelley y Harmon, 1972). Para el análisis cualitativo del pigmento se separó una alícuota de 20 ml del extracto, se le aplicó baño de N_2 gaseoso y se mantuvo en congelación a -20°C hasta el momento del análisis.

3A.7.b. De las dietas. La determinación de los pigmentos en las dietas con astaxantina se realizó a las seis semanas. En el caso de la dieta suplementada con astaxantina de langostilla, se colectaron sub-muestras en cada etapa de preparación (cada cuarto día) y se acumularon en un todo para su análisis al finalizar el experimento. Después de homogeneizar la muestra, se pesó 10 g de dieta D1, se colocó en un mortero y se extrajo el pigmento con acetona hasta agotar el color de la muestra. Una vez filtrado y aforado el extracto pigmentado de acetona se procedió al estudio espectrofotométrico y al cálculo de astaxantina, como se señaló anteriormente (inciso 3A.7a). El registro de absorbencia se realizó utilizando como blanco el extracto de la dieta testigo (D4). Del mismo modo a 10 g de alimento con levadura, *Phaffia rhodozyma*, (D2), se extrajo el contenido de carotenoides en un mortero, utilizando etanol como disolvente ya que en este caso dicho alcohol ofreció mejor eficiencia de extracción que la acetona. Un elemento auxiliar en esta extracción fue también la arena de Otawa calcinada que sirvió como abrasivo. Dado a que el alcohol es un disolvente altamente polar, que además de carotenoides puede extraer otros compuestos orgánicos, fue necesario trasladar los pigmentos contenidos en esta disolución a otro disolvente apolar como el éter de petróleo (EP), para lo cual se siguió el procedimiento señalado en el apartado 3A.7. Después de identificar la predominancia de la astaxantina en el espectro de absorción en EP, se calculó su concentración registrando su absorbencia a 470 nm en EP (Davies, 1976), el coeficiente de extinción $E_{1\%,1\text{cm}} = 1910$ (Al-Khalifa y Simpson, 1988), usando como blanco el extracto de la dieta testigo también en EP. El análisis de las dietas con astaxantina sintética (D3) y testigo (D4), se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por No y Storebakken (1991). Después de calcular la concentración del carotenoide en los extractos, éstos fueron evaporados en un rotavapor a 40°C hasta reducir su volumen a 20 ml, fracción que se conservó para el estudio

cromatográfico. El cálculo de astaxantina en todos los casos se hizo con la fórmula de Lambert y Beer.

3A.7.c. Del músculo de la trucha arcoiris, *O. mykiss*. Los filetes fueron descongelados, limpiados (eliminándose restos de piel o espinas) y triturados finamente con la ayuda de un cuchillo. Después de homogeneizar bien el tejido se pesó por duplicado 10 g de material, el cual se deshidrató durante 30 min con una cantidad similar en peso de sulfato de sodio anhidro. Seguidamente, se colocó la muestra en un mortero donde se extrajeron los pigmentos con acetona hasta agotar el color. El extracto así obtenido fue filtrado y los carotenoides transferidos a EP con el procedimiento ya conocido. Luego de obtener el espectro de absorción (300-600 nm), se calculó el contenido de astaxantina en el tejido registrando su absorbencia a 470 nm y $E_{1\%,1\text{cm}} = 1910$, usando como blanco EP. Como en el caso anterior, los extractos fueron evaporados y conservados en congelación a temperatura de -20°C para el estudio cromatográfico posterior.

3A.7.d. Análisis cromatográfico en capa fina (TLC). Además del espectro de absorción UV/VIS, otro elemento de juicio que permite una identificación más precisa de los carotenoides y de su composición, es el estudio cromatográfico en capa fina (TLC), realizado en forma simultánea con el pigmento patrón. Las alícuotas de los extractos pigmentados preservadas para este fin fueron evaporadas con N_2 gaseoso y redisueltas en hexano para su aplicación a las placas cromatográficas (el pigmento diluido en hexano eluye en forma más compacta a través de la fase estacionaria que en otro disolvente). Como fase estacionaria se utilizaron placas aluminizadas de gel de sílice (20 x 20, 60 F254, E. Merck), activadas (a $120^{\circ}/1\text{h}$), en las cuales las muestras fueron aplicadas en forma de barra y eluidas con la mezcla de disolventes acetona-hexano (30:70, v/v), siguiendo las recomendaciones de Skoog y West, (1975). La identificación de los carotenoides fue basada en los valores R_f , calculados con la fórmula:

$$R_f = \text{distancia del movimiento del soluto} / \text{distancia del movimiento del disolvente}$$

Las bandas separadas fueron sujetas a estudio espectrofotométrico el cual se hizo extrayendo cada una por raspado y disolviéndola en acetona. Se obtuvieron entonces los espectros de absorción característicos de los carotenoides. En el caso de la astaxantina de langostilla, se determinó el R_f de cada fracción y se obtuvo su espectro de absorción. La astaxantina esterificada es una forma no comercial del pigmento, hecho que dificulta la obtención de dicho compuesto para fines de patrón. Por tal razón, la identificación de estas fracciones se llevó a cabo solo por determinación de los R_f de las bandas y comparación de resultados con los datos disponibles en la literatura. El cálculo de proporcionalidad de cada una de ellas se realizó en función de la absorbencia total de las tres fracciones de la muestra.

Para purificar el patrón de astaxantina, una vez eluido el carotenoide sintético, éste fue separado de la placa cromatográfica raspando la banda pigmentada de donde se extrajo el pigmento con un volumen no mayor de 3 ml de acetona, el cual fue filtrado, evaporado con N_2 y redisoluto con hexano para ser utilizado en paralelo con las muestras problema en los estudios cromatográficos (TLC), o con EP para los estudios espectrofotométricos.

3A.8. Retención de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris (RAM). Este parámetro se define tradicionalmente como la cantidad de carotenoide retenido en el músculo, con respecto al ingerido con el alimento (Torrissen, 1985). Dada la dificultad que implica el cálculo preciso de la cantidad de alimento ingerido en los organismos acuáticos, se han propuesto numerosas fórmulas para su determinación sin definirse hasta el momento un método estándar. La fórmula empleada en el presente estudio fue propuesta por (Hatlen *et al.*, 1995):

$$\text{RAM (\%)} = (C_T \times W_T - C_t \times W_t) \times 0.49 / (W_T - W_t)$$

donde C_t y C_T , representan el contenido de pigmento muscular (mg/kg) en los tiempos inicial (t) y final (T), respectivamente; W_t y W_T , pesos promedio (g) de los peces en tiempos (t) y (T) y 0.49, que corresponde al porcentaje del músculo (49%) en los organismos eviscerados.

3A.9. Medición colorimétrica del músculo de la trucha arcoiris. El color de los filetes fue medido instrumentalmente con un colorímetro (Hunter Lab D25-PC2), utilizando los índices L^* , a^* y b^* (L^* =luminosidad o brillo del color, a^* =cromaticidad roja o rojicidad y b^* =cromaticidad amarilla, respectivamente) (CIE, 1986). Estos valores fueron determinados para cada filete por cuadruplicado, girando la muestra 90° sobre el plano horizontal entre cada lectura para obtener un valor promedio más representativo. Uno de los parámetros empleados para medir la pigmentación del músculo fue la tonalidad o *hue* (H°_{ab}). Este parámetro se refiere al color de la muestra en su variación del amarillo al rojo (Hope y Walch, 1990). Es calculado a partir de los valores de a^* y b^* con la fórmula:

$$H^\circ_{ab} = \tan^{-1} b^*/a^*$$

Los valores angulares de (H°_{ab}) más cercanos a 0° corresponden a rojo intenso, mientras que los valores más cercanos a 90° , corresponden a amarillo pálido (Skrede y Storebakken, 1986; Choubert *et al.*, 1992). Otro parámetro auxiliar utilizado fue el Croma (C^*). Éste representa la pureza o intensidad de un color. El rojo, por ejemplo, es un color de fuerte crom a diferencia del rosa (Hope y Walch, *op cit.*). Su cálculo se hizo mediante la fórmula empleada por Choubert *et al* (1992):

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

donde a^* =cromaticidad roja y b^* =cromaticidad amarilla.

3A.10. Tasa específica de crecimiento de la trucha arcoiris (TEC). Este parámetro representa el incremento diario del peso corporal de los peces. Fue calculado al finalizar el experimento de acuerdo a la fórmula:

$$TEC = [(\ln W_1 - \ln W_0) / (\#d)] \times 100,$$

donde \ln = logaritmo natural, W_0 = peso inicial, W_1 = peso final y #d = días de suministro de alimento (Torrissen, 1989).

3A.11. Factor de conversión alimenticia de la trucha arcoiris (FCA). Medición que habitualmente es utilizada por los acuicultores como índice de productividad (Klontz, 1991a). Fue calculada al finalizar el experimento con la fórmula:

$$\text{FCA} = \text{Alimento suministrado (g)/ganancia de peso de los organismos (g)}$$

3A.12. Signos patológicos y mortalidad de la trucha arcoiris. En cada etapa de muestreo se examinaron algunas características externas como internas de los peces con el objeto de identificar signos clínicos de posibles enfermedades. Las características examinadas fueron comportamiento de los peces, aspecto y coloración de las branquias, manchas en la piel, tamaño y coloración del hígado. La mortalidad fue determinada por recuento de los organismos fallecidos en relación al número inicial de organismos vivos y expresado en unidades porcentuales (Torrissen, 1984).

3A.13. Análisis estadístico de los resultados. La homogeneidad de la varianza fue determinada mediante la prueba de Bartlett. Los datos obtenidos fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), considerando como variables dependientes la concentración de astaxantina en el músculo, retención del pigmento, rojicidad (a^*), tonalidad del color, croma, tasa específica de crecimiento, y conversión alimenticia; y como variables independientes, la fuente de astaxantina o el tiempo de alimentación. Para determinar el efecto conjunto de la fuente de astaxantina y el tiempo de ingestión, se hizo un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Cuando se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, se determinó la igualdad o diferencia entre ellos a las 3 y 6 semanas, mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD), con un valor de $\alpha = 0.05$. Las relaciones entre el contenido de astaxantina en el músculo y la cromaticidad roja (a^*), cromaticidad amarilla (b^*), luminosidad (L^*), y tonalidad del color (H^{ab}) como variables dependientes fueron sometidas a un análisis de regresión lineal, de acuerdo con el modelo $y = a + bx$, donde y denota el valor de

la variable dependiente, x la concentración del carotenoide. Todas las pruebas fueron realizadas con el paquete estadístico STATISTICA, versión 4.5 (1994).

3B. Experimento en condiciones piloto

3B.1. El aceite de langostilla, *Pleuroncodes planipes*. En la presente etapa experimental se utilizó como fuente de astaxantina el aceite de langostilla obtenido de la producción industrial de harina del crustáceo, proceso que es llevado a cabo en la Planta harinera de la Empresa Conservera San Carlos, S.A. de C.V. (Pto. San Carlos, B.C.S.), bajo la supervisión del personal del Laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR (La Paz, B.C.S.). En dicho proceso los organismos de langostilla fueron sometidos a cocción durante 20 minutos a temperaturas de 86 a 88°C y prensados para obtenerse el agua de cola, de donde es extraído el aceite por centrifugación (Civera *et al.*, 1999). El aceite colectado fue enviado en un garrafón de plástico al laboratorio de análisis del Departamento de Nutrición de la Universidad Iberoamericana de la Ciudad de México. Para prevenir el deterioro del carotenoide en el compuesto, se añadió al garrafón 0.05% de etoxiquín, baño de N₂ gaseoso y se guardó en congelación a -15°C hasta el momento de ser utilizado.

3B.2. Organismos y condiciones experimentales. El experimento tuvo lugar en las instalaciones de la Granja Piscícola “Los Alevines”, ubicada a 2,300 m sobre el nivel del mar en el municipio de Amanalco de Becerra, Edo. de México, a 48 km de la ciudad de Toluca. Dicha granja es una de las unidades de producción más importantes del sector privado que opera en el país, con una producción de 100 ton/año. Los organismos que se producen en dicho lugar, en la opinión de su propietario (A. Medina, com. pers.), pertenecen a una mezcla de diferentes líneas genéticas, entre ellas, “kamloops”, “shasta” y la variedad local “zarco”. Cuatrocientos noventa y dos peces, con peso promedio de 254g fueron extraídos con red de pescar de uno de los estanques grandes de barro y trasladados a diez estanques circulares de concreto, de 3 m de diámetro y 90 cm de profundidad, emplazados a nivel del terreno y rodeados por vegetación gramínea. Dichos estanques poseían un inyector tubular de aire colocado en el centro y recibían agua de manantial transportada a través de un canal de

aproximadamente 50 m de longitud, la cual antes de ingresar a las unidades experimentales pasaba por un estanque somero de sedimentación. En los estanques de concreto el agua circulaba en sistema abierto, a una velocidad de 40 l/min. La temperatura promedio del agua durante el período experimental fue de $15 \pm 2.2^\circ\text{C}$, el $\text{pH} = 7.1 \pm 0.03$, el contenido de oxígeno disuelto de 6.6 ± 0.02 ppm y 0.08 ± 0.11 mg/l de amoníaco (NH_3). Los peces fueron distribuidos en tres tratamientos experimentales: T1, organismos que recibieron alimento con una inclusión de 50 mg de astaxantina de langostilla por kg de alimento; T2, con 75 mg/kg y T3, con 100 mg/kg del mismo pigmento. Paralelamente se alimentaron a dos grupos de peces, el primero como tratamiento de referencia (T4), los cuales recibieron alimento comercial pigmentado con la mezcla de carotenoides astaxantina-cantaxantina (Ax-Cx) (70% Ax:30% Cx) con una concentración de 90 mg/kg, fabricada por Alimentos Purina S.A. de C.V. Este alimento es vendido a los truticultores de la región para producir trucha pigmentada o “salmonada”. El segundo grupo (T5) fungió como testigo y consumieron alimento comercial elaborado igualmente por Alimentos Purina S.A. de C.V., sin adición de carotenoides. Después de tres días de ayuno, se procedió a alimentar a los animales con una ración diaria equivalente al 1.5% de la biomasa, en dos aplicaciones diarias (10h y 16h).

3B.3. Preparación de las Dietas. La dieta basal empleada fue el alimento comercial fabricado por Alimentos Purina S.A. de C.V., de 4 mm de diámetro y sin carotenoides añadidos. Este alimento concentrado es utilizado habitualmente en la granja trutícola de Amanalco. Las dietas experimentales D1, D2 y D3, fueron preparadas añadiendo a la dieta basal volúmenes calculados de aceite de langostilla para incorporar 50, 75 y 100 mg de astaxantina por kg de alimento, respectivamente. La incorporación del aceite se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el experimento anterior (apartado 3.A5). A las dietas D4 y D5, se les añadió mediante el mismo procedimiento aceite de soya para tratar de uniformizar el contenido de lípidos con respecto a las primeras. Dado el espacio limitado en el refrigerador de la granja, las dietas experimentales se prepararon cada dos semanas y se almacenaron en bolsas oscuras a 4°C . Después de cada preparación se tomaron fracciones de muestras, las cuales fueron guardadas en congelación a -15°C , para la medición de carotenoides al final del experimento. La composición química proximal de las dietas fueron determinadas por el personal del Centro

de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. con la metodología descrita en el AOAC (1990), adjunta en la sección Anexos II. El extracto libre de nitrógeno fue estimado por diferencia de $100 - (\% \text{Proteínas} + \% \text{EE} + \% \text{FC} + \% \text{Cenizas})$ y el contenido de energía bruta se calculó por calorímetro adiabático.

3B.4. Toma de muestras. Al comenzar el experimento se extrajeron cinco organismos adicionales del estanque grande para los análisis de color y contenido basal de carotenoides en el músculo. Posteriormente, antes de cada muestreo los peces fueron mantenidos en ayuno durante 18 h. Con el propósito de evitar mucha manipulación en las etapas intermedias (2, 4, y 6 semanas), se pesaron en lote 10 ejemplares de cada estanque, de donde se tomaron aleatoriamente dos organismos para el análisis de color y contenido de carotenoides. La extracción y conservación del músculo fue realizado en forma análoga al experimento anterior. Al término del experimento se pesaron en lote todos los ejemplares remanentes de cada estanque, de donde se extrajeron dos de cada uno para los respectivos análisis. La operación de pesado en todas las etapas se efectuó con una balanza de plataforma y con la ayuda de un contenedor de 40 l de capacidad.

3B.5 Análisis de los carotenoides

3B.5.a. Del aceite de langostilla. Después de homogeneizar el compuesto en el garrafón de plástico que lo contenía, se extrajeron por triplicado volúmenes de 10 ml de aceite para la determinación de astaxantina. De cada uno de ellos, se hicieron diluciones 1:100 en EP para determinar su espectro de absorción en el intervalo de 300 a 600 nm, en paralelo con la astaxantina patrón la cual fue preparada como se refirió en la sección 3A.7. Igualmente la concentración de astaxantina fue calculada con la fórmula de Lambert y Beer (Kelley y Harmon, 1972), utilizando el valor de absorbencia del carotenoide en EP así como su coeficiente de extinción (470 nm, $E_{1\%,1\text{cm}} = 1910$). La determinación cualitativa del compuesto en el aceite y el cálculo proporcional de las diferentes fracciones de astaxantina fueron realizados mediante la técnica cromatográfica en capa fina (TLC), descrita en el experimento anterior (inciso 3A.7.d).

3B.5.b. De las dietas. La determinación de los carotenoides en las dietas se realizó al término del experimento. Las fracciones de muestras correspondientes a las dietas experimentales (D1, D2, y D3) recolectadas a las 2, 4, 6 y 8 semanas, fueron integradas en una sola muestra por cada tratamiento para este fin. Los análisis fueron realizados por duplicado siguiendo los pasos indicados en el experimento de laboratorio, a excepción de la dieta D4 la cual fue lamentablemente extraviada. El extracto en EP perteneciente a la dieta basal (D5), mostró un fuerte color amarillo. Para determinar la naturaleza de dicho pigmento, se evaporó una alícuota de 10 ml del extracto, se redisolvió en etanol (disolvente más indicado para la determinación de xantofilas amarillas) y se obtuvo el espectro de absorción en la región visible (UV/VIS). Después de identificar la curva espectral típica de la luteína, cuyo pico máximo de absorción se manifiesta a 445 nm en etanol (Davies, 1976), se calculó su concentración utilizando el coeficiente de extinción ($E_{1\%,1\text{cm}} = 2550$ en el mismo disolvente (Rodríguez-Amaya, 1999). Parte de la disolución en EP se conservó para la prueba cromatográfica. Los carotenoides de las dietas con aceite de langostilla (D1, D2 y D3), fueron extraídos en acetona y trasladados a éter de petróleo como se indicó anteriormente (3A.7), para ser analizadas espectrofotométricamente utilizando como blanco el extracto amarillo obtenido de la dieta basal. La concentración de carotenoides en la dieta D4 fue considerada de acuerdo a las especificaciones del fabricante, esto es, 90 mg de mezcla Ax-Cx (70%Ax:30%Cx) por kg de alimento (J. Zendejas, Purina S.A. de C.V., com.pers.). El análisis cualitativo de los pigmentos en las dietas fue efectuado mediante la prueba cromatográfica en capa fina (TLC), indicado en el inciso 3A.7.d.

3B.5.c. Del músculo de la trucha arcoiris, *O. mykiss*. La extracción de los pigmentos fue realizada como se describió en el ensayo anterior (3A.7.c). Después de obtener los espectros de absorción de cada una de las muestras, en el intervalo 300 a 600 nm, se identificaron los carotenoides atendiendo a las formas particulares del espectro y a los picos máximos de absorción. Los picos aparecidos a 445 nm en EP fueron considerados como luteína, atendiendo a los criterios especificados por Rodríguez-Amaya (1999); a 449 nm en EP como zeaxantina (Davies, 1976; Rodríguez-Amaya, 1999); y entre 470 a 472 nm como astaxantina (Buchwald y

Jencks, 1968). La confirmación de la identidad de cada uno de los compuestos se hizo por cromatografía en capa fina (TLC) con el auxilio de los pigmentos patrón.

3B.5.d. Análisis cromatográfico en capa fina (TLC). Una vez concentrados con vapores de N₂ los pigmentos del extracto y redisueltos en hexano, fueron aplicados en las placas cromatográficas (placas de vidrio con gel de sílice 20 x 10, 60 F254, E. Merck) y eluidos con la mezcla acetato de etilo-hexano (2:1, v/v). Después de ser reveladas las bandas se calcularon los R_f de cada una. En el caso de la astaxantina proveniente del aceite de langostilla se determinó el contenido proporcional de sus fracciones libre y esterificadas, y en el caso de las dietas experimentales como del músculo de los organismos experimentales y del tratamiento de referencia, se identificaron los carotenoides acompañantes de la astaxantina. Los patrones de astaxantina y cantaxantina fueron obtenidos a partir de los compuestos Carophyll Pink y Carophyll Rose, respectivamente (la concentración de cantaxantina en este último caso es 10%), purificando los carotenoides por cromatografía (TLC) como se explicó en la sección 3A.7. El patrón de luteína fue obtenido como pigmento estándar de grado II (93% luteína, 4.7% zeaxantina) (Hoffmann-Roche, Basilea Suiza). Con el objeto de verificar la identidad de cada pigmento, se registró el espectro de absorción UV/VIS de cada banda. Este registro, así como los valores R_f de las bandas resultantes fueron comparados con los resultados de los pigmentos patrón. La máxima absorción de la cantaxantina fue detectada a los 463 nm en EP como corresponde según Davies (1976).

3B.6. Retención de carotenoides en el músculo de la trucha arcoiris (RCM). Este parámetro fue calculado con la fórmula empleada en el experimento anterior. En el presente caso el porcentaje del músculo en los organismos eviscerados fue 40%.

3B.7. Medición colorimétrica del músculo de la trucha arcoiris. El procedimiento para este propósito fue similar al descrito en el experimento de laboratorio (apartado 3A.9).

3B.8. Tasa específica de crecimiento de la trucha arcoiris (TEC)**3B.9. Factor de conversión alimenticia de los organismos (FCA)**

Ambos índices fueron calculados a las ocho semanas con las fórmulas señaladas en los incisos 3A.10 y 3A.11.

3B.10. Signos patológicos y mortalidad de la trucha. Los exámenes a los peces fueron realizados siguiendo los mismos criterios contemplados en el experimento en condiciones de laboratorio (sección 3A.12).

3B.11. Análisis estadístico de los resultados. Del mismo modo, los datos obtenidos en esta etapa fueron evaluados utilizando las mismas herramientas empleadas en el experimento anterior y con el mismo paquete estadístico. Cuando se encontró diferencia significativa entre los tratamientos se determinó la igualdad o diferencia entre los mismos a las 2, 4, 6 y 8 semanas.

4. RESULTADOS

4A. Del experimento en condiciones de laboratorio

4A.1. Astaxantina en la langostilla, *Pleuroncodes planipes*

Atendiendo a los principales criterios para el análisis e identificación de los carotenoides, recomendados por Schiedt y Liaaen-Jensen (1995) y Rodríguez-Amaya (1997), el carotenoide observado en los organismos enteros de langostilla fue la astaxantina (Ax). El registro espectrofotométrico del pigmento mostró su típica curva de absorción, representada en la Figura 5, análoga al del pigmento patrón o astaxantina sintética (Carophyll Pink).

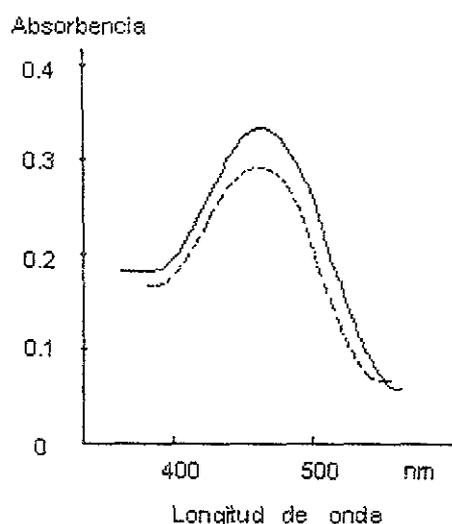


Figura 5. Espectro de absorción de la astaxantina en los organismos enteros de langostilla, *Pleuroncodes planipes*. Ax en la langostilla (---); Ax en el pigmento patrón (—) (λ_{\max} =470 nm en EP).

El contenido total de este carotenoide fue 145 mg por kg de langostilla. El análisis cromatográfico en capa fina (TLC) mostró la composición del compuesto caracterizado por tres bandas o fracciones de astaxantina, esquematizadas en la Figura 6, cuyas proporciones fueron $23.87 \pm 0.92\%$ como astaxantina libre, $40.44 \pm 0.33\%$ como astaxantina monoesterificada y $35.81 \pm 0.56\%$ como astaxantina diesterificada (Tabla 1).

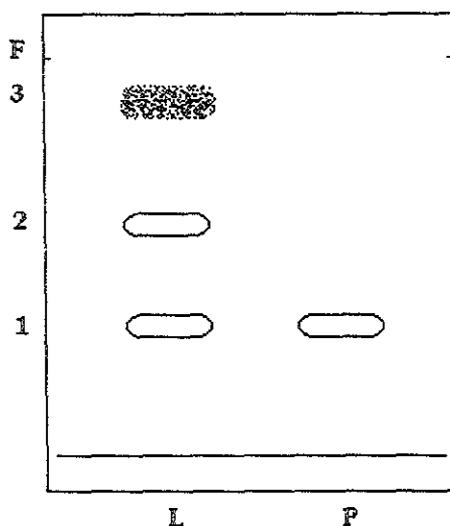


Figura 6. Separación cromatográfica (TLC) de la astaxantina de langostilla, *P. planipes*. L, Ax de langostilla; P, Ax patrón (Carophyll Pink). Bandas: 1, Ax libre; 2, Ax monoesterificada; 3, Ax diesterificada; F, frente de elución. Mezcla eluyente: hexano-acetona (70:30, v/v).

Tabla 1. Contenido y composición de carotenoides en la langostilla, *P. planipes*; en el extracto de aceite; y en las dietas empleadas en el experimento de laboratorio.

Carotenoides	Langostilla entera	Extracto en aceite	Dieta 1 (langostilla)	Dieta 2 (levadura)	Dieta 3 (Carophyll)
Astaxantina (Ax)					
Contenido teórico (mg/kg)			75	75	75
Contenido total (mg/kg)	145.00±0.15	61.00±0.29	72.10±0.35	72.44±0.79	72.87±0.36
Libre (%)	23.87±0.92	8.43±0.76	8.40±0.77	75.05±0.56	100
Monoéster (%)	40.44±0.33	20.32±0.77	19.92±0.20	Nd	Nd
Diéster (%)	35.81±0.56	72.27±1.06	72.43±1.10	Nd	Nd
Otros carotenoides (%)	Nd	Nd	Nd	24.67±0.72 ¹	Nd

¹No identificados. Nd = no detectados.

No se observó otro carotenoide asociado con la astaxantina en el crustáceo. Los valores R_f de las fracciones en la mezcla de disolventes hexano-acetona (70:30, v/v) fueron 0.3 para la astaxantina libre, 0.6 para la monoesterificada y 0.8 para la diesterificada, datos coincidentes con los publicados por Schiedt *et al.* (1993) y Fan *et al.* (1995).

4A.2. Astaxantina en el extracto de aceite y en las dietas

El aceite de bacalao después del proceso de extracción caliente presentó un color rojo-naranja intenso y de aspecto cristalino, con un contenido de astaxantina de 112 mg por 100 g de aceite. El nivel de recuperación del carotenoide por kg de langostilla entera fue de 61 mg, equivalente a 41% del obtenido con acetona. La composición química de la astaxantina una vez en disolución con el aceite (Fig. 7), se conservó semejante a la presentada en la langostilla entera, aunque su contenido proporcional fue modificado, mientras que en la dieta experimental éste se conservó inalterado, como se aprecia en la Tabla 1. Las dietas D2 y D3, presentaron por

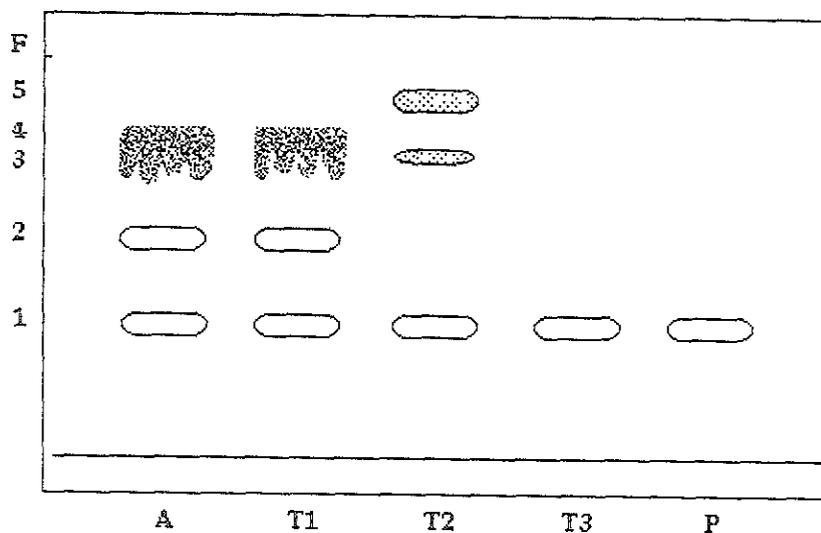


Figura 7. Separación cromatográfica (TLC) de la astaxantina en el extracto de aceite de bacalao y en las dietas utilizadas en los tratamientos del experimento en condiciones de laboratorio. A, extracto de aceite de bacalao; D1, D2 y D3, dietas suplementadas con Ax de langostilla, con levadura, *P. rhodozyma* y con Ax sintética (Carophyll Pink), respectivamente. P, Ax patrón (Carophyll Pink). Bandas: 1, Ax libre; 2, monoéster; 4, diéster; 3 y 5, carotenoides no identificados, F, frente de elución. Mezcla eluyente: hexano-acetona (70:30, v/v).

su parte 75.05% y 100% de astaxantina libre, respectivamente. En la dieta basal (D4) utilizada también como alimento para el grupo testigo, se registró un contenido de 0.9 mg/kg de carotenoides totales que dada su mínima concentración no permitió su determinación cromatográfica (TLC).

4A.3. Composición química de las dietas

Dado que el alimento basal para todas las dietas perteneció al mismo lote, la composición química proximal y energía bruta de las mismas fueron similares durante el estudio, como se muestra en la Tabla 2. El carácter distintivo entre ellas fue la fuente de astaxantina y su composición.

Tabla 2. Composición química proximal y contenido energético de las dietas empleadas en el experimento de laboratorio.

Componente (g/100g) ¹	Fuente de astaxantina en la dieta			
	Langostilla (Dieta 1)	Levadura (Dieta 2)	Carophyll (Dieta 3)	Dieta testigo (Dieta 4)
Humedad	10.3±0.18	9.1±0.20	9.4±0.15	9.5±0.17
Proteína cruda	36.2±0.21	36.9±0.23	35.9±0.19	36.5±0.16
Extracto etéreo	11.2±0.06	11.3±0.15	11.2±0.12	10.9±0.09
Cenizas	6.5±0.05	6.8±0.09	6.5±0.07	6.4±0.07
Fibra cruda	2.6±0.23	2.9±0.21	2.8±0.18	2.8±0.20
ELN ²	33.2	33.0	34.2	33.9
Energía (Kcal/g)	3.974±0.22	4.185±0.19	3.927±0.30	4.155±0.25

¹Media ± desviación estándar. Resultados expresados en base seca

²Extracto libre de Nitrógeno.

4A.4. Depósito de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris, *O. mykiss*.

El análisis estadístico de los resultados mostró que tanto la fuente de astaxantina en las dietas como el tiempo de ingestión de las mismas, influyeron significativamente ($P < 0.01$) sobre el contenido del carotenoide en el músculo, como expresa la Figura 8.

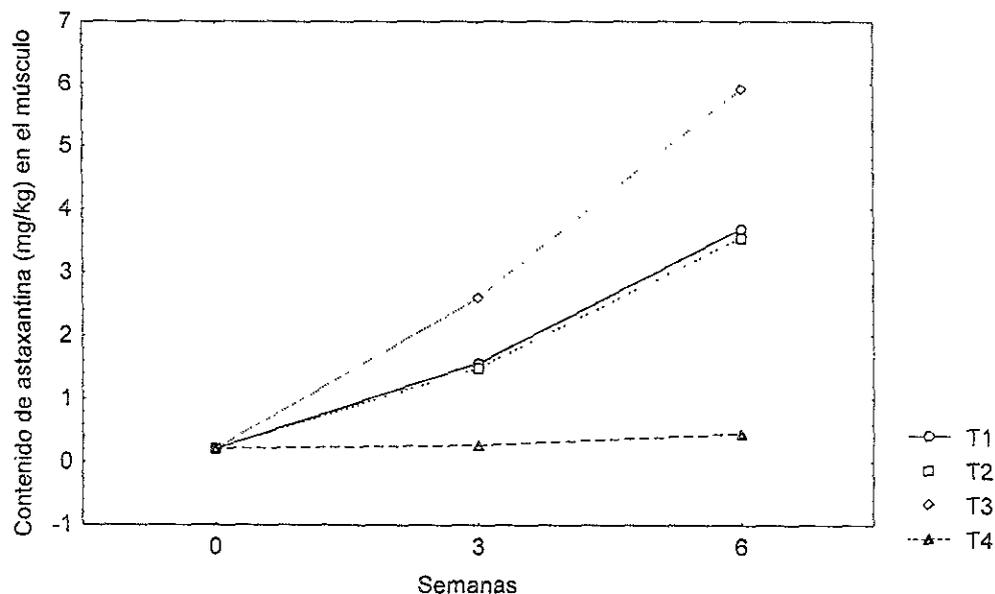


Figura 8. Depósito de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris en función de las fuentes del carotenoide en el alimento y el tiempo de ingestión, en el experimento de laboratorio. T1, con Ax de langostilla; T2, con Ax de levadura *P. rhododzyma*; T3, con Ax sintética (Carophyll Pink); T4, grupo testigo. $F(6,240)=95.16$; $p < 0.001$

El contenido promedio del carotenoide en el músculo de los organismos se presenta en la Tabla 3. El análisis cromatográfico demostró que la astaxantina fue depositada en el tejido únicamente en forma libre. La concentración del carotenoide en el músculo de los organismos que recibieron el pigmento de langostilla (T1), así como de aquellos que recibieron levadura, *P. rhodozyma* (T2), fue significativamente menor ($P < 0.05$) que la obtenida en los peces tratados con astaxantina sintética (Carophyll Pink) (T3). Este patrón de comportamiento se conservó hasta el término del experimento en la sexta semana, mientras que los tres tratamientos fueron significativamente diferentes ($P < 0.01$) con respecto al grupo testigo (T4).

Tabla 3. Contenido de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris y cinética de depósito durante el experimento en condiciones de laboratorio.

Tratamientos/ Fuente de Ax	Contenido de astaxantina en el músculo (mg/kg)			Tasa de Depósito ¹ (mg/kg/d)		
	Semanas	0	3	0-3	3-6	
T1 (Langostilla)		0.21±0.4	1.56±0.25 ^b	3.68±0.75 ^b	0.07	0.11
T2 (Levadura)		0.21±0.4	1.48±0.36 ^b	3.54±0.63 ^b	0.06	0.10
T3 (Carophyll)		0.21±0.4	2.59±0.51 ^a	5.91±1.36 ^a	0.12	0.17
T4 (Testigo)		0.21±0.4	0.27±0.08 ^c	0.40±0.10 ^c		

Media ± d.e. ^{a,b,c} Medias con literales diferentes entre tratamientos en la misma semana indican diferencia significativa (P<0.05). ¹Tasa de depósito (mg/kg/día) = Contenido de Ax final-Contenido de Ax inicial / días de alimentación, en las semanas 0 a 3 y 3 a 6

Un rasgo interesante observado en los organismos experimentales fue la menor variación en el contenido de astaxantina muscular, expresada en una desviación estándar más pequeña con respecto a los organismos sujetos a la astaxantina sintética (Carophyll Pink). Otro hecho que llamó la atención fue que los peces con mayor contenido de astaxantina en el músculo (9 organismos pertenecientes al tratamiento con astaxantina sintética), presentaron en la sexta semana ovarios muy pigmentados y de mayor tamaño, con un contenido de astaxantina de 3.5±2.5 mg/kg.

También en la Tabla 3 se puede apreciar que la tasa de acumulación del pigmento en el músculo de los ejemplares del tratamiento con astaxantina de langostilla fue de 0.07 mg/kg/día durante las primeras tres semanas, esto es 42% menor con respecto al observado en los organismos del tratamiento con la astaxantina sintética (Carophyll Pink), en los cuales dicho cociente fue de 0.12 mg/kg/día. Dicha tendencia fue invertida en la segunda etapa, en la cual, en el primer grupo la tasa de depósito tuvo un incremento de 1.6 veces (57%), mientras que en el segundo fue ligeramente inferior (de 1.4 veces o 42%).

4A.5. Retención de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris (RAM)

La Figura 9 señala que la retención del pigmento de la langostilla (T1) y de la levadura (T2) en el músculo de la trucha a las seis semanas fueron similares, calculadas en $5.62 \pm 0.54\%$ y $5.24 \pm 0.40\%$, respectivamente. Ambas mediciones fueron significativamente menores ($P < 0.01$) a la obtenida con la astaxantina sintética (Carophyll Pink), la cual alcanzó a $8.81 \pm 0.54\%$.

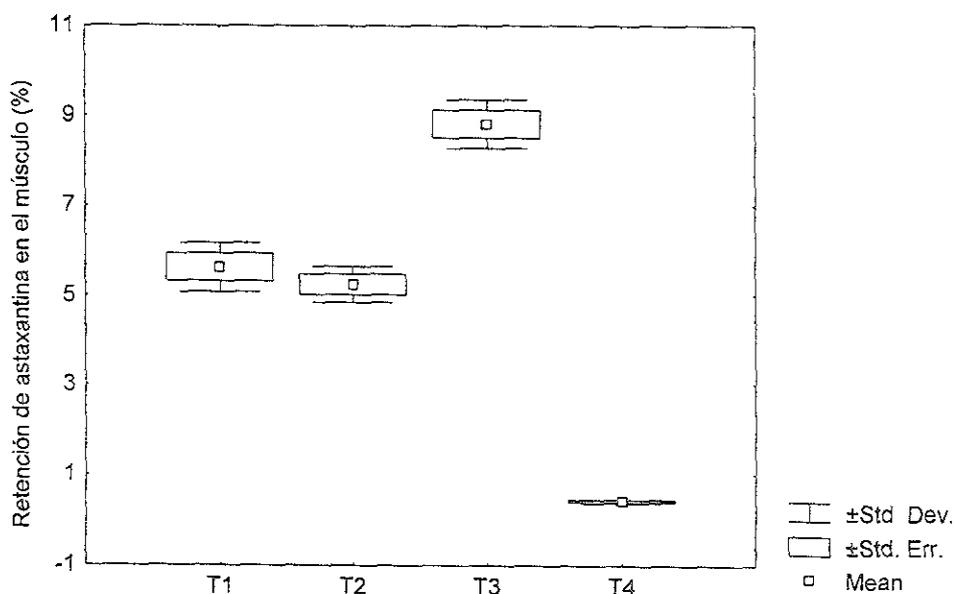


Figura 9. Retención de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris a las seis semanas, en el experimento de laboratorio. Tratamientos: T1, con Ax de langostilla, T2, con Ax de levadura *P. rhodozyma*; T3, con Ax sintética (Carophyll Pink); T4, grupo testigo.

4A.6. Pigmentación del músculo de la trucha arcoiris

Todos los peces que tuvieron astaxantina en la dieta exhibieron a partir del décimo día una coloración rosa brillante en la piel a lo largo de la línea lateral, siendo ésta más intensa después de la tercera semana y extendiéndose hasta los opérculos (Fotografía 4, ANEXO I). Entre todos, los organismos que recibieron astaxantina sintética (Carophyll Pink) presentaron una pigmentación externa más acentuada. Un rasgo interesante observado en el 20% de dichos ejemplares al finalizar la sexta semana fue la pigmentación rojo brillante de ovarios

acompañado de un ligero incremento de tamaño de dichos órganos, con respecto los demás organismos del mismo tratamiento y de los tratamientos T1 y T2. El incremento de la pigmentación externa de los peces se vio reflejado en la pigmentación del músculo durante las seis semanas, percibido tanto visual como colorimétricamente como consta en la Tabla 4 en la cual se exponen las variaciones de los índices L*, a*, b*. En dicha Tabla se puede apreciar que tanto la fuente de astaxantina en el alimento como el tiempo de ingestión tuvieron un efecto altamente significativo ($P < 0.001$) sobre los índices colorimétricos. Es notable también que entre la 3ª y 6ª semana, el promedio de los niveles de rojicidad (a*) en el músculo de los peces tratados con astaxantina de langostilla (T1) tuvo un incremento de 67%, seguido por los organismos del tratamiento con levadura (T2) *P. rhodozyma* (64%), mientras que en los ejemplares correspondientes al tratamiento con astaxantina sintética (Carophyll Pink) (T3), dicho incremento fue de 34%.

Tabla 4. Variación colorimétrica del músculo de la trucha arcoiris bajo la influencia de las diferentes fuentes de astaxantina en el alimento, en el experimento de laboratorio.

Tratamientos/ Fuente de Ax	Semana	L*	a*	b*	C*	(H°) _{ab}
	0 ¹	67.30±1.9	1.52±0.9	9.24±1.3	9.36±1.1	80.59±1.3
T1 (Langostilla)	3	55.15±2.0	11.13±1.9 ^b	13.53±1.1	17.55±2.0 ^b	50.27±2.9 ^b
	6	59.67±1.4	18.56±2.0 ^b	17.92±1.3	25.90±2.2 ^b	44.19±2.3 ^b
T2 (Levadura)	3	57.04±2.1	10.26±1.6 ^b	11.94±0.8	15.79±1.4 ^b	49.32±3.4 ^{bc}
	6	60.70±1.5	16.80±1.6 ^b	17.30±1.0	24.53±1.7 ^b	43.93±2.2 ^b
T3 (Carofil)	3	53.76±2.5	15.65±1.8 ^a	14.15±1.1	21.16±1.5 ^a	42.11±3.8 ^c
	6	57.33±2.5	21.02±1.9 ^a	17.90±1.4	27.63±2.23 ^a	40.48±1.9 ^c
T4 (Testigo)	3	59.28±1.8	3.11±1.0 ^c	9.95±3.2	10.83±2.82 ^c	68.69±2.2 ^a
	6	65.99±3.2	3.27±2.1 ^c	15.71±1.4	16.20±1.1 ^c	77.76±5.0 ^a

Media±d.e. L*, luminosidad; a*, cromaticidad roja; b*, cromaticidad amarilla; C*, croma, H°_{ab}, tonalidad del color del músculo.

¹ Los valores en la semana cero son comunes para todos los tratamientos. ^{a,b,c} Medias con literales diferentes entre tratamientos en la misma semana, indican diferencia altamente significativa ($P < 0.01$)

En la Figura 10 se puede observar que este efecto es inverso en las primeras tres semanas, período en el cual la acción pigmentante de la astaxantina sintética expresada en rojicidad (a^*), aventaja a las fuentes naturales del carotenoide. Por esta razón, a las seis semanas el nivel más alto de rojicidad (a^*) se tuvo en el músculo de los peces que recibieron el carotenoide sintético (Carophyll Pink) (T3), esquematizado en la Figura 10. Dicho efecto fue también distinguido visualmente como puede observarse en las Fotografías 5 y 6 (ANEXO I). Un hecho que llamó la atención en esta etapa fue la presencia de ovarios fuertemente pigmentados en 9 ejemplares de este grupo estudiado (T3), los cuales no fueron medidos colorimétricamente.

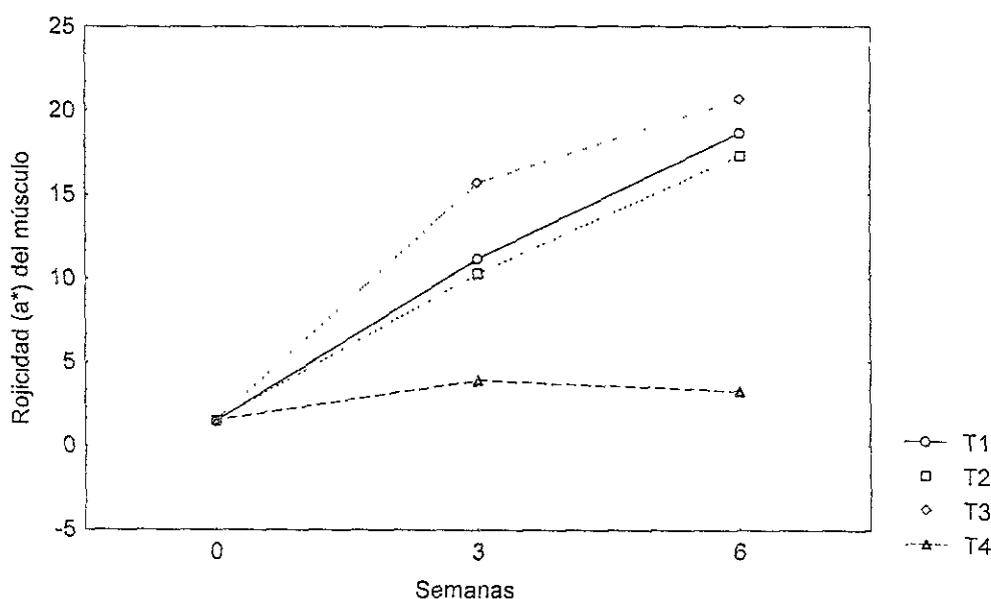


Figura 10. Efecto de la fuente de astaxantina en los tratamientos y el tiempo de ingestión del alimento sobre la cromaticidad roja (a^*) del músculo de la trucha cultivada en condiciones de laboratorio. T1, con Ax de langostilla, T2, con Ax de levadura *P. rhododyma*; T3, con Ax sintética (Carophyll Pink); T4, grupo testigo. $F(6,240)=136.62$; $p<0.001$

Los índices colorimétricos L^* , a^* , b^* , se mostraron altamente correlacionados con el contenido de astaxantina en el músculo. Entre ellos, la cromaticidad roja o rojicidad (a^*) mostró la mayor correlación como consta en la Tabla 5. Por su parte, la cromaticidad amarilla (b^*) mostró también una correlación positiva con la concentración de astaxantina muscular pero en menor grado que la rojicidad, aumentando al término del experimento aproximadamente dos veces su nivel basal en todos los tratamientos. La luminosidad (L^*) en cambio, mostró una correlación negativa con dicha variable, mostrando en consecuencia los

valores más bajos en el grupo que recibió la astaxantina sintética (Carophyll Pink) ($R = -0.61$). Igualmente, los parámetros cromaticidad (C^*) y tonalidad (H°_{ab}) fueron estrechamente correlacionados con el incremento del carotenoide en el músculo.

Tabla 5. Correlación entre los índices de color y el contenido de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris, en el experimento en condiciones de laboratorio.

Tratamientos/ Fuente de astaxantina	Modelo	CC ¹
T1 (Langostilla)	$a^* = 2.2659 + 3.3713 Ax$	$R = 0.93$
	$b^* = 10.9310 + 1.2425 Ax$	$R = 0.72$
	$L^* = 65.9650 - 1.6510 Ax$	$R = -0.70$
	$H^{\circ} = 77.4550 - 7.1030 Ax$	$R = -0.84$
	$C^* = 11.1880 + 2.9094 Ax$	$R = 0.89$
T2 (Levadura)	$a^* = 2.3332 + 3.4249 Ax$	$R = 0.92$
	$b^* = 11.0335 + 1.2800 Ax$	$R = 0.72$
	$L^* = 65.8237 - 1.6905 Ax$	$R = -0.70$
	$H^{\circ} = 77.4550 - 7.1030 Ax$	$R = -0.85$
	$C^* = 11.1880 + 2.9094 Ax$	$R = 0.88$
T3 (Carophyll)	$a^* = 1.4255 + 4.5146 Ax$	$R = 0.95$
	$b^* = 10.5036 + 1.9076 Ax$	$R = 0.77$
	$L^* = 65.9900 - 1.7720 Ax$	$R = -0.61$
	$H^{\circ} = 79.4570 - 9.7600 Ax$	$R = -0.87$
	$C^* = 10.4150 + 3.9978 Ax$	$R = 0.91$

¹Coefficiente de correlación.

Una información importante que se obtuvo de la correlación entre concentración de astaxantina en el músculo y rojicidad (a^*) del tejido, en todos los peces suplementados con astaxantina, es la tendencia de equilibrio en los niveles de rojicidad (a^*) a medida que el contenido del carotenoide en el músculo alcanza niveles cercanos a 6 mg/kg, aspecto distinguible en la Figura 11.

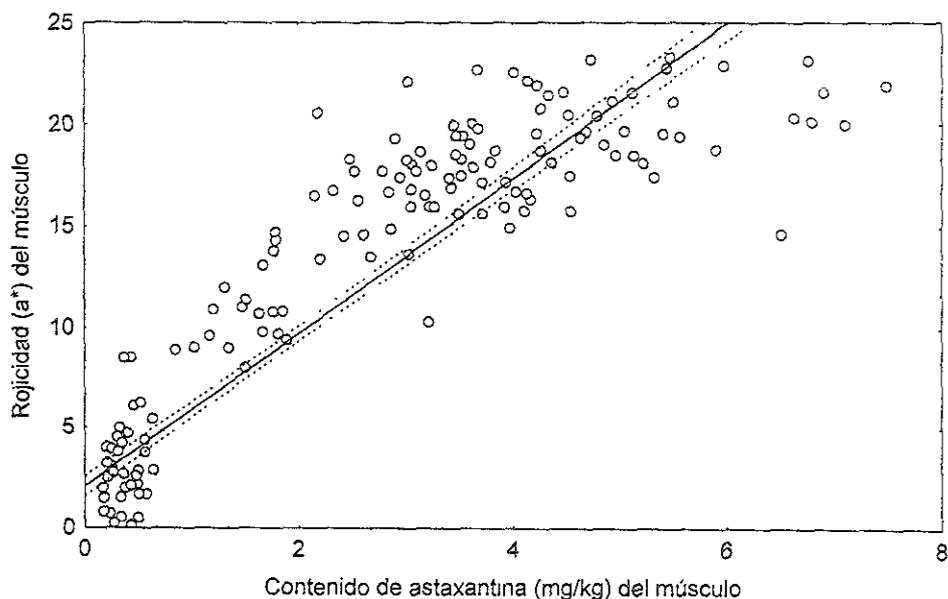


Figura 11. Correlación entre el contenido de astaxantina en el músculo y la cromaticidad roja (a^*) del tejido en todos los ejemplares de trucha arcoiris que recibieron astaxantina en la dieta. ($y = 2.3548 + 3.5674 Ax$, $r = 0.92$).

El contenido de astaxantina en el músculo como consecuencia de la ingestión del carotenoide con la dieta tuvo un efecto significativo ($P < 0.01$) en los parámetros tonalidad (H°_{ab}) y croma (C^*) (Figura 12), decreciendo el primer parámetro directamente con el incremento del carotenoide, en tanto que los niveles de croma fueron incrementados. Aunque los niveles de tonalidad (H°_{ab}) obtenidos en la sexta semana en el tratamiento con langostilla, así como con la levadura *P. rhodozyma*, fueron significativamente diferentes ($P < 0.01$) a los del tratamiento con la astaxantina sintética (Carophyll Pink), los niveles de croma (C^*) en la misma semana en los tres tratamientos no presentaron diferencia significativa ($P > 0.05$).

4A.7. Comportamiento de la trucha durante el experimento

Al comenzar el período de aclimatación, los peces se mostraron con gran actividad motriz que condujo a proteger las tinas con mallas removibles. Una vez estabilizados y comenzada la experimentación, los peces sometidos a la dieta con el pigmento de langostilla (D1) presentaron renuencia moderada a ingerir el alimento durante los primeros días. Pasado este

tiempo, éste fue aceptado activamente. Las otras dietas D2, D3 y D4, fueron consumidas desde el principio.

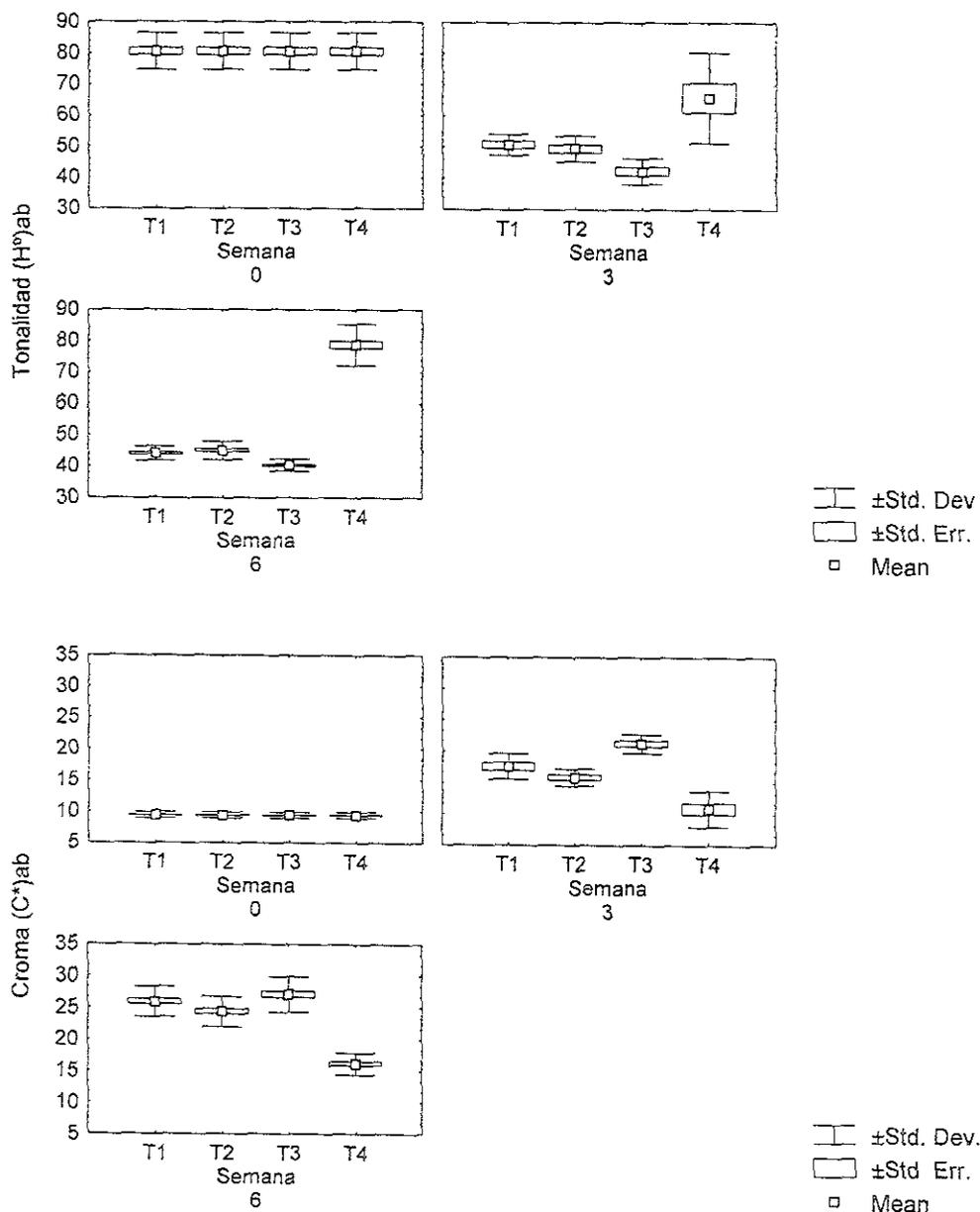


Figura 12. Tonalidad del color (H°)ab y cromas (C*) del músculo de la trucha arcoiris, en función de las diferentes fuentes de astaxantina en los tratamientos y del tiempo de ingestión del alimento T1, con Ax de langostilla; T2, con Ax de levadura *P. rhododyma*; T3, con Ax sintética (Carophyll Pink); T4, grupo testigo.

4A.8. Tasa específica de crecimiento de la trucha arcoiris (TEC)

Como se resume en la Tabla 6, el crecimiento en peso de los organismos en todos los grupos estudiados no se vio influenciado por la fuente de astaxantina en el alimento. La tasa específica de crecimiento en los tratamientos con adición de astaxantina de langostilla, de la levadura *P. rhodozyma* y de la astaxantina sintética (Carophyll Pink) (T1, T2 y T3, respectivamente), no presentaron diferencia significativa ($P>0.05$) con respecto al grupo testigo (T4). A las seis semanas, los organismos tuvieron un incremento total en peso equivalente al 45, 47, 47 y 48% en los tratamientos T1 a T4, respectivamente, comparable al observado por Torrissen (1989) en truchas arcoiris más jóvenes (123 g), a las ocho semanas de tratamiento con astaxantina y cantaxantina sintéticas.

4A.9. Factor de conversión alimenticia de la trucha arcoiris (FCA)

Este parámetro por su parte, calculado al finalizar el estudio fue similar entre los tratamientos y el grupo testigo ($P>0.05$), indicado en la Tabla 6.

Tabla 6. Tasa específica de crecimiento de la trucha arcoiris y otros parámetros fisiológicos bajo la influencia de las diferentes fuentes de astaxantina en la dieta, en el experimento de laboratorio.

Tratamientos/ Fuente de Ax	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Mortalidad (%)	TEC (%)	FCA
T1 (Langostilla)	218±6	317±19	0.0±0.0 ^a	0.89±0.02 ^a	1.46±0.13 ^a
T2 (Levadura)	217±5	319±13	0.0±0.0 ^a	0.92±0.01 ^a	1.41±0.07 ^a
T3 (Carophyll)	218±9	321±17	0.0±0.0 ^a	0.91±0.04 ^a	1.44±0.24 ^a
T4 (Testigo)	220±17	325±23	1.85±0.0 ^a	0.93±0.03 ^a	1.36±0.16 ^a

Media ± d.e (n=54 en la semana cero, n= 30 en la semana seis, en cada tratamiento). TEC= tasa específica de crecimiento, FCA= factor de conversión alimenticia. ^a Literales iguales entre tratamientos en la misma semana expresan no diferencia significativa ($P>0.05$)

4A.10. Signos patológicos y mortalidad de la trucha

A los dos días de haber empezado el experimento, un ejemplar perteneciente al grupo testigo murió accidentalmente al enredarse con la red que cubría las tinas. A las dos semanas, se observaron manchas grisáceas con apariencia ligeramente algodonosa en la piel del dorso (base de la aleta dorsal) y opérculo de algunos organismos en cada tratamiento (entre 5 a 7% de la población). Al examinarse al microscopio se constató que las manchas fueron provocadas por microorganismos saprofiticos como el hongo *Saprolegnia sp.* Dicho efecto fue corregido con inmersión de los peces en una disolución de Verde de Malaquita a una concentración de 67 ppm durante 30 segundos (Drummond, 1990) y con la aplicación de 1 kg de sal común colocada en la entrada de agua en cada tanque durante 3 a 4 horas. La limpieza de las unidades experimentales de manera interdiaria con sifón, permitió disminuir el exceso de manipulación ocasionado por el barrido, buscando así reducir el nivel de estrés en los organismos. Los hígados examinados al principio y al final del experimento presentaron un crecimiento y coloración normal en toda la población, cuyos pesos fluctuaron de 3.60 ± 0.09 g al empezar el experimento a 4.87 ± 0.18 g al finalizar. El único caso de muerte en el grupo testigo representó el 1.85% de mortalidad en dicha población, sin diferencia significativa ($P > 0.05$) con respecto a los demás tratamientos.

4B. Del experimento en condiciones piloto

4B.1. Astaxantina en el aceite de langostilla, *Pleuroncodes planipes*, y en las dietas

El aceite de langostilla almacenado en el garrafón de plástico a -15°C contuvo una concentración de $1,169 \pm 1.2$ mg de astaxantina por kg de aceite (equivalente a 116.9 mg/100 g de aceite), la cual estuvo compuesta por 6.99% como astaxantina libre y 93.01% esterificada (70.88% diésteres y 22.13% monoésteres de astaxantina). Como consta en la Tabla 7, la disminución máxima del contenido de astaxantina en las dietas experimentales (D1, D2 y D3), después de ocho semanas de almacenamiento a 4°C , fue de 2.52% con respecto a la concentración inicial. Sin embargo, su composición química permaneció sin alteración significativa con respecto al carotenoide en el aceite, como lo demostraron las pruebas cromatográficas (TLC) ilustradas en la Figura 13.

Tabla 7. Contenido de carotenoides en las dietas empleadas en el experimento en condiciones piloto.

	Dietas				
	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4 ¹	Dieta 5
	50 mg/kg	75 mg/kg	100 mg/kg	90 mg/kg	0 mg/kg
Astaxantina (mg/kg)					
Contenido inicial	49.30 \pm 1.43	74.76 \pm 1.72	99.27 \pm 0.37	Nc	Nd
Contenido final	48.71 \pm 0.86	72.87 \pm 0.32	98.25 \pm 1.74	Nc	Nd
Decremento de Ax (%) ²	1.21	2.52	1.03	Nc	Nd
Ax libre (%)	7.15 \pm 0.49	6.57 \pm 0.16	7.48 \pm 0.66	100 ³	Nd
Monoéster de Ax (%)	23.39 \pm 0.26	24.05 \pm 0.77	25.24 \pm 1.12	0	Nd
Diéster de Ax (%)	69.45 \pm 0.77	69.35 \pm 0.91	67.26 \pm 1.78	0	Nd
Luteína	Nd	Nd	Nd	Nd	18.10 \pm 0.26

¹Dieta comercial con un contenido de 90 mg/kg de astaxantina y cantaxantina sintéticas. Nc = no calculado. Nd = no detectado

²Disminución de Ax en ocho semanas. ³Los carotenoides Ax y Cx son sintetizados en su forma libre (Bernhard, 1991)

La dieta basal (D5), mostró en su composición la xantofila amarilla luteína con una concentración de 18.10 ± 0.26 mg/kg. Dicho pigmento exhibió su típica curva espectral análoga a la del pigmento patrón, caracterizada principalmente por el pico de absorción máxima a los 445 nm en EP como lo describe Rodríguez-Amaya (1999), e ilustrada en la Figura 14. Las dietas experimentales presentaron en consecuencia además de astaxantina, dicho contenido basal de luteína observable sólo en la prueba cromatográfica (Figura 13). Los R_f calculados para dichos carotenoides fueron $R_f = 0.35$ para la luteína, 0.45 para la fracción libre de astaxantina; 0.65 para la astaxantina monoesterificada y 0.85 para la astaxantina diesterificada. La diferencia entre los R_f calculados en la presente etapa con respecto a los del primer experimento obedece a la diferente mezcla eluyente aquí utilizada.

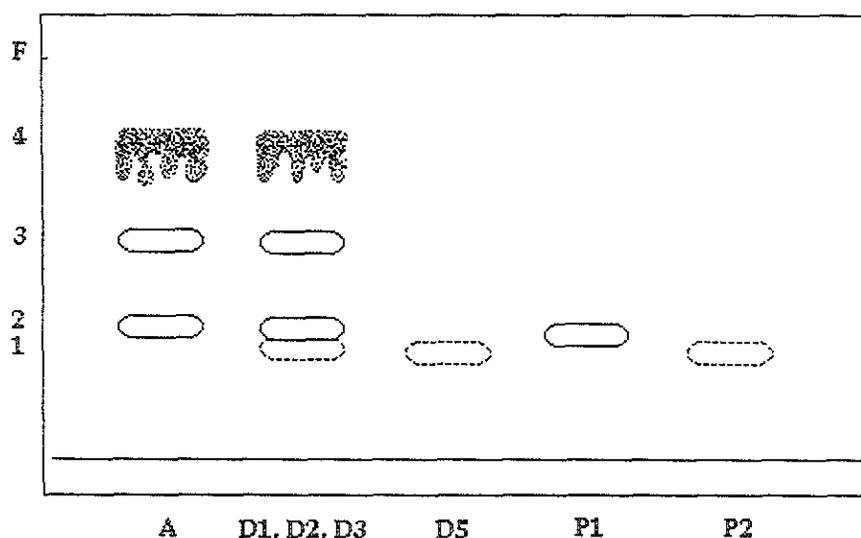


Figura 13. Separación cromatográfica (TLC) de los carotenoides en el aceite de langostilla y en las dietas utilizadas en el experimento en condiciones piloto. A, aceite de langostilla; D1, D2, D3, dietas con 50, 75 y 100 mg/kg de Ax de langostilla, respectivamente; D5, dieta del grupo testigo P1: patrón de Ax (Carophyll Pink), P2: patrón de luteína. Bandas: 1, luteína; 2, Ax libre; 3, monoéster deAx; 4, diéster deAx.

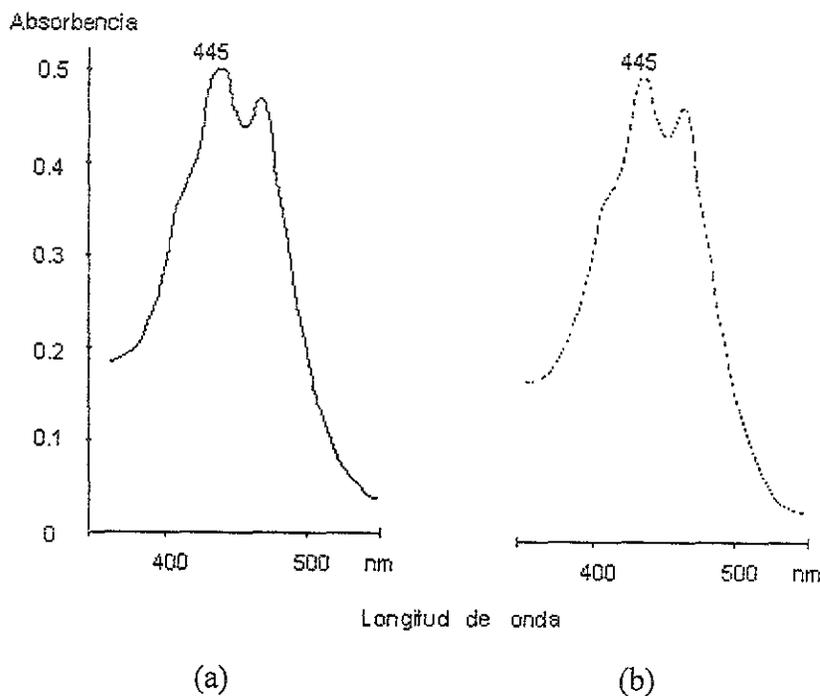


Figura 14. Espectro de absorción de la luteína en la dieta basal empleada en el experimento en condiciones piloto. (a) Pigmento patrón, (b) pigmento en la dieta basal (422, 445, 474 nm en EP).

Tabla 8. Composición química proximal y contenido energético de las dietas empleadas en el experimento en condiciones piloto

Componente (g/100g) ¹	Dietas/Niveles de inclusión de astaxantina				
	Dieta 1 50 mg/kg	Dieta 2 75 mg/kg	Dieta 3 100 mg/kg	Dieta 4 ² (90 mg/kg)	Dieta 5 ³ (0 mg/kg)
Humedad	5.29±0.52	5.17±0.00	5.18±0.10	5.12±0.14	5.29±0.03
Proteína cruda	39.37±0.28	38.72±0.05	39.33±0.06	38.27±0.13	38.55±0.27
Extracto etéreo	12.10±0.24	12.34±0.31	12.61±0.23	14.04±0.22	13.47±0.30
Cenizas	8.00±0.05	8.05±0.08	8.00±0.02	8.84±0.08	8.04±0.16
Fibra cruda	2.59±0.13	2.37±0.09	2.18±0.04	2.12±0.08	2.14±0.18
ELN ⁴	37.94	38.52	37.88	36.73	37.80
Energía (Kcal/g)	5.0949±0.22	5.2629±0.19	5.2796±0.15	5.4033±0.30	5.4084±0.38

¹Media ± d.e. Resultados expresados en base seca. ²Dieta comercial con un contenido de 90 mg/kg de astaxantina y cantaxantina sintéticas. ³Dieta basal para el grupo testigo, sin adición de carotenoides. ⁴Extracto libre de Nitrógeno.

4B.2. Composición química de las dietas

Debido a que las dietas experimentales fueron elaboradas con la misma dieta basal, éstas no mostraron variaciones importantes en su composición proximal como se pudo apreciar en la Tabla 8.

4B.3. Composición y contenido de carotenoides en el músculo de la trucha arcoiris

En la Tabla 9 se expone el nivel de carotenoides en el músculo de los organismos que recibieron astaxantina en la dieta durante las ocho semanas de observación. La concentración de dichos compuestos en los peces que recibieron los tres niveles de astaxantina de langostilla (T1, T2 y T3), así como en aquellos del tratamiento de referencia con la mezcla Ax-Cx (T4), fue estadísticamente superior ($P < 0.01$) a la del grupo testigo (T5) a las ocho semanas. Durante las seis primeras semanas los organismos que recibieron 50 mg/kg del pigmento de langostilla (T1), presentaron un depósito de carotenoides significativamente menor ($P < 0.01$) que los que recibieron 75 y 100 mg/kg del carotenoide (T2 y T3) y que el tratamiento de referencia con Ax-Cx (T4); sin embargo, en la octava semana, dicho depósito se incrementó hasta alcanzar un nivel semejante a los observados en aquellos tratamientos, razón por la cual, no se observó diferencia significativa ($P > 0.05$) en dicho momento del estudio. Por su parte, el depósito de carotenoides en los tratamientos T2, T3 y T4 fue semejante entre sí ($P > 0.05$) en todas las etapas de estudio.

También señalada en la Tabla 9 y a semejanza de lo observado en el experimento de laboratorio, en los organismos de los tratamientos experimentales (T1 y T3) se observó mayor tasa de depósito de carotenoides en el músculo durante la segunda etapa del experimento con respecto a la primera. En el tratamiento T2 dicho efecto no es evidente probablemente debido a la elevada concentración que presentó alguna de las muestras en la semana 4. En el presente experimento, el incremento de la tasa de depósito observado en los organismos que recibieron la mezcla sintética Ax-Cx (T4) fue similar al observado en los peces tratados con astaxantina de langostilla (a diferencia del tratamiento T2), hecho antagónico con respecto a lo observado

en el experimento de laboratorio. Un rasgo sobresaliente en este experimento es el pronunciado incremento de dicha tasa especialmente en los peces que consumieron la menor inclusión de astaxantina (50 mg/kg) (T1), en los cuales se triplicó (3.3 veces) este nivel, mientras que en los tratamientos T3 y T4, solo hubo un incremento de 1.6 veces con respecto a las primeras cuatro semanas.

Tabla 9. Contenido de carotenoides en el músculo de la trucha arcoiris y cinética de depósito durante el experimento en condiciones piloto.

Tratamientos/ Nivel de inclusión	Contenido de carotenoides en el músculo (mg/kg)					Tasa de depósito ¹ (mg/kg/d)		
	Semanas	0	2	4	6	8	0-4	4-8
T1/ (50 mg/kg)		1.09±0.36	1.95±0.33	1.83±0.38 ^b	2.67±0.55 ^b	4.32±1.01 ^a	0.03	0.10
T2/ (75 mg/kg)		1.09±0.36	1.91±0.52	3.23±0.63 ^a	3.71±0.31 ^a	4.77±0.81 ^a	0.08	0.07
T3/ (100 mg/kg)		1.09±0.36	2.04±0.61	2.65±0.27 ^a	3.97±0.89 ^a	5.20±1.11 ^a	0.06	0.10
T4 (Ax-Cx)		1.09±0.36	1.93±0.13	2.72±0.84 ^a	3.21±0.37 ^{ab}	5.19±0.74 ^a	0.06	0.10
T5 (Testigo)		1.09±0.36	1.38±0.28	1.27±0.77 ^b	1.39±0.21 ^c	1.65±1.00 ^b		

Media \pm d.e. ^{a,b,c} Medias con literales diferentes entre tratamientos en la misma semana indican diferencia significativa ($P < 0.01$). ¹Tasa de depósito (mg/kg/día) = Contenido final de Ax - Contenido inicial de Ax / días de alimentación, 0 a 4 semanas, 4 a 8 semanas

La Figura 15 representa gráficamente la cinética del depósito de los carotenoides en el músculo de la trucha. En ella se aprecia que los contenidos de pigmentos en los peces que ingirieron los tres niveles de inclusión del carotenoide de langostilla (T1, T2, T3) a las ocho semanas, fueron equivalentes al del tratamiento de referencia con los carotenoides sintéticos Ax-Cx (T4).

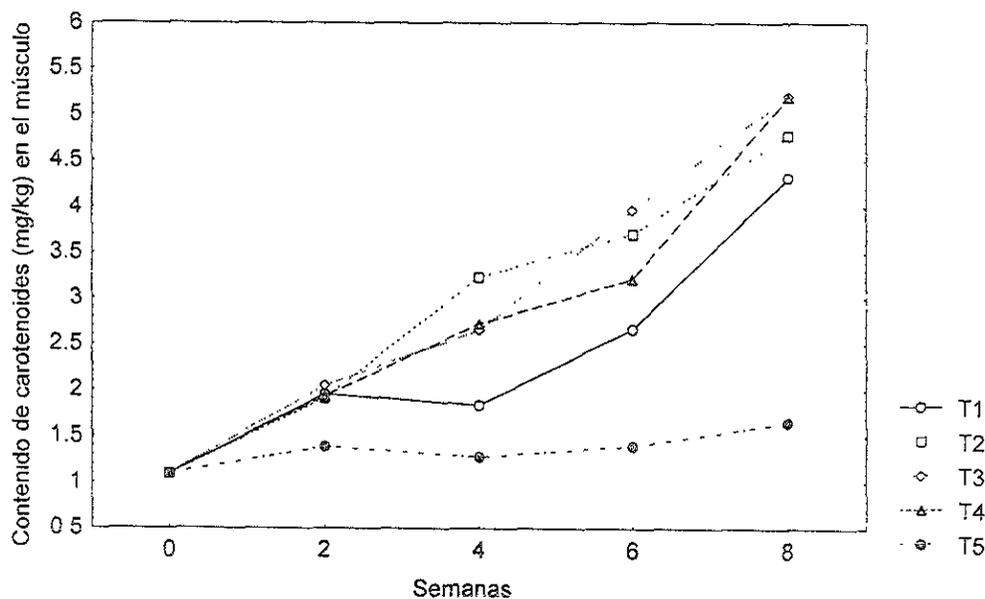


Figura 15. Depósito de carotenoides en el músculo de la trucha en función de los niveles de inclusión de astaxantina de langostilla en la dieta y el tiempo de ingestión del alimento en el experimento piloto. T1, 50 mg/kg; T2, 75 mg/kg; T3, 100 mg/kg; T4, tratamiento de referencia (Ax-Cx); T5, grupo testigo (sin Ax). $F(16,105)=6.89$; $p<0.001$.

El análisis cromatográfico mostró que los peces presentaron en el músculo al comienzo del experimento la xantofila amarilla luteína, con una concentración de 1.09 ± 0.36 mg/kg. Este carotenoide permaneció en los organismos del grupo testigo (T5) durante las ocho semanas de experimentación, alcanzando un máximo de 1.65 ± 1.00 mg/kg, mientras que, en los tratamientos experimentales (T1, T2, T3) y en el tratamiento de referencia (T4), la luteína fue visible en el registro espectrofotométrico sólo hasta la segunda semana. A partir de la cuarta semana fue detectada en estos organismos la astaxantina como principal carotenoide, acompañado de pequeñas concentraciones de otra xantofila amarilla, la zeaxantina (Zx), cuyo pico máximo de absorbencia en EP se observó a los 449 nm (Rodríguez-Amaya, 1999), y mostrando su forma típica la cual es esquematizada en la Figura 16 a.

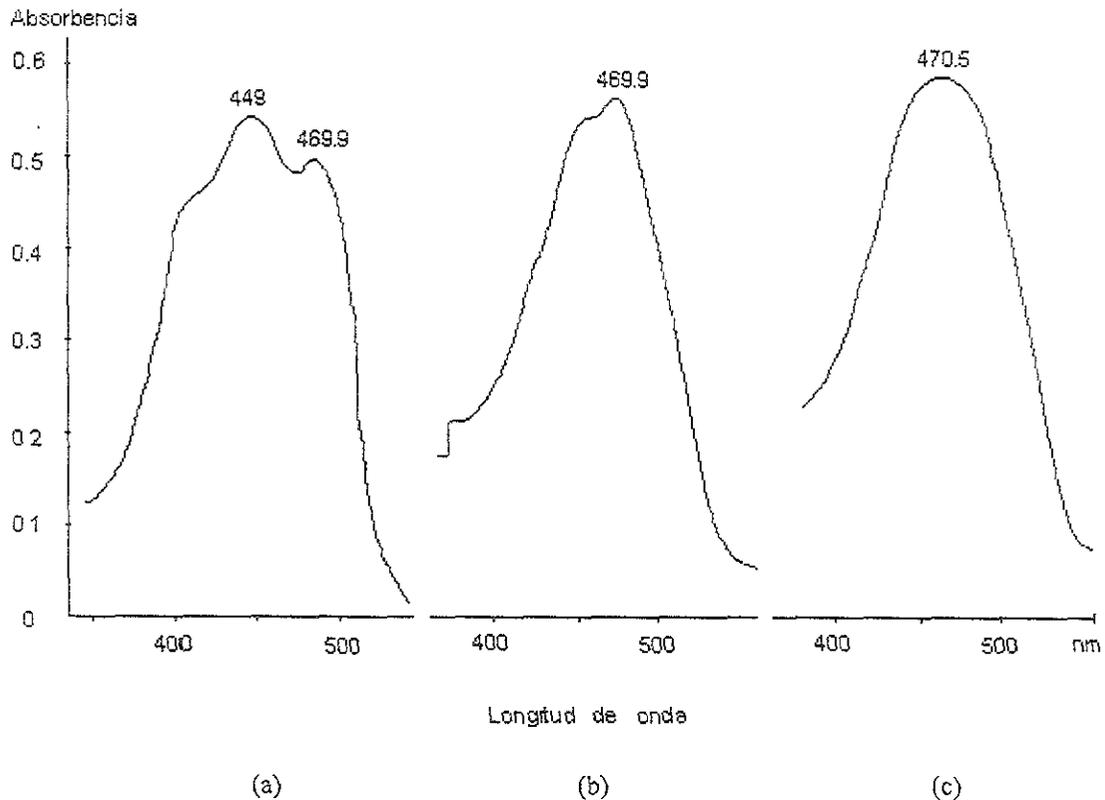


Figura 16. Espectro de absorción de la zeaxantina y astaxantina detectados a partir de la cuarta semana en el músculo de la trucha arcoiris que recibieron astaxantina en el experimento piloto. (a), zeaxantina (449, λ_{\max}); (b), astaxantina (470 λ_{\max}) con influencia de zeaxantina; (c), patrón de Ax (Carophyll Pink).

El músculo de los peces que ingirieron la dieta con carotenoides sintéticos (Ax-Cx), pertenecientes al grupo de referencia (T4), mostró además de astaxantina y zeaxantina, la cantaxantina (Cx). Este carotenoide fue detectado solo en la cromatografía de capa fina (Figura 17). Una vez aislado el compuesto de la placa cromatográfica, éste presentó un pico máximo de absorción a los 463 nm como corresponde a su naturaleza (Davies, 1976), y una curva espectral análoga al del pigmento patrón. La predominancia de la astaxantina en todas las muestras procedentes de los tratamientos experimentales, así como del tratamiento de referencia, se conservó durante las cuatro últimas semanas. Su asociación con los carotenoides acompañantes se manifestó en la curva espectral con la aparición de un hombro o curva de inflexión antes del pico máximo, morfología ligeramente atípica de este compuesto (Figura 16 b). Este rasgo no existe en el espectro del carotenoide patrón, como consta en la Figura 16 c. A pesar de dicha interferencia, la astaxantina fue evidente por su máxima absorbencia de luz visible entre los 468 a 473 nm en EP (Buchwald y Jencks, 1968; Davies, 1976).

En el estudio cromatográfico de capa fina (TLC) fue posible apreciar que la luteína y la zeaxantina presentan un mismo R_f (Figura 17). Tal coincidencia obedece a la semejanza estructural de ambos carotenoides, como lo refieren Schiedt *et al.* (1995). Esta particularidad impidió la identificación concluyente de la zeaxantina por este método en los extractos correspondientes a los peces tratados con astaxantina, por lo que para tales propósitos, se utilizó únicamente las características espectrofotométricas de las bandas aisladas.

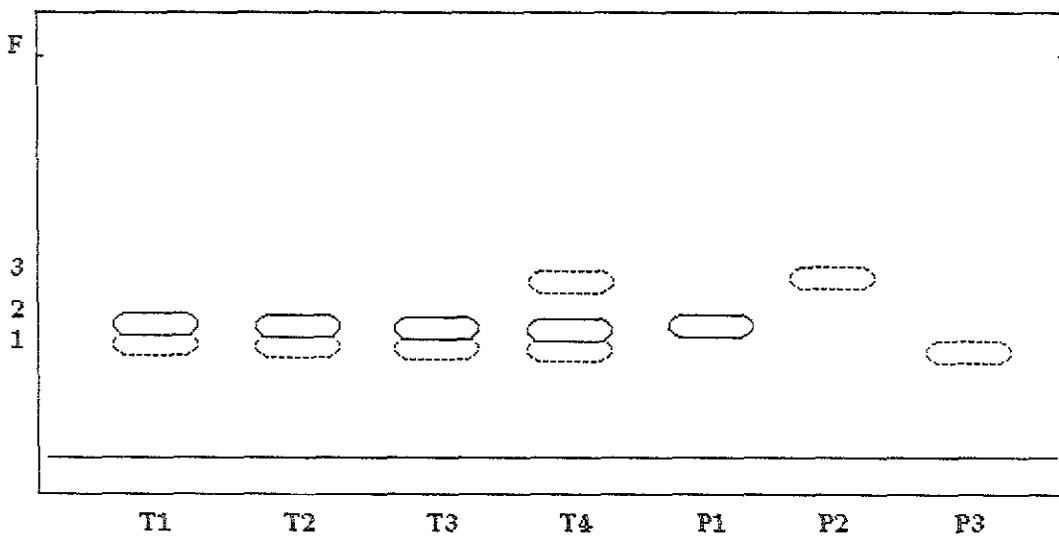


Figura 17. Separación cromatográfica de los carotenoides del músculo de la trucha a las ocho semanas de ingestión de alimentos con diferentes niveles de inclusión de astaxantina de langostilla en el cultivo piloto. Tratamientos T1, 50 mg/kg, T2, 75 mg/kg; T3, 100 mg/kg, T4, tratamiento de referencia (Ax-Cx) P1, P2 y P3, patrones de astaxantina, cantaxantina y luteína, respectivamente. Bandas 1: zeaxantina y luteína; 2, astaxantina, 3 cantaxantina; F, frente de elución

Los valores R_f determinados en la prueba cromatográfica (TLC) fueron: 0.35 para la zeaxantina y luteína, 0.45 para la astaxantina, coincidentes con los registrados por Schiedt *et al.* (1995), y 0.55 para la cantaxantina. El contenido proporcional de estos carotenoides en el músculo, determinado al finalizar el experimento en los diferentes tratamientos, se muestra en la Figura 18.

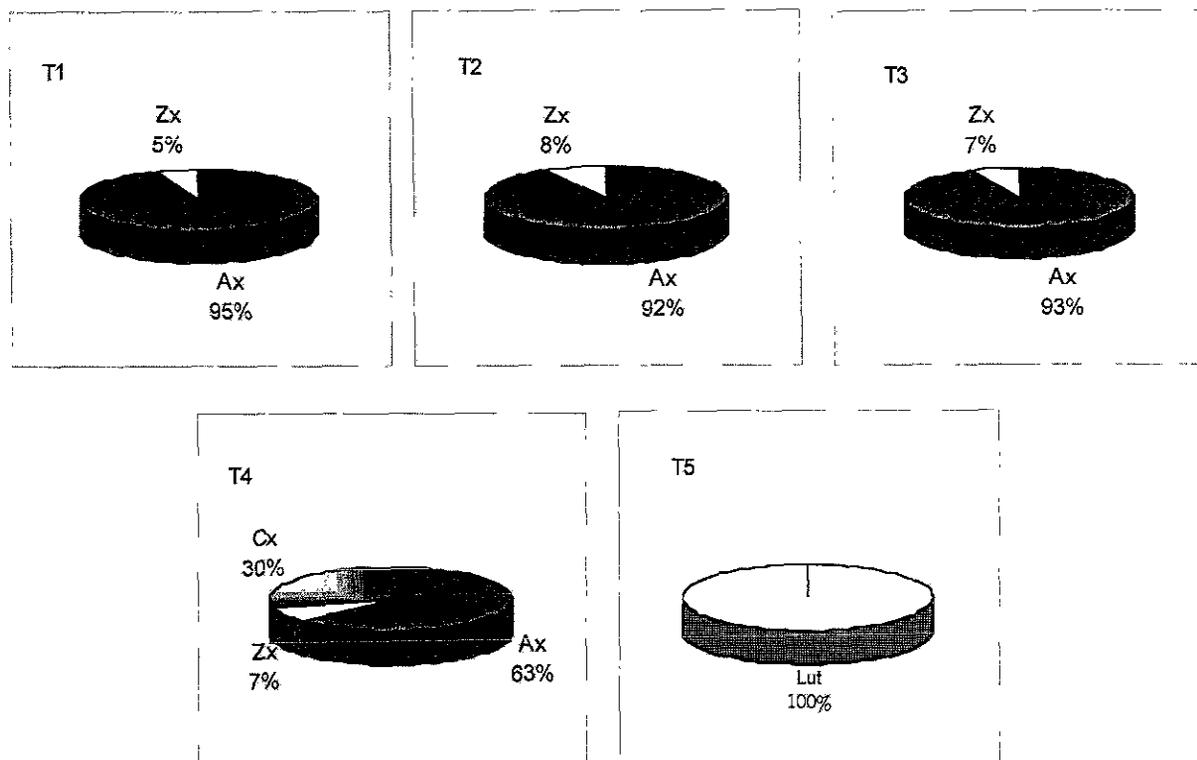


Figura 18. Contenido proporcional de los carotenoides depositados en el músculo de la trucha arcoiris a las ocho semanas de experimentación en condiciones piloto. T1, 50 mg/kg; T2, 75 mg/kg; T3, 100 mg/kg; T4, tratamiento de referencia (Ax-Cx); T5, grupo testigo (sin Ax).

4B.4. Retención de carotenoides en el músculo de la trucha arcoiris (RCM)

Los diferentes niveles de inclusión de la astaxantina de langostilla en el alimento (50, 75 y 100 mg/kg), no tuvieron efecto significativo ($P > 0.05$) sobre los niveles de retención del carotenoide en el músculo a las ocho semanas. Los promedios observados en los peces que ingirieron el pigmento de la langostilla (T1, T2 y T3) fueron 4.58 ± 0.91 , 4.75 ± 0.79 y $5.34 \pm 1.92\%$, respectivamente, comparables con la obtenida con los pigmentos sintéticos Ax-Cx en el tratamiento de referencia (T4) ($4.98 \pm 1.13\%$) y significativamente diferentes a la mostrada en el grupo testigo (T5) (Figura 19).

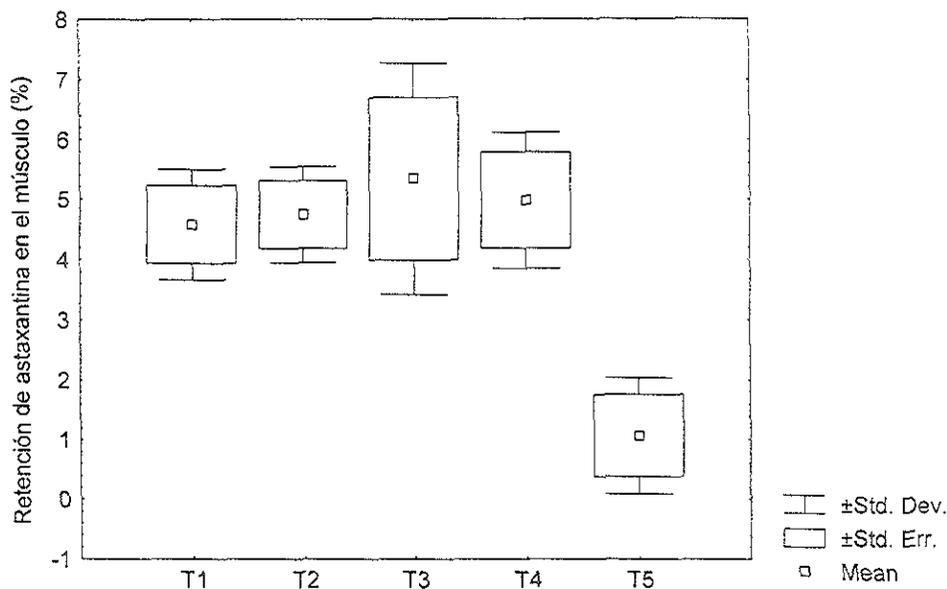


Figura 19. Efecto de los niveles de inclusión de la astaxantina de langostilla en el alimento de la trucha, sobre la retención del pigmento en el músculo a las ocho semanas. T1, 50 mg/kg; T2, 75 mg/kg; T3, 100 mg/kg; T4, tratamiento de referencia (Ax-Cx); T5, grupo testigo (sin Ax). ($P < 0.01$)

4B.5. Pigmentación muscular de la trucha arcoiris

Los peces de los tratamientos T2, T3 y T4 mostraron desde la segunda semana un color rosa metálico a lo largo de la línea lateral, en tanto que los del tratamiento T1 manifestaron esta coloración sólo después de las cuatro semanas. El músculo de los peces colectados al empezar el ensayo tuvo un color amarillento el cual se conservó en los peces del grupo testigo (T5) durante las ocho semanas, mientras que en los organismos que recibieron astaxantina en el alimento, el tejido fue mostrando paulatinamente una coloración roja que se incrementó con el tiempo y que fue detectado colorimétricamente mediante los índices de color L^* , a^* , b^* , como se indica en la Tabla 10. En dicha Tabla y en la Figura 20 se puede distinguir que el incremento de color del músculo fue reflejado principalmente en los índices de cromaticidad roja o rojicidad (a^*), así como en los parámetros tonalidad (H°)_{ab} y croma (C^*). Los ejemplares de los tratamientos experimentales (T1, T2 y T3) y los del tratamiento de referencia (T4), presentaron al finalizar el experimento niveles de rojicidad (a^*) estadísticamente semejantes ($P > 0.05$), pero significativamente diferentes ($P < 0.01$) con respecto al grupo testigo (T5).

Tabla 10. Variación colorimétrica del músculo de la trucha arcoiris bajo la influencia de diferentes niveles de inclusión de astaxantina de langostilla en el alimento, en el experimento en condiciones piloto.

Tratamientos	Semana	L*	a*	b*	C* _{ab}	(H°) _{ab}
	0 ¹	62.70±1.38	3.83±1.11	11.95±2.19	12.50±2.40	73.40±2.39
T1 (50 mg/kg)	2	61.99±1.73	4.64±1.74	10.83±0.59	11.86±0.91	67.16±7.98
	4	61.02±3.01	9.50±2.23 ^b	13.51±1.19	16.55±2.18 ^a	55.32±4.75 ^b
	6	59.57±1.49	9.34±0.81 ^b	13.61±1.32	16.53±1.10 ^a	55.44±3.78 ^b
	8	53.22±0.92	14.91±1.84 ^a	14.68±0.68	20.94±1.69 ^a	44.71±2.75 ^b
T2 (75 mg/kg)	2	62.25±3.01	7.20±1.80	11.98±1.71	14.00±2.32	59.24±4.16
	4	60.64±1.64	9.55±1.20 ^b	12.46±0.88	15.70±1.38 ^a	52.63±2.06 ^c
	6	60.65±1.47	11.06±1.10 ^a	13.58±0.87	17.53±1.29 ^a	50.90±1.74 ^c
	8	55.43±2.02	15.23±2.54 ^a	14.68±1.97	21.16±3.18 ^a	44.06±1.31 ^b
T3 (100 mg/kg)	2	60.63±3.38	7.23±3.49	10.96±2.49	13.20±3.99	58.19±7.03
	4	60.04±3.77	11.03±3.07 ^a	13.24±2.88	17.25±4.14 ^a	50.52±2.54 ^c
	6	56.74±1.45	11.82±1.63 ^a	13.52±1.97	18.02±2.02 ^a	48.76±4.81 ^c
	8	54.43±4.33	14.66±4.24 ^a	13.99±1.66	20.32±4.15 ^a	44.45±5.43 ^b
T4 (Ax-Cx)	2	60.71±2.13	6.58±2.34	11.73±1.83	13.49±2.64	61.48±6.09
	4	59.13±1.39	11.06±1.32 ^b	14.02±1.13	17.86±1.63 ^a	51.77±1.84 ^c
	6	59.34±2.73	10.84±2.79 ^a	13.77±1.97	17.56±3.18 ^a	52.21±4.13 ^c
	8	52.22±1.43	16.14±1.43 ^a	14.57±0.47	21.75±1.32 ^a	42.15±1.88 ^b
T5 (Testigo)	2	61.16±3.29	5.05±1.03	12.56±1.86	13.58±1.77	67.93±4.89
	4	61.42±2.86	7.31±2.18 ^c	13.37±0.60	15.34±0.86 ^a	61.61±7.75 ^a
	6	58.09±2.76	6.16±1.55 ^c	12.29±1.31	13.81±1.40 ^b	63.47±5.95 ^a
	8	58.77±2.39	6.46±1.62 ^b	14.12±1.22	15.56±1.63 ^b	65.64±4.38 ^a

Media±d.e. Luminosidad (L*); rojicidad (a*); cromaticidad amarilla (b*); croma (C*) y tonalidad (H°_{ab}) del músculo de la trucha arcoiris en los tratamientos con Ax de langostilla. Los valores en la semana cero son comunes para todos los tratamientos y grupo testigo. ^{a,b,c} Medias con literales diferentes entre tratamientos en la misma semana, indican diferencia altamente significativa (P<0.01).

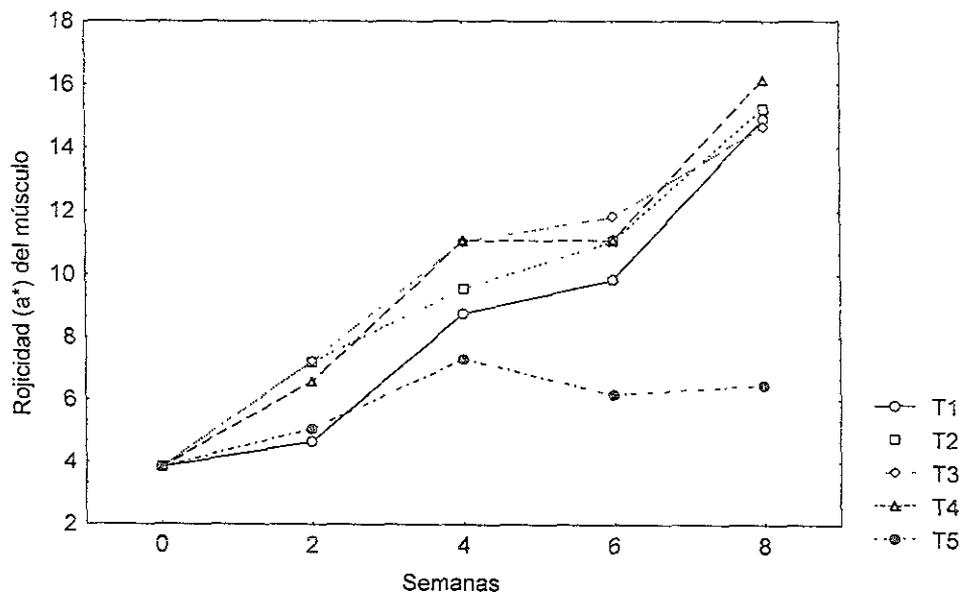


Figura 20. Efecto de los niveles de inclusión de la astaxantina de langostilla en el alimento de la trucha y el tiempo de ingestión, sobre la rojicidad (a^*) del músculo. T1, 50 mg/kg; T2, 75 mg/kg; T3, 100 mg/kg; T4, tratamiento de referencia (Ax-Cx); T5, grupo testigo (sin Ax) $F(16, 105) = 3.92$; $P < 0.001$.

Como en el experimento anterior, los índices de cromaticidad presentaron estrecha correlación con el contenido de carotenoides en el músculo, entre ellos la cromaticidad roja ó rojicidad (a^*) fue el índice más dependiente como se puede observar en la Tabla 11. Tanto la cromaticidad amarilla (b^*) como la luminosidad (L^*) presentaron baja correlación con dicho parámetro, mostrando esta última una correlación negativa, al igual que la tonalidad (H°)_{ab}.

Los niveles de tonalidad en el músculo de los organismos que recibieron astaxantina del crustáceo a las ocho semanas fueron muy semejantes (con una variación de 44.06 a 44.71), apreciable en la Figura 21. Este resultado confirma lo observado en cuanto a la concentración de carotenoides y los niveles de rojicidad alcanzados en la octava semana en dichos grupos. El parámetro croma (C^*) mostró por su parte menor correlación con el contenido de pigmentos en el músculo. Al finalizar el experimento, las medias obtenidas de ambos parámetros (H° _{ab} y C^*), no presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a los peces que recibieron los carotenoides sintéticos (Ax-Cx) (T4), mientras que con respecto al grupo testigo (T5), éstos fueron significativamente diferentes ($P < 0.001$).

Tabla 11. Correlación entre los índices de color L^* , a^* , b^* , parámetros (H°)_{ab}, (C^*) y el contenido de astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris del experimento piloto.

Tratamientos/ Nivel de inclusión de Ax	Modelo	CC ¹
T1 (50 mg/kg)	$a^* = 1.9800 + 2.5232 Ax$	R = 0.84
	$b^* = 11.6990 + 0.50607 Ax$	R = 0.36
	$L^* = 64.0570 - 1.67.90 Ax$	R = - 0.67
	$H^\circ = 76.6420 - 6.7477 Ax$	R = - 0.84
	$C^* = 11.2188 + 1.8005 Ax$	R = 0.72
T2 (75 mg/kg)	$a^* = 1.9898 + 2.5651 Ax$	R = 0.82
	$b^* = 11.7040 + 0.52839 Ax$	R = 0.36
	$L^* = 64.2740 - 1.9300 Ax$	R = - 0.71
	$H^\circ = 76.5214 - 6.7530 Ax$	R = - 0.81
	$C^* = 11.2091 + 1.8533 Ax$	R = 0.71
T3 (100 mg/kg)	$a^* = 1.7127 + 2.6784 Ax$	R = 0.85
	$b^* = 11.6060 + 0.59608 Ax$	R = 0.42
	$L^* = 64.2910 - 1.8150 Ax$	R = - 0.68
	$H^\circ = 77.2673 - 7.0515 Ax$	R = - 0.84
	$C^* = 10.9930 + 1.9581 Ax$	R = 0.75
T4 (Ax-Cx)	$a^* = 2.0570 + 2.4783 Ax$	R = 0.81
	$b^* = 11.7370 + 0.48249 Ax$	R = 0.33
	$L^* = 63.9910 - 1.6380 Ax$	R = - 0.63
	$H^\circ = 76.6065 - 6.7388 Ax$	R = - 0.82
	$C^* = 11.3012 + 1.7476 Ax$	R = 0.68

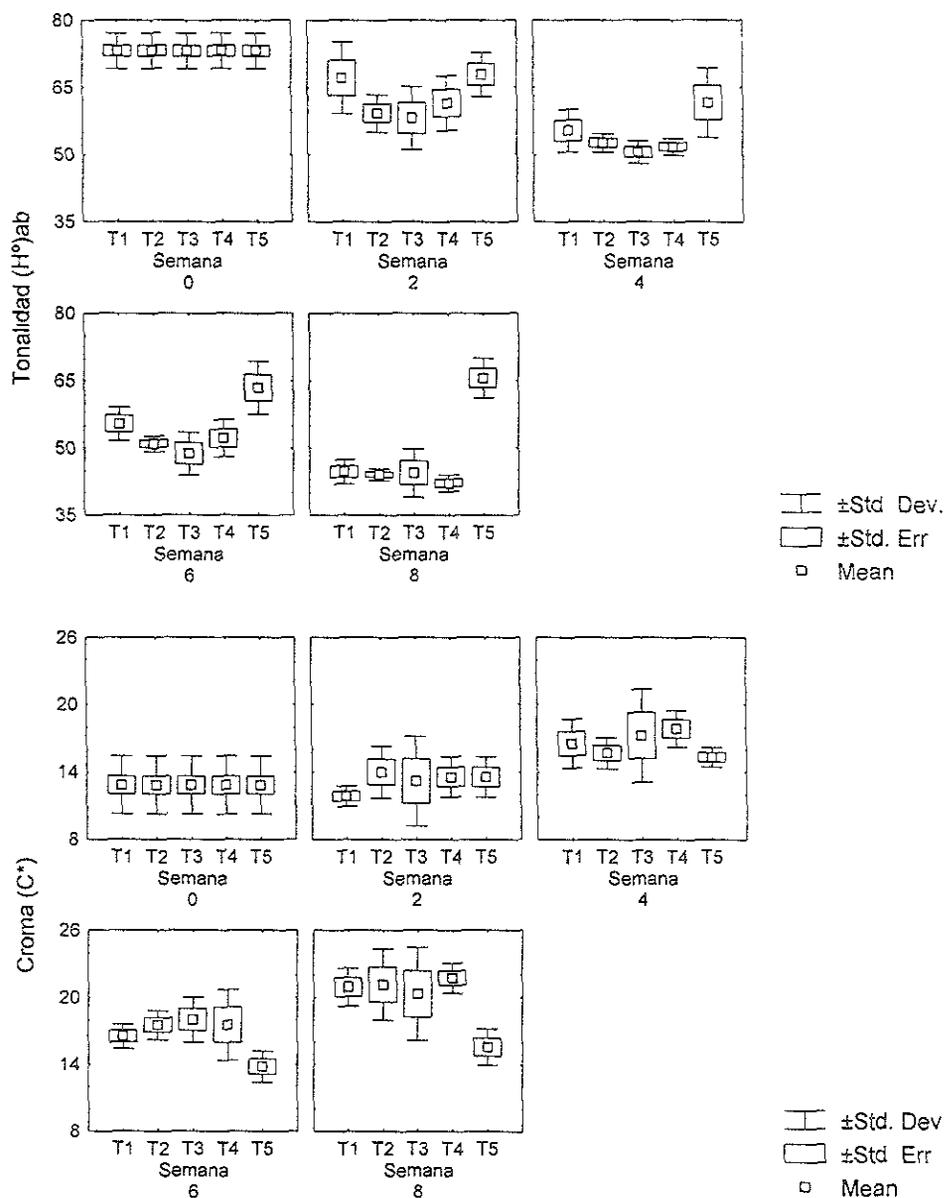


Figura 21. Tonalidad del color (H°ab) y cromas (C*) en el músculo de la trucha arcoiris, en función de los niveles de inclusión de astaxantina de langostilla en la dieta y del tiempo de ingestión. T1, 50 mg/kg; T2, 75 mg/kg; T3, 100 mg/kg; T4, tratamiento de referencia (Ax-Cx); T5, grupo testigo (sin Ax).

4B.6. Comportamiento de la trucha durante el experimento

Una vez trasladados a los estanques de concreto los peces se mostraron con gran actividad de nado, saltando sobre la superficie del agua pero sin llegar a salir al exterior. Durante la primera semana las dietas fueron medianamente aceptadas, sin embargo, a mediados de la segunda semana se observó en los organismos una ligera renuencia a aceptar las dietas experimentales, dejando en consecuencia alimento residual. Para prevenir un deterioro en la calidad del agua, se disminuyó a partir de esta fecha la ración diaria a 1.2% de la biomasa total de cada estanque, cantidad que sí fue consumida en su totalidad en las siguientes semanas.

4B.7. Tasa específica de crecimiento de la trucha arcoiris (TEC)

Destaca en la Tabla 13 la tasa específica de crecimiento (TEC) de los organismos al finalizar el experimento. Los resultados obtenidos mostraron que dicho parámetro fisiológico no fue afectado por la adición del pigmento de langostilla en ninguna de sus concentraciones ($P>0.05$). Las medias observadas en los tres tratamientos no mostraron diferencia significativa con respecto al tratamiento de referencia (T4) y el grupo testigo (T5). Al término de las ocho semanas el incremento de peso registrado en los peces fue de 45, 53, 51, 58 y 66%, con respecto al peso inicial en los tratamientos T1 a T5, respectivamente, incrementos inferiores a los contemplados en otros estudios con trucha arcoiris, como los de Austreng *et al.* (1987) y Torrissen, (1989).

4B.8. Factor de conversión alimenticia de la trucha arcoiris (FCA)

Los coeficientes de conversión alimenticia expresados igualmente en la Tabla 13, no presentaron diferencia significativa entre los grupos estudiados, sin embargo, los niveles más altos se concentraron en los organismos que recibieron astaxantina de langostilla, con magnitudes ligeramente superiores a los obtenidos en las granjas trutícolas de la región como Rancho El Pedregal (Edo. de México), centro trutícola de Malinalco (Edo. de México) o granja Amanalco, cuyos coeficientes se mencionaron anteriormente.

4B.9. Signos patológicos y mortalidad de la trucha

Al finalizar la segunda semana de experimentación se observaron algunos organismos con las branquias ligeramente inflamadas en cada uno de los estanques. Un pez perteneciente al grupo testigo (T5), murió en esta misma ocasión. Las medidas adoptadas para disminuir el posible estrés de los organismos ocasionado por los nuevos factores ambientales fueron la reducción de la ración diaria de alimento a 1.2% en toda la población y el incremento de la limpieza de los estanques, consistente en un barrido semanal y purgado de los mismos cada 48 h. La única pérdida de la trucha en las ocho semanas fue la del grupo testigo, la cual representó el 1.08% de mortalidad en esa población de referencia. En la inspección ocular de los órganos internos de los peces extraídos en cada etapa de muestreo, no se apreció ninguna anomalía. Los hígados de todos los organismos presentaron color, tamaño y crecimiento normal, fluctuando entre 3.95 ± 0.82 g a 5.05 ± 1.06 g entre la semana 0 y la semana 8, respectivamente.

Tabla 12. Tasa de crecimiento de la trucha arcoiris, y otros parámetros fisiológicos frente a los diferentes niveles de inclusión de astaxantina de langostilla en el alimento, a las ocho semanas de experimentación en condiciones piloto.

Tratamientos/ nivel de inclusión	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Mortalidad (%)	TEC (%)	FCA
T1 (50 mg/kg)	252±8.61	365±10.12	0.0±0.0 ^c	0.74±0.08 ^b	1.97±0.26 ^a
T2 (75 mg/kg)	247±10.47	377±4.72	0.0±0.0 ^c	0.84±0.05 ^b	1.76±0.08 ^a
T3 (100 mg/kg)	252±9.61	380±5.05	0.0±0.0 ^c	0.82±0.00 ^b	1.76±0.02 ^a
T4 (Ax-Cx)	250±12.00	394±15.44	0.0±0.0 ^c	0.91±0.07 ^b	1.58±0.19 ^a
T5 (Testigo)	269±12.28	446±41.21	1.08±0.0 ^c	1.00±0.18 ^b	1.32±0.34 ^a

Media ± d.e (n=100 peces en la semana cero y n=88 en la semana ocho por tratamiento); TEC, tasa específica de crecimiento, FCA, factor de conversión alimenticia. ^{a,b,c} Literales iguales entre los tratamientos expresan no diferencia significativa (P>0.05)

DISCUSIÓN

Una ventaja importante del método de extracción de astaxantina con aceite, es la facilidad y rapidez del procedimiento, que permite obtener el carotenoide en condiciones de laboratorio y a pequeña escala. El pigmento es diluido en el medio en forma homogénea, distribuyéndose uniformemente en la superficie del alimento peletizado. Su inclusión no altera la formulación de las dietas ni la integridad del pelet, como sucede cuando se añaden los crustáceos molidos al alimento.

En la adaptación del método, reducir el contenido normal de agua de los organismos de langostilla, *Pleuroncodes planipes*, fue un factor muy importante. El abatimiento de la humedad hasta un 46% permitió obtener un buen nivel de concentración de astaxantina, suficiente para la elaboración del alimento experimental con la dosis deseada. Aún cuando la cantidad de carotenoide fue suficiente, el nivel de extracción observado con aceite es menor con respecto al obtenido con disolventes orgánicos, lo cual indica su escaso poder de penetración al complejo caroteno-proteína, o más aún, a la asociación quitina-proteína del exoesqueleto para remover al carotenoide. Por lo tanto, la obtención de astaxantina por este método implica tener un material residual de langostilla todavía rico en astaxantina, que podría ser utilizado como ingrediente en alimentos de uso acuícola o avícola (Carrillo-Domínguez *et al.*, 1995). Por otro lado, el carotenoide extraído por este método posee un mayor grado de esterificación que el compuesto en los organismos de origen, posiblemente debido a una preferente extracción de la fracción esterificada con el aceite, como fue considerado por Omara-Alwala *et al.* (1985), o por una esterificación durante la extracción caliente. Es posible que la disolución pigmentada, además de contener astaxantina, posea otros compuestos constituyentes del crustáceo los cuales le confieren un olor y sabor característico a la dieta produciendo la renuencia temporal de los peces a ingerir el alimento que lo contiene. En la opinión de Cadwallader *et al.* (1995), el olor particular de los invertebrados marinos es producido por sustancias volátiles derivadas de aminoácidos.

La causa principal de degradación de los carotenoides es la oxidación enzimática o no enzimática (Rodríguez-Amaya, 1997). Por esta razón, es muy importante proteger la integridad

de la molécula de astaxantina con las medidas preventivas utilizadas en el presente estudio. En un seguimiento practicado en el laboratorio a los extractos de aceite, se observó que con estas medidas y congelación a -20°C , el pigmento posee una estabilidad de 100% durante tres meses, de allí que es aconsejable almacenar el extracto pigmentado a temperaturas entre -15° a -20°C hasta el momento de su empleo. El abatimiento del 2% de la concentración de astaxantina en las dietas durante ocho semanas, es atribuible a la temperatura de refrigeración (4°C) en el que fueron conservadas las dietas y a la manipulación diaria del alimento durante el cálculo de las raciones. Sin embargo dicho decremento no disminuye la eficiencia de utilización del carotenoide en los peces. No obstante, es recomendable poner en práctica medidas de prevención para proteger la astaxantina, como el almacenamiento del alimento pigmentado a temperaturas de congelación y su menor contacto con la luz directa y el oxígeno ambiental.

Como se señaló oportunamente en la Figura 4, la exposición del extracto pigmentado a temperaturas altas por un tiempo prolongado influye en el nivel de recuperación del carotenoide. Altas temperaturas pueden ocasionar reacciones indeseables en la molécula del carotenoide como su isomerización, poniendo en riesgo la viabilidad del compuesto en los organismos (Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995; Rodríguez-Amaya, 1999). Schiedt *et al.* (1981), postulan que los diferentes isómeros *E/Z* son bien utilizados en la pigmentación muscular del salmón del Atlántico como en las especies del género *Oncorhynchus spp.* Por el contrario, Arai *et al.* (1987), después de utilizar astaxantina de krill extraída con aceite caliente en las dietas del salmón coho, sostienen que los isómeros *Z* del carotenoide son depositados en el músculo en proporciones de sólo 3 a 8%, indicando una absorción selectiva o depósito de la forma *trans* (*all E*) de astaxantina. Esta opinión fue recientemente confirmada por Osterlie *et al.* (1999), en un estudio en trucha arcoiris. Si se parte del concepto de que sólo de 4 a 8% del total de astaxantina ingerida es depositada en el músculo (Schiedt *et al.*, 1985), el estudio de la biodisponibilidad de la astaxantina de un subproducto como el aceite de langostilla, es importante. Preliminarmente, los resultados aquí obtenidos permiten suponer que la temperatura aplicada durante las extracciones, por un lapso no mayor de 30 minutos, no modifica substancialmente las proporciones isoméricas del carotenoide, o si ese es el caso, éstas son utilizadas indistintamente en la trucha arcoiris.

Al margen de las ventajas y desventajas del empleo del aceite de bacalao como extractante, utilizar el aceite de langostilla, *Pleuroncodes planipes*, en el cultivo de la trucha ofrece la alternativa de un uso integral del crustáceo para fines de nutrición acuícola, tema propuesto previamente por Civera *et al.* (1992 y 1994). Spinelli, en com. pers. con Chen y Meyers (1982), afirma que una concentración de 60 mg de astaxantina por 100 g de aceite puede ser considerada económicamente factible para fines acuícolas. El contenido de 116.9 mg/100 g estimado en el aceite de langostilla, sumado a otros nutrimentos esenciales del crustáceo como aminoácidos y ácidos grasos (Pierce *et al.*, 1971; Spinelli *et al.*, 1974; Castro *et al.*, 1995), que probablemente se encuentran en disolución en el aceite, alientan la posibilidad de utilizar directamente este compuesto en la elaboración de alimentos concentrados para la trucha arcoiris. Su utilización evitaría la incorporación a la dieta de altas concentraciones de minerales o quitina, como ocurre cuando se emplea harina de crustáceos (Meyers y Rutledge, 1971).

En la opinión de Goodwin (1954) y Tanaka *et al.* (1976), los crustáceos pueden presentar hasta diez carotenoides diferentes los cuales se encuentran principalmente esterificados a ácidos grasos de cadena larga (Renstrom y Liaaen-Jensen, 1981). Entre dichos carotenoides la astaxantina representa de 84 a 99% y el β -caroteno de 2 a 30%. Con los métodos analíticos aquí empleados se demostró que la astaxantina es el único carotenoide en la langostilla, *Pleuroncodes planipes*, el cual se encuentra a una concentración de 145 mg/kg. Dicho contenido es significativo al compararse con los niveles detectados en otros crustáceos probados en la pigmentación de salmónidos, como los enlistados a continuación:

Especie	Astaxantina	Concentración (mg/kg)	Referencia
Krill (<i>Euphausia spp.</i>)	Total	22-77	Lambertsen y Braekkan, (1971)
	Libre	(3-31%)	
	Monoéster	(30-49%)	
	Diéster	(33-65%)	
Copépodos (<i>C. finmarchicus</i>)	Total	39-84	Lambertsen y Braekkan, (1971)
	Libre	(25%)	
	Monoéster	(38%)	
	Diéster	(37%)	
Langostilla (<i>P. planipes</i>)	Total	100-160	Spinelli <i>et al.</i> (1974)

Langostilla (<i>P. planipes</i>)	Total	99	Wilkie (1972)
	Libre	(12.5%)	
	Esterificada	(83.5%)	
Langostilla (<i>P. planipes</i>) (re-extraída con aceite)	Total	1550	Spinelli y Mahnken (1978)
Acocil (<i>Procambarus clarkii</i>)	Total	153	Meyers y Bligh (1981)
	Esterificada	(49.4%)	
	Libre	(40.3%)	
	Astaceno	(10.3%)	
Acocil (<i>Procambarus clarkii</i>)	Total	137	Meyers <i>et al.</i> (1990)
<i>Pandalus borealis</i>	Total	74	Torrissen <i>et al.</i> (1981)
<i>Geryon quinques</i>	Total	76	Kuo <i>et al.</i> (1976)

La diferente composición de la astaxantina encontrada en la langostilla con respecto a la observada por Wilkie (1972), quien determinó 95.4% de astaxantina (12% en forma libre, 88% esterificada) y 4.6% de β -caroteno como carotenoide acompañante, puede obedecer a factores como la edad, tipo de alimentación, estado fisiológico, u otras características endógenas que influyen en la composición cuantitativa y cualitativa de los carotenoides en los organismos, y en particular en los crustáceos (Czecsuga, 1975; Otazu-Abrill, 1978; Goodwin, 1986).

Considerando que la ruta metabólica de los carotenoides de la dieta puede dividirse arbitrariamente en cuatro pasos: absorción, transporte, transformación y depósito (Putnam, 1991), y que el músculo es el principal tejido depositario de los carotenoides en los salmónidos (Schiedt *et al.*, 1985), la concentración de los carotenoides así como la composición de los mismos en el tejido pueden ser considerados como indicadores de los procesos metabólicos previos a su depósito. La presencia de astaxantina únicamente en su forma libre en el músculo de los peces tratados con el carotenoide de langostilla, y el depósito del compuesto a una tasa menor que la astaxantina sintética durante las primeras semanas de ingestión del alimento, sugieren la utilización de la fracción esterificada del pigmento de la dieta previa hidrólisis. Es posible que dicho retraso metabólico, coincidente con la renuencia de los peces a ingerir la dieta experimental, corresponda a un período de inducción de esterasas constitutivas de la trucha mediante un inductor específico, que en este caso, podría ser alguna de las moléculas esterificadas con la astaxantina. Una vez alcanzada la actividad hidrolítica y puesta a disposición la astaxantina libre, el carotenoide es absorbido y depositado en el músculo de la misma manera que la astaxantina sintética, como se corroboró en el experimento piloto. Un

aprovechamiento semejante al del pigmento de langostilla se obtiene con astaxantina de la levadura, *Phaffia rhodozyma*. Whyte (1993), quien experimentó durante 21 semanas con esta fuente de astaxantina en el salmón chinook, *Oncorhynchus tshawytscha*, observó un depósito predominante del carotenoide en el músculo entre la 8ª y 21ª semana en tanto que la astaxantina sintética se depositó principalmente en las primeras 12 semanas. Estos resultados confirman lo antedicho por Torrissen y Braekkan (1979), Schiedt *et al.* (1975), y Foss *et al.* (1987), con relación al efecto limitante de la astaxantina de origen natural o esterificada en la pigmentación de salmónidos. Sin embargo, como se refirió anteriormente, en el caso de la astaxantina de langostilla dicha limitación es superada a partir de la 6ª semana, obteniéndose en la 8ª semana resultados semejantes a los obtenidos de la aplicación de los pigmentos sintéticos, 100% en estado libre. Un resultado semejante al presente fue obtenido por Kamata (1977), al estudiar el efecto de la astaxantina de camarón sobre la pigmentación de la trucha. El autor así como otros investigadores, entre ellos Torrissen *et al.* (1989), atribuyen a su vez tal ventaja a la posible influencia de otros compuestos acompañantes del carotenoide. En este sentido, es probable que los ácidos grasos esterificados con la astaxantina de los crustáceos jueguen un papel importante en el metabolismo del pigmento en los salmónidos. Al respecto, Borel *et al.* (1996), afirman que los ácidos grasos influyen en la solubilidad y transferencia de los carotenoides en la fase acuosa de una emulsión con triglicéridos. Por su parte, Bjerkgeng *et al.* (1999), observaron que el depósito de la astaxantina en el músculo del salmón del Atlántico, *Salmo salar*, fue correlacionado positivamente con el contenido de ácidos grasos monoinsaturados del aceite de la dieta y negativamente con el contenido de ácidos grasos n-3. Si se considera que en la langostilla, *Pleuroncodes planipes*, los monoenos más abundantes son el ácido palmitoleico (16:1) y oleico (18:1) (Pierce *et al.*, 1971; Spinelli *et al.*, 1974), una hipótesis plausible sería que estos compuestos favorecen el aprovechamiento metabólico de la astaxantina en la trucha arcoiris.

Es factible que los menores depósitos de pigmento en el músculo observados antes de las seis semanas con la inclusión de 50 mg/kg, corresponda a una insuficiente concentración de astaxantina en el alimento para desencadenar la actividad enzimática previa a su absorción. Choubert y Storebakken (1989), Storebakken y Choubert (1991), demostraron que dosis de 50

mg/kg o inferiores permiten mayor absorción y depósito en el músculo debido a la mejor digestibilidad del carotenoide cuando su concentración en la dieta es baja y el tiempo de exposición es prolongado. En el caso de la astaxantina de langostilla, los resultados parecen indicar que su aprovechamiento depende principalmente de la interrelación enzima-sustrato, por lo que el factor más importante es el tiempo de ingestión más que la dosis del compuesto en la dieta. Un dato que permite resaltar esta conjetura es el incremento pronunciado del contenido de astaxantina en el músculo de los peces (correspondientes al tratamiento con 50 mg/kg de astaxantina), durante las dos últimas semanas. Por lo consiguiente, el tiempo mínimo requerido para obtener un buen depósito en el músculo con dicha inclusión es ocho semanas, mientras que con las dosis de 75 y 100 mg/kg esto se consigue desde las seis semanas.

Los ejemplares jóvenes de la trucha (menores de 100g), poseen un contenido mínimo de carotenoides en el músculo (March, 1990). Del mismo modo, durante la madurez sexual al ser trasladada la astaxantina del músculo a otros tejidos como piel y gónadas, el contenido del pigmento muscular también es mínimo. En ambas etapas de desarrollo la retención del carotenoide en el músculo es casi nula (Choubert y Blanc, 1983). La poca variación de los niveles de retención en el músculo de los peces experimentales, tanto en el experimento de laboratorio como piloto (Figs. 9 y 19), sugieren estabilidad del carotenoide en esta etapa fisiológica de la trucha, hecho que debe ser aprovechado si se busca una buena pigmentación para fines comerciales. La pureza genética de los organismos empleados en el experimento de laboratorio fue un factor que posiblemente favoreció una mayor retención (36% superior) con la astaxantina sintética como resultado de un mayor depósito en el músculo, con respecto a la obtenida en los peces del experimento piloto, aún con los carotenoides sintéticos. Niveles de retención semejantes a los aquí obtenidos fueron observados por Spinelli y Mahnken (1978), al utilizar astaxantina de *P. planipes*, en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). Dichos investigadores calcularon niveles de retención de 3 a 5% en el músculo después de 17 semanas. A su vez, Schiedt *et al.* (1985), determinaron por métodos radioactivos la retención de la astaxantina sintética en el músculo de la trucha arcoiris (de 200-250 g), del orden de 4 a 8% después de suministrar 100 mg del carotenoide durante cuatro semanas.

Es categórico subrayar que este parámetro definido como la cantidad de pigmento retenido en el músculo con respecto al pigmento tomado del alimento (Torrissen, 1985), y utilizado como indicador de eficiencia del carotenoide en el proceso de pigmentación, carece hasta el momento de un método estandarizado para su medición, por lo que la comparación directa de los resultados entre los estudios existentes es un tanto arbitraria. Dada la dificultad que implica el cálculo exacto de la cantidad de alimento ingerido en los organismos acuáticos, en la determinación de este parámetro se han utilizado variantes de una misma fórmula como las contempladas por Choubert y Luquet (1983), Torrissen (1985), Storebakken y Choubert (1991), No y Storebakken (1991), Hatlen *et al.* (1995), Torrissen *et al.* (1995), mismas que han generado niveles comprendidos en el amplio intervalo de 2.2% (Torrissen *et al.*, 1979) a 60% (Kotik *et al.*, 1979). Las discrepancias en los resultados pueden ser también atribuidas a las diferentes condiciones experimentales y ambientales de cada estudio, así como a las características biológicas de los peces. Por esta razón, adoptar y normalizar un método único de medición de éste y otros parámetros es muy recomendable para futuras investigaciones.

La naturaleza genética de los organismos juega un papel determinante sobre el metabolismo de los carotenoides en los salmónidos. En opinión de Ando *et al.* (1989), los representantes del género *Oncorhynchus*, depositan en el músculo predominantemente astaxantina, mientras que otras especies como la trucha café, *Salmo trutta*, o truchas de manantial *Salvelinus sp.*, modifican la astaxantina del alimento en zeaxantina y luteína depositándolos en el tejido como metabolitos del primero. Sin embargo, dichas xantofilas amarillas no siempre tienen un origen metabólico. Debido a la incapacidad de conversión de carotenoides en la mayoría de los salmónidos, estos compuestos al estar presentes en la dieta son depositados como tales en el músculo, hecho que podría explicar la presencia de luteína en los peces experimentados a nivel piloto, los cuales consumieron la dieta basal elaborada entre otros ingredientes, con cereales y sub-productos vegetales (J. Zendejas, Purina S.A. de C.V., com. pers.), cuyos principales carotenoides son luteína y zeaxantina (Marusich y Bauernfeind, 1981). En cuanto a la zeaxantina detectada en los organismos que recibieron astaxantina con la dieta, podría pensarse que además de tener un origen alimenticio tuvo un origen metabólico asociado con el patrón genético particular de la población de truchas de Amanalco. La ausencia

de esta xantofila en el músculo de la trucha “kamloops” del experimento de laboratorio, permite inferir que la naturaleza esterificada de la astaxantina de langostilla no determina su transformación en zeaxantina, como fuera demostrado por Schiedt *et al.* (1986), al utilizar diésteres de astaxantina en la trucha, *Oncorhynchus mykiss*.

Existe una correspondencia directa entre el contenido de carotenoides en el músculo y el color rojo del tejido (Skrede y Storebakken, 1986; Skrede *et al.*, 1990; Hatlen y Jobling, 1998). Esta correspondencia, sin embargo, es imprecisa después de un contenido de 6 mg/kg (Foss *et al.*, 1984), razón por la cual los salmicultores europeos utilizan dicho nivel como límite, en el entendido de que el ojo humano es incapaz de distinguir variaciones de rojo después de tal concentración. Los resultados observados en el ensayo de laboratorio, en el cual la cromaticidad roja (a^*) del músculo se mantiene casi constante después de una concentración de 5 mg/kg (Fig. 11), permiten suponer que a tal concentración se encuentra el umbral de saturación de la astaxantina en el músculo de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*. Por lo tanto, sostener el proceso de pigmentación después de haber alcanzado dicha concentración resultaría innecesario. Una observación paralela a la determinación del contenido de astaxantina en el músculo de los peces que recibieron astaxantina sintética (T3), en el experimento de laboratorio fue la detección de cantidades importantes del carotenoide (3.5 ± 2.5 mg/kg), en los ovarios de 9 ejemplares al término del ensayo. Tal parece que una vez alcanzada la saturación en el músculo, el pigmento es transportado hacia los ovarios aún antes de la madurez sexual.

Spinelli y Mahnken (1978), tras realizar análisis sensoriales de la carne del salmón coho, sostuvieron que a un depósito de 3.5 ± 0.05 mg/kg de astaxantina en el tejido le corresponde una buena pigmentación y a 4.5 ± 0.05 mg/kg una pigmentación excelente, concepto compartido por Ugletveit (1974), citado por Chen *et al.* (1984), y Torrissen *et al.* (1989). Aplicando este criterio, la trucha arcoiris con astaxantina de langostilla del experimento de laboratorio, así como aquellas que recibieron 75 y 100 mg/kg en el experimento piloto, mostraron buena pigmentación a las seis semanas y excelente a las ocho semanas. En cambio, los ejemplares con 50 mg/kg mostraron una pigmentación excelente sólo a las ocho semanas y similar a la obtenida con las inclusiones de 75 y 100 mg/kg. Al no haber efecto significativo de los niveles de

inclusión de astaxantina en el alimento sobre el depósito del carotenoide en el músculo y la pigmentación resultante a las ocho semanas, podría admitirse que el costo de pigmentación de la trucha sería menor al utilizar la menor concentración en la dieta, es decir 50 mg/kg.

La determinación colorimétrica mediante el sistema de medición CIE L*, a*, b* (CIE, 1986), desarrollado en 1931 por la Comisión Internacional de Iluminación (Commission Internationale de l'Eclairage), es ampliamente utilizada en la evaluación de la carne de salmónidos, en la cual los índices a* y b* poseen mayor importancia. Los resultados obtenidos con este procedimiento permiten hacer comparaciones más precisas y objetivas con respecto a las pruebas sensoriales. El contenido de astaxantina como carotenoide único en el músculo de los peces experimentados a nivel laboratorio fue reflejado en los índices más altos de rojicidad (a*) con respecto a los peces del cultivo piloto, los cuales posiblemente debido a la zeaxantina depositada, los niveles de rojicidad aún a las ocho semanas fueron menores (Tablas 4 y 10). Los resultados indican en consecuencia que al margen de la fuente de astaxantina en el alimento y de su concentración en el músculo, la composición de los carotenoides en el tejido influye significativamente en la pigmentación final de la carne, hecho que confirma afirmaciones precedentes (Torrissen, 1985; Hardy *et al.*, 1987).

Dado a que el índice luminosidad (L*), es afectado principalmente por el contenido de agua en el tejido, su medición, así como la de los otros índices debe hacerse inmediatamente después de fileteada la carne (Skrede *et al.*, 1989). Si las muestras son sometidas a congelamiento previo, el contenido de agua en el tejido puede alterar la reflexión de la luz y originar datos que no corresponden al músculo. Igualmente, las condiciones de refrigeración pueden alterar dichas mediciones. En una serie de estudios sobre descoloración de los pigmentos del pescado rojo, Tsukuda y Amano (1966), observaron que a temperaturas de refrigeración y oscuridad, una lipoxigenasa puede convertir la astaxantina en compuestos menos coloreados, modificando por lo tanto las características colorimétricas originales de la carne.

El ángulo *hue* o tonalidad (H°)_{ab}, y el croma (C*), son herramientas alternas que también se emplean en la evaluación de la carne (Hatlen y Jobling, 1998). En ambos experimentos se

advirtió que la tonalidad (H°_{ab}) es más sensible a las variaciones de (a^*) que el croma (C^*), por ende, su empleo como parámetro alternativo de medición es más recomendable. Al finalizar los experimentos la tonalidad obtenida con astaxantina de langostilla fueron de niveles comparables con los obtenidos de la aplicación de los carotenoides sintéticos en el experimento piloto y sólo superado por la astaxantina sintética en el experimento de laboratorio, como consecuencia de un mayor depósito en el músculo. En el entendido de que a valores más cercanos a cero corresponden tonalidades más rojas, las características de color aquí obtenidas fueron superiores a las observadas en otros trabajos con astaxantina sintética como los de Skrede *et al.* (1990), y Choubert *et al.*, (1992).

La alteración de los factores ambientales, entre los cuales se pueden citar: la composición del alimento, condiciones físico químicas del agua, presencia de agentes infecciosos, pueden ocasionar modificaciones fisiológicas o bioquímicas en los peces, manifestación conocida como Síndrome General de Adaptación (SGA) (Roberts, 1989). En tales circunstancias, pueden sobrevenir infecciones por microorganismos patógenos facultativos como el hongo *Saprolegnia spp.*, cuyas esporas abundan sobre todo a temperaturas bajas por lo que es frecuente en cultivos de salmónidos. Las infecciones se producen normalmente por la presencia de lesiones en la piel las cuales facilitan la penetración de los hongos pudiendo llegar a causar desequilibrios en los fluidos orgánicos y trastornos circulatorios en los peces (Roberts, *op cit.*). Un posible factor condicionante de la saprolegniosis temporal observada en el presente estudio fue posiblemente la manipulación durante el pesado de los peces y la limpieza de los estanques, dejando como consecuencia algunas lesiones en la piel de los peces. Otro factor perturbador pudo haber sido la dieta experimental y sus nuevas características organolépticas. El alimento rechazado sumado a otras fuentes de materia orgánica del agua pudieron influir en la composición química de ésta constituyendo otro factor de presión para la trucha. En ambos experimentos, el control oportuno directo o indirecto de dichos factores con medidas como la reducción de la ración diaria, la limpieza de los estanques con sifón o a intervalos más espaciados y la aplicación de sal en disolución en los estanques (en el caso del experimento de laboratorio), permitieron corregir oportunamente dichas anomalías. La aplicación de disolución salina posee efectos benéficos como la reducción de los niveles de nitrógeno y amoníaco en la sangre de los peces, la

amoníaco en la sangre de los peces, la estimulación de secreción de mucosa y el efecto astringente en los tejidos branquiales (Klontz, 1991b).

La composición de los ingredientes de la dieta puede provocar una baja digestibilidad del alimento en los peces y producir alteraciones metabólicas que influyen en el crecimiento de los mismos (Zamora y Echevarría, 1990; Pike, 1998). Se ha observado por ejemplo, que dietas con grasas insaturadas, grasas enranciadas (con altos niveles de peróxidos), u otros subproductos de origen animal, pueden provocar disturbios hepáticos en los peces manifestados por un hígado amarillento y brillante, degeneración de las células hepáticas, hemorragia en las vísceras y palidez de las branquias (Roberts y Sheperd, 1974). En lo concerniente a las características morfológicas del hígado observadas en la trucha en ambos ensayos, éstas fueron normales en lo concerniente a tamaño y pigmentación. Siendo el hígado un órgano sensible a los trastornos metabólicos (Roberts, 1989), la ingestión de astaxantina esterificada de langostilla con la dieta por un lapso no mayor a ocho semanas, aparentemente no produjo alteraciones macroscópicas en dicho órgano. Tomando en cuenta los antecedentes publicados por De la Nöue y Choubert (1986), quienes sostienen que la digestibilidad aparente de la astaxantina esterificada en la trucha arcoiris es 13% y de la astaxantina libre 97%, es factible que la ingestión de astaxantina de langostilla provoque algún trastorno nutricional. Considerando que las enfermedades nutricionales se desarrollan lentamente en largos períodos de tiempo (Chávez, 1993), un factor que pudo evitar un posible trastorno en la salud de los organismos es el tiempo reducido de exposición al alimento experimental, mientras que para fines metabólicos del carotenoide, la corta exposición de seis a ocho semanas fue suficiente. Otro factor muy relacionado con estos resultados sin duda es la edad de los peces en virtud de que la actividad enzimática en los mismos depende de esta variable (Dabrowski, 1977). Por lo consiguiente, la extrapolación de estos resultados a poblaciones de diferente tamaño o edad no es recomendable.

En condiciones óptimas de crianza (con agua de manantial y a 15°C), es posible observar en la trucha arcoiris una tasa de crecimiento específico de 1.0 (Klontz, 1991a). Las tasas ligeramente más bajas observadas no solo en los peces experimentales sino en los del grupo testigo, pueden obedecer en el caso del experimento de laboratorio a la baja temperatura del

agua (9.5°C). En general en los salmónidos, cada grado centígrado menor que la temperatura ambiental estándar (15°C), representa una disminución de 8.25% en la tasa de crecimiento de los organismos (Klontz, 1991a). Mientras que en los organismos del cultivo piloto, la variable de mayor efecto sobre el crecimiento de los organismos pudo ser la concentración de amoníaco en los estanques, cuyo nivel de 0.08 ± 0.11 mg/l es superior al mínimo recomendable (0.03 mg/l). No obstante, el incremento de peso obtenido al finalizar los ensayos corresponde a los obtenidos en otras granjas de la región y a otros antecedentes (Austreng *et al*, 1987; Torrissen, 1989).

La mayoría de los alimentos comerciales están formulados para dar conversiones entre 1.2 a 1.4:1 en la trucha arcoiris (Klontz, 1991b). Los resultados obtenidos en el experimento de laboratorio fueron comparables a dichos niveles de referencia, lo cual implica un buen aprovechamiento del alimento. Sin embargo, en el experimento piloto y sobre todo en los organismos experimentales, se obtuvieron conversiones menos eficientes posiblemente relacionadas con la poca ingestión del alimento con aceite de langostilla durante las dos primeras semanas. A pesar de dichos resultados las diferentes conversiones en los tratamientos fueron comparables estadísticamente con respecto al grupo testigo.

Por último, la total sobrevivencia de los peces sujetos al carotenoide de langostilla en la dieta tanto en el experimento de laboratorio como piloto, sugieren un adecuado mecanismo de adaptación en los peces a las nuevas condiciones ambientales en ambas condiciones. Mortalidades de 1.85 y 1.08% como las aquí observadas, se pueden considerar normales si se estima que la trucha arcoiris mayores de 12 cm a tamaño comercial, presentan en condiciones óptimas de desarrollo mortalidades de 1 a 10% (Villalobos, 1983).

Como concepto aclaratorio se podría añadir que aunque el color rojo de la carne de los salmónidos es en ocasiones asociado con la calidad del producto y buena salud de los organismos (Latscha, 1990; Scott *et al.*, 1994), dicha característica no manifiesta directamente el estado de salud de los mismos. Sólo se podría utilizar como un indicador indirecto de la actividad trófica de los mismos en el medio.

CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación son aplicables a la trucha arcoiris, en su etapa de desarrollo previa a la madurez sexual (de 300 a 400g). Las conclusiones más importantes son:

1. La astaxantina de la langostilla, *Pleuoncodes planipes*, a pesar de su alto nivel de esterificación, es utilizada eficientemente en la trucha arcoiris a partir de la sexta semana de su ingestión. En la octava semana el carotenoide es depositado en el músculo en la misma magnitud que la astaxantina sintética.
2. El retraso metabólico en la utilización de la astaxantina de langostilla en la trucha, durante las primeras semanas de ingestión del carotenoide, es interpretado como el resultado de un proceso de inducción enzimática necesario para la descomposición hidrolítica del compuesto.
3. En condiciones de laboratorio y después de un tratamiento de seis semanas con 75 mg de astaxantina de langostilla por kg de alimento, el depósito de astaxantina en el músculo de la trucha así como la cromaticidad roja (a^*) del tejido, son semejantes ($P > 0.05$) a los obtenidos con la levadura, *Phaffia rhodozyma*, y menores ($P < 0.05$) con respecto a la astaxantina sintética (Carophyll Pink). Sin embargo, ambos parámetros mostraron una tendencia de crecimiento con el tiempo. Los niveles de pigmentación alcanzados, se encuentran en los intervalos comercialmente aceptables.
4. En condiciones de cultivo piloto, el depósito y retención de astaxantina así como la pigmentación muscular de la trucha arcoiris después de ingerir astaxantina de langostilla a concentraciones de 50, 75 y 100 mg por kg de alimento, poseen niveles semejantes ($P > 0.05$) a los obtenidos con el carotenoide sintético a las ocho semanas. Las inclusiones de 75 y 100 mg/kg producen niveles aceptables de pigmentación desde las seis semanas, en tanto que la inclusión de 50 mg/kg no es recomendable antes de las ocho semanas. A pesar de la diferencia no significativa entre los resultados, los mejores índices se tuvieron con la inclusión de 75 mg/kg, siendo por lo tanto, la dosis más adecuada para su

aplicación en el cultivo de la trucha. Este criterio podría ser aplicado en condiciones de cultivo de mayor escala, siempre y cuando, la edad de la trucha corresponda al de los organismos aquí utilizados.

5. De los experimentos llevados a cabo en condiciones de laboratorio como piloto, se desprende que la homogeneidad genética de la población de la trucha, así como la composición de carotenoides en los ingredientes de la dieta y en el músculo, pueden influir en la pigmentación final de la carne.
6. La ingestión de la astaxantina de langostilla en la trucha arcoiris durante seis a ocho semanas, no tiene ningún efecto significativo sobre tasa de crecimiento específico (TCE), factor de conversión alimenticia (FCA) y mortalidad de la trucha, ni produce deterioro en la salud de los organismos atribuibles a algún trastorno nutricional.
7. La recuperación de astaxantina de la langostilla, *Pleuoncodes planipes*, con aceite de bacalao en el laboratorio, es un procedimiento rápido, sencillo, y aunque posee baja eficiencia de extracción del carotenoide, la concentración de astaxantina en el aceite es suficiente para elaborar el alimento de la trucha para propósitos de pigmentación.

Las ventajas de utilizar dicho extracto como complemento del alimento son:

- a. Permite la fácil inclusión del pigmento a la dieta y la preparación de ésta a medida que se necesite.
- b. La disolución en aceite es adsorbida uniformemente en el alimento peletizado permitiendo una distribución homogénea de la astaxantina en el mismo.
- c. No altera la composición proximal de las dietas ya que el extracto pigmentado aporta parcial o totalmente la inclusión de aceite necesario en el alimento.

Entre las desventajas de su empleo se pueden citar:

a. Confiere al alimento un olor característico que provoca la renuencia en los peces a capturar la comida durante los primeros días.

8. La astaxantina en el crustáceo, *Pleuroncodes planipes*, se encuentra a una concentración de 145 mg/kg, con una composición de 24% en forma libre y 76% esterificada. Esta concentración es reducida a 60 mg/kg en el extracto de aceite, equivalente a 112 mg de astaxantina por 100 g de aceite, con una composición de 8% en forma libre y 92 % esterificada, niveles muy semejantes a los encontrados en el aceite de langostilla.

El valor más conspicuo de la utilización de la astaxantina de langostilla en la pigmentación de la trucha arcoiris radica en:

a. El pigmento es utilizado eficientemente por la trucha sin efectos adversos sobre la salud o el crecimiento de los organismos.

b. A pesar de su composición predominantemente esterificada, el compuesto es utilizado por la trucha con la misma eficiencia que la astaxantina sintética.

c. Su consumo no produce el depósito de otros carotenoides diferentes a la astaxantina en el músculo, de tal forma que pudieran interferir en la pigmentación roja de la carne.

LITERATURA CITADA

- Al-Khalifa, A.S. and Simpson, K. 1988. Metabolism of astaxanthin in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 91B(3):563-568.
- Ando, S. and Hatano, M. 1987. Metabolic pathways of carotenoids in chum salmon *Oncorhynchus keta* during spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B:411-416.
- Ando, S., Osada, K., Hatano, M. and Saneyoshi, M. 1989. Comparison of carotenoids in muscle and ovary from four genera of salmonid fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 93B: 503-508.
- Ando, S. and Hatano, M. 1991. Distribution of carotenoids in the eggs from four species of salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B:341-345.
- Andrewes, A.G., Phaff, H.J. and Starr, M.P. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochem.* 15: 1003-1007.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Arai, S., Mori, T., Miki, W., Yamaguchi, K., Konosu, S., Satake, M., Fujita, T. 1987. Pigmentation of juvenile coho salmon with carotenoid oil extracted from Antarctic krill. *Aquaculture* 66:255-264.
- Aurioles-Gamboa, D. 1992. Inshore-offshore movements of pelagic red crabs *Pleuroncodes planipes* (Decapoda, Anomura, Galatheidae) off the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico. *Crustaceana* 62(1):71-84.
- Aurioles-Gamboa, D. 1995. Distribución y abundancia de la langostilla bentónica (*Pleuroncodes planipes*) en la plataforma continental de la costa oeste de Baja California. En: Aurioles-Gamboa D. y E.F. Balart (Ed.). *La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México, 59 pp.
- Austreng, E., Storebakken, T., Asgard, T. 1987. Growth rate estimates for cultured Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 60:157-160.
- Bardach, J.F., Ryther, J.H., and McLarney, W.O. 1972. Commercial culture of freshwater salmonids. Cap. 2. In: *The Farming and Husbandry of Freshwater and Marine Organisms*. John Wiley and Sons, Inc. 868 pp.
- Bernhard, K. 1991. Synthetic astaxanthin. The route of a carotenoid from research to commercialization. In: *Carotenoids, chemistry and biology*. Krinsky N.Y., Mathews-Roth M.M. and Taylor R.F. (Eds.). Plenum Press, N.Y. pp 337.
- Binkowski, F.P., Sedmak, J.J., Jolly, S.O. 1993. An evaluation of *Phaffia* yeast as a pigment source for salmonids. *Aquaculture Magazine*, March/April 54-59.
- Bjerkeng, B., Storebakken, T., Liaaen-Jensen, S. 1990. Response to carotenoids by rainbow trout in the sea: resorption and metabolism of dietary astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture* 91:153-162.

- Bjerkeng, B., Storebakken, T., Liaaen-Jensen, S. 1992. Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation. *Aquaculture* 108:333-346.
- Bjerkeng, B., Folling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J.J., Alsted, N. 1997. Bioavailability of all-E-astaxanthin and Z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 157:63-82.
- Bjerkeng, B., Hatlen, H., Wathne, E. 1999. Deposition of astaxanthin in fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with herring, capelin, sandeel, or Peruvian high PUFA oils. *Aquaculture* 180:307-319.
- Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D., Azais-Braesco, V. 1996. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution and release from lipid droplets. *J. Lipid Res.* 37:250-261.
- Boyd, C.M. 1962. The biology of a marine decapod crustacean, *Pleuroncodes planipes* Stimpson, 1860. Tesis doctoral, Universidad de California, 123 pp.
- Britton, G. 1983. *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge University Press, London, 366 pp.
- Buchwald, M. and Jencks, H.P. 1968. Optical properties of astaxanthin solution and aggregates. *Biochem.* 7(2):834-843, 1968.
- Cadwallader, K.R., Tan, Q., Chen, F., Meyers, S.P. 1995. Evaluation of the aroma of cooked spiny lobster tail meat by aroma extract dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* 43:2432-2437.
- Carrillo-Domínguez, S., Pérez-Gil, F., Avila-González, E. y Castro- González, I. 1995. La langostilla en la avicultura. En: Aurióles-Gamboa D. y E.F. Balart (Ed.). *La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México, 193 pp.
- Castro, M.I., Carrillo, S., Pérez-Gil, F. y Calvo, C. 1995. Composición química de la langostilla y procesos tecnológicos En: Aurióles-Gamboa D. y E.F. Balart (Ed.). *La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México, 163 pp.
- CIE (Commission Internationale de l'Eclairage). 1986. *Colorimetry*. 2nd. Ed. Publication No. 15.2, Vienna.
- Civera-Cerecedo, R., Goytortúa-Bores, E., Roca-Mesa, S. y Greene-Yee, A. 1992. Utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal as a protein source for *Penaeus vannamei* juvenils. Abstracts. Aquaculture '92, Orlando, Florida. Mayo 21-25, 1992.
- Civera-Cerecedo, R., Villareal, H., Vega-Villasante, Nolasco, H., Rocha, S., Goytortúa-Bores, E., González, M. y Camarillo, M. T. 1994. Digestive enzyme activity and growth of *Penaeus vannamei* fed diets containing red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal as a protein source. Abstracts Aquaculture '94, New Orleans, Louisiana. Enero 14-18, 1994.

- Civera-Cerecedo, R., Goytortúa-Bores, E., Rocha-Meza, S., Nolasco-Soria, H. 1999. Conservación de langostilla, fabricación de harina, análisis químicos proximales, análisis microbiológicos y evaluación de dietas en condiciones de cultivo controlado en laboratorio. En: Balart, E. (Ed.). *Informe Final, Proyecto Piloto: Captura y Fabricación de Harina de Langostilla Bentónica para su Evaluación como Insumo Proteico en Alimento Balanceado para Camarón*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., México, 86 pp.
- Czeczuga, B. 1974. Comparative studies of carotenoids of the fauna of the Gullmar Fjord (Bohuslan, Sweden). II - Crustacea: *Eupagurus berhardus*, *Hyas coarctatus* y *Upogebia deltaura*. *Mar. Biol.* 28:95-98.
- Czeczuga, B. 1975. Carotenoids in *Eudiptomus amblyodon* Marenz (Crustacea) during ontogenetic development. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A:665-668.
- Chen, H.M. and Meyers, S.P. 1982. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *J. Food Sci.* 47:892-900, 1982.
- Chen, H.M., Meyers, S.P., Hardy, R.W. and Biede, S.L. 1984. Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions. *J. Food Sci.* 49:1337-1340, 1984.
- Choubert, G. Jr. 1979. Tentative utilization of Spirulin algae as a source of carotenoid pigments for rainbow trout. *Aquaculture* 18:135-143.
- Choubert, G. Jr. and Luquet P. 1982. Fixation et retention musculaire de la canthaxanthine par la truite arc-en-ciel. *Ann. Zootech.* 31:1-10.
- Choubert, G. Jr. and Luquet, P. 1983. Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) pigmentation. Influence of fat content of the diet. *Aquaculture* 32:19-26.
- Choubert, G., Blanc, J.M. 1985. Flesh colour of diploid and triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) fed canthaxanthin. *Aquaculture* 47:299-304.
- Choubert, G., Storebakken, T. 1989. Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentation of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations. *Aquaculture* 81:69-77.
- Choubert, G., Blanc, J.M., Courvalin, C. 1992. Muscle carotenoid content and colour of farmed rainbow trout fed astaxanthin or canthaxanthin as affected by cooking and smoke-curing procedures. *Int. J. Food Sc. Tech.* 27:277-284.
- Choubert, G., Milicua, J.C. and Gómez, R. 1994a. The transport of astaxanthin in immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* serum. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A:245-248.
- Choubert, G., Gómez, R. and Milicua, J.C. 1994b. Response of serum carotenoid levels to dietary astaxanthin and canthaxanthin in immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A:1001-1006.
- Davies, B.H. 1976. Carotenoids. In: Goodwin, T.W. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd. Ed., Vol. 2. Academic Press, London, pp 38-165.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Dabrowski, K. and Glogowski, J. 1977. A study of the application of proteolytic enzymes to fish food. *Aquaculture* 12(4):349-360.
- Donkin, P. 1976. Ketocarotenoid biosynthesis by *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry* 15:711-718.
- Drummond, S.S. 1990. *Trout Farming Handbook*. Fishing News Books, Osney Mead, Oxford, England. 164 pp.
- Fan, L., Vonshak, A., Gabbay, R., Hirshberg, J., Cohen, Z. and Boussiba, S. 1995. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus fluviialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. *Plant Cell Physiol.* 36(8):1519-1524.
- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E., Streiff, K. 1984. Carotenoids in diets for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture* 41:213-226.
- Foss, P., Storebakken, T., Austreng, E., Liaaen-Jensen, S. 1987. Carotenoids in diets for salmonids. V. Pigmentation of rainbow trout and sea trout with astaxanthin and astaxanthin dipalmitate in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture* 65:293-305.
- Fraser, P.D., Misawa, N., Linden, H., Yamano, S., Kobayashi, K. and Sandmann, G. 1992. Expression in *E. coli*, purification and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *J. Biol. Chem.* 267:19891-19895.
- Gómez, S. 1990. Efecto de la adición de carotenos en la dieta sobre la viabilidad y fecundidad de los huevos de trucha arcoiris *Salmo gairdneri* R. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1990.
- García Marín, E. 1981. Descripción física y económica de la granja de trucha de Malinalco, México. 1er. *Simposio Internacional de Educación y Organización Pesquera*. Gestión Tecnológicas de las Pesquerías, Cancún, México 3:1-10.
- Gobantes, I., Choubert, G., Milicua, J.C. and Gómez R. 1998. Serum carotenoid concentration changes during sexual maturation in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Agric. Food Chem.* 46:383-387.
- Goodwin, T.W. 1952. *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*. Chapman and Hall London, 356 pp.
- Goodwin, T.W. 1986. Metabolism, nutrition and function of carotenoids. *Annual Review of Nutrition* 6:273-297.
- Guillou, A., Khalil, M., Adambounou, L. 1994. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture* 130:351-360.
- Hardy, R.W., Scott, T.M., Harrell, L.W. 1987. Replacement of herring oil with menhaden oil, soybean oil, or tallow in the diets of Atlantic salmon raised in marine-net pens. *Aquaculture* 65:267-277.

- Hatlen, B., Aas, G.H., Jorgensen, E.H., Storebakken, T., Goswami, U.C. 1995. Pigmentation of 1, 2 and 3 year old Arctic char (*Salvelinus alpinus*) fed two different dietary astaxanthin concentrations. *Aquaculture* 138:303-312.
- Hatlen, B., Jobling, M. 1998. Relationships between carotenoid concentration and colour of fillets of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), fed astaxanthin. *Aquaculture Research* 29:191-202.
- Henmi, H. Hata, M. and Hata, M. 1989. Astaxanthin and/or canthaxanthin-actomyosin complex in salmon muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:1583-1589.
- Hope, A., Walch, M. 1990. *The Color Compendium*. Van Nostrand Reinhold, N.Y. 360 pp.
- Ingle, G. y Arredondo, J.L. 1996. Colorantes vegetales como agentes pigmentantes de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): Evaluación sensorial. *Reuniones Técnicas de la Red Nacional de Investigación para la Acuicultura en Aguas Continentales*. Memorias. Instituto Nacional de Pesca, SEMARNAP.
- Jhonson, E.A., Conklin, D.E. and Lewis, M.J. 1977. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *J. Fish. Res. Board Can.* 34:2417-2421.
- Jhonson, E.A. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology* 11(4):297-326.
- Jyonouchi, H., Sun S., Iijima, K. Gross, M. D. 2000. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition and Cancer* 36(1):59-65.
- Kamata T., Neamtu G.G. and Simpson K.L. 1977. The pigmentation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with *Hyppophae rhamnoides* oil. *Rev. Roum. Biochim.* 14(4):253.
- Kamata, T. 1977. The pigmentation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Master of Sci. Thesis. Univ. of Rhode Island, USA.
- Karrer, P. and Jucker, E. 1950. *Carotenoids*. Elsevier Publishing Company Inc. N.Y. 384 pp.
- Kelley, C.E. and Harmon, A.W. 1972. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. *Fish. Bull.* 70:111-114.
- Kitahara, T. 1983. Behavior of carotenoids in the chum salmon (*Oncorhynchus ketta*) during anadromous migration. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B:97-101.
- Klontz, G.W. 1991a. *Fish for the future: concepts and methods of intensive Aquaculture*. Text No. 5. Idaho Forest, Wildlife, and Range Experiment Station. University of Idaho, Moscow.
- Klontz, G.W. 1991b. *Producción de trucha arcoiris en granjas familiares*. Alimentos de Alta Calidad El Pedregal, S.A. de C.V. Toluca Edo. de México, 88 pp. Derechos Reservados.
- Kotik, L.V., Tolokonnikov, G. Yu., and Dubrovin, V.N. 1979. The effect of krill meal meal additions to feeds of muscle pigmentation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Ichthyol.*, 19(5):119-122.
- Kuo, H.C., Lee, T.C., Kamata, T. and Simpsom, K.L. 1976. Red crab processing waste as a carotenoid source for rainbow trout. *Alimenta* 15, 47.

- Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M. and Utsumi, K. 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 22:27-38.
- Lambertsen, G. and Braekkan, O.R. 1971. Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. *J. Sci. Food Agric.* 22:99.
- Latscha, T. 1990. *Carotenoids in animal nutrition*. Publication F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basle, Switzerland. Document No. 2175.
- Lee, R.G., Neamtu, G., Lee, T.C. and Simpson, K.L. 1978. Pigmentation of rainbow trout with extracts of floral parts from *Tagetes erecta* and *Cucurbita maxima marcia*. *Rev. Roum. Biochim.* 15(4):287.
- Liaaen-Jensen S. 1990. Marine carotenoids. Selected topics. *New J. Chem.* 14:747-759.
- March, B.E., Hajen, W.E., Deacon, G., MacMillan, C., Walsh, G. 1990. Intestinal absorption of astaxanthin concentration, body weight and metabolic rate as determinants of flesh pigmentation in salmonid fish. *Aquaculture* 90:313-322.
- Marusich, W.L., Bauernfeind, J.C. 1981. Oxycarotenoids in poultry feeds. In: *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. Bauernfeind, J.C. (Ed.). Academic Press, New York, pp. 319-462.
- McCallum, I.M., Cheng, K.M., March, B.E. 1987. Carotenoid pigmentation in two strains of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their crosses. *Aquaculture* 67:291-300.
- Meyers, S.P. and Rutledge, J.E. 1971. Economic utilization of crustacean meal. *Feedstuff* 43:16-39.
- Meyers, S.P. and Bligh, D. 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. *J. Agric. Food Chem.* 29:505-508.
- Meyers, S.P. and Chen, H.M. 1985. Process for the utilization of shellfish waste. United States Patent. Mar. 19, 1985. Pat. No. 4,505,936.
- Meyers, S.P., Chen, H.M., No, H.K. and Lee, K.S. 1990. An integrated approach to recovery and utilization of Louisiana crawfish processing wastes. *Proc. of the International By-Products Conference*, April 1990, Anchorage, Alaska.
- Meyers, S.P. and Sanderson, G.W. 1992. Natural pigments for salmon feeds. *Feed Management* 43(11):12-14+.
- Meyers, S. P. 1993. The biological / nutritional role of astaxanthin in salmonids and other aquatic species. Papers of the *The First International Symposium on Natural Colorants*. Nov. 7-10, Amherst, Mass.
- Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 63:141-46.
- Mikulín, A.Y. and Soin, S.G. 1975. The functional significance of carotenoids in the embryonic development of teleosts. *J. Ichthyol.* 15(5):749-759.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Otan, T., Miki, W. 1995. Analysis of an astaxanthin biosynthesis gene cluster. *J. Bacteriol.* 177:6575-6584.

- Nakamura, K., Hata, M., Hata, M. 1985. A study on astaxanthin in salmon *Oncorhynchus keta* serum. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 51(6):979-989.
- Nakano, T., Tosa, M. and Takeuchi, M. 1995. Improvement of biochemical features in fish health by red yeast and synthetic astaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* 43:1570-1573.
- Nickell, D.C. and Bromage, N.R. 1998. The effect of timing and duration of feeding astaxanthin on the development and variation of fillet colour and efficiency of pigmentation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 169:233-246.
- No, H.K. and Storebakken, T. 1991. Pigmentation of rainbow trout with astaxanthin at different water temperatures. *Aquaculture* 97:203-216.
- Olson, J.A. 1989. Biological actions of carotenoids. *J. Nutr.* 119:94-95.
- Omara-Alwala, T.R., Chen, H.M., Ito, Y., Simpson, K. and Meyers, S.P. 1985. Carotenoid pigment and fatty acid analyses of crawfish oil extracts. *J. Agric. Food Chem.* 33:260-263.
- Osterlie, M., Bjerkgeng, B. and Liaaen-Jensen, S. 1999. Accumulation of astaxanthin all-*E*,9*Z* and 13*Z* geometrical isomers and 3 and 3' *RS* optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective. *J. Nutr.* 129:391-398.
- Otazu-Abrill, M. 1978. Contribution à l'étude de l'action de la lumière et de la nourriture sur le métabolisme des pigments caroténoïdes chez *Palaemon serratus* et *Penaeus japonicus* en élevage contrôlé. These de Doctorat de Spécialité Océanologie. Université D'aix-Marseille, France.
- Peterson, D.H., Jäger, H.K., Savage, G.M., Washburn, G.N., Westers, H. 1966. Natural coloration of trout using xanthophylls. *Trans. Am. Fish. Soc.* 95:408-414.
- Pierce, R., Vander Veen, J. and Olcott, H.S. 1971. The lipids of krill (*Euphasia sp.*) and red crab (*Pleuroncode planipes*). *Agr. Food. Chem.* 17(2):367-369.
- Pike, I.H. 1998. Future supplies of fish meal and fish oil: quality requirements for *Aquaculture*. With particular reference to shrimps. *International Aquafeed Directory & Buyers' Guide* 1997/98.
- Putnam, M. 1991. A review of the nature, function, variability, and supply of pigments in salmonid fish. In: *Aquaculture and the Environment*. Pauw, N. and Joyce, J. (Eds.). European Acuaculture Society, Spec. Pub. No. 16, Belgium, pp 245-263.
- Renstrom, B. and Liaaen-Jensen, S. 1981. Fatty acid composition of some esterified carotenoids. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B:625-627.
- Renstrom, B., Borch, G., Skulberg, O.M. and Liaaen-Jensen, S. 1981. Optical Purity of (3*S*,3'*S*)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry* 20:2561.
- Roberts, R.J. 1989. *Fish Pathology*. Roberts, R.J. (Ed.). Baillière Tindall. London, England. 466 pp.
- Rodríguez-Amaya, D. 1997. Análisis de Carotenoides. En: *Producción y Manejo de Datos de Composición Química de Alimentos en Nutrición*. Morón, C., Zacarías, I. y De Pablo, S. (Eds.). Dirección de Alimentación y Nutrición, FAO, Santiago de Chile, p. 231.

- Rodríguez-Amaya, D. 1999. *A guide to carotenoid analysis in foods*. OMNI Research, ILSI Human Nutrition Institute, Washington, D.C. p 19.
- Saito, A. and Reiger, L.W. 1971. Pigmentation of brook trout by feeding dried crustacean wastes. *J. Fish Res. Can.* 28:509-512.
- Sceurman, L., Martinsen, C. and Little, A. 1978. The effect of dietary lipid and pigment concentration in the feed of *Salmo gairdneri* on sensory characteristics and objective measurements of the fish muscle tissue. In *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Vol. 2, Halver J.E. y Tiews K. (Eds.). Heenemann GmbH & Co., Berlin, pp 401.
- Scott, T.M., Rasco, B.A. and Hardy, R.W. 1994. Stability of krill meal, astaxanthin and canthaxanthin color in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during frozen, storage and cooking. *J. Aq. Food Prod. Tech.* 3(4):53-63.
- Schiedt, K., Leuenberger, F.J. and Vecchi, M. 1981. Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin. 5. *Ex wild salmon (Salmo salar and Oncorhynchus)*. *Helv. Chim. Acta* 64:449-457.
- Schiedt, K., Leuenberger, F. J., Vecchi, M. and Glinz, E. 1985. Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. *Pure Appl. Chem.* 57(5): 685-692.
- Schiedt, K., Vecchi, M. and Glinz, E. 1986. Astaxanthin and its metabolites in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 9-12.
- Schiedt, K., Bischof, S. and Glinz, E. 1993. Metabolism of carotenoids and in vivo racemization of (3S,3'S) astaxanthin in the crustacean *Penaeus*. *Methods in Enzymology* 214:148-168.
- Schiedt, K. and Liaaen-Jensen, S. 1995. Isolation and Analysis. In: *Carotenoids. Isolation and Analysis*. Britton G., Liaaen-Jensen S. and H. Pfander (Eds.), Vol.1A. Birkhäuser Verlag, Berlin, p 81.
- Schiedt, K., Bischof, S. and Liaaen-Jensen, S. 1995. Example 5: Fish. Isolation of astaxanthin and its metabolites from skin of Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: *Carotenoids. Isolation and Analysis*. Britton G., Liaaen-Jensen, S. and H. Pfander (Eds.), Vol. 1A. Birkhäuser Verlag, Berlin. p 248.
- Schroeder, W.A. and Johnson, E.A. 1995. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J. Industrial Microb.* 14:502-507.
- Segner, H., Arend, P., Poeppinghausen, K. Von, and Schmidt, H. 1989. The effect of feeding astaxanthin to *Oreochromis niloticus* and *Colisa labiosa* on the histology of the liver. *Aquaculture* 79:381-390.
- Seybold, A. and Goodwin, T.W. 1958. Occurrence of astaxanthin in the flower petal *Adonis annua* L. *Nature* 184, 1714-1715.
- Skonberg, D.I., Hardy, R.W., Barrows, F.T., Dong, F.M. 1998. Color and flavor analyses of fillets from farm-raised rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low-phosphorus feeds containing corn or wheat gluten. *Aquaculture* 166:269-277.

- Skoog, D. y West, D. 1975. *Análisis Instrumental*. Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, pp 637-639.
- Skrede, G. and Storebakken, T. 1986. Instrumental color analysis of farmed and wild Atlantic salmon when raw, baked and smoked. *Aquaculture* 53:279-286.
- Skrede, G., Storebakken, T. and Naes, T. 1990. Color evaluation in raw, baked and smoked flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed astaxanthin or canthaxanthin. *J. Food Sci.* 55(6):1574-1578.
- Spinelli, J., Lehman, L. and Wieg, D. 1974. Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. *J. Fish. Res. Board Can.* 31:1025-1029.
- Spinelli, J. and Mahnken, C. 1978. Carotenoid deposition in pen-reared salmonids fed diets containing oil extracts of red crab (*Pleuroncodes planipes*). *Aquaculture* 13:213-223.
- Spinelli, J. 1979. Preparation of salmonid diets containing zooplankton and their effect on organoleptic properties of pen-reared salmonids. In: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*. Vol. 2, Halver, J.E. and Thiews, K. (Eds.). H. Heenemann GmbH & Co., Berlin 42, 383.
- Steven, D.M. 1948. Studies on animal carotenoids. I. Carotenoids of the brown trout *Salmo trutta* L. *J. Exp. Biol.* 25:369-387.
- Storebakken, T., Foss, P., Austreng, E. and Liaaen-Jensen, L. 1985. Carotenoids in diets for salmonids. II. Epimerization studies with astaxanthin in Atlantic salmon. *Aquaculture* 44:259-269.
- Storebakken, T. and Choubert, G. 1991. Flesh pigmentation of rainbow trout fed astaxanthin and canthaxanthin at different feeding rates in freshwater and saltwater. *Aquaculture* 95:289-296.
- Storebakken, T. and No, H.K. 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture* 100:209-229.
- Tacon, A.G.J. 1981. Speculative review of possible carotenoid function in fish. *Prog. Fish Cult.* 43(4):205-208.
- Takeuchi, K. 1960. The behaviour of carotenoid and distribution of xanthophores during development of medaka (*Orzyas latipes*). *Embriology* 5:170-177.
- Tanaka, Y., Matsuguchi, H., Katayama, T., Simpson, K.L. and Chichester, C.O. 1976. The biosynthesis of astaxanthin. The metabolism of the carotenoids in the prawn (*Penaeus japonicus* Bate). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 42:197-202.
- Terao, J. 1989. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids* 24:659-661.
- Torrissen, O.J. and Braekkan, O.R. 1979. The utilization of astaxanthin forms by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In *Finfish, Nutrition and Fishfeed Technology*. Vol. 2. Halver J.E. and Thiews K. (Eds.), Heenemann GmbH & Co., Berlin 42, 377.

- Torrissen, O.J., Tidemann, E., Hansen, F. and Raa, J. 1981. Ensiling in acid - a method to stabilize astaxanthin in shrimp processing byproducts and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 26: 77.
- Torrissen, O.J. 1984. Pigmentation of salmonids: effect of carotenoids in eggs and start feeding diet on survival and growth rate. *Aquaculture* 43:185-193.
- Torrissen, O.J. and Naevdal, G. 1984. Pigmentation of salmonids - genetical variation in carotenoid deposition in rainbow trout. *Aquaculture* 38:59-66.
- Torrissen, O.J. 1985. Pigmentation of salmonids: factors affecting carotenoid deposition in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 46:133-142.
- Torrissen, K.R. and Torrissen, O.J. 1985. Protease activities and carotenoid levels during the sexual maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 50:113-122.
- Torrissen, O.J. 1989. Pigmentation of salmonids: interactions of astaxanthin and canthaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. *Aquaculture* 79: 363-374.
- Torrissen, O.J., Hardy, R.W. and Shearer, K.D. 1989. Pigmentation of salmonids - Carotenoid deposition and metabolism. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1(2): 209-225.
- Torrissen, O.J., Christiansen, R., Struksnaes, G. and Estermann, R. 1995. Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period. *Aquaculture Nutrition* 1:77-84.
- Velásquez, E.M. y Espinoza, M.R. 1989. Diagnóstico del estado actual del cultivo de la trucha arcoiris en México. SEMARNAP.
- Vernon, J., Ponce, J. y Pedroza, R. 1994. Bioensayo de pigmentación de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con extractos de chile ancho (*Capsicum annuum*). *Arch. Lat. de Nutr.* 44(4):252-255.
- Villalobos, G.J. 1983. Sinopsis sobre la biología y cultivo de la trucha arcoiris *Salmo gardneri* (Richardson, 1836). Tesis para optar el título de Biólogo. Fac. Ciencias, UNAM.
- Whyte, J. N. 1993. Use of *Phaffia* yeast in the pigmentation of farmed chinook salmon. Papers of the First International Symposium on Natural Colorants. Nov. 7-10, Amherst, Mass.
- Wilkie, D.W. 1972. The carotenoid pigmentation of *Pleuroncodes planipes* Stimpson (Crustacea: Decapoda: Galatheidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 42B: 731-734.
- Zagalsky 1995. Carotenoproteins. In: *Carotenoids. Isolation and Analysis*. Britton G., Liaaen-Jensen, S. and H. Pfander (Eds.), Vol. 1A. Birkhäuser Verlag, Berlin. p 243.
- Zechmeister, L. 1944. *Cis-trans* isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. *Chem. Rev.* 34:267-344.

ANEXOS

ANEXO I

Fotografías 1 y 2. Arribazón de langostilla, *Pleuroncodes planipes*, en las playas de Bahía Magdalena, B.C.S.
(Fotografía tomada en Mayo de 1994, por el personal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, BCS).

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

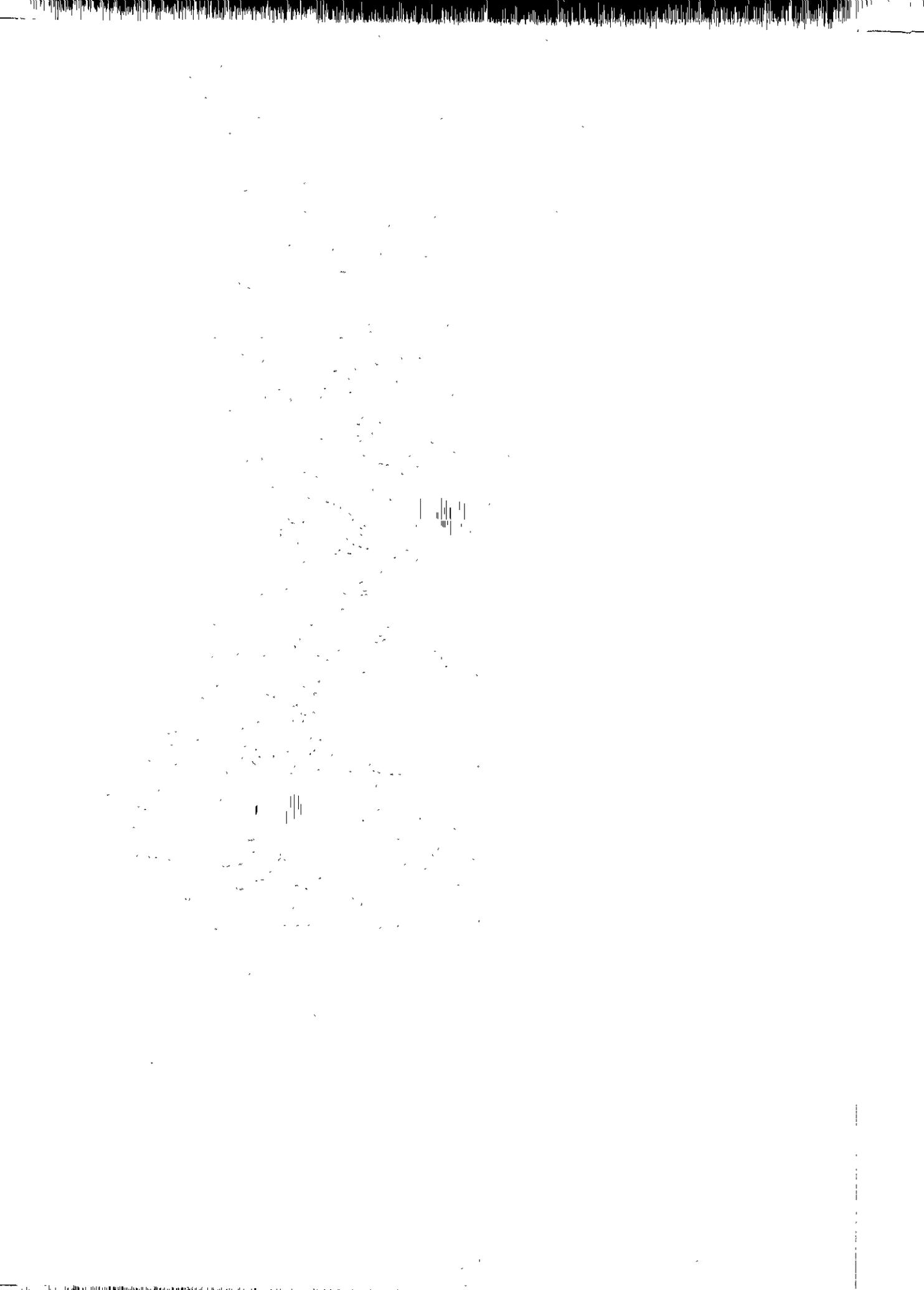
98

99

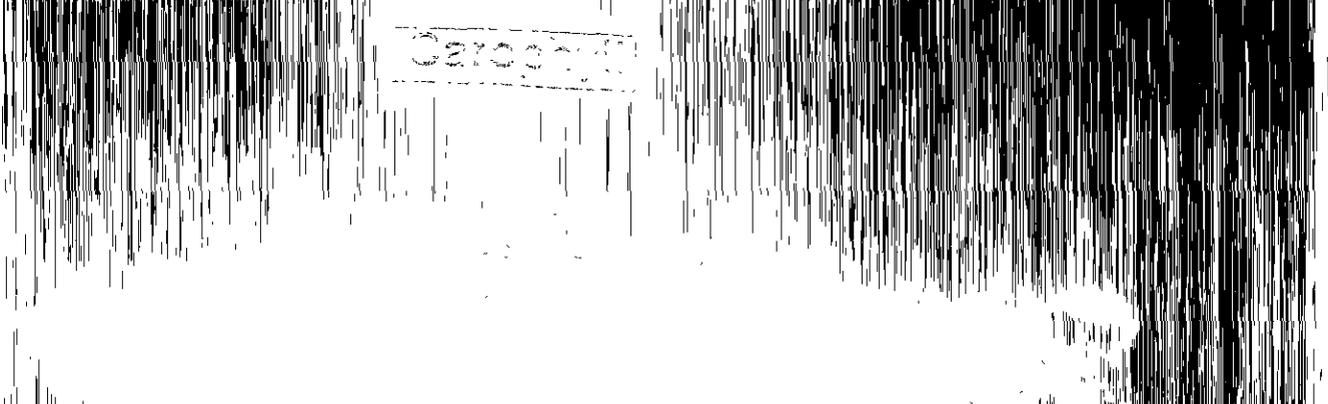
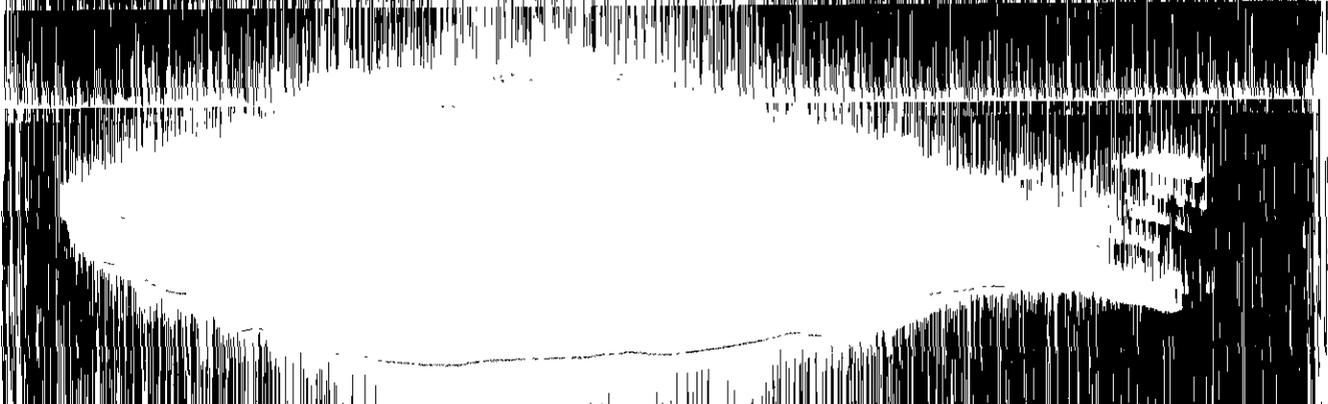
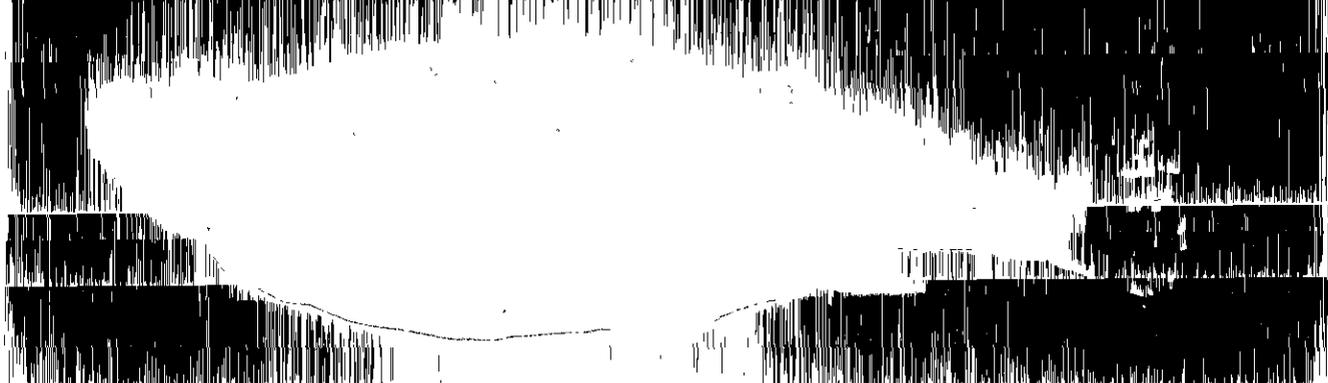
100

Fotografía 3. Ejemplares de langostilla, *Peurancodes planipes*, (Decápoda, Anomura, Galatheidae), cuya característica más sobresaliente es la coloración roja del exoesqueleto y la flexión de los segmentos abdominales hacia la parte inferior del cefalotórax.

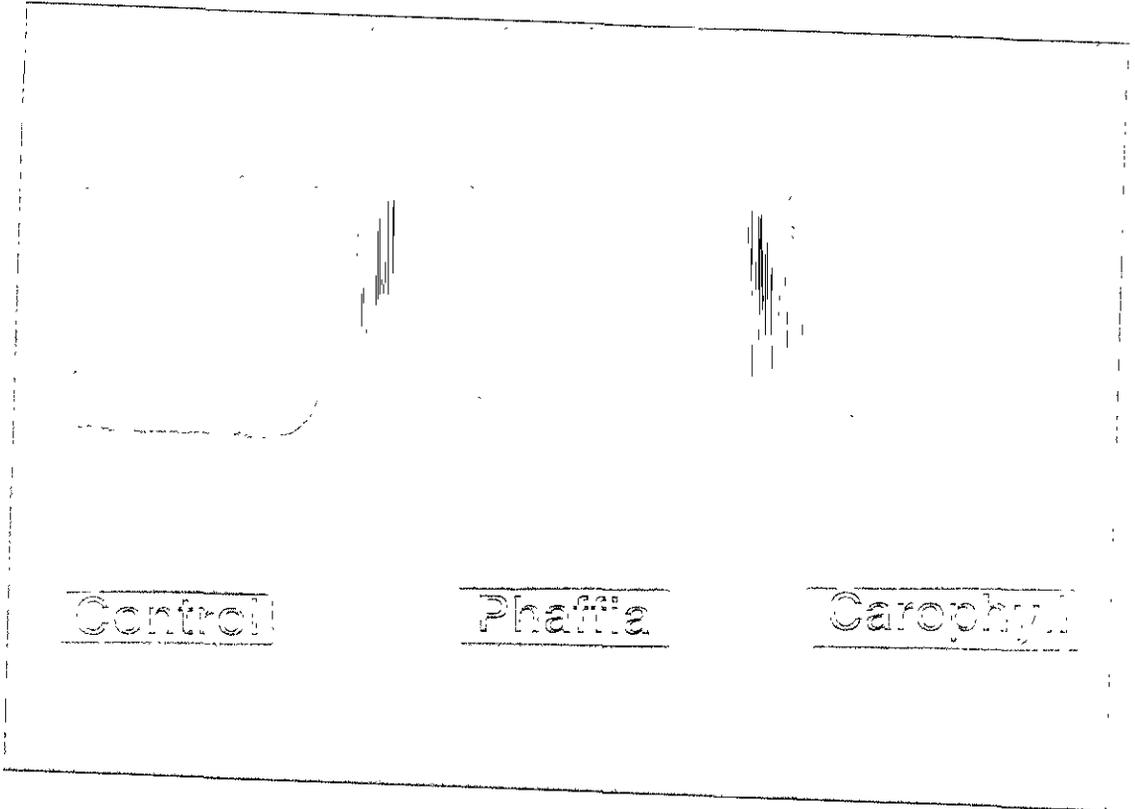
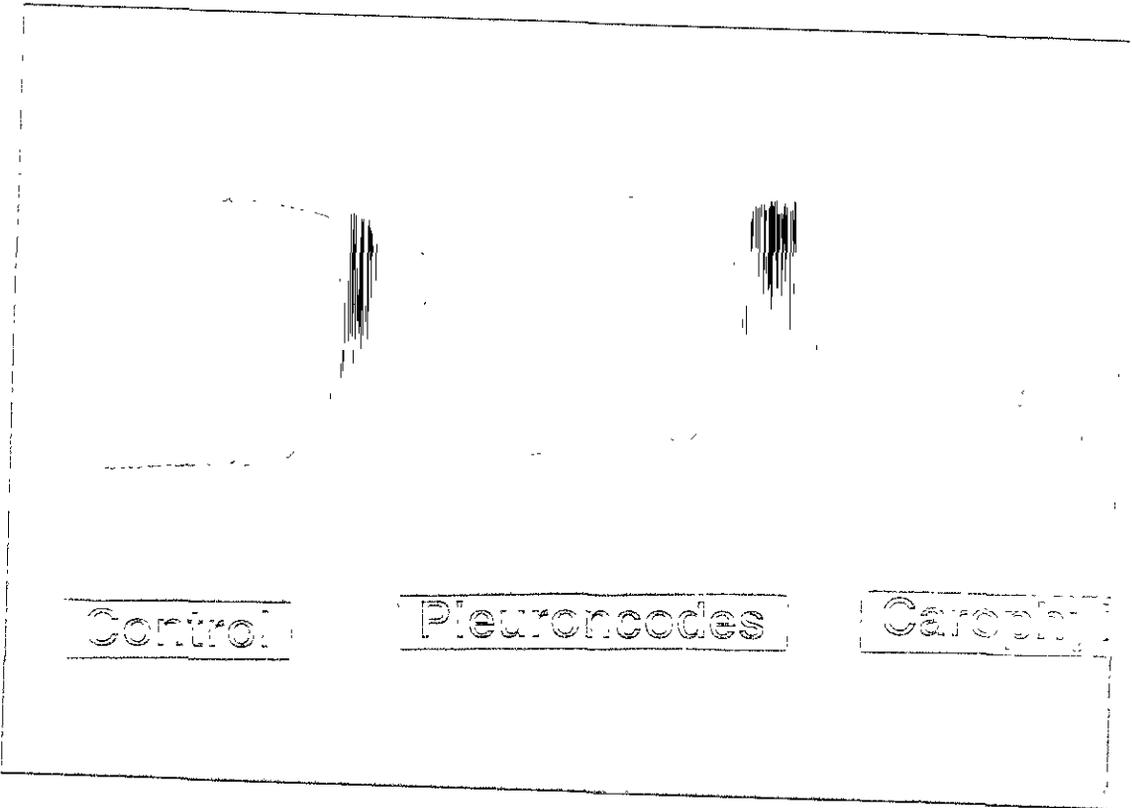
(Fotografía tomada por el personal del Centro de Investigaciones Biológicas del Norceste, BCS).



Fotografía 4. Ejemplares descongelados de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, mostrando la pigmentación externa del cuerpo después de seis semanas de alimentación con dieta suplementada con astaxantina de langostilla, *Pleuoncodes planipes*, astaxantina de levadura *Phaffia rhodozyma*, y astaxantina sintética, en comparación con el ejemplar del grupo testigo (control). Experimento de laboratorio.



Fotografías 5 y 6. Pigmentación del músculo de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, después de seis semanas de alimentación con dieta suplementada con astaxantina de langostilla, *Pleuoncodes planipes*, astaxantina de levadura, *Phaffia rhodozyma*, y astaxantina sintética, en comparación con el músculo de los peces del grupo testigo (control). Experimento de laboratorio.



ANEXO II

Métodos descritos en el AOAC (1990), para el análisis químico proximal de las dietas para animales

- 4.1.03. Método para la determinación de Humedad.
- 4.1.10. Método para la determinación de Cenizas
- 4.2.05. Método para la determinación de Proteína
- 4.5.01. Método para la determinación de Extracto Etéreo
- 4.6.01. Método para la determinación de Fibra Cruda

4. Animal Feed

William R. Hindham, Chapter Editor
United States Department of Agriculture

Subchapter 1 ANIMAL FEED—GENERAL

4.1.01

AOAC Official Method 965.16 Sampling of Animal Feed Procedure

Use slotted single or double tube, or slotted tube and rod, all with pointed ends.

Take ≥ 500 g sample, 1 kg preferred, as follows: Lay bag horizontally and remove core diagonally from end to end. Determine number of cores as follows: From lots of 1–10 bags, sample all bags; from lot of ≥ 11 , sample 10 bags. Take 1 core from each bag sampled, except that for lots of 1–4 bags take enough diagonal cores from each bag to total ≥ 5 cores. For bulk feeds draw ≥ 10 cores from different regions, in sampling small containers (≤ 10 lb) 1 package is enough. Reduce composite sample to amount required, preferably by riffling, or by mixing thoroughly on clean oil-cloth or paper and quartering. Place sample in air-tight container.

A sample from less than these numbers of bags may be declared an official sample if guarantor agrees. For samples that cannot be representatively taken with probe described, use other sampling means

4.1.02

AOAC Official Method 950.02 Animal Feed Preparation of Sample Final Action

Grind sample to pass sieve with circular openings 1 mm ($1/25^{\circ}$) diameter and mix thoroughly. If sample cannot be ground, reduce to as fine condition as possible. Do not grind molasses feeds.

References: JAOAC 33, 424(1950); 41, 223(1958); 45, 658(1965); 51, 567(1968).

4.1.03

AOAC Official Method 934.01 Moisture in Animal Feed Drying in Vacuum at 95–100° Final Action

Dry amount sample containing ca 2 g dry material to constant weight at 95–100° under pressure ≤ 100 mm Hg (ca 5 h). For feeds with high molasses content, use temperature $\leq 70^{\circ}$ and pressure ≤ 50

mm Hg. Use covered Al dish ≥ 50 mm diameter and ≤ 40 mm deep. Report loss in weight as moisture.

References: JAOAC 17, 68(1934); 51, 467(1968); 60, 322(1977).

4.1.04

AOAC Official Method 925.04 Moisture in Animal Feed By Distillation with Toluene Final Action

A. Apparatus

Connect 250 mL flask of Pyrex or other resistant glass by means of Bidwell-Sterling moisture receiver to 500 mm Liebig condenser. Calibrate receiver, 5 mL capacity, by distilling known amounts H_2O into graduated column, and estimating column of H_2O to 0.01 mL. Clean tube and condenser with chromic acid cleaning mixture, rinse thoroughly with H_2O , then alcohol, and dry in oven to prevent undue amount H_2O from adhering to inner surfaces during determination.

B. Determination

If sample is likely to bump, add dry sand to cover bottom of flask. Add enough toluene to cover sample completely (ca 75 mL). Weigh and introduce enough sample into toluene to give 2–5 mL H_2O and connect apparatus. Fill receiving tube with toluene, pouring it through top of condenser. Bring to boil and distil slowly, ca 2 drops/s, until most of the H_2O passes over; then increase rate of distillation to ca 4 drops/s.

When all H_2O is apparently over, wash down condenser by pouring toluene in at top, continuing distillation short time to see whether any more H_2O distils over; if it does, repeat washing-down process. If any H_2O remains in condenser, remove by brushing down with tube brush attached to Cu wire and saturated with toluene, washing down condenser at same time. (Entire process is usually completed within 1 h.) Let receiving tube come to room temperature. If any drops adhere to sides of tube, force them down, using Cu wire with end wrapped with rubber band. Read volume H_2O and calculate to %.

References: JAOAC 8, 295(1925); 9, 30(1926).

4.1.05

AOAC Official Method 923.35† Moisture in Animal Feed Drying without Heat over Sulfuric Acid Final Action Surplus 1374

See 7.005–7.007, 12th ed.

the SED between reference moisture data and NIRS predicted data. Reanalyze these samples by both methods. If some samples are reanalyzed, delete these samples from the original file and enter new values via computer. If SEP is similar to SEC, final NIRS equation can be accepted for use.

Reference: JAOAC 74, 324(1991).

4.1.08

AOAC Official Method 955.07
Moisture in Animal Feed in
Highly Acid Milk By-products
Final Action

Add ca 2 g ZnO, freshly ignited or oven dried, to flat-bottom dish ≥ 5 cm diameter and weigh. Add ca 1 g sample and weigh quickly. Add ca 5 mL H_2O and distribute sample evenly on bottom of dish. Heat on steam bath, exposing maximum surface of dish bottom to live steam until apparently dry. Heat at 98–100° in air oven 3 h or to constant weight. Cool in desiccator; then weigh quickly. Determine weight residue. Dilute with twice its volume CO_2 -free H_2O . Add 2 mL phenolphthalein and titrate with 0.1N NaOH to first persistent pink. Calculate as % lactic acid by weight (1 mL 0.1N NaOH = 0.0090 g lactic acid). To compensate for H_2O formed when acid is neutralized by ZnO, add 0.1 g to residue weight for each g acid (as lactic) in weighed sample. Report % residue (corrected) as total solids.

References: JAOAC 36, 213(1953); 37, 253(1954).

4.1.09

AOAC Official Method 991.02
Moisture in Soft-Moist Pet Foods
Karl Fischer Method
First Action (See 1)

(Applicable to samples containing 20–30% moisture and other volatile materials)

Method Performance:

$$s_r = 0.3, s_R = 0.4; RSD_r = 1.1\%; RSD_R = 1.7\%$$

A. Principle

Water is extracted with methanol from pet food that contains other volatile components, and aliquots titrated with Karl Fischer reagent.

B. Apparatus and Reagents

(a) *Karl Fischer titration assembly*.—Manual or automatic, with stirrer.

(b) *Karl Fischer reagent*.—Stabilized, single solution (Fisher Scientific Co., SK3, or equivalent). (*Caution*: If solution contains pyridine, see Appendix B, safety note on pyridine.) To standardize reagent, add 100 mg H_2O from weighing pipet, or other suitable device, to 30–50 mL pretitrated CH_3OH , and titrate with Karl Fischer reagent. $C = \text{mg } H_2O/\text{mL reagent}$.

(c) *Ethanol*.—ACS reagent grade. $\geq 99.8\% CH_3OH$. $\leq 0.1\% H_2O$. $\leq 0.001\%$ acetone.

C. Sample Preparation

Reduce sample to as fine condition as possible. Household-style blender may be used; shake blender back and forth to move sample into blades.

D. Determination

Accurately weigh 8–10 g prepared sample into Erlenmeyer that contains magnetic stirring bar. Add 200 mL CH_3OH , and stopper flask. Stir magnetically 15 min. Let solids settle. Transfer 10 mL aliquot to titration vessel containing pretitrated methanol and titrate with Karl Fischer reagent. Determine blank on 10 mL CH_3OH as above and subtract from sample determination.

$$\text{Water, \%} = [2 \times (\text{mL reagent} \times C)]/\text{g sample}$$

Reference: JAOAC 73, 399(1990).

4.1.10

AOAC Official Method 942.05
Ash of Animal Feed
Final Action

Weigh 2 g sample into porcelain crucible and place in temperature controlled furnace preheated to 600°. Hold at this temperature 2 h. Transfer crucible directly to desiccator, cool, and weigh immediately, reporting % ash to first decimal place.

References: JAOAC 25, 857(1942); 26, 220(1943).

Subchapter 2
PROTEIN

4.2.01

AOAC Official Method 985.11★
Protein in Animal Feed
Qualitative Tests
Final Action
Surplus 1265

A. Biuret Test

See 22.012–22.013, 10th ed.

B. Millon Test

See 22.014–22.015, 10th ed.

C. Glyoxylic Acid Test (Hopkins-Cole)

See 22.016–22.017, 10th ed.

D. Adamkiewicz Test

See 22.018, 10th ed.

E. Ninhydrin Test

See 22.019, 10th ed.

(Note: Empirical approximation of $(P_0 + P_1) = 11.0$ will be satisfactorily accurate for P_0 between 740 and 780 mm Hg and syringe temperature between 298 and 305°K.)

(c) Calculate % N = $(P_c \times V_c \times 0.0449)/(T \times W)$, where T = final syringe temperature in °K and W = sample weight in mg.

Example:

$$P_0 = 750.1 \text{ mm Hg at } 25^\circ\text{C}, W = 148.91 \text{ mg}$$

	Start	Finish
Counter readings, blank	500 μL	524 μL
Counter readings, sample	524	6955

$$t_1 = 302.7^\circ\text{K}, t_2 = 303.0^\circ\text{K}, V_0 = 6955 - 524 = 6431 \mu\text{L}$$

$$V_c = 6431 - [24 + C_A(t_2 - t_1)] = 6431 - (24 + 35 \times 0.3) = 6396 \mu\text{L}$$

$$P_c = 750.1 - (3.1 \times 9.6) = 737.4$$

$$\% \text{ N} = (737.4 \times 6396 \times 0.04493)/(303.0 \times 148.91) = 4.69\%$$

(e) Calculate % protein = % N \times 6.25, or % N \times 5.70 in case of wheat grains.

Reference: JAOAC 51, 766(1968).

4.2.05

AOAC Official Method 978.05 Protein (Crude) in Animal Feed

Automated Kjeldahl Method

First Action 1976

Final Action 1977

A. Principle

Automation of macro Kjeldahl method is in 6 steps: sample and reagent addition, initial and final digestion, cooling and dilution, NaOH addition, steam distillation and titration, and automatic pumping of flask contents to waste. Chemistry is carried out in macro Kjeldahl flasks equipped with side arms which are rotated at 3 min intervals through each successive step.

B. Apparatus

(a) *Kjeldahl (protein/nitrogen) analyzer*.—Kjel-Foss Automatic Model 16210 (Foss Food Technology Corp.), or equivalent.

(b) *Weighing papers*.—120 \times 120 mm N-free tissues, Foss Food Technology Corp., or equivalent.

C. Reagents

(a) *Kjel-tabs*.—Containing 5 g K_2SO_4 and 0.25 g HgO (Foss Food Technology Corp.).

(b) *Kjeldahl (protein/nitrogen) analyzer reagents*.—Prepare following according to manufacturer's instructions: (1) *Sulfuric acid*.—96–98%. (2) *Hydrogen peroxide*.—30–35%. (3) *Ammonium sulfate standard solutions*.—(a) *Standard solution I*.—Dissolve 30.000 ± 0.030 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in H_2O and dilute to 1 L with H_2O . (b) *Standard solution II*.—Dissolve 0.750 ± 0.001 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in H_2O

and dilute to 1 L with H_2O . (4) *Mixed indicator solution*.—Dissolve 1.000 g methyl red and 0.250 g methylene blue in alcohol and dilute to 1 L with alcohol. Dilute 10 mL this solution to 1 L with H_2O . (5) *Sodium hydroxide-sodium thiosulfate solution*.—40% NaOH-8% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. (6) *Dilute sulfuric acid solution*.—0.6%. Dilute 30 mL 96–98% H_2SO_4 to 5 L with H_2O .

D. Determination

(Caution: See Appendix B, safety notes on wet oxidation, sulfuric acid, mercury, and peroxides.)

Place 3 Kjel-tabs in special flask (500 mL of design compatible to Foss instrument) in position 1. Shift dispenser arm over flask and depress H_2SO_4 lever, initiating simultaneous addition of 10 mL 30–35% H_2O_2 and 12–15 mL 96–98% H_2SO_4 (depending on fat content of sample). To flask, add accurately weighed sample (ca 1.0 g if <45% protein, and ca 0.5 g if >45% protein) wrapped in weighing paper and closed. Flask automatically rotates to position 2 where sample digests 3 min, and then to position 3 for 5 min additional digestion. In position 4, flask is cooled by centrifugal blower, lid opens automatically, and 140 mL H_2O is added automatically. Flask rotates to position 5, where NaOH- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution is automatically introduced in excess. Released NH_3 is steam distilled quantitatively into 200 mL tall-form titration beaker containing 50 mL mixed indicator solution, and is simultaneously titrated automatically with dilute H_2SO_4 solution delivered by photometrically regulated syringe. Final position of syringe is measured by potentiometer, output of which feeds electronic circuitry for conversion to visual display and/or printout in % N or % protein with appropriate conversion factors. In position 6, flask is emptied. Calibrate instrument initially each day with aliquots of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ standard solutions and check periodically as stated in operating manual.

Reference: JAOAC 59, 141(1976).

4.2.06

AOAC Official Method 978.06 Protein (Crude) in Animal Feed

Semiautomated Method

First Action 1976

Final Action 1977

A. Principle

Samples are digested in 250 mL calibrated tubes, using block digester. A of NH_3 -salicylate complex is read in flowcell at 650 nm, or NH_3 is distilled into standard acid and back-titrated with standard alkali.

B. Apparatus

(a) *Block digester*.—Model BD-20 (Technicon Instruments Corp., instrument now available from Bran and Luebbe, Inc., 1025 Bush Parkway, Buffalo Grove, IL 60089) or Model DS-20 (Tecator, Inc., instrument now available from Perstorp Analytical Inc., Silver Spring, MD 20904). Capable of maintaining 410° and digesting 20 samples at a time in 250 mL calibrated volumetric tubes constricted at top. Block must be equipped with removable shields to enclose exposed area of tubes completely at or above height of constriction.

(b) *Automatic analyzer*.—AutoAnalyzer with following modules (Technicon Instruments Corp., instrument now available from Bran and Luebbe, Inc., 1025 Bush Parkway, Buffalo Grove, IL 60089),

Subchapter E FAT

4.5.01

AOAC Official Method 920.39 Fat (Crude) or Ether Extract in Animal Feed Final Action

Use method 920.39A or 920.39C for mixed feeds other than (1) baked and/or expanded, (2) dried milk products, or (3) containing urea.

A. Indirect Method

Determine moisture as in 934.01 (see 4.1.03) or 920.36* (see 4.1.05); then extract dried substance as in 920.39C, and dry again. Report loss in weight as ether extract.

Direct Method

B. Reagent

Anhydrous ether.—Wash commercial ether with 2 or 3 portions H_2O , add solid NaOH or KOH, and let stand until most of H_2O is abstracted from the ether. Decant into dry bottle, add small pieces of carefully cleaned metallic Na, and let stand until H_2 evolution ceases. Keep ether, thus dehydrated, over metallic Na in loosely stoppered bottles. (Caution: See Appendix B, safety notes on sodium metal and diethyl ether.)

C. Determination

(Large amounts H_2O -soluble components such as carbohydrates, urea, lactic acid, glycerol, and others may interfere with extraction of fat; if present, extract 2 g sample on small paper in funnel with five 20 mL portions H_2O prior to drying for ether extraction. Caution. See Appendix B, safety notes on monitoring equipment, distillation, and diethyl ether.)

Extract ca 2 g sample, dried as in 934.01 (see 4.1.03) or 920.36* (see 4.1.05), with anhydrous ether. Use thimble with porosity permitting rapid passage of ether. Extraction period may vary from 4 h at condensation rate of 5–6 drops/s to 16 h at 2–3 drops/s. Dry extract 30 min at 100°, cool, and weigh.

References: JAOAC 64, 351(1981); 65, 289(1982).

4.5.02

AOAC Official Method 954.02 Fat (Crude) or Ether Extract in Pet Food Gravimetric Method Final Action 1977

[To be used only on products which have been baked and/or expanded, and on intermediate moisture pet foods. Not applicable to canned, fresh, or frozen pet food. Such products should be dried at 70–110°, then ground, and drying completed by 934.01 (see 4.1.03) or 920.36* (see 4.1.05) followed by 920.39A or 920.39C (see 4.5.01).]

(Caution: See Appendix B, safety notes on distillation, diethyl ether, and petroleum ether.)

Place ca 2 g, accurately weighed, ground, well-mixed sample in Mojonnier fat-extraction tube, add 2 mL alcohol to prevent lumping on addition of acid, and shake to moisten all particles. Add 10 mL HCl (25 + 11), mix well, and set tube 30–40 min in H_2O bath at 70–80°, shaking frequently. Cool to room temperature and add alcohol until liquid level rises into constricted portion of Mojonnier tube.

Add 25 mL ether, stopper with glass, Neoprene, or good quality rubber stopper thoroughly cleaned with alcohol, and shake vigorously 1 min. Carefully release pressure so that no solvent is lost. Wash adhering solvent and fat from stopper back into extraction tube with few mL redistilled petroleum ether (bp <60°). Add 25 mL redistilled petroleum ether, stopper, and shake vigorously 1 min. Let stand until upper liquid is practically clear or centrifuge 20 min at ca 600 rpm. Pour as much of ether-fat solution as possible through filter consisting of cotton pledget packed just firmly enough in funnel stem to let ether pass freely into 150 mL beaker containing several glass beads. Rinse lip of tube with few mL petroleum ether. Reextract liquid remaining in tube twice, each time with only 15 mL of each ether, shaking 1 min after addition of each ether. Pour clear ether solution through filter into same beaker as before, and wash tip of tube, stopper, funnel, and end of funnel stem with few mL of mixture of 2 ethers (1 + 1). Evaporate slowly on steam bath under gentle stream of air or N_2 . Continue heating on steam bath 15 min after solvent has evaporated; then cool to room temperature.

Redissolve dried fat residue in four 10 mL portions ethyl ether, filtering each portion through small pledget of cotton into 100 mL beaker, containing few glass beads, that has been predried 30 min at 100°, cooled to room temperature in desiccator, and weighed immediately. Use fifth 10 mL portion ether for rinsing cotton and funnel. Evaporate ether on steam bath, dry 90 min at 100°, cool to room temperature in desiccator, and weigh immediately. Correct this weight by blank determination on reagents used.

References: JAOAC 37, 250(1954); 38, 225(1955); 59, 1218(1976); 60, 322(1977); 65, 456(1982).

4.5.03

AOAC Official Method 932.02 Fat (Crude) or Ether Extract in Dried Milk Products Final Action

Proceed as in 932.03A(C) and 932.03B (see 33.5.08), using 8.5 mL H_2O and 1.5 mL NH_4OH .

References: JAOAC 15, 524(1932); 17, 190(1934); 18, 351(1935); 28, 80(1945).

4.5.04

AOAC Official Method 948.04 Fat (Crude) or Acetone in Feed

See 948.04

Subchapter 3
FIBER

4.3.01

AOAC Official Method 952.09
Fiber (Crude) in Animal Feed

Ceramic Fiber Filter Method

First Action 1932

Final Action 1971

Revised First Action 1982

AOCS-AOAC Method

A. Principle

Crude fiber is loss on ignition of dried residue remaining after digestion of sample with 1.25% H_2SO_4 and 1.25% $NaOH$ solutions under specific conditions. Method is applicable to grains, meals, flours, feeds, and fiber-bearing material from which fat can be extracted to leave workable residue.

B. Reagents

(a) *Sulfuric acid solution.*— $0.255 \pm 0.005N$. 1.25 g $H_2SO_4/100$ mL. Concentration must be checked by titration.

(b) *Sodium hydroxide solution.*— $0.313 \pm 0.005N$. 1.25 g $NaOH/100$ mL, free, or nearly so, from Na_2CO_3 . Concentration must be checked by titration.

(c) *Prepared ceramic fiber.*—Place 60 g ceramic fiber (Cerafiber, 8 lb/cu ft, E.J. Bartell Co., 700 Powell Ave, S.W., Renton, WA 98055) in blender, add 800 mL H_2O , and blend 1 min at low speed.

Determine blank by treating ca 2 g (dry weight) of prepared ceramic fiber with acid and alkali as in determination. Correct crude fiber results for any blank, which should be negligible (ca 2 mg).

(d) *Alcohol.*—95% or reagent alcohol, methanol, or isopropanol.

(e) *Antifoam.*—Dow Corning Corp. Antifoam A compound diluted 1 + 4 with mineral spirits or petroleum ether, or H_2O -diluted Antifoam B Emulsion (1 + 4). Do not use Antifoam Spray.

(f) *Bumping chips or granules.*—Broken Alundum crucibles or equivalent granules (RR Alundum 90 mesh, Norton Co., 1 New Bond St, Worcester, MA 01605) are satisfactory.

C. Apparatus

(a) *Digestion apparatus.*—With condenser to fit 600 mL beaker and hot plate adjustable to temperature that will bring 200 mL H_2O at 25° to rolling boil in 15 ± 2 min. (Available from Labconco Corp., 8811 Prospect Ave, Kansas City, MO 64132.)

(b) *Ashing dishes.*—Silica, Vitreosil 70 \times 16 mm; or porcelain, Coors Ceramics Co., 600 9th St, Golden, CO 80401, No. 60230, or equivalent.

(c) *Desiccator.*—With efficient desiccant such as 4–8 mesh Drierite ($CaCl_2$ is not satisfactory).

(d) *Filtering device.*—With No. 200 type 304 or 316 stainless steel screen (W.S. Tyler Inc., 8570 Tyler Blvd., Mentor, OH 44060), easily washed free of digested residue. Either Oklahoma State filter screen (see Figure 952.09A; available from Labconco Corp.) or modified California plastic Büchner (see Figures 952.09B; consists of 2 piece polypropylene plastic funnel manufactured by Nalge Co., 75 Panorama Creek Dr, PO Box 20365, Rochester, NY 14602, Cat. No. 4280-0700, 70 mm [without No. 200 screen], or equivalent [also available from Labconco Corp.]. Seal screen to filtering surface of funnel, using small-tip soldering iron).

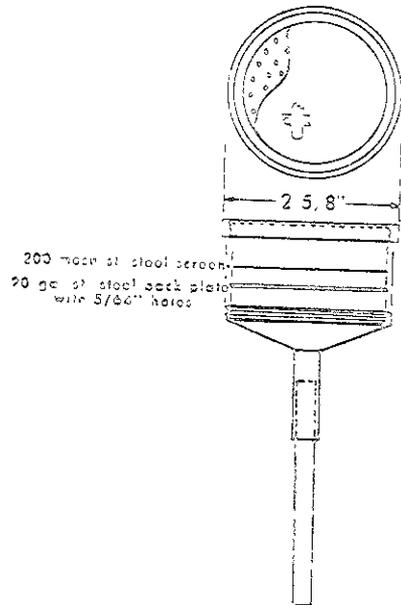


Figure 952.09A—Oklahoma State filter screen

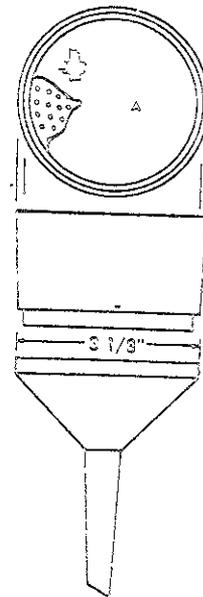


Figure 952.09B—Modified California State Büchner funnel, 2-piece polypropylene plastic, covered with 200-mesh screen, A, heat-sealed to edge of filtering surface

(e) *Suction filter.*—To accommodate filtering devices. Attach suction flask to trap in line with aspirator or other source of vacuum, with valve to break vacuum.

(f) *Liquid preheater.*—For preheating H_2O , 1.25% H_2SO_4 , and 1.25% $NaOH$ solutions to bp of H_2O . Convenient system, shown in Figure 952.09C, consists of sheet Cu tank with 3 coils of $3/8$ " (10 mm) od Cu tubing, 12.5' (3.8 m) long. Solder inlets and outlets where

tubing passes through tank walls. Connect to reflux condenser and fill with H₂O. Keep H₂O boiling with two 750 watt thermostatically controlled hot plates. Use Tygon for inlet leads to reservoirs of H₂O, acid, and alkali; use gum rubber tubing for outlets. Capacity of preheater is adequate for 60 analyses in 8 h.

D. Preparation of Sample

Reduce sample (riffle is suitable) to 100 g and place portion in sealed container for H₂O determination. Immediately determine H₂O. Grind remainder to uniform fineness. (Weber mill [Sargent-Welch Scientific Co. S-60870] with screen 0.032–0.040" [No. 18 or 20], Micro mill [Hosokawa Micron Powder Systems, Inc., 10 Chatnam Rd, Summit, NJ 07901] with screen 1/25–1/16" [No. 18–No. 12], and Wiley mill with 1 mm [No. 18] screen give comparable fineness.) Since most materials lose moisture during grinding, determine H₂O on ground sample at same time sample is taken for crude fiber determination.

E. Determination

Extract 2 g ground material with ether or petroleum ether (initial boiling temperature, 35–38°; dry-flask end point, 52–60°; ≥95% distilling <54°, and ≤60% distilling <40°; specific gravity at 60°F, 0.630–0.660; evaporation residue ≤0.002% by weight). If fat is <1%, extraction may be omitted. Transfer to 600 mL beaker, avoiding fiber contamination from paper or brush. Add ca 1.5–2.0 g dry weight of prepared ceramic fiber, 200 mL boiling 1.25% H₂SO₄, and 1 drop diluted antifoam. (Excess antifoam may give high results; use only if necessary to control foaming.) Bumping chips or granules may also be added. Place beaker on digestion apparatus with preadjusted hot plate and boil exactly 30 min, rotating beaker periodically to keep solids from adhering to sides. Remove beaker, and filter as in (a) or (b).

(a) *Using Oklahoma filter screen.*—Turn on suction and insert screen (precoated with ceramic fiber if extremely fine materials are analyzed) into beaker, keeping face of screen just under surface of liquid until all liquid is removed. Without breaking suction or raising filter, add 50–75 mL boiling H₂O. After wash is removed, repeat with three 50 mL washings. (Work rapidly to keep mat from becoming

dry.) Remove filter from beaker and drain all H₂O from line by raising above trap level. Return mat and residue to beaker by breaking suction and blowing back. Add 200 mL boiling 1.25% NaOH and boil exactly 30 min. Remove beaker, and filter as above. Without breaking suction, wash with 25 mL boiling 1.25% H₂SO₄ and three 50 mL portions boiling H₂O. Drain free of excess H₂O by raising filter. Lower filter into beaker and wash with 25 mL alcohol. Drain line, break suction, and remove mat by blowing back through filter screen into ashing dish. Proceed as in (c).

(b) *Using California Büchner.*—Filter contents of beaker through Büchner (precoated with ceramic fiber if extremely fine materials are being analyzed), rinse beaker with 50–75 mL boiling H₂O, and wash through Büchner. Repeat with three 50 mL portions H₂O, and suck dry. Remove mat and residue by snapping bottom of Büchner against top while covering stem with thumb or forefinger and replace in beaker. Add 200 mL boiling 1.25% NaOH and boil exactly 30 min. Remove beaker, and filter as above. Wash with 25 mL boiling 1.25% H₂SO₄, three 50 mL portions H₂O, and 25 mL alcohol. Remove mat and residue; transfer to ashing dish.

(c) *Treatment of residue.*—Dry mat and residue 2 h at 130 ± 2°. Cool in desiccator and weigh. Ignite 30 min at 600 ± 15°. Cool in desiccator and reweigh.

$$\begin{aligned} \% \text{ Crude fiber in ground sample} &= C \\ &= (\text{Loss in weight on ignition} - \text{loss in weight} \\ &\quad \text{of ceramic fiber blank}) \times 100 / \text{weight sample} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Crude fiber on desired moisture basis} &= C \\ &\times (100 - \% \text{ moisture desired}) / (100 - \% \text{ moisture in ground sample}) \end{aligned}$$

Report results to 0.1%.

References: JAOAC 42, 222(1959); 43, 335(1960); 44, 567(1961); 45, 578(1962); 65, 265(1982).

4.6.02

AOAC Official Method 962.09C Fiber (Crude) in Animal Feed

Fritted Glass Crucible Method

First Action 1978

Final Action 1979

A. Principle

Principle is same as in 962.09A (see 4.6.01), except sample is exposed to minimum vacuum needed to regulate filtration, and heating of sample solutions prevents gelling or precipitation of possible saturated solutions.

B. Apparatus and Reagents

See reagents 962.09B(a), (b), and (c) (see 4.6.01); apparatus 962.09C(a), (c), (d), and (f) (see 4.6.01), and in addition:

(a) *Filtration apparatus.*—System to permit application of minimum vacuum necessary for filtration and washing of each sample within 3–5 min. Each unit consists of reservoir manifold connected to (1) H₂O aspirator through 120° stopcock, (2) atmosphere through second stopcock with metering device, and (3) receptacle containing cone-shaped hard rubber gasket which provides vacuum seal with crucible. Vacuum gage attached to manifold indicates vacuum applied to crucible. Crucible can be heated before and during filtration

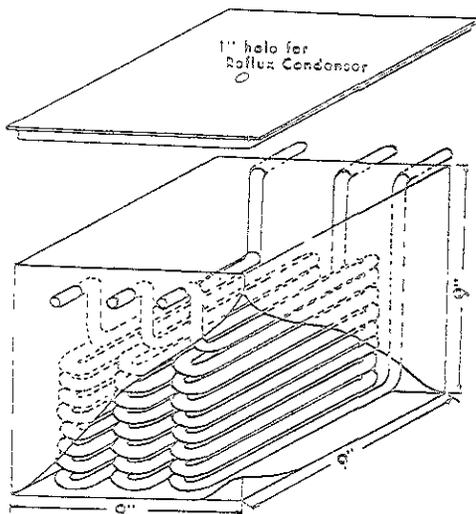


Figure 962.09C—Continuous heater for distilled water, 1.25% alkali, and 1.25% acid