

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**Efectos de la Sustitución Parcial de Harina y Aceite de Pescado
con Materias Primas de Origen Vegetal en la Pigmentación y
Color de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería en Alimentos

Pamela Soledad Stange Obando

VALDIVIA – CHILE

2004

PROFESOR PATROCINANTE

Fernando Figuerola R.

Ing. Agrónomo. M. S. Food Science.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESORES INFORMANTES

Marcia Costa L.

Ingeniero Civil Bioquímico.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Luz Haydee Molina

Profesora de Biología y Química.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Antecedentes salmonícolas en Chile	3
2.2	Pigmentación de salmónidos	6
2.2.1	Fuente de los carotenoides para salmónidos	8
2.2.1.1	Crustáceos	9
2.2.1.2	Levaduras	10
2.2.1.3	Algas	10
2.2.1.4	Plantas	10
2.2.1.5	Carotenoides sintéticos	11
2.3	Funciones de los carotenoides en salmónidos	12
2.3.1	Precusores de vitamina A	12
2.3.2	Reproducción	12
2.3.3	Acción antioxidante	12
2.3.4	Promotor de crecimiento	12
2.4	Metabolismo de los carotenoides en salmónidos	13
2.4.1	Digestión y absorción	13
2.4.2	Transporte de los carotenoides	14
2.4.3	Depósito de los carotenoides en el músculo	15
2.4.4	Metabolismo y excreción	16
2.5	Factores que afectan la pigmentación de los peces	16
2.5.1	Factores genéticos	16

2.5.2	Peso del pez	17
2.5.3	Maduración sexual	17
2.5.4	Estado de salud del pez	17
2.5.5	Factores del alimento	18
2.5.5.1	Lípidos	18
2.5.5.2	Proteínas	19
2.5.6	Fabricación del alimento	20
2.5.7	Tipo de pigmento	20
2.5.8	Periodo de entrega del alimento	21
2.5.9	Temperatura del agua	21
2.5.10	Calidad de agua	21
2.5.11	Salinidad	21
2.6	Evaluación de pigmentación en salmónidos	22
2.6.1	Evaluación sensorial	22
2.6.2	Evaluación instrumental	23
2.6.3	Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución	23
2.7	Expresión final de color	24
2.8	Efectos del procesamiento en calidad y color de filetes de salmónidos	25
2.8.1	Congelación	25
2.8.2	Ahumado en frío	26
3	MATERIAL Y METODO	27
3.1	Lugar del ensayo	27
3.2	Material	27
3.2.1	Alimento	27
3.2.2	Peces	29
3.2.3	Características de los tratamientos	29
3.2.3.1	Primera etapa	29
3.2.3.2	Segunda etapa	29

3.2.3.3	Tercera etapa	29
3.2.3.4	Frecuencia de muestreo	30
3.3	Metodología	30
3.3.1	Obtención de las muestras	30
3.3.2	Evaluación visual de color	30
3.3.3	Procesamiento de las muestras	31
3.3.4	Determinación de astaxantina	31
3.3.5	Análisis proximales	32
3.4	Diseño experimental	32
3.5	Cálculos y análisis de resultados	33
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
4.1	Respuesta productiva	34
4.2	Contenido de astaxantina en el alimento	34
4.3	Contenido de astaxantina en músculo	35
4.4	Retención de pigmento	41
4.5	Coloración evaluada por abanico colorimétrico Salmofan de Roche.	44
5	CONCLUSIONES	48
6	RESUMEN	49
	SUMARY	50
7	BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales carotenoides usados en nutrición acuícola	7
2	Composición de las dietas para cada etapa	28
3	Condiciones de funcionamiento del HPLC	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Producción de especies salmonícolas	4
2	Vías metabólicas de las astaxantina en el pez	13
3	Diseño experimental propuesto	32
4	Concentración de astaxantina y análisis de Tukey en las diferentes etapas	40
5	Retención de astaxantina y análisis de Tukey en las distintas etapas	42
6	Color promedio de salmón y análisis de Tukey en las diferentes etapas	45

1 INTRODUCCIÓN

En Chile, la acuicultura ha tenido un importante desarrollo en los últimos años, destacándose el cultivo de numerosas especies como ostiones, algas y otras que aún están en cultivo experimental, sin embargo la industria acuícola se encuentra mayormente concentrada en el cultivo de especies salmónidas, siendo las especies más destacadas el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los peces que tienen importancia como alimento para el consumidor presentan diversas diferencias generando una mayor o menor aceptación a éste, entre estas diferencias destacan la composición química (proteínas y ácidos grasos poli insaturados) y aspectos relacionados con su apariencia física y el color de su carne; constituyendo así el factor determinante de su explotación en forma artesanal e industrial.

La calidad de los salmónidos puede ser medida a través de la textura, contenido graso y del color, siendo este último uno de los criterios más importantes a la hora de la comercialización. El color está determinado por la depositación de pigmentos como la astaxantina y cantaxantina que se identifican en el grupo de los carotenoides, los cuales deben ser incluidos en la dieta para poder lograr el color característico de los peces, proceso llamado pigmentación, el cual se encuentra afectado por numerosos factores que dependen principalmente del alimento, de la genética del pez y condiciones ambientales.

El proceso de producción de salmónidos a través de los años, ha sido cada vez más eficiente. La optimización de este proceso incorpora una revisión constante de los costos involucrados, y con ello la búsqueda de alternativas de acuerdo a la disponibilidad y costo de las materias primas actualmente en uso, sustentadas en criterios técnicos para no comprometer la calidad del producto final.

La pigmentación no está ajena a esta revisión, ya que actualmente la sustitución de ingredientes de origen marino en el alimento para peces por otros de origen vegetal abren expectativas de ahorro debido a una mayor disponibilidad y menor costo.

De lo anterior surge la hipótesis de que la adición de materias primas de origen vegetal en la dieta produce variaciones en los niveles de pigmentación en canales de salmónidos lo cual será evaluado durante tres etapas fisiológicas de los peces, marcadas por la duplicación de peso al recibir tres distintas formulaciones de alimento.

1.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto del alimento de distintas composiciones y proporciones de macro nutrientes de origen animal y vegetal, en la concentración de astaxantina en canales de salmónidos durante tres etapas fisiológicas de los peces.

1.2 Objetivos específicos

- Establecer si la naturaleza de las dietas proporcionadas a salmones del Atlántico (*Salmo salar*) afectan el color, la concentración y la retención de pigmento en los peces.
- Determinar con qué dieta en cada etapa se obtienen mejores resultados desde el punto de vista del productor.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes salmonícolas de Chile

El cultivo de peces bajo condiciones controladas se ha practicado por cientos de años, sin embargo, el referido a los salmónidos (truchas y salmones) constituye desde el punto de vista industrial una actividad de reciente data. El cultivo de salmones y truchas en forma industrial se produjo en el hemisferio sur a raíz de la internación de especies de salmónidos y la tecnología necesaria para esta actividad con objeto comercial, que han permitido la mundialización de la acuicultura (VIDAL, 2000).

En nuestro país, esta industria se inició a principios de la década de 1980, presentando un explosivo crecimiento el cual fue posible gracias a las condiciones naturales adecuadas, entre las que destacan la disponibilidad de extensas zonas costeras, lacustres y fluviales que ofrecen óptimas condiciones ambientales para cultivo, las cuales se presentan en gran parte libres de contaminación, temperatura adecuada del agua y suficientes horas de luz en épocas invernales que permiten mejores y más rápidas tasas de crecimiento en comparación con el hemisferio norte. Además de un bajo costo de mano de obra y la existencia de insumos relacionados con la fabricación de alimentos debido a la producción de harinas de pescado de alta calidad (ACHURRA, 1996).

Desde 1994, la producción de mariscos y pescados ha representado alrededor del 6% de la producción mundial anual. En 2001, los envíos al exterior de pescados y mariscos superaron los US\$ 3.199 millones, representando un

20,48% del total de las exportaciones chilenas, según las cifras entregadas por el Banco Central de Chile (CHILE, BANCO CENTRAL, 2002).

Desde que comenzó a operar el primer cultivo de salmones en 1986, Chile se ha convertido en el segundo productor mundial de salmón con un 35% de participación del mercado actual, detrás de Noruega que tiene el 37%, siendo los principales países de destino de esta producción Japón, Estados Unidos, Latinoamérica y la Unión Europea (CHILE, PROCHILE,2003).

Chile se encuentra en el quinto lugar del *ranking* con US\$483 millones y un 6% de participación de mercado en las importaciones de productos del mar norteamericanas totales. En el año 2002, 71% del filete de salmón provenía de Chile, por lo cual, el país se posicionó como líder en los envíos a los Estados Unidos (CHILE, PROCHILE,2003).

Del total de exportación de salmónidos, aproximadamente un 41% corresponde a salmón del Atlántico, 34% a salmón Coho y 25% a trucha Arcoiris (FIGURA 1).



FIGURA 1. Producción de especies salmonícolas.

FUENTE: CHILE, FUNDACIÓN CHILE (2002).

Hace una década atrás, los productos del mar congelados lideraban el mercado, cerca del 25% de toda la producción era vendida en forma congelada y sólo el 20% fresco. Hoy en día, el pescado fresco es el indiscutible líder representando más de 45% de los productos del mar destinados al consumo humano (CHILE, PROCHILE,2003). En la mente del consumidor, el pescado fresco significa pescado de alta calidad, la visión del pescado sacado del agua un día y puesto a la venta el siguiente día, es una poderosa imagen para los consumidores, aún cuando no siempre refleje la realidad. Los consumidores han establecido una clara preferencia por el pescado fresco. El crecimiento en el consumo del producto fresco es posible por el aumento en la acuicultura y las mejoras en los sistemas de refrigeración y transporte para proveer pescado a los consumidores en todas partes (CHILE, PROCHILE,2003).

El salmón ahumado ha sido uno de los productos especiales, siempre bien valorados, pero difíciles de evaluar, ya que este producto es vendido a través de tiendas de especialidades/gourmet, las cuales no son auditadas. Las dos formas principales de salmón ahumado son ahumado-frío y ahumado-caliente. En todo el mundo, el salmón Atlántico es preferido para ahumar por su alto contenido de grasa, textura superior, color uniforme y alta calidad (CHILE, PROCHILE, 2003).

Debido al aumento del consumo del salmón en el extranjero durante los últimos años, éste se ha convertido en uno de los más exitosos en el mercado alimenticio; trayendo consigo presiones de precio, niveles de calidad poco uniformes y, en algunos casos, bajos niveles de crecimiento (VIDAL, 2000).

Al revisar los costos del proceso de producción de salmónidos, el ítem de mayor importancia es el alimento proporcionado a los peces el cual representa alrededor del 50% de los costos, seguido por el costo de los smolt, gastos

operacionales y administrativos, mano de obra y gastos de venta (WURMANN, 1997).

2.2 Pigmentación de salmónidos

La coloración de muchos productos marinos está dada por pigmentos que se identifican en el grupo de los carotenoides (SHAHIDI *et al.*, 1998), los cuales son compuestos principalmente liposolubles que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (FENNEMA, 1993; FOSS *et al.*, 1984). Esta coloración es muy importante para especies acuícolas como salmónidos, exosqueletos y tejidos epiteliales de especies con caparazones cuyos colores están definidos entre el rojo y amarillo (BJERKENG, 2000), tono que adquieren debido a que poseen la capacidad genética de almacenar pigmentos oxigenados en el músculo, piel y también en los ovarios (KHARE *et al.*, 1973; SCHIEDT *et al.*, 1981).

Los salmónidos no tienen la capacidad de sintetizar carotenoides por sí mismos y por lo tanto son absolutamente dependientes de la dieta para lograr la pigmentación normal conocida (CHRISTIANSEN *et al.*, 1991).

Se ha identificado gran cantidad de carotenoides en salmones (CUADRO 1) cuya absorción es bastante diferente, siendo mayoritariamente responsables del color los pigmentos aislados astaxantina (3,3'-dihidroxi β -caroteno-4,4'-diona) (FOSS *et al.*, 1984; HARDY, 1988; SINNOT, 1989) y en forma menos abundante cantaxantina (β - β -caroteno-4,4'-diona) (SCHIEDT *et al.*, 1995; STOREBAKKEN y NO, 1992).

La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos unidas de manera tal que el orden se invierte al centro. Este esqueleto básico puede modificarse de varias maneras como por ejemplo por hidrogenación,

dehidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento, isomerización, introducción de funciones oxigenadas o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras (FENNEMA, 1993; RODRÍGUEZ-AMAYA, 1997).

CUADRO 1. Principales carotenoides usados en nutrición acuícola.

CAROTENOIDE	ABSORCIÓN (*)	ESTRUCTURA
Astaxantina	*****	Retinol y dehidroretinol
Cantaxantina	***	Retinol y dehidroretinol
Zeaxantina	*	Retinol y dehidroretinol
B- carotino	*	Retinol
Luteína	*	Dehidroretinol
Isozeaxantina	*	Dehidroretinol

FUENTE: TORRISSEN y CHRISTIANSEN (1995).

(*) El número de asteriscos denota el grado de absorción del carotenoide.

La propiedad pigmentante de los carotenoides está determinada por la presencia de una cadena de dobles enlaces conjugados que constituye el cromóforo en todos los carotenoides (NICKELL y BROMAGE, 1997), pero estos dobles enlaces los hacen inestables y susceptibles a la oxidación y reorganización molecular, dando lugar a innumerables derivados e isómeros con distintos valores pigmentantes (CASTRO, 1992).

La molécula de astaxantina tiene dos átomos de carbono asimétricos equivalentes en la posición 3 y 3', pudiendo formar tres isómeros ópticos distintos: (3R, 3'R), (3R, 3'S)=(3S, 3'R), o forma meso y (3S, 3'S) (CASTRO, 1992). En salmones del Atlántico y truchas Arcoiris, las proporciones de la composición configuracional de isómeros de astaxantina en la musculatura es sorprendentemente similar, estando los isómeros ópticos en

porcentajes de 78 a 85 (3S,3'S), 12 a 17% (3R,3'R) y 2 a 6% (meso astaxantina); y para los isómeros geométricos en un 80% como forma trans y un 20% en forma cis (SCHIEDT *et al.*, 1981). Es importante mencionar que en el alimento del salmón salvaje se encuentra prácticamente la misma composición configuracional de isómeros de astaxantina y virtualmente estos no cambian al ser ingeridos, absorbidos y acumulados, por lo tanto los tejidos presentan la misma proporción (CASTRO, 1992).

La astaxantina sintética es una mezcla de los tres isómeros ópticos en la siguiente proporción (3R,3'R), (3R,3'S)=(3S,3'R) y (3S,3'S) 25, 50 y 25% respectivamente y 100% como forma trans que es totalmente biodisponible (CASTRO,1992).

La astaxantina se presenta en la naturaleza como astaxantina libre, mono o diéster ya que puede esterificarse con ácidos grasos. En el plasma y musculatura se encuentra astaxantina en la forma libre, mientras que en la piel se encuentra esterificada. Los carotenoides sintéticos que se producen comercialmente están en la forma libre (HARDY *et al.*, 1994).

La tasa de retención de los pigmentos carotenoides en los salmónidos, definida por la proporción entre los carotenoides fijados en el tejido muscular y los ingeridos (STOREBAKKEN y NO, 1992) alcanza un rango de 1 a 18%, y varía con factores como tamaño, especie, tipo de pigmento, madurez sexual, composición de la dieta y concentración de carotenoides en el alimento (TORRISEN *et al.*, 1989).

2.2.1 Fuente de los carotenoides para salmónidos. Bajo condiciones naturales, los salmónidos obtienen su característico color debido a la ingesta de crustáceos y zooplancton cuyo pigmento predominante es la astaxantina, por lo tanto encontrándose presente en los salmones silvestres, por lo que ha sido

utilizada con gran éxito durante los últimos años, desplazando a la cantaxantina, que fue inicialmente utilizada por ser el único pigmento disponible a gran escala en la salmonicultura (LARRAÍN, 2002). Sin embargo, de acuerdo a lo publicado por SKREDE y STOREBAKKEN (1986) la cantaxantina otorga un color mas amarillento que la astaxantina.

En condiciones de cultivo la pigmentación de los salmónidos a base de carotenoides corresponde mayoritariamente a astaxantina la cual posee variadas fuentes de origen marino o vegetal o productos sintéticos (CHOUBERT, 1981).

2.2.1.1 Crustáceos. La astaxantina, ya sea en forma libre, esterificada o formando complejos con proteínas, es el pigmento principal tanto en caparazones como órganos internos de los crustáceos y representa el 70% del total de los pigmentos presentes, ubicándose especialmente en los caparazones (TANAKA *et al.*, 1986).

En el ambiente natural, los crustáceos son una importante fuente de alimento para los peces, obteniendo desde aquí el pigmento que les otorga la coloración al tejido muscular (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

El krill es uno de los crustáceos más investigados debido a la concentración de carotenoides que posee, las cuales varían desde 15 a 77 mg/kg dependiendo de la especie. La harina de krill antártico (*Euphausia superba*), que contiene 180-200 mg/kg de astaxantina, es considerada un estimulador del apetito de los salmones además posee un alto contenido de proteína cercano al 60% y un moderado aporte de grasas, pero la astaxantina se encuentra mayoritariamente en forma de ésteres de ácidos grasos, lo cual limita su uso en peces (BRAVO, 2000).

2.2.1.2 Levaduras. Entre las levaduras que producen astaxantina, solamente la *Phaffia rhodosyma* es de importancia comercial, ésta posee la capacidad de fermentar azúcares y sintetizar carotenoides. En la actualidad ha sido posible aislarla desde árboles con follajes densos sólo en algunos países.

Las cepas silvestres contienen hasta 500 mg de carotenoide por kilogramo de materia seca, del cual un 40% a 95% corresponde a astaxantina en forma libre y el resto a foenicaxantina y otros carotenoides de menor importancia (ANDREWES *et al.*, 1986).

En procesos de fermentación industrial donde se utilizan cepas seleccionadas se ha llegado a concentraciones de 3.000 o más ppm de astaxantina (JOHNSON, 1989).

2.2.1.3 Algas. Las algas son la fuente natural con el más alto contenido de astaxantina alcanzando hasta 5 gramos por kilogramo de materia seca, ya que el 90% de los carotenoides corresponde a astaxantina, siendo un 87% ésteres y sólo un 3% astaxantina en forma libre (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

El uso a nivel industrial de las algas potencia al desarrollo de tecnologías que incrementen la proporción de astaxantina libre o el desarrollo de un proceso de hidrólisis de los ésteres de astaxantina, cuyos costos deberán ser favorables al ser comparados con los costos de producción de pigmentos obtenidos sintéticamente (TORRISSEN *et al.*, 1989; MARKOVITS, 1991).

2.2.1.4 Plantas. De todas las plantas que contienen astaxantina, sólo *Adonis sp.* es considerada importante como fuente de carotenoides, la cual es una planta silvestre coloreada, que puede ser encontrada en el sur de Europa y es considerada una maleza por productores de trigo. La forma predominante es como diéster de varios ácidos grasos. El contenido de astaxantina encontrado

en los pétalos deshidratados de *Adonis annua* es cercana a 11.000 ppm (aprox. 75% de los carotenoides) y las flores de *Adonis aestivalis* contienen alrededor de 1.600 ppm (aprox. 80% de los carotenoides) (MARKOVITS, 1991).

2.2.1.5 Carotenoides sintéticos. El cultivo intensivo de salmónidos no puede depender de un aporte natural de pigmentos, por lo cual se recurre a la suplementación con productos sintéticos como la astaxantina y la cantaxantina para alcanzar el grado de coloración deseado en la carne (TORRISSEN *et al.*, 1989), favorecido además por ser productos estandarizados, con una alta concentración de carotenoides y de fácil manejo (HARDY *et al.*, 1994; NICKELL y BROMAGE, 1997).

La astaxantina por ser muy sensible al oxígeno, una vez sintetizada debe ser recubierta o empacada en un protector (beadlet), que consiste básicamente en una matriz de gelatina y carbohidratos, además los antioxidantes etoxiquina y palmitato de ascorbilo son incluidos en el beadlet para asegurar un producto de mayor estabilidad (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

La cantaxantina no es el pigmento más abundante en la cadena alimenticia de salmónidos, ya que constituye solo una pequeña porción de los carotenoides del músculo de los peces silvestres, sin embargo es utilizada para la pigmentación de salmónidos, a pesar de que posee menor eficiencia de pigmentación que la astaxantina debido a una menor tasa de absorción, débil unión a la actomiosina y sufre mayor grado de degradación en el organismo de los peces (BAKER, *et al.*, 2002).

Los pigmentos sintéticos son producidos principalmente por Hoffman la Roche (Basilea, Suiza), en 1964 sacaron al mercado la cantaxantina sintética llamada Carophyll Red 10%®, siendo la principal fuente de pigmento empleada en la década pasada. La astaxantina sintética esta disponible desde 1985,

denominada Carophyll Pink 8%®, teniendo una mayor eficiencia de pigmentación que la cantaxantina en salmónidos, ya que absorbe, deposita y retiene más su color a la congelación (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

2.3 Funciones de los carotenoides en salmónidos

Los carotenoides tienen una importante función metabólica en los peces, por lo que existe un gran interés por conocer mejor estas funciones debido al gran impacto que ellos representan en la comercialización del producto final.

2.3.1 Precursores de vitamina A. TORRISSEN y CHRISTIANSEN (1995), mencionan que la astaxantina, zeaxantina y cantaxantina son precursores de vitamina A en salmónidos, pero el rango de incorporación es dependiente del peso y edad del pez, y la concentración de vitamina A existente en el pez (GROSS y BUDOWSKI, 1966).

2.3.2 Reproducción. Este rol de los pigmentos aún no está claro, se especula que el movimiento de astaxantina a la piel en los machos sirve para que las especies se reconozcan durante la reproducción, y a los ovarios en las hembras para desempeñar un rol fisiológico en el oocito y en el posterior desarrollo embrionario (BIRD y SAVAGE, 1990)

2.3.3 Acción antioxidante. Una mayor concentración muscular de astaxantina logró disminuir significativamente la rancidez de los filetes en salmónidos.

2.3.4 Promotor de crecimiento. CHRISTIANSEN y TORRISSEN (1994), trabajando con alevines de primera alimentación informan que una concentración de 3,8 ppm produjo menores mortalidades y tasas de crecimiento satisfactorias, cuando se compara con dietas sin astaxantina, lo que también se observa en juveniles de salmón del atlántico (CHRISTIANSEN y TORRISSEN, 1996), por lo tanto estos autores infieren que la astaxantina tiene un valor

nutricional y que es esencial en los salmones, no debiendo considerarse un aditivo sino un nutriente.

2.4 Metabolismo de los carotenoides en salmónidos.

En el proceso metabólico de la astaxantina (FIGURA 2), ocurren varios pasos que pueden alterar la cantidad y tasa de depositación de pigmento en el músculo los cuales son dependientes de su digestión, eficiencia de absorción, capacidad de transporte, mecanismo de depósito en diferentes tejidos, metabolismo y excreción (TORRISSEN *et al.*, 1989; NICKEL y BROMAGE, 1997).

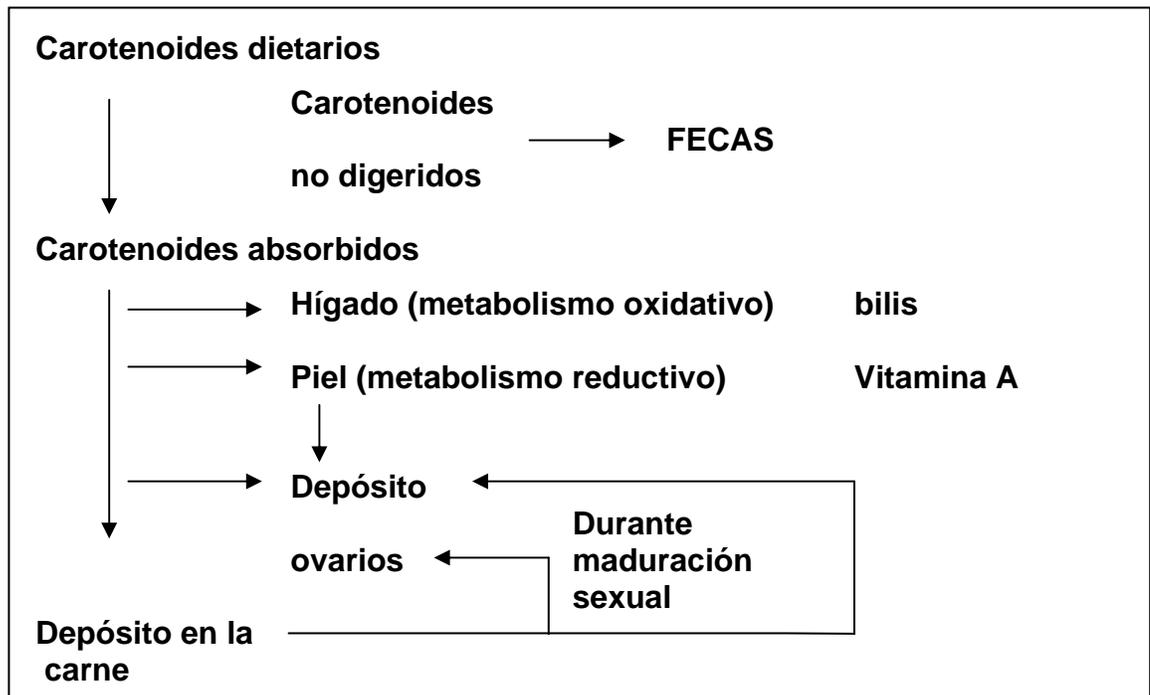


FIGURA 2. Vías metabólicas de la astaxantina en el pez.

FUENTE: TORRISSEN *et al.*, (1989), HARDY *et al.* (1989).

2.4.1 Digestión y absorción. La absorción de los carotenoides es afectada por la digestión de pigmentos de distintas fuentes (TORRISSEN *et al.*, 1989), la presencia de grupos hidroxílicos (TORRISSEN, 1986) y el grado de

esterificación (SCHIEDT *et al.*, 1986). Se ha demostrado que los salmónidos absorben astaxantina del intestino en su forma libre, atribuyéndose esto a la limitada capacidad de hidrolizar ésteres y diésteres de astaxantina en la pared intestinal (FOSS *et al.*, 1987; NICKELL y BROMAGE, 1997).

Esta limitación, en la hidrólisis de los ésteres, indica que la eficiencia en la pigmentación de la carne depende de la forma molecular de la astaxantina, por lo tanto la astaxantina mono y diéster (presente en crustáceos) no son de uso habitual en las dietas de salmónidos con el propósito de pigmentar, y se privilegia el empleo de astaxantina sintética (forma libre) en las dietas ya que posee un porcentaje mas alto de digestibilidad (TORRISSEN *et al.*, 1989; NICKELL y BROMAGE, 1997).

Tanto la astaxantina como la cantaxantina son moléculas altamente digestibles, pero la astaxantina es mas digestible que la cantaxantina, debido a diferencias estructurales, que hacen que tenga una menor absorción a nivel intestinal y menor fijación y estabilidad en el músculo que la astaxantina (LARRAÍN, 2002; NICKELL y BROMAGE, 1997).

La absorción de astaxantina ocurre principalmente en el ciego pilórico, mientras que la cantaxantina se absorbe a lo largo de todo el tracto digestivo (TORRISSEN, 1986; AL-KALIFA y SIMPSON, 1988; TORRISSEN *et al.*, 1990). Los carotenoides al ser liposolubles probablemente emulsificados incorporándose en el micelio junto a la bilis y otros componentes lipofílicos (STOREBAKKEN y NO, 1992), siendo metabolizados en el hígado (TORRISSEN *et al.*, 1990).

2.4.2 Transporte de los carotenoides. El mecanismo por el cual los carotenoides son tomados desde el plasma por los tejidos y devueltos nuevamente al plasma desde los tejidos específicos aun no esta determinado

claramente (OLSON, 1993), pero se sabe que es realizado principalmente por lipoproteínas de alta densidad (HDL) y baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy alta densidad VHDL y lipoproteínas de muy baja densidad VLDL (CHOUBERT *et al.*, 1994). Además, se ha demostrado la participación de ácidos grasos esenciales ($\omega 3$) y, especialmente el ácido docohexaenoico (DHA) en el transporte de carotenoides, como parte integral de las lipoproteínas transportadoras (BIRD y SAVAGE, 1990).

2.4.3 Depósito de los carotenoides en el músculo. Después de la esmoltificación la depositación de los carotenoides en el músculo incrementa (BJERKENG *et al.*, 1992), y la acumulación de carotenoides no cesa durante la maduración sexual. Los tejidos musculares poseen concentraciones relativamente bajas de astaxantina considerando la cantidad de músculo presente.

La astaxantina se encuentra relacionada con la porción proteica del músculo de los salmónidos (SCHIEDT, 1998) pero no se encuentra uniformemente distribuida en los filetes del pez. Este parámetro es muy importante con respecto a la calidad. En la literatura se menciona que los salmónidos poseen diferencias en concentración con respecto a diversas áreas de estos, considerando la figura del pez linealmente, por lo tanto se ha estimado que la zona del caudal contiene entre un 30 a 40% superior en relación a la parte anterior y posterior del filete (CHRISTIANSEN y WALLACE, 1988; NO y STOREBAKKEN, 1991).

REFSGAARD *et al.*, (1998), reportó un 19% de diferencia de concentración de astaxantina a favor del caudal. Esto no fue encontrado por BELL *et al.*, (1998). Por otro lado, nuevos estudios determinaron un incremento radial en pigmentación hacia la espina dorsal (McCALLUM *et al.*, 1987). Cortes en áreas

dorsales y medias contienen más carotenoides que los tejidos adiposos en el beli (sección abdominal del pez) y la parte conectiva de los miotones.

2.4.4 Metabolismo y excreción. SCHIEDT *et al.*, (1985) al alimentar truchas con astaxantina libre encontró una tasa de retención de un 10%, pero los valores de digestibilidad son mucho más altos con una rango de 25 a 90% (HARDY, 1988). Esto sugiere que un alto porcentaje de los carotenoides dietarios son absorbidos y metabolizados a otros productos o bien excretados por la bilis (HARDY, 1988). El hígado actúa como el principal órgano almacenador de compuestos transportados por lipoproteínas y consecuentemente, una alta proporción de los carotenoides absorbidos son metabolizados en él y excretados por la bilis, lo que hace que no estén disponibles para la pigmentación muscular (STOREBAKKEN y NO, 1992; NICKELL y BROMAGE, 1997). Esta función hepática ha sido confirmada por TORRISSEN e INGEBRIGTSEN (1992) quienes confirman la excreción biliar y urinaria de metabolitos de astaxantina.

2.5 Factores que afectan la pigmentación de los peces

El proceso de pigmentación se encuentra afectado por numerosos e importantes factores observándose importantes variaciones en la absorción y depósito de carotenoides.

2.5.1 Factores genéticos. Existe una gran variación en la tasa de retención de pigmento entre diferentes especies de salmonídeos. Destacándose mayormente, en cuanto a la tasa de retención de pigmento, la trucha Arcoiris, seguida por el salmón Coho y finalmente el salmón del Atlántico (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

Sin embargo, las variaciones dentro de una especie también son importantes ya que peces mantenidos bajo similares condiciones de pigmentación y manejo, no

tienen la misma eficiencia de pigmentación debido principalmente a la variabilidad genética (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

2.5.2 Peso del pez. Se ha mencionado que en salmónidos existe un peso mínimo, aproximadamente de 100 g, sobre el cual los carotenoides son depositados eficientemente en el músculo. Aparentemente, los carotenoides no son transportados al músculo o bien son transformados en compuestos derivados incoloros (MARCH *et al*, 1990).

2.5.3 Maduración sexual. Durante este periodo los pigmentos son transportados desde el músculo hacia los ovarios (en el caso de las hembras) y la piel (para los machos). En esta época el proceso de pigmentación es ineficiente y extremadamente difícil. Lo cual debe ser considerado, junto con antecedentes de maduración temprana de los peces, para decidir cuando mover los smolts al mar y planificar épocas de cosecha para evitar que se llegue a la época de maduración antes de alcanzar los niveles de pigmentación requeridos de la carne (TORRISSEN *et al*, 1989, HARDY *et al*, 1989).

En el tiempo de maduración sexual, los carotenoides almacenados son transportados por lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL) o lipoproteínas de alta densidad (HDL) a los ovarios y finalmente a la progenie (TORRISSEN y CHRISTIANSEN, 1995).

En salmones del Atlántico, el proceso de movilización de astaxantina desde el músculo, puede comenzar tan temprano como 6 meses antes del desove y mucho antes que se evidencien signos gonadales (IGS) o características sexuales secundarias externas (TORRISSEN y CHRISTIANSEN, 1997).

2.5.4 Estado de salud del pez. Los peces al estar afectados por enfermedades ya sean de origen viral, bacteriano, parasitario o cualquier otra situación

altamente estresante, se va a ver notablemente disminuido el consumo de alimento, recibiendo por ende menor cantidad de pigmento de lo deseado por el productor. Por otra parte, al aumentar la mortalidad puede provocar un gran impacto en la cantidad de pigmento utilizado por biomasa final cosechada (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

Según PUTNAM (1991), bajo condiciones estresantes del pez, la astaxantina puede ser transformada a idoxantina, la cual produce una coloración amarillenta. Después de largos días de ayuno (38 días), la concentración de astaxantina en el músculo no cambia, sin embargo, aumenta el catabolismo de proteínas y lípidos. Esto demuestra que durante condiciones de ayuno existe una redistribución interna del pigmento (CHOUBERT, 1992).

2.5.5 Factores del alimento. Existen diversos factores que afectan la pigmentación de los salmónidos, sin embargo uno de los factores mas importantes es la composición de la dieta proporcionada a los peces (TORRISSEN, 1985; NICKELL y BROMAGE, 1998).

La elaboración de alimentos de alta calidad es una necesidad de vital importancia para el desarrollo de la industria acuícola. La calidad de estos alimentos, esta determinada por el tipo, calidad y composición de ingredientes que se utilicen, la formulación de la dieta y por los métodos de procesamiento empleados en su elaboración. Por lo que los distintos constituyentes del alimento juegan un importante rol en este proceso. El tipo de ingrediente y su nivel en la ración influirá en la composición nutricional del alimento, así como en su presentación (CAMPABADAL y CELIS, 2000).

2.5.5.1 Lípidos. Los lípidos empleados para nutrición acuícola constituyen la fuente de energía para los peces, pero no solo se utilizan como fuente de energía sino como fuente de ácidos grasos omega 3 y omega 6, siendo el

aceite de pescado, el de bacalao y el de soya los más utilizados (CAMPABADAL y CELIS, 2000).

Se ha reportado que el aumento en el contenido de lípidos en la dieta tiene un efecto positivo en la depositación de pigmento en salmónidos debido probablemente un aumento en la absorción intestinal (ABDUL MALAK *et al*, 1975; TIBALDI y BALLESTRAZZI, 1990; TORRISSEN *et al*, 1990; BJERKENG *et al*, 1997; EINEN y ROEM, 1997; NICKELL y BROMAGE, 1998). Sin embargo, algunos autores como CHOUBERT y LUQUET (1983), TORRISSEN (1985) , TORRISSEN *et al* (1990) señalan lo contrario.

La influencia de la fuente del aceite adicionado al alimento y la composición de ácidos grasos en relación a la depositación de pigmento ha recibido muy poca atención lo cual puede explicar algunas de las aparentes discrepancias con respecto al tema (BJERKENG *et al.*, 1999).

De acuerdo a HARDY *et al.* (1987), las grasas saturadas reducen la digestibilidad de los carotenoides y por lo tanto su incorporación en los tejidos musculares de los peces.

Al aumentar el nivel de lípidos en la dieta, se aumenta el nivel de energía del alimento y el crecimiento de los peces. Esto produce una mayor biomasa que debe ser pigmentada, lo que debe ser compensado a través de la dosis de pigmento en la dieta (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

2.5.5.2 Proteínas Desde un punto de vista nutricional las fuentes de origen animal para fuente de proteínas, como la harina de pescado, la harina de cabeza de camarón y la harina de calamar, son las más utilizadas en la formulación de alimentos acuícolas, aunque muchos nutriólogos también utilizan la harina de carne y hueso y la harina de sangre (AKIYAMA y

POLANCO, 1995; JAUNCEY y ROSS, 1982). Por otro lado, en los últimos años ha existido un gran auge en el uso de proteínas de origen vegetal, especialmente por los productos de soya y la soya integral, estos ingredientes han producido excelentes rendimientos, tanto biológicos como económicos (LAWRENCE *et al*, 1986; LOWELL, 1984; AKIYAMA, 1988, AKIYAMA 1992, LIM y DOMINY, 1989; LIM y DOMINY, 1990).

Existen otras fuentes de proteína vegetal que también se usan en la formulación de dietas para especies acuícolas. Entre las más comunes están la harina de semilla de algodón, la de canola y la harina de maní. El problema de estas fuentes es la presencia de algunos factores antinutricionales, un incompleto perfil de aminoácidos y el desarrollo de micotoxinas, que limitan su uso (LIM y DOMINY, 1989).

2.5.6 Fabricación del alimento. El proceso empleado en la elaboración del alimento, ya sea extrusión o peletizado, puede provocar severos daños a los carotenoides debido a las diversas condiciones de temperatura y humedad, efectos mecánicos y exposición al oxígeno involucrados en el proceso a los cuales son extremadamente sensibles las moléculas pigmentantes (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

Se ha observado que las pérdidas de carotenoides en el proceso de extrusión en la elaboración del alimento es de aproximadamente 5-10%. Dependiendo exclusivamente de las condiciones de operación y la calidad de las materias primas empleadas (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

2.5.7 Tipo de pigmento. La astaxantina libre es considerada más eficiente que la cantaxantina para pigmentar el músculo de los peces puesto que el coeficiente de retención de la astaxantina es 1,3 y 1,5 veces mayor en relación con la cantaxantina debido en parte a diferencias de digestibilidad y a que la

astaxantina se une más firmemente a la actomiosina en el músculo que la cantaxantina. Además con astaxantina se logra un color del músculo mucho más rojizo comparable con la concentración de carotenoides en la carne (STOREBAKKEN y NO, 1992).

2.5.8 Periodo de entrega del alimento. La tasa de retención de pigmento se puede optimizar haciendo largos los periodos de entrega de alimento ya que de esta forma la dosis de pigmento necesaria para alcanzar la meta fijada de nivel de pigmento es menor. Por lo que es más beneficioso utilizar bajas dosis por periodos largos que altas dosis por periodos cortos (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

2.5.9 Temperatura del agua. Autores como NO y STOREBAKKEN (1991), señalan que existe relación entre la temperatura del agua y el depósito de astaxantina observándose que salmónidos cultivados a temperaturas cálidas (15°C) poseen mayores depósitos de pigmento en el músculo.

2.5.10 Calidad del agua. Muchos factores unidos a la calidad del agua son de importancia para mantener un estado de salud óptimo del pez. La transparencia del agua también puede tener un efecto sobre la toma de alimento, afectando el consumo de pigmento en una población. Cambios en el oxígeno disuelto, amonio y concentración de microalgas son estresantes para los peces, por lo tanto, mientras estas condiciones se mantengan cerca del nivel óptimo, favorecerán el rendimiento del proceso de pigmentación (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

2.5.11 Salinidad. Estudios de la influencia de la salinidad en la retención de pigmento han sido contradictorios. Truchas arco iris mantenidas en agua salada tienen mejor retención de pigmento en el músculo y otros tejidos que truchas mantenidas en agua dulce. (NO, 1992). Sin embargo, otros estudios muestran

que truchas arco iris presentan mayor retención de astaxantina cuando han sido cultivadas en agua dulce que salada (CHOUBERT *et al*, 1996).

2.6 Evaluación de pigmentación en salmónidos.

La coloración en la carne de los salmones se puede medir mediante evaluación sensorial, que es una medición cualitativa y por una evaluación instrumental o medición cuantitativa. La pigmentación se determina por el análisis cuantitativo de los pigmentos carotenoides presentes en los músculos.

2.6.1 Evaluación sensorial. La estimación del color por este método es el comúnmente usado en la industria, la principal razón es su bajo costo, comparado con métodos instrumentales, y lo fácil de usar. Este método consiste en la comparación visual del color de la carne del pez con los tonos presentes en cartas de color.

Un punto importante a considerar cuando se usa este método es la estandarización de las condiciones bajo las cuales se compara el color con la carta o el abanico, porque el medio ambiente puede modificar la percepción del color. Para evitar esto se han diseñado "cajas de luz", las cuales tienen una dimensión, un color y una intensidad de luz determinada (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

La Carta Color ® diseñada por Laboratorios Roche tiene una gama de colores de 11 a 18, la cual fue creada basada en salmón del Atlántico y va desde el rosado pálido hasta rojo intenso; el color ideal depende de la especie y del mercado importador, fluctúa entre 14 y 16, siendo el valor menor para salmón del Atlántico y el mayor para trucha.

El abanico colorimétrico SalmoFan de Roche® reemplaza a la carta, tiene una gama más amplia de colores que va desde el 20 al 34. Dependiendo de la

especie y del mercado varía la preferencia del consumidor. Se ha observado que hay una relación directa entre el color del músculo medido visualmente y la concentración de astaxantina hasta un cierto nivel que corresponde más o menos a 6 - 7 mg/kg. El ojo humano tiene una capacidad limitada para distinguir diferencias en el color de la carne con concentraciones superiores a éstas (BJERKENG, 2000).

2.6.2 Evaluación instrumental. Este método es considerado más objetivo y preciso que el anterior dado su carácter instrumental. Se basa en la luz reflectada, utilizando un colorímetro de reflectancia (CASTRO, 1993).

Su principio se fundamenta en el hecho de que la sensación que se tiene es triparamétrica, es decir en función del tono, la claridad y la saturación, y que los colores pueden ser representados por coordenadas en un espacio tridimensional (CASTRO, 1992).

La información que entrega el colorímetro de reflectancia se basa en un sistema de valores establecido por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE). El espacio cromático es definido por coordenadas rectangulares (L^* a^* b^*) y por coordenadas cilíndricas (L^* H^* C^*). En el primero L^* es luminosidad o claridad; a^* es la cromaticidad con respecto al componente rojo(+) o verde (-) ; b^* es la cromaticidad con respecto al componente amarillo (+) o azul (-); en el segundo, L^* es claridad; C^* cromaticidad y H^* tono (CASTRO, 1992).

2.6.3 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta resolución. Esta metodología permite identificar, aislar y cuantificar el contenido de carotenoides en la musculatura (CASTRO, 1992).

La cromatografía consta de una fase estacionaria o fija y otra móvil que se filtra a través o sobre la superficie de la fase fija, de tal forma que los componentes

de la muestra se distribuyen entre las dos fases y cada uno de ellos es selectivamente retenido por la fase estacionaria (CASTRO, 1993).

El procedimiento general incluye varias etapas que son preparación de estándares y curva de calibración a partir del producto comercial de astaxantina. Posteriormente incluye preparación, análisis cromatográfico y cuantificación de la astaxantina en las muestras (CASTRO, 1993).

Los pigmentos son aislados de otras sustancias mediante un sistema de extracción con solventes orgánicos y posteriormente, separados en el cromatógrafo. La detección es por su absorbancia a una longitud de onda de 473 nm. La concentración es determinada mediante la integración (comparación) del área del cromatograma (curva de respuesta en el tiempo) en la curva de calibración, confeccionada sobre la base de una serie de diluciones de los estándares de pureza conocida (WEBER, 1990; CASTRO 1992).

El conocimiento de la concentración de pigmentos en los músculos ha permitido hacer un seguimiento de las dosis dietarias de los pigmentos y así implementar mejores estrategias de pigmentación (CASTRO, 1992)

2.7 Expresión final de color

Como ya antes se ha mencionado, son muchos los factores que determinarán la expresión de un color, a una cierta concentración de pigmento en el músculo de los peces. Sin embargo, en ciertas ocasiones a pesar de tener suficiente pigmento depositado en el músculo, puede que no se exprese el color esperado. Dentro de los factores que pueden incidir se encuentran la velocidad de crecimiento, infiltración de grasa y características de la composición muscular del pez (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

2.8 Efectos del procesamiento en calidad y color de filetes de salmónidos

El efecto de las condiciones de procesamiento y almacenamiento en la retención de pigmento en los filetes de salmónidos son un punto importante al determinar la eficiencia de la pigmentación a causa de que las condiciones de operación de los productos salmonídeos pueden variar substancialmente, produciendo variaciones en la cantidad de pigmento retenido y la percepción de color (JENSEN *et al.*, 1998, GOBANTES *et al.*, 1998).

El procesamiento de salmónidos puede generar pérdidas de pigmento debido a la oxidación de las moléculas de pigmento o desunión entre el pigmento y la actomiosina muscular. Lo cual, es importante considerar para el establecimiento de las metas de pigmento depositado al momento de cosecha de un grupo determinado de peces (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

La degradación o deterioro de pigmento y posterior pérdida de color es afectada por numerosos factores durante el proceso tales como temperatura, pH, exposición a procesos oxidativos (luz, agua, sal y oxígeno) y la influencia de enzimas musculares como lipoxigenasas y peroxidadas (JENSEN *et al.*, 1998).

Una manera de minimizar las pérdidas de color es asegurándose que el contenido de astaxantina en el producto sea suficientemente alto, de tal manera que pequeñas pérdidas de astaxantina tengan un efecto limitado sobre el color del producto. Normalmente niveles meta de concentración de astaxantina de 8 mg/kg en salmón Atlántico son suficientes para evitar pérdidas normales por proceso y lograr mantener la visualización de color (ALMENDRAS y SABELLE, 1999).

2.8.1 Congelación. El efecto de la congelación de filetes de salmónidos en la depositación de pigmento y color ocasiona un efecto negativo dependiendo del tipo de pigmento utilizado, afectando significativamente a los productos

pigmentados con cantaxantina, evidenciándose una fuerte variación en la concentración de pigmento en el músculo y la percepción del color, lo que no ocurre al estar presente la astaxantina (JENSEN *et al.*,1998, GOBANTES *et al.*,1998).

Es notablemente reconocido que la unión más fuerte es la existente entre la astaxantina y el músculo, por lo tanto, generando una mejor retención de pigmento en peces alimentados con este carotenoide. Las sutiles diferencias estructurales de las moléculas entre astaxantina y cantaxantina generan importantes diferencias en la apreciación visual de color (GOBANTES *et al.*,1998).

2.8.2 Ahumado en frío. La magnitud de las pérdidas o cambios en los parámetros de calidad, pueden ser altamente variables y dependientes de las condiciones y el grado de procesamiento dado a los salmónidos. Al observar las características de los filetes se aprecian notables cambios en la apariencia externa, especialmente en la coloración, observándose que el ahumado produce una disminución del brillo y tono, pero un aumento en la intensidad del color rojo (CHOUBERT *et al.*, 1992).

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Lugar del ensayo

El cultivo de los peces se efectuó en el centro experimental Liucura, perteneciente a Cetecsal S.A., ubicado en la isla Lemuy. Los análisis fisicoquímicos fueron realizados en las instalaciones de Cetecsal S.A. laboratorio perteneciente a Salmofood S.A. el cual se encuentra ubicado en Castro, Décima Región.

3.2 Material

Se procede a describir el material utilizado en la investigación.

3.2.1 Alimento. El alimento utilizado fue alimento extruído, el cual fue proporcionado y diseñado por la empresa Salmofood S.A. Se utilizaron tres formulaciones denominadas 30/43, 30/40 y 35/38 de acuerdo al contenido de lípidos y proteínas, éstas fueron empleadas por etapas a lo largo del proceso de crecimiento de los peces de acuerdo a las demandas energéticas y nutricionales del periodo que corresponde al de mayor consumo de alimento.

A partir de las tres diferentes formulaciones se diseñaron ocho dietas isocalóricas e isoenergéticas respectivamente (CUADRO 2), las cuales se caracterizan por diferir en nivel de harina de pescado (20-25% y 40-45%) y en nivel de aceite de pescado (100, 80, 60 y 40%). Cada formulación constó de una dieta control (dieta 5), que se caracteriza por tener sólo harinas y aceites de origen marino. Todas las demás dietas, para completar el porcentaje de proteínas y de lípidos de las formulaciones se le agregaron ingredientes de

origen vegetal. La sustitución de aceite de pescado fue realizada con una mezcla de aceite de soya (96%) y maní (4%) y a una mezcla de harinas de origen vegetal. El pigmento utilizado fue astaxantina (Carophyll pink 8%® de Roche) siendo agregado en el proceso de extrusión en igual concentración para todas las dietas en las tres etapas. La entrega del alimento fue a saciedad controlada (*ad libitum* con control del consumo evitando así pérdidas de alimento).

CUADRO 2. Composición de las dietas para cada etapa.

I Etapa						
Formulación	Tratamiento	% de h. Pescado	% de h. vegetales	% de lípidos	% ac. pescado	Astaxantina (ppm)
30 43	D1	20-25	20-25	30	100	70
30 43	D2	20-25	20-25	30	80	70
30 43	D3	20-25	20-25	30	60	70
30 43	D4	20-25	20-25	30	40	70
30 43	D5 (control)	40-45	0	30	100	70
30 43	D6	40-45	0	30	80	70
30 43	D7	40-45	0	30	60	70
30 43	D8	40-45	0	30	40	70
II Etapa						
Formulación	Tratamiento	% de h. Pescado	% de h. vegetales	% de lípidos	% ac. pescado	Astaxantina (ppm)
30 40	D1	20-25	20-25	30	100	70
30 40	D2	20-25	20-25	30	80	70
30 40	D3	20-25	20-25	30	60	70
30 40	D4	20-25	20-25	30	40	70
30 40	D5 (control)	40-45	0	30	100	70
30 40	D6	40-45	0	30	80	70
30 40	D7	40-45	0	30	60	70
30 40	D8	40-45	0	30	40	70
III Etapa						
Formulación	Tratamiento	% de h. Pescado	% de h. vegetales	% de lípidos	% ac. pescado	Astaxantina (ppm)
35 38	D1	20-25	20-25	35	100	70
35 38	D2	20-25	20-25	35	80	70
35 38	D3	20-25	20-25	35	60	70
35 38	D4	20-25	20-25	35	40	70
35 38	D5 (control)	40-45	0	35	100	70
35 38	D6	40-45	0	35	80	70
35 38	D7	40-45	0	35	60	70
35 38	D8	40-45	0	35	40	70

3.2.2 Peces. Se dio inicio al ensayo el día 25 de marzo de 2002 donde 12.000 salmones del Atlántico con un peso promedio inicial de 100 gramos fueron mantenidos en una misma jaula hasta la duplicación de peso, luego del cual se distribuyeron a 24 jaulas de 7x7x7 m³ (500 peces por jaula) donde recibieron un mismo régimen alimenticio hasta la obtención de 400 gramos, dato que indicó que se diera inicio a la aplicación de los distintos tratamientos.

3.2.3 Características de los tratamientos. En base a las 24 jaulas, se formaron grupos triplicados de salmones los cuales fueron alimentados con 8 dietas distintas a partir de una misma formulación dependiendo la etapa de crecimiento en la que se encontraban los peces.

3.2.3.1 Primera etapa. Cada grupo triplicado de peces fue alimentado con una de las ocho dietas de la formulación 30/43 (CUADRO 2), la cual se caracteriza por diferir en la fuente de lípidos (30%) y en la fuente de proteína (43%). El peso inicial de los peces en esta etapa fue de 400 gramos y duró hasta la obtención de la duplicación del peso (800-900 gramos) en los peces pertenecientes al tratamiento o dieta control.

3.2.3.2 Segunda etapa. Cada grupo triplicado de peces fue alimentado con una de las ocho dietas de la formulación 30/40 (CUADRO 2), la cual se caracteriza por diferir en la fuente de lípidos (30%) y en la fuente de proteína (40%). El peso inicial en esta etapa para los peces fue de 800-900 gramos hasta la obtención de 1800-1900 gramos peso indicado por el tratamiento control.

3.2.3.3 Tercera etapa. Cada grupo triplicado de peces fue alimentado con una de las ocho dietas de la formulación 35/38 (CUADRO 2), la cual se caracteriza por diferir en la fuente de lípidos (35%) y en la fuente de proteína (38%), el peso inicial en la etapa fue de 1800-1900 gramos hasta la duplicación del peso de los peces pertenecientes al tratamiento control el cual fue de 3600-3700 gramos.

3.2.3.4 Frecuencia de muestreo. Cada etapa terminó en el momento en que el grupo triplicado, al cual se le aplicó el tratamiento testigo (45/100), alcanzó la duplicación de peso tomando como punto de partida el peso promedio de 400 gramos.

3.3 Metodología

La metodología aplicada fue realizada de igual forma en las tres etapas del ensayo.

3.3.1 Obtención de las muestras. De cada jaula se obtuvieron diez peces de forma aleatoria, los cuales fueron anestesiados, pesados, medidos, sacrificados por golpe y desangrados. Las muestras fueron individualizadas según dieta y jaula de su procedencia y se transportaron en bins con hielo y agua hacia la planta de proceso. Allí los peces fueron eviscerados, fileteados (división de la canal en dos hemicanales, desechando la cabeza y columna vertebral) hasta la condición de filetes TRIM E (filete sin piel, sin espinas, sin aletas dorsales y ventrales, rebaje en cola, en aleta ventral y espinal lateral dorsal y sin grasa peritoneal), envasados y congelados a -18°C .

3.3.2 Evaluación visual de color. Ésta fue realizada usando el abanico colorimétrico Salmofan Roche ® para salmonideos, la tarjeta de color posee una escala de tonalidades que está definida en el rango de 20 y 34, con un color rosa muy pálido para la tonalidad 20 hasta un color rojo profundo para la tonalidad 34. el cual incorpora más tonos en comparación con otras cartas de color para obtener una mejor comparación con los filetes de salmonideos.

La evaluación visual del color de los filetes descongelados se realizó bajo las mismas condiciones de iluminación artificial (luz fluorescente) y siempre por la misma persona. Un color favorable para competir en el mercado debe ser 15 o superior para el salmón del Atlántico.

3.3.3 Procesamiento de las muestras. Previamente descongelados los filetes, se homogeneizó una porción o steak de cada pez, la cual se obtiene cortando verticalmente a través del pescado en la zona que corresponde entre la aleta dorsal y la aleta anal, lo cual se denomina corte noruego.

3.3.4 Determinación de astaxantina. El procedimiento se realizó aplicando el método modificado de TORRISSEN *et al.* (1995) el cual consiste en extracciones sucesivas de astaxantina con acetona desde 0,5 gramos del steak homogeneizado de cada pez con ayuda de un disruptor en una cámara de extracción y filtrado al vacío. Posteriormente se determinó la concentración de pigmento mediante HPLC (modelo Merck Hitachi el cual consta de 5 módulos: interfase D -7000, autosampler L-7420, bomba cuaternaria L-7100, detector UV- VIS L-7420, horno columna L-7350). Las condiciones del análisis se muestran en el CUADRO 3:

CUADRO 3. Condiciones de funcionamiento del HPLC.

Fase móvil	
Metanol	60 %
Acetona	30 %
Agua	10 %
Precolumna	Merck Lichrocart 4-4 RP-18 5 µL porosidad
Columna	Merck Lichrocart 250-4 RP-18 5 µL porosidad
Lámpara	Wolfranio
Volumen de inyección	20µL
Presión	100 bar
Temperatura	30° C
Longitud de onda	473 nm
Flujo	1 mL/ min
Modo de inyección	Automático
Elución	Isocrática
Tiempo corrida	16 min

3.3.5 Análisis proximales. El laboratorio CETECSAL S.A. realizó a los alimentos proporcionados a los peces en las distintas etapas del ensayo los

siguientes análisis: acidez libre, índice de peróxido, índice de anisidina, totox, análisis de lípidos totales por el método de soxhlet e hidrólisis ácida, proteínas totales por método Kjeldahl, determinación de cenizas por gravimetría y contenido de astaxantina por HPLC.

3.4 Diseño experimental

En la FIGURA 3 se muestra la distribución de las dietas en las jaulas del centro de cultivo, que corresponde a un diseño multifactorial de dos factores categóricos (aceite de pescado con cuatro niveles y harina de pescado con dos niveles).

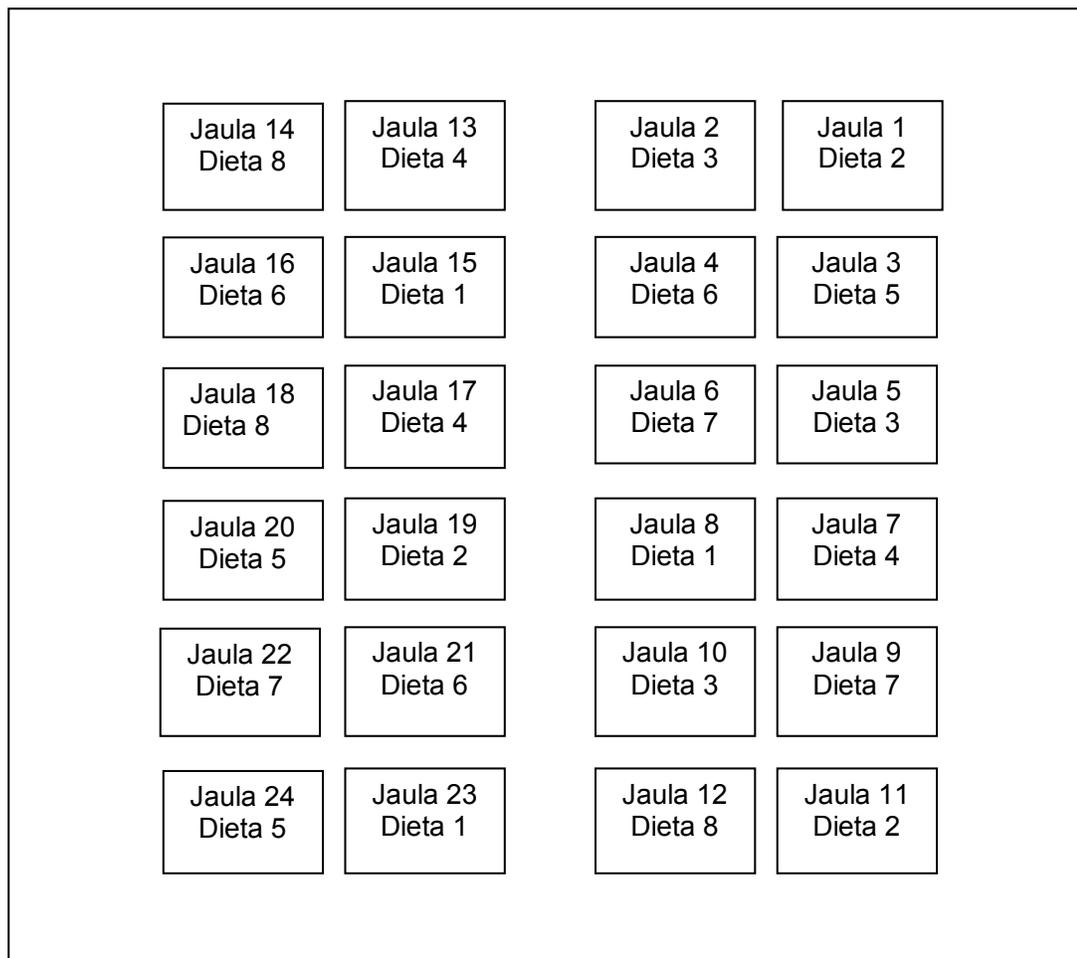


FIGURA 3. Diseño experimental propuesto.

3.5 Cálculos y análisis de resultados

El cálculo del porcentaje de retención de astaxantina entregada a la biomasa de peces se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Retención(\%)} = \frac{(A_f \times B_f) - (A_i \times B_i)}{A_p} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

A_f = astaxantina en músculo al final del periodo (mg/kg).

A_i = astaxantina en músculo al inicio del periodo (mg/kg).

A_p = astaxantina entregada en el periodo (de acuerdo a la cantidad de alimento entregado y concentración de pigmento (kg).

B_i = biomasa al inicio del periodo (peso promedio de los peces multiplicado por el número de individuos por jaula).

B_f = biomasa al final del periodo.

Los resultados de esta parte de la investigación fueron tratados estadísticamente mediante el programa Statgraphics Plus 5,0, análisis de varianza simple con un nivel de confianza de 95%. En caso de existir diferencias significativas ($P \leq 0,05$) se realizó el Test de Rango Múltiple de Tukey al 95% de confianza entre las dietas suplementadas con ingredientes vegetales y la dieta control (SPIEGEL, 1991).

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados presentados en este experimento corresponden al análisis de la estrategia de pigmentación en el periodo de mayor demanda de alimento en el ciclo productivo de los peces, el cual está demarcado por el traslado y adaptación al mar de los peces (smolt) hasta el inicio de la fase final donde se realiza el acondicionamiento de peso y color previo a la cosecha. Este periodo intermedio se subdividió en tres etapas determinadas por las necesidades nutricionales y energéticas de los peces, el cual correspondió en tiempo a 9 meses aproximadamente, en el cual se entregaron tres distintas formulaciones alimentarias.

4.1 Respuesta productiva

Los datos de respuesta productiva del ensayo para los distintos tratamientos, en cada una de las etapas, fueron muy coincidentes y no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) de acuerdo a lo informado por Cetecsal S.A. Es importante mencionar que los peces muestreados no presentaron evidencia de maduración sexual, ya que en caso de haber maduración sexual la pigmentación es extremadamente difícil debido a que el pigmento ingerido se deposita mayoritariamente en las gónadas.

4.2 Contenido de astaxantina en el alimento

El contenido de astaxantina fue determinado al final de cada etapa de alimentación. Las formulaciones de alimento 30/43, 30/40 y 35/38 tuvieron una concentración promedio de astaxantina de 60,7 ppm; 57,7 ppm y 67,2 ppm, respectivamente, no existiendo diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las

distintas dietas de cada etapa, sin afectar de este modo la realización del experimento.

Al observar los valores de concentración de astaxantina de las distintas dietas empleadas en cada una de las etapas en el estudio, éstas presentan variaciones con respecto al contenido de pigmento que debió estar incorporado en el alimento según la formulación. Estas diferencias son atribuibles a pérdidas durante el proceso de extrusión y peletizado; de hecho se estima que las pérdidas durante estos dos procesos pueden alcanzar del 5 a 10% del pigmento inicialmente incluido en cada una de estas etapas (HARDY *et al.*, 1994).

4.3 Contenido de astaxantina en músculo

En la FIGURA 4 se presentan las concentraciones promedio de astaxantina en músculo y su análisis estadístico, luego de que los peces fueran alimentados con las diferentes dietas en las etapas 1, 2 y 3. La concentración de astaxantina presenta un aumento al comparar los resultados al final del transcurso de las tres etapas lo cual se justifica que a medida del paso del tiempo de suministración de alimento incrementa el peso corporal, indicando que hay mayor cantidad de músculo que pigmentar; aumentando así la depositación de pigmento (SPRINGATE, 1991; NO y STOREBAKKEN, 1991).

En detalle, la etapa 1 no presentó diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las muestras obtenidas en jaula en relación a las distintas dietas entregadas, ni con respecto a los distintos niveles de inclusión de harinas y aceites vegetales y la interacción entre éstos. Entre sí las dietas presentaron pequeñas variaciones siendo las dietas con menores resultados las dietas 1 y 3 (2,78 y 2,62 mg/kg respectivamente) siendo alrededor de un 2 - 8% inferiores a la dieta 5 control (2,86 mg/kg), ambas dietas poseen la misma concentración de harina de pescado y 100% y 60% de aceite de pescado respectivamente. Las dietas que tuvieron mayor concentración de astaxantina fueron las dietas 2 y 8 con 3,27 y

3,30 mg/kg respectivamente, siendo aproximadamente un 10% superiores a la dieta 5 (dieta control) destacando por su composición de materias primas vegetales. La posible explicación a este leve aumento sería que las harinas vegetales presentes en los alimentos tienen compuestos antioxidantes que protegen al pigmento incorporado en las dietas de la oxidación existiendo mayor cantidad de pigmento disponible en el proceso de digestión y asimilación del pigmento en el pez (TORRISSEN *et al.*;1989, HARDY *et al.*,1989) ya que la molécula oxidada no se deposita, siendo directamente excretada (STOREBAKKEN y NO, 1992). Mayoritariamente los valores de astaxantina obtenidos no se encontraron dentro de lo esperado de acuerdo a lo comunicado por PONCE (2003)* y CHRISTIANSEN *et al.* (1991), ya que en esta etapa de crecimiento los peces deberían tener una concentración promedio de 4 mg/kg.

En la etapa 2, al igual que en la etapa 1, la inclusión de materias primas vegetales en las dietas experimentales para peces con relación a la dieta 5 (dieta control) no reflejó diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) en la concentración de astaxantina en el tejido muscular. Además, el análisis multifactorial demostró que no hubo interacción entre los factores en estudio, sin influir en la concentración de pigmento a favor o en contra de ésta.

Las concentraciones promedio de las dietas presentaron leves variaciones de astaxantina siendo las dietas con menores resultados la dieta 7 y 8 (4,55 y 4,53 mg/kg respectivamente) aproximadamente un 10 % menor a la dieta 5 (control) las cuales corresponden a las dietas con mayor porcentaje de harina de pescado y 60 y 40 % de aceite de pescado respectivamente. Las dietas de mejores resultados fueron las dietas 1 y 5 (dieta control) (4,88 y 5,11 mg/kg de astaxantina respectivamente) que corresponden a las dietas que poseen mayor porcentaje de aceites de pescado pero que varían en el porcentaje de harina de pescado, la dieta 1 a pesar de sus buenos resultados no superó a la dieta

* Comunicación personal. Jorge Ponce, Cetecsal S.A.

control (dieta 5) prediciendo, de acuerdo a estos resultados, que la utilización de materias primas de origen marino genera la obtención de buenos resultados en pigmentación.

Los valores obtenidos en esta segunda etapa de crecimiento no se encontraron dentro de lo esperado de acuerdo a lo informado por PONCE (2003)* y CHRISTIANSEN *et al.* (1991) ya que estos deberían estar mayoritariamente en el rango de 6 mg/kg.

Los resultados de pigmentación en la etapa 3 no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los salmones alimentados con las distintas dietas, por lo cual los porcentajes de harina y aceite de pescado y la posible interacción entre éstos no influenciaron el contenido de astaxantina en musculatura de los peces, ratificando los resultados obtenidos en las etapas anteriores.

En esta etapa productiva las dietas con menores resultados fueron las dietas 2 y 8 (6,54 y 6,35 mg/kg respectivamente) que presentaron valores levemente inferiores (entre 4 - 5% menos) a la dieta 5 (control). Las dietas 5 (control) y 6 con una concentración de astaxantina de 6,87 y 7,21 mg/kg respectivamente fueron las que presentaron mejores resultados siendo la dieta 6 un 4,7% superior a la dieta control destacándose por poseer un alto contenido de aceites vegetales. Las concentraciones de astaxantina en esta etapa del estudio se encontraron dentro de lo esperado ya que las concentraciones están dentro del rango de los 6-8 mg/kg según lo informado por STOREBAKKEN y NO, (1992) en estudios realizados anteriormente.

Al momento de la cosecha se ha estimado que la concentración de astaxantina en músculo debe ser de 8 mg/kg o superior (ALMENDRAS y SABELLE, 1999) para que asegure una coloración adecuada, lo cual en este estudio se logró con

* Comunicación personal. Jorge Ponce. Cetecsal S.A.

la estrategia de pigmentación aplicada en la fase final (siguiente a la tercera etapa de este estudio) que tuvo una duración de alrededor de 40 días donde los peces fueron alimentados con una dieta normal de recuperación en base a aceite de pescado y un alto contenido de astaxantina que fue superior al suministrado en las dietas experimentales para que los peces restantes alcanzaran el peso y color comercial deseado por el mercado de destino.

Se ha observado que la concentración de pigmento esta influenciada por el contenido de lípidos de la dieta debido probablemente a un aumento en la absorción intestinal (EINEN y ROEM, 1997; NICKELL y BROMAGE, 1998), sin embargo, la fuente del aceite y la composición de ácidos grasos pueden aclarar las discrepancias con respecto al tema. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la concentración de astaxantina no se ve influenciada por la sustitución parcial de aceites de origen vegetal en el alimento ni la interacción entre los porcentajes de harina y aceite de pescado, ya que tanto en la primera como segunda y tercera etapa, las concentraciones de astaxantina de las muestras analizadas no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$), observándose que los tratamientos con incorporación de lípidos de origen vegetal produjeron resultados similares al tratamiento control (dieta 5), coincidiendo con lo concluido en los estudios realizados por CHRISTIANSEN *et al.* (1991) y HARDY *et al.* (1987).

Sin embargo, BJERKENG *et al.*(1999) indica que el uso de diferentes aceites puede afectar la utilización de astaxantina en salmón del atlántico, pero no hay suficiente información sobre los factores que están involucrados en este proceso. Uno de los mayores obstáculos en la eficiente utilización pueden estar relacionados quizás con la matriz gelatinosa y la incorporación a los micelios mezclados del pigmento en el alimento. La importancia de la liberación de los carotenoides desde la matriz de alimento y los factores que influyen en la absorción están siendo recientemente estudiados.

SARGENT (1999) al observar el efecto negativo del empleo de materias primas vegetales, menciona que al complementar las dietas con aceites de origen vegetal se produce un cambio en la relación de EPA y DHA, en la cantidad de ácidos grasos ω -3 y la relación ω -6/ ω -3, además de la composición lipídica de los peces teniendo como referencia los porcentajes máximos de inclusión. Debido a que como los aceites vegetales poseen mayor cantidad de ácidos grasos ω -6, la pigmentación tendría como efecto una reducción en el depósito de carotenoides debido que los pigmentos tendrían una mayor afinidad a los ácidos grasos ω -3.

En relación al empleo de harinas de origen vegetal, aún no se conoce un efecto significativo en pigmentación. A la hora de incorporarlo en alimentación acuícola se debe tener en cuenta principalmente el aspecto nutricional, puesto que aportan una muy pequeña gama de aminoácidos y pueden desarrollar micotoxinas (AKIYAMA 1992).

Desde el punto de vista de la concentración de astaxantina en el tejido muscular de los peces no se observa incidencia en el empleo de sustancias de origen vegetal para la entrega de proteínas y lípidos en la nutrición acuícola, por lo que habría que considerar otros factores como el efecto en la salud, tasas de conversión de alimento, aspectos inmunológicos como resistencia a enfermedades y posibles cambios en atributos sensoriales de los peces especialmente el sabor; para así comparar la eficacia de su empleo con respecto a la harina y aceite de pescado (BJERKENG *et al.*;1997).

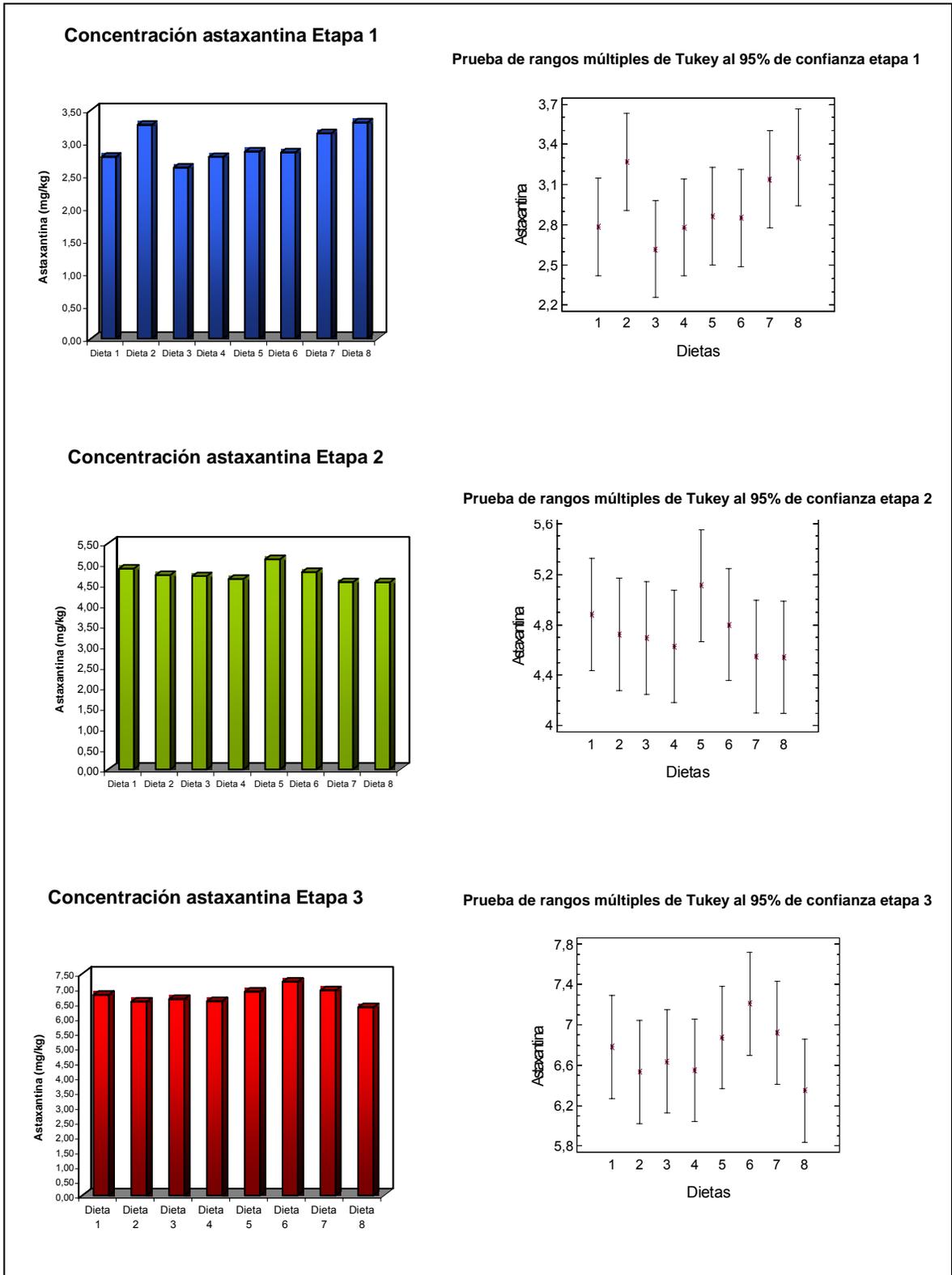


FIGURA 4. Concentración de astaxantina y análisis de Tukey en las diferentes etapas.

4.4 Retención de pigmento

En la FIGURA 5 se presentan los porcentajes de retención de pigmento en los peces posterior a su alimentación con las dietas experimentales desarrolladas para las diferentes etapas del experimento.

En la etapa 1, los porcentajes de retención no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) ni la interacción entre los factores porcentaje de harina y aceite de pescado. Se ve que los porcentajes de retención poseen leves variaciones siendo las dietas que presentaron menor porcentaje de retención en relación a la dieta control (dieta 5) las dietas 3 y 4 con 7,49% y 7,51% respectivamente, las cuales corresponden a las dietas con mayor porcentaje de harinas vegetales.

La dieta que tuvo mayor retención fue la dieta 8 con un valor de 9,8% la cual corresponde a la dieta que posee mayor porcentaje de harina de pescado (40-45%) y mayor nivel de aceite vegetal (60%), observándose un leve efecto positivo por la incorporación de materias primas de origen vegetal.

En la etapa 2, se produjo una variación con respecto a la etapa 1, ya que aún cuando el análisis estadístico global mostrado en la FIGURA 5 no muestra diferencias significativas, los porcentajes de retención de las dietas presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en relación al nivel de aceite incorporado, siendo las dietas con menor porcentaje de inclusión de aceites vegetales las que presentaron mayor retención. Las dietas que presentaron mayor porcentaje de retención son la dieta 1 (10,39%) y dieta 5 (control) con un valor de 10,75% que corresponden a las dietas que no poseen aceites vegetales. La dieta que produjo menor retención fue la dieta que contiene 40% de aceites vegetales la cual corresponde a la dieta 7 con una retención promedio de 8,07%.

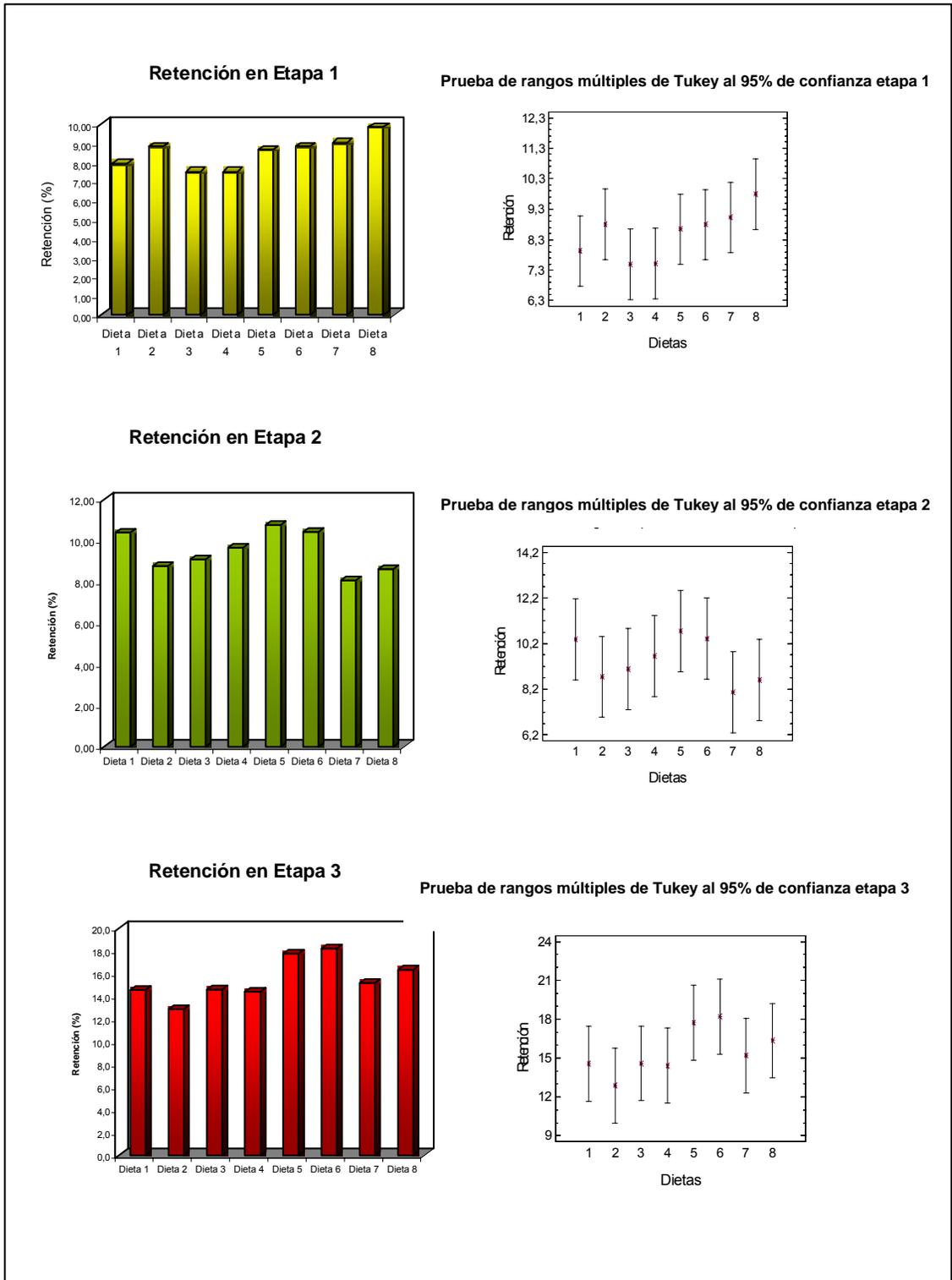


FIGURA 5. Retención de astaxantina y análisis de Tukey en las distintas etapas.

En la última etapa, los porcentajes de retención obtenidos, no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) con respecto a los porcentajes de harina y aceite de pescado.

En esta etapa la dieta que presentó mayor porcentaje de retención corresponde a la dieta 6 (18,2%) que corresponde a la dieta que no posee harinas vegetales y 20% de aceites vegetales. Y la de menor porcentaje es la dieta 2 que contiene harinas vegetales y 20% de aceites vegetales.

Los valores de retención encontrados en el periodo productivo para salmónidos se encuentran en el rango de 1-18% de los carotenoides entregados en la dieta de acuerdo a lo reportado por TORRISSEN *et al.*, (1989), lo cual se corrobora en esta experiencia. Sin embargo NICKELL y BROMAGE (1997), señalan que estos valores pueden ser aún mayores llegando a cifras cercanas al 30%.

Al usar concentraciones altas de pigmento se observa que el porcentaje de retención es inversamente proporcional a la concentración de pigmentos. Por lo tanto, se puede aumentar la tasa de retención al modificar el contenido de pigmentos en la dieta (FOSS *et al.*, 1984). La disminución en el depósito muscular puede ser explicado porque la digestibilidad de los carotenoides disminuye a mayores concentraciones de ellos, por una limitada tasa de absorción, transporte, distribución a los tejidos, a una limitación en la capacidad de unión al músculo (BJERKENG *et al.*; 1992; STOREBAKKEN y CHOUBERT, 1991; CHOUBERT y STOREBAKKEN, 1996).

Como se vió en la etapa 1 y 3 no se observa ningún efecto en la retención de pigmento indicando que los pigmentos son indiferentes a la fuente de aceites y harinas vegetales. Sin embargo, en la etapa 2, al comparar los resultados se manifiestan diferencias estadísticamente significativas, existiendo un menor porcentaje de retención en las dietas que poseen mayor incorporación de

aceites vegetales independiente de la cantidad de harinas vegetales incluidas, lo cual por ser la astaxantina liposoluble debe tener mayor afinidad con un tipo de ácido graso que no se encontraría presente o en menor cantidad en los aceites vegetales, especialmente los ω -3, los cuales tienen menor concentración en este tipo de aceites, los cuales en algunas especies de peces por encontrarse en mayor concentración en el alimento son responsables del síndrome de mal pigmentación (SARGENT *et al.*, 1999).

El motivo en especial para explicar la diferencia de resultados entre las etapas puede ser causado por las diferencias en las fuentes de aceite utilizados para elaborar el alimento de los peces.

4.5 Coloración evaluada por abanico colorimétrico Salmofan de Roche

En la FIGURA 6 se presentan los valores de color promedio de músculo obtenidos luego de que los peces fueran alimentados con las diferentes dietas en la etapa 1, en la cual no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en el color de las muestras obtenidas en jaula con respecto a los distintos niveles de inclusión de harinas y aceites vegetales y la interacción entre éstos. Las dietas que presentaron menores resultados de color fueron las dietas 2 y 3 con valores promedio de 21,0 de acuerdo a la escala del abanico Salmofan.

En la etapa 2, al igual que en la etapa 1, las concentraciones promedio de astaxantina en las dietas suministradas, no presentaron diferencias significativas en el color medido en músculo por comparación con el abanico colorimétrico Salmofan de las muestras obtenidas de jaula con respecto a la inclusión de harinas y aceites vegetales y la interacción entre éstos.

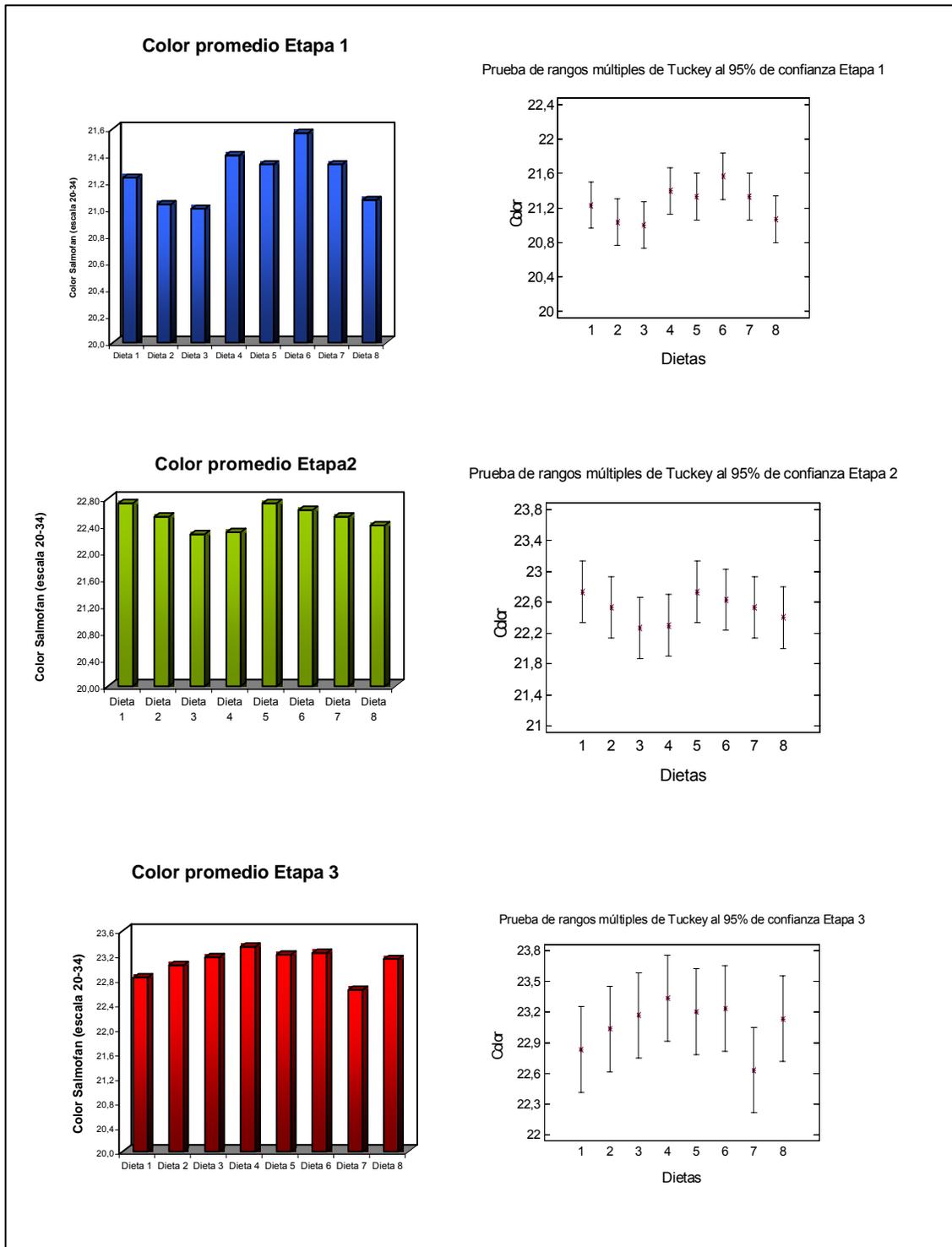


FIGURA 6. Color promedio y análisis de Tukey en las distintas etapas.

La coloración promedio obtenida por las diferentes dietas suministradas en la musculatura de los peces presentó leves diferencias siendo, la dieta con menor resultado fue la dieta 3 (22,27) y la de mejor resultado fue la dieta 5 que corresponde a la dieta control sin inclusión de harinas y aceites vegetales.

En la etapa 3 (FIGURA 6), al igual que en las etapas anteriores, la coloración determinada por comparación con el abanico Salmofan no presentó diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en relación a la inclusión de harinas y aceites vegetales y la interacción entre estos ingredientes.

En esta etapa la dieta que presentó menor promedio de color de acuerdo al abanico Salmofan fue la dieta 7 con un valor de 22,63 que se compone mayoritariamente de harina de pescado (40-45%) y 60% de aceite de pescado. La dieta de mejor resultado con un valor promedio de 23,33 correspondió a la dieta 4 que esta compuesta por 20-25% de harina de pescado y 40% de aceite de pescado.

Al comparar los datos al final de cada etapa no se observan grandes variaciones en la coloración entre etapa y etapa del ciclo productivo, observándose variaciones de menos de un tono de acuerdo a los valores del abanico colorimétrico Salmofan.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el color no se ve influenciado por la sustitución parcial de aceites y harinas de origen vegetal en el alimento ni la interacción entre estos, ya que tanto en la primera, como segunda y tercera etapa las concentraciones de astaxantina de las muestras analizadas no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$), observándose que los tratamientos con incorporación de lípidos de origen vegetal produjeron resultados similares al tratamiento control (dieta 5) coincidiendo con lo concluido en los estudios realizados por ROSENLUND *et al.* (2001). Sin

embargo, al final de la tercera etapa, que corresponde al inicio de la estrategia de pigmentación, la brecha entre el color obtenido y exigido comercialmente para la especie (26 de acuerdo a este abanico colorimétrico) es alta en relación a los niveles de pigmento obtenidos en el estudio y los que indican una buena coloración.

Una buena pigmentación no permite por sí sola, asegurar una adecuada coloración, puesto que existen varios factores que pueden interferir en la percepción visual de la coloración de los filetes (CHRISTIANSEN *et al.*, 1995) uno de ellos es el contenido de grasas en el tejido conectivo (entre los miómeros); en este estudio los peces se alimentaron con dietas de igual contenido lipídico y no se determinó el contenido lipídico de los filetes como parte del estudio.

El desarrollo de una estrategia de pigmentación óptima se obtiene logrando una eficiente utilización de la astaxantina presente en el alimento que se traduzca en una coloración que satisfaga las exigencias comerciales de los filetes de salmón del Atlántico.

5 CONCLUSIONES

- La sustitución de fuentes tradicionales por materias primas vegetales en dietas para salmón del Atlántico no presentó diferencias en la concentración de pigmento y el grado de coloración de los peces en las distintas etapas de evaluación.
- La coloración obtenida con la entrega de las distintas dietas se enmarcó dentro de los requerimientos exigidos para salmones del Atlántico en las distintas etapas de crecimiento de acuerdo al peso obtenido.
- La retención de astaxantina en las etapas 1 y 3 no presentaron diferencias, en cambio en la etapa 2 se observó efectos negativos con respecto al nivel de aceites vegetales incorporados, debido a la menor cantidad de ω -3 presentes en el alimento los cuales se reflejan en la composición muscular de los peces disminuyendo la absorción y depositación de astaxantina.
- Los resultados obtenidos permiten considerar la aplicación de materias primas vegetales en gran escala para la producción de alimento para peces sin afectar las características de coloración y pigmentación, previa evaluación de disponibilidad y costos de las materia primas.

6 RESUMEN

El objetivo de este experimento fue evaluar el grado de pigmentación y retención de astaxantina y coloración de salmón del atlántico en tres estados fisiológicos del pez que corresponden a los de mayor requerimiento de alimento frente al empleo, como complemento, de aceites y harinas vegetales en sus dietas, las cuales contenían similar concentración de astaxantina (70 ppm), para ello se formaron grupos triplicados en 24 jaulas cúbicas de 343 m³, con 500 peces cada una, con un peso inicial promedio de 100 gramos a los cuales se les asignó al azar ocho distintos tratamientos. El grado de coloración se evaluó con la Carta de Salmofan de Roche y la concentración de pigmento en el filete se midió utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los grupos de peces no presentaron diferencias significativas con respecto a la inclusión de harinas y aceites vegetales ni la interacción entre estos en el contenido de astaxantina y coloración. Sin embargo la retención en una de las tres etapas productivas presentó diferencias significativas influenciada por la cantidad de aceites vegetales presentes en el alimento.

SUMARY

The objective of this experiment was the evaluation retention and of the astaxanthin pigmentation of the Atlantic salmon muscle coloration in three physiological state that have major requeriment ish fed related to the use of plant meal and oil as fish diet complement assuming diets contain similar astaxanthin level (70 ppm). The experiment was performed in triplicate groups, in 24 cages of 343 cubic meters, with 500 fishes each, with and average of 100 g initial weight to which 8 treatments were randomly assigned. The coloration level was evaluated by Roche Salmofan Card and the pigment content was measured by HPLC.

The 8 groups of fishes did not present statical significant differences respect to the inclusion of plant meal or oil, neither respect the interaction of both with the astaxanthin content or coloration. However, the retention in one of the three stages presented significant differences influenced by the plant oil present in feed.

7 BIBLIOGRAFÍA

- ABDUL-MALAK, N.; ZWINGELSTEIN, G.; JOUANNETEAU, J. y KOENIG, J. 1975. Influence de certains facteurs nutritionnels sur la pigmentation de la truite arc-en-ciel par la canthaxanthine. Ann. Nutr. Aliment., 29, 459-463.
- ACHURRA, M. 1996. Salmones: Una experiencia exitosa de exportación. Chile pesquero. 91: 28-33.
- AKIYAMA, D. 1988. Soybean meal utilization by marine Shrimp. In Proc. of AOCS World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs. Singapore. October 2-7, 1988. 29p.
- AKIYAMA, D. 1992. Utilización de la pasta de soya en los alimentos acuícolas. ASA/México A.N. No. 108 1a reimpresión. 20p.
- AKIYAMA, D. y POLANCO, B. 1995. Manejo de granjas en cultivo semi-intensivo de camarones. Manual Técnico. Asociación Americana de soya. Venezuela. 30p.
- AL-KALIFA, A.S. y SIMPSON, K.L. 1988. Metabolism of astaxanthin in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 91B (3): 563-568.
- ALMENDRAS, F. y SABELLE, M. 1999 Guía práctica: Uso de pigmentos en salmonídeos bajo condiciones comerciales. Productos Roche Ltda. 97 p.

- ANDREWES, A.G.; PHAFF, M.P. y STARR, M.P. 1986. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma* a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15: 1003-1007.
- BAKER, R.T.; PFEIFFER, A.M.; SCHÖNER, F.J. y SMITH-LEMMON, L. 2002. Pigmentating efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Animal Feed Science and Technology*. 99: 97-106.
- BELL, J.G.; MC-EVOY, J.; WEBSTER, J.L.; MC-GHEE, F. MILLAR, R.M. y SARGENT, J.R. 1998. Flesh lipid composition of scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal Agriculture Food Chemistry*. 46:119 - 127.
- BIRD J.N. y SAVAGE G.P. 1990. Carotenoid pigmentation in aquaculture. *Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand* vol15:45-56.
- BJERKENG, B.; HATLEN B. Y 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.
- BJERKENG, B. 2000. Carotenoid pigmentation of salmonid fishes – recent progress. *Avances en nutrición acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. 71-89.
- BJERKENG, B.; HATLEN, B. y GUANTE, 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.

- BJERKENG, B.; REFSTIE,S.; FJALESTAD, K.T.; STORENBAKKEN, T.y
RODBOTTEN, M. y ROEM, A. 1997. Quality parameters of the flesh of
Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full –
fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet.
Aquaculture. 157: 297 – 309.
- BJERKENG, B.; STORENBAKKEN, T. y LIAAEN-JENSEN, S. 1992.
Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation.
Aquaculture. 108: 333 - 346.
- BRAVO, I.E. 2000. Evaluación de la pigmentación de trucha arco iris
(*Oncorhynchus mikiss*) en respuesta a la incorporación de dos niveles de
astaxantina a la dieta de crecimiento-engorda. Memoria de título.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.
Santiago, Chile.
- CAMPABADAL, C.; CELIS, A. 2000. Factores que afectan la calidad de los
alimentos acuícolas. Avances en nutrición acuícola. Memorias del V
Simposium Internacional de Nutrición acuícola. 19-22 Noviembre, 2000.
Mérida, Yucatán. 523-540.
- CASTRO, E. 1992. Métodos de evaluación y certificación de pigmentación para
la industria salmonera. V International Symposium on Fish Nutrition and
Feeding. Fundación Chile. Santiago, Chile.
- CASTRO, E. 1993. Evaluación de pigmentos carotenoides. Aquanoticias. Abril,
4-7.
- CHILE, BANCO CENTRAL. 2002. 77ª Memoria Anual. 105 p.

- CHILE, FUNDACIÓN CHILE. 2003. La actividad salmonera actual y sus proyecciones a futuro. Informativo. Junio/octubre. 56 p.
- CHILE, PROCHILE. 2003. Perfil del mercado de los productos del mar en Estados Unidos.
- CHOUBERT, G.; BLANC, J.M y COURVALIN, C. 1992. Muscle carotenoid content and colour of farmed rainbow trout fed astaxanthin or canthaxanthin as affected by cooking and smoked-curing procedures. International Journal Of Food Science and Technology. Vol 27 (3): 277-284.
- CHOUBERT, G. 1992. Pigmentation of the salmonidae: dynamics and factors of variation. Productions – animales. 5:4, 235 – 246.
- CHOUBERT, G. 1981. Carotenoids and fish pigmentation. Nutrition des Poyssions. 283-295.
- CHOUBERT, G. y LUQUET, P. 1993. Utilisation of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) pigmentation: influence of fat content of the diet. Aquaculture 32, 19-26.
- CHOUBERT, G.; MILICUA, J.C. y GOMEZ, R. 1994. The transport of astaxanthin in mature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* serum. Comp. Biochem. Physiol Vol 108A (2/3): 245-248.
- CHOUBERT, G. y STOREBAKKEN, T. 1996. Digestibility of astaxanthin and canthaxanthin in rainbow trout as affected by dietary concentration, feeding rate and water salinity. Annales de Zootechnie 45: (5), 445-453.

- CHRISTIANSEN, J.S. y WALLACE, J.C. 1988. Deposition of canthaxanthin and muscle lipid in size groups of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L). *Aquaculture*. 69: 69 – 78.
- CHRISTIANSEN, R. y TORRISSEN, O.J. 1994. Translation of biological functions of astaxanthin in salmon. Norwegian Institute of Marine Research Center for Aquaculture Matre Research Station. 18 p.
- CHRISTIANSEN, R. y TORRISSEN, O.J. 1996. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed different dietary levels of astaxanthin. Juveniles. *Aquaculture Nutrition* vol.2 (1): 55-62.
- CHRISTIANSEN, R; STRUKSNAES, G.; ESTERMANN, R. y TORRISSEN, O.J. 1995. Assessment of flesh colour in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research*. 26: 311-321.
- CHRISTIANSEN, R.; TORRISSEN, O.J.; STRUKSNAES, G. y ESTERMANN, R. 1991. Flesh color assessments of salmonids. 4th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Biarritz, France, 24-27 June.
- EINEN, O y ROEM, A.J. 1997. Dietary protein/energy ratios for Atlantic salmon in relation to fish size: growth, feed utilization and slaughter quality. *Aquaculture Nutrition*. 3, 115 - 126.
- FENNEMA, O. 1993. *Química de los Alimentos*. 2^{da} edición Ed. Acribia S.A. España. pp 108 - 109.
- FOSS, P.; STOREBAKKEN, T.; AUSTRENG, E. y 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.

FOSS, P.; STORENBAKKEN, T.; SCHIEDT, K.; LIAAEN-JENSEN, S. AUSTRENG, E. y STREIFF, K. 1984. Carotenoids in diets for salmonids. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture* 41: 213-226.

GOBANTES, I.; CHOUBERT, G. y GOMEZ, R. 1998. Quality of pigmented (astaxanthin and canthaxanthin) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal Agriculture Food Chemistry*. 46, 4358-4362.

GROSS, J. y BUDOWSKI, P. 1966 Conversion of carotenoids into vitamin A₁ y A₂ in two species of freshwater fish. *Biochemical Journal* 101: 747-754.

HARDY, R.; CASTRO, E. y CAPDEVILLE, A. 1994. Pigmentations of salmonids: sources, retention, programs and regulations. Documento técnico Fundación Chile. Santiago, Chile. 19 pp.

HARDY, R., SCOTT, T. y HARRELL, L. 1989. 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.

HARDY, R. 1988. Pigmentation and unconventional feed ingredients for fish feed. National Marine Fisheries Service, NOAA. Northwest and Alaska Fisheries Center. University of Washington, EE.UU.

HARDY, R.; SCOTT, T.M. y 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.

- JAUNCEY, K. y ROSS, B. 1982. A guide to tilapia feeds and feeding. Institute of Aquaculture. University of Stirling. Scotland. 111p.
- JENSEN, C.; BIRK, E. JOKUMSEN, A. SKIBSTED, L.H. y BERTELSEN, G. 1998. Effect of dietary levels of fat, α -tocopherol and astaxanthin on colour and lipid oxidation during storage of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and during cill storage of smoked trout Z. Lebensmitt. Unters. Forsch. 207, 189-196.
- JOHNSON, E.A. 1989. A pigment source in salmonids feed. Feed management. 40 (12): 18-21.
- KHARE, A.; MOSS, G.P.; WEDDON, B.C.L. y MATTHEWS, A.D. 1973. Identification of astaxanthin in scottish salmon. comp.. Biochem. Physiol. Vol 45 B: 971-973.
- LARRAIN,C., 2002. Alternativas de pigmentación: nuevos antecedentes. Salmonicultura. 4: 27, 78-79.
- LAWRENCE, A.L.; CASTILLO, F.L.; STURMER L.N.; y AKIYAMA, D. 1986. Respuesta nutricional de los camarones marinos a diferentes niveles de harina de soya integral en alimentos balanceados. Conferencia de Negocios Conjuntos del X Aniversario del Consejo Económico del USA-ROC-USA, Taipei, Taiwan. 18p.
- LIM, C.; DOMINY, W. 1989. Utilization of plant proteins by warmwater fish. ASA Technical Bull. Vol. 3 AQ 15. Singapore. 12p.

- LIM, C. y DOMINY, W. 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 87:53-63.
- LOWELL, R.T. 1984. Use of soybean products in diets for aquaculture species. *ASA Animal Nutrition Research Highlines. Special Edition*. 6p.
- MARCH, B.E.; HAJEN, W.E.; DEACON, G.; MACMILLAN, C. y WALSH, M. 1990. Intestinal absorption of astaxanthin, plasma astaxanthin concentration body weight and metabolic rate as determinants of flesh pigmentation in salmonid fish. *Aquaculture*. 90: (3-4), 313 - 322.
- MARKOVITS, A. 1991. Adonis : potencial fuente vegetal de astaxantina. *Alimentos* 16 (5): 49.
- Mc CALLUM, I.M., CHENG, K.M. y MARCH, B.E. 1987. Carotenoid pigmentation in two strains of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their crosses. *Aquaculture*. 67, 291 – 300.
- NICKELL, D.C. y BROMAGE, N.R. 1997. Problems of pigmentation: lipids and maturation. Institute of Aquaculture, University of Stirling FK9 4LA. 20 pp.
- NICKELL, D.C. y 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. 1992. Pigmentation of rainbow trout with astaxanthin and canthaxanthin in freshwater and saltwater. *Aquaculture*. 101: (1-2), 123 - 134.

- NO, H.K. y STOREBAKKEN, T. 1991. Color stability of rainbow trout fillets during frozen storage. *Journal Food Science*. 56: (969 – 972), 984.
- OLSON, J.A. 1993. Absorption, transport and metabolism of carotenoids in humans. 10th Int. Symp. Carotenoids, Trondheim, 20-25 June 1993.
- PUTNAM, M. 1991. A review of the nature, function, variability, and supply of pigments in salmonid fish. *Aquaculture and the environment*. 16: 245-263.
- REFSGAARD, H.H.F.; BROCKHOFF, P.B. y JENSEN, B. 1998. Biological variation of lipid constituents and distribution of tocopherols and astaxanthin in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal Agriculture Food Chemistry*. 46: 808 –812.
- RODRIGUEZ- AMAYA, D., 1997. Carotenoides y Preparación de Alimentos: La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos. Campinas, Brasil. 105 pp.
- ROSENLUND, G., OBACH, A., SANDBERG, M.G., STANDAL, H. y TVEIT, K. 2001. Effect of alternative lipid sources on long – term growth performance and quality of atlantic salmon (*Salmo salar L*). *Aquaculture Research*. 32 (1):323-328.
- SARGENT, J., MC EVOY, L., ESTEVEZ, A., BELL, G., BELL, M., HENDERSON, J. y TOCHER, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*. 179, 217-229.

- SCHIEDT, K. 1998. Absorption and metabolism of carotenoids in birds, fish and crustaceans. pp 285 –358.
- SCHIEDT, K. BISCHOF, S. y GLINZ. E. 1995. Isolation of astaxanthin and its metabolites from skin of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Carotenoids. 1A: 243-253.
- SCHIEDT, K.; VECCHI, M. y GLINZ, E. 1986. Astaxanthin and its metabolites in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Comp. Biochem. Physiol. Vol 83B (1): 9-12.
- SCHIEDT, K.; LEUENBERGER, F.J.; VECCHI, M.y GLINZ, E. 1985. Absortion, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chiken. Pure and Appl.Chem.; vol 57 (5): 685-692.
- SCHIEDT, K.; LEUENBERGER, F.J. y VECCHI, M. 1981. Natural occurrence of enantiomeric and meso- Astaxanthin 5. Ex wild salmon (salmo salar and Oncorhynchus). Helvetica Chimica Acta Vol. 64 Fasc. 2 (44): 449-457.
- SHAHIDI, F.; METUSALACH, A y BROWN, J.A. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. Crit. Rev. Food Sci. 38, 1 – 67.
- SINNOT, R. 1989. keep them in the pink to stay competitive. Fish farmer 12 (5): 23-26.
- SKREDE, D.I. y STOREBAKKEN, T. 1986. Characteristics of color in raw, baked and smoked wild and pen-reared Atlantic Salmon. Journal of Food Science. 51, 804-808.

- SPIEGEL, M. 1991. Estadística. Ed. McGraw-Hill / Interamericana de España. S.A. España. 556p.
- SPRINGATE, G. 1991. Feed formulation and on-farm management. *Aquaculture*. 104:52-56.
- STOREBAKKEN, T.; NO, H.K. 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*. 100: (1-3), 209-229.
- STOREBAKKEN, T. y CHOUBERT, G. 1991. Flesh pigmentation of rainbow trout feed astaxanthin or canthaxanthin at different feeding rates in freshwater and saltwater. *Aquaculture*. 95: 289-295.
- TANAKA, Y.,MAATSUGUCHI, H., KATAYAMA, T., SIMPSON, K.L. y CHICHESTER, C.O. 1986. The biosíntesis of astaxanthin – XVI. The carotenoids in crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 54B: 391-393.
- TIBALDI, E.; BALLESTRAZZI, R. 1990. Influenza del tenore di astaxantina e del livello lipidico della dieta sulla salmonatura della trota iridea. *Zootecn.Nutr.Anim.* 16, 127-135.
- TORRISSEN, O.J. y CHRISTIANSEN R.,1997. Effects of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 153: (1-2), 51- 62.
- TORRISSEN, O.J. y CHRISTIANSEN,R. 1995. Requirements for carotenoids in fish diets. *Journal of Applied Ichthyology*. 11: (3-4), 225-230.
- TORRISSEN, O.J, CHRISTIANSEN R., STRUKSNAES, G. y ESTERMANN, R., 1995. Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon *Salmo salar*

in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period. *Aquaculture Nutrition*. 1:77 – 84.

TORRISSEN, O.J. 1985. Pigmentation of salmonids: factors affecting carotenoid deposition in rainbow trout. *Aquaculture*. 46:133 – 142.

TORRISSEN, O.J. 1986. Pigmentation of salmonids: a comparison of astaxanthin and canthaxanthin as pigment sources for rainbow trout. *Aquaculture* 53: 271-278.

TORRISSEN, O.J.; HARDY, R.W. y SHEARER, K.D. 1989. Pigmentation of salmonids carotenoid deposition and metabolism. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1: 209-225.

TORRISSEN, O.J.; HARDY, R.W.; SHEARER, K.D.; SCOTT, T.M. y STONE, F.E. 1990. Effects of dietary canthaxanthin level and lipid level on apparent digestibility coefficients for canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 88: 351-362.

TORRISSEN, O.J. y INGEBRIGTSEN, K. 1992. Tissue distribution of ¹⁴C-astaxanthin in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 108:381-386.

TORRISSEN, O.J, CHRISTIANSEN R., STRUKSNAES, G. y ESTERMANN, R., 1995. Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon *Salmo salar* in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period. *Aquaculture Nutrition*. 1:77 – 84.

VIDAL, L. 2003. Las preferencias de los consumidores de salmón. *Salmónicultura*. 17: 33-36

WEBER, S. 1990 Determination of added stabilized astaxanthin in fish feeds and premixes with HPLC. Ed. H.E. S  ller. Analytical methods for vitamins and carotenoids in feed. Revisrd Supplement. Roche-PUBLICATION. Index N   2264. pp. 59-61.

WURMANN, C. 1997. Alimentos para peces: se ajusta el mercado. Aquanoticias. Julio, 7-25.