

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS**

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“EVALUACION DEL EFECTO PIGMENTANTE Y NUTRICIONAL DEL
Haematococcus pluvialis COMO BIOAGENTE APLICADO EN LA DIETA DE
TRUCHAS EN EL CRIADERO C.E.D.E.PEZ PUNO 2014”**

**Trabajo de tesis presentado por la
bachiller:**

Solania Leidy Maquera Benavente

**Para optar el Título Profesional de
Químico Farmacéutica**

Asesor:

José A. Villanueva Salas, PhD

AREQUIPA – PERÚ

2015

DEDICATORIA

A:

Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mi abuelo Juan Benavente Aviles (QEPD) por ser el ejemplo para salir adelante, por sus sabios consejos impartidos durante toda su vida. Esta tesis es el resultado de lo que nos has enseñado en la vida, ya que siempre has sido una persona honesta, entregada a tu trabajo, y un gran líder, pero más que todo eso, una gran persona que siempre ha podido salir adelante y ser triunfador.

Mi abuela Alejandrina Llanos Mamani (QEPD), por ser mi ejemplo para seguir adelante en el convivir diario, gracias por tu paciencia, por enseñarme el camino de la vida, gracias por tus consejos, por el amor que me has dado y gracias por eso y por mucho más.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de Tesis, Dr. José A. Villanueva Salas, gracias por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigadora.

A todas las personas del laboratorio de investigación del proyecto Mercurio, por su atención y amabilidad en todo lo referente a la realización de mi tesis. Especialmente a la Mg. Janeth Medina, por sus consejos, su paciencia, su apoyo y ánimos que me brindo. Asimismo agradezco al Mg. Stamber Revilla por su visión crítica de muchos aspectos en la realización de esta investigación

Al Centro de desarrollo pesquero CEDEPES – Puno, mis agradecimientos a mi tío Hipolito y Osbalda, por haberme apoyado en la crianza de las truchas.

A mis padres Emilio y Sabina, porque creyeron en mí, para sacarme adelante dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada una de mis metas, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen. Porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

Y por último, pero no menos importante, estaré agradecida a mis dos amigas Leidy y Fiorella porque siempre estuvieron ahí para apoyarme y dándome ánimos para culminación de esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	9
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	10
1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	10
1.1. Etimología	10
1.2. Ciclo vital	11
1.3. Características físicas	13
1.4. Composición	13
2. ASTAXANTINA	14
2.1. Estructura y propiedades químicas	15
2.2. Fuentes	15
2.2.1. Sintéticas	15
2.2.2. Naturales	16
2.2.2.1. Crustáceos	16
2.2.2.2. Microbianas	16
a. Algas	16
b. Levaduras	17
c. Bacterias	17
2.2.2.3. Plantas	17
2.3. Biosíntesis de Astaxantina a partir de <i>Haematococcus pluvialis</i>	18
a. Síntesis de Mevalonato a partir del Acetato	19
b. Conversión del Mevalonato en dos Isopreno activados	19
c. Condensación de unidades Isopreno	20
d. Condensación de dos moléculas GGPP	21
e. Desaturación para formar Licopeno	21
f. Biosíntesis de carotenos cíclicos	22
2.4. Funciones de Astaxantina	24
2.4.1. Función pigmentante	24
2.4.2. Función de la fotosíntesis	24
2.4.3. Función antioxidante	25
2.5. Importancia y aplicaciones de la Astaxantina	26
3. TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	27
3.1. Taxonomía	27
3.2. Características	28
3.3. Aspectos biológicos	28
3.3.1. Hábitad	28
3.3.2. Distribución	28
3.3.3. Predadores	28

3.3.4. Alimentación	29
3.4. Etapas del desarrollo de la trucha	29
3.4.1. Ova	29
3.4.2. Alevino	29
3.4.3. Juvenil	30
3.4.4. Comercial	30
3.5. Usos y funciones de la Astaxantina en la acuicultura	30
3.5.1. Metabolismo de los carotenoides en salmónidos	30
3.5.2. Digestión y absorción	31
3.5.3. Transporte	32
3.5.4. Depósito y retención de Astaxantina	32
3.5.5. Excreción	34
3.5.6. Reproducción	34
3.5.7. Precursores de vitamina A	35
3.5.8. Promotor de crecimiento	35
3.6. Factores que afectan la pigmentación de los peces	35
3.6.1. Factores fisiológicos	36
3.6.1.1. Factores genéticos	36
3.6.1.2. Tamaño de los peces	36
3.6.1.3. Maduración sexual	36
3.6.1.4. Estado de salud del pez	37
3.6.2. Factores dietarios	37
3.6.2.1. Lípidos	37
3.6.2.2. Fabricación del alimento	38
3.6.2.3. Tipo de pigmento	38
3.6.2.4. Periodo de entrega del alimento	38
3.6.3. Factores externos	38
3.6.3.1. Temperatura del agua	38
3.6.3.2. Calidad del agua	39
3.6.3.3. Salinidad	39
3.7. Evaluación de pigmentación en truchas	39
3.7.1. Expresión visual	40
3.7.2. expresión instrumental	41
3.8. Expresión final del color	41
4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	42
4.1. Fundamentos y principios	42
4.2. Equipo para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	43
4.2.1. Reservorio de la fase móvil	44
4.2.2. Sistema de bombeo	44
4.2.3. Inyectores	44
4.2.4. Columnas	45
4.2.5. Detectores	45
4.2.6. Sistema de toma y procesamiento de datos	46
a. Registrador	46
b. Sistema de control	46

4.3. Parámetros relevantes	47
4.4. Tipos de técnicas de HPLC	48
4.4.1. Cromatografía de fase normal (NP HPLC)	48
4.4.2. Cromatografía de fase reversa (RP HPLC)	49
4.4.3. Cromatografía de intercambio iónico (IEX)	50
4.4.4. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	51
CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	52
1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	52
2. MATERIALES	52
2.1. Material biológico	52
2.2. Material para la fabricación de las jaulas	52
2.3. Materiales para la crianza de truchas	53
2.4. Materia prima	53
2.5. Materiales de laboratorio	53
2.5.1. Materiales de vidrio	53
2.5.2. Equipos y aparatos	54
2.5.3. Otros materiales	54
2.5.4. Reactivos	55
2.5.5. Estándar de referencia	55
3. MÉTODOS	55
3.1. Diseño y fabricación de jaulas	55
3.2. Manejo de la alimentación	56
3.2.1. Alimentos balanceados	56
3.2.2. Cálculos para determinar la dieta de las truchas	57
3.2.3. Estrategia de la pigmentación	57
3.2.4. Preparación de dietas experimentales (Pellets)	58
3.3. Determinación del universo a estudiar	61
3.4. Evaluación del crecimiento y coloración pre tratamiento	61
3.5. Diseño experimental	61
3.6. Obtención de las muestras	61
3.7. Análisis de las muestras	62
3.7.1. Evaluación del crecimiento de las truchas post tratamiento	62
3.7.2. Evaluación sensorial del color	63
3.8. Estandarización del método para la cuantificación de Astaxantina por HPLC	63
3.8.1. Método	63
3.8.2. Fundamento	63
3.8.3. Procedimiento	64
3.8.3.1. Elección de la longitud de onda óptima	64
3.8.3.2. Desarrollo de los patrones cromatográficos	64
3.8.3.2.1. Preparación de la fase móvil	64
3.8.3.2.2. Preparación de los estándares	65
3.9. Parámetros de estandarización del método	65

3.9.1. Linealidad	66
3.9.2. Precisión	
3.9.3. Exactitud	66
3.9.4. Límite de detección	67
3.9.5. Límite de cuantificación	67
3.10. Extracción de Astaxantina	68
3.10.1. Método	68
3.10.2. Fundamento	68
3.10.3. Procedimiento	68
3.11. Acondicionamiento del HPLC para la cuantificación de Astaxantina	69
3.12. Determinación de proteínas	69
3.12.1. Método	69
3.12.2. Fundamento	69
3.12.3. Procedimiento	70
3.13. Determinación de lípidos	71
3.13.1. Método	71
3.13.2. Fundamento	71
3.13.3. Procedimiento	71
3.14. Métodos estadísticos	72
3.14.1. ANOVA (Análisis de varianza)	72
3.14.2. Prueba de especificidad: Test de Tukey	72
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES	73
1. Material biológico	73
2. Crianza de truchas	74
3. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas pre tratamiento	74
4. Diseño experimental de la crianza de las truchas	75
5. Obtención de las muestras	77
6. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas	77
7. Evaluación de la pigmentación de Astaxantina en el musculo de truchas alimentadas con <i>Haematococcus pluvialis</i> , empleando de la regla colorimétrica Salmo-Fan	81
8. Estandarización del método para la cuantificación de Astaxantina por HPLC	83
8.1. Elección de la longitud de onda óptima	84
8.2. Preparación de la fase móvil	84
8.3. Condiciones cromatográficas	84
8.4. Parámetros de estandarización del método	86
8.4.1. Linealidad	86
8.4.2. Precisión	87
8.4.2.1. Repetibilidad	87
8.4.2.2. Precisión intermedia	88
8.4.3. Exactitud	89
8.4.4. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	89

9. Extracción de Astaxantina	91
10. Acondicionamiento del HPLC para la cuantificación de Astaxantina	92
11. Cuantificación de Astaxantina en el polvo de <i>Haematococcus pluvialis</i>	92
12. Cuantificación de Astaxantina en los pellets fabricados	93
13. Cuantificación de Astaxantina en el pellet comercial	94
14. Cuantificación de Astaxantina en el musculo de truchas	95
15. Determinación de proteínas	101
16. Determinación de lípidos	105
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	109
SUGERENCIAS	110
BIBLIOGRAFÍA	112
ANEXOS	123



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Haematococcus pluvialis</i>	10
Tabla 2. Propiedades generales de <i>Haematococcus pluvialis</i>	13
Tabla 3. Principales aplicaciones de la Astaxantina	26
Tabla 4. Taxonomía de <i>Oncorhynchus mykiss</i>	27
Tabla 5. Composición química de los alimentos balanceados engorde y acabado truchas Naltech ®	57
Tabla 6. Cuadro de estrategia de tratamientos	58
Tabla 7. Composición de biomasa de <i>Haematococcus pluvialis</i>	59
Tabla 8. Evaluación del crecimiento y coloración de la trucha arco iris	74
Tabla 9. Evolución del peso promedio obtenido en muestras de truchas	77
Tabla 10. Análisis de varianza y test de Tukey al peso promedio en muestras de truchas	79
Tabla 11. Evolución de la distribución de la talla promedio obtenida en muestras de truchas	79
Tabla 12. Análisis de varianza y test de Tukey a la talla promedio en muestras de truchas	80
Tabla 13. Evaluación cualitativa de la pigmentación del musculo de trucha según la regla colorimétrica Salmo-Fan ® de Roche	81
Tabla 14. Análisis de varianza y test de Tukey a la pigmentación del músculo de trucha según la regla colorimétrica Salmo-Fan de Roche®	83
Tabla 15. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Astaxantina por HPLC	85
Tabla 16. Concentraciones y áreas para la gráfica de calibración del método	86
Tabla 17. Determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión	87
Tabla 18. Evaluación de la repetibilidad del método aplicando la ecuación de regresión	88
Tabla 19. Evaluación de la precisión del método aplicando la ecuación de regresión	88
Tabla 20. Evaluación de la exactitud del método aplicando la ecuación	

de regresión	89
Tabla 21. Datos de la gráfica de la determinación promedio para la linealidad del método	90
Tabla 22. Cuantificación de Astaxantina en el polvo de <i>Haematococcus pluvialis</i> mediante HPLC	93
Tabla 23. Concentración de Astaxantina en los pellets fabricados mediante HPLC	94
Tabla 24. Cuantificación de Astaxantina en el pellet comercial mediante HPLC	94
Tabla 25. Descripción de la alimentación suministrada a los diferentes grupos de truchas	95
Tabla 26. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas grupo Blanco (1)	96
Tabla 27. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas del grupo Control (2)	96
Tabla 28. Cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas del grupo A	97
Tabla 29. Cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas del grupo B	97
Tabla 30. Cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas del grupo C	98
Tabla 31. Análisis de varianza para la cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas	99
Tabla 32. Test de Tukey para la cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas	99
Tabla 33. Porcentaje de proteínas presente en el músculo de truchas de los grupos experimentales	103
Tabla 34. Análisis de varianza al porcentaje de proteínas presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales	104
Tabla 35. Test de Tukey al porcentaje de proteínas presente en el músculo de truchas de los grupos experimentales	104
Tabla 36. Porcentaje de lípidos presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales	106
Tabla 37. Análisis de varianza al porcentaje de lípidos presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales	107

Tabla 38. Test de Tukey al porcentaje de lípidos presente en el músculo de truchas de los grupos experimentales	108
Tabla 39. Factor de porcentajes para suministrar alimento seco (balanceado) en relación a la temperatura, peso y talla	123
Tabla 40. Cuadros de conversión alimenticia	124
Tabla 41. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas arco iris en tiempo cero	124
Tabla 42. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la primera semana de evaluación	124
Tabla 43. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la primera semana de evaluación	125
Tabla 44. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A en la primera semana de evaluación	125
Tabla 45. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la primera semana de evaluación	125
Tabla 46. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la primera semana de evaluación	125
Tabla 47. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la segunda semana de evaluación	126
Tabla 48. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la segunda semana de evaluación	126
Tabla 49. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A en la segunda semana de evaluación	126
Tabla 50. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la segunda semana de evaluación	126
Tabla 51. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la segunda semana de evaluación	127
Tabla 52. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la tercera semana de evaluación	127
Tabla 53. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la tercera semana de evaluación	127
Tabla 54. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A	

en la tercera semana de evaluación	127
Tabla 55. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la tercera semana de evaluación	128
Tabla 56. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la tercera semana de evaluación	128
Tabla 57. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la cuarta semana de evaluación	128
Tabla 58. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la cuarta semana de evaluación	128
Tabla 59. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A en la cuarta semana de evaluación	129
Tabla 60. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la cuarta semana de evaluación	129
Tabla 61. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la cuarta semana de evaluación	129
Tabla 62. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la quinta semana de evaluación	129
Tabla 63. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la quinta semana de evaluación	130
Tabla 64. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A en la quinta semana de evaluación	130
Tabla 65. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la quinta semana de evaluación	130
Tabla 66. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la quinta semana de evaluación	130
Tabla 67. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas del grupo blanco (1)	131
Tabla 68. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas del grupo control (2)	131
Tabla 69. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas del grupo A	131
Tabla 70. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas	131

Tabla 71. Cuantificación de Astaxantina en las muestras del grupo C	132
Tabla 72. Determinación de proteínas de las muestras del grupo blanco (1)	132
Tabla 73. Determinación de proteínas de las muestras del grupo control (2)	132
Tabla 74. Determinación de proteínas de las muestras del grupo A	132
Tabla 75. Determinación de proteínas de las muestras del grupo B	132
Tabla 76. Determinación de proteínas de las muestras del grupo C	133
Tabla 77. Determinación de lípidos de las muestras del grupo blanco (1)	133
Tabla 78. Determinación de lípidos de las muestras del grupo control (2)	133
Tabla 79. Determinación de lípidos de las muestras del grupo A	133
Tabla 80. Determinación de lípidos de las muestras del grupo B	133
Tabla 81. Determinación de lípidos de las muestras del grupo C	134



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo vital de <i>Haematococcus pluvialis</i>	12
Figura 2. Isopreno	14
Figura 3. Estructura química de la Astaxantina	14
Figura 4. Reacciones de síntesis de IPP	19
Figura 5. Reacciones para formar Licopeno GGPP	20
Figura 6. Reacciones para formar cis – fitoeno	21
Figura 7. Reacciones de desaturación para formar Licopeno	22
Figura 8. Reacciones para la formación de Astaxantina	23
Figura 9. Huevecillos de trucha arco iris	29
Figura 10. Alevino de trucha arco iris	29
Figura 11. Metabolismo de carotenoides, Astaxantina y Cantaxantina en salmónidos	33
Figura 12. Cartilla Roche TM (izquierda), Salmo – Fan TM mini (derecha) y regla Salmo – Fan TM (abajo)	41
Figura 13. Esquema de los componentes de un equipo de HPLC	43
Figura 14. Diseño de jaulas flotantes	56
Figura 15. Quistes (aplanósporas) de <i>Haematococcus pluvialis</i>	58
Figura 16. Procedimiento de la repeletización	60
Figura 17. Secado del alimento repeletizado	60
Figura 18. Alimentos rotulados	60
Figura 19. Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	61
Figura 20. Estrategia de muestreo realizado para trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) alimentados con 5 tratamientos diferentes	62
Figura 21. Evaluación del crecimiento de las truchas	62
Figura 22. Medición del color empleando la regla colorimétrica Salmofan Roche®	63
Figura 23. Preparación de la curva de calibración	65
Figura 24. Distrito de Ojherani	73
Figura 25. Jaulas flotantes elaboradas para la crianza de truchas	74

Figura 26. Gráfico de distribución de la población de estudio	76
Figura 27. Gráfico de la evolución del peso promedio obtenido en muestras de truchas	78
Figura 28. Gráfico de distribución de la talla promedio obtenida en muestras de truchas	80
Figura 29. Gráfico de la evaluación cualitativa de la pigmentación del músculo de trucha según la regla colorimétrica Salmo – Fan® La Roche	82
Figura 30. Barrido espectrofotométrico del estándar de Astaxantina	84
Figura 31. Cromatograma Astaxantina por HPLC	85
Figura 32. Representación gráfica de la linealidad	86
Figura 33. Gráfico de la concentración de Astaxantina vs. Desviación estándar	90
Figura 34. Procedimiento de extracción de Astaxantina	91
Figura 35. Gráfico de promedios de la concentración de Astaxantina mediante HPLC de los diferentes grupos experimentales	100
Figura 36. Digestión de las muestras	101
Figura 37. Destilación de las muestras	102
Figura 38. Titulación de las muestras	102
Figura 39. Gráfico de promedios del porcentaje de proteínas presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales	103
Figura 40. Proceso de extracción de lípidos	105
Figura 41. Grasa extraída	106
Figura 42. Gráfico de promedios del porcentaje de lípidos presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales	107

RESUMEN

La presente investigación tuvo como finalidad el estudio de los efectos pigmentantes, nutricionales del *Haematococcus pluvialis* aplicado en la dieta utilizada en la truchicultura.

El estudio inicialmente consistió en la crianza de 500 truchas en estado juvenil en el Lago Titicaca por un lapso de 62 días, mediante un sistema semintensivo. Dichos peces fueron divididos en cinco jaulas flotantes conteniendo 100 especímenes cada una, a las que se sometieron a diferentes condiciones de alimentación: El grupo 1 y 2 representaron el blanco y el control (el homólogo comercial); los grupos A, B y C que fueron alimentados con la microalga *Haematococcus pluvialis* en forma de pellets que contenían: 37.5 mg.kg⁻¹, 75 mg.kg⁻¹ y 150 mg.kg⁻¹ de Astaxantina respectivamente, concentraciones que fueron proporcionadas por el distribuidor de la microalga. Durante la crianza se realizaron muestreos semanales en forma aleatoria obteniendo cuatro muestras de cada jaula; para así poder evaluar el peso, talla y coloración con ayuda de la regla colorimétrica Salmo-Fan. Al finalizar la crianza se realizaron diferentes evaluaciones físico químicas como la determinación de proteínas y grasas, además de la cuantificación de Astaxantina; para lo que se realizó la estandarización del método por HPLC. La metodología desarrollada para la cuantificación de Astaxantina por HPLC resultó ser lineal, precisa, exacta, con límites de detección y cuantificación iguales a 0.126 mg. L⁻¹ y 0.318 mg.L⁻¹, respectivamente, además de resultar ser una metodología sencilla, rápida y económica en

relación a las metodologías publicadas en bibliografía. Con el método estandarizado se procedió a cuantificar la Astaxantina presente en la muestras de polvo de *Haematococcus pluvialis* y pellets dando resultados diferentes a los datos proporcionados por el distribuidor.

Transcurrido el tiempo de alimentación, se procedió a analizar el contenido de Astaxantina en el músculo de las truchas encontrándose concentraciones de 0.24 mg.kg^{-1} en el grupo blanco (1), el grupo control (2) obtuvo una concentración de 1.52 mg.kg^{-1} ; los grupos A, B y C mostraron concentraciones de 1.27, 3.48 y 2.59 mg.kg^{-1} respectivamente, observando la influencia de la Astaxantina en la alimentación de los grupos B y C, no habiendo diferencias significativas en los grupos control (2) y el grupo A.

En cuanto a los resultados obtenidos referidos al peso, talla y coloración según escala Salmo-Fan; el grupo blanco mostró 324.20 g, 28.69 cm, 20.70, el grupo control dio 336.05 g, 28.51 cm, 25.25; el grupo A dio 341.70 g, 28.55 cm, 23.65; el grupo B dio 351.70 g, 28.20 cm, 26.10 y en el grupo C se obtuvo los valores de 331.60 g, 27.82 cm, 25.50; respectivamente. Mostrándose que la trucha presenta una máxima coloración a una concentración de 75 mg.kg^{-1} de Astaxantina. En cuanto a los resultados obtenidos en la cuantificación de Astaxantina en muestras de truchas se evidenció que el polvo de *Haematococcus pluvialis* presenta un gran efecto pigmentante a ciertas concentraciones, en comparación con el pigmento comercial utilizado por las industrias de alimentos acuícolas. Así mismo se realizaron estudios nutricionales en los cuales se obtuvieron los valores de 19.47 %, 15.16 % en el grupo blanco, 20.63 %, 18.28 % en el grupo control; 20.33 %, 18.18 % en el grupo A, 20.60 %, 20.58 % en el grupo B y 21.08%, 26.06 % en el grupo C respectivamente en cuanto al contenido proteico y lipídico, habiéndose conseguido un incremento proporcional en la concentración proteica y lipídica lo cual indica la influencia de *Haematococcus pluvialis* en la dieta de las truchas.

Palabras clave: *Haematococcus pluvialis*, Astaxantina.

ABSTRACT

This research aimed to study the pigmentation, and effects of *Haematococcus pluvialis* applied to the diet used in trout farming.

The study initially consisted of 500 trout rearing juvenile stage on Lake Titicaca for a period of 62 days, using a semi-intensive system. These fish were divided into five floating cages each containing 100 specimens, which were subjected to different feeding conditions: Group 1 and 2 accounted white and control (the commercial counterpart); Groups A, B and C that were fed the microalgae *Haematococcus pluvialis* in pellet form containing: 37.5 mg.kg⁻¹, 75 mg.kg⁻¹ and 150 mg.kg⁻¹ of Astaxanthin respectively, concentrations which were provided by the distributor of the microalgae. During breeding weekly samples were taken randomly getting four samples of each cage; in order to assess the weight, size and color using the colorimetric rule Salmo-Fan. Different physical and chemical tests such as determination of protein and fat were performed at the end parenting, besides quantifying astaxanthin; for which standardization was performed by HPLC method. The methodology developed for quantification by HPLC proved Astaxanthin linear, accurate, precise, with detection limits and quantification equal to 0.126 mg. L⁻¹ and 0.318 mg.L⁻¹, respectively, and prove a simple, fast and economical methodology regarding methodologies published in literature. With the standardized method proceeded to quantify the Astaxanthin present in dust samples from *Haematococcus pluvialis* and pellets giving different results to the data provided by the distributor.

He spent feeding time, proceeded to analyze the content of Astaxanthin in the muscle of trout found concentrations of 0.24 mg.kg⁻¹ in the white group (1) control (2) group had a concentration of 1.52 mg.kg⁻¹; groups A, B and C showed concentrations of 1.27, 3.48, 2.59 mg.kg⁻¹, respectively, noting the influence of Astaxanthin in feeding the B and C groups, with no significant differences in control (2) groups and Group A.

As for the results based on the weight, size and color according scale Salmo-Fan; white group showed 324.20 g, 28.69 cm, 20.70, control group gave 336.05 g, 28.51 cm, 25.25; Group A gave 341.70 g, 28.55 cm, 23.65; group B gave 351.70 g, 28.20 cm, 26.10 and group C values obtained 331.60 g, 27.82 cm, 25.50; respectively. Presented showing the

maximum coloring trout at a concentration of 75 mg.kg^{-1} Astaxanthin. As for the results of the quantification of Astaxanthin in trout samples evidenced that the powder has a large *Haematococcus pluvialis* pigmenting effect at certain concentrations, compared to pigment used for commercial fish feed industries. Also nutritional studies in which the values of 19.47 %, 15.16 % in the white group, 20.63 %, 18.28 % in the control group were performed were obtained; 20.33 %, 18.18 % in group A, 20.60 %, 20.58 % in group B and 21.08 %, 26.06 % in group C respectively in terms of protein and lipid content, having achieved a proportional increase in protein concentration and lipid what indicating the influence of *Haematococcus pluvialis* in the diet of trout.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, Astaxanthin.



INTRODUCCIÓN

Transcurrido los años desde la introducción de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Perú, su crianza en los últimos 10 años ha tenido un desarrollo vertiginoso. Actualmente, la principal zona de cultivo es el lago Titicaca, seguido por otras zonas de cultivo que son Junín y Huancavelica. En los cuales la crianza de esta especie viene desarrollándose principalmente a niveles semi intensivos con acuicultores de micro y pequeña empresa (AMYPE) y en una menor proporción con grandes empresas a niveles intensivos.⁸⁵

El consumo interno de la trucha arco iris ha alcanzado de manera preliminar en 2010 las 11 525 toneladas métricas con un valor estimado de 37 millones de dólares, asimismo dentro del ranking de países productores de trucha arco iris en el escenario mundial, el Perú en 2010 ha mejorado su posición, ya que en el 2009 se encontraba en el puesto 14avo y para el 2010 estaría en el puesto 12avo teniendo el 2,46 % de la producción mundial, precedido por Italia (6,66 %), Francia (5,68 %), Dinamarca (5,54 %), Alemania (3,88 %), España (3,78 %), China (2,95), Polonia (2,91 %) y EEUU de Norteamérica (2,86 %); según estadísticas de FishStat-FAO.⁹²

Se debe señalar que se estima que en 2010 la zona americana ha producido el 31,77 % (214 mil toneladas métricas) de la producción mundial de trucha arco iris y el Perú se encuentra en una posición de relevancia entre los países de la región, teniendo el 7,60 % de la producción de dicha especie, convirtiéndose en uno de los países productores de trucha más importantes después de Chile que tiene el 75,25 % y EEUU de Norteamérica con el 8,81 %. Los principales destinos de exportación de la trucha arco iris peruana han sido los países de Canadá (250 toneladas métricas con un valor de 2,3 millones de dólares), Alemania (197 toneladas métricas con un valor de 839 mil dólares) y Noruega (145 toneladas métricas con un valor de 817 mil dólares), el volumen exportado a estos países representa el 61 % de la exportación nacional.⁸⁴

El criterio fundamental de aceptación de las truchas, por parte del público consumidor, es el impacto visual dado por la coloración rosada o roja de su carne.¹⁰⁷ Esta es la característica distintiva de esta especie y lo que contribuye a darle el sello de exclusividad a su imagen a diferencia de otros productos alimenticios de origen animal

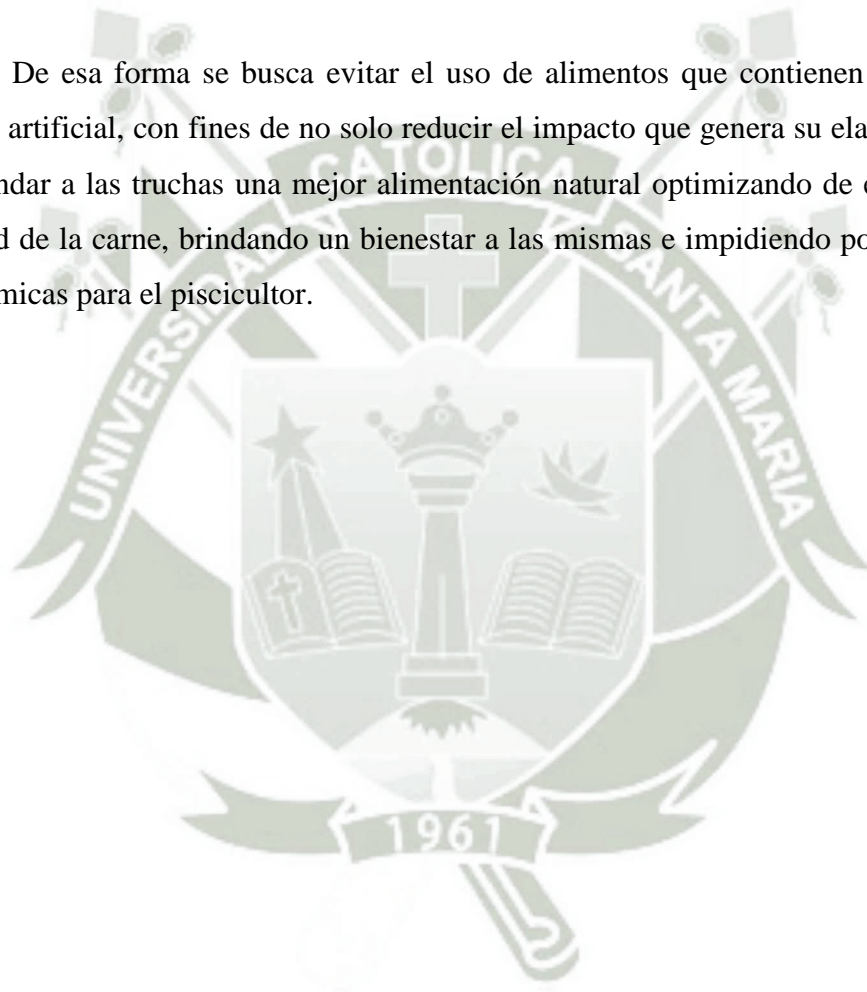
que son juzgados básicamente por su sabor, textura, frescura, etc. Por consiguiente, el grado de pigmentación de la carne es un factor preponderante en la determinación del precio que alcance estas especies en el mercado y en cualquiera de sus formas de presentación.¹¹

La pigmentación de la carne de salmonídeos resulta de la absorción y depósito de carotenoides oxigenados en el músculo a nivel del complejo de actino-miosina,^{15, 32} entonces una correcta pigmentación del músculo de la trucha dará como resultado una coloración rosada o roja de su carne.²⁴ En la naturaleza, los carotenoides son producidos por bacterias, algas, microalgas, plantas, y a través de la cadena alimentaria los pigmentos llegan a los peces.¹¹⁷ Mientras que como consecuencia de las condiciones de cautiverio, la alimentación de la trucha resulta ser un problema en la actualidad, pues estudios indican que una dieta que incluye trucha silvestre puede ser muy beneficiosa a la salud. Por el contrario, la trucha cultivada, ofrece menos ventajas dietéticas y hasta ciertas desventajas visibles; ya que no cuenta con una fuente de pigmentación natural en su dieta.⁸¹ Es debido a estas condiciones de cautiverio que ciertos colorantes artificiales, subproductos tóxicos como consecuencia del estrés oxidativo propias del cautiverio, antibióticos y otras drogas están presentes en varios grados en el tejido de truchas cultivadas, frecuentemente en niveles tales que pueden afectar la salud humana.¹¹

Es así que debido a la fuerte expansión de la truchicultura y la necesidad de pigmentar estos peces, se ha generado una gran demanda mundial por fuentes pigmentantes. Entre los productos utilizados se ha recurrido a fuentes naturales y fuentes artificiales de pigmento, como el Carophyll red 10 % (Cantaxantina sintética) y Carophyll pink 8 % (Astaxantina sintética). Estos pigmentos son marca registrada de F. Hoffman-La Roche y Co. Ltda. Suiza.¹¹ Los productos sintéticos, hasta la fecha, han sido, la fuente de pigmentos más utilizada por la acuicultura mundial y nacional, por ser productos estandarizados, con una alta concentración de carotenoide y de fácil manejo.¹¹³ Estos sin embargo, ofrecen ese único aporte a la dieta a un precio extremadamente alto, representando entre al 15 al 20 % del costo de la dieta.¹⁰⁷ Así como también el mercado mundial de Astaxantina se estima en 200 millones de dólares anuales, donde un kilogramo del pigmento se cotiza en 2,500 dólares.¹¹

Debido a esta problemática se busca la sustitución de los pigmentantes artificiales comúnmente incluidos en formulaciones de alimentos para truchas, por pigmentos de origen natural como es la Astaxantina presente en *Haematococcus pluvialis*, este carotenoide además de incrementar el valor nutricional de la carne, gracias a sus propiedades innatas por medio de la alimentación cotidiana; logrará una óptima pigmentación de las truchas. Dicha pigmentación se evaluara cuantitativa y cualitativamente por medio de la técnica del HPLC, además de ser comparado con respecto al pigmento comercial que son usados en la producción de alimentos acuícolas.

De esa forma se busca evitar el uso de alimentos que contienen pigmentos de origen artificial, con fines de no solo reducir el impacto que genera su elaboración; sino de brindar a las truchas una mejor alimentación natural optimizando de esta manera la calidad de la carne, brindando un bienestar a las mismas e impidiendo posibles pérdida económicas para el piscicultor.



HIPÓTESIS

Debido a la presencia del carotenoide Astaxantina en la microalga *Haemotococcus pluvialis* es probable que la administración de este microorganismo como componente de la dieta de *Oncorhynchus mykiss* mejore la pigmentación y valor nutricional de su carne.



OBJETIVOS

- Obtener truchas en un estado juvenil, las cuales deberán presentar una escasa coloración; además de presentar todas las características físicas propias de este estado.
- Elaborar pellets que contengan Astaxantina presente en la microalga *Haematococcus pluvialis*.
- Estandarizar una técnica por HPLC para la determinación de Astaxantina.
- Determinar la concentración de Astaxantina presente en el polvo de la microalga *Haematococcus pluvialis*, pellets fabricados y pellets comercial mediante cromatografía líquida de alta resolución.
- Realizar la crianza de truchas alimentándolas con pellets fabricados y comerciales, con un reajuste biométrico mediante el sistema semintensivo. Así mismo se evaluará semanalmente la evolución de la talla y peso de la población en estudio por un periodo de cinco semanas.
- Determinar la concentración de Astaxantina y comparar el efecto pigmentante del *Haematococcus pluvialis* presente en el músculo de las truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), tras ser alimentadas con los pellets comerciales y los pellets fabricados que contienen la microalga como agente pigmentante componente de la dieta.
- Evaluar el porcentaje de proteínas y grasas del *Haematococcus pluvialis* aplicado en la dieta empleada en truchicultura mediante el sistema semintensivo.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. *Haematococcus pluvialis*

1.1. ETIMOLOGÍA

Haematococcus: Nombre genérico compuesto por dos partes, *Haemato-* que hace referencia a su color rojo sangre y *-coccus* que hace referencia a la forma esférica de sus quistes.⁴¹

pluvialis: Epíteto que hace referencia a que se puede encontrar en lugares con agua de lluvia.⁴¹

Haematococcus pluvialis es una microalga que presenta la siguiente clasificación:

Tabla 1. Taxonomía de *Haematococcus pluvialis*.

Clasificación científica	
Dominio	Eukaryota
Reino	<i>Viridiplantae</i>
Filo	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Chlorophyceae</i>
Orden	<i>Chlamydomonadales</i>
Familia	<i>Haematococcaceae</i>
Genero	<i>Haematococcus</i>
Especie	<i>H. pluvialis</i>

Fuente: (Flotow, 1844).⁴¹

Haematococcus pluvialis es una microalga verde de agua dulce, unicelular, con un tamaño celular entre 8 y 50 μm , tiene una forma elipsoide redondeada al final de la

parte anterior y posterior, que se caracteriza por presentar dos flagelos con los que se desplaza en su estado vegetativo así mismo presenta un crecimiento fotoautótrofo. Se incluye en *Chlorophyta* por poseer clorofila a y b aunque puede estar enmascarada por otros pigmentos.⁴¹

Esta microalga ha ganado gran interés comercial por su capacidad de acumular altos niveles de Astaxantina comparado con otras fuentes, por lo que es uno de los mejores productores del carotenoide rojo, ya que tiene la capacidad de acumular más del 3% en peso seco de pigmento.⁵⁰ La producción de este metabolito secundario está fuertemente relacionada con los cambios morfológicos producidos en la microalga desde un estado vegetativo verde en el que se da el crecimiento, hasta un estado rojo de alta acumulación de Astaxantina. Estos cambios son inducidos por diversos factores como la deficiencia de nutrientes (nitrato, fosfato, sulfato), la intensidad lumínica, la salinidad del medio y las altas temperaturas, entre otros.¹¹⁵ Comúnmente se sugiere que la formación de grandes cantidades de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* es una estrategia de supervivencia en condiciones ambientales adversas.⁷⁰

1.2. CICLO VITAL

En el ciclo vital de *Haematococcus pluvialis* se pueden distinguir diferentes estados o fases de crecimiento:³⁸

- En la primera forma, donde se da el crecimiento, la célula es verde de forma alargada o macrozoide, presenta flagelos denominándose célula vegetativa.
- Una forma sin flagelos y verde se denomina palmela.
- La típica célula de resistencia o hematociste, rodeada por una gruesa membrana celulósica.
- Las pequeñas formas flageladas esbeltas o microzooides encerradas en una fina membrana de celulosa.
- Otra forma roja, en donde se da la acumulación de Astaxantina, se denomina el estado de aplanóspora no móvil, encerrada también en una fina membrana de celulosa.

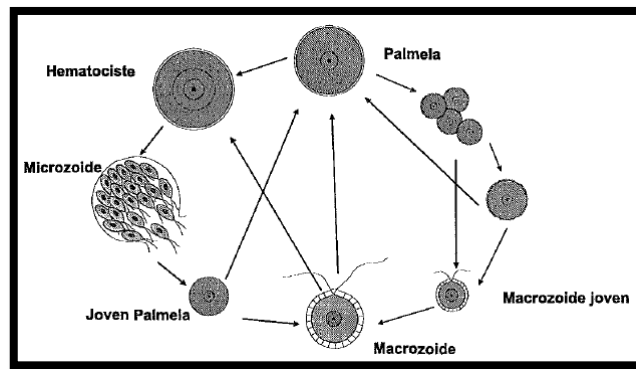


Figura 1. Ciclo vital de *Haematococcus pluvialis*

Fuente: (Elliot, 1934).³⁸

En condiciones favorables, las células verdes redondas palmela aumentan de tamaño de forma exponencial, y se dividen para producir flagelos, las células hijas móviles que posteriormente pierden los flagelos y se convierten de nuevo a una gruesa pared característica de la etapa de palmela, la forma más prominente del alga en las culturas no sincrónicas.²⁰

Cuando las condiciones se vuelven desfavorables, o debido a diferentes tipos de estrés ambiental, las células dejan de dividirse, se reúnen, pierden sus flagelos (etapa palmela), aumentan de tamaño y forman una gruesa y persistente pared cística (enquistamiento), que contiene esporopolenina (etapa hematociste); al mismo tiempo, las células empiezan a acumular masivamente Astaxantina, notándose primeramente la deposición alrededor del núcleo y continuando radialmente, para convertirse en quistes resistentes. Resultando así la formación de grandes aplanósporas rojas, formas esféricas no móviles resistentes a las condiciones ambientales extremas,²⁰ siguen a los macrozooides, que contienen 1-2 % de su peso seco como Astaxantina,¹⁷ predominantemente en la forma de monoésteres de ácidos grasos en la etapa estacionario temprano, el cual no posee una pared celular gruesa.⁹⁴ En estados posteriores, cuando ya posee una pared celular gruesa, dominan los diésteres, lo que apunta hacia una esterificación en los estados finales del desarrollo.⁴⁸ Posteriormente, después de haber sido expuestos a condiciones favorables, la gruesa pared cística pronto desaparece y como resultado de la fisión; de las aplanósporas brotan células hijas flageladas o los pequeños microzooides móviles las cuales nadan dentro de la vieja pared celular, que

posteriormente crecen en palmela o macrozoide. Esos macrozoides contienen Astaxantina, aunque aparece en la periferia de la célula una fina línea de clorofila, la cual, tras las subsiguientes divisiones, aumenta en grosor.⁵⁵

1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

- Color: Rojo oscuro
- Tamaño de partícula: 5-25 micras
- Humedad: 4-9%
- Densidad aparente: valor suelta: 0,303 - 0,345 g / mL
valor aprovechado: 0,370 - 0,435 g / mL

1.4. COMPOSICIÓN

La composición general de *Haematococcus pluvialis* consiste en carotenoides comunes, ácidos grasos, proteínas, carbohidratos y minerales (Tabla 2). La Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* es de aproximadamente 70 % de monoésteres (vinculados a 16: 0, 18: 1 y 18: 2 ácidos grasos), 25 % de diésteres y 5 % de pigmento libre, y el 15 % restante consiste en una mezcla de β -caroteno, Cantaxantina, y la Luteína.⁵⁷

Tabla 2. Propiedades generales de *Haematococcus pluvialis*.

Astaxantina	> 1,5%
Carotenoides totales	> 1,75%
Proteína	20-30%
Carbohidratos	30-40%
Grasa	7-25%
Humedad	4-9%
Color	rojo a rojo oscuro
Tamaño de partícula	5-25 micras
Densidad	0,370 - 0,435 g / ml

Fuente: John E. Dore and Gerald R. Cysewski.⁵⁷

Haematococcus pluvialis se encuentra comúnmente en climas templados de todo el mundo. Sus quistes son responsables del color rojo sanguinolento. Esta alga tiene un interés biotecnológico creciente gracias a su acumulación de Astaxantina y al alto valor

económico que presenta esta en el mercado. Los estudios han demostrado que la harina de algas *Haematococcus* es una fuente eficaz de Astaxantina, es seguro, y nunca se ha asociado con toxicidad en los estudios de literatura o de campo reportadas.⁵⁷

2. ASTAXANTINA

2.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES QUÍMICAS

La Astaxantina es un oxicarotenoide que pertenece al grupo de las xantofilas. Al igual que otros carotenoides, este pigmento está formado por ocho unidades de Isopreno (Figura 2) que por condensación dan estructuras carbonadas de cuarenta átomos, llamados Tetraterpenos.⁶³

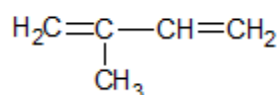


Figura 2. Isopreno

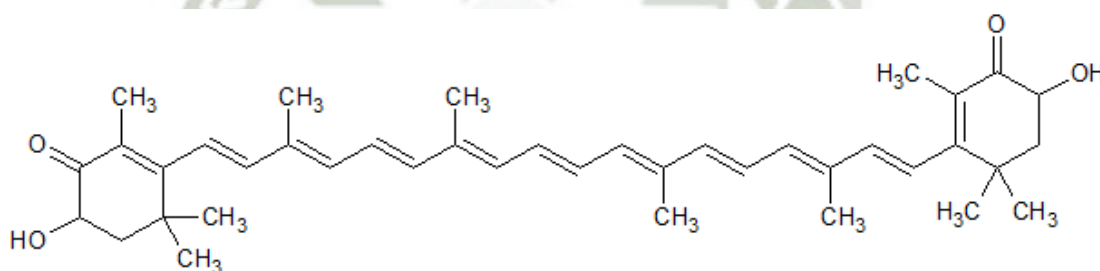


Figura 3. Estructura química de la Astaxantina.

IUPAC: (6S)-6-hydroxy-3-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-18-[(4S)-4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-3-oxocyclohexen-1-yl]-3,7,12,16-tetramethyloctadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl]-2,4,4-trimethylcyclohex-2-en-1-one

Otro nombre: 3,3'-dihidroxi-β, β-caroteno-4,4'-diona

Peso Molecular: 596.84 g.mol⁻¹

Formula Molecular: C₄₀H₅₂O₄

Este pigmento fue identificado químicamente por Kühn y Sorenson (1983)⁶³ y presenta forma de cristales de color violeta oscuro, su punto de fusión es de aproximadamente 224 °C. La molécula de Astaxantina tiene dos carbonos asimétricos localizados en las posiciones 3 y 3' de los anillos benzoicos en cada extremo de la

molécula, que son conectados por una cadena de dobles enlaces conjugados representando el cromóforo el cual es responsable del color típico carotenoide.⁶⁶

Diferentes enantiómeros de la molécula se producen como consecuencia de las distintas formas en que los grupos hidroxilo están unidos a los centros asimétricos de los átomos de carbono (Figura 3). Cuando el grupo hidroxilo se une y proyecta arriba del plano de la molécula, es “configuración R”, y cuando el grupo hidroxilo se adhiere para proyectarse debajo del plano de la molécula, se conoce como “configuración S”. Por lo tanto, los tres enantiómeros posibles son designados como: 3R, 3R’; 3S, 3S’; y 3R, 3S’ (meso).⁷² En la naturaleza, 3S, 3’S-Astaxantina es el isómero más abundante y diferentes organismos producen Astaxantina en diferentes proporciones estereoisómeras. La molécula de Astaxantina también presenta isómeros geométricos (cis y trans); los isómeros cis muestran una mayor biodisponibilidad y potencia en seres humanos, los isómeros trans de la Astaxantina natural se convierten en una mezcla cis-trans, especialmente en 9-cis y 13-cis. El incremento de la temperatura, exposición a la luz o a la presencia de ácidos, pueden provocar la formación de isómeros cis.⁵⁸

2.2.FUENTES

La Astaxantina es un pigmento carotenoide presente en animales marinos tales como los salmones, truchas y los crustáceos, ya que estos animales no pueden sintetizar Astaxantina por sí solos entonces la toman en sus alimentos naturales la cual es adicionada a la alimentación de dichas especies cultivadas para intensificar su color.⁵⁸

2.2.1. Sintéticas

La empresa farmacéutica Hoffman-La Roche (Basel, Suiza), ha desarrollado varios procesos para la síntesis de carotenoides. En 1964 introdujo la Cantaxantina sintética como pigmento en alimentos “Carophyll red MR”.⁵⁸ Este pigmento fue utilizado con éxito en acuicultura hasta la aparición de la trans-Astaxantina, la cual comercialmente recibe el nombre de “Carophyll pink MR”. La Astaxantina sintética es la principal fuente utilizada para pigmentar el músculo de truchas, la cual es preferida por los piscicultores sobre la Cantaxantina, porque se absorbe más eficientemente y da una coloración más natural y homogénea a los alimentos procesados. En la actualidad la etiqueta de este

producto comercial, Carophyll pink_{MR}, indica que contiene un 8 % de Astaxantina libre con una combinación de isómeros en equilibrio y tiene un costo de venta de \$2500 a \$3500 dólares americanos/kg.^{99, 86}

2.2.2. Naturales

En la naturaleza, la Astaxantina es producida por el plancton y algunos tipos de algas, los cuales son ingeridos por diversas especies acuáticas, incluyendo a los crustáceos, entre los que se encuentran los langostinos. A su vez, los crustáceos son ingeridos por los peces (como el salmón o la trucha) o por las aves (flamingos, ibis rojo).³³ Cada fuente natural de Astaxantina presenta sus limitaciones, debido principalmente a problemas técnicos de extracción y a los bajos rendimientos obtenidos. No obstante, los consumidores prefieren los pigmentos de origen natural por no estar sujetos a las restricciones que impone la FDA a los colorantes sintéticos.⁸⁷

2.2.2.1. Crustáceos

Los desperdicios de crustáceos consisten en el caparazón y la carne adherida a este, las vísceras y la cabeza. Los principales componentes del exoesqueleto son quitina, proteína residual siendo el pigmento más abundante la Astaxantina, la cual puede encontrarse en forma libre, esterificada, o formando complejos con proteínas.¹¹¹ Los niveles de carotenoides extraídos de esta fuente son bajos (hasta 200 mg/kg) y para obtener una pigmentación satisfactoria se requiere la adición del 10 al 25 % en peso en relación al total de la ración del alimento formulado. Sin embargo, esta fuente contiene altos niveles de ceniza, de quitina y humedad, lo cual ocasiona un problema técnico en la formulación y en la elaboración del alimento. Además, el bajo contenido de nutrientes y proteínas no la hace útil como suplemento en el alimento para peces. Otra desventaja se presenta en los costos de extracción de la Astaxantina, los cuales pueden fluctuar entre 5000 y 15000 dólares americanos/kg, lo que limita su uso.⁵⁸

2.2.2.2. Microbianas

a. Algas

La capacidad para formar carotenoides secundarios es propia de los géneros *Ankistodesmus*, *Haematococcus* y *Scenedesmus*, pero específica de la especie en el

género *Chlorella* (especies como *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*). Las algas de género *Chlorophyceae* y algunas algas que crecen en la nieve como *Chlamydomonas nivalis* tienen la habilidad de sintetizar Astaxantina en forma de ésteres, Cantaxantina y otros pigmentos bajo condiciones desfavorables como limitación de nitrógeno y posiblemente irradiación solar elevada.^{13,111} También se ha informado que los géneros *Chlorococcum* (*Chlorococcum wimerri*), *Botryococcus* (*Botryococcus braunii*), *Neochlois* y *Protosiphon* contienen importantes cantidades de carotenoides (Astaxantina, principalmente monoésteres).⁷⁶ Recientemente se ha incrementado el interés en la microalga verde *Haematococcus pluvialis* tanto desde un punto de vista taxonómico,^{19, 18} como por su capacidad para producir una alta cantidad de Astaxantina (1.5-3.0% peso seco), por consiguiente *H. pluvialis* se considera una fuente potencial de este pigmento.⁸⁶

b. Levaduras

La levadura *Phafia rhodozyma* contiene Astaxantina como carotenoide principal, dependiendo de la cepa y las condiciones de crecimiento;⁶³ siendo la principal limitación que presenta la pequeña acumulación de Astaxantina que se encuentra en su pared celular, por lo cual la industria está utilizando células genéticamente modificadas capaces de producir más de 800 mg/kg de Astaxantina.^{39, 62}

c. Bacterias

También se han explorado bacterias como posibles fuentes de carotenoides. En 1999, investigadores de la Universidad Hebrea de Jerusalén patentaron a la bacteria *Paracoccus marcuksi* MH1, la cual produce y secreta carotenoides, como Adonixantina y Astaxantina.⁵⁴

2.2.2.3. Plantas

Otra fuente pigmentante con buenas expectativas de utilización son las flores de las plantas del género *Adonis*, que es el único género del reino vegetal que ha sido reportado como fuente de ésteres de Astaxantina.⁷⁶

2.3. BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA A PARTIR DE *Haematococcus pluvialis*

La biosíntesis de Astaxantina a partir del *H. pluvialis* se da cuando las condiciones durante su desarrollo se vuelven desfavorables, o debido a diferentes tipos de estrés ambiental, las células dejan de dividirse, se reúnen, pierden sus flagelos, aumentan de tamaño y forman una gruesa y persistente pared cística (enquistamiento); al mismo tiempo, las células empiezan a acumular masivamente Astaxantina, notándose primeramente la deposición alrededor del núcleo y continuando radialmente, para convertirse en quistes resistentes.²⁰ Diversos estudios determinaron que las condiciones para enquistamiento y la carotenogénesis en el alga eran los mismos, y que los dos fenómenos suelen ocurrir juntos, existiendo un proceso biosintético de esporopolenina vía cetocarotenoides como la Astaxantina.²⁰ Esta es segregada como una forma de proteger el fotosistema cuando la célula percibe que las condiciones no son favorables, desencadena la respuesta de enquistamiento en donde la Astaxantina se dispersa hacia la periferia de las células de *Haematococcus* en virtud de la inducción de la luz, y se mueve de nuevo hacia el centro después cuando se interrumpe la iluminación.¹¹⁸ No se producen importantes cambios cuantitativos o cualitativos durante esta migración. Quistes rojos son más resistentes a la foto inhibición que los quistes verdes, lo cual indica un fuerte papel foto protector para Astaxantina, la cual protege del daño oxidativo que pudiera ocasionarle al fotosistema una radiación de alta energía como la radiación UV, incluso se ha encontrado que puede originar una cierta resistencia a estos microorganismos frente a radiación gamma o rayos X.²⁰

La Astaxantina se clasifica dentro del grupo de los carotenoides los cuales como terpenoides son sintetizados por la ruta del Isopreno. La mayoría de las rutas han sido elucidadas, pero se requiere más información sobre las enzimas involucradas. El Isopentenil Pirofosfato (IPP) es el precursor común de muchos de los compuestos isoprenoides, aunque el primer precursor específico es el compuesto Ácido Mevalónico (MVA), el cual por un proceso de descarboxilación produce IPP.³⁶

La biosíntesis de carotenoides involucra seis etapas:⁴⁷

a. Síntesis del Mevalonato a partir del Acetato.

- b. Conversión del Mevalonato en dos Isoprenos activados.
- c. Condensación de unidades Isopreno.
- d. Condensación de dos moléculas GGPP.
- e. De saturación para formar Licopeno.
- f. Biosíntesis de Carotenos Cíclicos.

a. Síntesis del Mevalonato a partir del Acetato

Los pasos iniciales de la ruta involucran la fusión de tres moléculas de Acetil-CoA para producir 3-hidroxi-3- metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Existe evidencia de que una enzima cataliza ambas reacciones usando como Fe^{2+} y quinona como cofactores. La conversión de HMG-CoA a Mevalonato es catalizada por HMG-CoA reductasa, usando NADPH como cofactor.³⁶

b. Conversión del Mevalonato en dos Isopreno activados

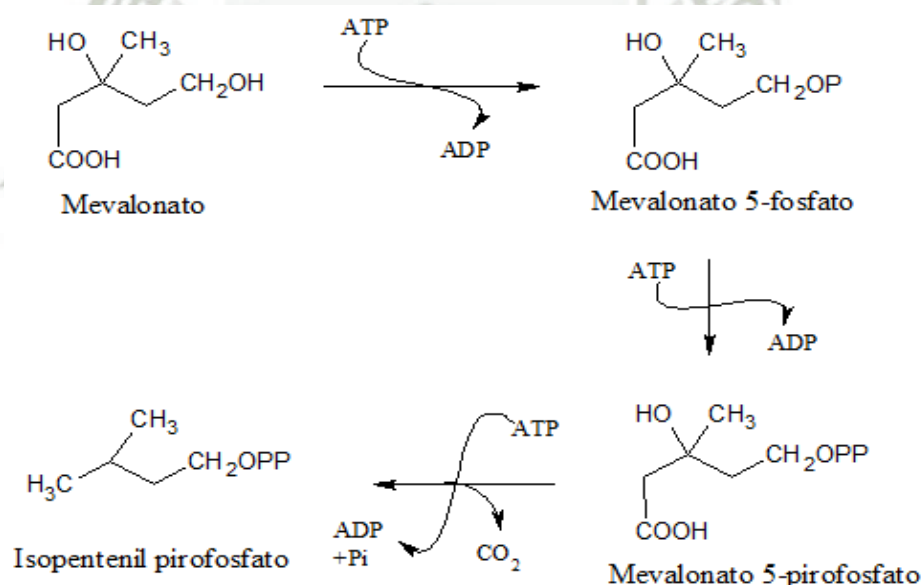


Figura 4. Reacciones de síntesis de IPP

La síntesis de Isopentenil Pirofosfato (IPP) a partir del Mevalonato está bien caracterizada en plantas. El IPP se forma a partir del Ácido Mevalónico (MVA), que es fosforilado sucesivamente a Ácido Mevalónico 5-fosfato y 5-pirofosfato por enzimas cinasas en presencia de ATP. Posteriormente, el MVA-5-pirofosfato es descarboxilado

para dar una unidad de Isopreno.⁴⁷ El Isopentenil Pirofosfato es la unidad básica para la construcción de terpenoides de cadena más larga. El IPP por sí solo no es lo suficientemente reactivo para iniciar las reacciones de condensación. Entonces, el primer paso es su isomerización a Dimetilalilpirofosfato (DMAPP), la reacción es catalizada por la IPP isomerasa con un ión metálico divalente como cofactor.³⁶

c. Condensación de unidades Isopreno

El siguiente paso es la condensación de un IPP y un DMAPP para obtener geranilpirofosfato (GPP). Posteriormente ocurre otra condensación con un IPP más para obtener farnesilpirofosfato (FPP). Después de esto, otra moléculas de IPP se condensa con el GPP para obtener el geranilgeranil pirofosfato (GGPP) gracias a la GGPP sintasa (Figura 5). Debido a que el GGPP es un precursor de muchos otros compuestos, es posible que la transformación del GGPP, en esta parte de la ruta, esté altamente regulada por mecanismos complejos.^{47, 36}

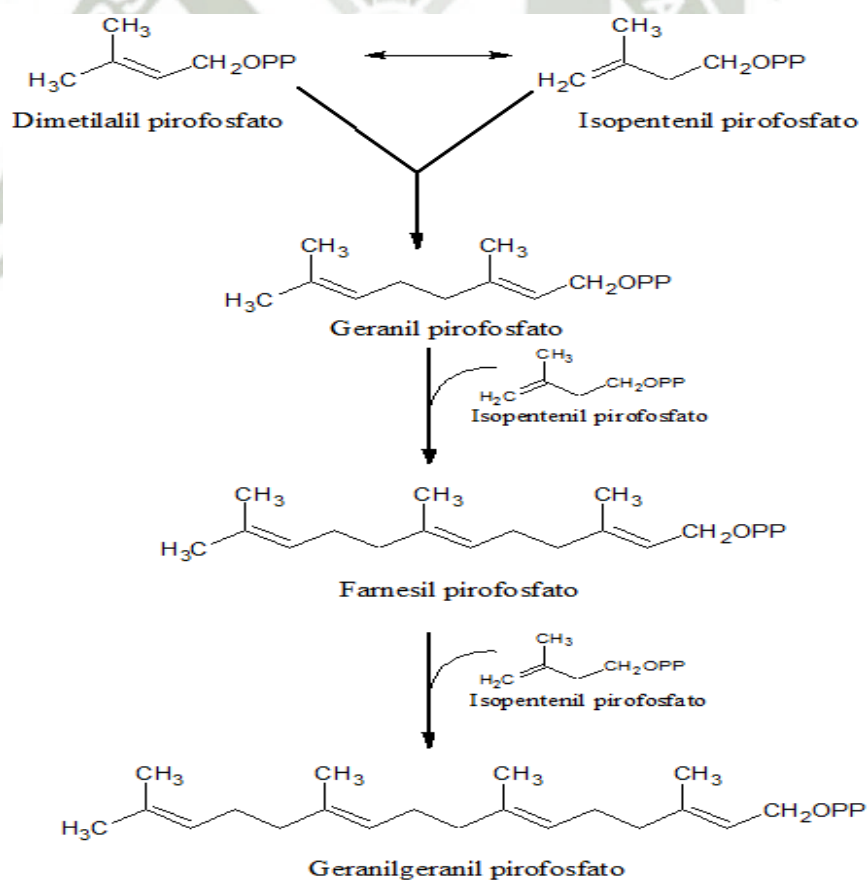


Figura 5. Reacciones para formar Licopeno GGPP.

d. Condensación de dos moléculas GGPP

El primer paso específico de la síntesis de carotenoides (Figura 6) implica la unión covalente "cabeza con cabeza" de dos moléculas de GGPP, dando lugar tras una serie de reacciones a Fitoeno (C_{40}). El intermediario de esta reacción es un ciclopropano C_{40} , el Prefitoeno Pirofosfato (PPPP). La mayoría de los organismos (especialmente plantas superiores, algas y hongos) sintetizan 15, 15'-cis- fitoeno, aunque otros organismos pueden sintetizar el isómero trans-. La formación de uno u otro isómero depende de la estereoquímica de la remoción de un hidrógeno en la condensación del GGPP. Esta molécula tiene la estructura básica de los carotenoides, y las reacciones subsiguientes involucran transformaciones químicas de esta estructura.^{36, 47}

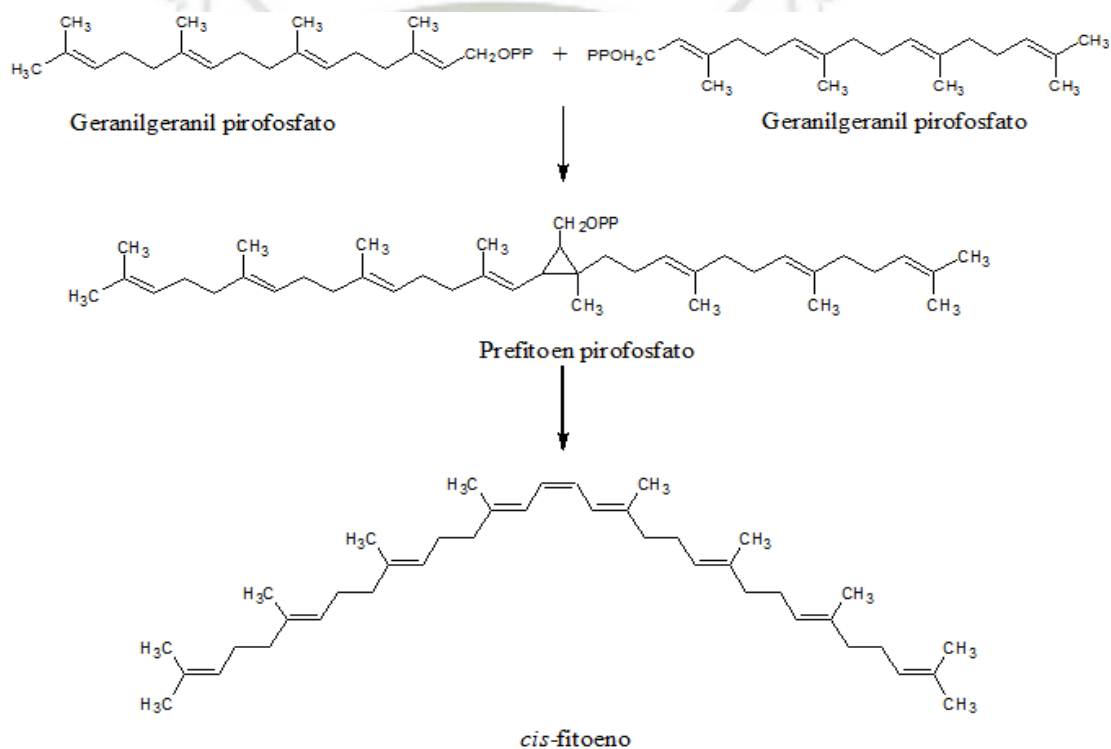


Figura 6. Reacciones para formar cis- fitoeno

e. Desaturación para formar Licopeno

Posteriormente, el Fitoeno sufre 4 reacciones de desaturación para dar Fitoflueno, Caroteno, Neurosporeno y finalmente, Licopeno (Figura 7). A partir de aquí, el Licopeno puede sufrir un gran número de reacciones metabólicas que implican el doble enlace C-1 ,2 y darán lugar a una gran diversidad de carotenoides.³⁶

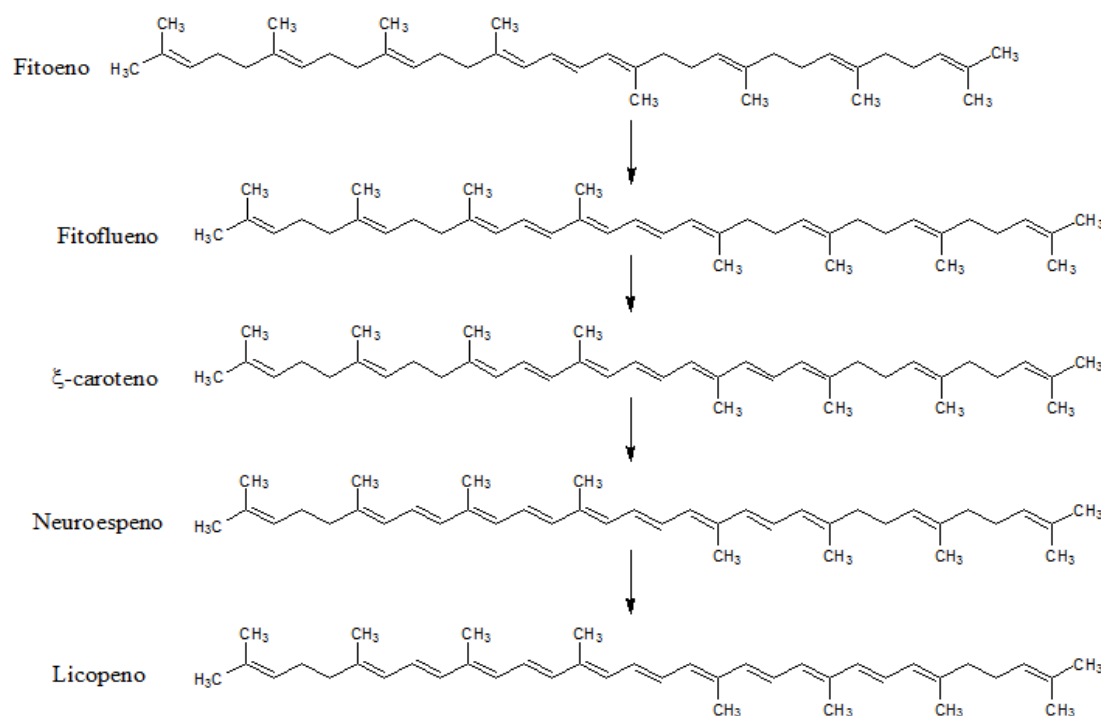


Figura 7. Reacciones de desaturación para formar Licopeno.

f. Biosíntesis de carotenos cíclicos

La biosíntesis de carotenos cíclicos ocurre mediante la ciclación de uno o ambos grupos terminales del Licopeno. En plantas superiores el Licopeno puede convertirse en β- o γ- caroteno gracias a Licopeno ciclasas; estas enzimas aceptan otros sustratos acíclicos como el Neurospeno. La fracción de carotenoides de las células vegetativas, consta en su mayoría de la Luteína (75-80 %) y β-caroteno (10-20 %). Mientras que en los quistes de color rojo, el carotenoide predominante es la Astaxantina.⁹⁴ El β- caroteno es convertido en Astaxantina por la adición de grupos carbonilos en la posición 4 y 4', y grupos hidroxilo en la posición 3 y 3', respectivamente. La presencia de Echinenona y Cantaxantina en los microorganismos muestra que es prioritaria la formación de los grupos carbonilos frente a la hidroxilación. La formación de estos grupos es catalizada por β-caroteno cetolasa (4,4'- oxigenasa) con el intermediario mono cetocarotenoide (Echinenona), mientras que la formación de grupos hidroxílicos esta catalizada por una

hidroxilasa (3,3'-oxigenasa) para formar la Astaxantina (Figura 8).¹²⁰

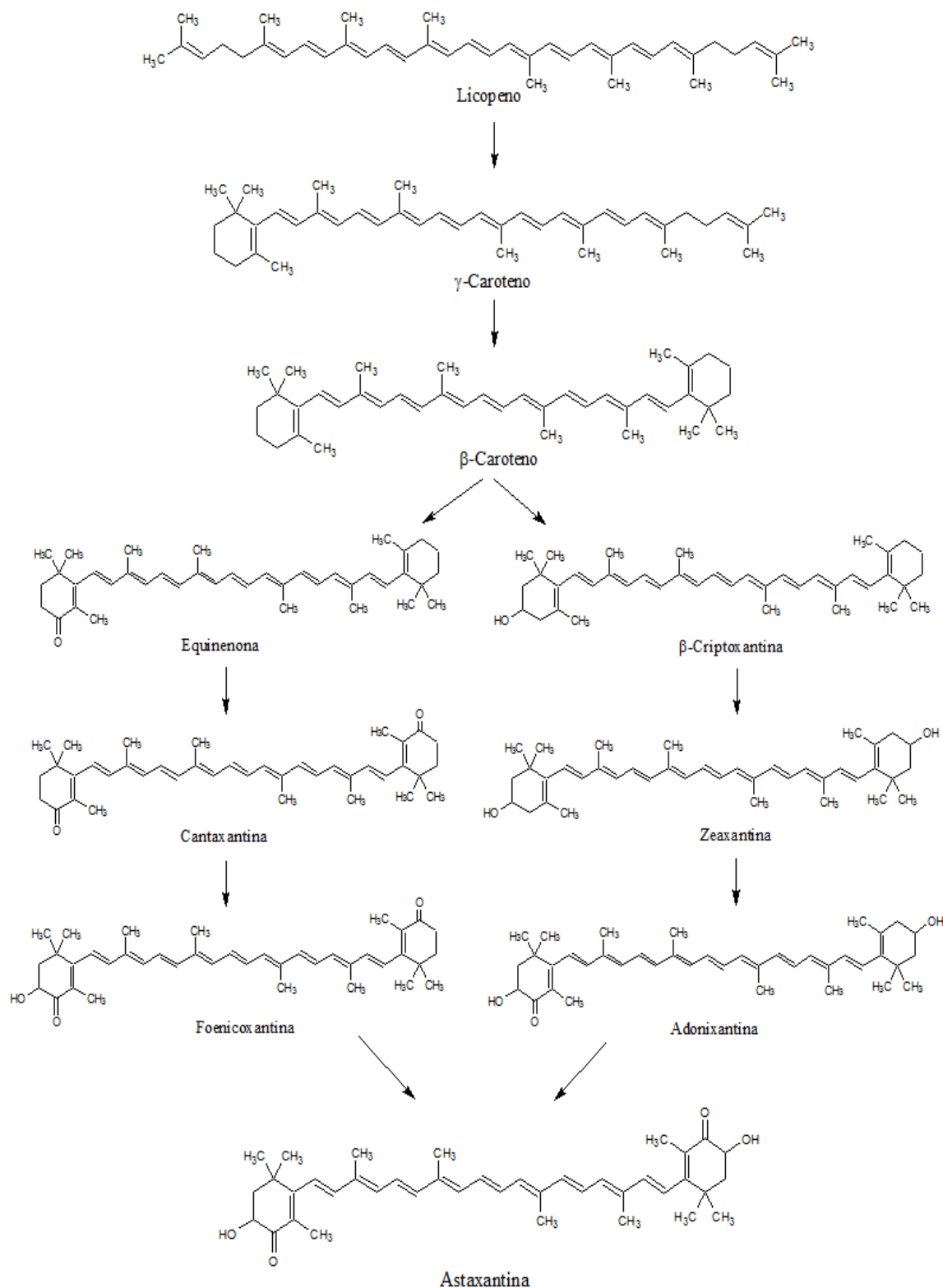


Figura 8. Reacciones para la formación de Astaxantina.

2.4.FUNCIONES DE ASTAXANTINA

La Astaxantina por pertenecer a la clase de los carotenoides llamados xantofilas o carotenoides oxigenados, presenta actividades metabólicas y fisiológicas de las cuales son atribuidas a los carotenoides. Sin embargo, la molécula de Astaxantina tiene otras propiedades químicas peculiares debido a su estructura molecular, ya que presenta grupos funcionales hidroxilo y carbonilo en cada anillo ionona con lo cual explica algunas de sus funciones.⁷²

Los carotenoides son responsables de la coloración de las aves, peces, insectos y algunos invertebrados. Dado que sólo las plantas y microorganismos sintetizan carotenos *de novo*, los encontrados en animales provienen de las plantas que fueron ingeridas en algún punto de la cadena alimenticia. La presencia de estos colorantes en los animales es el resultado de los hábitos alimenticios, absorción, transformaciones metabólicas y simbiosis.¹⁰⁰ En organismos vivos, existen dos características fundamentales de los pigmentos carotenoides que permiten entender y deducir los roles que ellos puedan llegar a desempeñar. Por una lado, el hecho de ser compuestos orgánicos coloreados, los hace actuar como agentes pigmentantes, y por otro, su capacidad reductora les permite desempeñarse, bajo condiciones específicas, como agentes antioxidantes.¹¹¹

2.4.1. Función pigmentante

Existen diferencias en las vías metabólicas de la Astaxantina en crustáceos y peces herbívoros y carnívoros, incluyendo salmónidos. Trabajos con salmónidos han mostrado su incapacidad para sintetizar Astaxantina *de novo*, careciendo la capacidad para oxidar 3,3 dihidroxicarotenoides y para absorber β -caroteno dietario. Por lo tanto, estos peces requieren de una fuente de Astaxantina en la dieta, la cual es subsecuentemente depositada, principalmente en la forma libre no esterificada, en la carne de la trucha y las formas esterificadas en la piel y ovarios.¹¹¹

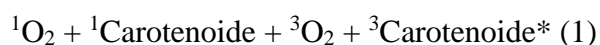
2.4.2. Función en la fotosíntesis

Los principales pigmentos involucrados en la fotosíntesis son las clorofilas y carotenoides, los cuales tienen dos funciones bien conocidas en este proceso que son pigmentos accesorios para captar la energía luminosa y foto protectores contra el daño

oxidativo, minimizando la cantidad de luz disponible para la absorción por las células.^{45,46} La función de la Astaxantina se suele asociar con una foto protección de las células, por absorción pasiva de fotones antes de que éstos alcancen los pigmentos fotosintéticos, reduciendo en gran medida la cantidad de luz transmitida a los complejos pigmento-proteína, minimizando la potencial foto inhibición y foto destrucción en cloroplastos originados por luces azules de gran energía. Otras observaciones que apoyan el papel fotoprotector de la Astaxantina es la dispersión que sufre este carotenoide, normalmente situado en la zona central del citoplasma, bajo la influencia de una alta intensidad luminosa, extendiéndose hacia la periferia, llegando incluso a parecer disperso por todo el citoplasma, entre la fuente de luz y el aparato fotosintético, dándole una tonalidad verderosácea y permaneciendo en esta disposición mientras persista la iluminación; cuando ésta desaparece, los carotenoides gradualmente regresan a la zona central de la célula.¹¹⁸

2.4.3. Función antioxidante

Esta capacidad antioxidante de gran alcance de la Astaxantina proviene de su estructura molecular única de 11 enlaces dobles conjugados y dos grupos hidroxilos. Los carotenoides pueden ser caracterizados por su capacidad para interactuar con especies de oxígeno químicamente reactivas llamadas "oxígeno singlet", el cual participa en reacciones oxidativas las cuales pueden deteriorar o destruir importantes partes celulares, incluyendo membranas, enzimas y ácidos nucleicos (DNA). Los carotenoides son capaces de capturar especies de radicales libres tal como oxígeno singlet ($^1\text{O}_2$) así como oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$). La ventaja de los carotenoides en la neutralización física de las moléculas oxidantes de ($^1\text{O}_2$), es que pueden actuar como antioxidantes sin cambiar su propia estructura. Esta neutralización de $^1\text{O}_2$ se caracteriza principalmente por la disipación de energía (*) como calor (reacciones 1 y 2). La Astaxantina actúa como un antioxidante de amortiguamiento mediante la captura de especies de radicales libres tal como oxígeno singlet ($^1\text{O}_2$) así como oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$).



Mientras que en las reacciones de neutralización química entre carotenoides y radicales libres, como la oxidación de lípidos, hay una transferencia de electrones.⁵¹

El potencial antioxidante de la Astaxantina se ha demostrado en estudios *in vivo* e *in vitro*.^{24, 85}

2.5.IMPORTANCIA Y APLICACIONES DE LA ASTAXANTINA

El precio de la Astaxantina es de aproximadamente 2,500 dólares por kilogramo, con un mercado mundial estimado en 200 millones de dólares por año. Aunque más del 95% de este mercado consume Astaxantina sintética, actualmente los consumidores demandan productos naturales, haciendo a los pigmentos sintéticos menos deseables, lo que provee una oportunidad para la producción de Astaxantina natural.⁷³

Tabla 3. Principales aplicaciones de la Astaxantina.

Sector	Aplicación	Función	Fuente
Acuicultura	Salmon y trucha	Pigmentación	(Dominguez et al., 2005; Lawlor & O'Brien, 1995; Lorenz & Cysewski, 2000).
		Etapas del crecimiento	
	Peces marinos – Besugo	Pigmentación	
	Peces ornamentales	Pigmentación	
	Cultivos de camarón	Pigmentación	
Ornitología	Gallinas	Color yema de los huevos	(Inbarr, 1998)
	Pollos	Pigmentación	
Farmacéutica	Radicales libres	Antioxidante	(Barros et al., 2001; Guerin et al., 2003; Kamath et al., 2008; Mortensen et al., 1997; Naguib, 2000; Pashkow et al., 2008)
	Per oxidación	Antioxidante	
	Salud Humana	Anti-cancerígeno	
	Piel, ADN y retinas	Foto protector	

Fuente: (Armenta López Roberto Emeterio, 2002).¹¹

Los pigmentos carotenoides son de gran importancia para diferentes sectores, entre los que se destacan la acuicultura, la ornitología y la industria farmacéutica, desempeñando funciones vitales en la fisiología y la salud de diferentes especies

biológicas. En la Tabla 3 se muestra un resumen de las principales aplicaciones de la Astaxantina.

Estudios recientes señalan otras propiedades de la Astaxantina con potencial aplicación en las industrias farmacéutica y cosmética tales como su elevada actividad antioxidante, excelentes propiedades como agente fotoprotector (luz UV), propiedades para la salud ocular, de la piel, del corazón y a nivel celular y otros usos potenciales como anti-inflamatorio, anti-cancerígeno, desintoxicante, en enfermedades neurodegenerativas y en la respuesta inmune. Las industrias anteriormente mencionadas han encontrado numerosas ventajas en la utilización de Astaxantina natural frente a la sintética en sus aplicaciones, lo que ha generado un aumento en la demanda de este producto natural e impulsado el uso de microorganismos capaces de sintetizar Astaxantina.⁴⁹

3. TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

La trucha “arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*), es una especie íctica perteneciente a la familia Salmonidae, originaria de las costas del Pacífico de América del Norte, que debido a su fácil adaptación al cautiverio, su crianza ha sido ampliamente difundida casi en todo el mundo. En América del Sur, se encuentra distribuida en Argentina, Brasil, Bolivia Chile, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela.⁸⁷

3.1.TAXONOMÍA

Tabla 4. Taxonomía de *Oncorhynchus mykiss*.

Reino	Animal
Sub Reino	Metazoa
Phylum	Chordata
Sub Phylum	Vertebrata
Clase	Osteichtyes
Sub Clase	Actinopterygii
Orden	Isospondyli
Sub Orden	Salmonidei
Familia	Salmonidae
Género	<i>Oncorhynchus</i>
Especie	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre común	“Trucha arco iris”

Fuente: (Pokniak 2000).⁹¹

3.2. CARACTERÍSTICAS

Esta especie se caracteriza por tener el cuerpo cubierto con finas escamas y de forma fusiforme (forma de huso), la coloración de la trucha varía de acuerdo al ambiente en que vive, edad, estado de maduración sexual y otros factores, como por ejemplo la influencia del ambiente en riachuelos sombreados presentan color plomo oscuro mientras que en un estanque bien expuesto a los rayos del sol ofrece una tonalidad mucho más clara, verde oliva en su parte superior luego una franja rojiza para finalizar con el abdomen blanco; además posee gran número de máculas negras en la piel, a manera de lunares, por lo que en otros lugares se le llama también trucha pecosa. La denominación de trucha arco iris se debe a la presencia de una franja de colores de diferentes tonalidades, con predominio de una franja rojiza sobre la línea lateral en ambos lados del cuerpo.⁸⁷

3.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS

3.3.1. Hábitad

El hábitad natural de la trucha son los ríos, lagos y lagunas de aguas frías, limpias y cristalinas; típicas de los ríos de alta montaña. La “trucha arco iris” prefiere las corrientes moderadas y ocupa generalmente los tramos medios de fondos pedregosos y de moderada vegetación. Son peces de agua frías, aunque el grado de tolerancia a la temperatura es amplio, pudiendo subsistir a temperaturas de 25°C durante varios días y a límites inferiores cercanos a la congelación.⁸⁹

3.3.2. Distribución

En el Perú se distribuye en casi todos los ambientes dulce acuícolas de la sierra, al haberse adaptado a los ríos, lagunas y lagos de las zonas alto andinas. Su distribución en los ríos se halla continuamente alterada por su gran movilidad, pues migran de una zona a otra, dependiendo de la estación del año, estadio biológico, de las horas del día, del tipo de alimento, épocas de reproducción, etc.⁸⁹

3.3.3. Predadores

En sus primeros estadios (ovas, larvas y alevines), tienen como predadores a otros peces de mayor tamaño, las aves, como la gaviota y la garza gris. Al estado adulto, es capturada por el hombre.⁸⁹

3.3.4. Alimentación

La trucha es un pez de hábito carnívoro y se alimenta en la naturaleza de presas vivas, como insectos en estado larvario, moluscos, crustáceos, gusanos, renacuajos y peces pequeños.⁸⁹

3.4. ETAPAS DEL DESARROLLO DE LA TRUCHA

El desarrollo biológico de la trucha comprende 5 etapas:

3.4.1. Ova

Son los huevos fecundados que son incubados en el nido construido por la hembra. La velocidad de desarrollo de los huevos depende en gran medida de la temperatura del agua. La óptima se sitúa entre los 8 y 12 °C. A una temperatura de 10 °C la eclosión del alevín será a los 31 días, mientras que a 15.6 °C la eclosión será a los 19 días. En la Figura 9 se pueden observar los huevecillos de la trucha arco iris.⁸⁸



Figura 9. Huevecillos de trucha arco iris.

3.4.2. Alevino

Al concluir el desarrollo embrionario, el alevín eclosiona y se alimenta de las reservas nutricionales contenidas en el saco vitelino durante dos o cuatro semanas, dependiendo de la temperatura. Una vez estas reservas han sido agotadas y el saco vitelino ha sido absorbido, el alevín se transforma en cría y asciende a la superficie; esta fase dura entre 14 y 20 días.⁸⁸



Figura 10. Alevino de trucha arco iris

3.4.3. Juvenil

En esta etapa los organismos tienen todas las características de los adultos; es decir, ya tienen hábitos propios de la especie, como ser activos y nadar contra la corriente, atrapar sus presas para alimentarse, haciéndolo con pequeños peces de otras especies, ranas, etc. Se diferencian de los adultos porque aún no han madurado sexualmente, presentando un periodo de crianza que fluctúa del 4 al 7 mes.⁸⁸

3.4.4. Comercial

Es la etapa especial, donde los peces han recibido el proceso de engorde para ser comercializados, estos miden 15 cm. a 22 cm. Con un peso de 100 a 200 gr.⁸⁸

3.5. USOS Y FUNCIONES DE LA ASTAXANTINA EN ACUICULTURA

El significativo papel de los carotenoides, principalmente del oxicarotenoide Astaxantina (3,3' dihidroxi- β , β -caroteno-4, 4'-diona) en la pigmentación y nutrición de una variedad de especies de crustáceos y peces es de interés global en la acuicultura. La Astaxantina es uno de los pigmentos más distribuidos y característicos de animales acuáticos, representando cerca del 99% del total de carotenoides presentes en salmónidos silvestres.^{16, 105}

3.5.1. Metabolismo de los carotenoides en salmónidos

El papel de la Astaxantina como un antioxidante metabólicamente activo es particularmente relevante en términos de fisiología animal acuática. Los mayores beneficios de las dietas fortificadas con Astaxantina varían significativamente ya que los requerimientos nutricionales están en función de los estadios del ciclo de vida de peces, demostrando importancia en estadios tempranos de desarrollo de peces, así como bajo condiciones de cultivo intensivo, donde los factores de estrés probablemente juegan un papel significativo. Otra consideración está relacionada con el uso cada vez mayor de alimentos acuícolas con alto contenido de lípidos (energía), con énfasis en posibles correlaciones entre niveles lipídicos y el metabolismo de carotenoides. Según estudios realizados se demostró que la Astaxantina dietaria presenta un efecto sobre el crecimiento, estatus de antioxidantes, química sanguínea e inmunidad en los salmónidos.

³¹ Los peces alimentados con una dieta sin suplementación de Astaxantina mostraron

claros signos de desnutrición, incluyendo apetito y crecimiento pobres. Además, se encontraron mayores concentraciones de retinol (10 veces) en el músculo e hígado de peces alimentados con dieta suplementada con Astaxantina. El estudio mostró que la interacción entre las vitaminas antioxidantes y la Astaxantina pudiera ser una importante función de la Astaxantina.¹³

3.5.2. Digestión y absorción

La absorción de los carotenoides es afectada por la digestión de pigmentos de distintas fuentes,¹¹¹ la presencia de grupos hidroxilicos¹¹⁰ y el grado de esterificación.⁹⁷

Las etapas involucradas en la óptima absorción de xantofilas son:

1. Liberación de xantofilas de la matriz alimentaria.
2. Transferencia de xantofilas de micelas de lípidos en el intestino delgado
3. Absorción de xantofilas por células de la mucosa intestinales y
4. Transporte de xantofilas o sus productos metabólicos en el sistema linfático.

En las truchas y salmones, la Astaxantina se encuentra en estado libre en el músculo y plasma, lo que indica que los ésteres de Astaxantina son hidrolizados en el tracto digestivo y que este pigmento se absorbe en su forma libre.^{103, 97, 111}

Niveles no detectables de Astaxantina mono y diésteres de digesta extraída del intestino del íleon y posterior sugieren que hidrólisis del éster ocurre principalmente en la región pilórica del tracto gastrointestinal. Las diferencias regionales en la hidrólisis del éster de Astaxantina a lo largo de la longitud del intestino de la trucha pueden resultar en una influencia de la velocidad de tránsito intestinal en la absorción de la Astaxantina de una fuente esterificada. Alimentación frecuente puede aumentar la tasa de tránsito gastrointestinal de la alimentación del bolo limitando la eficiente digestión y absorción de nutrientes, como se ha sugerido para energía, proteínas, lípidos y materia seca.^{104, 88, 23} Por consiguiente la hidrólisis de estos ésteres dentro del tracto gastrointestinal salmónido antes de absorción pueden ser un factor importante que limita la absorción y posterior deposición de Astaxantina natural ésteres.²⁵ Los carotenoides son absorbidos en el intestino anterior con grasa y se almacenan principalmente en las porciones de lípidos del

cuerpo. La absorción de Astaxantina ocurre principalmente en el ciego pilórico, mientras que la Cantaxantina se absorbe a lo largo de todo el tracto digestivo.^{110, 4} Aproximadamente el 80 por ciento de los carotenoides se distribuyen en los tejidos adiposos, con cantidades más pequeñas que se encuentran en el hígado, músculo, glándulas suprarrenales y los órganos reproductivos.¹¹²

3.5.3. Transporte

Trabajos realizados en salmonideos reportan que los carotenoides son transportados en la sangre, unidos mediante enlaces no covalentes, beta y alfa caroteno o licopeno, en su mayoría son transportados por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) y lipoproteínas de baja densidad (LDLs), mientras que la Astaxantina, Zeaxantina y Luteína, tienen más probabilidades de ser transportados por LDLs y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Siendo el hígado el mayor órgano metabólico. En una madurez sexual, el compuesto es transferido de la carne a la piel y gónadas.³⁷

3.5.4. Depósito y retención de Astaxantina

El depósito de Astaxantina ha mostrado variar en diferentes estadios de vida de la trucha arco iris.¹⁴ El almacenamiento en el músculo depende de varios factores como el metabolismo de los carotenoides por parte de los peces, la saturación de los sitios de fijación de pigmentos en los músculos; sin embargo, el factor más relevante parece ser la absorción de los pigmentos desde el intestino, de acuerdo a diferentes autores.^{75, 82} Además la retención de carotenoides en salmónidos puede depender sobre una variedad de factores, incluyendo la talla, especie de pez, la fuente de carotenoides y la concentración dietaria de carotenoides. Sin embargo la retención de carotenoides está influenciada positivamente por el contenido de lípidos en la dieta; esto significa que el coeficiente de digestibilidad aparente de la Astaxantina, es decir el aprovechamiento o absorción, aumenta con el contenido de lípidos de la dieta lo que da como resultado niveles más altos de carotenoides en la carne. También se ha observado que el tipo de lípidos y su digestibilidad afecta la concentración de carotenoides en los músculos; las grasas saturadas reducen la digestibilidad de los carotenoides y por lo tanto su incorporación en el músculo. La forma en que son fijados los pigmentos en la trucha difiere según el tejido, ya sea en la piel o en la musculatura. El pigmento se deposita en

la piel en forma de diéster reportando una concentración 10 veces más que los músculos, en los cuales la Astaxantina se encuentra en forma libre; esto se debe a los procesos metabólicos de absorción que ocurre en el intestino. En donde el carotenoide es transportado directamente a la piel y luego otra parte es sintetizado hacia los músculos.

27

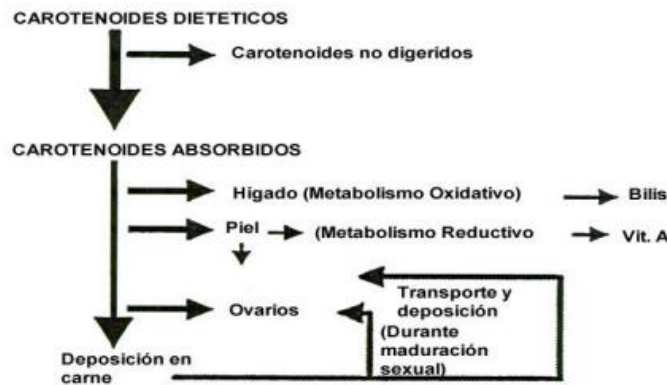


Figura 11. Metabolismo de carotenoides, Astaxantina y Cantaxantina en salmónidos.

La coloración rosada de los salmonídeos está dada por la presencia de carotenoides oxigenados en su tejido muscular, principalmente Astaxantina, aunque también se pueden encontrar pequeñas cantidades de otros carotenoides como Cantaxantina, Zeaxantina, Luteína, Capsantina, etc... Esta coloración, aunque depende de los pigmentos retenidos por el tejido muscular, no guarda una relación directa con la concentración muscular de carotenoides. A bajo nivel de carotenoides, la asociación es lineal entre la intensidad de pigmentación y la concentración muscular, sin embargo, por sobre los 3 a 4 mg/kg esta relación se pierde debido a que el ojo humano no tiene la sensibilidad para captar diferencias de pigmentación por sobre las concentraciones antes mencionadas.¹¹¹ Otro factor que influye sobre esta relación es la presencia de grasa intermusculares despigmentadas que, si se encuentran en alta cantidad, puede enmascarar la pigmentación visual de la carne. Así, se plantea que con un prolongado ayuno previo a la cosecha, movilizara estas grasas, y de este modo, se apreciaría una mejor pigmentación en el producto.¹¹²

La cantidad de Astaxantina dietética que se utiliza para la pigmentación rara vez supera el 18 % en trucha arco iris.¹⁰⁵ Esto puede explicarse por la pobre absorción desde el tracto intestinal (pérdidas fecales normalmente cuenta 30-70 % de la Astaxantina

dietética) y por la pobre retención de la Astaxantina absorbida en el músculo. Diversos estudios reportaron que sólo el 40 % de la Astaxantina absorbida se mantuvo en el músculo de la trucha arco iris.¹⁴ Esto puede explicarse por la extensa transformación metabólica. Respecto a la dieta, los valores observados para el coeficiente de digestibilidad, expresado como la diferencia entre los carotenoides ingeridos y excretados, fluctúa entre un 40 a 60 %, mientras que la capacidad de retención, definida como la proporción de lo ingerido que es retenido en la carne o en el cuerpo como un todo, se estima entre un 4 a 20 %. La Astaxantina libre es utilizada más eficientemente que la Cantaxantina, siendo el coeficiente de retención entre 1,3 y 1,5 veces mayor para la primera, en parte esto se explica por diferencias en la digestibilidad y a que la Astaxantina se une más fuertemente a la actomiosina en el músculo que la Cantaxantina. También le da a la carne un color más rojizo que la Cantaxantina a niveles comparables de concentración de carotenoides en carne. En cuanto a la conservación, los dos carotenoides tienen una estabilidad comparable durante el almacenamiento de productos congelados; se ha informado de pérdidas cercanas al 5 % de ellos en filetes envasados al vacío y guardados a - 20° C durante seis meses.¹⁰⁵

3.5.5. Excreción

Se han encontrado altas concentraciones de metabolitos de Astaxantina en riñón, hígado y biliares tras la administración oral de carotenoides marcados radiactivamente ²⁶.¹¹³ Una alta actividad radiactiva específica se encuentra en la bilis después de alimentar con Astaxantina marcada con ¹⁴C y Cantaxantina de salmón Atlántico y trucha arco iris, respectivamente, pero las concentraciones de carotenoides intactos son bajas.^{52, 34, 109} En estudios realizados en el 2003 se midieron la absorción de carotenoides hepática en trucha arco iris mediante el uso de un modelo de perfusión de órganos aislados y se encontraron cocientes de baja extracción hepática (3-7 %) y una absorción de carotenoides saturable. Por lo cual llegaron a la conclusión que las tasas de captación carotenoides fueron limitadas por la tasa de endocitosis mediada por receptores de moléculas de lipoproteínas.³⁴ El índice hepatosomático es cerca de 1 % en la trucha arco iris.^{42, 93}

3.5.6. Reproducción

Los carotenoides también influyen en el sistema endocrino, en relación al desarrollo gonadal, y maduración, fertilización, eclosión, viabilidad y crecimiento en

peces y crustáceos.⁶⁵ Las especies de truchas jóvenes acumulan pigmento en el músculo y una vez alcanzada la madurez sexual dicho pigmento es movilizado y transferido desde el músculo hacia la piel otorgando a los machos sexualmente maduros su color característico y así atraer a las hembras de su especie, las cuales acumulan el pigmento en los huevos.⁹⁸

3.5.7. Precursores de vitamina A

En estudios realizados por un grupo de científicos mencionan que los peces alimentados con una dieta a base de caseína sin suplemento de Astaxantina (15 mg/kg) mostraron 18 % de sobrevivencia comparado con una mayor sobrevivencia del 90 % de los peces alimentados con dietas con Astaxantina. Así mismo se encontró que la Astaxantina tiene un efecto sobre la concentración de la vitamina A de este carotenoide en huevos de salmónidos indicando un mayor potencial de función de provitamina A comparado con β -caroteno durante el período de primera alimentación. Concluyendo que la Astaxantina fue esencial para los alevines de trucha durante el primer período de alimentación.¹⁰⁹

3.5.8. Promotor de crecimiento

Cantaxantina o Astaxantina debe considerarse como una vitamina para los peces y todas las dietas de peces deben añadirse con Cantaxantina o Astaxantina en un nivel superior a 10 mg. En la primera alimentación en dietas para acuicultura y en la fecundidad de reproductores.¹⁰⁹ Varias pruebas alimenticias han mostrado que los carotenoides precursores de la Astaxantina y la propia Astaxantina mejoran la eficiencia alimenticia, aceleran la tasa de crecimiento y mejoran la sobrevivencia larvaria,¹¹⁴ así como también se ha demostrado que incrementan la supervivencia de los huevos y el porcentaje de huevos fertilizados, protegiéndolos contra condiciones extremas.³⁴

3.6. FACTORES QUE AFECTAN LA PIGMENTACIÓN DE LOS PECES

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

3.6.1. Factores fisiológicos

3.6.1.1. Factores genéticos

La habilidad de los salmónidos para depositar pigmentos en su musculatura varía tanto entre especie como entre individuos de una misma especie. La variabilidad entre especie se puede apreciar fácilmente al observar la concentración de carotenoides musculares en salmónidos silvestres, reportando en mg/kg de peso, 1 a 3 en trucha arco iris, 3 a 11 en salmón del Atlántico y 9 a 21 en salmón coho. Esta diferencia también se observa en salmónidos de crianza artificial aunque fluctúan en rangos menores, (3 a 12 mg/kg), ¹⁰² determinado por la administración artificial de pigmentos.⁹⁷ 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.⁶

3.6.1.2. Tamaño de los peces

Estudios realizados por Torrissen en 1989 ¹¹¹ plantean dos modelos hipotéticos para la retención del pigmento entregado a los peces. En el primer modelo habría un incremento lineal de la concentración de carotenoides en el músculo a medida que los peces aumentan de peso, por lo tanto la retención también aumentaría, pero este modelo está sustentado en estudios de corta duración o con peces de baja tasa de crecimiento específica (TCE), no representando por lo tanto el depósito de pigmentos y la tasa de retención en todo un ciclo de producción. ¹¹¹ El segundo modelo plantea que la retención es constante a través de todo el ciclo de producción, predice un rápido incremento en el depósito de pigmento en peces más pequeños y alcanza una asíntota cuando los peces son más grandes (0,5-1,0 kg en truchas arco iris), así este último modelo sugiere que los programas de pigmentación pueden partir temprano en el ciclo de producción y que la concentración de pigmento en la dieta determina la pigmentación final en el músculo. ¹¹¹

3.6.1.3. Maduración sexual

Durante este período, en las hembras los carotenoides se desplazan más a los ovarios para ser depositados en las ovas, y en los machos se movilizan principalmente a la piel, donde al parecer tendría una función conductual de ritual reproductivo para la hembra.¹¹¹ Además, durante la maduración sexual, tanto en las hembras como en los

machos hay un mayor desarrollo gonadal. Esta pérdida de carotenoides en el músculo de los peces maduros puede llegar a un 60 %, en comparación con su contenido muscular previo,⁷⁸ sin embargo, éste puede ser disminuida con aportes relativamente altos de carotenoides en el alimento durante los meses previos a la época de desove.¹⁰⁵

3.6.1.4. 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, disminuirán 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.⁶

3.6.2. Factores dietarios

Existen diversos factores que afectan la pigmentación de los salmónidos, sin embargo uno de los factores más importantes es la composición de la dieta proporcionada a los peces.^{114, 83} El contenido de carotenoides en la dieta, es el factor determinante de la concentración de éstos en el tejido muscular de los salmónidos. 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 está determinada por el tipo, calidad y composición de ingrediente que se utilicen, la formulación de la dieta y por los métodos de procesamiento empleados en su elaboración. El tipo de ingrediente y su nivel en la ración influirá en la composición nutricional del alimento, así como en su presentación.

21

3.6.2.1. Lípidos

La cantidad de lípidos en la dieta ha demostrado tener influencia sobre el depósito de pigmentos en el tejido muscular. La absorción de carotenoides mejora cuando se eleva el nivel de lípidos de alto punto de fusión en la dieta de los salmónidos; disminuyendo la digestibilidad de los carotenoides y por consiguiente, su retención en el tejido muscular.¹¹⁴ 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.²¹

3.6.2.2. 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.³ 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.⁵

3.6.2.3. Tipo de pigmento

La Astaxantina libre es utilizada más eficientemente que la Cantaxantina, siendo el coeficiente de retención entre 1,3 y 1,5 veces mayor para la primera, en parte esto se explica por diferencias en la digestibilidad ya que la Astaxantina se une más fuertemente que la Cantaxantina a la actomiosina en el músculo. También le da a la carne un color más rojizo que la Cantaxantina a niveles comparables de concentración de carotenoides en carne.¹⁰⁵

3.6.2.4. Periodo de entrega del alimento

La tasa de retención de pigmento se puede optimizar haciendo largos 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.⁶

3.6.3. Factores externos

3.6.3.1. Temperatura del agua

Las truchas arco iris, como todos los peces (excepto los atunes, por ejemplo, que tienen una temperatura corporal algunos grados mayor que la del agua), son animales poiquilotermos (“de sangre fría”), es decir que no tienen la capacidad de regular su temperatura corporal como las aves y mamíferos; debido a ello cuando aumenta la temperatura del agua también aumenta la actividad de las truchas, comen más y se desarrollan con rapidez. Es decir que dentro de los límites óptimos debe tratarse de criar a las truchas a temperaturas cercanas al máximo: 13 - 15 °C. Por lo que no hay diferencias

en concentración y retención de carotenoides con agua a 15°C en comparación a una de 5°C; sin embargo, los compuestos sintetizados derivados de carotenoides se absorben más eficientemente y logra pigmentar las truchas arco iris en menos de la mitad del tiempo cuando la temperatura del agua se mantiene a 15°C, ya que las bajas temperaturas disminuyen el consumo y la tasa metabólica en los peces, afectando la absorción y posterior depósito de los pigmentos.⁶

3.6.3.2. 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 micro algas son estresantes para los peces por lo tanto, mientras estas condiciones se mantengan cerca del nivel óptimo, favorecerán el rendimiento del proceso de pigmentación.⁶

3.6.3.3. Salinidad

Estudios de la influencia de la salinidad en la retención de pigmento han sido contradictorios. Las truchas arco iris mantenidas en agua salada tienen mejor retención de pigmento en el músculo y otros tejidos muestran que truchas arco iris presentan mayor retención de Astaxantina cuando han sido cultivadas en agua dulce que salada.²⁷

3.7. EVALUACIÓN DE PIGMENTACIÓN EN TRUCHAS

Para la industria truchera es importante poder clasificar a las truchas por el color que presenta su músculo en forma rápida y económica.²⁹ Para lograr esto se usan fundamentalmente dos métodos para evaluar el color: Uno basado en la evaluación visual, que es una medición cualitativa que consiste en comparar el color del filete con cartillas de color estandarizadas y el otro basado por una evaluación instrumental o medición cuantitativa que consiste en una medición instrumental del color usando espacios de color predefinidos por la comisión internacional para la iluminación. La pigmentación se determina por el análisis cuantitativo de los pigmentos carotenoides presentes en los músculos.²⁷

3.7.1. Expresión visual

La medición visual del color es usada tanto para clasificar a los peces en plantas de proceso para su posterior comercialización, como para medir color en estudios de investigación. Para la evaluación visual del color se usa la cartilla Roche™ o el abanico colorimétrico Salmo-Fan®, este último ha sido reemplazado por la regla Salmo-Fan® por razones de manejo. La cartilla Roche™ tiene una gama de colores de 11 a 18, fue creada basada en salmón del Atlántico; el gran inconveniente de esta cartilla son las limitadas alternativas de color que presenta, y que ha llevado a utilizar colores intermedios no impresos tales como 16,5 o 17,5. *Salmo-Fan®* (regla y abanico) se lanzó al mercado en 1997 para reemplazar a la cartilla Roche, tiene una gama más amplia de colores que va desde el 20 al 34, lo cual permite una mejor estimación de la coloración del filete,⁹¹ sin embargo, a pesar de esto, la cartilla Roche se sigue utilizando en algunas plantas de proceso del país. Este método, además de ser simple y rápido, es importante porque los consumidores deciden su compra en base a la apreciación visual del color del filete.⁸ La evaluación visual tiene limitaciones, ya que está sujeta a factores ambientales como calidad y tipo de luz, color de fondo, además de ser un método subjetivo, es decir, dos medidores con visión normal y bajo las mismas condiciones de iluminación pueden clasificar un mismo filete en dos categorías diferentes.¹⁰¹ Es recomendable que la evaluación visual se lleve a cabo en el exterior, con luz de día y de cara al norte, pero por motivos prácticos dentro de las plantas de proceso se recomienda el uso de cabinas de iluminación controlada.⁸

El ojo humano es capaz de captar diferencias de color relativamente pequeñas, pero tiene habilidad limitada para separar matices cuando el color es muy intenso, es decir, tiende a no discriminar cuando la concentración de pigmento en el músculo es alta; además el cerebro humano tiene limitada habilidad para recordar y describir el valor absoluto del color observado.¹⁰¹

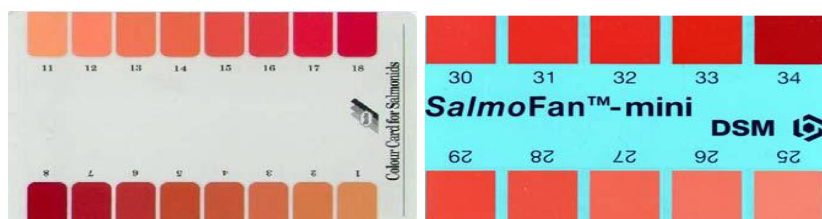




Figura 12. Cartilla Roche™ (izquierda), *Salmo-Fan*™ mini (derecha) y regla *SalmoFan*™ (abajo). Foto gentileza de C. Araneda.

3.7.2. Expresión instrumental

La medición instrumental se ha utilizado principalmente en estudios de investigación en la medición de carne fresca de salmón debido a que ofrece resultados objetivos, cuantitativos y a que sus resultados son independientes de la iluminación del lugar donde se lleva a cabo la medición. Los fotocolorímetros miden la luz reflejada por la muestra de músculo y la comparan con un estándar de calibración blanco, permitiendo representar el color en tres ejes o componentes de cromaticidad conocidos como espacios de color. Los espacios de color usados para la medición de la carne de salmónidos son $L^*a^*b^*$ y $L^*C^*h^*$ (CIE, 1986), este último espacio de color permite una mejor comparación del color evaluado en relación con el percibido por el ojo humano.¹⁴ Está demostrado que a medida que el color rojo anaranjado de los salmónidos es más intenso, L^* y h^* disminuyen, mientras que a^* , b^* y C^* aumentan.^{83, 30} El método visual tiene correlaciones más altas que el fotocolorímetro cuando la concentración de pigmento aumenta; sin embargo, ninguno de los dos métodos es un buen predictor de la concentración de pigmentos.³⁰ Para que el sistema instrumental preste mayor utilidad, no basta sólo con la objetividad, sino que además este método debe ser más preciso que las evaluaciones visuales realizadas con cartilla o regla. También es deseable que los distintos parámetros que entrega el fotocolorímetro muestren una alta correlación con la medición visual, de manera que sea posible relacionar estos parámetros con la percepción visual del color.⁸³

3.8. EXPRESION FINAL DEL COLOR

Como ya antes se han mencionado, son muchos los factores que determinan 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.⁶ Existen grandes diferencias entre las especies de salmónidos en la capacidad de absorber y depositar Astaxantina en el músculo, la trucha arco iris es mucho más eficiente que salmón coho y este, a su vez, es más eficiente que salmón del Atlántico.⁶ Por esta razón, los valores ideales de color para cada una de estas especies es diferente, alrededor de 32-34 o 16,5-17 para trucha, 30 o 16-16,5 para salmón Coho y 26 o 14,5-15 para salmón del Atlántico, correspondiendo el primer valor a la regla de Salmo-Fan™ y el segundo a la cartilla Roche.⁹

4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

4.1. Fundamentos y principios

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. La separación se da por un proceso dinámico de migración diferencial, donde las sustancias de la mezcla analizada presentan movibilidades en fase móvil a causa de diferencias de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica. Las sustancias individuales así separadas se pueden identificar o determinar mediante procedimientos analíticos.⁴⁰

Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cual fue presentada por el Prof. Horvath en 1970.⁶² La cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR), o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Los compuestos que se van a analizar se disuelven en un disolvente adecuado, y la mayoría de las separaciones tiene lugar a temperatura ambiente. La popularidad de esta técnica se debe a su gran sensibilidad, excelente capacidad para el análisis de trazas (en muchos casos ppb), su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo.⁶²

4.2. Equipo para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica de separación, un detector y un dispositivo de recolección de datos como, por ejemplo, una computadora, un integrador o un registrador, como se observa en la Figura 13.

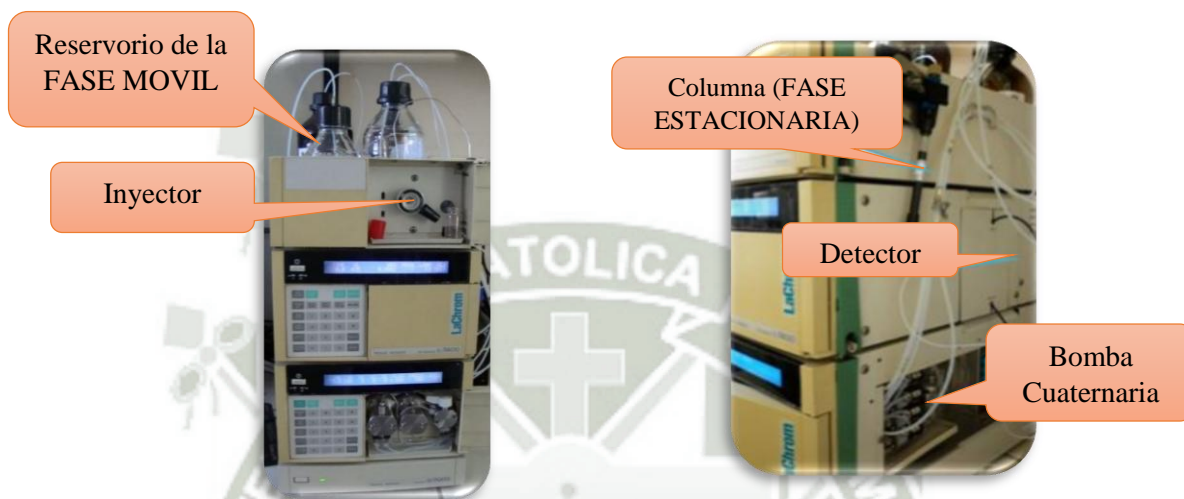


Figura 13. Esquema de los componentes de un equipo de HPLC.

El analito se pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna.

El retardo se conoce como tiempo de retención, único para analito. Depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil. Los solutos más comunes usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada con líquidos orgánicos, los más comunes son metanol y acetonitrilo, también suelen usarse sales y buffers para contribuir a la separación de componentes. También se usa el ácido trifluoracético para actuar como formadores de pares iónicos. Estas combinaciones introducen el concepto de gradiente de elución. Consiste en la variación de la composición de la fase móvil, para adaptarse a los diferentes analitos y conseguir mejores resultados. El gradiente separa la matriz del analito en función de la afinidad del analito

por la composición de la fase móvil. Cada analito tiene un gradiente de elución óptimo para obtener la máxima separación de picos en el detector.⁴⁰

4.2.1. Reservorio de la fase móvil

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse “dentro de la caja negra” de un equipo integrado o externamente en un equipo modular, y en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia esta, manteniendo llenas las conexiones.⁶²

4.2.2. Sistema de bombeo

La fase móvil puede ser un solvente pero una mezcla de solventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome solventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado.⁴⁰ El sistema de bombeo, administra cantidades exactas con un flujo constante y continuo de fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna mediante uniones adecuadas para altas presiones. El sistema consta de una o varias bombas reguladoras controladas por computadora que pueden programarse para variar la relación entre los componentes de la fase móvil, según se requiera para la cromatografía en gradiente o para mezclar la fase móvil en corridas isocráticas. Sin embargo, cuando los solventes de la fase móvil son mezclados previamente, se puede controlar con mayor exactitud. Las presiones operativas son típicamente de hasta 5000 psi o más, con velocidades de flujo de hasta aproximadamente 10 mL.min⁻¹. Las bombas empleadas para el análisis cuantitativo deben construirse con materiales inertes a los componentes corrosivos de la fase móvil y ser capaces de bombear la fase móvil hacia la válvula inyectora a una velocidad constante, con fluctuaciones mínimas, durante periodos de tiempo prolongados.^{40, 62}

4.2.3. Inyectores

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiadas, los compuestos que se van a ser cromatografiados se inyectan a la fase móvil ya sea manualmente usando jeringas o mediante el uso de inyectores automáticos.⁴⁰ La válvula inyectora permite la introducción (inyección) en el flujo de la fase móvil, de la muestra

(mezcla de analitos) contenida en un aro o loop de volumen calibrado, antes de entrar en la columna.⁶² Los inyectores deben presentar las siguientes características:

- Debe ser fácil de operar.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

4.2.4. Columnas

Este es el corazón del sistema HPLC, esto produce una separación de los analitos en mixtura. La columna es el lugar donde la fase móvil está en contacto con la fase estacionaria, formando una interfaz con una superficie enorme. La mayor parte del desarrollo de cromatografía en los últimos años se dirigió hacia el diseño de muchas maneras diferentes para mejorar este contacto interfacial.⁶² La separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba, entre la fase móvil polar y la fase estacionaria apolar (descrito como cromatografía líquida de fase normal). Las fases estacionarias para la cromatografía de líquidos en fase reversa, constan normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. Las partículas son generalmente de 3 μm a 10 μm de diámetro. La polaridad de la columna depende de la polaridad de los grupos funcionales unidos, que varía desde el octadecilsilano relativamente no polar a grupos nitrilo muy polares.⁴⁰

4.2.5. Detectores.

Este es un dispositivo para el registro continuo de propiedades físicas específicas (a veces químicas) de la columna.⁴⁰ Luego que se produce la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector.⁴⁰ Los detectores espectrofotométricos constan de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación, lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía.⁴⁰ Si el analito absorbe mayor que el de fondo (fase móvil), se obtiene una señal positiva.⁶² Pueden obtenerse con facilidad detectores de longitud de onda fija, variable y múltiple. Los detectores de longitud de onda fija operan a una sola longitud de onda, habitualmente a 254 nm, emitida

por una lámpara de mercurio de baja presión. Los detectores de longitud de onda variable contienen una fuente de luz continua, como una lámpara de deuterios o de xenón de alta presión y un monocromador o un filtro de interferencia para generar radiación monocromática a una longitud de onda seleccionada por el operador. Los detectores de longitud de onda múltiple (red de diodos) miden la absorbancia a dos o más longitudes de onda simultáneamente. Estos detectores adquieren los datos de absorbancia a lo largo del intervalo total UV-visible.⁴⁰

4.2.6. Sistema de toma y procesamiento de datos:

El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la de un gráfico o cromatograma, de cuya interpretación puede extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que podemos citar.⁶²

a. Registrador

Con la señal enviada por el detector, el registrador realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo denominado cromatograma. Idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El registrador calcula además el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia.⁴⁰ Integrador, que permite no solo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento matemático para el cálculo de concentraciones.

b. Sistema de control

Sistema basado en una computadora que controla todos los parámetros del instrumento de HPLC (composición del eluyente, la temperatura, la secuencia de inyección, etc.)⁶² y que permite con el software apropiado tanto el registro gráfico del cromatograma como los cálculos apropiados, la manipulación de datos, el almacenamiento de ensayos, generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatografos.

4.3. Parámetros relevantes

Un parámetro importante es el tiempo de retención de un componente, que se refiere al tiempo transcurrido, entre el instante en que se introduce la mezcla y el instante en que se detecta la señal propia del componente en su máxima intensidad. Los tiempos de retención no son reproducibles, ni siquiera en una misma columna cromatográfica. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil.⁶² Del mismo modo, la composición de la fase móvil influye significativamente en el desempeño cromatográfico, y en la resolución de los compuestos de la muestra. Para el trabajo cuantitativo exacto deben emplearse reactivos de alta pureza y disolventes orgánicos de “grado HPLC”. El agua de calidad adecuada debe tener una conductividad baja y una absorción UV baja.^{40, 62}

Por otra parte, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir el trayecto y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y que produzcan inestabilidad en la señal del detector. Para evitar las obstrucciones, los solventes y muestras a inyectar se filtran con membranas de 0.45 a 0.22 μm .⁶² Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasificadores de solvente por vacío o por burbujeo con He, y en el caso de no contar con los mismos, se deben desgasificar los solventes por medio de ultrasonido o agitación bajo vacío antes de utilizarlos como fase móvil.⁶²

- Tipos de técnicas de HPLC

Los cuatro tipos principales de técnicas de HPLC. La principal característica que define la identidad de cada técnica es el tipo dominante de las interacciones moleculares empleados, hay tres tipos básicos de las fuerzas moleculares: fuerzas iónicas, fuerzas polares, y de dispersión fuerzas. Cada técnica específica aprovecha cada una de estas fuerzas específicas:⁶²

- Fuerzas polares son el tipo dominante de las interacciones moleculares empleados en cromatografía de fase normal.
- Fuerzas de dispersión son empleados en cromatografía en fase inversa.
- Fuerzas iónicas están empleados en cromatografía de intercambio iónico.

La cuarta técnica, cromatografía de exclusión por tamaño, se basa en la ausencia de interacciones específicas del analito con la fase estacionaria.

4.4. Tipos de técnicas de HPLC

4.4.1. Cromatografía de fase normal (NP HPLC)

Explora, mide las diferencias en la fuerza de las interacciones polares de los analitos en la mezcla, con la fase estacionaria. Cuanto más fuerte es la interacción analito-fase estacionaria, mayor será la retención del analito. Al igual que con cualquier técnica de cromatografía líquida, la separación NP HPLC es un proceso competitivo. Las moléculas del analito compiten con las moléculas de fase móvil para los sitios de adsorción en la superficie de la fase estacionaria. Cuanto más fuerte es la interacción de la fase móvil con la fase estacionaria, menor es la diferencia entre las interacciones de la fase estacionaria y las interacciones analito, y por lo tanto menor es la retención del analito.⁶² La utilización de NP HPLC como el método de cromatografía de elección, suele estar relacionada con la solubilidad de la muestra en determinadas fases móviles.⁴⁰ La fase móvil en la NP HPLC son a base de solventes no polares (como el hexano, heptano, etc.) con la adición de pequeñas cantidades de modificadores polares (es decir, el metanol, etanol). Variación en la concentración de los modificadores polares en la fase móvil permite el control de la retención del analito en la columna. Los típicos aditivos polares son alcoholes (metanol, etanol isopropanol) añadido a la fase móvil en cantidades relativamente pequeñas.⁶² Los materiales de empaque tradicionalmente utilizados en NP HPLC suelen ser óxidos porosos como sílica (SiO₂) o alúmina (Al₂O₃). La superficie de estas fases estacionarias se cubre con la densa población de los grupos OH, lo que hace de estas superficies altamente polares. La retención de los analitos en estas superficies es muy sensible a las variaciones de la composición de fase móvil.^{40, 62} Las fases estacionarias químicamente modificadas, también se pueden utilizar en NP HPLC. Sílice modificada con trimetoxiglicidopropilsilanos (Nombre común: fase-diol), es el típico material de empaque con la polaridad de superficie reducida. La densidad superficial de grupos OH en la fase-diol está en el nivel de 3-4 $\mu\text{mol.m}^{-2}$, mientras que en sílica pura la densidad superficial de silanoles está en el nivel de 8 $\mu\text{mol.m}^{-2}$. El uso de la fase estacionaria tipo diol y eluyentes modificadores de baja polaridad [ésteres (acetato de etilo) en lugar de alcoholes] permiten aumentar la robustez en la separación y la

reproducibilidad, en comparación con silica pura.⁶² La utilización de NP HPLC como el método de cromatografía de elección, suele estar relacionada con la solubilidad de la muestra en determinadas fases móviles.⁴⁰ Por lo que es considerado el método de elección de los compuestos altamente hidrofóbicos (que puede demostrar una interacción muy fuerte en cromatografía en fase inversa), que son insolubles en solventes polares o acuosos.⁶² Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta. El mayor inconveniente de NP se debe a la alta actividad del material de relleno, que tiende a absorber agua y solventes polares en su superficie. Como consecuencia, su comportamiento puede modificarse en detrimento de la reproducibilidad de resultados.⁴⁰

62

4.4.2. Cromatografía de fase reversa (RP HPLC)

A diferencia de la cromatografía de fase normal, la cromatografía de fase inversa emplea principalmente fuerzas de dispersión (o interacciones hidrofóbicas de Van der Waals). Las polaridades de las fases móviles y estacionarias se invierten, de manera que la superficie de la fase estacionaria en RP HPLC es hidrófoba y la fase móvil es polar, donde principalmente las soluciones a base de agua son empleadas.⁶² El principio básico de este método está basado en las interacciones del disolvente polar, el analito no polar y la fase estacionaria no polar.⁴⁰ La adición de disolventes polares incrementa el tiempo de retención y añadir disolvente hidrofóbicos lo disminuyen. El tiempo de retención es mayor para moléculas no polares. Los adsorbentes empleados en este modo de cromatografía son materiales porosos, rígidos con superficies hidrofóbicas. En todos los modos de HPLC con interacciones positivas analito-superficie (NP, RP, IEX) cuanto mayor sea la superficie absorbente, más la retención del analito y en la mayoría de los casos mejor separación. La mayoría de los materiales de empaque utilizados en RP HPLC son sílica porosa químicamente modificada. La fase estacionaria típica es silicio tratado con RMe_2SiCl , donde R es una cadena lineal con un grupo alcalino. Las características del analito son importantes para sus propiedades de retención. Las moléculas muy grandes pueden causar que la interacción no sea completa. El tiempo de retención aumenta con el área de hidrofobicidad, que es inversamente proporcional al tamaño del soluto. Los componentes ramificados eluyen más rápido porque el área total está disminuida. Hay otros modificadores de la fase móvil que afectan a la retención del analito. Añadir sales inorgánicas causa incremento del tiempo de retención. El pH

también es importante porque modifica a la hidrofobia del analito. Por eso se suele usar un buffer como fosfato sódico para controlar el pH. Un ácido orgánico como ácido fórmico o ácido trifluoroacético. Sirven para muchas cosas, controlan el pH, neutralizan cualquier carga residual del silicato en la fase estacionaria y actúa como formador de pares iónicos para neutralizar la carga del analito. Los efectos varían pero aumentan la calidad de la cromatografía.^{40, 62}

RPLC es modo más popular de la cromatografía. Casi el 90 % de todos los análisis, de muestras de bajo peso molecular, se llevan a cabo usando el RPLC. Uno de los principales impulsores de su enorme popularidad, es la capacidad de discriminar compuestos relacionados muy estrechamente, la facilidad de variación de la retención y la selectividad. El origen de estas ventajas podrían ser explicadas desde un punto de vista energético; las fuerzas de dispersión empleadas en este modo de separación son las fuerzas intermoleculares más débiles, haciendo así muy baja la base general de la interacción energética en el sistema cromatográfico, comparado con otras técnicas de separación.⁶² Esta energía de bajo fondo permite distinguir diferencias muy pequeñas en las interacciones moleculares de analitos estrechamente relacionados. Como una analogía, es posible comparar dos técnicas espectroscópicas: UV y la espectroscopia de fluorescencia. En la espectroscopia de fluorescencia, los registros de emisiones de cero energía esencialmente contra la luz de fondo, hace que su sensibilidad en varios ordenes de magnitud sea más alta que en espectroscopia de rayos UV, donde la energía de fondo es muy alta. Una situación similar se encuentra en RP HPLC, donde su sensibilidad a la menor diferencia energética en las interacciones analito-superficie es muy alta, atribuida a la energía de fondo de baja interacción.⁶²

4.4.3. Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

Como su nombre lo indica, se basa en las diferentes afinidades de los iones del analito por los centros de carga iónica opuestos de la resina o contra-iones absorbido en la fase estacionaria hidrofóbica.⁶² Dependiendo de la carga de los centros de canje en la superficie, la resina podría ser intercambiador de aniones (centros iónicos positivos en la superficie) o intercambiador de cationes (centros negativos en la superficie).⁶²

Cuatro tipos principales de centros de intercambio iónico se suelen utilizar:

SO₃ → intercambiador catiónico fuerte

CO₂ → intercambiador catiónico débil

Amina cuaternaria → intercambiador aniónico fuerte

Amina terciaria → intercambiador aniónico débil

La retención del analito y selectividad en la cromatografía de intercambio iónico dependen en gran medida del pH y fuerza iónica de la fase móvil.⁶²

4.4.4. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

SEC es el método para la separación dinámica de las moléculas según su tamaño, como su nombre lo indica, la separación se basa en la exclusión de las moléculas desde el espacio poroso del material de empaque debido a su impedimento esférico. El radio hidrodinámico de la molécula del analito es el principal factor determinante de su retención. En general cuanto mayor sea el radio hidrodinámico, menor será la retención.⁶² Esta modalidad cromatográfica suele utilizarse tanto para la determinación del peso molecular y como la distribución de pesos moleculares y la dispersidad. La cromatografía de exclusión molecular es el modo cromatográfico más simple y predecible que requiere, en relación a las otras modalidades cromatográficas, menor esfuerzo en cuanto al desarrollo de los métodos de análisis. En general, es suficiente con seleccionar la columna que abarque el rango de pesos moleculares apropiado y un solvente que disuelva y solvate adecuadamente al analito. Por este motivo, la capacidad de picos está muy limitada, y obviamente, no tiene sentido el gradiente de elución que amplía esta capacidad en otros modos cromatográficos. Resulta claro que es el método más predecible, ya que todos los constituyentes de la muestra deben eluir entre el volumen de exclusión y el volumen de permeación total.^{40, 62} Si bien la operación en SEC aparenta ser bastante sencilla, en la práctica, suelen presentarse algunas dificultades. Por un lado, el cálculo del peso (o distribución) molecular de un polímero es una operación bastante compleja, aunque los integradores modernos disponen de algoritmos para el tratamiento adecuado de este problema. Por el otro, las adsorciones a los materiales de relleno que suelen presentar algunos biopolímeros complican bastante la interpretación de los cromatogramas. Todo mecanismo ajeno a la exclusión (adsorción, partición, intercambio iónico) debe ser evitado por una elección adecuada de la fase móvil.⁴⁰

CAPÍTULO II:

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se inició con la crianza de truchas en el Lago Titicaca mediante el sistema semintensivo, a su vez se realizó los controles en cuanto a peso, talla y coloración se refiere, en el “Centro de Desarrollo Pesquero C.E.D.E.PEZ”; que está ubicado en el distrito de Ojherani, región Puno.

Luego de la crianza de los peces se procedió a realizar la cuantificación de Astaxantina, la determinación de proteínas y lípidos en las diferentes muestras, las cuales se realizaron en el Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio (H-202) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, de la Universidad Católica de Santa María - Arequipa.

2. MATERIALES

2.1. Material biológico

- Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
- *Haematococcus pluvialis*, proporcionado por la empresa Andexs Biotechnology S.A.

2.2. Materiales para la fabricación de las jaulas

- Tubos galvanizados
- Cilindros de plástico
- Boyas amarillas

- Templadores
- Lastre
- Anclas
- Cuerdas
- Mallas

2.3. Materiales para la crianza de truchas

- Balsa.
- Termómetro
- Red de muestreo.
- Material de seguridad como botas, chaleco salvavidas y trajes de agua.
- Regla colorimétrica Salmo-Fan Roche®.
- Regla metálica.
- Balanza electrónica de uso doméstico PATRICKS – EK2151H.
- Balanza electrónica de uso doméstico CAMRY – EK2151H.
- Cuchillo y tijera para eviscerado.
- Guantes de goma.
- Bolsas ziploc.
- Cooler.

2.4. Materia prima

- Alimento comercial truchas engorde Naltech®.
- Alimento comercial truchas acabado Naltech®.

2.5. Materiales de laboratorio

2.5.1. Materiales de vidrio:

- Placas Petri.
- Beakers de 50 mL.
- Equipo de micro filtración al vacío.
- Fiolas de 5 y 10 mL.
- Erlenmeyer de 10 mL.

- Matraces Kjeldahl de 500 mL.
- Buretas.
- Probetas de 100 y 50 mL.
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL.
- Pipetas pasteur.
- Baguetas
- Frascos de vidrio de 20 mL, 100 mL, 200 mL y 500 mL.

2.5.2. Equipos y aparatos:

- Balanza analítica OHAUS Pioneer® PA214
- Espectrofotómetro UV/V, AGILENT CARY 60
- Baño de ultrasonido, BRANSONIC 2510
- Agitador Vortex Analog mixer.
- Centrífuga
- Sistema HPLC LaChrom. Compuesto por los siguientes módulos:
 - Detector: MERCK HITACHI UV L – 7400
 - Bomba: MERCK HITACHI L - 7100
 - Interface: MERCK HITACHI D – 7000
 - Columna: Chromolith® Performance RP – 18e (100x4.6 mm)
 - Software: EZChrom Elite
- Digestor y destilador Kjeldahl.
- Aparato de extracción Soxhlet.
- Estufa.
- Desecador

2.5.3. Otros materiales:

- Espátulas
- Plancha calentadora
- Mortero
- Filtros de membrana de microfibra de *vidrio* 47 mm, WHATMAN
- Filtros de jeringa de 100 mm 0.22 µm ANOTOP Millex

- Placas de aluminio de Silica Gel 60 F₂₅₄ de 20 cm x 20 cm
- Jeringa de inyección de 100 µL para HPLC
- Micropipeta automática de 200 – 1000 µL, BRAND

2.5.4. Reactivos:

- Hexano P.A. MERCK
- Acetonitrilo, grado HPLC. MERCK
- Metanol, grado HPLC. MERCK
- Acido orto – fosfórico, 85 % P.A. MERCK.
- Ácido sulfúrico 98 %. P.A. MERCK
- Sulfato de cobre pentahidratado. P.A.
- Zinc granulado.
- Hidróxido de sodio
- Sulfato de sodio anhidro
- Ácido bórico al 2%
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N
- Indicador Shiro Tashiro
- Eter de petróleo. P.A. SIGMA

2.5.5. Estándar de referencia:

Estándar de Astaxantina suministrado por la empresa Quimtia S.A (Lima, Perú)

3. MÉTODOS

3.1. Diseño y fabricación de jaulas

La crianza de las truchas se llevó a cabo en jaulas flotantes que fueron construidas de forma artesanal, formando una estructura cuadrada, estando unidos a boyas, cilindros de plástico, y sobre este sistema descansa la bolsa o vivero de cultivo, confeccionado de redes que tiene como objetivo confinar a la población de peces que se cría, en un ambiente controlado, y que cae hacia el fondo, cerrando por los lados. Todo el sistema fue anclado al fondo con templadores y lastres. (Ver Figura 14) También se diseñó un “techo” para la

protección contra predadores así como también para tratar de evitar la fuga por parte de los peces en cultivo.

La función de la jaula es la de retener los peces, permitiendo el intercambio de agua entre la jaula y el ambiente que la rodea. Esta función esta principalmente influenciada por el volumen, la forma y el material que se utiliza. El volumen de las jaulas es un factor importante a considerar ya que el tamaño y la biomasa de los animales “cambian” en el transcurso de la producción; al igual que varía las concentraciones de oxígeno y amonio disueltos en el agua que ingresa a la jaula, afectando al metabolismo de los peces de cultivo. Para favorecer la circulación de agua y reducir el riesgo de contaminación de los fondos que también es perjudicial para los peces, las jaulas deben ubicarse en lugares de al menos 15 m de profundidad; así mismo, se debe evitar zonas de corrientes fuertes para prevenir posibles daños y problemas de manejo con las jaulas.⁸⁰ El tamaño de las jaulas construidas tuvo un volumen de 2.097 m³ (1.4x1.4x1.07 m).

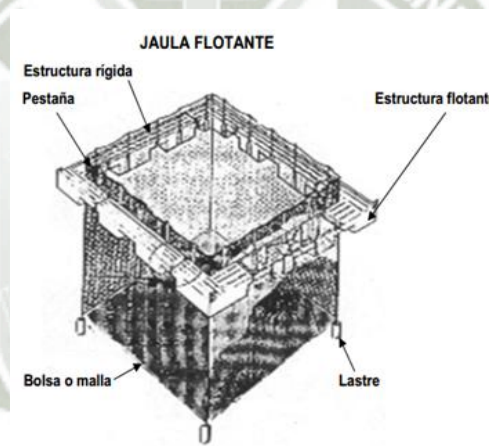


Figura 14. Diseño de jaulas flotantes.

3.2. Manejo de la alimentación

3.2.1. Alimentos balanceados

Para la alimentación de las truchas se empleó 2 tipos de alimentos balanceados comerciales de la marca Naltech® elaborado por la empresa Aquatech:

- Alimento balanceado acabado truchas Naltech®.
- Alimento balanceado engorde truchas Naltech®.

El alimento balanceado comercial truchas engorde y acabado Naltech® cuentan con las siguientes características nutricionales:

Tabla 5. Composición química de los alimentos balanceados engorde y acabado truchas Naltech®.

Nutrientes	Engorde	Acabado C/P
% Proteína, min	40	40
% Grasa, min	14	14
% Fibra, máx.	3.5	3.5
% Calcio, min.	1.2	1.2
% Fosforo, min.	1.0	1.0
% Ceniza, máx.	12	12
% Humedad, máx.	12	12
ED kCal/kg	3,500	3,500

Fuente: Empresa de alimentos acuícolas Aquatech® - Naletch

* Con la diferencia que el alimento balanceado truchas Acabado contiene 750 grs. de Astaxantina/TM de alimento.

3.2.2. Cálculos para determinar la dieta de las truchas

Las cantidades del alimento a administrar para cada jaula se determinaron mediante cálculos, usando tablas alimenticias como la tabla de factor de porcentajes para suministrar alimento seco (balanceado) en relación a la temperatura, peso y talla (Ver ANEXO I, Tabla 35). Así mismo se basó en la biomasa inicial, y posteriormente se fue ajustando esta ración alimenticia en base a los cambios de la misma.

Para asegurar que todo el alimento suministrado fuera consumido, se alimentó a las truchas en horas de la madrugada, durante toda la fase experimental

3.2.3. Estrategia de la pigmentación

Se usó como pigmento experimental el polvo de la microalga *Haematococcus pluvialis* que según los datos proporcionados por el distribuidor esta contiene Astaxantina en un 30 000 mg.kg⁻¹; a partir de esta concentración se realizaron diluciones en 3 diferentes concentraciones, el cual fue comparado con el pigmento comercial usado en el alimento balanceado truchas acabado Naltech®, que según los datos proporcionados por el fabricante de los pellets, estos cuentan con 75 mg.kg⁻¹ de Astaxantina. Sobre esta base se definieron los siguientes tratamientos:

Tabla 6. Cuadro de estrategia tratamientos.

Tratamiento	Descripción
1	Alimento truchas engorde Naltech® (sin pigmento)
2	Alimento truchas acabado Naltech® (pigmento comercial 75 mg.kg ⁻¹)
A	<i>Haematococcus pluvialis</i> 37.5 mg.kg ⁻¹
B	<i>Haematococcus pluvialis</i> 75 mg.kg ⁻¹
C	<i>Haematococcus pluvialis</i> 150 mg.kg ⁻¹

Fuente: Registro de investigación.

Los quistes de *Haematococcus pluvialis* a utilizar para el tratamiento del grupo A, B y C son las que se muestran en la Figura 15.

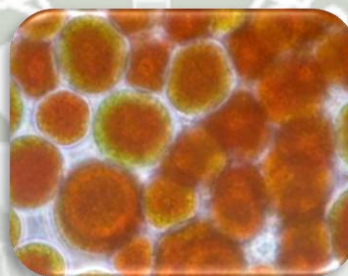


Figura 15. Quistes (aplanósporas) de *Haematococcus pluvialis*.

En la Figura 15 se observa el espesor de la pared de la aplanóspora (quistes).⁸⁰ Etapa donde se da la acumulación de Astaxantina. Con lo cual comprobamos morfológicamente que se está usando los quistes de *Haematococcus pluvialis*.

3.2.4. Preparación de dietas experimentales (Pellets)

Los cálculos para la formulación del pellet se realizaron en base a los datos de concentración proporcionados por la empresa Andexs Biotechnology (Astaxantina total contenida en el polvo *Haematococcus pluvialis* (30 000 mg.kg⁻¹) dado que en el momento no se disponía del equipo necesario para realizar la determinación cuantitativa de Astaxantina en dichas muestras.

El polvo de *H. pluvialis* contiene la siguiente composición (Tabla 7):

Tabla 7. Composición de biomasa de *Haematococcus pluvialis*

Componentes	%
Astaxantina	1.5 – 3.5
Proteína	15 – 25
Carbohidratos	30 – 40
Cenizas	2 – 4
Lípidos	20 – 35
Luteína	<0.5
β -caroteno	<0.5
Cantaxantina	<0.35

Fuente: ANDEXS S.R.L

La materia prima utilizada para la elaboración de las dietas experimentales, fue el alimento comercial para engorde de truchas Naltech®, el cual fue triturado y posteriormente se le incorporó las diferentes concentraciones del polvo de la microalga. El polvo de *Haematococcus pluvialis* fue previamente triturado y disuelto en una cantidad de aceite de pescado, considerado desde la formulación (dieta isolipídica). El repeletizado se realizó en las instalaciones del centro de desarrollo pesquero CEDEPES. Esta nueva formulación fue conseguida después de haberse realizado la molienda del alimento sustrato base engorde Naltech® y seguidamente se pesaron tres lotes de 6.3 kg para cada jaula, utilizando para esto una balanza marca PATRICKS con capacidad para 30 kg. Posteriormente se procedió a incorporar las diferentes concentraciones del polvo de *Haematococcus pluvialis* disuelto en aceite al alimento sustrato, homogeneizándola mediante el uso de una mezcladora marca Hobart con capacidad de 10 kg. Durante este proceso se adicionó un 18 % de agua con respecto al peso seco de la mezcla. La pasta resultante de cada lote, se colocó en una peletizadora manual para obtener pellets de 3.2 mm de diámetro por 5 mm de largo, para lo cual se usó una red de aluminio. Entre cada tratamiento se limpió la peletizadora para evitar contaminación entre las concentraciones del pigmento.



Figura 16. Procedimiento de la repeletización.

El producto obtenido fue etiquetado y posteriormente secado de manera extendida sobre papel kraft a temperatura ambiente de 10°C, durante 3 días. Tal como se puede apreciar en la Figura 17.



Figura 17. Secado del alimento repeletizado.

Una vez seco el alimento se puso en envases de papel, alejado de la luz del área donde fue almacenado. Tal como se muestra en la Figura 18



Figura 18. Alimentos rotulados

El alimento fue entregado de forma natural y diaria tanto para el grupo control como para los demás grupos que se evaluaron.

3.3. Determinación del universo a estudiar

Correspondiente a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), que fueron criadas en el Lago Titicaca en jaulas flotantes durante el año 2013. La población estudiada correspondió a 500 ejemplares. (Ver Figura 19).



Figura 19. Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

3.4. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas pre tratamiento

Antes de realizar la distribución del total de la población de peces; se realizó una evaluación preliminar, la cual consistió en muestrear cinco truchas de forma aleatoria, las cuales fueron sacrificadas, y posteriormente se realizó el control del tamaño y del peso utilizando una regla metálica y una balanza digital de 5 kg respectivamente. Luego se procedió a evaluar la coloración de los músculos de la trucha utilizando la regla colorimétrica Salmo-Fan.

3.5. Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio y en él se integró el manejo de cinco tratamientos, siendo uno de ellos el control. Se manejaron 500 ejemplares, que fueron repartidos en 5 jaulas experimentales. La fase experimental tuvo una duración de 51 días, precedidos de una fase de aclimatación de 11 días.

3.6. Obtención de las muestras

Una vez dividida toda la población de truchas y ya iniciado el tratamiento experimental, se procederá a extraer 4 muestras por cada jaula de forma aleatoria, semanalmente. (Ver Figura 20). Así mismo se contempló el manejo y seguimiento de las variables del incremento de biomasa y la determinación cualitativa del color adquirido en el músculo de los ejemplares.

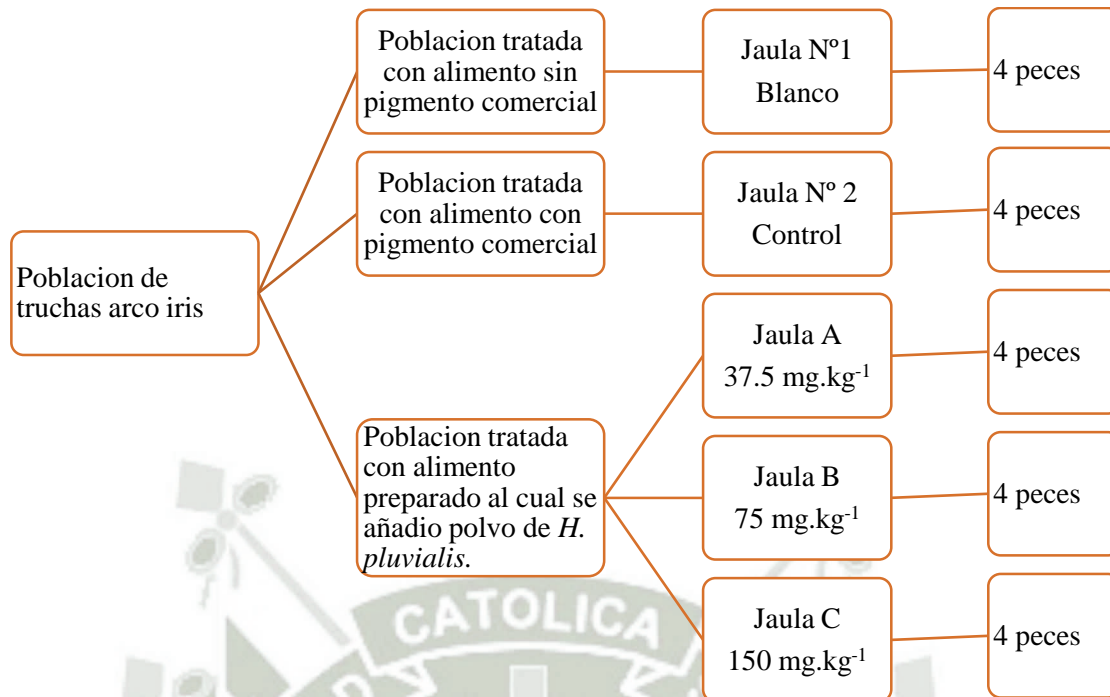


Figura 20. Estrategia de muestreo realizado para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con 5 tratamientos diferentes.

3.7. Análisis de las muestras

3.7.1. Evaluación del crecimiento de las truchas post-tratamiento

A las 20 truchas extraídas semanalmente se procedió a realizar una evaluación biométrica, que consiste en pesarlas utilizando una balanza digital de 5 Kg y medir su tamaño usando una regla metálica. (Ver Figura 21)



Figura 21. Evaluación del crecimiento de las truchas.

3.7.2. Evaluación sensorial del color

Luego de realizar la evaluación biométrica, las muestras fueron evisceradas hasta la condición de filetes TRIM C (filete sin piel, sin espinas, sin aletas dorsales y ventrales, rebaje en cola, en aleta ventral y espinal lateral dorsal y sin grasa peritoneal). A las cuales se midió el color presente en músculo, empleando la regla colorimétrica Salmo-Fan, (Ver Figura 22) esta regla contiene una escala de tonalidades definida desde un rango de 20 hasta 34 unidades, con una tonalidad pálida de color rosa para el número 20 hasta un color rojo intenso para la tonalidad 34 el cual incorpora una mejor comparación con los filetes de salmónidos. Un color favorable para competir en el mercado debe ser 27 unidades o superior a este valor.



Figura 22. Medición del color empleando la regla colorimétrica Salmo-Fan Roche®

Una vez que ya se finalizó la crianza de truchas. Se muestrearon 3 truchas por cada grupo, las cuales fueron evisceradas hasta la condición de filetes TRIM C y posteriormente fueron guardadas en bolsas ziploc, puestas en un cooler y transportadas al laboratorio en hielo.

3.8. Estandarización del método para la cuantificación de Astaxantina por HPLC

3.8.1. Método: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

3.8.2. Fundamento:

Técnica que se basa en la separación de los componentes de una mezcla, mediante la utilización de dos fases, una móvil y una estacionaria. Que en este tipo de cromatografía tiene lugar dentro de una columna empacada, el material de empaque está constituido por la fase estacionaria que es de gel de sílice al que se une químicamente del cloruro de octadecildimetilsilicio y forma una fase estacionaria estable y no polar, a la cual se

denomina de fase reversa (RP -18). Se emplea una fase móvil líquida como eluyente que es impulsada por una bomba. A medida que la fase móvil que contiene el soluto pasa a través de las partículas de la fase estacionaria, se produce el fenómeno de partición debido a la solubilidad relativa de los componentes analizados en las dos fases.¹¹⁶

3.8.3. Procedimiento

3.8.3.1. Elección de la longitud de onda óptima

Se empleó un espectrofotómetro UV/Vis para la elección de la longitud de onda que presenta una mayor absorción para la determinación de Astaxantina.

3.8.3.2. Desarrollo de los patrones cromatográficos

3.8.3.2.1. Preparación de la fase móvil

Se probaron diferentes proporciones y combinaciones de solventes: Metanol, acetonitrilo, diclorometano y agua a diferentes flujos.

Los solventes que conforman la fase móvil fueron desgasificados y filtrados al vacío a través de un filtro de membrana de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro. Para asegurar un adecuado funcionamiento del equipo, debido a que las partículas presentes en la fase móvil pueden bloquear las fritas y canales del instrumento. Una vez filtrada la fase móvil se transfirió a sus respectivos recipientes de vidrio con mucho cuidado evitando formar burbujas.

3.8.3.2.2. Preparación de los estándares

Se preparó dos soluciones: Una solución madre y otra solución stock del estándar de Astaxantina. Por lo que se pesó exactamente 500 µg del estándar de referencia, luego se transfirió a una fiola de aforo de 10 mL y se enrasó con acetonitrilo grado HPLC, obteniendo una solución madre de concentración 50 ppm, seguidamente se tomó una alícuota de 2 mL y se diluyó en una fiola de 5 mL y también se enrasó con acetonitrilo grado HPLC, dando una concentración de 20 ppm de solución stock. De la cual se tomaron alícuotas de 125, 250, 500, 1000, 1500 µL; las cuales se llevaron a un volumen final de 5 mL utilizando el acetonitrilo como solvente, obteniéndose concentraciones de 0.5, 1, 2, 4 y 6 ppm. Tal como se muestra en la Figura 23.

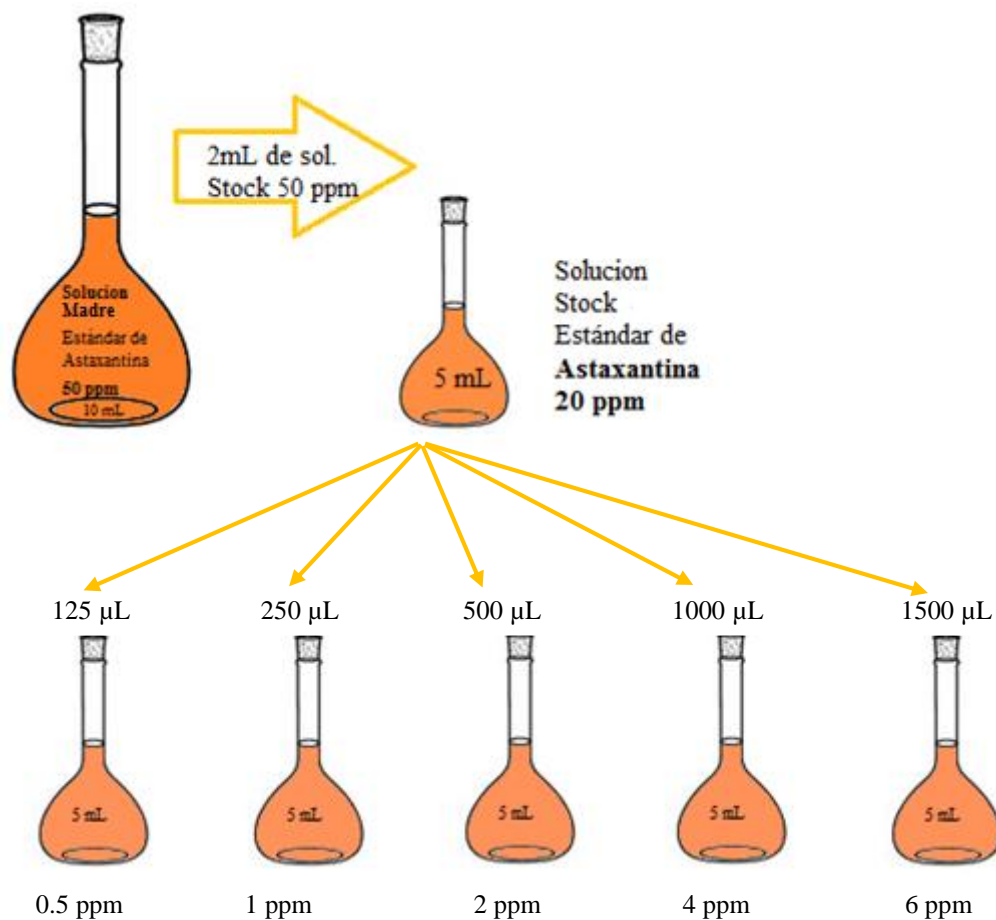


Figura 23. Preparación de la curva de calibración.

Estas soluciones estándar preparadas se filtraron a través de filtros Anotop®, obteniendo soluciones filtradas las cuales se colocaron en tubos eppendorf debidamente rotulados.

Una vez acondicionada la columna de HPLC con fase móvil a un flujo de 1.5 mL.min⁻¹ se procedió a inyectar un volumen de 20 µL de las soluciones anteriormente preparadas. La detección de los analitos se realizó a 275 nm de longitud de onda. Con los valores de las áreas obtenidas se constituyó la curva de calibración correspondiente, la cual fue sometida a un análisis de regresión lineal.

3.9. Parámetros de estandarización del método

3.9.1. Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Además conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de

analito para lo cual el método ha sido probado y dentro de los cuales se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar.

3.9.2. Precisión

Está relacionada con la dispersión de las medias alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repentinamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, σ , estimada analíticamente por S o más comúnmente como la desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación (CV).

$$Ds = \sqrt{\frac{\sum xi - \frac{(\sum xi)^2}{n}}{n - 1}}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$DSR = \frac{s. 100}{\bar{X}}$$

3.9.3. Exactitud

La exactitud es el parámetro que nos permite conocer que tan cerca del valor real se encuentra el valor medido.

La exactitud se calculó como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida del analito añadida a la muestra o como diferencia entre la medida de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

El porcentaje de recuperación se calcula de la siguiente manera:

$$(\%)Recuperación = \left(\frac{C1 - C2}{C3}\right) X 100$$

C1 = Concentración determinada de la muestra adicionada.

C2 = Concentración determinada de la muestra no adicionada.

C3= Concentración adicionada.

3.9.4. Límite de detección

Corresponde según USP a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc).

3.9.5. Límite de cuantificación

Según la misma referencia, es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables y se expresa también en unidades de concentración.

Los límites de detección y cuantificación se pueden estimar a partir de una curva de regresión, considerándose concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

- Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: **b**.
- Se obtiene otra curva de calibración, inyectando cada punto por triplicada, pero para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl}
- Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs S y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

- **Límite de detección**

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3 (S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

- **Límite de cuantificación**

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10 (S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

3.10. Extracción de Astaxantina

3.10.1. Método: Extracción con disolventes.

3.10.2. Fundamento:

Esta extracción se da por la separación de dos líquidos no miscibles, aprovechando la acción de la gravedad.¹¹⁶ Consiste en separar una o varias sustancias presentes en un disolvente mediante su transferencia a otro disolvente insoluble, o parcialmente insoluble, en el primero. La transferencia de componentes activos se consigue mediante el contacto directo entre las dos fases líquidas.¹¹⁶ Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando mayor o menor cantidad de disolvente.⁹³

En la práctica es muy utilizada para separar compuestos orgánicos de las soluciones acuosas en las que se encuentra. Los distintos solutos presentes se distribuyen entre las fases acuosa y orgánica, de acuerdo con sus solubilidades relativas.

3.10.3. Procedimiento

Para la cuantificación de Astaxantina por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), las muestras de polvo de *Haematococcus pluvialis*, pellets y músculo de truchas fueron tratadas de la siguiente manera:

Pesar 2 g de la muestra en un tubo centrifuga al cual se añadirá 5 mL de hexano, sonicar durante 5 minutos. Posteriormente añadir 10 mL de solución etanol:agua (2:1), agitar en vortex por 20 minutos y centrifugar a 1350 rpm por 2 minutos, inmediatamente pipetear el sobrenadante y recogerlo en un matraz de 25 mL, añadir nuevamente 5 mL de

hexano al tubo centrifuga y agitar por vortex durante 15 minutos más, centrifugar a 1350 rpm durante 2 minutos. Seguidamente extraer el sobrenadante y recolectar en el matraz de 25 mL (realizar 2 extracciones más con hexano). Posteriormente evaporar el hexano a sequedad. Una vez que el hexano se haya evaporado en su totalidad, los residuos obtenidos serán disueltos con 1 mL de acetonitrilo grado HPLC y sometidos a ultrasonido por 1 minuto. Finalmente estas soluciones obtenidas se procedieran a filtrarlas a través de filtros de 0.22 μm de diámetro, para posteriormente ser inyectados en el sistema cromatográfico.

3.11. Acondicionamiento del HPLC para la cuantificación de Astaxantina

Una vez preparadas las muestras y desgasificados todos los solventes se procederá a purgar el equipo por 15 minutos, posteriormente se estabilizará la columna o fase estacionaria con la fase móvil, lo cual se verificará con la apreciación de la línea base sin ruidos ni derivas y finalmente se procederá a crear el método y la secuencia para la cuantificación de Astaxantina. Las condiciones cromatográficas para la cuantificación de Astaxantina por HPLC se muestran en el capítulo III.

3.12. Determinación de proteínas

3.12.1. Método: Kjeldahl.

3.12.2. Fundamento:

Este método se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en SO_2 , el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio. El amoníaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una disolución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una disolución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método de Kjeldahl-Gunning se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión. La determinación de proteínas se realizó empleando la metodología Kjeldahl, el cual determina el porcentaje de nitrógeno total que multiplicado por un factor,

proporciona la cantidad de proteína en una muestra. Para este cálculo se empleó el siguiente modelo matemático.⁸⁴

$$\% \text{ Nitrogeno} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{m}$$

V = Volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación, en mL.

N = Normalidad del ácido clorhídrico.

m = peso de la muestra en gramos.

0.014 = Miliequivalente del nitrógeno.

Para realizar el cálculo del contenido proteico final como porcentaje en masa se emplea la siguiente formula:

$$\% \text{ Ptotal} = \% \text{ Ntotal} \times 6.25$$

3.12.3. Procedimiento:

Pesar 1.000 g de la muestra en un matraz Kjeldahl, añadirle 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro, 25 mL de ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio. Seguidamente colocar el matraz en el digestor y calentar cuidadosamente a baja temperatura hasta que todo el material esté carbonizado, aumentar gradualmente la temperatura hasta que la disolución esté completamente clara y dejar por 30 minutos más a esa temperatura. Posteriormente enfriar y añadir de 400 a 450 mL de agua para disolver completamente la muestra, agregar 3 ó 4 gránulos de zinc y 50 mL de hidróxido de sodio 1:1. Inmediatamente conectar el matraz a un sistema de destilación, el cual previamente se le ha colocado en la salida del refrigerante un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenga 50 mL de ácido bórico y unas gotas del reactivo Shiro-Tashiro como indicador. Inmediatamente destilar hasta que haya pasado todo el amoníaco (que unas gotas de destilado no den alcalinidad con el papel tornasol, aproximadamente 300 mL). Finalmente retirar el matraz receptor y titular el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N.

3.13. Determinación de lípidos

3.13.1. Método: Soxhlet

3.13.2. Fundamento:

Es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso. La determinación de grasas totales fue determinada bajo el protocolo correspondiente a la regulación ISO 1443 el cual expresa los resultados en un valor porcentual de peso, para su determinación se emplea el siguiente modelo matemático.⁸⁴

$$\text{Porcentaje grasa} = \frac{P1 - P}{P2} \times 100$$

P= Peso en g del matraz.

P1 = Peso en g del matraz con la grasa.

P2 = peso en g de la muestra.

3.13.3. Procedimiento:

Inicialmente se realizará la determinación de la humedad de las muestras, ya que los lípidos no pueden ser extraídos con efectividad de los alimentos húmedos, por lo que procedemos a pesar una placa petri limpia y seca, enseguida se procederá a triturar la muestra y pesar aproximadamente 10 g en la placa. Seguidamente colocar la muestra en la estufa a 105 °C por 12 h. Para luego dejar enfriar la placa que contiene la muestra en un desecador y pesar nuevamente cuidando de que el material no este expuesto al medio ambiente. Posteriormente sacar del horno el balón de extracción, enfriar en un desecador y pesar el balón, también pesar la muestra en papel filtro, colocar la muestra en la unidad de extracción, conectar el extractor al matraz con éter de petróleo a 2/3 del volumen total enseguida llevar a ebullición y ajustar el calentamiento. Al término, colocar el balón en el horno durante hora y media para eliminar el éter y enfriar el balón en un desecador y pesar.

3.14. Métodos estadísticos

La presente investigación se realizó por triplicado ($n=3$), consiguiendo tres valores para la determinación de la concentración de Astaxantina, proteínas y lípidos en músculos de la trucha. Se determinó el valor promedio, la desviación estándar, coeficiente de variación. Frente a los resultados obtenidos se usaron parámetros de distribución central, de dispersión como son la desviación estándar (S) y desviación estándar relativa (RSD) además se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey.⁴³ Para poder ver el cálculo de los parámetros estadísticos se realizó en el programa Microsoft Excel.

3.14.1. ANOVA (Análisis de varianza)

Este es una prueba de significancia, la cual tiene como objetivo demostrar estadísticamente si el efecto hallado al aplicar los tratamientos es debido a los mismos o a causas fuera de los tratamientos.⁴³

F de V	SC	GL	CM	FC
Entre grupos				
Dentro de grupos				
Total				

F de V : Fuente de variabilidad

GL : Grados de Libertad.

SM : Suma de cuadrados.

CM : Cuadrado medio.

FC : Prueba F.

3.14.2. Prueba de especificidad: Test de Tukey

Se aplica una vez obtenidos los resultados del análisis de varianza ANOVA, es decir si en el análisis de varianza los resultados obtenidos fueran significativos a los diferentes tratamientos, se procederá a averiguar estadísticamente cuál de ellos fue más eficiente o más específico, de no hallarse significancia en la prueba de ANOVA no será necesario realizar el test de Tukey.⁴³

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en dos etapas, una biológica en el “Centro de Desarrollo Pesquero C.E.D.E.PEZ”; que está ubicado en el distrito de Ojherani, región Puno. (Ver Figura 24) y una etapa de análisis fisicoquímicos en el Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio (H-202) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, de la Universidad Católica de Santa María - Arequipa.

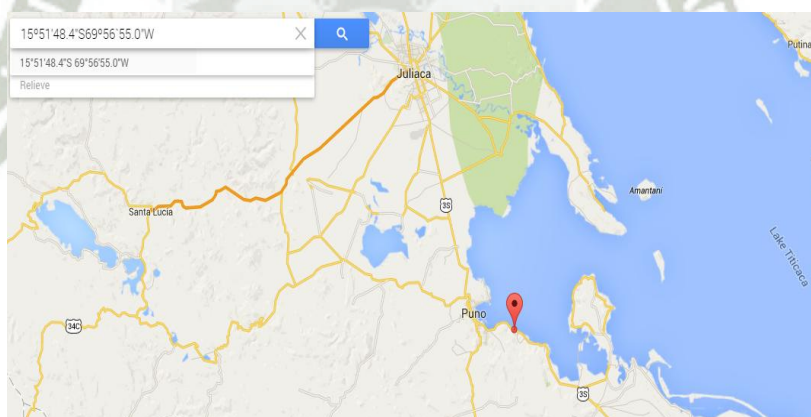


Figura 24. Distrito de Ojherani.

1. MATERIAL BIOLÓGICO

La población que se empleó para el estudio fue de la especie de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), que fueron criadas en el Lago Titicaca en jaulas flotantes. Las cuales se encontraban en estado juvenil y antes de iniciar la investigación se inspeccionaron para verificar que no presentaran enfermedades o laceraciones.

2. CRIANZA DE TRUCHAS

Para la crianza de las truchas se lograron elaborar jaulas flotantes, siguiendo el esquema mostrado en la Figura 14 del capítulo anterior.



Figura 25. Jaulas flotantes elaboradas para la crianza de truchas.

Una vez adquiridas y examinadas las truchas en estado juvenil, estas fueron trasladadas a las jaulas elaboradas, las que se muestran en la Figura 25.

3. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y COLORACIÓN DE LAS TRUCHAS PRE TRATAMIENTO

Antes de iniciar el tratamiento con las dietas experimentales se realizó un muestreo inicial (T0), el 02 de junio del 2013, para determinar el nivel de pigmentación muscular en los diferentes grupos, mostrándose los resultados en la Tabla 8.

Tabla 8. Evaluación del crecimiento y coloración de la trucha arco iris ¹.

CARACTERÍSTICAS	TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
Color de la carne (escala Salmo-Fan ²)	< a ± 20
Tamaño del pez ³ (cm)	± 23.6
Peso ⁴ (g)	± 195

Fuente: Registro de investigación.

¹ Resumen de la Tabla 37 del Anexo I.

² Regla de colores Salmo-Fan que cuenta con una escala colorimétrica desde 20 hasta 34 unidades arbitrarias promedio entre las 5 muestras evaluadas.

³ Tamaño del pez promedio entre las 5 muestras evaluadas.

⁴ Peso en gramos promedio de 5 truchas evaluadas.

Como se puede apreciar en la Tabla 8 en el momento de iniciar del estudio, las truchas presentaron una coloración ínfima, es decir casi no presentaban pigmentación alguna, por lo que no se pudo determinar un valor de coloración con la regla colorimétrica Salmo-Fan. Así mismo estos peces mostraban una talla y peso característico en la etapa juvenil en que se encontraban, debido a las condiciones de la alimentación de dicha etapa

4. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA CRIANZA DE LAS TRUCHAS

El diseño experimental fue aleatorio y en él se integró el manejo de cinco tratamientos, siendo uno de ellos el control. (Ver Figura 26). La fase experimental tuvo una duración de 51 días, precedidos de una fase de aclimatación de 11 días.

En la Figura 26 podemos apreciar el diseño seguido para la disposición de los especímenes que consistió en 500 truchas con un peso inicial promedio de 195 g en etapa juvenil que fueron criadas en jaulas flotantes las cuales se dividieron en cinco grupos, conteniendo 100 peces cada grupo, a los que se sometieron a diferentes condiciones de alimentación.

Durante la crianza, se tuvo que monitorear la temperatura del agua, ya que esto es un factor importante porque la temperatura influye en el metabolismo de la trucha. La medición de la temperatura del agua, se realizó cada 5 días, en horas de la mañana antes de alimentar a toda la población de truchas. La crianza de truchas se llevó a cabo en los meses de Junio a Agosto dando como resultado un valor de 13 – 14 °C de la temperatura del agua; valores que están dentro de los límites óptimos y que son característicos durante estas fechas. Así mismo durante la crianza se tuvo que cambiar las jaulas ya que estas se ensucian con los desechos biológicos de las truchas y con las algas que crecen o se depositan alrededor de las jaulas, y obstruyen la oxigenación del agua. Por lo que el cambio de las jaulas que se realizó cada 2 semanas en las mañanas, antes de alimentar a las truchas para evitar el estrés de los peces.

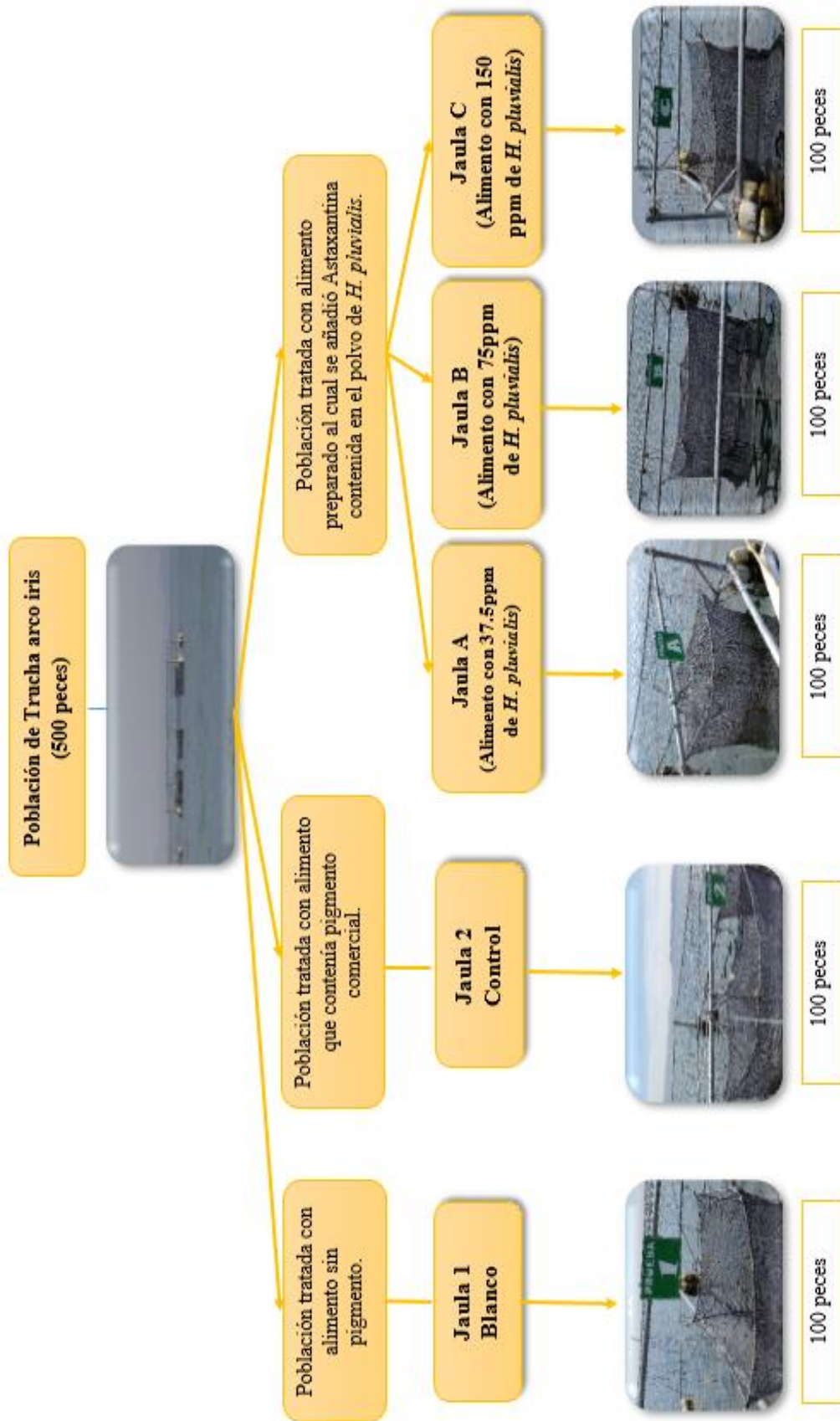


Figura 26. Gráfico de distribución de la población de estudio

5. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Después de haber dividido toda la población de truchas y una vez ya iniciado el tratamiento experimental el día 13 de junio, se tuvo que esperar unos 23 días para que la trucha pueda absorber el pigmento experimental.

Para poder realizar las evaluaciones del crecimiento y coloración de las truchas, semanalmente se recolectó cuatro truchas en forma aleatoria, de cada jaula, obteniendo 20 muestras en total, a las que posteriormente se sacrificaron y se evaluaron el peso, talla y también se les determinó cualitativamente el color adquirido en el músculo de las truchas seleccionadas. Toda esta evaluación se realizó en un lapso de cinco semanas.

Al finalizar la crianza de los peces se obtuvieron tres muestras por cada jaula de forma aleatoria, las cuales se utilizaron para la extracción de Astaxantina para la posterior cuantificación en el musculo de las truchas.

6. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y COLORACIÓN DE LAS TRUCHAS POST TRATAMIENTO

Los resultados de la determinación del peso y talla promedio de las muestras obtenidas en los grupos: (1) control (2) blanco, (A) (37.5 mg.kg^{-1} de *H. pluvialis*), (B) (75 mg.kg^{-1} de *H. pluvialis*) y grupo (C) (150 mg.kg^{-1} de *H. pluvialis*); se presentan en las Figuras 27 y 28. En los Anexos III, IV, V, VI, VII se señalan los datos de las tallas y pesos de los pescados muestreados y en la Tabla 9 se observan los datos promedios obtenidos.

Tabla 9. Evolución del peso promedio obtenido en muestras de truchas.

Grupo	Semanas				
	1ra	2da	3ra	4ta	5ta
Blanco	± 259.0	± 276.8	± 324.8	± 375.8	± 384.8
Control	± 275.5	± 301.0	± 306.0	± 361.0	± 436.8
A	± 258.0	± 293.0	± 300.0	± 398.3	± 459.3
B	± 267.3	± 304.0	± 326.0	± 360.3	± 501.0
C	± 238.3	± 281.3	± 292.3	± 355.5	± 490.8

Fuente: Registro de investigación.

En la Tabla 9 se aprecia que con el pasar del tiempo hay un aumento progresivo del peso de las truchas, los datos son graficados en la Figura 27 donde se observa la evolución del peso que se desarrolló de la siguiente manera: El grupo blanco (1) y el grupo control (2) son los que menor evolución presentaron en cuanto al peso se refiere durante las cinco semanas. El grupo (A) que recibió *H. pluvialis* al 37.5 mg.kg^{-1} presentó un ligero aumento de peso a diferencia de los grupos (B) y (C) que recibieron *H. pluvialis* al 75 mg.kg^{-1} y 150 mg.kg^{-1} respectivamente; los cuales en la quinta semana de tratamiento aumentaron significativamente de peso ya que en las primeras semanas se presentaron valores de peso mínimo. Por lo que podemos concluir que a nivel cuantitativo el grupo que presenta mayor peso es el grupo (B) (*H. pluvialis* al 75 mg.kg^{-1}) seguido del grupo (C) (*H. pluvialis* al 150 mg.kg^{-1}).

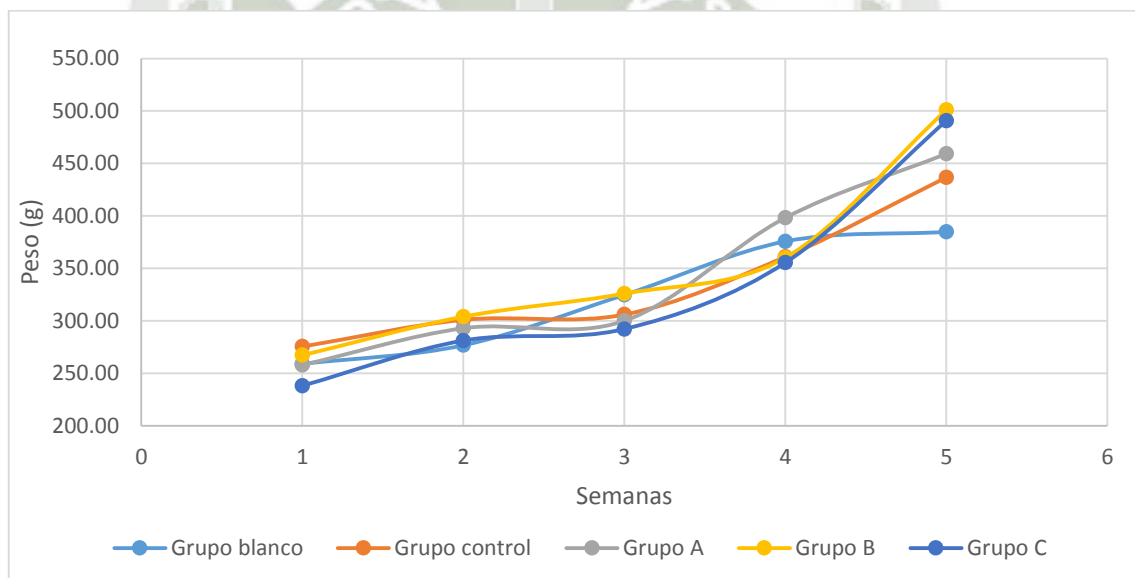


Figura 27. Gráfico de la evolución del peso promedio obtenido en muestras de truchas.

La Tabla 10 muestra los resultados para el análisis de varianza y el test de Tukey, se observa que todos los grupos muestran una significancia de 0.871, valor que es superior al permitido de 0.05, por lo que no existen diferencias significativas entre los grupos, posteriormente para confirmar o discriminar este resultado se realizó un test de Tukey, en esta prueba todos los grupos forman un solo subconjunto por lo que en cuanto a peso en gramos durante las 5 semanas de tratamiento no existen diferencias significativas.

Tabla 10. Análisis de varianza y test de Tukey al peso promedio en muestras de truchas.

Grupo	Anova P=0.05	N	Tukey Subconjunto para alfa = 0.05
			1
Blanco	0.871	20	324,2000
C		20	331,6000
Control		20	336,0500
A		20	341,7000
B		20	351,8000

Fuente: Registro de investigación.

Tabla 11. Evolución de la distribución de la talla promedio obtenida en muestras de truchas.

Grupos	Semanas				
	1ra	2da	3ra	4ta	5ta
Blanco	± 27.3	± 27.8	± 28.7	± 29.5	± 30.1
Control	± 27.6	± 27.6	± 28.5	± 28.9	± 30.0
A	± 26.3	± 27.6	± 28.5	± 30.0	± 30.4
B	± 26.5	± 27.6	± 28.5	± 28.8	± 29.6
C	± 26.4	± 26.9	± 27.7	± 29.0	± 29.1

Fuente: Registro de investigación.

Como se observa los datos en la Tabla 11 graficados en la Figura 28; la evolución en cuanto se refiere a la talla, se desarrolló de la siguiente manera: El grupo blanco (1) presentó una evolución continua aumentando la talla durante las cinco semanas de tratamiento. El grupo control (2) y el grupo (B) que recibió *H. pluvialis* al 75 mg.kg⁻¹ presentaron un aumento de talla manteniéndose casi constante en la tercera y cuarta semana pero en la quinta semana de tratamiento aumentaron significativamente en cambio el grupo (A) tratado con *H. pluvialis* al 37.5 mg.kg⁻¹ presentó una evolución continua y favorable durante todo el tratamiento a diferencia del grupo (C) (*H. pluvialis* al 150 mg.kg⁻¹) que presentó una evolución lenta y baja; por lo que podemos concluir que a nivel cuantitativo el grupo que presenta mayor evolución en cuanto a la talla se refiere

es el grupo A (*H. pluvialis* al 37.5 mg.kg⁻¹) seguido del grupo (1) blanco, (2) control, el grupo B (*H. pluvialis* al 75 mg.kg⁻¹), y el grupo C que fue el que presentó los valores más bajos de talla.

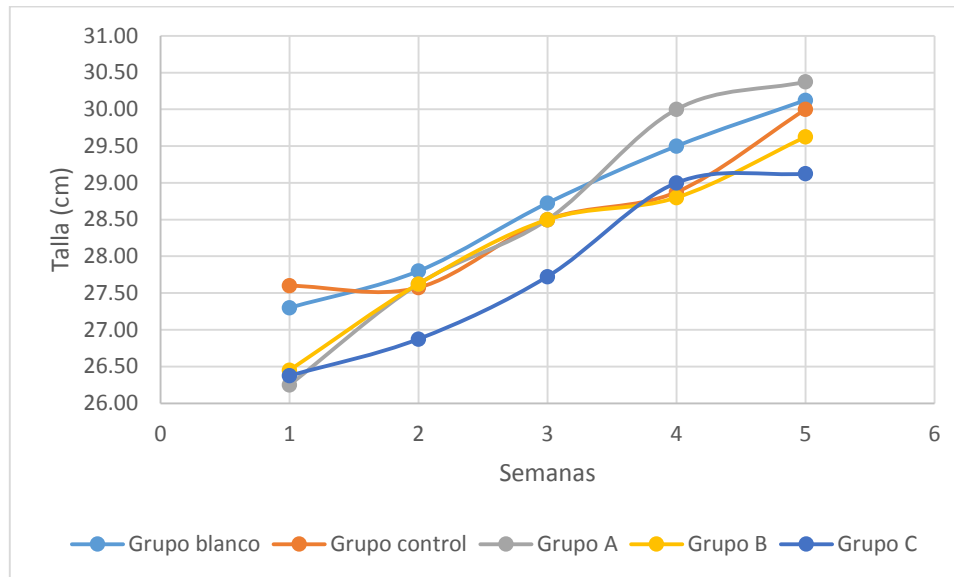


Figura 28. Gráfico de distribución de la talla promedio obtenida en muestras de trucha.

Tabla 12. Análisis de varianza y test de Tukey a la talla promedio en muestras de truchas.

Grupo	Anova P=0.05	N	Tukey Subconjunto para alfa = 0.05
			1
C	0.507	20	27,8200
B		20	28,2150
Control		20	28,5100
A		20	28,5500
Blanco		20	28,6900

Fuente: Registro de investigación.

La Tabla 12 muestra los resultados para el análisis de varianza y el test de Tukey para la talla registrada, se observa que todos los grupos muestran una significancia de 0.507, valor que es superior al permitido de 0.05 por lo que no existen diferencias significativas entre los grupos, posteriormente para confirmar o discriminar este resultado se realizó un test de Tukey, en esta prueba todos los grupos forman un solo subconjunto por lo que en cuanto a la talla registrada en centímetros durante las 5 semanas de tratamiento no existen diferencias significativas.

7. EVALUACIÓN DE LA PIGMENTACIÓN DE ASTAXANTINA EN EL MÚSCULO DE TRUCHAS ALIMENTADAS CON *Haematococcus pluvialis*, EMPLEANDO LA REGLA COLORIMÉTRICA SALMO-FAN

Con el fin de medir la concentración de Astaxantina absorbidas por el músculo de las truchas que fueron alimentadas con los pellets fabricados que contenían polvo de *H. pluvialis* en diferentes porcentajes, y a la vez medir la tonalidad alcanzada; inicialmente se procedió a eviscerar los pescados hasta la condición de filetes Trim C, para luego facilitar la evaluación organoléptica visual empleando la regla colorimétrica Salmo-Fan de la compañía La Roche®. La frecuencia de la evaluación organoléptica fue semanal por un lapso de cinco semanas. Realizando 5 evaluaciones en total. En los anexos III, IV, V, VI, VII se señalan los datos de los valores alcanzados en cuanto se refiere a la coloración Salmo-Fan de los pescados muestreados y en la Tabla 13 se observan los datos promedios obtenidos.

Las evaluaciones que se observan en la Tabla 13 se realizaron semanalmente, para ello se recolectó cuatro truchas en forma aleatoria, luego se sacrificó y se trozó para analizar visualmente el color del músculo.

Tabla 13. Evaluación cualitativa de la pigmentación del músculo de trucha según la regla colorimétrica Salmo-Fan de Roche®

Grupo	Semanas				
	1ra	2da	3ra	4ta	5ta
Blanco	± 20.3	± 20.8	± 20.8	± 20.8	± 21.0
Control	± 24.0	± 24.3	± 25.3	± 26.0	± 26.8
A	± 22.8	± 22.8	± 23.8	± 24.5	± 24.5
B	± 24.3	± 24.3	± 25.3	± 28.3	± 28.5
C	± 24.0	± 24.0	± 25.8	± 26.8	± 27.0

Fuente: Registro de investigación.

En la Figura 29 se puede apreciar que el grupo blanco es el que menor pigmentación presenta y se mantiene constante durante las cinco semanas. El grupo (A) que recibió *H. pluvialis* al 37.5 mg.kg⁻¹ mantiene una posición menor, a diferencia del

grupo (B) que recibió *H. pluvialis* al 75 mg.kg^{-1} , que presentó la mayor coloración, seguida del grupo (C) *H. pluvialis* al 150 mg.kg^{-1} que casi alcanza a este grupo en la quinta semana de tratamiento. En cambio el grupo control en las primeras semanas se mantiene en niveles de pigmentación similares al grupo de B sin embargo en la quinta semana disminuye la pigmentación.

Por lo que podemos concluir que a nivel cualitativo el grupo que presenta mayor pigmentación es el grupo B que recibió *H. pluvialis* al 75 mg.kg^{-1} , seguido del grupo C que recibió Astaxantina al 150 mg.kg^{-1} proveniente de *H. pluvialis* como biocomponente de la dieta, lo que nos confirma que no necesariamente a mayor concentración se obtendrá una mayor coloración ya que el grupo B que solo recibió 75 mg.kg^{-1} de *H. pluvialis* presentó una mayor coloración en comparación con el grupo C (150 mg.kg^{-1} de *H. pluvialis*).

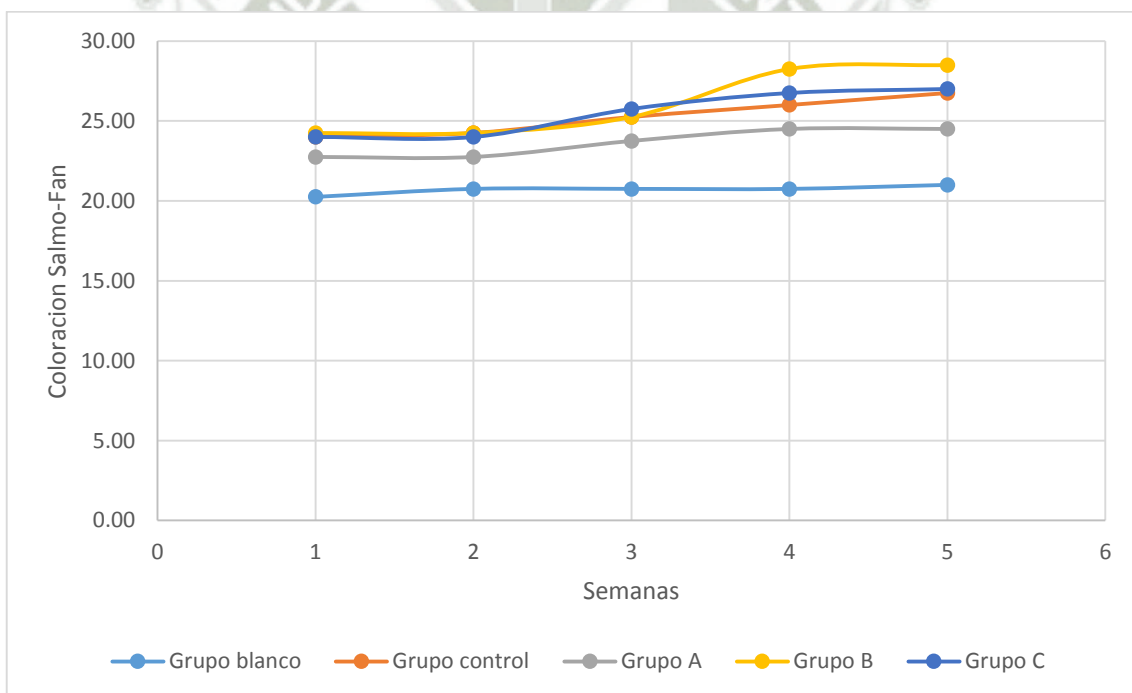


Figura 29. Gráfico de la evaluación cualitativa de la pigmentación del músculo de trucha según la regla colorimétrica Salmo-Fan La Roche®.

La Tabla 14 muestra los resultados para el análisis de varianza y el test de Tukey para la coloración Salmo-Fan registrada, se observa que todos los grupos muestran una significancia de 0.000, valor que es inferior al permitido de 0.05 por lo que existen

diferencias significativas entre los grupos, posteriormente para confirmar o discriminar este resultado se realizó un test de Tukey, en esta prueba se observa que los grupos C y B tratados con una concentración de Astaxantina del 150 y 75 mg.kg⁻¹ son similares al control ya que junto a este último constituyen un subconjunto que se diferencia del grupo A tratado con 37.5 mg.kg⁻¹ - que ocupa un lugar intermedio – y del grupo blanco que es el que menor promedio de pigmentación muestra. Por lo que podemos concluir que en cuanto a pigmentación los grupos con mayor eficacia pigmentante son los grupos B y C con 75 y 150 mg.kg⁻¹ de Astaxantina presente en la microalga añadida.

Tabla 14. Análisis de varianza y test de Tukey a la pigmentación del músculo de trucha según la regla colorimétrica Salmo-Fan de Roche®

Grupo	Anova	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
	P=0.05		1	2	3
Blanco	0.000	20	20,6000		
A		20		23,6500	
Control		20			25,3000
C		20			25,5000
B		20			26,0500

Fuente: Registro de investigación.

Una vez que ya se finalizó la crianza de truchas por un lapso de cinco semanas. Se muestrearon 3 truchas por cada grupo, las cuales se trozaron hasta la condición TRIM C, que fueron guardados en bolsas ziploc, puestas en un cooler y transportadas al laboratorio en hielo.

8. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA POR HPLC

Esta identificación de Astaxantina se realizó en muestras de polvo de *Haematococcus pluvialis*, pellet y músculo de truchas; por lo que se procedió desarrollar un método de determinación de Astaxantina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

8.1. Elección de la longitud de onda óptima

Para la cuantificación de Astaxantina por HPLC, se seleccionó la longitud de onda que presentaba la mayor absorción, para lo que se realizó un barrido espectral (200-800 nm) de una solución estándar de Astaxantina; donde se determinó que la máxima absorción se dio a una longitud de onda de 275 nm; dicho barrido se realizó en un espectrofotómetro CARY UV/V en una celda de cuarzo de un centímetro de paso de luz.

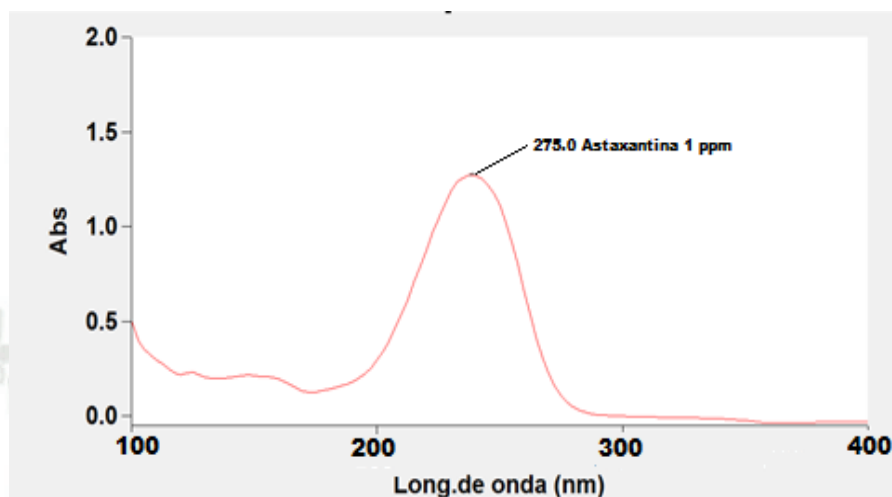


Figura 30. Barrido espectrofotométrico del estándar de Astaxantina.

8.2. Preparación de la fase móvil

Se probaron diferentes proporciones y combinaciones de solventes: metanol, diclorometano, agua, acetonitrilo, y buffer fosfato a diferentes flujos y tiempos de corrida. Encontrándose una mejor respuesta, sencilla, isocrática con una adecuada separación y un tiempo de retención óptimo; frente a una fase móvil de acetonitrilo:metanol. Se utilizó como fase móvil, una mezcla de (v/v) de acetonitrilo en una proporción 80:20 con metanol.

8.3. Condiciones cromatográficas

Una vez seleccionada la longitud de onda y la fase móvil se utilizaron las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 15; para la posterior cuantificación de Astaxantina en las muestras de polvo de *Haematococcus pluvialis*, pellets y músculo de trucha.

Si bien es cierto que hay muchas técnicas y métodos para la cuantificación de Astaxantina las cuales hacen uso de columnas de gel siliconadas o trabajan con fases

móviles complejas con gradiente, en el presente trabajo de investigación se buscó estandarizar un método sencillo, práctico y económico en relación a las técnicas publicadas en diferentes revistas de investigación.

Tabla 15. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Astaxantina por HPLC.

Cromatógrafo	(HPLC) LaChrom
Columna	Chromolith RP 18e; 100 x 4.6 mm
Detector	UV/Visible
Fase Móvil	Acetonitrilo : metanol (80:20 v/v)
Longitud de onda	275 nm
Volumen de inyección	20 µL
Velocidad de flujo	1.5 mL/min
Tiempo de retención	2.45 minutos
Tiempo de corrida	7 minutos

Fuente: Registro de investigación.

La solución estándar de Astaxantina fue cuantificada a una longitud de onda de 275 nm, con un tiempo de retención de 2.45 minutos durante un tiempo de corrida de 7 minutos.

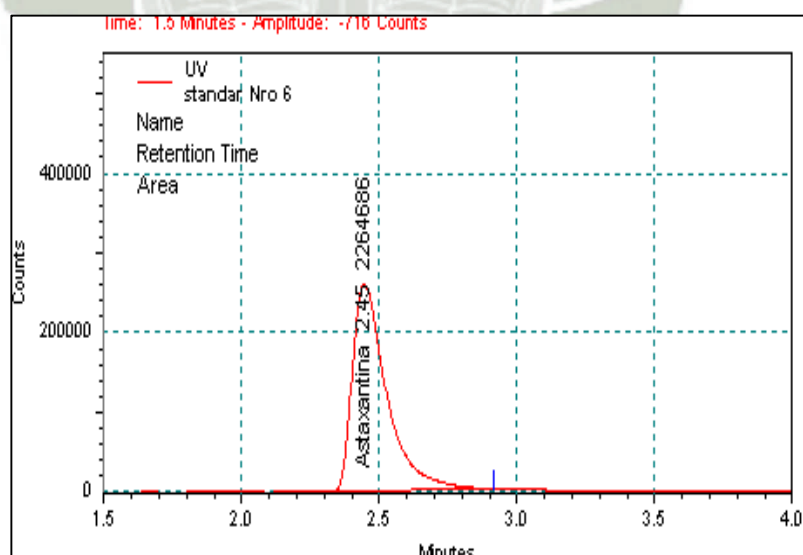


Figura 31. Cromatograma Astaxantina por HPLC.

8.4. Parámetros de estandarización del método

8.4.1. Linealidad

Para la determinación de la linealidad del método se preparó soluciones a las concentraciones de 0.5, 1, 2,4 y 6 mg.L⁻¹ partiéndose de la solución stock de 20 mg.L⁻¹ del estándar de Astaxantina cada una de ellas se inyectó por triplicado. Con las lecturas se preparó una gráfica de calibración, a continuación se muestran los resultados:

Tabla 16. Concentraciones y áreas para la gráfica de calibración del método.

Concentración mg.L ⁻¹	Áreas			Promedio	D. S
	1ra Curva	2da Curva	3ra Curva		
0.5	153511	171526	150440	158492.3	11391.4
1	338589	328232	369964	345595.0	21730.2
2	894776	805011	851346	850377.7	44890.33
4	1475849	1480388	1483911	1480049.3	4041.66
6	2209712	2264686	2525457	2333285.0	168680.45

Fuente: Registro de investigación.

En la Tabla 16 se puede observar que a medida que se utilizó mayores concentraciones del estándar de Astaxantina, se obtuvo un incremento en las áreas, lo que demostraría que los resultados obtenidos por el método analítico son proporcionales a la concentración del analito.

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste como se puede apreciar en la siguiente Figura 32.

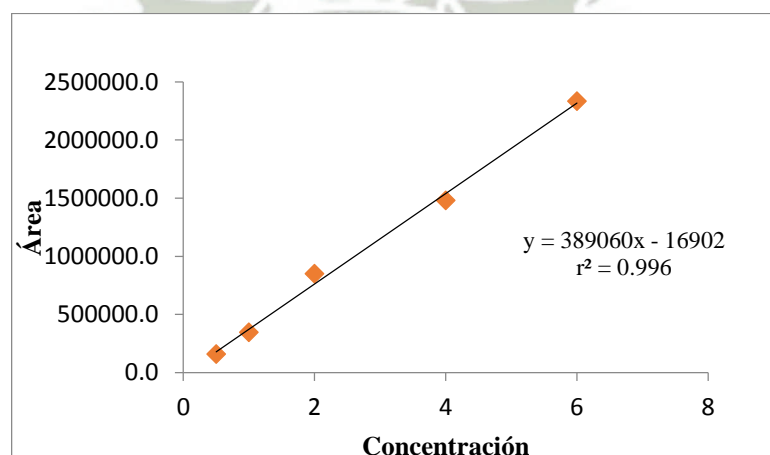


Figura 32. Representación gráfica de la linealidad

En la Figura 32, por regresión lineal a partir del rango de las concentraciones finales de los estándares y el valor promedio del área, se obtuvo el coeficiente de correlación, (r^2) igual a 0.996, el cual debe ser por lo menos de 0.99 para ser aceptado; una pendiente (b) de 389060, un intercepto (a) de 16902.

Con los resultados del estudio de la linealidad, la relación entre la variable independiente (concentración) y la variable dependiente (área) se expresa matemáticamente haciendo una estadística de regresión, tal como se expresa en la Tabla 17.

Tabla 17. Determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.995
Coefficiente de determinación R²	0.989
R² ajustado	0.989
Error típico	87939.50515

Fuente: Registro de investigación.

En nuestro análisis R (coeficiente de correlación múltiple) toma un valor muy alto (siendo su máximo 1); y R cuadrado nos indica que el 98.9% de la variación de las áreas está explicada por las concentraciones de Astaxantina. Por lo que se comprueba que las áreas observadas están fuertemente relacionadas con las concentraciones. Al trabajar con 5 concentraciones por triplicado los valores de R cuadrado corregido y no corregido son iguales.

8.4.2. Precisión

Expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse:

8.4.2.1. Repetibilidad

Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista.

Los resultados se observan en la Tabla 18, en donde se obtuvieron coeficientes de variación de menores a 7.3, lo cual indica que el instrumento es preciso, bajo las condiciones de análisis establecidas. ($CV < 7.3\%$ según la AOAC⁸).

Tabla 18. Evaluación de la repetibilidad del método aplicando la ecuación de regresión

Cc (ppm)	Promedio	D. S.	% CV
0.5	158492.3	11391.45	7.19
1.0	345595.0	21730.23	6.29
2.0	850377.7	44890.33	5.28
4.0	1480049.3	4041.66	0.27
6.0	2333285.0	4041.66	7.23

Fuente: Registro de investigación.

8.4.2.2. Precisión intermedia

Obtenida dentro del laboratorio con distintos analistas en diferentes días, con las curvas de calibración diferentes, con diferentes instrumentos, con la misma muestra homogénea.

En la Tabla 19 se puede apreciar que se obtuvieron coeficientes de variación menores a 16%, lo cual indica que el instrumento es preciso bajo las condiciones de análisis establecidas ($CV < 16\%$ según la AOAC¹⁰).

Tabla 19. Evaluación de la precisión del método aplicando la ecuación de regresión.

Conc. (ppm)	Área	Corridas			Promedia	D.S.	%CV
		N° 1	N° 2	N° 3			
0.5	153511	171526	150440	161526	159250.8	9424.0	5.92
1.0	338589	328232	369964	378232	353754.3	24105.9	6.81
2.0	894776	805011	851346	935011	871536.0	55983.3	6.42
4.0	1475849	1480388	1483911	1383911	1456014.8	48182.3	3.31
6.0	2209712	2264686	2525457	2109712	2277391.8	177383.6	7.79

Fuente: Registro de investigación.

8.4.3. Exactitud

Este parámetro se refiere al valor medio que se obtiene, el cual debe ser muy próximo al de referencia. Dicho de otro modo la recuperación del analito debe acercarse al 100%.

Tabla 20. Evaluación de la exactitud del método aplicando la ecuación de regresión.

	Ensayo N°1		Ensayo N°2		Ensayo N°3		Promedio
	Cc.	Área	Cc.	Área	Cc.	Área	
St.	0.558	200148	0.537	192134	0.559	200656	
M1	7.202	2784992	5.957	2300681	3.815	1467488	
M2	7.122	2753985	5.986	2312112	5.009	1931907	
M+ ST1	7.224	2793589	6.395	2471180	4.207	1619768	
M+ST2	7.269	2811188	6.412	2477885	5.418	2091175	
Promedio	93.87%		98.39%		96.74%		96.33%

Fuente: Registro de investigación.

Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 20. Para dicho cometido se tomó como valor teórico el 110 % y el valor experimental encontrado fue de 96.33 %. (Para muestras de 10 ppm el porcentaje de recuperación deberá estar entre 80 – 110% según AOAC).

8.4.4. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Para determinar el límite de detección y cuantificación se trabajó con las cinco concentraciones por triplicado (0.5, 1, 2, 4 y 6 ppm), por lo que se utilizó los datos de la gráfica de calibración promedio preparada para la determinación de la linealidad del método (ver Figura 33).

Los promedios y las desviaciones estándar de estas mediciones se señalan en la Tabla 21.

Tabla 21. Datos de la gráfica de la determinación promedio para la linealidad del método.

Concentración (ppm)	Áreas			Promedio	Desviación Estándar
	1ra Curva	2da Curva	3ra Curva		
0.5	153511	171526	150440	158492.3	11391.45
1	338589	328232	369964	345595.0	21730.23
2	894776	805011	851346	850377.7	44890.33
4	1475849	1480388	1483911	1480049.3	4041.66
6	2209712	2264686	2525457	2333285.0	168680.45

Fuente: Registro de investigación.

A partir de estos datos se halla la ecuación de regresión lineal: $y=389060 x - 16902$. El valor de “Ybl” se obtiene por extrapolación de la respuesta a concentración cero y el valor de “b” es el valor de la pendiente (16902).

Se determinó la desviación estándar de las áreas correspondiente a cada concentración, construyéndose una gráfica de concentración de Astaxantina vs desviación estándar.

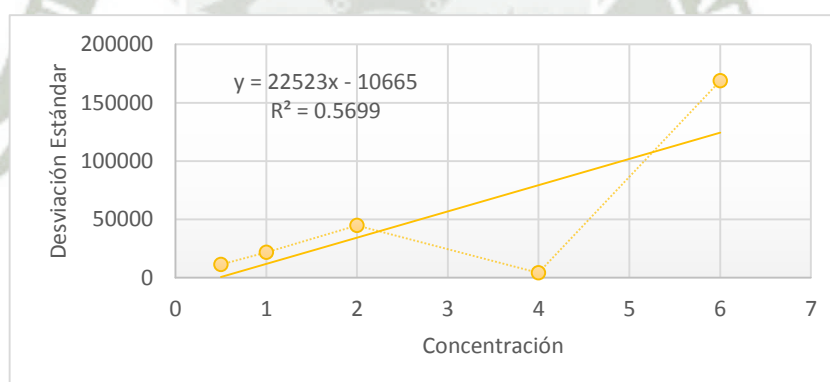


Figura 33. Gráfico de la concentración de Astaxantina vs. Desviación estándar.

De igual forma se halla la ecuación de regresión lineal a partir de estos datos: $y=225323x - 10665$, donde Sbl se halla por extrapolación de la desviación estándar a concentración cero.

$$\text{Límite de Detección} = 0.126 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$\text{Límite de Cuantificación} = 0.318 \text{ mg.L}^{-1}$$

Estos valores nos indican que la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede cuantificar no necesariamente con precisión y exactitud es de 0.126 mg.L^{-1} y la mínima cantidad de analito presente en la muestra que puede ser cuantificada, con una adecuada precisión y exactitud es de 0.318 mg.L^{-1} .

9. EXTRACCIÓN DE ASTAXANTINA

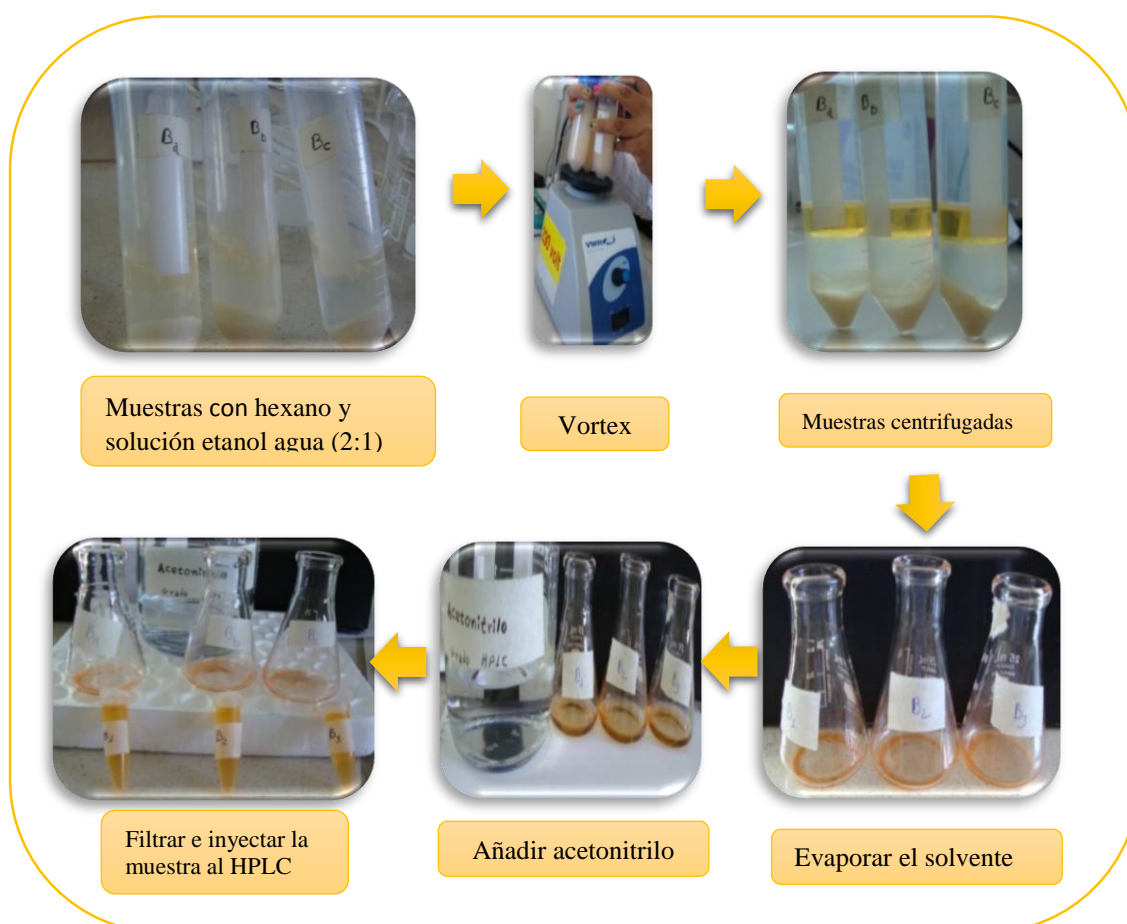


Figura 34. Procedimiento de extracción de Astaxantina.

Como fue mencionado en el capítulo anterior, la extracción de la Astaxantina en las muestras de polvo de *Haematococcus pluvialis*, pellets y músculos de las truchas consistió en poner en contacto las muestras con el solvente no miscible: hexano; en un tubo centrifuga en una proporción 2:5 (basándonos en la afinidad del pigmento por este solvente); seguidamente se procedió a sonicar la muestra para poder obtener una mejor extracción. Posteriormente se agregó una solución de etanol:agua (2:1) que sirve como

coadyuvante para poder extraer el pigmento; para lograr una mejor extracción, en seguida se procedió a agitar en vortex por 20 minutos; luego se centrifugó la muestra para poder separar las dos fases de la solución obtenida; y así pipetear el sobrenadante que contiene el pigmento para luego recolectar en un matraz de 25 mL. Para poder extraer el pigmento en su totalidad de las muestras a tratar se procedió a añadir nuevamente 5 mL de hexano al tubo centrifuga y seguir con el procedimiento de extracción para luego recolectar la solución en el matraz de 25 mL. Este procedimiento de extracción con hexano se realizó por 2 veces más, para asegurarnos que estamos extrayendo el pigmento en su totalidad. Posteriormente se procedió a evaporar el solvente de los matraces de 25 mL, donde se observaron los diversos colores de los residuos secos obtenidos de las diferentes muestras, lo cual se puede deber a las distintas concentraciones de Astaxantina en cada muestra.

10. ACONDICIONAMIENTO DEL HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA

Una vez preparadas las muestras y desgasificados todos los solventes se procedió a purgar el equipo por 15 minutos, posteriormente se estabilizó la columna o fase estacionaria con la fase móvil, lo cual se verificó con la apreciación de la línea base sin ruidos ni derivas, finalmente se procedió a crear el método y la secuencia para la cuantificación de Astaxantina.

11. CUANTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA EN EL POLVO DE *Haematococcus pluvialis*

La cuantificación de Astaxantina en el polvo de *H. pluvialis* se realizó por la técnica de cromatografía de alta resolución; la cual sirvió para determinar la concentración real de Astaxantina contenida en el polvo de *Haematococcus pluvialis*. Este análisis se realizó después de la fabricación del pellet, y la crianza de las truchas; ya que en el inicio de la investigación no se disponía del equipo necesario para realizar la determinación cuantitativa de Astaxantina en dichas muestras.

Tabla 22. Cuantificación de Astaxantina en el polvo de *Haematococcus pluvialis* mediante HPLC.

Descripción	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. de Astaxantina (mg.kg ⁻¹)
1	529324	2.88	0.0144	0.0207	695.4
2	1103805	2.94	0.0147	0.0222	662.2
3	1017453	2.71	0.0136	0.0210	645.2
X	883527,3	2.84	0.0142	0.0213	667.6
D.S.	309772,8	0.12	0.0001	0.0008	5.1

Fuente: Registro de investigación.

En la Tabla 22 se muestra la concentración promedio de las tres mediciones por el método de HPLC realizado al polvo de *Haematococcus pluvialis* dando como resultado el valor de 667.6 mg.kg⁻¹, resultando este ser un valor muy lejano al teóricamente proporcionado por el distribuidor, que consistía en 30 000 mg.kg⁻¹, y tras una investigación se logró obtener la información de que este mismo distribuidor suministraba esta misma alga a la empresa Aquatech.

12. CUANTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA EN LOS PELLETS FABRICADOS

Inicialmente se realizó los cálculos para la fabricación de los pellets pertenecientes a los grupos A, B y C en base a la concentración que fue proporcionada por el distribuidor de la microalga *Haematococcus pluvialis*, pero sin embargo al realizar la cuantificación de Astaxantina por HPLC en el polvo de *H. pluvialis*, este contenía una concentración de 133.5 mg.kg⁻¹ como ya se había mencionado anteriormente. Por lo que se realizó nuevamente los cálculos necesarios para determinar con cuanto de concentración de Astaxantina se había alimentado a los peces de los grupos A, B y C.

Como se puede apreciar en la Tabla 23, se realizó nuevamente los cálculos según la concentración analizada por HPLC en el polvo de *H. pluvialis*; demostrando que los pellets del grupo A que teóricamente contenían una concentración de 37.5 mg.kg⁻¹ de pigmento en realidad contenían 0.8 mg.kg⁻¹ de Astaxantina en *H. pluvialis*, al igual que el grupo B que teóricamente contenía una concentración de 75 mg.kg⁻¹, resultó dando un valor de 1.7 mg.kg⁻¹, del mismo modo se realizó los cálculos para hallar la verdadera

concentración de Astaxantina en los pellets pertenecientes al grupo C, que en la teoría contenían una concentración de 150 mg.kg^{-1} pero que en realidad solo llegaba a contener 3.3 mg.kg^{-1} de Astaxantina en un kilogramo de polvo de la microalga.

Tabla 23. Concentración de Astaxantina en los pellets fabricados mediante HPLC

Grupos	Cc teórica (mg.kg^{-1})	Cc de Astaxantina por HPLC (mg.kg^{-1})
A	37.5	0.8
B	75.0	1.7
C	150.0	3.3

Fuente: Registro de investigación.

13. CUANTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA EN EL PELLETT COMERCIAL POR HPLC

La cuantificación de Astaxantina en las muestras de pellet se realizó por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución; la cual sirvió para determinar la concentración de Astaxantina contenida en las muestras del pellet comercial (truchas acabado Naltech®) perteneciente al grupo control (2); que según las cantidades declaradas en la etiqueta del pellet debería contener 75 mg.kg^{-1} de Astaxantina, pero que sin embargo al realizar el análisis por HPLC se obtuvo el valor de 9.2 mg.kg^{-1} .

Tabla 24. Cuantificación de Astaxantina en el pellet comercial mediante HPLC.

Descripción	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg^{-1})
1	248478	0.71	0.0007	0.0675	10.5
2	197795	0.58	0.0006	0.0685	8.4
3	203717	0.59	0.0006	0.0682	8.7
X	216663	0.62	0.0006	0.0681	9.2
D.S.	27710,96	0.07	0.0001	0.0005	1.1

Fuente: Registro de investigación.

En la Tabla 24 se muestra los valores obtenidos de las tres mediciones por el método de HPLC del pellet comercial que según el fabricante contenía 75 mg.kg^{-1} de Astaxantina pero que sin embargo al realizar el análisis, se obtuvo el valor de 9.2 mg.kg^{-1} , evidenciando claramente una concentración baja en relación al valor de la etiqueta, este

dato guarda relación con la menor concentración evidenciada en la microalga de *Haematococcus pluvialis*, puesto que como se había comentado anteriormente esta microalga es la materia prima para la elaboración de estos pellets comerciales.

14. CUANTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA EN EL MÚSCULO DE TRUCHAS

Valga la pena recalcar que las concentraciones reales tanto de los pellets fabricados y el pellet comercial, tras el recalcado realizado por la cuantificación de HPLC son los que se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Descripción de la alimentación suministrada a los diferentes grupos de truchas

Grupo	Descripción
1	Alimento truchas engorde Naltech® (Sin pigmento)
2	Alimento truchas acabado Naltech® (Pigmento comercial)
A	<i>Haematococcus pluvialis</i> 0.8 mg.kg ⁻¹
B	<i>Haematococcus pluvialis</i> 1.7 mg.kg ⁻¹
C	<i>Haematococcus pluvialis</i> 3.3 mg.kg ⁻¹

Fuente: Registro investigación.

La cuantificación de Astaxantina en el músculo de las truchas se realizó por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución; la cual sirvió para dar una concentración del contenido de pigmento en los músculos de las diferentes muestras.

La Tabla 26 precisamente muestra los resultados para la cuantificación de Astaxantina mediante HPLC del grupo blanco que consistió en una jaula flotante con 100 especímenes, de los que se extrajo en forma aleatoria tres ejemplares, a los que se les retiró una porción de músculo, el cual fue sometido conforme al procedimiento descrito en el capítulo anterior. Este grupo recibió una dieta balanceada (Truchas engorde Naltech®) que no contenía pigmento alguno pero que sin embargo luego de realizar el análisis de cuantificación de Astaxantina por HPLC mostró una concentración de media

o promedio de 0.2 mg.kg^{-1} , con una desviación de 0.2. Estos valores resultan bajos por efecto de la dieta recibida

Tabla 26. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas del grupo Blanco (1).

Repetición	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg^{-1})
1	125694,50	0.2	0.2	0.2	0.2
2	76646,00	0.1	0.1	0.1	0.1
3	301230,50	0.4	0.4	0.4	0.4
Promedio					0.2
D. Estándar					0.2

Fuente: Registro de investigación.

La Tabla 27 muestra los resultados para la cuantificación de Astaxantina mediante HPLC del grupo control que al igual que el anterior grupo consistió en una jaula flotante con 100 especímenes de la cual se extrajeron tres muestras escogidas en forma aleatoria; a los que se les retiró una porción de músculo, y que fueron sometidas conforme al procedimiento descrito en el capítulo anterior. El grupo control recibió una dieta que incluía el pigmento comercial (Truchas acabado Naltech®). La concentración de Astaxantina media o promedio de este grupo fue de 1.5 mg.kg^{-1} , con una desviación de 0.4. Estos valores resultan un tanto superiores al blanco debido a la inclusión del pigmento comercial usado por la industria acuícola Aquatech®.

Tabla 27. Cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas del grupo Control (2)

Repetición	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg^{-1})
1	1922674.17	1.2	1.2	1.2	1.2
2	2134609.33	1.3	1.3	1.3	1.3
3	3171264.33	2.0	2.0	2.0	2.0
Promedio					1.5
D. Estándar					0.4

Fuente: Registro de investigación.

La Tabla 28 muestra la cuantificación de Astaxantina en el músculo de la trucha mediante HPLC del grupo tratado con *H. pluvialis* como componente de la dieta a las que se adicionó Astaxantina que según el fabricante corresponde a una concentración de 37.5 mg.kg⁻¹ contenida en esta alga, pero que sin embargo contenía una concentración real de 0.8 mg.kg⁻¹.

Se observa para este grupo que la concentración media de Astaxantina absorbida en el músculo de las truchas es de 1.3 mg.kg⁻¹ con una desviación de 0.5. Estos valores en comparación al grupo blanco son un tanto superiores pero similares al grupo control que recibió el pigmento comercial.

Tabla 28. Cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas del grupo A

Repetición	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg ⁻¹)
1	1098665,17	1.4	1.4	1.4	1.4
2	1335405,17	1.7	1.7	1.7	1.7
3	562028,667	0.7	0.7	0.7	0.7
Promedio					1.3
D. Estándar					0.5

Fuente: Registro de investigación.

Tabla 29. Cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas del grupo B

Repetición	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg ⁻¹)
1	3723153.83	4.7	4.7	4.7	4.7
2	3104409.67	3.9	3.9	3.9	3.9
3	1482654.83	1.9	1.9	1.9	1.9
Promedio					3.5
D. Estándar					1.5

Fuente: Registro de investigación.

La Tabla 29 muestra la cuantificación de Astaxantina mediante HPLC del grupo B tratado con *H. pluvialis* como biocomponente de la dieta de las truchas a las que se adicionó una concentración de 75 mg.kg⁻¹ de Astaxantina según el fabricante pero que sin embargo al realizar el análisis del polvo de la microalga solo llegó a contener 1.7 mg.kg⁻¹ de Astaxantina en dicha alga. Se observa para este grupo que la concentración media de Astaxantina absorbida por el músculo de las truchas es de 3.5 mg.kg⁻¹ con una desviación de 1.5. Estos valores son superiores no solo al grupo blanco sino al control y al grupo A.

La Tabla 30 muestra la cuantificación de Astaxantina mediante HPLC al grupo tratado con *H. pluvialis* como componente de la dieta de las truchas a las que se adicionó una concentración de 150 mg.kg⁻¹ de Astaxantina contenida en esta alga según los datos proporcionados por el fabricante de la referida alga; pero que sin embargo al realizar la cuantificación por HPLC del pigmento en el polvo de la microalga solo se llegó a adicionar una concentración real de 3.3 mg.kg⁻¹ de Astaxantina. Se observa para este grupo que la concentración media de Astaxantina absorbida por el músculo de las truchas es de 2.6 mg.kg⁻¹, con una desviación de 0.09. Estos valores son mayores a los tres primeros grupos (blanco, control y A), sin embargo se muestra un tanto inferior al último grupo B que recibió *H. pluvialis* con Astaxantina con una concentración real de 1.7 mg.kg⁻¹.

Tabla 30. Cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas del grupo C

Repetición	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg ⁻¹)
1	3829227.5	2.7	2.7	2.7	2.7
2	2011765.83	2.6	2.6	2.6	2.6
3	1941227.33	2.5	2.5	2.5	2.5
Promedio					2.6
D. Estándar					0.1

Fuente: Registro de investigación.

Todas estas semejanzas y diferencias de los distintos grupos hacen necesaria la realización de un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple (Test de Tukey). A continuación los resultados:

La Tabla 31 muestra los resultados para el análisis de varianza practicado a las concentraciones de Astaxantina presentes en el músculo de trucha, se trabajó a un nivel de confianza de 0.05. Se observa la significancia (Sig.) que es igual a 0.002, como este valor es inferior a 0.05 entonces se rechaza la hipótesis nula que afirma que los grupos son iguales y se acepta la hipótesis alternativa que asume que los grupos son diferentes.

Tabla 31. Análisis de varianza para la cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas.

	Suma de cuadrados	de Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	18.666	4	4.666	9.220	0.002
Intra-grupos	5.061	10	0.506		
Total	23.727	14			

Fuente: Registro de investigación.

La conclusión es que los valores de concentración de Astaxantina proveniente de los grupos blanco, control, A, B y C en tanto sus varianzas son significativamente diferentes.

Tabla 32. Test de Tukey para la cuantificación de Astaxantina en músculo de truchas.

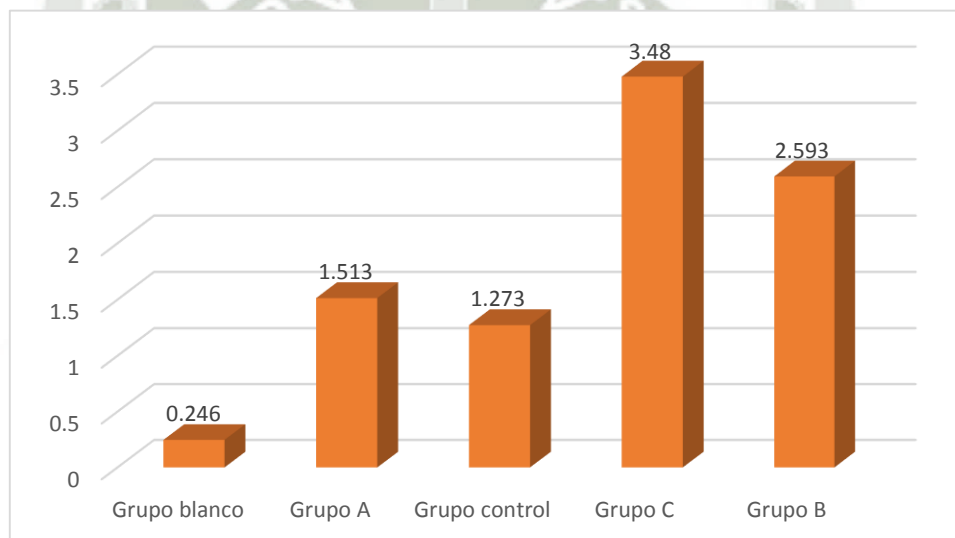
Grupo experimental	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Blanco	3	0.2467		
A	3	1.2733	1.2733	
Control	3	1.5133	1.5133	
C	3		2.5933	2.5933
B	3			3.4800
Sig.		0.261	0.230	0.570

Fuente: Registro de investigación.

El test de Tukey realizado para ver las diferencias de los grupos mediante comparaciones par a par, se muestra en la Tabla 32 en este se aprecia que el grupo B que presenta mayor promedio de concentración de Astaxantina y que se diferencia tanto del

grupo control (2) y blanco (1); es el que recibió *H. pluvialis* a una concentración real de 1.7 mg.kg^{-1} . En tanto que el grupo blanco es completamente diferente a los demás grupos. El grupo control y el grupo A con *H. pluvialis* al 0.8 mg.kg^{-1} ; estadísticamente son similares. Además el grupo C tratado con *H. pluvialis* a 3.3 mg.kg^{-1} a pesar de tener una concentración mayor es estadísticamente similar al grupo B tratado con *H. pluvialis* al 1.7 mg.kg^{-1}

Por lo cual concluimos que para lograr una concentración significativa de Astaxantina en el músculo de trucha, es necesario añadir en su dieta el componente *H. pluvialis* a una concentración de 1.7 mg.kg^{-1} ; ya que con esta concentración del pigmento se logró obtener una buena pigmentación a un costo y tiempo mínimo.



Fuente: Registro de investigación.

Figura 35. Gráfico de promedios de la concentración de Astaxantina mediante HPLC de los diferentes grupos experimentales.

En la Figura 35 podemos apreciar con mayor facilidad que no hay una relación directa entre concentración de Astaxantina y pigmentación absorbida por la trucha ya que el grupo B que contiene 1.7 mg.kg^{-1} de polvo de *H. pluvialis* fue el grupo que mayor concentración de pigmento absorbido presentó en comparación con el grupo C que contenía 3.3 mg.kg^{-1} de *H. pluvialis* el doble de concentración de Astaxantina pero que

sin embargo no logró pigmentar más que los otros grupos experimentales. Esta observación se puede deber a que la trucha presenta una limitada capacidad para la absorción de los carotenoides en las células musculares las cuales son responsables de la disminución Astaxantina en el músculo ante aumento de dosis; según referencia T. Ytrestøyl. B. Bjerkeng. 2007 ¹¹³ Esta es la probable razón por el que el grupo B muestra una mayor concentración de Astaxantina en el músculo de la trucha que el grupo C.

Por lo que podemos concluir que la dieta ideal para lograr una buena pigmentación es alimentar a la población de truchas con pellets que contengan a una concentración de 1.7 mg.kg^{-1} de Astaxantina.

15. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Como fue mencionado en el capítulo anterior se determinó la concentración de proteínas en los músculos de truchas por el método Kjeldahl, el cual consistió en triturar las muestras y luego pesar 1.000 g de dicha muestra en un matraz Kjeldahl seguidamente se añadió 0.75 g de sulfato de cobre, 1mL de ácido perclórico, 10 mL de ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio. Posteriormente se colocó el balón en el digestor y se procedió a calentar cuidadosamente a baja temperatura hasta que todo el material esté carbonizado, luego se tuvo que aumentar gradualmente la temperatura hasta que la disolución esté completamente clara, para luego hacerla enfriar (ver Figura 36). Seguidamente se añadió 400 mL de agua para disolver completamente la muestra, adicionándole además 3 g de zinc y 50 mL de hidróxido de sodio 1:1.



Figura 36. Digestión de las muestras

Inmediatamente se conectó el matraz a un sistema de destilación (Ver Figura 37), al cual previamente se le ha colocado en la salida del refrigerante un matraz de recepción

de 500 mL que contenía 50 mL de ácido bórico y unas gotas del reactivo Shiro Tashiro como indicador.



Figura 37. Destilación de las muestras

Se procedió a destilar hasta asegurarnos que todo el amoníaco haya pasado, para lo cual añadimos unas gotas del indicador Shiro Tashiro, las cuales hacen virar la solución de color violeta a verde. Luego retiramos el matraz receptor y procedemos a titular el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N.



Figura 38. Titulación de las muestras

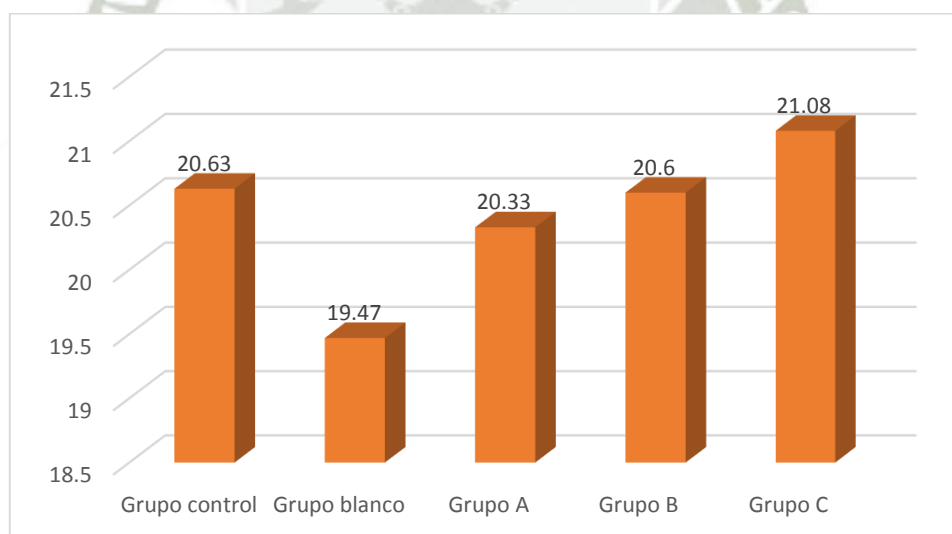
Los resultados de esta determinación de proteínas en las muestras del músculo de truchas fueron los siguientes: el grupo blanco (1) dio como concentración media 19.47 %, la muestra de la población que fue alimentada con el pigmento comercial dio una concentración media de 20.63 %, la muestra de la población que se alimentó con el suplemento que contenía 0.8 mg.kg⁻¹ de *H. pluvialis* contenía un 20.33 %; la muestra que fue alimentada con el biocomponente que contenía 1.7 mg.kg⁻¹ de *H. pluvialis* dio como cantidad proteica de 20.6 %; y por último las muestras que fueron alimentadas con el suplemento que contenía 3.3 mg.kg⁻¹ de *H. pluvialis* dieron como cantidad proteica 21.08 %. Todos estos resultados se expresan en la Tabla 33 y su respectivo gráfico.

Como se puede apreciar en los datos de la Tabla 33 que son graficados en la Figura 39; el grupo C (3.3 mg.kg^{-1} de *H. pluvialis*) fue el que presentó el valor más alto del porcentaje de proteínas, seguido del grupo control, el grupo B, el grupo A; en los cuales no hubo mucha diferencia significativa. En comparación con el grupo blanco que fue el que presentó el valor más bajo del porcentaje de proteínas.

Tabla 33. Porcentaje de proteínas presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales.

Grupo Proteínas	Media	Mediana	D. S.	Máximo	Mínimo
Blanco	20.63	20.93	0.56	21.14	19.81
Control	19.47	19.20	0.65	20.39	18.78
A	20.33	20.50	0.53	21.00	19.45
B	20.60	21.00	0.62	21.23	19.50
C	21.08	20.94	0.46	21.93	20.57

Fuente: Registro de investigación.



Fuente: Registro de investigación.

Figura 39. Gráfico de promedios del porcentaje de proteínas presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales.

La Tabla 34 muestra los resultados para el análisis de varianza practicado al porcentaje de proteínas presentes en el músculo de trucha, se trabajó también a un nivel de confianza del 0.05. Se observa la significancia (Sig.) que es igual a 0.005, como este valor es inferior a 0.05 entonces se rechaza la hipótesis nula que afirma que los grupos son iguales y se acepta la hipótesis que asume que los grupos son diferentes.

Tabla 34. Análisis de varianza al porcentaje de proteínas presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	12.830	4	3.207	9.917	0.005
Intra-grupos	12.936	40	0.323		
Total	25.766	44			

Fuente: Registro de investigación.

La conclusión es que los valores de porcentaje de proteínas proveniente de los grupos blanco, control, *H. pluvialis* al 0.8 mg.kg^{-1} , 1.7 mg.kg^{-1} y 3.3 mg.kg^{-1} en tanto sus medias y varianzas son significativamente diferentes por lo que se procedió a realizar un test de Tukey para determinar cuál de los grupos presentó mayor porcentaje de proteínas.

Tabla 35. Test de Tukey al porcentaje de proteínas presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales.

Grupo Proteínas	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
Blanco	19.4689	
A		20.3300
B		20.6089
Control		20.6344
C		21.0767
Sig.	1.000	0.059

Fuente: Registro de investigación.

El test de Tukey realizado para ver las diferencias de los grupos mediante comparaciones par a par, se muestra en la Tabla 35, en esta se aprecia que el grupo blanco

es estadísticamente diferente al resto de grupos experimentales; y que estos últimos a su vez presentan similitud. La primera conclusión a este resultado es que la Astaxantina si contribuye en el porcentaje proteico de la carne ya que todos los grupos que la recibieron – al margen de la fuente – son diferentes del blanco. La segunda conclusión es que la concentración de Astaxantina presente en *H. pluvialis* es indiferente para la riqueza proteica ya que estadísticamente todos los grupos son iguales.

16. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS

En cuanto al análisis de lípidos se realizó por el método de Soxhlet.

Como primer paso se realizó la determinación de la humedad de las muestras, ya que los lípidos no pueden ser extraídos con efectividad de los alimentos húmedos con el éter de petróleo, porque el solvente no puede penetrar fácilmente a los tejidos húmedos del alimento.



Figura 40. Proceso de extracción de lípidos.

Por lo que se inició el proceso triturando las muestras para luego pesar 10.000 g en una placa petri limpia y seca, posteriormente se colocó la muestra en la estufa a 105°C por 12 h. Pasado el tiempo estimado se dejó enfriando la placa que contiene la muestra en un desecador, una vez enfriado se pesó nuevamente. Obteniendo el porcentaje de humedad de la muestra. Una vez que la muestras estuvieron desecadas, se colocó el balón de extracción completamente limpio en la estufa por media hora a 105 ° C luego se retiró y dejó que se enfríe en un desecador para posteriormente pesar el balón y la muestra en un papel filtro. Seguidamente se colocó la muestra en la unidad de extracción, y se procedió al armado del equipo de Soxhlet como se observa en la Figura 40 agregándose

el solvente éter de petróleo a 2/3 del volumen total, se llevó a ebullición ajustando el calentamiento aproximadamente por 2 horas, tiempo en el que ocurrieron 50 ciclos.

Una vez terminado el proceso se colocó el balón en la estufa durante hora y media para eliminar el éter, obteniéndose así un líquido amarillo viscoso que representó la grasa extraída.



Figura 41. Grasa extraída

Culminado este proceso, enfiamos el balón en un desecador y pesamos nuevamente para así poder realizar la muestra y obtener el porcentaje de lípidos en la muestra analizada.

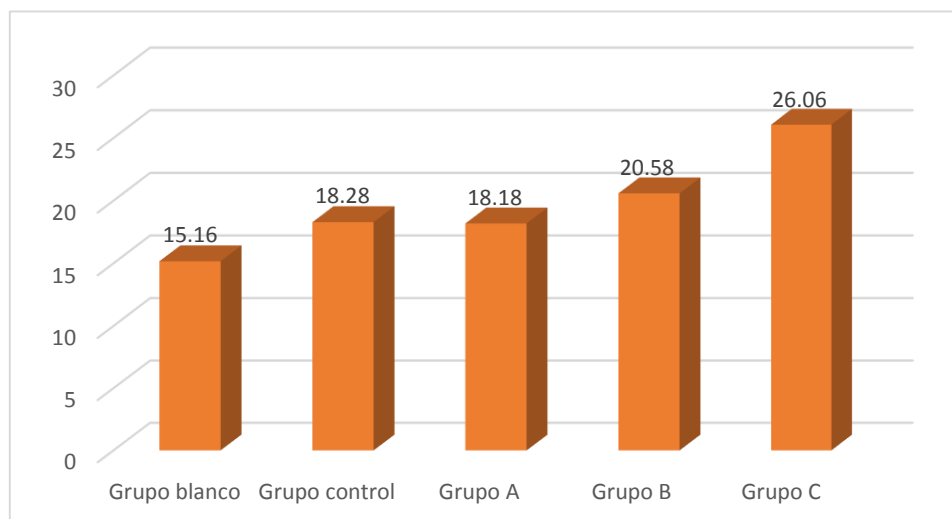
Tabla 36. Porcentaje de lípidos presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales.

Grupos	Media	Mediana	D. S.	Máximo	Suma
Blanco	15.16	15.57	0.89	15.78	45.49
Control	18.28	18.24	0.38	18.67	54.83
A	18.18	17.98	0.69	18.95	54.54
B	20.58	20.75	0.37	20.83	61.73
C	26.06	25.17	3.50	29.92	78.18

Fuente: Registro de investigación.

Los resultados de la determinación de lípidos en las muestras de músculos de las truchas fueron las siguientes: El grupo blanco (1) dio como concentración media 15.16 %, la muestra de la población que fue alimentada con el pigmento comercial dio una concentración media de 18.28 %, la de la población que se alimentó con el suplemento que contenía 0.8 mg.kg⁻¹ de *H. pluvialis* contenía un 18.18 %; la muestra que fue alimentada con el biocomponente que contenía 1.7 mg.kg⁻¹ de *H. pluvialis* dio como cantidad lipídica 20.58 %; y por último las muestras que fueron alimentadas con el

suplemento que contenía 3.3 mg.kg^{-1} de *H. pluvialis* dieron como cantidad lipídica el valor de 26.06 %. Todos estos resultados se expresan en la Tabla 36 y su respectivo gráfico (Figura 42).



Fuente: Registro de investigación.

Figura 42. Gráfico de promedios del porcentaje de lípidos presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales.

Tabla 37. Análisis de varianza al porcentaje de lípidos presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	198.372	4	49.593	17.954	0.000
Intra-grupos	27.623	10	2.762		
Total	225.995	14			

Fuente: Registro de investigación.

La Tabla 37 muestra los resultados para el análisis de varianza practicado al porcentaje de grasas presentes en el músculo de trucha, se trabajó también a un nivel de confianza del 0.05. Se observa la significancia (Sig.) que es igual a 0.000, como este valor es inferior a 0.05 entonces se rechaza la hipótesis nula que afirma que los grupos son iguales y se acepta la hipótesis que asume que los grupos son diferentes. La conclusión

es que los valores de porcentaje de grasas proveniente de los grupos blanco (1), control (2). A. B y C; en tanto sus medias y varianzas son significativamente diferentes.

El test de Tukey realizado para ver las diferencias de los grupos mediante comparaciones par a par, se muestra en la Tabla 38, en esta se aprecia que los grupos que presentan diferencias significativas respecto del blanco son el grupo B y C que recibieron *H. pluvialis* al 1.7 y al 3.3 mg.kg⁻¹, respectivamente. Siendo este último grupo el que presenta un valor con el mayor promedio en grasas y que presenta una diferencia no solo con el grupo blanco sino además con el grupo B tratado con *H. pluvialis* al 1.7 mg.kg⁻¹. El resto de grupos más bien tienen porcentajes de grasas similares al blanco. Por lo que concluimos que el grupo C tratado con *H. pluvialis* al 3.3 mg.kg⁻¹ presenta mayor contenido en grasas.

Tabla 38. Test de Tukey al porcentaje de lípidos presente en el músculo de trucha de los grupos experimentales.

Grupo Grasas	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
Blanco	15.1633		
A	18.1800	18.1800	
Control	18.2767	18.2767	
B		20.5767	
C			26.0600
Sig.	0.223	0.441	1.000

Fuente: Registro de investigación

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

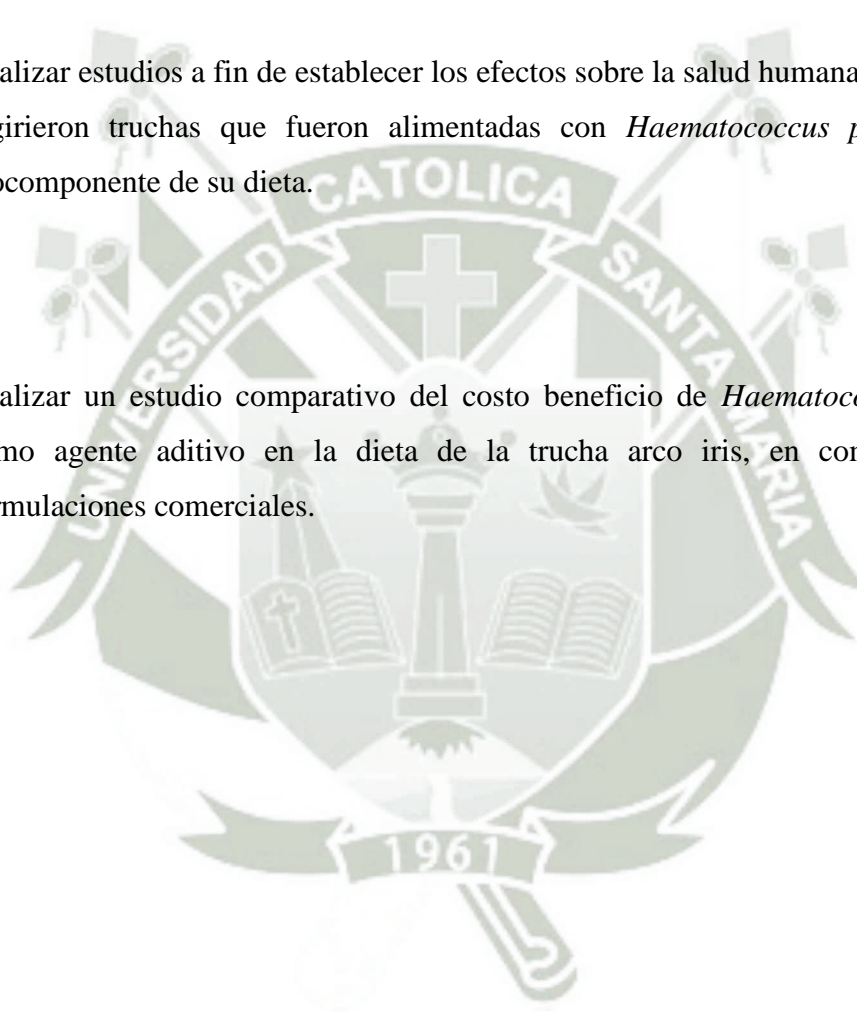
- Se obtuvo un universo de 500 truchas en estado juvenil las cuales presentaron escasa coloración dando un valor $<$ a 20 en escala colorimétrica Salmo-Fan.
- Se realizaron los cálculos correspondientes a la elaboración de los pellets conteniendo concentraciones teóricas iniciales de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* basadas en el valor proporcionado por el distribuidor.
- Se logró estandarizar una técnica por HPLC para la determinación de Astaxantina. Resultando ser esta técnica lineal, precisa, exacta, con límites de detección y cuantificación iguales a 0.126 mg. L⁻¹ y 0.318 mg.L⁻¹, respectivamente, además de resultar ser una metodología sencilla, rápida y económica en relación a las metodologías publicadas en bibliografía.
- Se determinó la concentración de Astaxantina presente el polvo de la microalga *Haematococcus pluvialis* mediante la técnica de cromatografía de alta resolución, hallándose una concentración promedio de 667.6 mg.kg⁻¹ lo que ameritó un recalcu en las concentraciones de los pellets fabricados. Así mismo se determinó la concentración de Astaxantina presente en los pellets comerciales dando una concentración promedio de 9.2 mg.kg⁻¹, siendo este valor diferente al declarado en la etiqueta del fabricante.
- Se logró realizar la crianza de truchas alimentándolas con pellets fabricados a concentraciones de 0.8, 1.7, y 3.3 mg.kg⁻¹ de Astaxantina contenida en la microalga *Haematococcus pluvialis*, y pellets comerciales, con un control biométrico. Así mismo se realizó un monitoreo continuo de la evolución de la talla y peso de la población en estudio, extrayendo semanalmente cuatro muestras de forma aleatoria de cada jaula por un periodo de cinco semanas. Mostrándose que

a nivel cuantitativo el grupo que presentó mayor evolución en cuanto a la talla se refiere fue el grupo A, seguido del grupo (1) blanco, (2) control, el grupo B y el grupo C que fue el que presentó los valores más bajos de talla. Y en cuanto a peso se refiere el grupo que presentó mayor evolución fue el grupo B, seguido del grupo C, grupo A, grupo (1) blanco y por último el grupo (2) control.

- Se cuantificó y comparó la concentración de Astaxantina presente en el músculo de truchas luego de ser alimentadas con los pellets comerciales y los pellets fabricados que contenían el polvo de *Haematococcus pluvialis* como biocomponente de la dieta. Esta microalga fue administrada en cantidades que representaban tres concentraciones de Astaxantina que fue de 0.8, 1.7, y 3.3 mg.kg⁻¹. El grupo que presentó mayor concentración de este pigmento fue el grupo B tratado con 1.7 mg.kg⁻¹ con un promedio de 3.5 mg.kg⁻¹, este valor fue superior no solo al blanco además del grupo C y el grupo control que recibió pellets con Astaxantina comercial.
- Para la evaluación del efecto nutricional se midió el porcentaje de proteínas y grasas presentes en la carne luego del periodo de tratamiento. En cuanto a las proteínas luego del análisis estadístico se concluye que la Astaxantina si tiene influencia en el porcentaje proteico de la carne, en tanto que la cantidad de *Haematococcus pluvialis* como biocomponente de la dieta un concentración del 0.8 mg.kg⁻¹ tiene un efecto similar al grupo de 3.3 mg.kg⁻¹. En cuanto al porcentaje de grasas los grupos con mayores porcentajes y diferentes del blanco fueron los grupos que recibieron *Haematococcus pluvialis* con Astaxantina al 1.7, y 3.3 mg.kg⁻¹. Como conclusión se puede considerar que *Haematococcus pluvialis* al 1.7 mg.kg⁻¹ son suficientes para generar un efecto nutricional con aumento de proteínas y grasas en la trucha.

SUGERENCIAS

1. Realizar estudios a fin de determinar la influencia de *Haematococcus pluvialis* en otros parámetros bioindicadores de la trucha arco iris luego de ser alimentadas con este biocomponente.
2. Realizar estudios a fin de establecer los efectos sobre la salud humana en sujetos que ingirieron truchas que fueron alimentadas con *Haematococcus pluvialis* como biocomponente de su dieta.
3. Realizar un estudio comparativo del costo beneficio de *Haematococcus pluvialis* como agente aditivo en la dieta de la trucha arco iris, en comparación con formulaciones comerciales.



BIBLIOGRAFÍA

1. AKIYAMA, D. Soybean meal utilization by marine Shrimp. In Proc. Of AOCS world Congress on vegetable protein utilization in Human foods and animal feedstuffs. Singapore. October 1988; 2-7. 29p.
2. AKIYAMA, D. Utilización de la pasta de soya en los alimentos acuícolas. ASA/México A.N. 1992; No. 108 1ra reimpresión. 20p.
3. AKIYAMA, D. y POLANCO, B., Manejo de granjas en cultivo semintensivo de salmónidos. Manual Técnico. Asociación Americana de soya. Venezuela. 1995; 30p.
4. AL-KHALIFA. A.S. AND SIMPSON, K., F. Metabolism of astaxanthin in the rainbow trout (Sahoguiraneri). Comp. Biochem. Physiol. 1988; 9 1 B: 563-568.
5. ALMENDRAS, F. M. SABALLE. Guía práctica: Uso de pigmentos en Salmonideos bajo condiciones comerciales de Lab. Roche. El teniente 061, Parque Industrial, Puerto Montt, Chile. 1998
6. ALMENDRAS, F. y SABELLE, M. Guía práctica: Uso de pigmentos en salmonídeos bajo condiciones comerciales. Productos Roche Ltda. 1999; 97 p.
7. AN, G-H., SCHUMAN, D. B., JOHNSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. Applied and Environmental Microbiology. 1989; 55, 116-121.
8. ANDERSON, S. Salmon color and the consumer. In IIFET conference. Oregon State University. 2000.
9. ANÓNIMO. Aquarium. Department of marine resources of maine. <<http://www.state.me.us/dmr/rm/Aquarium/teachersguidesample-pages-of-teachers-guide.htm>> Septiembre 21, 2001.
10. AOAC Internacional (Association of official analytical chemists) (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. EEUU; 2012.
11. ARMENTA LÓPEZ R., Extracción de caroproteínas a partir de residuos de camarón fermentados: Revista Mexicana de Ingeniería Química (México) 2002; 1 (1) 49-45.

12. ASKER, D. Y OHTA, Y. Production of cantaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999; 88(6):617-621.
13. BIDIGARE, R.R., Ondrusek, M.E., Kennicutt, M.C., Iturriaga, R., Harvey, H.R., Hoham, R.W. y Macko, S.A. 1993. *J. Phycol.* 29: 427-434.
14. BJERKENG B., FOLLINGM., LAGOCKI S., STOREBAKKEN T., OLLI J.J. & ALSTED N. Bioavailability of all – E –astaxanthin and IX isomers of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 1997; (108), 333-346.
15. BJERKENG, B., HATLEN, B., JOBLING, M., Astaxanthin and its metabolites idoxanthin and crustaxanthin in flesh, skin, and gonads of sexually immature and maturing Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 2000^a; (125B), 395-404.
16. BJERKENG, B.; STOREBAKKEN, T.; Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation. *Aquaculture*. 1997; (108): 333-346.
17. BOROWITZKA, MA, HUISMAN, JM, OSBORN, A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *J Appl Phyco*. 1991; (3): 295-304.
18. BUCHHEIM, M.A., MAULEY, M.A., ZIMMER, E.A., THERIOT, E.C. Y CHAPMAN, R.L., Multiple origins of colonial green flagellates from unicells. Evidence from molecular and organism characters. *Mol Phylogen Evol.*, 1995; 4:322-343.
19. BUCHHEIM, M.A., Y CHAPMAN, R.L. Phylogeny of the colonial green flagellates: a study of 18S and 26S RNA sequence data. *Biosystems.*, 1991; 25:85-100.
20. BURCZYKJ., Cell Wall carotenoids in green algae wich form sporopollenins. *Phytochemistry*, 1987; 26:121-128.
21. CAMPABADAL, C.; CELIS, A. Factores que afectan la calidad de los alimentos acuícolas. *Avances en nutrición acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición acuícola. Mérida, Yucatán.* 2000; 19 (22): 523-540.
22. CASTRO. E. G. MENA. Pigmentos carotenoides - Rol nutricional en especies salmonídeas y fuentes de pigmentación. Programa Cooperativo Gubernamental. FAO -Italia. GCP/RLA, 102, ITA. Proyecto Aquila II. Documento de campo N° 16: 213-227

23. CHO C. Y. & KAUSHIK S.J., Nutritional energetics in fish: Energy and protein utilisation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). World review of nutrition and dietetics, 1990; 61, 132 -172.
24. CHOPRA, M., WILSON, R.L. Y THURNHAM, D.I., Free radical scavenging ability of lutein in vitro. En: Carotenoids in Human Health. L.M. Canfield, N.I. Krinsky y J.A. Olson (Eds.). Annual NY Academic Sciences. Nueva York 1993; pp. 61-67.
25. CHOUBERT G. & HEINRICH O. Carotenoid pigments of the Green alga *Haematococcus pluvialis*: assay on rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and cantaxanthin. *Aquaculture*, 1993; 112, 217-226.
26. CHOUBERT G., GUILLOU A. & FAUCONNEAU B. Absorption and fate of labelled cantaxanthin 15,15`- H in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1987; 87^a, 717-720.
27. CHOUBERT, G. & STOREBAKKEN, T., Digestibility of astaxanthin and canthaxanthin in rainbow trout as affected by dietary concentration, feeding rate and water salinity. *Ann. Zootech.*, 1996; 45, 445– 453.
28. CHOUBERT, G., Pigmentation of the salmonidae: dynamics and factors of variation. *Productions – animales*. 1992; 5:4, 235 – 246.
29. CHOUBERT, G.; STOREBAKKEN, T., Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentation of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations. *Aquaculture*. 1989; 81: 69-77.
30. CHRISTIANSEN, R., GLETTE, J., LIE, Ø., TORRISSEN, O.J., WAAGBØ, R., Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed semi-purified diets with and without astaxanthin supplementation. *J. Fish Diseases*, 1995; 18, 317-328.
31. CHRISTIANSEN, R., STRUKSNÆS, G., ESTERMANN, R., TORRISSEN, O.J., Assessment of flesh colour in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquacult. Res.*, 1996; 26, 311-321.
32. CHRISTIANSEN, R.; TORRISSEN, O.J., Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed different dietary levels of astaxanthin. Juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 1996; Vol. 2 (1): 55-62.

33. COHEN, Z., Chemicals from Microalgae (1 ed.): CRC Press, 1999.
34. CRAIK, J.C.A., Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, 1985; 41: 213-226.
35. DAVIS, R. W., DNA Cloning Techniques: A Practical Approach (Glover, D., ed), 1985; pp. 49-70, IRL Press, Oxford.
36. DELGADO-VARGAS, F., JIMENEZ, A.R. Y PAREDES-LOPEZ, O., Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2000; 40, 173–289.
37. DEMING, D.M. & ERDMAN, J.W., Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure Appl. Chem.*, 1999; 12, 2213–2223.
Disponible en:
http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manua_trucha_jaulas.pdf.
38. ELLIOT, A.M. *Arch. Protistenk.* 1934; 82: 250-272.
39. FANG, T. J., & WANG, J.-M., Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. *Process Biochemistry*, 2002; 37(11): 1235-1245.
40. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA USP 30. The united states Pharmacopeia Convention. United States. 2007.
41. FLOTOW, J. VON. BEOBACHTUNGEN ÜBER, *Haematococcus pluvialis* pluvialis. *Yerh. k. Leopold.-Carol. Akad. naturf*, 1844; 20 (1): 20-28.
42. FRANCESCO, M., PARISI, G., MEDALE, F., KAUSHIK, S.J., POLI, B.M., 2004. Effect of long term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 263, 413–429.
43. GALLEGOS, G. Estadística Aplicada. Ediciones Lumen. 1era Edición. Arequipa, 1994.
44. GOODWIN, T.W. JAMIRKON, M., Studies in carotenogenesis: II. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochem.*, 1954; J. 57, 376-381.

45. GORTON HL, VOGELMANN TC., Ultraviolet radiation and the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Photochem photobiol.* 2003 Jun; 77(6):608-15.
46. GORTON HL, WILLIAMS WE, VOGELMANN TC., The light environment and cellular optics of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Photochem Photobiol.* 2001 Jun; 73(6):611-20.
47. GROSS, M.R. Alternative reproductive tactics and strategies. Behavioral ecology, G. Potts and R. Wootton, editors. *Fish reproduction: strategics and tactics.* Academic Press, London England. 1999, (12):155-75.
48. GRUNG, M. Y LIAAN-JENSEN, S. Algal carotenoids; secondary carotenoids of algae 3; carotenoids in a natural bloom of *Euglena sanguinea*. *Biochem Syst Ecol*, 1993; 21: 757-763.
49. GUERIN M, HUNTLEY ME, OLAIZOLA M. *Haematococcus* astaxanthin: application for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 2003; 21(5):210–216. doi: 10.1016/S0167-7799(03)00078-7. [[PubMed](#)][[Cross Ref](#)]
50. HAGEN, C.; GRÜNEWALD, K.; XYLÄNDER, M., & ROTHE, E. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*, 2001; 13(1): 79-87.
51. HAILA, Y., Islands and fragments. Maintaining biodiversity in forest ecosystems. Cambridge University Press, Cambridge, UK 1999; 1: 234-264.
52. HARDY, R.W., Torrissen, O-J. and Scott, T.M. Absorption and distribution of “Cllabeled canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) F Aquaculture. 1990; 87: 331-340.
53. HIGUERA-CIAPARA I, FÉLIX-VALENZUELA L, GOYCOOLEA FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006; 46:185–96. [[PubMed](#)]
54. HIRSCHBERG, J., Production of carotenoids (including the ketocarotenoids astaxanthin and adonixanthin) using a novel carotenoid-secreting bacterial species. <http://www.yissum.co.il/dsll617.htm>, 2001.
55. HUBER-PESTALOZZI, G., (Ed.), Stuttgart., E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. 1961; 70 (1): 216-218.

56. HUSSEIN, G., SANKAWA, U., GOTO, H., MATSUMOTO, K., & WATANABE, H., Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of natural products*. 2006; 69(3), 443–449.
57. JOHN E. DORE AND GERALD R. CYSEWSKI, *Haematococcus* algae meal as a source of natural astaxanthin for aquaculture feeds: *Cyanotech Corporation Queen Kaahumanu Hwy (USA)*. 2010; (102), 73-4460: 102.
58. JOHNSON, E. A., AN, G.-H., Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1991; 11(4), 297-326.
59. JOHNSON, E. A., *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *International Microbiology*. 2003; 6(3): 169-174.
60. JOHNSON, E. A., VILLA, T. G. Y LEWIS, M. J., *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture*. 1980; 20:123.
61. KAKIZONO T, KOBAYASHI M, NAGAI S, Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J Ferment Bioeng*. 1992; 74: 403±405.
62. KAZAKEVICH, Y., LOBRUTTO, R., “HPLC for pharmaceutical scientist”. United States of America. 2007.
63. KÜHN, R. Y SORENSON, N. A., Haber astaxanthin and ovoerdin. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1983; 71:1879.
64. KURILICH, A. C., AND J. A. JUVIK., Quantification of carotenoids and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47:1948–1955.
65. LATSCHA, T., Carotenoids in aquatic animal nutrition, their nature and significance in animal feeds, Roche Publication, F. Hoffman- La Roche. *Animal Nutrition and health*, Basle, Switzerland, 1990; (2175); 110 pp.
66. LAWRENCE, A.L.; CASTILLO, F.L.; STURMER L.N.; y AKIYAMA, D., 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 USAROC-USA, Taipei, Taiwan. 1986; 18p.
67. LEE YK, SOH CW, Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J Phycol.* 1991; 27: 575±577.

68. LEE, Y.K. Y DING, S.Y., Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). J Phyco. 1994; 30:445-449.
69. LEITRITZ EARL; MACKLIN R. Trout and salmon culture (Hatchery Methods) (Fish Bulletin, No. 107). 1ed. California: Paperback; 1969.
70. LI KR, WWANG HH, HAN G, WANG QJ, FAN J., Effects of brassinolide on the survival, growth and drought resistance of Robinia pseudoacacia seedlings under water-stress. New Forests, 2008; 35: 255-266.
71. LIM, C.; DOMINY, W. Utilization of plant proteins by warmwater fish. ASA Technical Bull. Singapore, 1989; (3)12:15p.
72. LIU, X. AND OSAWA, T., Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007; 357: 187-193.
73. LORENZ R. T; CYSEWSKI G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in Biotechnol. 2000; 18:160-167.
74. LOWELL, R.T. Use of soybean products in diets for aquaculture species. ASA Animal Nutrition Research Highlines. Special Edition. 1984; 6p.
75. MARCH, B.E.; MACMILLAN, C., Muscle pigmentation and plasma concentrations of astaxanthin in rainbow trout, chinook salmon, and atlantic salmon in response to different dietary levels of astaxanthin. The Progressive Fish-Culturist, 1996; 58:178-186.
76. MARKOVITS, A., Adonis: Potencial fuente vegetal de astaxantina. Chile pesquero, 1991; 69, 25-26.
77. MENDOZA BOJORQUEZ RAUL. Manual del cultivo de Trucha Arco iris en jaulas. Lima: Ministerio de la Producción y Fondo Nacional de Desarrollo pesquero; 2004.
78. MEYERS, S.P., Developments in world aquaculture, feed formulations, and role of carotenoids. Pure and Applied Chemistry. 1994; 66(5):1069-1076.
79. MILLER NJ, RICE-EVANS CA, DAVIES MJ, GOPINATHAN V & MILNER A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science, 1961 84, 407±412.

80. Ministerio de la Producción. Estudio sobre la acuicultura de la trucha a nivel mundial, el desenvolvimiento de la importación de ovas, la tendencia de la producción nacional y su comercialización. Lima: Dirección general de Acuicultura; 2011.
81. Municipalidad Distrital Ragash. Manual de crianza de Truchas (*Oncorhynchus mykiss*). Ancash: CEDEP; 2009
82. NICKELL, D.C.; BROMAGE, N.R., Problems of pigmentation: lipids and maturation. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling FK9, 1997 4LA. 20p.
83. NICKELL, D.C.; BROMAGE, N.R., 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, 1998; 169: 233-246.
84. NORMATIVIDAD MEXICANA Dirección General de Normas. Alimentos. Determinación de proteínas. Foods. determination of proteins. Normas mexicanas, NMX-F-068-S-1980, disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-068-S-1980.PDF>.
85. O'CONNOR, I. Y O'BRIEN, N., Modulation of UVA light-induced oxidative stress by p-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. Journal of Dermatological Science, 1998; 16:226-230.
86. OLAIZOLA, M., Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. Journal of Applied Phycology, 2000; 12(3): 499-506.
87. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACION Y LA AGRICULTURA. Depósito de documentos de la FAO, Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos; Departamento de Pesca, disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab489s/AB489S03.htm>.
88. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACION Y LA AGRICULTURA (FAO). FishStat Plus - Programa informático universal para series cronológicas de estadísticas pesqueras.

- Departamento de Pesca y Acuicultura; 2014 disponible en <http://www.fao.org/fishery/topic/16073/es>.
89. ORTEGA, H., M. HIDALGO Y G. BÉRTIZ., Los Peces del río Yavarí. En: Pitman, N., C. Vriesendorp, D. Moskovits (Eds.) YAVARI: Rapid Biological Inventories Report 11. Chicago IL: The Field Museum of Natural History, 2003; Pp: 59-62 y 220-43.
 90. PERDERSEN. C. L., Energy budgets for juvenile rainbow trout at various oxygen concentrations. *Aquaculture*, 1987; 97. 203-216.
 91. POKNIAK, J; BRAVO, I; BATTAGLIA, J; CORNEJO, S. (2000). Evaluación de dos estrategias de pigmentación en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). (En redacción).
 92. PUTNAM, M., A review of the nature, function, variability, and supply of pigments in salmonid fish. In: de Pauw, N., Joyce, J. (Eds.), *Aquaculture and the Environment*, Eur. Aquacult. Soc. Spec., Gent, Belgium 1991; 16, pp. 245- 263.
 93. QUILLET, E., LE GUILLOU, S., AUBIN, J., FAUCONNEAU, B., Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2005; 245, 49-61.
 94. RENSTROM, B., LIAAEN-JENSEN, S., Fatty acid composition of some esterified carotenoids. *Comp. Biochem. Physiol*, 1981; 69B, 626-627.
 95. RODRIGUEZ-AMAYA, DB. A GUIDE TO CAROTENOID ANALYSIS IN FOODS. Washington DC: ILSI Press, 2001.
 96. ROUSEFF, R.R., High Performance Liquid Chromatographic separation and Spectral Characterization of the Pigments in Astaxanthin. *J, Fd. Sci*, 1988; 53 (6): 1 823-11826.
 97. SCHIEDT K. VECCHI M. & GLINZ E., Astaxanthin and its metabolites in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1986; 83B, 9-12.
 98. SCHIEDT, K., LEUENBERGER, P.J., VECCHI, M. Y GLINZ, E., Adsorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. *Pure and Applied Chemistry*, 1985; 57(5):685-692.
 99. SCHROEDER WA, JOHNSON EA., Carotenoids protect Pha • a rhodozyma against singlet oxygen damage. *J Ind Microbiol*, 1995; 14: 502±507.

100. SHAHIDI, F. Y BROWN J.A., Carotenoids pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science*, 1998; 38(1): 1-67.
101. SIGURGISLADOTTIR, S., PARRISH, C.C., LALL, S.P., ACKMAN, R.G., Effects of feeding natural tocopherols and astaxanthin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet quality. *Food Res.*, 1994 Int. 27, 23-32.
102. SINNOTT, R., Keep them in the pink to stay competitive. *Fish Farmer*, 1989; 12(5): 2326.
103. SIVTSEVA, L.V., Qualitative composition and distribution of carotenoids and vitamin A in the organs and tissues of rainbow trout, *Salmoguidneri*. *J. Ichthyol.*, 1982; 22: 96-100.
104. STAPLES DJ AND NOMURA M., Influence of body size and food ration on the energy budget of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *J. Fish Biol.*, 1976; 9: 26-43.
105. STOREBAKKEN, T. y No, H.K., Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*, 1992; 100:209-229.
106. T. STOREBAKKEN, P. FOSS, K. SHIEDT, E. AUSTRENG, S. LIAAEN-JENSEN AND U. MANZ, *Aquaculture*, 1987; 65, 279.
107. T. YTRESTØYL, B. BJERKENG, Intraperitoneal and dietary administration of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) — Plasma uptake and tissue distribution of geometrical E/Z isomers: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B (USA)* 2007; (147): 250–259.
108. TÉLLEZ VIVAR MAURICIO. Dinámica de pigmentación en *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo salar* en fase marina de cultivo [Tesis de Pregrado]. Chile: UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE; 1998.V.
109. TORRISSEN O.J., R. CHRISTIANSEN, G. STRUKNAES, R. ESTERMANN., Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period. *Aquacultura.*, 1995; Nut.1: 77-84.
110. TORRISSEN, O. J., Pigmentation of salmonids: a comparison of astaxanthin and canthaxanthin as pigment sources for rainbow trout. *Aquaculture*, 1986; 53: 271-278.

111. TORRISSEN, O.J., HARDY, R.W. Y SHEARER, K.D., Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. *Critical Reviews in Aquatic Sciences*, 1989; 1 (2):209-225.
112. TORRISSEN, O.J., HARDY, R.W., SHEARER, K.D., SCOTT, T.M. AND STONE, F.E., Effects of dietary canthaxanthin level and lipid level on apparent digestibility coefficients for canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1990; 88: 35 1-362.
113. TORRISSEN, O.J., K. INGEBRIGTSEN., Tissue distribution of C-Astaxanthin in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult.* 1992; 108: 381-386.
114. TORRISSEN, O.J., Pigmentation of salmonids effects of carotenoids in eggs and start feeding diet on survival and growth rate. *Aquaculture*, 1984 43: 185-193.
115. TRIPATHI, U.; SARADA, R., & RAVISHANKAR, G., Effect of culture conditions on growth of green alga —*Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2002; 24(3): 323-329.
116. VALCARSEL, M. Técnicas analíticas de separación. 1988.
117. YAVUZ YAGIZ, HORDUR G. KRISTINSSON, MURAT O. BALABAN, BRUCE A. WELT, SIVAKUMAR RAGHAVAN, MAURICE R. MARSHALL, Correlation between astaxanthin amount and a* value in fresh Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle during different irradiation doses: *Food Chemistry (USA)* 2010; (120): 121-127.
118. YONG, Y. Y. R., LEE, Y. K., A possible role of photoprotection for secondary carotenoids in the cytoplasm of the green alga *Haematococcus lacustris* (Chl. Rophyta). *Phycologia*. 1991; 30, 257 261.
119. YUAN J.P. Y CHEN F., Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999; 47 (1): 31-35.
120. ZHU, C.; NAQVI, S.; CAPELL, T., & CHRISTOU, P., Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009; 483(2): 182-190.

ANEXOS

ANEXO I. Manejo de la Alimentación

Tabla 39. Factor de porcentajes para suministrar alimento seco (balanceado) en relación a la temperatura, peso y talla.

T ° C	PESO (g)	hasta 0.18	0.18- 1.5	1.5- 5.2	5.2- 12.0	12.0- 23.0	23.0- 39.1	39.1- 61.7	61.7- 91.7	91.7- 131.6	131.6- 181.8	181.8
	LONG (cm)	hasta 2.5	2.5- 5.0	6.0- 7.6	7.6- 10.1	10.1- 12.7	12.7- 15.2	15.2- 17.7	17.7- 20.3	20.3- 22.8	22.8- 25.4	25.4
2.2		2.7	2.2	1.7	1.3	1.0	0.8	0.7	0.6	0.5	0.5	0.4
2.7		2.7	2.3	1.8	1.4	1.1	0.9	0.7	0.6	0.5	0.5	0.4
3.3		2.9	2.4	2.0	1.5	1.2	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.5
3.7		3.0	2.5	2.2	1.7	1.3	0.9	0.8	0.7	0.6	0.6	0.5
4.4		3.2	2.6	2.2	1.8	1.3	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
5		3.3	2.8	2.2	1.8	1.4	1.1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
5.5		3.5	2.8	2.4	1.9	1.4	1.2	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
6.1		3.6	3.0	2.5	2.0	1.5	1.2	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6
6.6		3.8	3.1	2.5	2.1	1.6	1.3	1.0	0.9	0.8	0.8	0.6
7.2		4.0	3.3	2.7	2.1	1.7	1.3	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7
7.7		4.1	3.4	2.8	2.2	1.7	1.4	1.2	1.0	0.9	0.8	0.7
8.3		4.3	3.6	3.0	2.3	1.8	1.4	1.2	1.0	0.9	0.8	0.7
8.8		4.5	3.8	3.0	2.4	1.9	1.5	1.3	1.1	1.0	0.9	0.8
9.4		4.7	3.9	3.2	2.5	2.0	1.5	1.3	1.1	1.0	0.9	0.8
10		5.2	4.1	3.4	2.7	2.1	1.7	1.4	1.2	1.1	1.0	0.9
10.5		5.4	4.5	3.5	2.8	2.1	1.7	1.5	1.3	1.1	1.0	0.9
11.1		5.4	4.5	3.6	2.8	2.2	1.7	1.5	1.3	1.1	1.0	0.9
11.4		5.6	4.7	3.8	2.9	2.3	1.8	1.5	1.3	1.1	1.1	1.0
12.2		5.8	4.9	3.9	3.0	2.4	1.9	1.6	1.4	1.3	1.1	1.0
12.7		6.1	5.1	4.2	3.2	2.5	2.0	1.6	1.4	1.3	1.1	1.0
13.3		6.3	5.3	4.3	3.3	2.6	2.0	1.7	1.5	1.3	1.2	1.0
13.8		6.7	5.5	4.5	3.5	2.7	2.1	1.8	1.5	1.4	1.2	1.1
14.4		7.0	5.8	4.8	3.6	2.8	2.2	1.9	1.6	1.4	1.3	1.2
15.0		7.3	6.0	5.0	3.7	2.9	2.3	1.9	1.7	1.5	1.3	1.2
15.5		7.5	6.3	5.1	3.9	3.0	2.4	2.0	1.7	1.5	1.4	1.3
16.1		7.8	6.5	5.3	4.1	3.1	2.5	2.0	1.8	1.6	1.4	1.3
16.6		8.1	6.7	5.5	4.3	3.2	2.6	2.1	1.8	1.6	1.5	1.4
17.2		8.4	7.0	5.7	4.5	3.4	2.7	2.1	1.9	1.7	1.5	1.4
17.7		8.7	7.2	5.9	4.7	3.5	2.8	2.2	1.9	1.7	1.6	1.5
18.3		9.0	7.5	6.1	4.9	3.6	2.9	2.2	2.0	1.8	1.6	1.5
18.8		9.3	7.8	6.3	5.1	3.8	3.0	2.3	2.0	1.8	1.6	1.6
19.4		9.6	9.1	6.6	5.3	3.9	3.1	2.4	2.1	1.9	1.7	1.6
20		9.9	9.4	6.9	5.5	4.0	3.2	2.5	2.1	2.0	1.8	1.7

Tabla 40. Cuadros de conversión alimenticia

→Biomasa Inicial

Peso inicial del total de truchas	20.972 Kg
Nº de Jaulas	5
Biomasa inicial	104.86 kilos de trucha
Factor porcentual	1.2
Numero de truchas por jaula	100
Alimento a administrar para cada jaula	280 g por día.

→Biomasa Intermedia

Nº de peces muestreados: 25

Peso promedio de las truchas	250 g
Total de truchas	468
Biomasa intermedia	117.00 kilos de trucha
Factor porcentual	1.2
Alimento a administrar para cada jaula	300 g por día.

ANEXO II. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas pre tratamiento.

Tabla 41. Evaluación del crecimiento y coloración de las de trucha arco iris en tiempo cero.

CARACTERÍSTICAS	TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)					
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Color de la carne (escala Salmofan® ¹)	< a 20	< a 20	< a 20	< a 20	< a 20	< a 20
Tamaño del pez ² (cm)	25	23	24	21.5	24.5	23.6
Peso (g) ⁴	200	189	192	196	198	195

ANEXO III. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas post tratamiento; en la primera semana de evaluación.

Tabla 42. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la primera semana de evaluación

MUESTRA	Grupo blanco (1)		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	296.0	26.5	20.0
2	288.0	28.4	20.0
3	264.0	28.4	20.0
4	188.0	25.9	21.0
X	259.0	27.3	20.3

Tabla 43. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la primera semana de evaluación

MUESTRA	Grupo control (2)		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	289.0	27.0	24.0
2	324.0	28.5	23.0
3	227.0	28.0	25.0
4	262.0	26.9	24.0
X	275.5	27.6	24.0

Tabla 44. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A en la primera semana de evaluación

MUESTRA	Grupo A		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	237.0	26.0	22.0
2	270.0	26.5	23.0
3	253.0	26.0	23.0
4	272.0	26.5	23.0
X	258.0	26.3	22.8

Tabla 45. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la primera semana de evaluación

MUESTRA	Grupo B		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	254.0	26.0	25.0
2	248.0	25.0	25.0
3	274.0	26.8	24.0
4	293.0	28.0	23.0
X	267.3	26.5	24.3

Tabla 46. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la primera semana de evaluación

MUESTRA	Grupo C		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	234.0	25.5	24.0
2	254.0	26.5	23.0
3	221.0	26.5	24.0
4	244.0	27.0	25.0
X	238.3	26.4	24.0

ANEXO IV. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas post tratamiento; en la segunda semana de evaluación

Tabla 47. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la segunda semana de evaluación

MUESTRA	Grupo blanco (1)		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	291.0	28.7	21.0
2	259.0	26.5	20.0
3	260.0	28.0	20.0
4	297.0	28.0	20.0
X	276.8	27.8	20.8

Tabla 48. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la segunda semana de evaluación

MUESTRA	Grupo control (2)		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	286.0	28.5	25.0
2	338.0	28.0	25.0
3	325.0	25.0	24.0
4	255.0	28.8	23.0
X	301.0	27.6	24.3

Tabla 49. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A en la segunda semana de evaluación

MUESTRA	Grupo A		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	303.0	28.0	23.0
2	290.0	27.0	22.0
3	291.0	29.0	23.0
4	288.0	26.5	23.0
X	293.0	27.6	22.8

Tabla 50. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la segunda semana de evaluación

MUESTRA	Grupo B		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	304.0	27.5	24.0
2	286.0	26.5	24.0
3	363.0	29.5	25.0
4	263.0	27.0	24.0
X	304.0	27.6	24.3

Tabla 51. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la segunda semana de evaluación

MUESTRA	Grupo C		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	199.0	24.5	23.0
2	289.0	29.0	24.0
3	348.0	27.0	25.0
4	289.0	27.0	24.0
X	281.3	26.9	24.0

ANEXO V. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas post tratamiento; en la tercera semana de evaluación

Tabla 52. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la tercera semana de evaluación

MUESTRA	Grupo blanco (1)		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	303.0	27.6	22.0
2	366.0	29.5	20.0
3	262.0	27.8	20.0
4	368.0	30.0	21.0
X	324.8	28.7	20.8

Tabla 53. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la tercera semana de evaluación

MUESTRA	Grupo control (2)		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	326.0	29.0	26.0
2	274.0	27.5	26.0
3	291.0	28.5	25.0
4	333.0	29.0	24.0
X	306.0	28.5	25.3

Tabla 54. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A en la tercera semana de evaluación

MUESTRA	Grupo A		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	316.0	28.5	24.0
2	312.0	28.9	24.0
3	344.0	27.8	23.0
4	228.0	28.8	24.0
X	300.0	28.5	23.8

Tabla 55. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la tercera semana de evaluación

	Grupo B		
MUESTRA	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	347.0	28.5	26.0
2	351.0	29.0	24.0
3	247.0	27.5	26.0
4	359.0	29.0	25.0
X	326.0	28.5	25.3

Tabla 56. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la tercera semana de evaluación

	Grupo C		
MUESTRA	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	270.0	26.5	25.0
2	322.0	27.9	26.0
3	308.0	29.0	27.0
4	269.0	27.5	25.0
X	292.3	27.7	25.8

ANEXO VI. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas post tratamiento; en la cuarta semana de evaluación

Tabla 57. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la cuarta semana de evaluación

	Grupo blanco (1)		
MUESTRA	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	488.0	32.0	21.0
2	303.0	28.5	21.0
3	284.0	26.5	21.0
4	428.0	31.0	20.0
X	375.8	29.5	20.8

Tabla 58. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la cuarta semana de evaluación

	Grupo control (2)		
MUESTRA	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	359.0	30.0	25.0
2	373.0	29.0	26.0
3	301.0	25.5	27.0
4	411.0	31.0	26.0
X	361.0	28.9	26.0

Tabla 59. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A en la cuarta semana de evaluación

MUESTRA	Grupo A		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	342.0	29.0	24.0
2	481.0	30.0	25.0
3	432.0	30.0	25.0
4	338.0	31.0	24.0
X	398.3	30.0	24.5

Tabla 60. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la cuarta semana de evaluación

MUESTRA	Grupo B		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	366.0	29.5	29.0
2	360.0	30.0	27.0
3	389.0	26.0	28.0
4	326.0	30.0	29.0
X	360.3	28.9	28.3

Tabla 61. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la cuarta semana de evaluación

MUESTRA	Grupo C		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	366.0	28.5	27.0
2	303.0	28.5	27.0
3	318.0	30.0	26.0
4	435.0	29.0	27.0
X	355.5	29.0	26.8

ANEXO VII. Evaluación del crecimiento y coloración de las truchas post tratamiento; en la quinta semana de evaluación

Tabla 62. Unidades obtenidas en las muestras del grupo blanco (1) en la quinta semana de evaluación

MUESTRA	Grupo blanco (1)		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	364.0	30.0	21.0
2	464.0	29.0	21.0
3	342.0	31.0	21.0
4	369.0	30.5	21.0
X	384.8	30.1	21.0

Tabla 63. Unidades obtenidas en las muestras del grupo control (2) en la quinta semana de evaluación

MUESTRA	Grupo Control		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	397.0	30.0	27.0
2	459.0	30.0	26.0
3	464.0	31.0	27.0
4	427.0	29.0	27.0
X	436.8	30.0	26.8

Tabla 64. Unidades obtenidas en las muestras del grupo A en la quinta semana de evaluación

MUESTRA	Grupo A		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	489.0	29.0	24.0
2	453.0	32.0	24.0
3	458.0	32.0	25.0
4	437.0	28.5	25.0
X	459.3	30.4	24.5

Tabla 65. Unidades obtenidas en las muestras del grupo B en la quinta semana de evaluación

MUESTRA	Grupo B		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	498.0	29.0	29.0
2	514.0	29.5	29.0
3	475.0	32.0	29.0
4	517.0	28.0	27.0
X	501.0	29.6	28.5

Tabla 66. Unidades obtenidas en las muestras del grupo C en la quinta semana de evaluación

MUESTRA	Grupo C		
	Peso (g)	Talla (cm)	Coloración Salmofan
1	440.0	28.5	27.0
2	562.0	28.5	27.0
3	517.0	27.5	27.0
4	444.0	32.0	27.0
X	490.8	29.1	27.0

ANEXO VIII. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas alimentadas con polvo de *H. pluvialis* por HPLC

Tabla 67. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas del grupo blanco (1)

Grupo BLANCO (1)	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg⁻¹)
1	125694.50	0.39	0.0004	2.0653	0.19
2	76646.00	0.26	0.0003	2.0330	0.13
3	301230.50	0.84	0.0008	2.0253	0.42
X	167857.00	0.50	0.0005	2.0412	0.24

Tabla 68. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas del grupo control (2)

Grupo CONTROL (2)	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg⁻¹)
1	1922674.17	2.48	0.0025	2.0387	1.22
2	2134609.33	2.75	0.0028	2.0472	1.34
3	3171264.33	4.06	0.0041	2.0480	1.98
X	2409515.94	3.10	0.0031	2.0446	1.52

Tabla 69. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas del grupo A

Grupo A	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg⁻¹)
1	1098665.17	2.87	0.0029	2.0390	1.41
2	1335405.17	3.48	0.0035	2.0660	1.68
3	562028.667	1.49	0.0015	2.0516	0.73
X	998699.667	2.61	0.0026	2.0522	1.27

Tabla 70. Cuantificación de Astaxantina en el músculo de truchas del grupo B

Grupo B	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg⁻¹)
1	3723153.83	9.61	0.0096	2.0568	4.67
2	3104409.67	8.02	0.0080	2.0587	3.90
3	1482654.83	3.85	0.0039	2.0594	1.87
X	2770072.78	7.16	0.0072	2.0583	3.48

Tabla 71. Cuantificación de Astaxantina en las muestras del grupo C

Grupo C	Área	Cc (mg/L)	mg de Astaxantina	Peso de la muestra (g)	Cc. De Astaxantina (mg.kg ⁻¹)
1	3829227.5	5.55	0.0055	2.0595	2.69
2	2011765.83	5.31	0.0053	2.0546	2.58
3	1941227.33	5.12	0.0051	2.0428	2.51
X	2594073.56	5.32	0.0053	2.0523	2.59

ANEXO XI. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

Tabla 72. Determinación de proteínas de las muestras del grupo blanco (1)

BLANCO	R1	R2	R3
1	19.99	19.9	19.81
2	21.14	21	20.93
3	20.81	21	21.13
X	20.65	20.63	20.62

Tabla 73. Determinación de proteínas de las muestras del grupo control (2)

CONTROL	R1	R2	R3
1	18.95	19.2	19.39
2	19.11	18.9	18.78
3	20.39	20.3	20.2
X	19.48	19.47	19.46

Tabla 74. Determinación de proteínas de las muestras del grupo A

A	R1	R2	R3
1	19.93	19.7	19.45
2	20.73	20.5	20.34
3	21.00	20.8	20.52
X	20.55	20.33	20.10

Tabla 75. Determinación de proteínas de las muestras del grupo B

B	R1	R2	R3
1	19.91	20.2	20.41
2	19.52	19.5	19.46
3	21.23	21.1	21.05
X	20.22	20.27	20.31

Tabla 76. Determinación de proteínas de las muestras del grupo C

C	R1	R2	R3
1	20.62	20.8	20.94
2	21.07	20.8	20.57
3	21.93	21.6	21.36
X	21.21	21.07	20.96

ANEXO XII. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS

Tabla 77. Determinación de lípidos en muestras del grupo blanco (1)

BLANCO	Peso del balón con grasa (g)	Peso del balón (g)	Peso de la muestra (g)	% Grasa
1	67.9768	67.6226	2.5056	14.14
2	68.0147	67.6236	2.5116	15.57
3	68.0313	67.6239	2.5072	16.25

Tabla 78. Determinación de lípidos en muestras del grupo control (2)

CONTROL	Peso del balón con grasa (g)	Peso del balón (g)	peso de la muestra (g)	% Grasa
1	68.0737	67.6244	2.5066	17.92
2	68.0805	67.6239	2.5030	18.24
3	68.0650	67.585	2.5710	18.67

Tabla 79. Determinación de lípidos en muestras del grupo A

A	Peso del balón con grasa (g)	Peso del balón (g)	peso de la muestra (g)	% Grasa
1	68.0652	67.6245	2.5021	17.61
2	68.0720	67.6210	2.5089	17.98
3	68.0980	67.6223	2.5097	18.95





Tabla 80. Determinación de lípidos en muestras del grupo B

B	Peso del balón con grasa (g)	Peso del balón (g)	Peso de la muestra (g)	% Grasa
1	68.0830	67.5920	2.5120	19.55
2	68.1453	67.6249	2.5078	20.75
3	68.1453	67.6236	2.5051	20.83

Tabla 81. Determinación de lípidos en muestras del grupo C

C	Peso del balón con grasa (g)	Peso del balón (g)	Peso de la muestra (g)	% Grasa
3	68.2045	67.6249	2.5099	23.09
2	68.2548	67.6238	2.5065	25.17
3	68.3732	67.6222	2.5100	29.92

MUESTRAS TRUCHAS

GRUPO		
Blanco (1)		
Control (2)		
A	