

Curso 2006/07
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/31
I.S.B.N.: 978-84-7756-783-7

NOEMÍ TEJERA HERNÁNDEZ

**Influencia del aporte de carotenoides en la dieta,
sobre la pigmentación, composición lipídica
corporal y desarrollo de alevines
de bocinegro o pargo (*Pagrus pagrus*)**

Directores

**ANTONIO LORENZO HERNÁNDEZ
COVADONGA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A mi familia, mi ancla durante la tormenta

A Cova, el viento bajo mis alas

A Melo, por acogerme en tu "familia" como a una hija

*In Science as in Life, Achievement is
the Offspring of Love*

Santiago Ramón y Cajal

*La Suerte Acompaña a los
Valientes...*

J. T. H.

ÍNDICE

0.- RESUMEN/ABSTRACT.....	V-VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Consideraciones generales.	1
1.2. El bocinegro (<i>Pagrus pagrus</i> L.).....	5
1.3. Los carotenoides	7
1.3.1. Funciones de los carotenoides	11
1.3.1.1. Carotenoides como antioxidantes.....	12
1.4. Los lípidos en peces marinos	20
1.5. Los carotenoides y la acuicultura	27
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
3.1. Producción de alevines.....	41
3.2. Elaboración de dietas	42
3.3. Toma de muestras	42
3.4. Análisis bioquímicos.....	43
3.4.1. Análisis de carotenoides	45
3.4.2. Análisis de peróxidos lipídicos.....	50
3.4.3. Determinación de humedad.....	52
3.4.4. Análisis de lípido total.....	52
3.4.5. Determinación de las clases lipídicas	53
3.4.6. Separación de clases lipídicas para análisis de ácidos grasos	54
3.4.7. Análisis de ácidos grasos.....	55
3.5. Análisis estadísticos	57
3.6. Materiales.....	58

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 59

4.1. Experimento I..... 59

Evaluación del efecto de la astaxantina esterificada, presente en el camarón (Plesionika sp.), en el desarrollo, pigmentación, contenido de carotenoides y composición lipídica de la carcasa del bocinegro.

Nociones introductorias..... 59

Condiciones experimentales..... 61

Resultados y discusión 64

4.2. Experimento II..... 81

Evaluación del efecto de distintas fuentes, formas químicas y niveles dietarios (25 y 50 mg·kg⁻¹ de dieta) de astaxantina, sobre el desarrollo, pigmentación, perfil de carotenoides, nivel de peróxidos y composición lipídica de la piel del bocinegro.

Nociones introductorias..... 81

Condiciones experimentales..... 84

Resultados y discusión 88

4.3. Experimento III..... 113

Evaluación del efecto de distintas fuentes, formas químicas y niveles dietarios (8 y 16 mg·kg⁻¹ de dieta) de astaxantina, así como de distintos niveles dietarios de cantaxantina (25 y 50 mg·kg⁻¹ de dieta) sobre el desarrollo, pigmentación, perfil de carotenoides, nivel de peróxidos y composición lipídica de la piel del bocinegro.

Nociones introductorias..... 113

Condiciones experimentales..... 114

Resultados y discusión 118

4.4. Experimento IV 137

Estudio comparado del desarrollo, pigmentación, perfil de carotenoides, nivel de peróxidos y composición lipídica de la piel de bocinegros alimentados, en tanques de cultivo o jaulas marinas flotantes, con una dieta suplementada con astaxantina.

Nociones introductorias 137

Condiciones experimentales 140

Resultados y discusión 144

5. CONCLUSIONES..... 159

6. BIBLIOGRAFÍA 161

ANEXO 1. ÍNDICE DE TABLAS 197

ANEXO 2. ÍNDICE DE FIGURAS 201

Resumen

El bocinegro (*Pagrus pagrus*), es una especie con un fuerte potencial para la acuicultura, siendo la dificultad de obtener ejemplares correctamente pigmentados en cautividad, el principal obstáculo para su comercialización.

Teniendo en cuenta que los peces son incapaces de sintetizar pigmentos carotenoides de novo, pero que carotenoides como la astaxantina y la cantaxantina son responsables de la pigmentación del músculo y la piel de ciertos peces y crustáceos, el principal objetivo de esta memoria es estudiar la efectividad de distintos niveles y fuentes de astaxantina (el camarón *Plesionika sp*, el alga *Haematococcus pluvialis* y la astaxantina sintética Carophyll® Pink), y diferentes dosis de cantaxantina, sobre el crecimiento, supervivencia, coloración, nivel de carotenoide total, y nivel y forma química de la astaxantina depositada en la piel de los ejemplares.

Teniendo en cuenta que la astaxantina protege frente a la oxidación de los ácidos grasos altamente insaturados (PUFA), importantes en la nutrición de peces marinos, y frente a los efectos de la radiación ultravioleta, se quiso evaluar este papel protector analizando también los niveles de peróxidos lipídicos y la composición lipídica de la piel.

Los mejores resultados en términos de pigmentación y de menores niveles de peróxidos lipídicos se obtuvieron con las dos fuentes naturales de astaxantina (*Plesionika sp*. y *Haematococcus pluvialis*). La fuente sintética de astaxantina resultó menos efectiva. Los peces alimentados con la dieta sin carotenoides o con cantaxantina presentaron una coloración gris y mostraron los niveles más altos de peróxidos lipídicos en su piel.

Los resultados de HPLC mostraron que la astaxantina en su forma diester fue el carotenoide predominante en la piel de los ejemplares alimentados con las dietas suplementadas con astaxantina, detectando también ciertos niveles de otro carotenoide, la tunaxantina en su forma esterificada, en la piel de todos los peces muestreados.

Los peces cultivados en jaula marina flotante presentaron una pigmentación más oscura y una mayor acumulación de astaxantina en su piel, un posible mecanismo de protección frente a las elevadas intensidades lumínicas presentes en este medio. Nuestros resultados sugieren que una dieta suplementada con 20 mg de astaxantina esterificada por kg de dieta, podría dar buenos resultados si se emplearan estructuras que disminuyan la intensidad lumínica en la superficie de las jaulas. Esta conclusión es particularmente interesante desde un punto de vista económico, ya que el uso de menores niveles de astaxantina podría traducirse en una importante reducción de los costes de producción.

Abstract

The difficulty to obtain individuals of *Pagrus pagrus* with a natural pigmentation in captivity is a bottleneck to a successful commercialization of individuals of the species, a good candidate to diversify the aquaculture industry.

Taking into account that fish are unable to biosynthesize carotenoids de novo, but when abundantly supplied in the diet pigments such as astaxanthin and cantaxanthin are responsible for the muscle and skin colour of certain farmed fish and crustacean species, the main purpose of the present study was to investigate the effectiveness of different astaxanthin sources (i.e.; the shrimp *Plesionika sp*, the algae *Haematococcus pluvialis*, and the synthesized formulated astaxanthin Carophyll® Pink) in different dietary concentrations, and different doses of cantaxanthin, on growth, survival, pigmentation, total carotenoid levels and chemical form and level of deposited astaxanthin in the skin.

Astaxanthin exhibits essential biological functions including protection against oxidation of essential polyunsaturated fatty acids (PUFA) and protection against UV light effects. Given the important role of PUFA in marine fish nutrition, another purpose of the present work was to check whether dietary astaxanthin contributed to prevent tissue lipid peroxidation. Thus, the peroxide levels and the lipid composition of skin samples were also determined.

The best results in terms of pigmentation and lower levels of lipid peroxides were obtained by feeding the fish with two natural sources of astaxanthin, the shrimp *Plesionika sp*. and the algae *Haematococcus pluvialis*. Pigmentation attained with synthetic astaxanthin was less effective. Fish either fed diets lacking carotenoids or containing cantaxanthin became grey, a characteristic coloration of this fish species under captivity and showed the highest levels of lipid peroxides in their skin.

HPLC results showed astaxanthin diester as the major carotenoid found in the skin of fish fed with astaxanthin supplied diets, detecting certain levels of tunaxanthin ester in the skin of all the fish analyzed.

Fish held in a sea-cage system presented a darker pigmentation, which coincides with a higher content in astaxanthin in the skin. This may be due the high light intensity present in this environment. Our results suggest that a diet supplied with 20 mg·kg⁻¹ of esterified astaxanthin could give good results in terms of seacage fish pigmentation if an appropriate cover is selected to shade the installations. This could be of particularly interest under an economic point of view, since the use of less astaxanthin to formulate the pellets could be translated in a reduced production cost.



Introducción

1. Introducción

1.1 Consideraciones generales

Desde la antigüedad la pesca ha sido una fuente importante de alimentos para la humanidad, generando empleo y beneficios económicos para quienes se dedican a esta actividad. Sin embargo, el aumento de los conocimientos y la evolución dinámica de la pesca ha demostrado que, aunque renovables, los recursos acuáticos no son infinitos y es necesario explotarlos de manera racional para que sigan contribuyendo al bienestar nutricional, económico y social de una población mundial en constante crecimiento (FAO, 2003). En todo el mundo, más de 1.000 millones de personas dependen del pescado como fuente importante de proteína de origen animal, es decir, el pescado proporciona al menos el 30 por ciento de la proteína dietaria, siendo la dependencia del pescado mayor en las zonas costeras que en las continentales. Al beneficio del aporte de proteína de calidad que representa el consumo de pescado, hay que sumarle el hecho de que constituye la principal fuente de ácidos grasos omega 3 (ω 3) en la dieta humana (Sargent et al., 2002; Galli y Marangoni, 2006). Numerosos estudios relacionan la ingesta de estos ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) con una disminución del riesgo de enfermedades coronarias y neurodegenerativas, la disminución de problemas de hipertensión, la prevención de ciertas arritmias cardíacas y muerte súbita, una menor incidencia de diabetes o con el alivio de los síntomas de la artritis (Young y Conquer, 2005; Wenk, 2005; Judé et al 2006; Psota et al., 2006; Reiffel y McDonald, 2006; Schmidt et al., 2006; Wang et al., 2006a).

El aumento de la población mundial unido a estas características beneficiosas del pescado, ha provocado que su consumo se haya triplicado con creces durante el período 1961-2001, aumentando de 28 a 96,3 millones de toneladas. Si tenemos en cuenta que la contribución de la pesca de captura marina y continental al suministro de pescado ha sufrido un estancamiento en el período 1970-2000, los incrementos recientes de la disponibilidad *per cápita* de este recurso se han derivado de la producción de la acuicultura, tanto rural tradicional como comercial e intensiva y, en particular, de especies de elevado valor comercial (SOFIA, FAO, 2004). Más aún, la sociedad mundial de acuicultura (WAS) afirma que en 2010 el 50% del consumo de productos del mar será cultivado por el hombre. Sin embargo, el incremento de la producción acuícola lleva asociado una serie de agresiones medioambientales que deben ser minimizadas para que esta actividad constituya una alternativa sostenible para hacer frente a la creciente demanda mundial de pescado. Este es el caso de algunas actividades acuícolas, en las que el daño que puede producir la destrucción de hábitats, la introducción de especies exóticas o patógenos, así como el tener que recurrir al uso de grandes cantidades de pescado para obtener proteínas y aceites de calidad necesarios para formular dietas para peces carnívoros de cultivo, son factores que paradójicamente pueden contribuir al colapso de las pesquerías, agotando los stocks naturales (Naylor et al., 2000).

En definitiva, para reducir las repercusiones de la acuicultura en el medio ambiente y evitar los efectos negativos de otras actividades, debidos a una gestión deficiente, hace falta un mayor esfuerzo destinado a mejorar el aprovechamiento de los recursos y lograr una ordenación ambiental apropiada. El desarrollo sostenible es hoy en día un compromiso ineludible. Los productores acuícolas deben ser conscientes de esta obligación e implicarse cada vez más en lograr que la acuicultura pueda proveer a la sociedad de alimentos de alta

calidad, seguros y sanos, producidos mediante técnicas aceptables desde el punto de vista medioambiental y socialmente justas. La Comisión Europea ha reconocido la importancia de la acuicultura en su Política Pesquera Común (PPC) y ha desarrollado un documento específico denominado Estrategia para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura Europea, que está sirviendo de referencia para la nueva legislación sobre acuicultura de la Unión Europea. Igualmente, las acciones que se están desarrollando en esta línea desde la asociación española de productores son el desarrollo y la aplicación de protocolos de producción de reducido y controlado impacto ambiental, éticamente responsables con respecto de la biodiversidad, a la vez que competitivos empresarialmente (APROMAR 2006).

Otro de los grandes retos a los que se enfrenta la acuicultura en la actualidad, radica en la necesidad de diversificar el sector en cuanto al número de especies cultivadas. La dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) y el rodaballo (*Psetta máxima*, L.1758) son las especies de peces marinos que se producen en mayor proporción en los países europeos meridionales. En España la producción de pescados marinos de crianza ascendió en 2005 a 26.250 Tm, un 16,4% más que en el año anterior. Dentro de este total, la producción acuícola de dorada ha sido de 15.577 toneladas (59,3% del total de la producción), la de lubina de 5.492 toneladas (20,9% del total de la producción), y la de rodaballo de 4.275 toneladas (16,2% del total de la producción). En Canarias el engorde en jaulas flotantes de dorada y lubina ha sufrido un importante impulso. Así, las producciones en 2005 de las 26 empresas ubicadas en las Islas fue de 4.100 Tm (18 y 22% de la producción nacional de dorada y lubina, respectivamente) con unos 23×10^6 euros anuales de facturación y 300 puestos de trabajo directos (APROMAR 2006). No obstante, el hecho de que estas especies estén siendo ampliamente cultivadas en muchos países europeos lleva a una saturación del mercado y consecuentemente, a una reducción de los precios de venta. Estas son razones suficientes que justifican la búsqueda de una solución para abrir el mercado a

nuevos productos, ya sea innovando en cuanto a presentación se refiere, es decir mediante fileteado, precocinados, congelados, etc., o bien, tratando de cultivar nuevas especies que sean identificadas como producto de calidad, tengan una buena aceptación comercial y resulten rentables para el acuicultor.

En este sentido, gran parte de las investigaciones encaminadas a establecer la viabilidad del cultivo comercial de nuevas especies, se han centrado en espáridos tales como **el besugo** (*Pagellus bogaraveo*, Brünnich 1768) (Peleteiro et al., 2000, 2002; Linares et al., 2002, 2003; Olmedo et al., 2002, 2005; Silva et al., 2006) cuyo cultivo a escala comercial está ya siendo llevado a cabo, **el sargo** (*Diplodus sargus*, L. 1758 y *Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) (Abellán et al., 1994; Mena-Sellés y García-García, 2002; Cejas et al., 2003a, 2004 a, b; D'Anna et al., 2004; Almaila et al., 2006; Ozorio et al., 2006; Saavedra et al., 2006; Hernández et al., 2007; Pérez et al., 2007; Piedecausa et al., 2007), **el dentón** (*Dentex dentex*, L. 1758) (Abellán, 1999; Jover et al., 1999; Pastor y Grau, 2002; Estévez y Vallejo, 2003; García-García y Cerezo, 2003; Hidalgo et al., 2003; Giménez et al., 2006), **la hurta** (*Pagrus auriga*, Valenciannes 1843) (Muñoz et al., 2005; Padilla et al., 2005; Cárdenas et al., 2006) y **el bocinegro** (*Pagrus pagrus*, L.1758) (Divanach et al., 1993; Kentouri et al., 1995; Cejas et al., 1997a; 1999a; Divanach et al., 1997; Kolios et al., 1997; Hernández-Cruz et al., 1999; Mylonas et al., 2004). Estas especies poseen gran aceptación en el mercado, alto valor comercial y similitud con la dorada (*Sparus aurata*), cuyo cultivo está ampliamente consolidado y extendido.

1.2 El bocinegro (*Pagrus pagrus* L. 1758)

La especie objeto de estudio en la presente memoria, es el bocinegro o pargo (*Pagrus pagrus*), un espárido demersal marino comúnmente asociado a fondos arenosos o rocosos, que habita a profundidades que varían entre los 18 y los 185 m, distribuyéndose en zonas templadas de ambos lados del Atlántico, incluyendo el Archipiélago Canario, y en el Mediterráneo (Manooch, 1975; Pajuelo y Lorenzo, 1996). Respecto a sus hábitos alimenticios, los crustáceos decápodos, de los que puede obtener los pigmentos que le dan su coloración rojiza característica, similar a la de la dorada japonesa (*Chrysophrys major*, Temminck & Schlegel), o a la de la dorada australiana (red snapper, *Pagrus auratus*, Foster 1801), junto a los moluscos, son las presas más frecuentes que caracterizan su dieta (Labropoulou et al., 1999). También poliquetos y peces forman parte de la dieta de los juveniles de esta especie (Labropoulou et al., 1999; Castriota et al., 2005).



Fig. 1.1. Imagen de un ejemplar salvaje de *Pagrus pagrus*.

Los avances realizados en el establecimiento de sus técnicas de cultivo, permiten considerar al bocinegro como una especie con un fuerte potencial para la acuicultura, siendo

previsible que su cultivo experimente un impulso importante tanto en el área mediterránea, como en zonas templadas del Atlántico, incluyendo el Archipiélago Canario. En este sentido, se han llevado a cabo investigaciones sobre diversos aspectos: adaptación a condiciones de cautividad y crecimiento (Divanach et al., 1993; Kentouri et al., 1995), comportamiento reproductor (Méndez et al., 1995), desarrollo embrionario (Kentouri et al., 1992), desarrollo larvario (Hernandez et al., 1990), cultivo larvario (Divanach et al., 1997; Kolios et al., 1997; Hernández-Cruz et al., 1999), e influencia de ciertos parámetros sobre el engorde (Rueda et al., 1998; Maragoudaki et al., 1999). El Centro Oceanográfico de Canarias, ha trabajado en el desarrollo de técnicas de cultivo de bocinegro desde 1994, habiendo aportado información relevante sobre las distintas fases de cultivo integral, incluyendo técnicas aplicables a la reproducción en cautividad (Cejas et al., 1997b), cría larvaria y producción de alevines en régimen semiextensivo (Cejas et al., 1997a, 1999a), e influencia de varios parámetros sobre el engorde de bocinegro en tanques y jaulas flotantes (Cejas et al., 1999b).

Las investigaciones realizadas hasta la fecha en el bocinegro han permitido identificar varios problemas que deben resolverse antes de que esta especie pueda cultivarse a escala comercial, siendo una de las necesidades más acuciantes la de lograr la pigmentación adecuada de los ejemplares cultivados. La alimentación de los alevines de bocinegro con piensos comerciales para dorada (empleados habitualmente), hace que como consecuencia de la falta de carotenoides en los piensos utilizados, los ejemplares presenten una coloración gris oscura (Kolios et al., 1997), no lográndose el aspecto externo rojizo propio de la especie en su medio natural.

La presente memoria en la que se abordan, entre otros aspectos, la influencia del aporte de carotenoides en la dieta sobre la pigmentación de la piel del *Pagrus pagrus*, forma parte de varios proyectos de investigación financiados por el Instituto Español de

Oceanografía y el Ministerio de Educación y Ciencia (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, CICYT), en los que han participado el Departamento de Biología Animal de la Universidad de La Laguna y la Planta de Cultivos del Centro Oceanográfico de Canarias (COC) perteneciente al Instituto Español de Oceanografía (IEO). Asimismo, en una de las experiencias de engorde descritas en el presente documento se contó con la colaboración de la empresa de engorde de dorada y lubina CEDRA S.L.L.

1.3 Los Carotenoides

Los carotenoides, junto con las melaninas, son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Sin embargo, sólo ciertos microorganismos, hongos, algas y plantas fanerógamas pueden producirlos (Goodwin, 1984). Por tanto, los carotenoides responsables de la coloración amarilla, naranja o rojiza que presenta la piel de ciertos peces, el músculo de los salmónidos, los huevos de peces y la carcasa de los crustáceos, deben ser incorporados a través de la cadena alimenticia.

Son compuestos liposolubles, derivados de una estructura básica de 40 átomos de carbono, a partir de la cual, mediante modificaciones del tipo ruptura, hidrogenación, deshidrogenación, adición de grupos funcionales que contienen oxígeno o adición de cadenas de hidrocarburos cíclicas, derivan a su vez el resto de carotenoides. La larga cadena con dobles enlaces conjugados se denomina grupo cromóforo y dependiendo del número de dobles enlaces que posea el grupo, absorberá fotones en la zona del ultravioleta o en la región visible del espectro (Britton, 1995a, b). Si el compuesto tiene más de 5 dobles enlaces, la longitud de onda de absorción es de 400-600 nm, la cual está en la región visible del espectro (Latscha, 1990). No obstante, el espectro de absorción de los carotenoides va a depender del medio en el que se encuentre el compuesto y difiere según los solventes orgánicos. Así, en

condiciones *in-vivo* se verá afectado por la interacción de los carotenoides con los lípidos y proteínas (Britton, 1995a, b).

A los carotenoides podemos clasificarlos en dos grupos principales; los que presentan oxígeno en su estructura, denominados **xantofilas**, como por ejemplo la astaxantina, la cantaxantina o la luteína y los que no lo poseen, denominados **carotenos**, como el β -caroteno, y el licopeno.

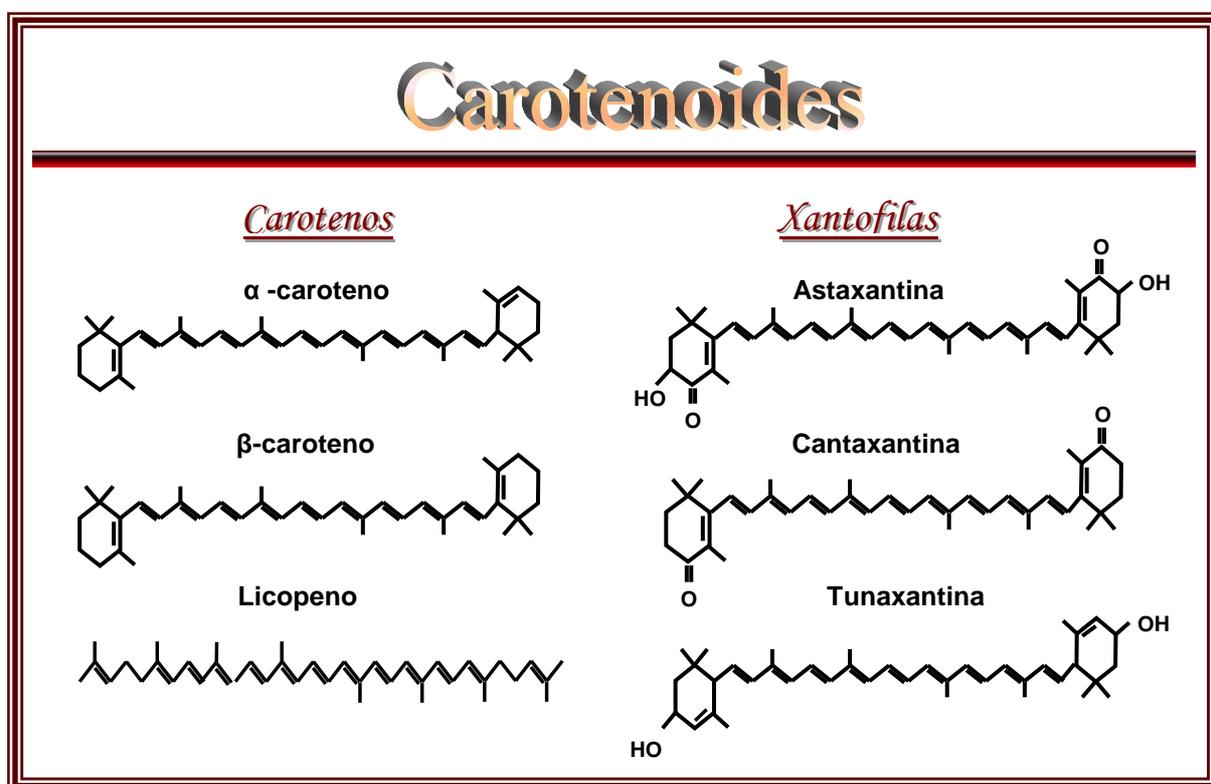


Fig. 1.2. Estructura química de algunos carotenoides importantes.

Carotenos y xantofilas no sólo van a diferenciarse en su estructura química, también lo hacen en cuanto a diversidad y distribución. Generalmente los carotenos tienen una mayor representación tanto cualitativa como cuantitativa, en plantas que en animales, siendo el β -caroteno el más común de todos. En contraste, las xantofilas están más ampliamente

distribuidas en el reino animal, pudiendo ser cuantitativamente mucho más abundantes que los carotenos (Shahidi et al., 1998). De este modo, encontramos que la xantofila astaxantina (Fig. 1.3) es el carotenoide más ampliamente distribuido en los organismos marinos, siendo particularmente abundante en crustáceos y peces (Latscha, 1990, 1991).

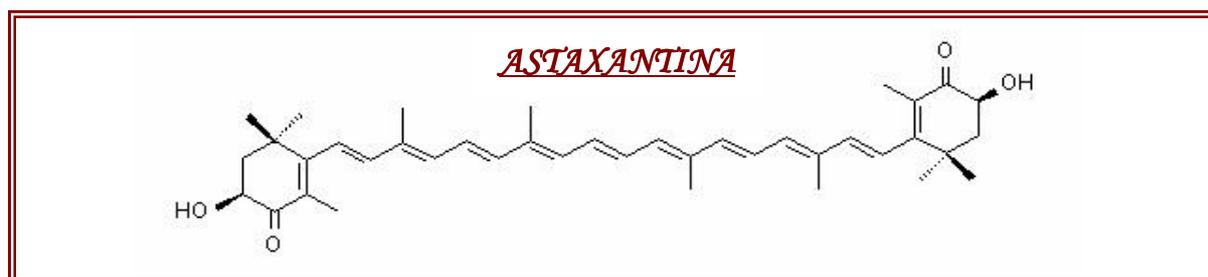


Fig. 1.3. Estructura química del carotenoide astaxantina.

Otros carotenoides que abundan en los peces son tunaxantina, luteína, zeaxantina y cantaxantina (Latscha, 1990, Shahidi et al., 1998). Tunaxantina, luteína y zeaxantina son pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos entre las especies de peces marinos, sobre todo en aquellas que presentan pigmentación amarilla (Shahidi et al., 1998), siendo la zeaxantina también especialmente abundante entre los peces de agua dulce (Anderson, 2000).

En el caso de la cantaxantina, vemos que este pigmento es el más importante de los carotenoides presentes en la artemia (*Artemia salina*), un crustáceo tradicionalmente utilizado como presa viva en las primeras fases de la alimentación de peces y crustáceos marinos producidos en cautividad (Schiedt, 1998). Asimismo, la cantaxantina se encuentra presente en el músculo, piel y ovarios de salmónidos, así como en otros tejidos de peces marinos (Czeczuga, 1980a, b; Shahidi et al., 1998)

La cantidad y el tipo de carotenoide encontrado en los animales acuáticos es específico de la especie siendo el resultado del alimento ingerido, de la capacidad de

absorción, del transporte sanguíneo hasta los distintos tejidos y de las características metabólicas de estos pigmentos (Torrissen et al., 1989).

En la piel de los peces, los pigmentos están localizados en unas células concretas de la dermis denominadas cromatóforos. Estas células pueden ser oscuras por contener melaninas (melanóforos), amarillas (xantóforos), rojas o naranjas (eritróforos) o blancas (guanóforos).

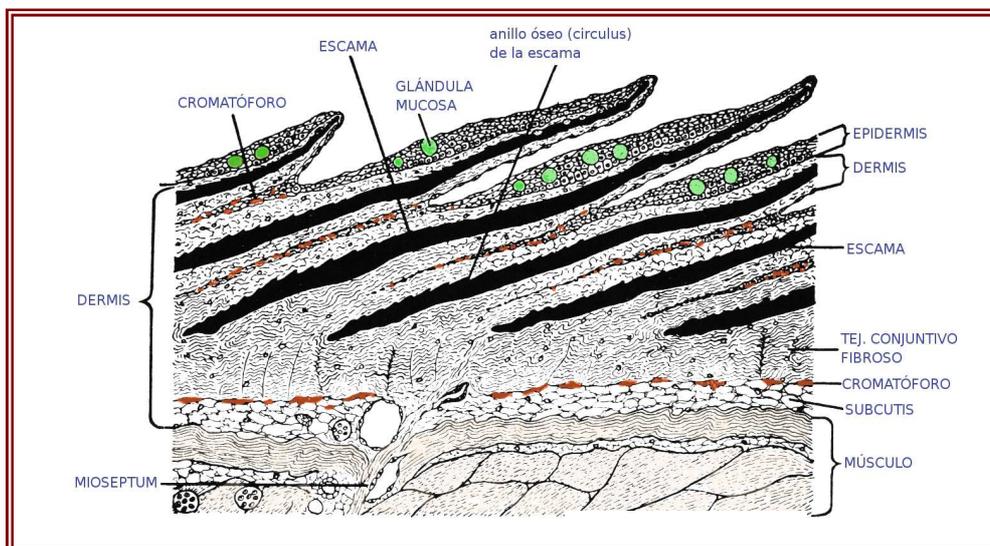


Fig. 1.4. Estructura y posición de los cromatóforos en la piel de los peces.

Los carotenoides se encuentran tanto en los xantóforos como en los eritróforos, confiriéndoles a estas células su característico color amarillo o rojo, respectivamente.

Las migraciones de pigmento dentro de los cromatóforos son responsables de los cambios en la coloración, una característica notoria de los peces. Estos cambios son complejos y están regulados por control nervioso y hormonal.

1.3.1 Funciones de los carotenoides

Como ya hemos mencionado, los carotenoides son responsables de la coloración de la piel y de ello van a depender numerosos procesos conductuales y fisiológicos relacionados con la propia supervivencia del animal, de modo que un aporte adecuado de pigmentos en la dieta se relaciona con funciones tan importantes como la comunicación, el camuflaje o la fotoprotección.

En los salmónidos, por ejemplo, los carotenoides juegan un importante papel en el cortejo, existiendo una movilización de estos pigmentos desde el músculo a la piel en los machos que están madurando (Christiansen, 1996).

La exhibición de color en los peces se convierte en una continua lucha entre la necesidad de comunicación y el riesgo de predación. De este modo, la habilidad de cambiar de color, o de seleccionar el adecuado, resulta clave para el camuflaje. Así, se ha observado que el color rojo está presente en peces con hábitos nocturnos o en aquellos que viven a moderadas profundidades como es el caso de los peces roca (*Sebastes spp.*) y del bocinegro (*Pagrus pagrus*). Este hecho se explica teniendo en cuenta que la mayoría de la luz roja es filtrada en los primeros metros de la columna de agua, lo que hace a estos peces virtualmente invisibles para sus posibles predadores a la profundidad a la que habitan (Christiansen, 1996).

Los carotenoides cumplen además, otras funciones fisiológicas. Tanto en peces como en mamíferos se ha demostrado que la astaxantina y otros carotenoides actúan como precursores de la vitamina A (Al-Khalifa y Simpson, 1988) y como promotores del crecimiento. Así, en el salmón atlántico, se ha observado que la tasa de crecimiento se ve incrementada cuando las dietas comerciales se suplementan con astaxantina o cantaxantina (Torrissen, 1984; Torrissen y Christiansen, 1995).

Asimismo, los carotenoides pueden desarrollar un importante papel fotoprotector frente a la acción de la radiación ultravioleta (UV). Esta radiación es capaz de traspasar hasta los 6 primeros metros de la columna de agua (Smith y Barker, 1978). Ello indica que los organismos que habitan en este rango de profundidad necesitarán adoptar un mecanismo de protección frente a esta exposición que, tal y como se describe a continuación, está directamente relacionada con numerosas reacciones oxidantes que comprometen la salud y el buen estado de desarrollo de los organismos (Guerin et al., 2003; Santocono et al., 2006).

1.3.1.1 Carotenoides como antioxidantes

Oxidantes y estrés oxidativo

Entre las funciones atribuidas a los carotenoides cabe destacar aquellas relacionadas con su actividad antioxidante (Haila et al., 1996; Bast et al., 1998; Rao y Agarwal, 1998; Kiokias y Gordon, 2003; Wang et al., 2006b). Debemos tener en cuenta que los radicales libres o especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden dañar componentes celulares como el ADN, proteínas y lípidos de membrana, son producidas en el cuerpo durante las reacciones y procesos metabólicos rutinarios y que, situaciones de estrés fisiológico y factores medioambientales incluyendo la exposición a la luz ultravioleta (UV), pueden incrementar su producción (Guerin et al., 2003; Santocono et al., 2006).

Desde el punto de vista químico, los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, lo que les da una configuración espacial generadora de gran inestabilidad. Entre las ROS cabe destacar a los radicales anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo (OH^{\bullet}), pasos intermedios de la reducción del oxígeno molecular a H_2O (Fig. 1.5).

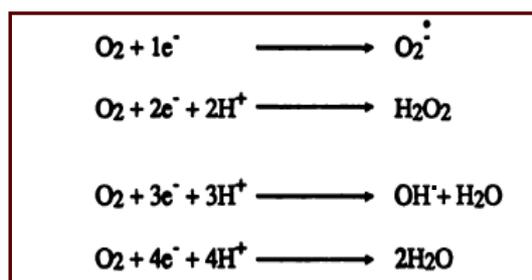


Fig. 1.5. Proceso de formación de algunas especies reactivas del oxígeno (Floyd, 1990).

Otras especies reactivas importantes son el oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$), resultado de la excitación electrónica del estado basal del oxígeno molecular (triplete), y los radicales peróxidos, presentes en la peroxidación lipídica (Sies, 1997).

Nivel energético	Spin	$E' - E^*$ (KJ)
(b) $^1\Sigma_g$	$\uparrow \quad \downarrow$	155
(b) $^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow \quad \underline{\quad}$	92
(a) $^3\Sigma_g$	$\uparrow \quad \uparrow$	Nivel energético basal

Fig. 1.6. Estados energéticos de la molécula de oxígeno. El nivel energético basal se corresponde con el estado triplete (a), existiendo dos estados posibles para el oxígeno singlete (b) (Floyd, 1990).

Cuando la producción de estas sustancias prooxidantes supera a la capacidad de respuesta antioxidante del organismo vivo, nos encontramos ante lo que se denomina **estrés oxidativo**, proceso que se relaciona con trastornos y enfermedades graves que afectan a humanos y a otros representantes del reino animal (Elejalde, 2001; Barnham et al., 2004; Valko et al., 2007).

Sistemas antioxidantes

Afortunadamente, el organismo vivo dispone de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de radicales libres. Entre estas defensas antioxidantes que posee la

célula destacan los sistemas enzimáticos, siendo los más importantes la *superóxido dismutasa* (SOD), la *catalasa* y la *glutación peroxidasa* (GSH-px) (Bandyopadhyay et al., 1999; Bragadóttir, 2001).

Además de sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos, existe una gran variedad de antioxidantes exógenos, entre los que cabe destacar: *la vitamina C* o ácido ascórbico, *la vitamina E* (alfa tocoferol) y **los carotenoides** (Elejalde, 2001).

Los carotenoides en general, y la astaxantina en particular, poseen especial habilidad para destruir directamente los radicales libres (se les llama por ello radical scavengers, o sumideros de radicales), e inactivar moléculas electrónicamente excitadas (actividad denominada quenching o apagamiento), como es el caso del oxígeno singlete (1O_2) (Di Mascio et al., 1991; Miki, 1991; Woodall et al., 1997; Stahl y Sies 2005). De hecho, estos pigmentos resultan particularmente eficientes a la hora de neutralizar los radicales peróxidos ($ROO\cdot$), los cuales están directamente relacionados con el mecanismo de peroxidación lipídica, uno de los procesos oxidativos más relevantes a nivel tisular.

Según Burton (1989), la presencia de un radical libre ($R\cdot$) en un sistema biológico que contenga lípidos insaturados (RH) u otros materiales susceptibles de ser oxidados, resulta potencialmente peligrosa, ya que el daño inicial que pudiera producir dicho radical puede verse amplificado a través de un mecanismo en cadena en el que se encuentran involucrados los radicales peróxidos ($ROO\cdot$). La reacción se produciría tal y como se muestra en la Figura 1.7.

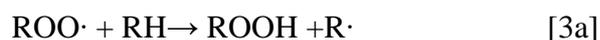
Inicio:**Propagación:****Finalización:**

Fig. 1.7. Reacciones propias del mecanismo de peroxidación lipídica (Burton, 1989).

Normalmente la fase de propagación de la reacción lleva consigo el paso [3a], en el que el radical peróxido secuestra un átomo de hidrógeno a un ácido graso, aunque a veces puede producirse la adición del radical a un doble enlace [3b].

Los carotenoides actuarían neutralizando al radical peróxido producido en [2] adoptando una conformación en la que el electrón desapareado se encuentra localizado en el carbono central del grupo cromóforo, tal y como se presenta en la siguiente figura para el β -caroteno:

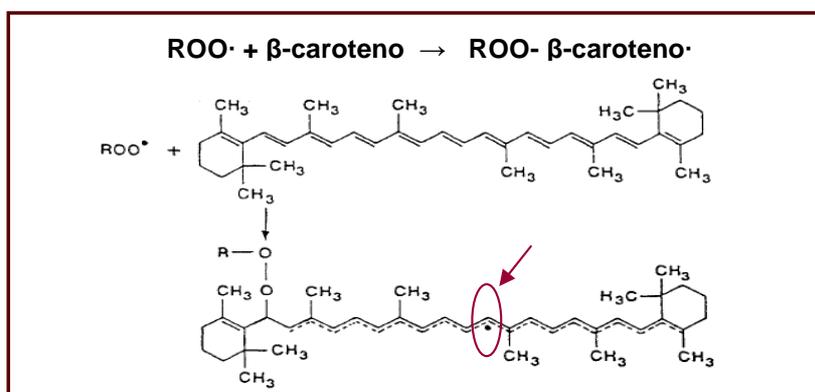


Fig. 1.8. Interacción entre el β -caroteno y los $ROO\cdot$ (propuesto por Yanishlieva et al., 1998; adaptado de Bragadóttir, 2001).

El radical β -caroteno resultante (ROO- β Car•) puede actuar como prooxidante o como antioxidante dependiendo de la tensión de oxígeno existente (a baja tensión de O₂ actuará como antioxidante), de las interacciones con otros antioxidantes y de la propia naturaleza del agente prooxidante con el que reaccione (Yanishlieva et al., 1998; Bragadóttir, 2001).

Es importante dejar constancia de que esta posible actividad prooxidante mostrada por el β -caroteno no es compartida por la astaxantina. Tanto este carotenoide como las xantofilas zeaxantina y cantaxantina son considerados antioxidantes puros, ya que exhiben poca o ninguna propiedad prooxidante, incluso ante una tensión elevada de oxígeno (Martin et al., 1999; Beutner et al., 2001).

Tal y como hemos visto, la larga cadena carbonada rica en dobles enlaces conjugados propia de los carotenoides, es responsable de la actividad antioxidante de estos pigmentos, ya que permite interceptar radicales libres y especies reactivas, evitando así su propagación (Liebler, 1993). Sin embargo, existen otros aspectos a tener en cuenta que pueden influir de un modo u otro en dicha actividad. Así, se ha demostrado que los grupos cetónicos presentes en los anillos de ciertos carotenoides como la astaxantina y la cantaxantina, contribuyen a la estabilización de las especies intermediarias que se forman al interaccionar los carotenoides con los radicales libres, contribuyendo a que su actividad antioxidante sea mayor a la que poseen otros carotenoides, como el β -caroteno, que carecen de dichos grupos cetónicos (Terao, 1989).

Sin embargo, esta teoría no explicaría el porqué carotenoides con el mismo número de dobles enlaces y carentes de grupos cetónicos, como es el caso de la zeaxantina y el β -caroteno, presentan similar actividad antioxidante en solución y sin embargo difieren en comportamiento cuando se añaden a sistemas liposomales, siendo el efecto protector de la zeaxantina mayor, frente a la acción de radicales peróxidos, que el del β -caroteno (Woodall

et al., 1997). Las diferencias de comportamiento observadas pueden deberse a diferencias en localización y orientación dentro de la membrana lipídica. Así, estudios realizados a nivel de membrana han demostrado que el β -caroteno (y otros carotenoides como el licopeno), poseen una orientación paralela a la superficie de la membrana, quedando aislados en el núcleo hidrofóbico de la misma, mientras que la zeaxantina se expande a través de la membrana, limitando la penetración del oxígeno en la misma (Fig.1.9) (Young y Lowe, 2001).

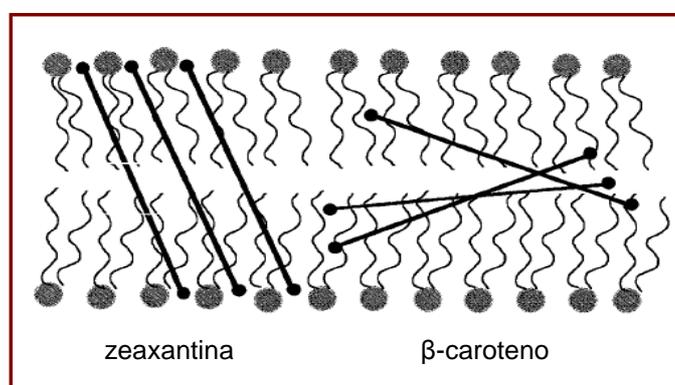


Fig. 1.9. Representación de una membrana lipídica artificial conteniendo los carotenoides zeaxantina y β -caroteno (Young y Lowe, 2001).

Si tenemos en cuenta que la efectividad de una sustancia para actuar como sumidero de radicales frente a los radicales peróxidos, se mide por su habilidad para actuar tanto en fase acuosa como en fase hidrofóbica (Halliwell et al., 1995), el hecho de que los extremos polares de la zeaxantina anclen la molécula a lo largo de la membrana y la pongan en contacto con el medio acuoso, puede explicar la mayor efectividad de este carotenoide comparado con el β -caroteno, que por otra parte, tendrá muchísimas menos posibilidades de reaccionar con estos radicales desde su posición en el interior de la membrana (Young y Lowe, 2001).

Estudios recientes realizados en membranas liposomales que contenían colesterol nos ayudan a dilucidar qué parámetros son los que influyen en la relación carotenoide-membrana

y, por lo tanto, en la capacidad antioxidante de ciertos carotenoides. Así, McNulty et al. (2007) han puesto de manifiesto que la astaxantina tiene la habilidad de interactuar con los lípidos de membrana sin alterar el orden de la misma, al tiempo que inhibe la peroxidación lipídica en un 41% respecto al resto de carotenoides ensayados. En lo que respecta a los demás carotenoides estudiados por estos autores (licopeno, β -caroteno, luteína, zeaxantina), aparte de disminuir la densidad electrónica del núcleo hidrofóbico de la membrana, actuaban ensanchándolo. Así, aunque tanto la zeaxantina como la astaxantina, por su polaridad, tengan la habilidad de colocarse transmembrana, por su polaridad, en este estudio la zeaxantina mostraba cierto efecto desestabilizador de la estructura de la misma y no así la astaxantina. Este último carotenoide, posee una estructura y una longitud similar a la zeaxantina (32Å), siendo el único parámetro que las diferencia, la presencia en la astaxantina de los grupos cetónicos que se encuentran en las posiciones C4 y C4' de los anillos aromáticos que caracterizan la molécula (Fig.1.10). Precisamente, son de nuevo estos sustituyentes los encargados de conferir una mayor estabilidad a los extremos polares de la molécula en su anclaje a la membrana, de modo que esta molécula puede expandirse completamente a través de la misma y no desestabiliza la estructura creada por la bicapa.

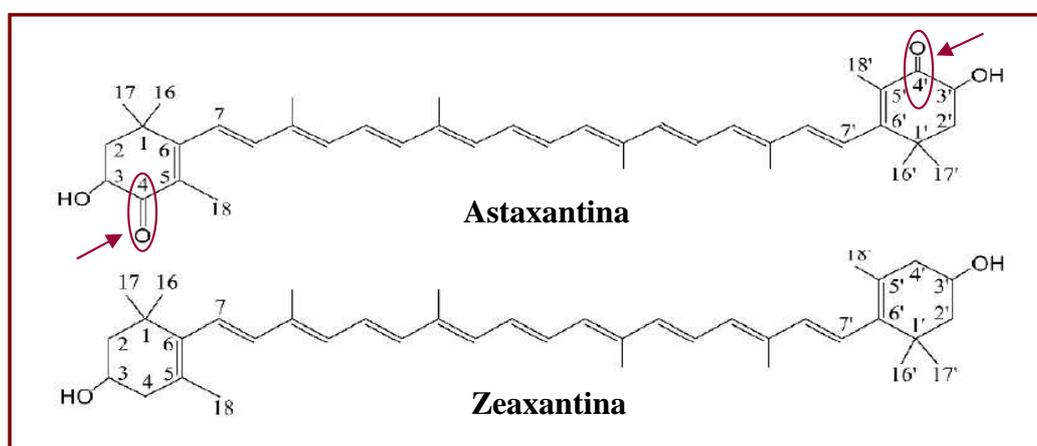


Fig.1.10. Estructura de los carotenoides astaxantina y zeaxantina en la que se aprecian los sustituyentes que diferencian ambas moléculas (McNulty et al., 2007).

Todos estos aspectos relacionados con la peroxidación lipídica y con la acción antioxidante de los carotenoides adquiere particular importancia cuando nos referimos a los tejidos de peces marinos, los cuales son ricos en ácidos grasos altamente insaturados (Arts et al., 2001; Sargent et al., 2002; Tocher, 2003).

Los ácidos grasos como el docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) y araquidónico (AA; 20:4n-6), que juegan un importante papel fisiológico como componentes estructurales de los fosfolípidos de membrana y como precursores de eicosanoides biológicamente activos (Bell et al., 1995, Gill y Valivety, 1997a,b; Kiewler et al., 1997; Tocher, 2003; Larsson et al., 2004; Ganga et al., 2005), son particularmente susceptibles de ser oxidados por los radicales libres que se generan de forma continua en los procesos fisiológicos que tienen lugar en las células (Biesalski, 1992). Una alteración incontrolada de los ácidos grasos de los fosfolípidos, unida a la acumulación de los productos de oxidación resultantes, puede dar lugar a la aparición de daños tisulares que generan procesos patológicos degenerativos (Halliwell y Gutteridge, 1989; Shahidi, et al., 1998; Lorenz, 2000).

Teniendo en cuenta que otro de los aspectos de la presente memoria ha sido evaluar el efecto antioxidante de los carotenoides astaxantina y cantaxantina, estudiando la presencia de productos de peroxidación lipídica y su posible efecto sobre la composición lipídica corporal de alevines de esta especie, resulta indispensable realizar en esta memoria una breve introducción a los lípidos y a sus unidades estructurales básicas, los ácidos grasos, algunos de los cuales ya han sido nombrados en el presente apartado por su esencialidad para los peces marinos.

1.4 Los Lípidos en peces marinos

Ácidos grasos

La mayoría de los lípidos, a excepción del colesterol, poseen ácidos grasos en su estructura. Estas moléculas están formadas por una larga cadena hidrocarbonada lineal (hidrófoba) con un extremo carboxilo terminal. En los ácidos grasos saturados todos los átomos de carbono de la cadena están unidos entre sí por un enlace simple, mientras que los ácidos grasos insaturados poseen uno o varios dobles enlaces entre los carbonos de la cadena, pudiendo clasificarse en monoinsaturados (un doble enlace) y poliinsaturados o PUFA (del inglés Polyunsaturated Fatty Acids) si poseen más de un doble enlace.

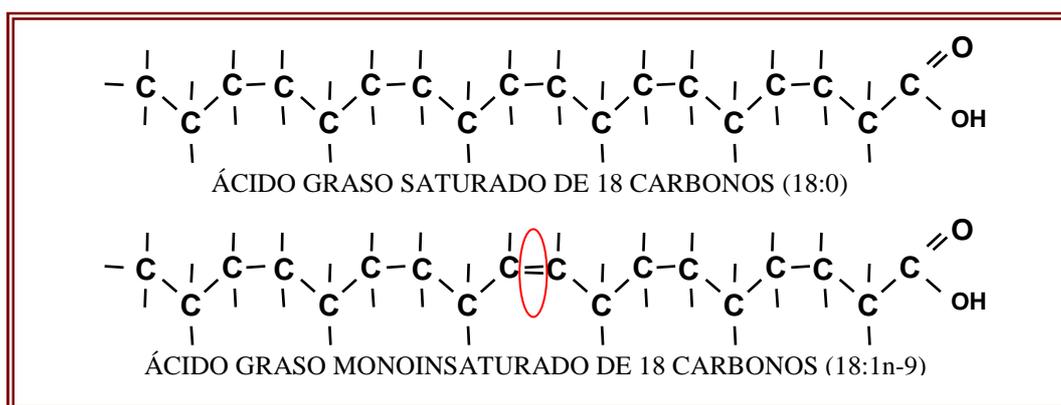


Fig. 1.11. Estructura del ácido graso saturado 18:0 o esteárico y del ácido graso monoinsaturado 18:1n-9 u oleico.

Dentro de los poliinsaturados cabe destacar a los altamente insaturados (≥ 3 dobles enlaces, ≥ 20 átomos de carbono), también conocidos como HUFA (del inglés Highlyunsaturated Fatty Acids), y en particular, a los n-3 HUFA (EPA y DHA, Fig.1.12), presentes en cantidades importantes en los peces (Sargent et al., 1995, 2002) y cuyos efectos beneficiosos para la salud humana han sido confirmados por numerosos estudios (Young y Conquer, 2005; Wenk, 2005; Psota et al., 2006; Reiffel y McDonald, 2006; Schmidt et al., 2006; Wang et al., 2006a).

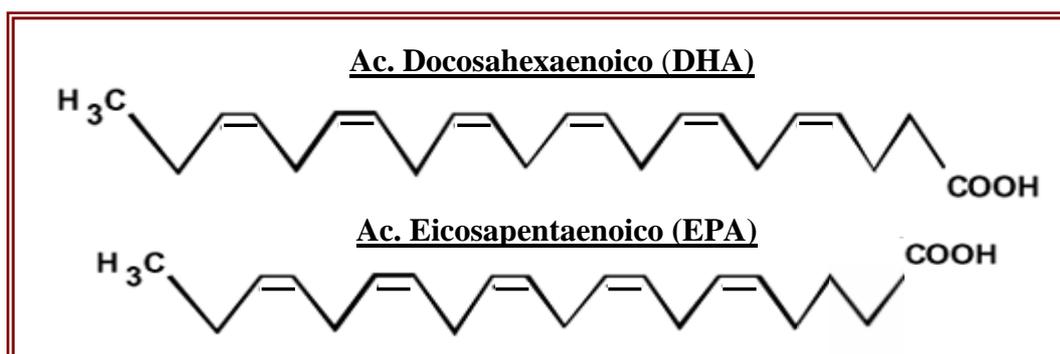


Fig. 1.12. Estructura de los ácidos grasos DHA (22:6n-3) y EPA (20:5n-3).

Para nombrar los ácidos grasos en la presente memoria se tendrá en cuenta:

- Longitud de la cadena.
- Existencia de dobles enlaces.
- Posición que ocupa el último doble enlace (desde el extremo metilo terminal).

Así, el 18:1n-9 es un ácido graso de 18 átomos de carbono con un doble enlace en el carbono 9, mientras que el 18:0 es un ácido graso saturado con 18 átomos de carbono.

Por último y atendiendo a la posición del último doble enlace hablamos de tres familias o series principales de ácidos grasos: n-3, n-6 y n-9.

Ácidos grasos esenciales (AGE)

Los ácidos grasos que no pueden ser sintetizados *de novo* por los organismos y, por lo tanto, deben ser obtenidos a través de la dieta, se denominan esenciales.

Los requerimientos dietarios de ácidos grasos esenciales en peces han sido ampliamente estudiados (Kalogeropoulos et al., 1992; Koven et al., 1989, 1990, 1992; Mourente y Tocher, 1993; Mourente et al., 1993; Rodríguez et al., 1993, 1994, 1998a; Ibeas et al., 1994, 1996, 1997; Izquierdo, 1996; Sargent et al., 1997, 1999; Skalli y Robin, 2004). En los peces de agua dulce se ha demostrado que los ácidos grasos esenciales son el linoleico o 18:2 (n-6) y el α -linolénico o 18:3 (n-3), ya que estos peces poseen la maquinaria enzimática

necesaria para transformar estos ácidos grasos dietarios de 18 carbonos en los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) de su misma serie (Sargent et al., 1995, 2002).

Sin embargo, los peces marinos requieren en la dieta el ácido graso 22:6n-3 o docosahexaenoico (DHA), el 20:5n-3 o eicosapentaenoico (EPA), y el 20:4n-6 o araquidónico (AA). Este requerimiento estricto en peces marinos está relacionado con la deficiencia de la actividad de las enzimas elongasas y desaturasas encargadas, respectivamente, de aumentar el número de átomos de carbono y añadir dobles enlaces a las moléculas precursoras de 18 átomos de carbono (Sargent et al., 1995, 1997, 2002). El siguiente esquema (Fig. 1.13) muestra las rutas mediante las cuales la maquinaria enzimática (elongasa-desaturasa) produce tanto AA como EPA y DHA, a partir de los ácidos grasos linoleico [18:2 (n-6)] y linolénico [18:3 (n-3)], respectivamente.

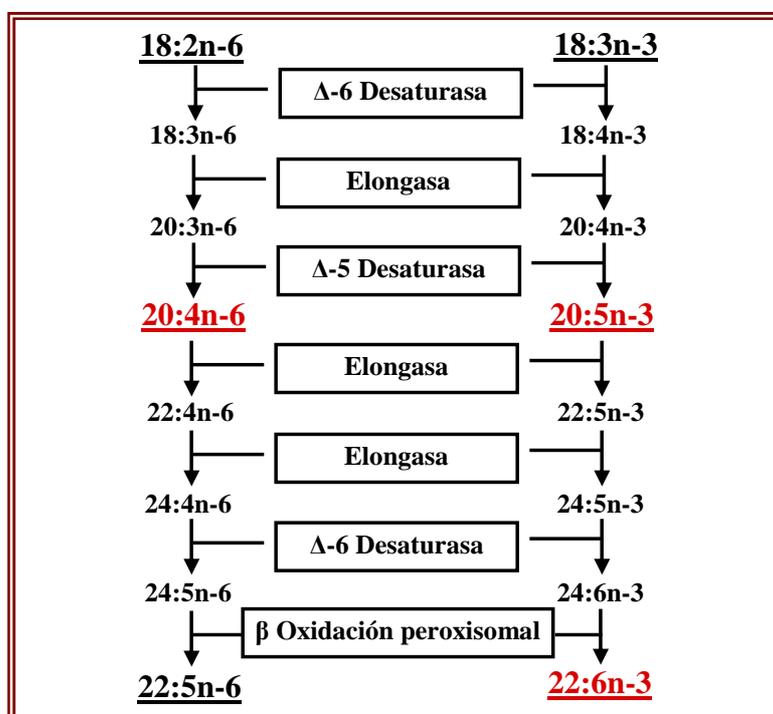


Fig. 1.13. Ruta de síntesis del AA [20:4 (n-6)], EPA [20:5 (n-3)] y DHA [22:6 (n-3)] a partir de los ácidos grasos linoleico [18:2 (n-6)] y linolénico [18:3 (n-3)].

La contribución del DHA y el EPA, como constituyentes de los fosfolípidos de membranas puede variar entre tejidos. Se ha visto por ejemplo, que los huevos (Watanabe et al., 1984; Mourente y Odriozola, 1990a,b; Harel et al., 1994; Rodríguez et al., 1998b; Almansa et al., 1999, 2001a; Izquierdo et al., 2001) y el esperma (Tinoco, 1982; Labbe et al., 1991; Martín, 2003) de peces, así como en membranas neurales y visuales, el DHA está presente en mucha mayor concentración que el EPA (Sargent et al., 1997). El DHA juega un papel fundamental en el desarrollo de estos sistemas en vertebrados y algunos trabajos relacionan la presencia de éste ácido graso con la óptima actividad enzimática de las membranas (Mallampalli et al., 1994; Vaidyanathan et al., 1994; Cahu et al., 2000).

En los peces marinos se ha demostrado que, además del nivel de requerimiento absoluto de estos ácidos grasos, también es importante el balance existente entre ambos o relación DHA/EPA. Varios trabajos relacionan este balance con el buen crecimiento y supervivencia de larvas y alevines de peces marinos como la dorada (*Sparus aurata*) (Mourente y Tocher, 1993; Izquierdo, 1996; Ibeas et al., 1997; Reitan et al., 1997; Rainuzzo et al., 1997; Rodríguez et al., 1994, 1997, 1998a; Bell et al., 2003a; Skalli y Robin, 2004; Jerez, 2006). Esto puede explicarse por las interacciones competitivas que existen entre estos dos ácidos grasos a la hora de incorporarse a fosfolípidos, y específicamente, por la competencia entre las enzimas que esterifican los ácidos grasos en esta clase lipídica (Sargent et al., 1999).

Hay que destacar que existe un importante esfuerzo investigador para intentar establecer los niveles dietarios óptimos de DHA y EPA en peces de cultivo (Koven et al., 1989, 1990, 1992; Mourente et al., 1993; Rodríguez et al., 1993, 1994, 1998b; Ibeas et al., 1994, 1996, 1997; Izquierdo, 1996; Reitan et al., 1997; Rainuzzo et al., 1997; Sargent et al., 1999; Skalli y Robin, 2004; Villalta et al., 2005a; Jerez, 2006; Vagner et al., 2007), sin embargo el esfuerzo ha sido muy inferior a la hora de fijar los requerimientos de AA. Esto

resulta sorprendente ya que este ácido graso es abundante en tejidos de peces salvajes (Grigorakis et al., 2002; Bell y Sargent, 2003; Cejas et al., 2003a; Rodríguez et al., 2004; Fernández-Jover et al., 2007; Mnari et al., 2007; Perez et al., 2007) y tiene un importante papel fisiológico a nivel celular. Varios estudios recientes han analizado su implicación en el buen desarrollo y en la pigmentación de los peces de cultivo (Castell et al., 1994; Bell et al., 1995, 1997; Navas et al., 1997; McEvoy et al., 1998a; Bessonart et al., 1999; Estévez et al., 1999, 2001; Copeman et al., 2002; Bell y Sargent, 2003; Villalta et al., 2005b).

El AA posee una función vital como principal precursor de una amplia variedad de componentes biológicamente activos conocidos en conjunto como eicosanoides, que incluyen prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Fig. 1.14) (Tocher y Sargent, 1987; Bell et al., 1994; Sargent et al., 2002; Tapiero et al., 2002; Bell y Sargent, 2003; SanGiovanni y Chew, 2005).

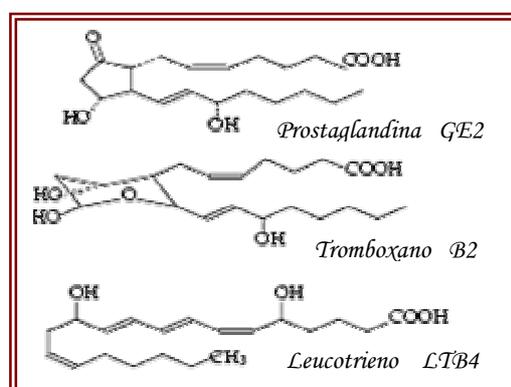


Fig.1.14. Estructura de ciertos eicosanoides.

Todos los tejidos producen eicosanoides, los cuales intervienen en una gran variedad de funciones fisiológicas como la osmorregulación, funciones cardiovasculares, respuesta inmune, control neural y funcionamiento del sistema reproductivo (Sargent et al, 2002).

A través de su conversión en eicosanoides, el AA interviene en un amplio rango de funciones fisiológicas en los peces en general (Bell y Sargent, 2003), ejerciendo un papel

relevante en el crecimiento y desarrollo de peces marinos (Castell et al., 1994; Bessonart et al., 1999).

El EPA también juega un importante papel en la formación de eicosanoides, sin embargo, éstos son biológicamente menos activos que los derivados del AA (Sargent et al., 1999). El EPA compite con el AA por la formación de eicosanoides, desempeñando el primero, un papel modulador sobre la cantidad y eficacia de estos compuestos derivados del AA (Bruce et al., 1999), de ahí, la importancia de considerar también la relación AA/EPA en los piensos para peces marinos (McEvoy et al., 1998a; Estévez et al., 1999, 2001; Bell et al., 2003a).

Además del importante papel fisiológico que desempeñan algunos ácidos grasos, una característica común a todos ellos es el papel estructural que desarrollan, formando parte de todos los lípidos excepto del colesterol.

De este modo, podemos encontrarlos formando parte de los Lípidos Polares, que pueden disolverse parcialmente en agua y que poseen una función eminentemente estructural; dentro de los cuales se encuentran los fosfolípidos, esfingolípidos y glucolípidos.

Los fosfolípidos son el principal grupo de lípidos polares. Derivan de un ácido fosfatídico (un glicerol fosfato esterificado con dos ácidos grasos de cadena larga), que se une por el grupo fosfato con otros grupos químicos (Fig. 1.15a). Lo común en estas clases lipídicas es que posean un ácido graso saturado y el otro, normalmente en posición sn2, con alguna insaturación (Fig. 1.15b). En algunos tejidos de peces como la retina, abundan fosfolípidos diesterificados con moléculas de DHA (Sargent et al., 1993). Los fosfolípidos se nombran con el prefijo fosfatidil seguido del nombre del derivado aminado o polialcohol con el que se une. Así, tendremos fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol o cardiolipina.

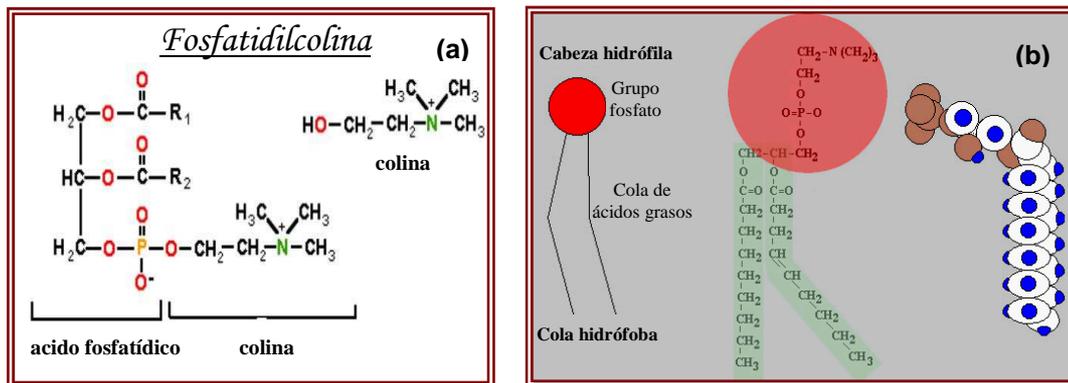


Fig. 1.15. a.- Grupos químicos que componen la fosfatidilcolina. b.- Estructura típica de un fosfolípido de membrana.

A los ácidos grasos también los encontramos formando parte de los Lípidos Neutros, los cuales son hidrófobos y no contienen grupos polares en su estructura. Entre ellos destacan los triacilglicéridos, formados por una molécula de glicerol esterificada con tres ácidos grasos y cuya función principal es la de reserva energética (Fig.1.16). También encontramos los monoacilglicéridos y los diacilglicéridos, en cuyo caso son 1 ó 2 las cadenas de ácido graso que se unen al glicerol para formar la molécula; el colesterol, un importante esteroide que forma parte de las membranas celulares y que no posee ácidos grasos en su estructura y los ésteres de esteroide que comprenden a los ésteres de colesterol y ésteres de ceras.

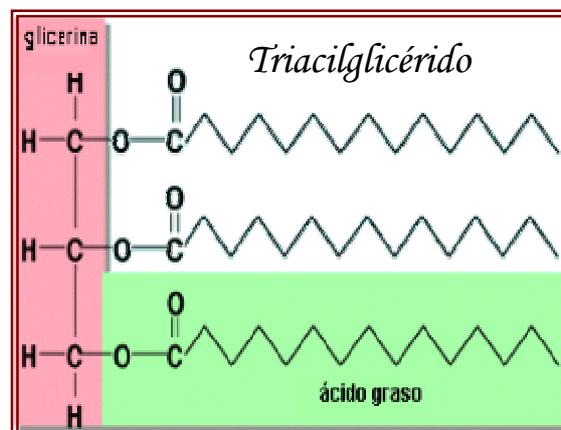


Fig. 1.16.- Estructura típica de un triacilglicérido.

Teniendo en cuenta la abundancia de ácidos grasos insaturados presentes en todos los tejidos de los peces y que son sustratos fácilmente oxidables, ésta oxidación podría afectar a la estructura de las clases lipídicas y, por lo tanto, al perfil característico que pudiera existir en un estado de equilibrio oxidativo dentro del organismo. Esta es la razón por la que en la presente memoria se ha procedido a analizar no sólo la coloración y el perfil de carotenoides, sino también el perfil lipídico de la piel de ejemplares de bocinegro alimentados con dietas carentes o suplementadas con distintas fuentes y niveles de carotenoides, esto es, estudiando tanto la composición en clases lipídicas como en ácidos grasos.

Asimismo, para evaluar la posible actividad antioxidante que pudieran desarrollar estos pigmentos suministrados en la dieta, se ha procedido a analizar el nivel de peróxidos lipídicos presentes en dichas muestras, al tiempo que el conjunto de resultados se ha relacionado no sólo con la fuente y dosis de carotenoide suministrada a los ejemplares de cultivo, sino también, con los niveles y las formas químicas de los carotenoides depositados en su piel.

1.5 Los carotenoides y la acuicultura

Gran variedad de carotenoides, tanto sintéticos como naturales, son utilizados en acuicultura en la actualidad, encontrándose su uso directamente vinculado con el intento de lograr la correcta coloración del producto acuícola. Así por ejemplo, la pigmentación rojiza característica del músculo de los salmónidos es uno de los parámetros más importantes relacionados con la calidad del producto final, influyendo en cuanto a la aceptación del mismo en el mercado. De hecho, el consumidor llega a relacionar la intensidad del color del músculo

del salmón con características tales como la frescura del producto, un mejor sabor del mismo, una mayor calidad y un precio superior en el mercado (Anderson, 2000).

Teniendo en cuenta estos aspectos, no es de extrañar que exista un importante esfuerzo investigador centrado en la búsqueda de fuentes de carotenoides que sean capaces de producir una correcta pigmentación, al tiempo que resulten rentables.

Tal y como se ha comentado al comienzo de la presente memoria, los animales, incluidos los peces y crustáceos, son incapaces de sintetizar carotenoides *de novo*, así que resulta necesario suministrarles estos pigmentos en la dieta (Goodwin, 1984). Sin embargo, no siempre hay que formular los tratamientos dietarios con los carotenoides que los organismos van a depositar en sus tejidos, ya que ciertas especies de interés acuícola (crustáceos, peces omnívoros y herbívoros) son capaces de transformar y depositar carotenoides ingeridos como el β -caroteno o la zeaxantina, en otros como la astaxantina (Simpson et al., 1981; Castillo et al., 1982; Schiedt, 1998). No sucede lo mismo en especies de peces carnívoras como los salmónidos y la dorada japonesa, incapaces de transformar otros carotenoides en la astaxantina que depositan en el músculo y la piel, respectivamente (Simpson y Kamata, 1979; Ibrahim et al., 1984, Schiedt, 1998). Dado que la astaxantina representa en torno al 80% de los carotenoides presentes en el músculo de los salmónidos en su medio natural (Shahidi, 1998), no sorprende que bajo condiciones de cultivo sea el carotenoide más comúnmente usado para pigmentar estas especies (Torrissen et al., 1989, Storebakken y No, 1992).

En la actualidad, la fuente de astaxantina más conocida y empleada en acuicultura es la sintetizada por los laboratorios Hoffman La Roche (recientemente adquiridos por la compañía DSM) y comercializada con el nombre de Carophyll® Pink. En este producto, la astaxantina (con un contenido mínimo del 8%), se presenta en su forma libre o no esterificada

(no posee ácidos grasos unidos a su estructura). El pigmento es elaborado mediante síntesis química y se comercializa como un conjunto de moléculas embebidas, junto a antioxidantes, en una matriz de carbohidratos y gelatina, la cual a su vez, se encuentra protegida por una cubierta diseñada para que el producto sea estable tras el extrusionado de las dietas. De hecho, debido a la buena solubilidad que posee el Carophyll® Pink es posible añadirlo en el pre- o en el post-extrusionado. El diseño que posee esta fuente de astaxantina permite que exista un equilibrio entre esta estabilidad y la digestibilidad que debe poseer el producto.

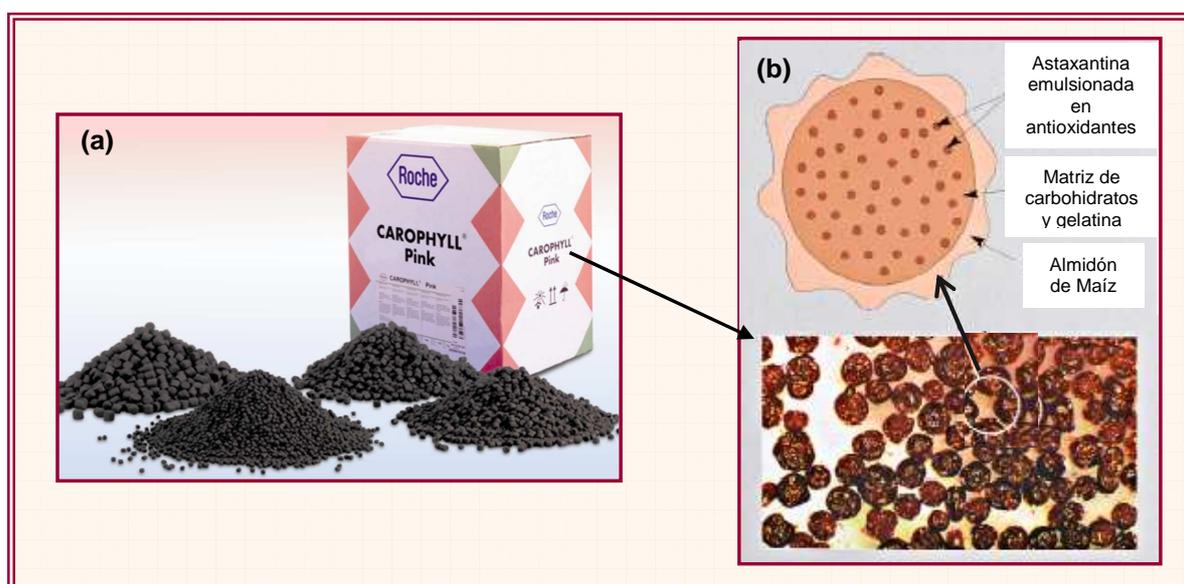


Fig. 1.17. a.- Carophyll® Pink añadido a piensos acuícolas. b.- Estructura y aspecto del producto.

Aunque la forma comercial más conocida sea el Carophyll® Pink, existen otras formas de astaxantina sintéticas en el mercado como las comercializadas por BASF Fine Chemicals bajo el nombre de Lucantin® Pink (astaxantina al 10%), Lucantin® Pink CWD (al 10%, para su uso post-extrusionado) y Lucantin® Pink CWD 20% (al 20%, para su uso post-extrusionado).

Asimismo, existen otras fuentes alternativas de astaxantina de origen natural en el mercado, entre las que hay que destacar crustáceos, levaduras como *Phaffia rhodozyma* y algas como *Haematococcus pluvialis*.

En los crustáceos, que constituyen la fuente natural de pigmentos para los salmónidos en su medio natural, la astaxantina en su forma libre, esterificada o formando complejos con proteínas, es el carotenoide más abundante (Meyers, 1994). Numerosos estudios avalan la eficiencia de la astaxantina presente en los crustáceos como fuente pigmentante de salmónidos de cultivo, así, incorporando organismos tales como el langostino, *Penaeus japonicus* (Saito y Regier, 1971; Choubert y Luquet, 1983), copépodos, *Calanus finmarchicus* (Lambertsen y Braekkan, 1971), langostilla, *Pleuroncodes planipes* (Spinelli et al., 1974; Spinelli y Mahnken, 1978; Coral-Hinostroza et al., 1998), el krill, *Euphasia sp.* (Lambertsen y Braekkan, 1971; Mori et al., 1989, Scott et al., 1994) y el acocil, *Procambarus clarkii* (Omara-Alwala et al., 1985), a las dietas de estas especies, en su forma fresca o deshidratada, se ha comprobado que es posible obtener diferentes grados de pigmentación del músculo (revisado por Ingle de la Mora, 2002).

En cuanto a la levadura *Phaffia rhodozyma*, las cepas procedentes de la naturaleza producen entre 200-400 mg·kg⁻¹ de astaxantina, mientras que las cepas que actualmente se comercializan, están modificadas genéticamente para que produzcan hasta 8.000 mg·kg⁻¹ de este carotenoide, que se presenta en estos microorganismos en su forma química libre o no esterificada. Una de las formas en las que actualmente se comercializa esta levadura en el mercado acuícola es el producto Ecotone[®], de la compañía ADM, que incluye 5.000 mg·kg⁻¹ de astaxantina.

Así como estos organismos producen hasta un 0,8 % de su peso seco de astaxantina, el alga *Haematococcus pluvialis* es capaz de producir de forma natural, sin modificación

genética, entre 15.000 y 40.000 mg·kg⁻¹ de astaxantina, es decir, entre 1,5 y 4 % de su peso seco (Lorenz, 2000; Lorenz y Cysewski, 2000; Guerin et al., 2003).

Dicha alga pertenece al *Phylum Chlorophyta* y se caracteriza por presentar color verde y motilidad cuando las condiciones son favorables, sin embargo, cuando los nutrientes son escasos, es sometida a un exceso de radiación UV o las condiciones en general se tornan desfavorables, las células pasan al estado de ciste, en el que pueden permanecer durante años y durante el cual acumulan astaxantina para protegerse de la luz UV y de la oxidación (Goodwin y Jamirkon, 1954; Borowitzka et al., 1991; Yong y Lee, 1991; Boussiba et al., 1992; Fan et al., 1994; Lorenz, 2000). La astaxantina se presenta en el alga *Haematococcus pluvialis* principalmente en su forma esterificada, siendo aproximadamente el 70% monoésteres (una molécula de ácido graso unida a la astaxantina en su posición C3 o C3'), el 25% diésteres (dos moléculas de ácidos grasos se unen a la astaxantina en los carbonos C3 y C3'), y el 5% restante astaxantina libre (Lorenz y Cysewski, 2000; Tejera et al., 2007).

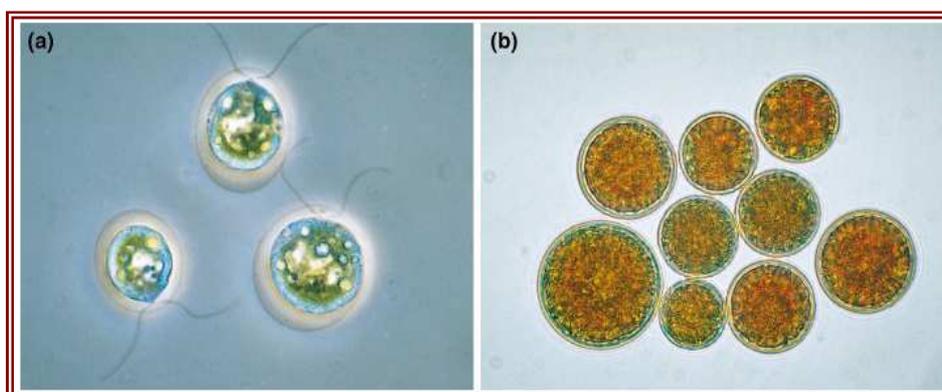


Fig. 1.18. a.- Células vegetativas de *Haematococcus pluvialis*; b.- Cistes que depositan astaxantina en condiciones desfavorables (Lorenz y Cysewski, 2000).

La presencia de pared celular tanto en la levadura como en el alga, dificulta la disponibilidad de la astaxantina por parte de los organismos que son alimentados con dietas suplementadas con estas fuentes y éste es uno de los principales obstáculos a los que se ha

enfrentado la biotecnología en los últimos años. En el caso de *Phaffia rhodozyma*, la industria ha desarrollado medios para liberar la astaxantina tales como: la optimización de las condiciones de secado de la levadura, la rotura mecánica de la pared celular y el tratamiento enzimático (hidrólisis de la pared celular usando preparados enzimáticos de *Bacillus circulans*), a fin de mejorar la disponibilidad del pigmento para su uso en la industria acuícola principalmente (Johnson, 2003). En el caso de *Haematococcus pluvialis*, este problema puede solucionarse si se tiene en cuenta que los cistes pueden regresar a su estado original si las condiciones se tornan de nuevo favorables. En dicho estado, el alga no necesita de la existencia de pared celular que es degradada durante este proceso denominado germinación. De hecho, si se añade nitrato al medio, durante las primeras 24-48 horas del proceso de germinación, existe un incremento de la disponibilidad de la astaxantina sin que se pierda una cantidad importante de este carotenoide, que por otro lado está en exceso y, por tanto, no se deposita cuando las células tienen sus requerimientos cubiertos (Fabregas et al., 2003).

Tanto la levadura *Phaffia rhodozyma* como el alga *Haematococcus pluvialis* han sido ensayadas en numerosas ocasiones como fuentes de astaxantina para pigmentar el músculo de salmónidos (Johnson et al., 1980; Sommer et al., 1991, 1992; Choubert y Heinrich 1993; Sanderson y Jolly, 1994; Choubert et al., 2006). Los resultados muestran una menor eficiencia de dichas fuentes, si se comparan sus efectos con la astaxantina sintética o Carophyll® Pink. Los menores niveles de deposición de dicho carotenoide utilizando estas fuentes naturales, podrían deberse a una ruptura incompleta de las paredes celulares de ambos organismos, lo que influiría en el nivel de astaxantina disponible para pigmentar a los peces (Sommer et al., 1991, 1992; Choubert y Heinrich, 1993; Storebakken et al., 2004).

Diversos estudios llevados a cabo para pigmentar otros organismos de interés acuícola, ponen de manifiesto el alto potencial que posee el alga *Haematococcus pluvialis* como fuente

de astaxantina. Así, en dorada japonesa (*Chrysophrys major*), un espárido que debe el color rojizo de su piel a la deposición del carotenoide astaxantina en su forma química diéster (Katayama et al., 1965; Tanaka et al., 1976; Ibrahim et al., 1984; Nakazoe et al., 1984), se ha comprobado que la adición de esta fuente de astaxantina da buenos resultados en cuanto a coloración de la piel (Guerin y Hosokawa, 2001).

Asimismo, existen referencias de su uso en el cultivo de crustáceos (Chien y Shiau, 2005) y de peces ornamentales (Ako et al., 2000; Gouveia et al., 2003). Estudios recientes, incluyendo el presente, avalan su uso para suplementar dietas para bocinegro (*Pagrus pagrus*) (Tejera et al., 2003, 2005, 2007; Chatzifotis et al., 2005; Tejera et al., 2007), lo que hace que esta alga se haya convertido en una promesa en el mercado de las fuentes de carotenoides para acuicultura.

Entre las compañías que actualmente comercializan esta alga para su uso en acuicultura destacan los laboratorios Cyanotech (Hawaii), que producen *Haematococcus pluvialis* a escala industrial y la comercializan bajo el nombre de NaturoseTM.



Fig. 1.19. Vista aérea de la Corporación Cyanotech en la que se observan sus sistemas de cultivo del alga *Haematococcus pluvialis* en Kailua-Kona, Hawaii. Los distintos colores de los estanques se corresponden con los distintos estadios por los que pasa el alga durante su producción.

Llegados a este punto, cabe destacar que aunque la astaxantina es el carotenoide que posee más importancia en la industria acuícola, no es el único que se utiliza, y existen diversas experiencias que tratan de buscar alternativas en cuanto a tipos de carotenoide y fuentes de las que extraerlos. Así por ejemplo la cantaxantina, es un carotenoide que fue aislado por primera vez de la seta *Cantharellus cinnabarinus* y que ha sido utilizado durante años por la industria salmonera, sólo o en combinación con astaxantina (Bjerkeng, 2000). Si bien es cierto que los salmónidos pigmentados sólo con cantaxantina poseen una coloración en el músculo algo más amarilla que los del medio natural (Skrede y Storebakken, 1986), su uso combinado con astaxantina parece proveer al músculo de los salmónidos de un mayor nivel de carotenoide total y, por tanto, de una mejor coloración (Torrissen, 1989). Este carotenoide ha sido empleado en la presente y en otras investigaciones para suplementar dietas para bocinegro (*Pagrus pagrus*), no obteniéndose buenos resultados en cuanto a pigmentación de la piel se refiere (Tejera, et al., 2005; Kalinowski et al., 2005).

En la actualidad, la forma más común en la que se encuentra este carotenoide en el mercado es la sintetizada y comercializada bajo el nombre de Carophyll[®] Red de laboratorios Hoffman La Roche (actualmente DSM), aunque también es posible encontrarla bajo el nombre de Lucantin[®] Red o Lucantin[®] Red CWD (para su uso post-extrusionado), comercializada por BASF Fine Chemicals.

Existen otras fuentes de carotenoides en el mercado que se encuentran aún en fase de investigación, tal es el caso de la paprika (*Capsicum annum*), rica en el carotenoide capsantina, que ha sido probada con relativo éxito en el cultivo de salmónidos (Vernon-Carter et al., 1994; Yanar et al., 1997; McEvoy, 1998b; Akhtar et al., 1999) y, con mejores resultados, en la carpa roja (*Cyprinus carpio*, L. 1758) (Morimoto et al., 1989) y en la carpa dorada (*Carassius auratus*, L. 1758) (Tsushima et al., 1998; Vassallo-Agius et al., 2001). Curiosamente, el uso

de paprika como suplemento dietario en reproductores de medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*, Temminck & Schlegel 1845) ha dado mejores resultados en cuanto a calidad de las puestas se refiere que el carotenoide astaxantina, a pesar de las múltiples funciones y efectos beneficiosos que se le atribuyen a este último (Vassallo-Agius et al., 2001).

Otra fuente natural de carotenoides con la que se han realizado experiencias en lo referente a la pigmentación son los pétalos de Marigold (*Tagetes erecta*), que presentan un contenido de un 88% de ésteres de luteína. Estudios realizados en trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) han demostrado que es posible pigmentar el músculo de estos peces utilizando esta fuente de carotenoides en la dieta, si bien la coloración obtenida es más amarilla que la que se obtiene suplementando la dieta de los ejemplares con astaxantina comercial o con paprika (Yanar et al., 2007). Un resultado similar se ha observado en la piel y en la base de las aletas de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*, L. 1758), al utilizar esta fuente de luteína como suplemento pigmentante (Boonyaratpalin y Unprasert, 1989; Ponce-Palafox et al., 2004), sin embargo, su uso en crustáceos ha tenido un resultado satisfactorio (Göçer et al., 2006).

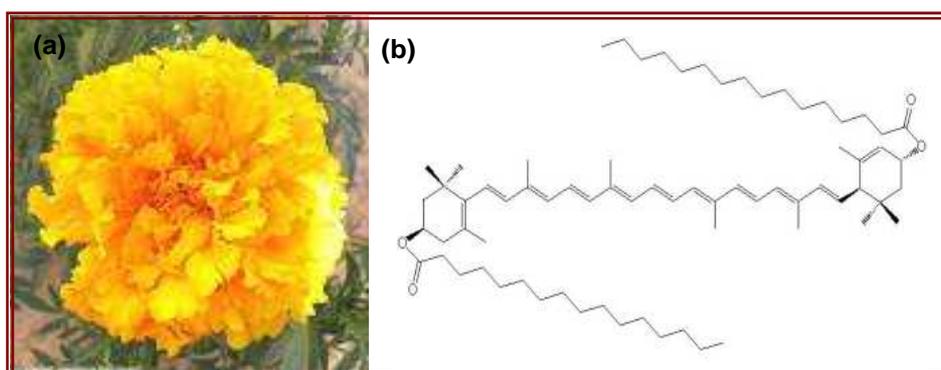


Fig. 1.20. a.- Flor de *Tagetes erecta*; b.- Luteína esterificada, forma química en la que se presenta este carotenoide en los pétalos de la flor.

Las microalgas *Spirulina sp.*, *Dunaliella salina* o *Chlorella vulgaris* se presentan también como fuentes con alto potencial pigmentante en el mercado de los carotenoides.

El alga *Spirulina sp.* ha sido ensayada con éxito en crustáceos (Chien y Shiau, 2005). Los buenos resultados obtenidos probablemente residen en el hecho de que esta cianofita es rica en los carotenoides zeaxantina y β -caroteno (Soejima et al., 1980; Liao et al., 1993), los cuales pueden ser transformados por estos organismos a la astaxantina que finalmente depositan en sus tejidos (Shahidi., 1998). El uso de la *Spirulina* también ha dado resultados positivos, en cuanto a pigmentación se refiere, en peces ornamentales (Ako et al., 2000) y en el cocinero (*Caranx vinctus*, Jordan & Gilbert 1882) (Okada et al., 1991). Sin embargo, en la trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*) no se logró obtener buenos resultados utilizando esta fuente de carotenoides (Choubert, 1979).

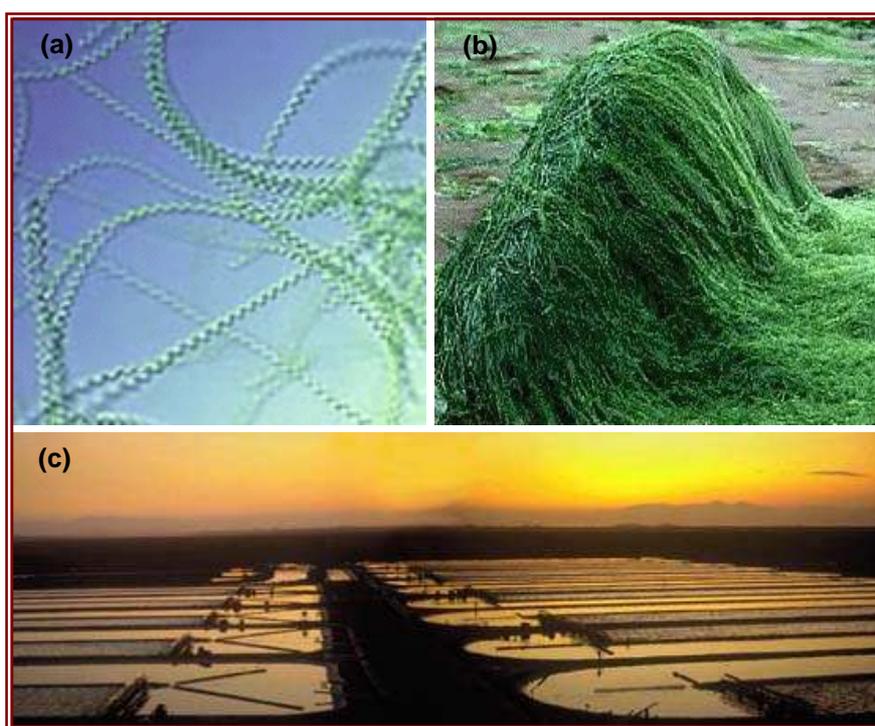


Fig. 1.21. a.- Aspecto de la *Spirulina sp.* al microscopio; b.- *Spirulina sp.* en la naturaleza, c.- Cultivo a gran escala de esta cianofita.

El alga *Dunaliella salina* se caracteriza por acumular grandes cantidades del carotenoide β -caroteno, lo que la convierte en un recurso interesante no sólo para la acuicultura, por su administración directa en las dietas destinadas a los organismos de cultivo,

sino también, desde el punto de vista biotecnológico, por servir de fuente de este carotenoide a escala industrial. Su utilización para suplementar dietas de crustáceos ha tenido éxito (Sommer et al., 1990; Boonyaratpalin et al., 2001), por el mismo motivo por el que la *Spirulina* ha dado lugar a buenos resultados en estos organismos, es decir, por su capacidad que poseen para transformar el β -caroteno a astaxantina (Shahidi, 1998).

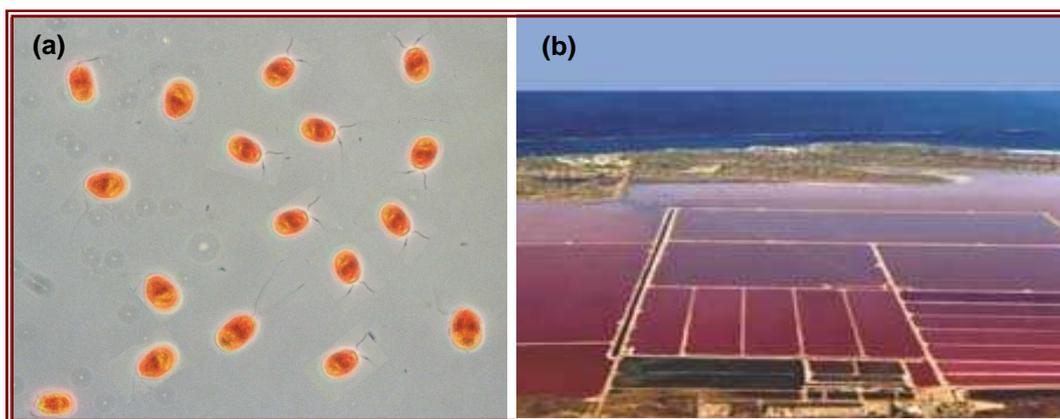


Fig. 1.22. a.- Aspecto de *Dunaliella salina* al microscopio; b.- Producción de esta alga a gran escala

El cultivo de otras microalgas como la *Chlorella vulgaris* para su empleo como fuente de carotenoides se encuentra todavía en sus fases iniciales, si bien es cierto que existen experiencias realizadas en peces (Gouveia et al., 1996; 1997; 1998; 2002; 2003), que avalan el continuar investigando sus posibles usos en acuicultura.

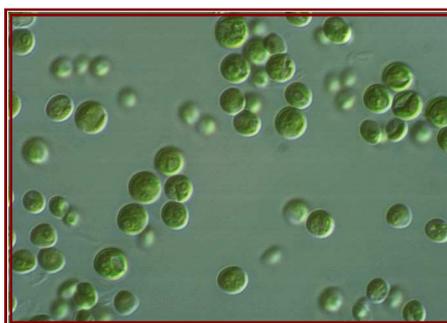


Fig. 1.23. Aspecto de *Chlorella vulgaris* al microscopio

La búsqueda de fuentes alternativas capaces de pigmentar organismos acuícolas es un campo en expansión que ofrece múltiples oportunidades para la investigación. En la presente memoria el probar distintas fuentes y niveles de carotenoides ha sido uno de los enfoques con el que hemos pretendido abordar el problema de mal-pigmentación que presentan los ejemplares de bocinegro (*Pagrus pagrus*) de cultivo. Aunque la coloración de la piel es uno de los parámetros que más afectan a la hora de comercializar esta especie, teniendo en cuenta el importante papel protector desarrollado por los carotenoides en la integridad de los lípidos de membrana, nuestra investigación aborda también aspectos relacionados con este efecto protector frente a la oxidación lipídica.



Objetivos

2. Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de esta memoria es estudiar la influencia del aporte de carotenoides en la dieta, sobre la pigmentación de alevines de bocinegro (*Pagrus pagrus*) mantenidos en cautividad, en tanques y jaulas marinas flotantes.

Teniendo en cuenta que los carotenoides en peces, no sólo están implicados en la pigmentación, sino que protegen contra la autoxidación lipídica y cumplen funciones específicas en el metabolismo, se pretende evaluar, además, cómo afectan estos pigmentos a la composición lipídica de la piel, y al desarrollo general de los alevines de bocinegro.

Objetivos concretos

Para la consecución del objetivo general, se planteó la realización de 4 experimentos de engorde de alevines de bocinegro, en los que se suministraron dietas con contenido variable de carotenoides.

En el experimento 1 se pretendió evaluar si la astaxantina esterificada presente en el camarón (*Plesionika sp.*) era capaz de pigmentar la piel de bocinegros mantenidos en tanques. Asimismo, se determinó el efecto de la astaxantina dietaria sobre el desarrollo, el contenido total de carotenoides y la composición lipídica de la carcasa.

En el experimento 2 se estudió el efecto de distintas fuentes de astaxantina: natural (el alga *Haematococcus pluvialis* comercializada como Naturose™) y sintética (Carophyll® Pink); la forma química en la que este pigmento se presenta en dichas fuentes (esterificada o libre); y distintos niveles suministrados (25 y 50 mg de astaxantina ·kg⁻¹ de dieta), sobre varios parámetros: desarrollo, pigmentación, presencia de astaxantina y sus derivados metabólicos, presencia de peróxidos lipídicos y composición lipídica de la piel de ejemplares de bocinegro mantenidos en tanques.

En el experimento 3 se determinó el efecto de la inclusión de dosis más bajas de astaxantina (8 y 16 mg·kg⁻¹ de dieta), procedente de distintas fuentes: natural (el alga *Haematococcus pluvialis* comercializada como Naturose™) y sintética (Carophyll® Pink), así como de distintos niveles de cantaxantina (25 y 50 mg·kg⁻¹ de dieta, Carophyll® Red), sobre varios parámetros: desarrollo, pigmentación, presencia de astaxantina y sus derivados metabólicos, presencia de peróxidos lipídicos y composición lipídica de la piel de ejemplares de bocinegro mantenidos en tanques.

En el experimento 4 se evaluó el efecto de los distintos sistemas de cultivo (tanques y jaulas marinas flotantes) sobre: el desarrollo, la pigmentación, el contenido de astaxantina y sus derivados metabólicos, la presencia de peróxidos lipídicos y la composición lipídica de la piel, en bocinegros alimentados con una dieta suplementada con astaxantina.



Material y Métodos

3. Material y Métodos

3.1 Producción de alevines

Los alevines de bocinegro (*Pagrus pagrus L.*) utilizados en todas las experiencias fueron obtenidos en la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Canarias mediante la tecnología Mesocosmos, a partir de lotes de reproductores mantenidos en las instalaciones del citado organismo. Esta tecnología está basada en sistemas de cultivo cerrado, cuyo volumen de agua puede oscilar entre 1 y 10.000 m³; en los que se desarrolla un ecosistema pelágico constituido por múltiples especies de alimento natural, relacionados en cadena: fitoplancton, zooplancton y predadores, que son representados por las postlarvas de peces a alimentar.

El mesocosmos, a pesar de no ser fácil de manejar, parece una excelente alternativa para incrementar la calidad y supervivencia de las larvas, dado que proporciona a estas, gran cantidad y variedad de presas pequeñas de excelente perfil bromatológico en cuanto al contenido de ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos se refiere. Las condiciones medioambientales del sistema de mesocosmos están sujetas al clima local donde se instale y el sistema puede ser mejorado incluyendo diferentes especies a lo largo de un ciclo anual. La productividad del mismo está determinada por la carga inicial y por el nivel de aportes exógenos de nutrientes. Las postlarvas de peces son colocadas en el sistema de mesocosmos cuando la densidad de presas ha alcanzado niveles apropiados o, de ser necesario por las condiciones de manejo, los organismos cultivados en este tipo de sistema son colectados con

periodicidad, seleccionados por tamaño y suministrados posteriormente a las postlarvas de peces que se encuentran en tanques separados (Prieto et al., 2006).

3.2 Elaboración de dietas

En el primer experimento, la dieta basal (B) utilizada fue una dieta comercial para dorada de la empresa de piensos TROUW España S.A, mientras que en el resto de las experiencias llevadas a cabo en la presente memoria, la empresa BIOMAR S.A fue la encargada de manufacturar los distintos tratamientos dietarios, los cuales fueron elaborados a partir de una dieta basal (B) comercial para dorada, variando sólo el nivel y fuente del carotenoide añadido. Los piensos elaborados fueron almacenados en cámaras a 18°C y protegidos de la luz hasta el momento de su utilización.

En cada experiencia se realizó un análisis de las dietas con el fin de comprobar que la composición y el nivel de carotenoide se ajustaba a la prevista en el diseño experimental.

3.3 Toma de muestras

Tras 4 meses de alimentación, los peces fueron sacrificados mediante shock hipotérmico, extrayéndose a continuación las muestras necesarias para los análisis bioquímicos. En el primer experimento los análisis se llevaron a cabo en la carcasa (sección de tejido muscular y piel), mientras que en el resto de las experiencias se separó el músculo de la piel para analizar esta última de forma aislada. A fin de separar ambos tejidos, fue

necesario utilizar bisturí y pinzas, limpiando las muestras de piel mediante raspado de su cara interna para evitar que arrastraran restos de tejido muscular o grasa subcutánea.

Una vez tomadas las muestras, éstas fueron inmediatamente colocadas en viales plásticos etiquetados y congeladas en nitrógeno líquido, siendo conservadas en ultracongelador a -80°C hasta el momento de su análisis.

Todos los aspectos concretos concernientes al mantenimiento de los peces y a las condiciones experimentales son detallados para cada experimento, en el apartado correspondiente.

3.4 Análisis Bioquímicos

Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal de la Universidad de La Laguna.

En las dietas se analizaron los niveles de astaxantina, así como los contenidos de humedad, lípido total, clases lipídicas y ácidos grasos.

En todas las muestras de carcasa o piel se analizó el contenido total de carotenoides. En los experimentos 2, 3 y 4 se analizó además el perfil de los carotenoides presentes en la piel, esto es, el tipo y porcentaje en el que se encuentra cada carotenoide en este tejido, así como el contenido total de astaxantina. Del mismo modo, el análisis de los niveles de peróxidos lipídicos de las muestras de piel fue llevada a cabo también en las 3 últimas experiencias.

En todos los experimentos se determinaron los contenidos de humedad, lípido total y el perfil de clases lipídicas del lípido total. Asimismo, se determinó la composición en ácidos grasos del lípido total y de los triacilglicéridos. En el primer experimento se aislaron las clases

lipídicas fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina del lípido de la carcasa para evaluar su composición en ácidos grasos, no así en el resto de las experiencias, en las que a la vista de los resultados del primer experimento, se determinó el perfil de ácidos grasos del conjunto de los lípidos polares.

A continuación se presenta un cuadro resumen de los análisis bioquímicos llevados a cabo en cada experiencia (E):

Experimentos	E 1	E 2	E 3	E 4
Carotenoides				
Contenido total	X	X	X	X
Perfil		X	X	X
Total Astaxantina		X	X	X
Peróxidos Lipídicos				
		X	X	X
Lípido total				
	X	X	X	X
Humedad				
	X	X	X	X
Clases lipídicas				
	X	X	X	X
Ácidos Grasos				
del Lípido total	X	X	X	X
de los Triacilglicéridos	X	X	X	X
de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina	X			
del total de Polares		X	X	X

Fig. 3.1. Esquema de los análisis realizados por experimento.

3.4.1 Análisis de Carotenoides

La extracción de carotenoides se realizó siguiendo el método descrito por Barua y colaboradores (1993). A tal fin, muestras de carcasa o piel, de aproximadamente 1g de peso, fueron homogeneizadas con etil acetato/etanol (10 ml, 1:1 v/v) y centrifugadas a 1.500 rpm (402 g), durante 2 min; siendo el sobrenadante trasvasado a un tubo limpio. El pellet fue rehomogeneizado en etil acetato (5 ml) y centrifugado nuevamente, siendo el sobrenadante obtenido, añadido al sobrenadante anterior. Finalmente el pellet fue rehomogeneizado en 10 ml de hexano y centrifugado, por última vez, combinando el sobrenadante resultante con los dos anteriores. Esta mezcla, producto de las tres extracciones consecutivas, fue evaporada bajo atmósfera de nitrógeno, proceso tras el cual, se mantuvo en desecador durante una hora. Tras este período, se añadió 2 ml de hexano con un 0,01% de BHT como antioxidante al tubo que contenía el extracto ya seco y a continuación se trasvasó esta solución a un tubo de ultracentrífuga, para facilitar el centrifugado a 10.000 rpm (11.180 g), durante 5 min. Una vez centrifugado, y tras filtrar el sobrenadante utilizando una jeringa de cristal y filtros comercializados para tal fin, se procedió a realizar una lectura espectrofotométrica de la solución obtenida, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu, UV-120-02, con la longitud de onda fijada a 470 nm y con hexano (+BHT) como blanco. Esta lectura fue realizada en todos los experimentos a fin de calcular la concentración de carotenoides presentes en las muestras. En la primera experiencia, el resultado de este cálculo se tomó como valor definitivo de dicha concentración de carotenoides. Sin embargo, en el resto de experimentos se empleó sólo para conocer la concentración de las muestras antes de su inyección en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC).

De acuerdo con los protocolos cedidos por los laboratorios Roche la fórmula para calcular la concentración de pigmento (astaxantina o cantaxantina) presente en las muestras es la siguiente:

$$[\text{Carotenoide}] \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} = [(\text{Abs} \times 10.000) / \text{E1\%, 1cm}] \times \text{V/m}$$

Donde:

Abs es la absorbancia de la muestra.

10.000 es el factor de dilución.

E1%, 1cm es el coeficiente de extinción de la astaxantina en hexano, o lo que es lo mismo, la absorción estándar de una solución del carotenoide al 1% (peso/volumen), en una cubeta de 1cm de ancho a la $\lambda^{\text{máx}}$ en n-hexano. El valor que toma para la astaxantina medida a 470nm es **2.100**, mientras que para la cantaxantina medida a 466nm es **2.260**.

V es el volumen final de la muestra tras su extracción, siendo en nuestro caso 2ml.

m es el peso del tejido (g).

Aunque la unidad en la que se expresa este contenido en la fórmula sea $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, nosotros transformaremos nuestros datos en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Tal y como se ha comentado, la separación y determinación cualitativa de los carotenoides y la cuantificación de la astaxantina de las muestras de los experimentos 2, 3 y 4 se realizó mediante HPLC. Las muestras de los experimentos 2 y 3 fueron analizadas en el Instituto de Acuicultura Akvaforsk (Sunndalsøra, Noruega), utilizando un equipo cromatográfico Shimadzu LC-10AS, conectado a un detector Photodiode array UV-Vis (PDA) Shimadzu SPD-M6A y a un procesador Shimadzu CBM-10a. Una columna de sílica gel tratada con H_3PO_4 (Hibar, LiChrosorb Si 60, con partículas de 5 mm; diámetro interno de 4 mm, longitud de 125 mm; Merck), fue seleccionada para la separación y análisis de los extractos de pigmento, tal y como fue descrito por Vecchi et al. (1987). La fase móvil

consistió en una mezcla isocrática de n-hexano / acetona (80:20 v/v), diariamente renovada, y el flujo fue fijado 1,5 ml /min.

La inyección fue llevada a cabo mediante un autoinyector Shimadzu SIL-10. La longitud de onda del detector PDA se estableció entre 420 y 540 nm. Los picos obtenidos fueron identificados por orden de elución, tiempo de retención y propiedades de absorción, con un estándar de astaxantina pura, de una concentración de aproximadamente 1,5 mg·l⁻¹ (n-hexano/cloroformo, 95,5:4,5), siguiendo las indicaciones propuestas por los laboratorios Roche en sus catálogos para el análisis de astaxantina en piensos. Todos los cromatogramas fueron reintegrados (software Class LC10, Shimadzu, Japón) para ajustar la línea base.

En el experimento 4, la separación y determinación cualitativa de los carotenoides y la cuantificación de la astaxantina se analizaron en el laboratorio de Fisiología Animal del departamento de Biología Animal de la Universidad de La Laguna (ULL), utilizando un HPLC marca Jasco (Jasco Corporation, Tokyo, Japan), equipado con una bomba PU-1580 y un detector PDA MD-1510/ 1515, y controlado por un software de adquisición y procesamiento de datos.



Fig. 3.2. Imagen del equipo de HPLC propiedad de la ULL.

En este caso, se utilizó un inyector manual Rheodyne modelo 7725 (Rheodyne, CA, USA), equipado con un loop de 20 µl de capacidad por muestra. La columna seleccionada fue una LiChrosorb Si 60, con partículas de 5 mm; diámetro interno de 4 mm y longitud de 125 mm de la casa comercial Scharlab (Scharlab S.L, Barcelona, España). El método utilizado, es decir, tanto la fase móvil, como el flujo seleccionado y el resto de parámetros cromatográficos seleccionados, fueron idénticos a los descritos para las experiencias 2 y 3.

El cálculo necesario para determinar la concentración de pigmento utilizando HPLC se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$[\text{Carotenoide}] \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} = (\mathbf{A_m} \times \mathbf{V} \times \mathbf{Abs} \times \mathbf{10.000}) / (\mathbf{m} \times \mathbf{A_{std}} \times \mathbf{E1\%, 1cm})$$

En la que:

A_m es el área de los picos cromatográficos correspondientes a los carotenoides en la muestra.

V es el volumen final de la muestra tras su extracción, siendo en nuestro caso 2ml.

Abs es la absorbancia del patrón de astaxantina elaborado según las instrucciones de laboratorios Roche.

10.000 es el factor de dilución.

m es el peso del tejido (g).

A_{std} es el área de los picos obtenidos al pinchar el estándar en el HPLC.

E1%, 1cm es el coeficiente de extinción de la astaxantina en hexano, o lo que es lo mismo, la absorción estándar de una solución del carotenoide al 1% (peso/volumen), en una cubeta de 1cm de ancho a la $\lambda^{\text{máx}}$ en n-hexano. El valor que toma para la astaxantina medida a 470nm es **2.100**, mientras que para la cantaxantina medida a 466nm es **2.260**.

En el caso de existir isómeros de astaxantina en la muestra, será necesario multiplicar en la fórmula el valor del área correspondiente al pico del isómero 9z por 1,2 y el del isómero 13z por 1,3. Asimismo, si se determinara la existencia del isómero z de la cantaxantina, el área correspondiente al mismo debería ser multiplicado por 1,3. La necesidad de realizar estos cálculos reside en que la respuesta cromatográfica de estos compuestos es menor a la que posee la forma química más común en la que se presentan estos carotenoides en la naturaleza, la forma all-E, o forma trans del compuesto.

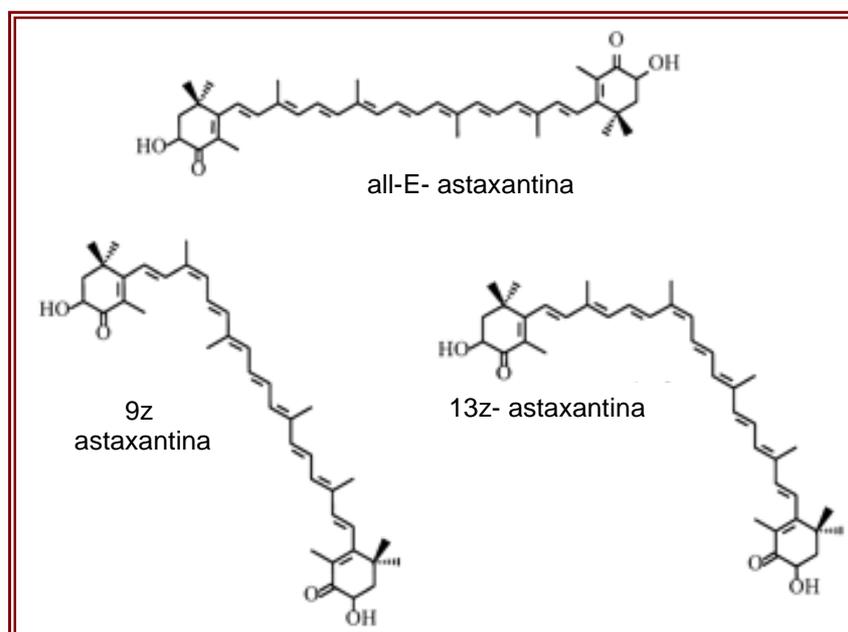


Fig. 3.3. Isómeros químicos más importantes de la astaxantina.

3.4.2 Análisis de Peróxidos Lipídicos

La determinación de los peróxidos se realizó según modificación del método de Shanta et al. (1994).

Antes de llevar a cabo el análisis de las muestras, se realizó una recta de calibrado. Para ello se utiliza una serie de concentraciones crecientes de una solución stock de Fe III disueltas en 10 ml de cloroformo: metanol (proporción 7:1), a las que se les añade 50 µl de una solución de tiocianato de amonio preparada al 30%. Al entrar en contacto ambas soluciones se produce una reacción colorimétrica, que es medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm, a los 5 minutos de haber añadido el reactivo. La pendiente de la recta y la ordenada en el origen van a ser datos necesarios en la determinación de los peróxidos de las muestras. La solución stock de Fe III necesaria para realizar la curva de calibrado se obtiene disolviendo 0,5g de Fe en polvo en 50 ml de HCl 10N, a esta disolución se le añaden de 1 a 2 ml de H₂O₂ al 30%, y se lleva a ebullición. Una vez atemperada la solución, se le añade H₂O destilada hasta 500ml. De esta disolución se toma 1ml que se disuelve con cloroformo:metanol (7:3) hasta hacer un volumen final de 100 ml, que será finalmente nuestra solución stock.

Para el análisis de una muestra partimos de 10 mg de lípido diluido en 10 ml de cloroformo: metanol (7:1). Este lípido fue obtenido siguiendo el protocolo de extracción de lípido total que se describe en el apartado 3.4.4. A estos 10 mg de lípido se le añaden 50 µl de una solución de tiocianato de amonio al 30% y 50 µl de una solución de FeII preparada previamente (62,7 mg FeCl₂·4H₂O/10 ml HCl 3,7%).

La reacción de color se produce al oxidarse el Fe II a Fe III por la acción de los peróxidos lipídicos presentes en la muestra. El Fe III reacciona con el tiocianato de amonio y produce un color azul que se va intensificando a medida que la reacción continúa.

El blanco utilizado en la reacción es la mezcla de 10 ml de cloroformo: metanol (7:1) con 50 µl de la solución de tiocianato de amonio y 50 µl de la solución de FeII.

Siguiendo el mismo protocolo utilizado para realizar la recta de calibrado, tras 5 min desde el inicio de la reacción, la muestra se transfiere a una cubeta de cuarzo y se mide su absorbancia por espectrofotometría, a una longitud de onda de 500nm.

El índice de peróxidos de la muestra (IP), viene dado por la siguiente fórmula:

$$IP_{(\text{meq O}_2/\text{kg muestra})} = [(Abs_m - Abs_b) - b] / a / (m \times 55.845 \times 2)$$

Donde:

Abs_m es la absorbancia de la muestra a 500nm.

Abs_b es la absorbancia del blanco a 500nm.

55.845 es el peso atómico del hierro.

a es la pendiente de la recta patrón.

b es la ordenada en el origen de dicha recta.

m es el peso de la muestra utilizada en g.

meq = miliequivalentes.

3.4.3 Determinación de Humedad

Se determinó según el Método Oficial de Análisis de la Asociación de Química Analítica Oficial de Estados Unidos (AOAC, Horwitz, 1980). El método consiste básicamente en secar en una estufa a 110°C una cantidad conocida de muestra (**Pi**). El proceso de secado se detiene cuando el peso de la muestra se hace constante (**Pf**), calculándose el porcentaje de humedad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ H} = ((\text{Pi} - \text{Pf}) / \text{Pi}) \times 100$$

3.4.4 Análisis del Lípido Total

Los lípidos totales fueron extraídos según Christie (1982), como modificación del método descrito por Folch et al. (1957). Muestras de 500-1.000 mg de tejido fueron homogeneizadas con cloroformo/metanol (2:1, v/v), conteniendo 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. El solvente orgánico fue evaporado bajo un flujo de nitrógeno y la muestra se mantuvo en el desecador bajo vacío durante 5 horas. El contenido de lípido total fue determinado gravimétricamente.

Los lípidos extraídos fueron redisueltos en cloroformo/metanol (2:1, v/v) conteniendo 0,01% de BHT y guardados hasta su análisis a -20 °C, en viales sellados con atmósfera de nitrógeno.

La cantidad de lípido total presente en la muestra puede expresarse en porcentaje de su peso fresco o más comúnmente, de su peso seco (% p.s.). El valor del porcentaje de lípido en

peso seco se calcula a partir de los datos de lípido en peso fresco (% p.f.) y del contenido en humedad de la muestra (% H), aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ p.s.} = (\% \text{ p.f.} \times 100) / (100 - \% \text{ H})$$

Con el fin de reducir el error analítico, la determinación de los contenidos en humedad y lípido total de cada muestra se realizó por duplicado.

3.4.5 Determinación de las Clases Lipídicas

Las clases lipídicas fueron cuantificadas por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) (“High Performance Thin Layer Chromatography”), mediante doble desarrollo (Olsen y Henderson, 1989). Se usaron placas de sílica gel 60, de 10x10 cm x 0,2 mm de grosor de sílice y sin indicador fluorescente, suministradas por Merck (Darmstadt, Alemania).

Previamente a su uso, las placas se desarrollaron en toda su longitud en una solución de dietil éter para eliminar las impurezas, y luego fueron activadas en una estufa a 110 °C durante media hora. Se aplicaron las muestras de entre 20 y 30 µg de lípidos totales, en la base de la placa, en bandas de unos 2 mm. Para el desarrollo de los lípidos polares se utilizó una mezcla de metil acetato/ isopropanol/ cloroformo/ metanol/ KCl 0,25% (25:25:25:10:9; en volumen). Como mezcla de solventes para los lípidos neutros se usó hexano/ dietil éter/ ácido acético glacial (80:20:2; en volumen).

Las placas se pulverizaron con una solución de acetato cúprico al 3% en ácido ortofosfórico al 8%, se quemaron en una estufa a 160 °C durante 15 minutos, y se cuantificaron en un densitómetro Shimadzu CS-9301 a una longitud de onda de 370 nm.

Para la identificación de cada clase lipídica se usaron estándares proporcionados por SIGMA Co. (St. Louis, MO) y procedentes de huevas de bacalao de composición conocida.

3.4.6 Separación de clases lipídicas para análisis de ácidos grasos

Tanto los triacilglicéridos, la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de la carcasa en el primer experimento, como los triacilglicéridos y la fracción del total de lípidos polares de la piel, en el resto de experiencias, fueron separados a partir de los lípidos totales de dichos tejidos, con el fin de determinar posteriormente su composición en ácidos grasos.

Para ello, se colocó una fracción del lípido total de unos 2 mg de cada muestra en la base de placas de cromatografía en placa fina (TLC) de sílica gel 25, de 20x20 cm x 25 mm de grosor de sílice y sin indicador fluorescente, suministradas por Merck (Darmstadt, Alemania).

En el experimento 1 realizamos un desarrollo de los lípidos polares, a fin de obtener separadamente las clases lipídicas fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Para ello, se realizó un sólo desarrollo de las placas utilizando una mezcla de metil acetato/ isopropanol/ cloroformo/ metanol/ KCl 0,25% (25:25:25:10:9 en volumen).

En todos los experimentos se analizó el perfil de ácidos grasos de los triacilglicéridos, que fueron aislados de las muestras de lípido total, utilizando un desarrollo simple de la TLC con la misma proporción y tipo de mezcla de solventes neutros que en el análisis de clases lipídicas: hexano/ dietil éter/ ácido acético en proporción 80:20:2, en volumen. De este desarrollo, no sólo se aislaron los triacilglicéridos de la parte superior de la placa, sino que en los experimentos 2, 3 y 4, también se obtuvo la fracción de lípidos polares del lípido total,

fracción que queda en la línea de aplicación de la muestra, debido a que la mezcla de solventes neutros no permite arrastrar los lípidos polares.

En todos los casos, para la correcta identificación de las bandas correspondientes a las fracciones lipídicas ya separadas, se utilizó como patrón, un extracto de huevas de bacalao de composición conocida, que fue aplicado en uno de los márgenes de la placa para que tuviera el mismo desarrollo que el resto de las muestras.

La visualización de las clases se realizó bajo luz ultravioleta (365 nm) tras realizar una tinción con 2', 7',- diclorofluoresceína al 0,1 % en metanol del 97% (w/v) (Christie, 1982).

A continuación las bandas de sílice fueron rascadas en tubos de cristal y tratadas para la obtención de sus ácidos grasos como se detalla a continuación.

3.4.7 *Análisis de Ácidos grasos*

A partir de los extractos de lípido total, triacilglicéridos, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y total de lípidos polares, se obtuvieron los ésteres metílicos de ácidos grasos, para su identificación y cuantificación por cromatografía de gases. Este proceso se realizó sometiendo 1-2 mg del extracto correspondiente, a una transmetilación por catálisis ácida, usando una solución de ácido sulfúrico al 1% (v/v) en metanol. Para asegurar la disolución de los lípidos neutros se añadió 1ml de tolueno a cada extracto de lípido total y triacilglicéridos, previamente a la adición de la solución de sulfúrico en metanol. La reacción se llevó a cabo a 50°C durante 16 horas, en atmósfera de nitrógeno. Los ésteres metílicos de ácidos grasos así obtenidos fueron purificados mediante desarrollo simple por cromatografía de capa fina (TLC), con una mezcla de hexano/ dietil éter/ ácido acético (85:15:1 en volumen)

y visualizados bajo luz ultravioleta (365 nm), tras realizar una tinción con 2', 7'-diclorofluoresceína al 0,1 % en metanol del 97% (w/v) (Christie, 1982). Antes de la transmetilación se añadió el ácido graso nonadecanoico (19:0) como estándar interno, en una cantidad equivalente al 5% de los lípidos.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos, ya purificados, fueron extraídos de la sílice con una mezcla de hexano/ dietil éter (1:1) y cuantificados utilizando un cromatógrafo de gases provisto de inyección *on column* y un detector de ionización de llama, bajo las siguientes condiciones operativas:

- Aparato: Shimadzu, modelo GC-14A
- Integrador: Shimadzu, modelo C-R4A
- Columna: capilar de sílice fundida SupelcowaxTM 10 (30 m x 0.32 I.D.) (Supelco, Inc., Bellefonte, USA)
- Gas portador: Helio
- Presión de los gases: He₂ 1 Kg/cm², H₂ 0,55 Kg/cm², Aire 0,55 Kg/cm²
- Temperatura: Inyector 50°C (*on column*), Detector 250°C, Columna según rampa con las siguientes características: temperatura inicial 60°C, tasa de incremento de temperatura 39°C/min hasta alcanzar 150°C, seguida de tasa de incremento de 2,5°C hasta alcanzar temperatura final 230°C, que se mantiene durante 14 minutos.



Fig. 3.4. Imagen del cromatógrafo de gases propiedad de la ULL.

La identificación de cada ácido graso se llevó a cabo mediante la utilización, como patrón, de una mezcla de ácidos grasos procedentes de un aceite de pescado bien caracterizado y dos patrones (PUFA-3, C4-24) proporcionados por la casa comercial BIOSIGMA.

3.5 Análisis Estadísticos

Los datos de la presente memoria son expresados como media \pm desviación estándar. Previamente a su análisis estadístico, fue necesario realizar una transformación a arcsenosino de aquellos datos que estaban expresados como porcentajes.

Se utilizó el test one-sample Kolmogorov-Smirnoff para comprobar que los datos seguían una distribución Normal.

Tanto en el experimento 1, en el que se probaron 2 dietas, como en el experimento 4, en el que se probó una sola dieta, pero se hizo una comparación entre alevines de dos sistemas

de cultivo (tanque y jaula), las diferencias entre las medias fueron establecidas tratando los datos con una t-student.

En los experimentos 2 y 3, en los que los se probaron 6 y 7 tratamientos dietarios, respectivamente, se aplicó una ANOVA, utilizando el test estadístico de Levene. En caso de que las varianzas resultaran homogéneas, el test estadístico utilizado para detectar diferencias entre las medias de datos de los distintos tratamientos dietarios fue el test de comparación múltiple Tukey. Cuando los datos no seguían una distribución normal y/o no existía homogeneidad de varianzas, el test estadístico seleccionado a tal fin, fue el test Kruskal–Wallis, seguido, en su caso, del test de comparación múltiple Games-Howell (Zar, 1984).

En todos los test realizados fue considerado estadísticamente diferente $p < 0,05$.

En todas las experiencias los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS, en sus distintas versiones (versión 12.0, 13.0, SPSS Inc., Chicago, USA.).

3.6 Materiales

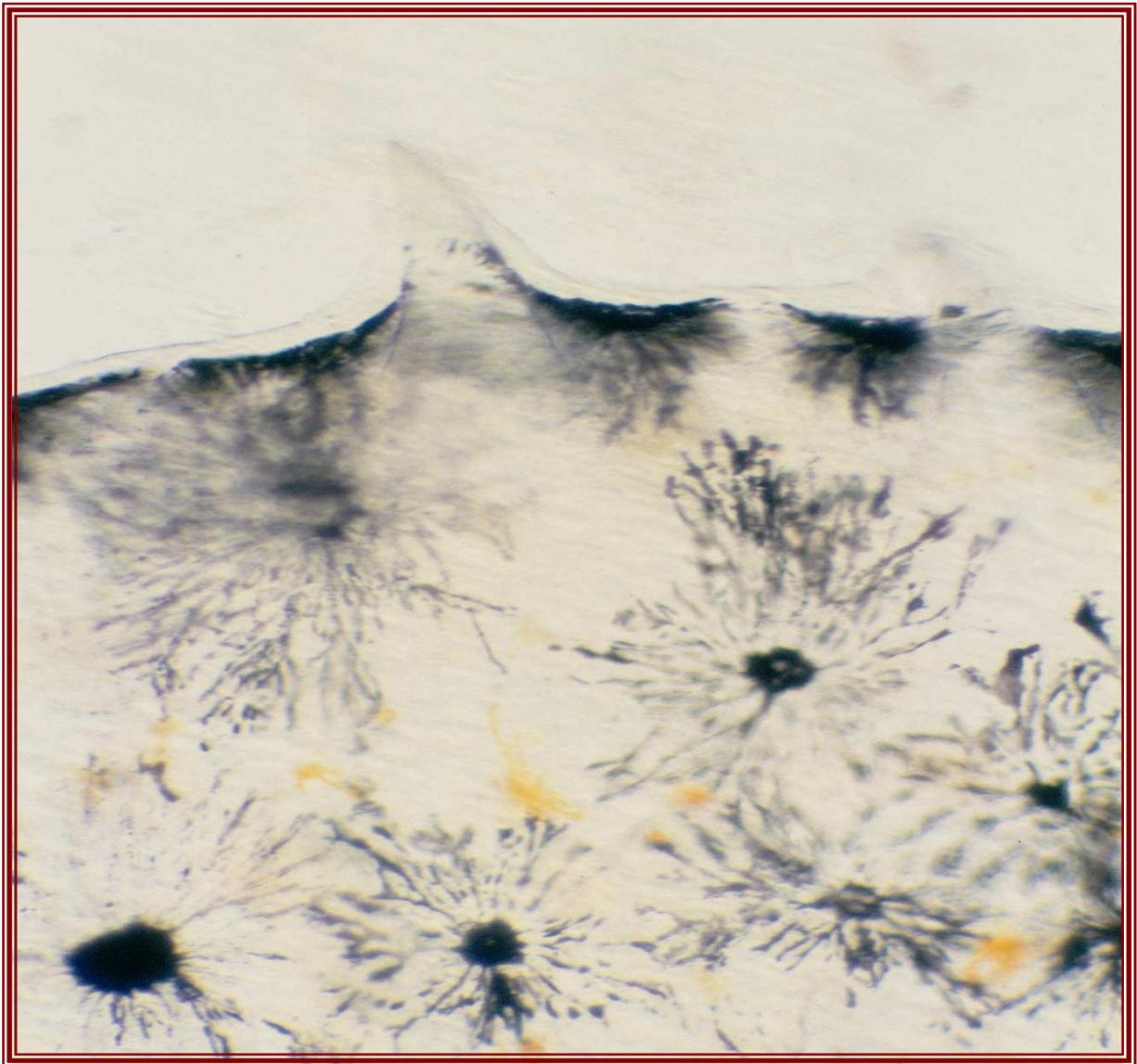
Los solventes empleados en la extracción de carotenoides y lípidos, el desarrollo de clases lipídicas y la separación de ácidos grasos, fueron suministrados por Panreac (España). El n-hexano empleado para resuspender las muestras de carotenoides, así como los solventes empleados para su separación por HPLC, fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). La astaxantina empleada como estándar fue suministrada por Sigma (Biosigma, España).



*Resultados
y
Discusión*

Experimento I

*Evaluación del efecto de la astaxantina esterificada, presente en el camarón (*Plesionika sp.*), en el desarrollo, pigmentación, contenido de carotenoides y composición lipídica de la carcasa del bocinegro.*



4. Resultados y Discusión

4.1 Experimento I

Nociones introductorias

Como hemos señalado anteriormente, la adquisición de coloración en ciertos tejidos de algunas especies de peces es dependiente de la absorción y deposición de carotenoides provenientes de la dieta, ya que como sucede con otros vertebrados, los peces son incapaces de sintetizar estos pigmentos *de novo* (Goodwin, 1984). La eficiencia de absorción de los carotenoides va a ser diferente entre grupos zoológicos. Así, los mamíferos absorben mejor el β -caroteno, mientras que los peces y las aves tienen preferencia por los carotenoides oxigenados. Tal y como se muestra en la siguiente figura, el color del músculo de los salmónidos va a depender de la absorción y deposición de los carotenoides oxigenados como la astaxantina, que se deposita en el músculo en su forma libre no esterificada, y la cantaxantina, siendo la eficiencia de absorción de estos pigmentos dietarios 10 ó 20 veces superior de la que presentan la luteína y la zeaxantina (Torrissen et al., 1989).

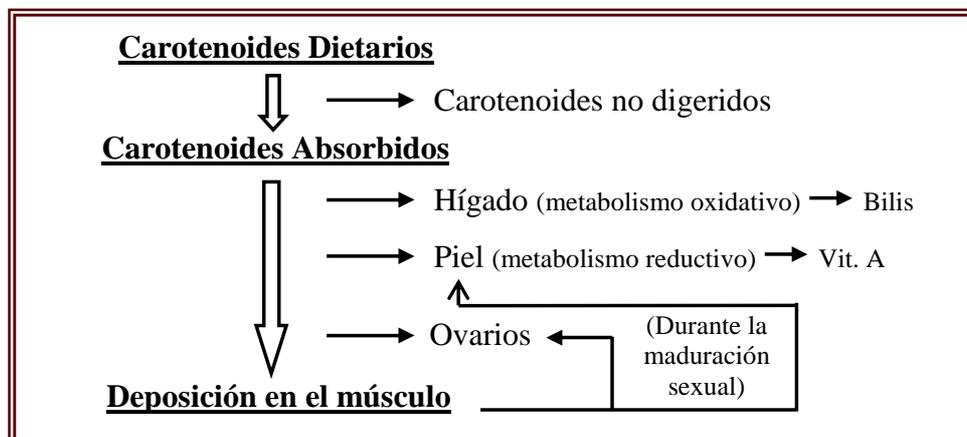


Fig. 4.I.1.- Metabolismo de los carotenoides, astaxantina y cantaxantina en salmónidos (Torrissen et al., 1989).

Durante los primeros años del cultivo de salmón Atlántico y de la trucha arcoiris los crustáceos han sido utilizados tradicionalmente como fuente natural de pigmento. Así, estudios llevados a cabo en la trucha arcoiris por Torrison (1985) han mostrado que es posible producir una pigmentación aceptable del músculo cuando se alimenta esta especie con una dieta suplementada con un 10-20% de harina de camarón durante unos siete meses. De igual modo, el krill (*Euphasia superba* y *E. pacifica*), el copépodo *Calanus finmarchicus*, y el cangrejo rojo (*Pleuroncodes planipes*) han demostrado ser buenas fuentes de carotenoides, capaces de pigmentar el músculo de los salmónidos (Spinelli et al., 1974; Schneider et al., 1979; Torrison y Braekkan, 1979; Torrison, 1985). Tal y como se comentó en el apartado de la Introducción, la fuente de carotenoides más habitual empleada para pigmentar el músculo de salmónidos hoy en día es la astaxantina sintética comercializada como Carophyll® Pink, sola o combinada con la cantaxantina sintética Carophyll® Red.

En el caso de espáridos como la dorada japonesa (*Chrysophrys major*) la pigmentación rojiza de la piel es consecuencia de la deposición de astaxantina (Katayama et al., 1965; Tanaka et al., 1976; Ibrahim et al., 1984; Nakazoe et al., 1984), que se encuentra en la piel en su forma esterificada, unida a ácidos grasos (Nakazoe et al., 1984). De hecho, la coloración de su piel depende directamente de la administración de astaxantina en la dieta, ya que se ha comprobado que son incapaces de transformar otros carotenoides como β -caroteno, luteína, cantaxantina y zeaxantina en este carotenoide (Katayama et al., 1972; Tanaka et al., 1976; Nakazoe et al., 1984).

Crustáceos como la *Squilla oratoria* parecen ser la fuente de la que obtiene la astaxantina la dorada japonesa en el medio natural, tal y como han puesto de manifiesto los estudios de los contenidos estomacales realizados en ejemplares de esta especie (Lorenz, 1998).

Teniendo en cuenta estos aspectos, como objetivo para el primer experimento de la presente memoria se planteó el utilizar una fuente natural de carotenoides similar a la que puede encontrar el bocinegro (*Pagrus pagrus*) en el medio natural, como es el caso del crustáceo decápodo *Plesionika sp.* o camarón, para suplementar la dieta de alevines de esta especie, producidos en cautividad, y determinar el efecto que produce dicha suplementación en la coloración de la piel y el contenido total de carotenoides de la carcasa. Asimismo, conociendo la importancia de la astaxantina para promover el crecimiento y como antioxidante, se determinó el crecimiento, clases lipídicas y contenido en ácidos grasos de la carcasa de los ejemplares sometidos a estudio.

Condiciones experimentales

Se seleccionaron alevines de bocinegro con un peso medio de $2,8 \pm 1,8$ g, que fueron divididos en 6 grupos de (2 tratamientos, 3 réplicas). Cada grupo fue mantenido en un tanque de 3m^3 con un flujo de agua de mar de 30 l/min. El nivel de oxígeno fue mantenido cerca del nivel de saturación mediante aireación continua. La temperatura del agua se mantuvo entre 22,5 y 23,4 °C a lo largo del experimento.

Durante 4 meses, los peces fueron alimentados diariamente con una cantidad de alimento equivalente al 2% de su peso corporal. Tres grupos (B) fueron alimentados con un 100% de pienso comercial para dorada (dieta basal B; Trouw España S.A). Otros tres grupos (B+C) fueron alimentados con un 88% de la misma dieta basal y un 12% de camarón descongelado (*Pleisonika sp.*), para incluir así una fuente de carotenoides en la dieta. El camarón fue suministrado simultáneamente con la dieta basal, no mezclado con ésta.

Cada mes, 60 peces de cada tanque fueron seleccionados y medidos para determinar su peso y longitud, siendo luego retornados a los tanques. Los índices de crecimiento y

supervivencia fueron calculados a lo largo del experimento y los ratios de alimentación ajustados a la biomasa. Asimismo, la mortalidad fue registrada diariamente. La pigmentación de la piel fue determinada de modo visual y mediante fotografías durante los muestreos.

Al final del periodo experimental, esto es, a los 4 meses de alimentación, se sacrificaron 6 peces por tratamiento (2/tanque) mediante shock hipotérmico. Las muestras de carcasa (piel unida al músculo) fueron tomadas e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80 °C hasta su análisis. El resto de los peces fueron utilizados para otros estudios desarrollados paralelamente por el Centro Costero de Canarias.

Los carotenoides de la carcasa fueron extraídos utilizando el método descrito por Barua et al. (1993). A continuación, se realizó una lectura espectrofotométrica (Shimadzu, UV-120-02) en cubeta de cuarzo a 470 nm, utilizando hexano (+BHT) como blanco, tal y como se detalla en el apartado de Material y Métodos de la presente memoria (Pág.45).

La humedad fue determinada mediante el método descrito por Horwitz (1980) a fin de expresar los resultados como peso seco, para la extracción de lípidos se siguió el protocolo descrito por Christie, 1982 (modificación de Folch et al. (1957)) y las clases lipídicas fueron determinadas por el método de Olsen y Henderson (1989), siendo todos estos análisis descritos con más detalle en el apartado de Material y Métodos (Pág. 52-53).

En este experimento se llevó a cabo la separación de las clases lipídicas fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y triacilglicéridos (TAG), siguiendo las pautas marcadas por Olsen y Henderson (1989). Una vez aisladas, se sometieron al protocolo de transmetilación descrito por Christie (1982), para el posterior análisis, mediante cromatografía de gases, de su composición en ácidos grasos. Asimismo, utilizando esta misma técnica, se llevó a cabo la determinación del perfil en ácidos grasos en el lípido total (LT) (Material y Métodos, Pág. 54-57).

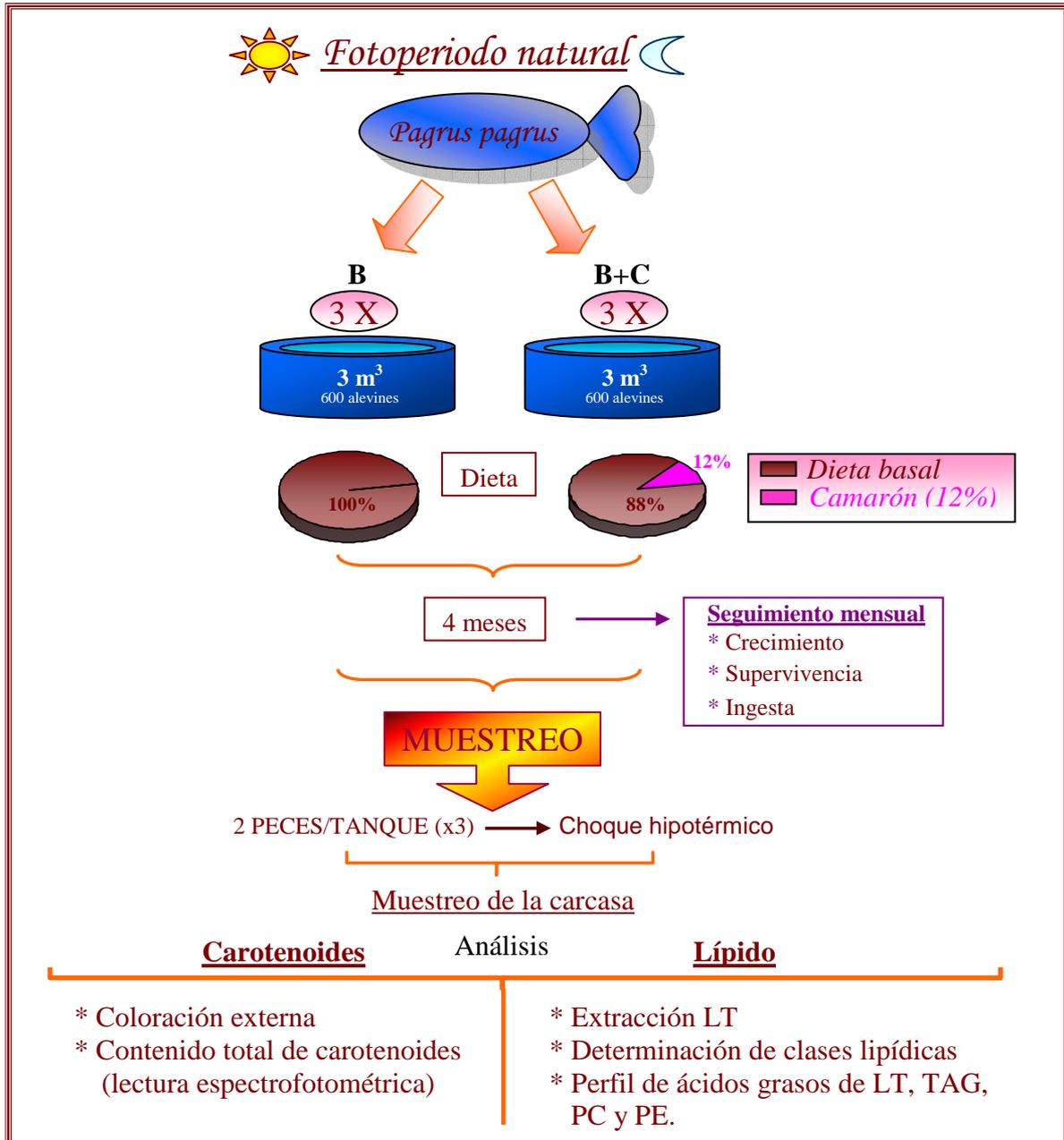


Fig. 4.I.2. Experimento 1. Esquema del diseño experimental. Fuente de astaxantina: camarón (*Plesionika sp.*) descongelado, rico en la forma diéster de este carotenoide.

Resultados y discusión

El contenido de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en peso seco (p.s)) presente en el pienso comercial fue de $17,8 \pm 0,5$ frente a $260,4 \pm 49$ presente en las muestras de camarón analizadas (Fig. 4.I.3, Tabla 4.I.1). En cuanto a la composición en clases lipídicas, se observó que la proporción de lípido polar presente en el camarón fue significativamente superior al de la dieta basal (Fig. 4.I.4, Tabla 4.I.1), sin embargo, en términos absolutos, al tener la dieta basal mayor contenido de LT (p.s) y ser el camarón sólo un 12% del alimento total, estas diferencias de aporte de lípido polar se atenúan sustancialmente.

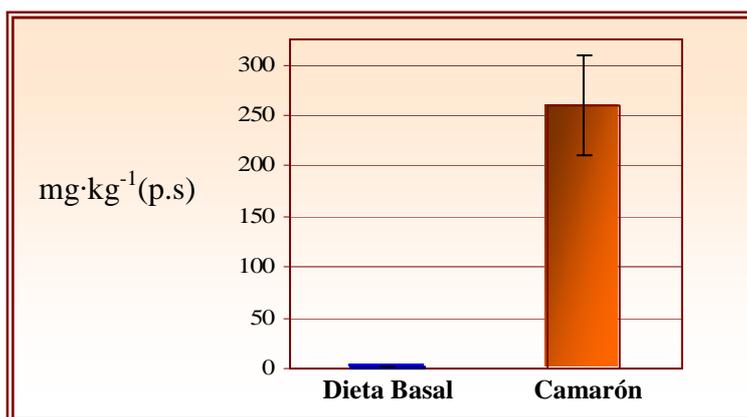


Fig. 4.I.3 Contenido en carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de la dieta comercial y del camarón empleados en el Experimento 1.

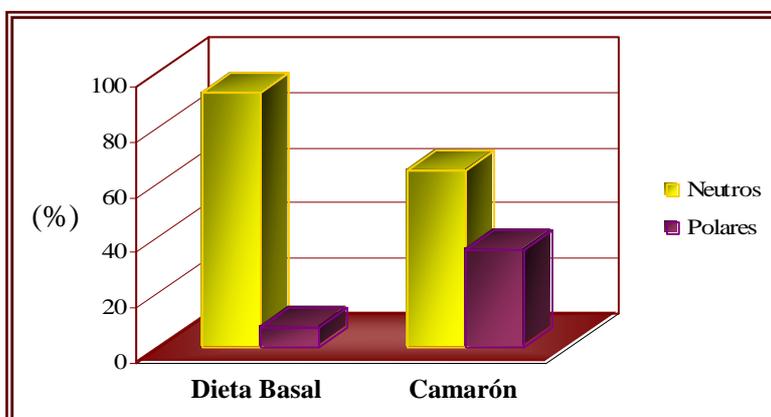


Fig. 4.I.4. Contenido de lípidos neutros y polares de la dieta basal y del camarón (n=3).

Tabla 4.I.1

Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), humedad (%), lípido (% p.s), y composición de clases lipídicas (% del lípido total) de la dieta basal (B) y del camarón (C) (peso húmedo %).

Dieta	B	C
Total de carotenoides	17,8 ± 0,5	260,4 ± 49,0
Humedad	6,9 ± 0,1	74,1 ± 1,4
Lípido Total	16,4 ± 1,1	6,7 ± 0,9
Clases lipídicas		
Esfingomiolina	0,0	0,4 ± 0,1
Fosfatidilcolina	4,9 ± 0,7	16,0 ± 2,4
Fosfatidilserina	0,0	3,8 ± 0,9
Fosfatidilinositol	0,0	1,6 ± 0,3
Fosfatidilglicerol ^a	0,0	1,4 ± 0,3
Fosfatidiletanolamina	2,5 ± 0,8	12,4 ± 0,7
Colesterol	8,7 ± 0,6	22,7 ± 1,3
Ácidos grasos libres	10,0 ± 3,0	11,8 ± 0,5
Triglicéridos	68,9 ± 1,8	26,1 ± 10,7
Ésteres de esteroles y ceras	5,0 ± 0,1	2,1 ± 2,6
Total lípido neutro	92,6 ± 1,1	64,4 ± 3,6
Total lípido polar	7,4 ± 1,1	35,6 ± 3,6

Media ± desviación estándar (n=3). ^a También puede incluir ácido fosfatídico y cardiolipina.

En la figura 4.I.5 y la tabla 4.I.2 se muestra el perfil de ácidos grasos de ambos componentes dietarios. Así, la composición en ácidos grasos del lípido total (LT) de la dieta basal está caracterizada por una mayor proporción de monoenos y menor porcentaje de n-6 y n-3 HUFA en comparación con el camarón, mientras que los niveles de saturados son similares.

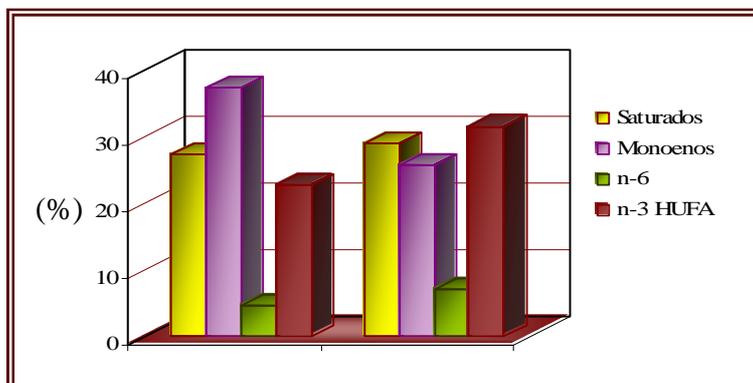


Fig. 4.I.5. Proporciones de los principales grupos de ácidos grasos de la dieta basal y del camarón (n=3).

Tabla 4.I.2

Perfil de ácidos grasos del lípido total de la dieta basal (B) y el camarón (C) (peso húmedo %).

	B	C
14:0	6,2 ± 0,1	2,4 ± 0,2
14:1	0,0	0,4 ± 0,0
15:0	0,5 ± 0,0	1,1 ± 0,2
16:0	17,9 ± 0,2	18,0 ± 0,8
17:0	0,0	1,3 ± 0,2
16:3	0,0	0,9 ± 0,2
18:0	2,4 ± 0,1	6,2 ± 0,4
18:1n-9	15,0 ± 0,1	14,5 ± 1,0
18:1n-7	2,1 ± 0,1	4,4 ± 0,5
18:2n-6	3,5 ± 0,0	2,0 ± 0,6
18:3n-3	1,6 ± 0,0	1,3 ± 0,1
18:4n-3	2,7 ± 0,0	0,5 ± 0,1
20:1 ¹	5,5 ± 0,1	1,3 ± 0,5
20:4 n-6	0,5 ± 0,1	3,5 ± 0,6
20:4n-3	0,6 ± 0,0	0,0
20:5n-3	9,4 ± 0,1	11,8 ± 2,4
22:1 ¹	8,4 ± 0,1	0,0
22:5n-6	0,0	1,0 ± 0,2
22:5n-3	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
22:6n-3	11,5 ± 0,3	18,1 ± 2,2
UK	3,1 ± 0,2	3,9 ± 1,5
Totales		
Saturados	27,3 ± 0,1	29,0 ± 0,9
Monoenos	37,4 ± 0,2	25,7 ± 2,6
n-3	26,9 ± 0,4	33,3 ± 4,2
n-6	4,6 ± 0,1	7,0 ± 0,9
n-3 HUFA	22,6 ± 0,4	31,5 ± 4,4
EPA/DHA ²	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1

Resultados representados como media ± desviación estándar (n=3). Los totales incluyen algunos componentes minoritarios no mostrados.

¹ Contiene los isómeros n-11 y n-9; ² 20:5n-3/22:6n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

A pesar de estas diferencias en cuanto a mayor aporte de carotenoides, lípido polar y n-3 HUFA por parte del camarón, tras 4 meses de alimentación, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a crecimiento y supervivencia se refiere, entre ambos tratamientos dietarios (Tabla 4.I.3).

Tabla 4.I. 3

Peso (g), talla (cm), supervivencia (%), tasa de crecimiento e índice de conversión de los alevines de bocinegro después de 4 meses de alimentación con la dieta basal (B) y la dieta basal suplementada con camarón (B+C).

	Inicial	Final	
		B	B+C
Peso (g)	2,8 ± 1,8	47,4 ± 11,0	50,2 ± 11,8
Talla (cm)	4,6 ± 0,9	12,0 ± 1,1	12,3 ± 1,0
Supervivencia (%)	–	97,2 ± 3,1	95,3 ± 3,5
Tasa de crecimiento	–	2,01 ± 0,0	2,04 ± 0,0
Índice de conversión del alimento	–	2,16 ± 0,1	2,07 ± 0,1

Media ± desviación estándar (60 peces por tratamiento).

Sin embargo, el 100% de los peces alimentados con la dieta suplementada con camarón (B+C) mostraron una coloración rojiza en su piel equiparable a la que presentan los peces en su medio natural (Fig. 4.I.6), a diferencia de los peces alimentados sólo con la dieta basal (B) que mostraron una coloración externa grisácea (Fig. 4.I.7).



Fig. 4.I.6. Fotografía de los alevines de bocinegro alimentados con el tratamiento B+C (88% dieta basal, 12% camarón descongelado).



Fig. 4.I.7. Fotografía de los alevines de bocinegro alimentados con la dieta B (100% dieta basal).

La diferencia de coloración encontrada entre ambos grupos experimentales se correspondía con el contenido total de carotenoides presente en la carcasa. Así, en los peces alimentados con la dieta suplementada con camarón (B+C) el contenido de carotenoides fue de $12,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.s, significativamente superior al encontrado en la carcasa de aquellos alimentados sólo con la dieta basal (B) y que no se pigmentaron adecuadamente ($1,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.s) (Fig. 4.I.8, Tabla 4.I.4).

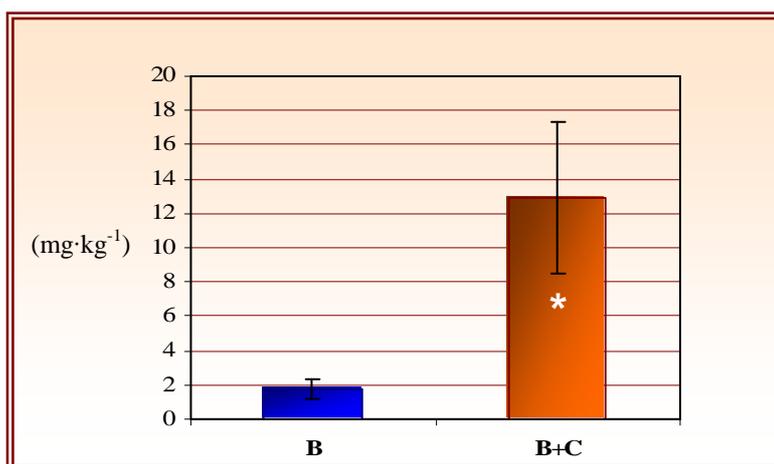


Fig. 4.I.8. Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en las carcasas de los peces alimentados con la dieta basal (B) y con la dieta basal suplementada con camarón (B+C), (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tabla 4.I.4

Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), humedad (%) y lípido (% p.s), y composición de clases lipídicas (% del lípido total) de la carcasa de los peces alimentados con las dietas B y B+C (peso húmedo).

	B	B+C	
Total de carotenoides	1,8 ± 0,6	12,6 ± 4,4	*
Humedad	73,9 ± 0,9	73,4 ± 2,8	
Lípido Total	13,8 ± 1,0	10,2 ± 1,7	*
Clases lipídicas			
Esfingomielina	tr	0,5 ± 0,1	
Fosfatidilcolina	15,8 ± 1,1	19,8 ± 2,5	
Fosfatidilserina	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,6	
Fosfatidilinositol	2,7 ± 0,2	2,9 ± 0,3	
Fosfatidilglicerol ^a	1,0 ± 0,7	1,0 ± 1,2	
Fosfatidiletanolamina	8,0 ± 1,1	9,8 ± 1,5	
Colesterol	9,3 ± 0,3	10,6 ± 1,3	
Ácidos grasos libres	0,0	0,0	
Triglicéridos	59,2 ± 3,1	50,6 ± 7,7	
Ésteres de esteroides y ceras	2,2 ± 0,5	2,8 ± 0,6	
Total lípido neutro	70,7 ± 2,9	64,0 ± 5,8	
Total lípido polar	29,3 ± 2,9	36,0 ± 5,8	

Media ± desviación estándar (n=6). ^a También puede incluir ácido fosfatídico y cardiolipina. * Diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0,05$).

De estos resultados se desprende que los bocinegros alimentados con 88% de dieta basal y 12% de camarón (grupo B+C) fueron capaces de utilizar eficientemente los carotenoides presentes en este crustáceo (*Plesionika sp.*), depositándolos en su piel para adquirir cierto color rojizo propio de esta especie en su medio natural.

El 12% de camarón suministrado en la dieta B+C aportó $31,3 \text{ mg de carotenoide}\cdot\text{kg}^{-1}$ p.s de dieta. Por tanto, un nivel dietario de aproximadamente $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de carotenoides en peso seco de dieta parece ser suficiente para que alevines de 50 g de peso sean capaces de adquirir una pigmentación adecuada.

Como ya se comentó anteriormente, los carotenoides no están sólo asociados con la pigmentación de la piel, sino que poseen otras muchas propiedades biológicas. En este sentido, numerosos estudios han mostrado los efectos positivos de los carotenoides en el

crecimiento de la tilapia del Nilo (Boonyaratpalin y Unprasert, 1989) y del salmón Atlántico (Christiansen et al., 1995), así como en la supervivencia del *Penaeus japonicus* (Negre-Sadargues et al., 1993). En el presente experimento hemos visto, si embargo, que no existen diferencias significativas en cuanto a crecimiento o supervivencia se refiere entre ambos tratamientos (Tabla 4.I.3), lo que sugiere que el aporte dietario de carotenoides no ha supuesto una mejora significativa en cuanto a supervivencia y crecimiento de los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con camarón (B+C).

En cuanto al patrón general de clases lipídicas del lípido total de la carcasa de ambos grupos de peces (B y B+C), hay que destacar el alto porcentaje de triacilglicéridos (TAG) encontrado en ambos, no existiendo diferencias significativas en esta, ni en el resto de las clases lipídicas determinadas a pesar de que el camarón aportara un porcentaje superior de lípidos polares. Esto es debido probablemente a que un 12% de suplemento no es suficiente como para inducir cambios significativos en la composición de clases lipídicas de la carcasa, observándose sólo aumentos sutiles de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), que son particularmente abundantes en el camarón (Tabla 4.I.4).

Teniendo en cuenta la ausencia de estudios realizados en esta especie, en cuanto a composición lipídica se refiere, nuestros resultados no han podido ser contrastados con otros estudios previos.

En lo que respecta al perfil de ácidos grasos del lípido total de la carcasa, tanto en los peces del grupo B como en los del B+C, los porcentajes más elevados los encontramos para los ácidos grasos 16:0, 18:1n-9, 22:6n-3, 20:5n-3, 16:1, 20:1 y 22:1. Estos ácidos grasos representaron un 75,5% y un 74,5% del lípido total, para B y B+C, respectivamente (Fig. 4.I.9a, Tabla 4.I.5).

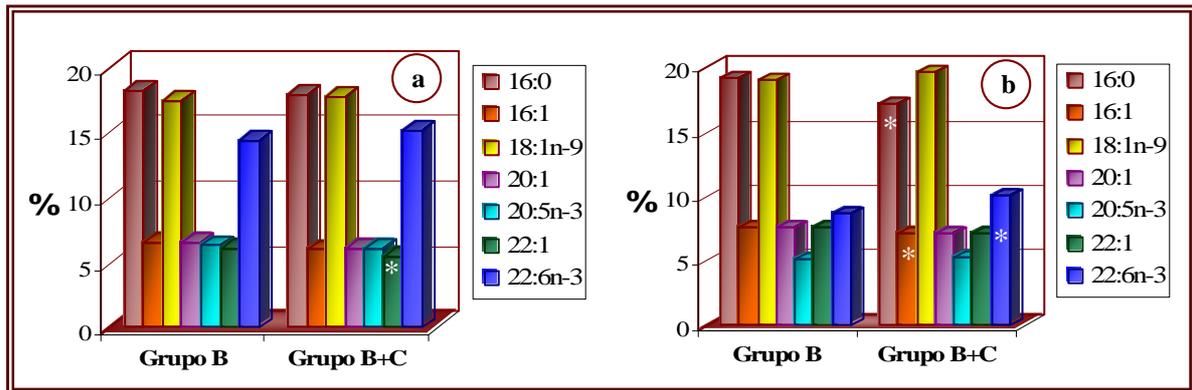


Fig. 4.I.9. Principales ácidos grasos del lípido total (a) y de los triacilglicéridos (b), (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tabla 4.I.5.

Perfil de ácidos grasos del lípido total (LT) (peso húmedo %) de la carcasa de bocinegros alimentados con las dietas B y B+C.

	B	B+C
14:0	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,1
16:0	18,2 ± 0,5	17,9 ± 0,2
16:1 ^a	6,5 ± 0,2	6,0 ± 0,3
18:0	4,1 ± 0,1	4,3 ± 0,3
18:1 n-9	17,5 ± 0,2	17,8 ± 0,8
18:1 n-7	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,0
18:2 n-6	4,5 ± 0,1	5,4 ± 0,1 *
18:3 n-3	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,4
18:4 n-3	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,2
20:1 ^b	6,5 ± 0,1	6,1 ± 0,3
20:4 n-6	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
20:4 n-3	tr	tr
20:5 n-3	6,3 ± 0,5	6,1 ± 0,1
22:1 ^b	6,1 ± 0,2	5,5 ± 0,2 *
22:5 n-6	tr	tr
22:5 n-3	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1
22:6 n-3	14,4 ± 0,8	15,2 ± 1,9
UK.	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,4
Totales		
Saturados	26,8 ± 0,7	26,5 ± 0,3
Monoenos	39,5 ± 0,6	38,4 ± 1,3
n-3	25,0 ± 0,6	25,5 ± 1,3
n-6	5,8 ± 0,1	6,7 ± 0,4 *
n-3 HUFA	22,5 ± 0,6	23,1 ± 1,6
EPA/DHA ^c	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1

Media ± desviación estándar (n=6). Los totales incluyen algunos componentes minoritarios no mostrados. * Diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0,05$). ^a Contiene los isómeros n-9 y n-7; ^b contiene los isómeros n-11 y n-9; ^c 20:5n-3/22:6n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

Al analizar la composición de los triacilglicéridos encontramos un patrón similar al del LT, siendo el ácido graso más representativo el 18:1n-9, seguido de 16:0, 22:6n-3, 16:1, 20:1, 22:1 y 20:5 n-3 (Fig. 4.I.9b, Tabla 4.I.6).

Tabla 4.I.6.

Perfil de ácidos grasos de triacilglicéridos (TAG) (peso húmedo %) de la carcasa de bocinegros alimentados con las dietas B y B+C.

	B	B+C	
14:0	5,0 ± 0,5	4,6 ± 0,1	
16:0	19,2 ± 1,8	17,2 ± 0,2	*
16:1 ^a	7,6 ± 0,1	7,2 ± 0,2	*
18:0	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,2	
18:1 n-9	19,0 ± 0,6	19,6 ± 0,6	
18:1 n-7	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,0	*
18:2 n-6	4,4 ± 0,4	5,5 ± 0,2	*
18:3 n-6	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	
18:3 n-3	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	
18:4 n-3	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2	
20:1 ^b	7,6 ± 0,2	7,2 ± 0,7	
20:4 n-6	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	
20:4 n-3	tr	tr	
20:5 n-3	5,1 ± 1,0	5,3 ± 0,7	
22:1 ^b	7,4 ± 0,4	6,9 ± 0,4	
22:5 n-6	0,0	0,0	
22:5 n-3	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	
22:6 n-3	8,7 ± 0,5	10,1 ± 0,4	*
UK.	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,3	
Totales			
Saturados	29,1 ± 2,7	26,4 ± 0,5	
Monoenos	44,6 ± 0,4	43,9 ± 0,9	
n-3	18,0 ± 2,0	19,9 ± 0,9	
n-6	5,3 ± 0,5	6,6 ± 0,2	*
n-3 HUFA	15,4 ± 1,6	17,0 ± 0,6	
EPA/DHA ^c	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	

Resultados representados como media ± desviación estándar (n=6). Los totales incluyen algunos componentes minoritarios no mostrados. * Diferencia significativa entre tratamientos (p< 0,05). ^a Contiene los isómeros n-9 y n-7; ^b contiene los isómeros n-11 y n-9; ^c 20:5n-3/22:6n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

Tanto en el LT como en los TAG encontramos algunas diferencias puntuales entre tratamientos, en lo que a algunos ácidos grasos se refiere. Así, las proporciones de 22:1 fueron superiores en el LT de los peces alimentados con la dieta B, respecto a los

alimentados con la B+C, lo cual puede explicarse teniendo en cuenta que el camarón aporta muy baja proporción del mismo, teniendo un efecto diluidor de estos ácidos grasos en B+C frente a B (Tabla 4.I.5). Llama la atención sin embargo, el menor porcentaje de 18:2n-6 observado tanto en el LT como en los TAG de los peces alimentados sólo con la dieta basal (B), ya que esto ocurre a pesar de que un 100% de esta dieta aporta mayores niveles de este ácido graso respecto a B+C. Esta diferencia significativa podría explicarse si los carotenoides aportados por el camarón en la dieta B+C estuvieran ejerciendo cierto efecto protector, frente a la peroxidación lipídica de los PUFA, existiendo una pérdida del 18:2n-6 y otros PUFA por oxidación en los ejemplares que sólo fueron alimentados con dieta basal. De hecho, se ha comprobado que un modo de evaluar si ha existido peroxidación lipídica, a parte de la medida directa de los radicales producto de esta reacción, es el evaluar las pérdidas de ácidos grasos insaturados (Halliwell y Chirico, 1993). Por lo tanto, el hecho de que los peces alimentados con un 100% de la dieta B, que recibieron mayores niveles de 18:2n-6 que los alimentados con un 88% de la misma (B+C), presenten menores porcentajes de este ácido graso en el LT y en los TAG de sus carcasas podría estar indicando que ha existido cierta oxidación de ácidos grasos en los primeros. Sin embargo, el que en el LT de la carcasa del tratamiento B, los porcentajes de otros ácidos grasos con mayor número de insaturaciones y, por tanto, más susceptibles a la oxidación, como es el caso del EPA y el DHA, no presenten diferencias significativas entre los tratamientos a pesar de que el camarón podría haber enriquecido en estos ácidos grasos la carcasa de los peces B+C, parece indicar que la diferencia existente en cuanto a porcentaje de 18:2n-6 no se debe a un proceso de peroxidación lipídica. Otra posible explicación podría residir en el hecho de que el camarón aporta mayores proporciones de fosfolípidos, los cuales se relacionan con una mayor digestibilidad de los lípidos ingeridos en la dieta (Coutteau et al., 1997;

Geurden et al., 1998) y ello podría favorecer una mayor absorción y deposición del 18:2n-6, entre otros ácidos grasos, en los peces alimentados con la dieta B+C. Asimismo, el que no exista aumento significativo en los contenidos de EPA y DHA del LT de las carcasas B+C, podría indicar que la dieta basal ha sido bien formulada para cubrir los requerimientos de AGE del pez, protegiéndolo al mismo tiempo de la oxidación mediante la acción de otras vitaminas y antioxidantes que están presentes en la dieta.

Hay que señalar sin embargo, que en los TAG el porcentaje de 22:6n-3 sí fue superior en la carcasa de los peces alimentados con la dieta suplementada con camarón (B+C) (Fig. 4.I.9b, Tabla 4.I.6). Ello podría implicar que, como se ha descrito para otras especies (Ibeas et al., 1996; Rodríguez et al., 1998b; Almansa et al., 1999; Skally y Robin, 2004; Skalli et al., 2006), los triacilglicéridos reflejan en mayor medida el perfil de ácidos grasos de la dieta y en este caso, el perfil del camarón.

En cuanto a la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE), éstas exhibieron un perfil de ácidos grasos característico (Fig 4.I.10, Tabla 4.I.7). Los ácidos grasos más representativos de la PC son 16:0 (32,1–28,3%), seguido por el 22:6n-3 (19,3–24,2%) y el 18:1n-9 (17,3–15,7%). En la PE, las proporciones de 22:6n-3 fueron aún superiores (39,2–46,8%) a las observadas para la PC, pero tanto las del 16:0 (12,3–10,0%) como las del 18:1n-9 (7,9–6,8%) fueron menores.

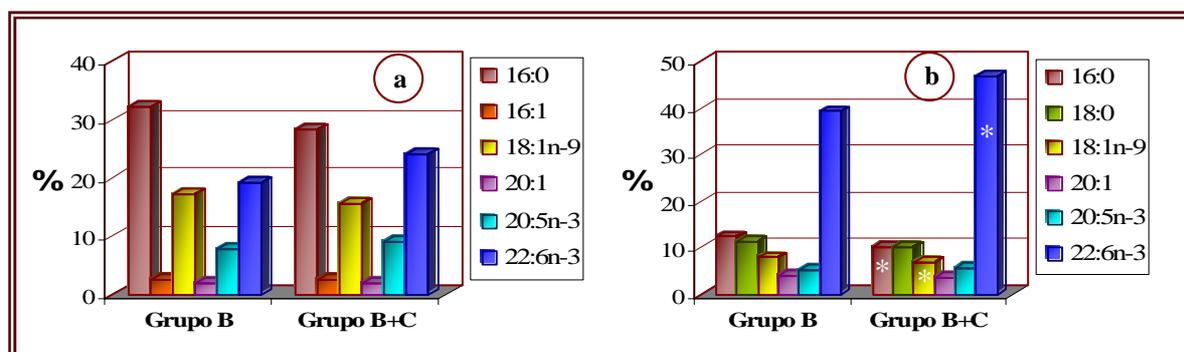


Figura 4.I.10.- Principales ácidos grasos de la fosfatidilcolina (a) y de la fosfatidiletanolamina (b), (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05).

Tabla 4.I.7

Perfil de ácidos grasos de la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) (peso húmedo %) de la carcasa de bocinegros alimentados con las dietas B y B+C.

	Fosfatidilcolina		Fosfatidiletanolamina	
	B	B+C	B	B+C
14:0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,4	0,4 ± 0,1
16:0	32,1 ± 4,7	28,3 ± 0,6	12,3 ± 1,4	10,0 ± 0,7 *
16:1 ^a	2,7 ± 0,3	2,5 ± 0,3	1,9 ± 1,0	1,2 ± 0,3
18:0	2,5 ± 0,8	1,8 ± 0,2	11,3 ± 2,8	10,2 ± 0,5
18:1 n-9	17,3 ± 1,7	15,7 ± 1,6	7,9 ± 1,0	6,8 ± 0,4 *
18:1 n-7	2,6 ± 0,7	2,3 ± 0,3	2,6 ± 0,4	2,4 ± 0,1
18:1 n-5	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
18:2 n-6	5,3 ± 0,3	4,9 ± 0,5	2,7 ± 0,3	2,4 ± 0,3
20:1 ^b	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	4,0 ± 0,7	3,7 ± 0,4
20:4 n-6	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1 *	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2
20:4 n-3	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0
20:5 n-3	7,7 ± 1,9	9,2 ± 0,9	5,2 ± 0,8	5,6 ± 0,6
22:1 ^b	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,5	0,5 ± 0,1 *
22:5 n-6	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1 *	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1
22:5 n-3	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,6	2,2 ± 0,3
22:6 n-3	19,3 ± 4,4	24,2 ± 3,0	39,3 ± 4,4	46,8 ± 2,5 *
UK.	1,0 ± 0,3	1,4 ± 1,7	3,0 ± 1,3	2,3 ± 0,6
Totales				
Saturados	35,8 ± 5,6	31,2 ± 0,6	25,3 ± 3,1	21,3 ± 0,9 *
Monoenos	25,4 ± 2,5	23,1 ± 1,7	17,3 ± 2,5	14,7 ± 1,0 *
n-3	29,3 ± 6,3	36,0 ± 2,6 *	48,2 ± 4,7	55,6 ± 1,7 *
n-6	7,4 ± 0,3	7,3 ± 0,4	5,7 ± 0,5	5,5 ± 0,3
n-3 HUFA	28,5 ± 6,3	35,1 ± 3,0	47,3 ± 4,9	55,1 ± 1,7 *
EPA/DHA ^c	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0

Media ± desviación estándar (n=6). Los totales incluyen algunos componentes minoritarios no mostrados. * Diferencia significativa entre tratamientos (p< 0,05). ^a Contiene los isómeros n-9 y n-7; ^b contiene los isómeros n-11 y n-9; ^c 20:5n-3/22:6n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

El perfil en ácidos grasos de estas clases lipídicas polares mostró algunas diferencias significativas entre tratamientos, siendo los porcentajes de 20:4n-6 y de 22:5n-6 encontrados en la **PC** sutilmente superiores en los peces alimentados con la dieta B+C, comparados con los alimentados con la dieta B, lo que podría ser un reflejo del perfil lipídico del camarón, que presenta también mayores proporciones de estos dos ácidos grasos (Tabla 4.I.7), lo que facilita su incorporación a una fracción que, como es el caso de los lípidos polares, presenta mayor avidez por ácidos grasos de mayor longitud y grado de insaturación, hecho que se ha descrito para distintos tejidos de peces (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003). Este hecho,

contrasta con lo descrito para LT y TAG donde el incremento de los n-6 se debía al 18:2n-6 y no al 20:4n-6 y 22:5n-6. El 18:2n-6 ha sido descrito recientemente como un ácido graso que se incorpora con facilidad en los lípidos de distintos tejidos de los peces. Su incorporación a los lípidos neutros ha sido recientemente descrita para el músculo de algunas especies (Rodríguez et al. 2004; Skalli y Robin, 2004; Robin y Skalli, 2007; Rinchard et al., *En prensa*), mientras que en otros casos se ha observado su afinidad por lípidos polares de tejidos como la branquia y el intestino (Bell et al., 2003b; Dópido, 2006). Tal vez esta acumulación de 18:2n-6 en una u otra fracción lipídica dependerá del nivel de grasa aportado en la dieta y de la necesidad de los lípidos polares de los tejidos por los PUFA. Asimismo, aunque no significativa, en la **PC** se observa una tendencia particular con respecto al 22:6n-3 y al 20:5n-3, que presentan porcentajes superiores en la carcasas B+C, aunque sólo es significativo el aumento del conjunto de los n-3. Una vez más, se trata de un perfil que refleja el del camarón, que es rico en estos ácidos grasos n-3 (Fig. 4.I.10a, Tabla 4.I.7).

En la **PE** sí se observa un porcentaje significativamente superior de 22:6n-3 en los peces alimentados con camarón (B+C), mientras que el 20:5n-3 no sufre un incremento significativo. Sin embargo, el aumento global sí queda reflejado de forma significativa en los n-3 y en los n-3 HUFA (Fig. 4.I.10b, Tabla 4.I.7). En definitiva, una vez más nos encontramos con que la mayor avidez de la fracción polar por los HUFA se ve favorecida por un mayor aporte dietario (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003). Asimismo, en la **PE** de los peces que recibieron la dieta B+C existe una menor incorporación del ácido graso 22:1, debido probablemente a que el camarón no aporta este ácido graso y sí lo hace de forma significativa la dieta basal (Tabla 4.I.7). Igualmente, existe una menor incorporación de 16:0 y de 18:1n-9 en la **PE** de los ejemplares B+C (Fig. 4.I.10b, Tabla 4.I.7), lo cual se traduce en una disminución del total de saturados y de monoenos.

El conjunto de resultados descrito, en cuanto al perfil de ácidos grasos del lípido total y de las distintas clases lipídicas analizadas es similar, en términos generales, a los descritos para otras especies de peces marinos cultivadas, como la lubina (Krajnovic-Ozretic et al., 1994), la dorada (Ibeas et al., 1996) y el rodaballo (Sérot et al., 1998).

Aunque varios estudios recientes sugieren que los carotenoides, incluyendo el β -caroteno, la astaxantina y la cantaxantina, actúan como potentes antioxidantes en modelos de membrana *in vitro* y trabajan sinérgicamente con la vitamina E (Nishigaki et al., 1994; Bell et al., 2000), en nuestro estudio parece que los peces alimentados con una dieta carente de carotenoides (B) no han visto influenciadas de forma negativa sus tasas de crecimiento y supervivencia, ni la composición lipídica corporal, los cambios observados en ciertos ácidos grasos son más bien debidos a la inclusión de un 12% de camarón que posee un perfil diferente al de la dieta basal. Esto sugiere que el papel antioxidante que pudieran haber desarrollado los carotenoides en la dieta B+C frente a la B debe haber sido suplido en esta última, por la presencia de vitamina E y/u otros antioxidantes, habitualmente incluidos en la formulación de las dietas comerciales.

Como conclusión podemos afirmar que cuando se suplementa la dieta de los alevines de bocinegro con un 12% de este crustáceo, que equivale a unos 30 mg de carotenoides \cdot kg⁻¹ en p.s de dieta, éstos son capaces de utilizar eficientemente dichos carotenoides naturales, adquiriendo de esta manera un color rojizo característico de esta especie en su medio natural,. Este porcentaje se encuentra dentro del rango de suplementación recomendado por Torrisen y colaboradores (1989) para salmónidos, los cuales establecen que es necesario emplear entre 10- 25% de suplementación con fuentes derivadas de crustáceos para lograr que el músculo de estas especies adquiera una coloración aceptable para el mercado. De hecho, se ha determinado que en salmónidos el nivel de astaxantina óptimo para lograr dicha pigmentación

está en torno a los $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Rajasingh et al., 2006), sin embargo en otras especies como la dorada japonesa (*Chrysophrys major*) los requerimientos de este carotenoide no han sido establecidos aún, aunque los productores acuícolas establecen un rango de 25-50 mg de astaxantina $\cdot\text{kg}^{-1}$ de dieta como cantidad necesaria para pigmentar su piel. Si bien en el presente experimento, $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de carotenoides procedente de camarón, constituidos fundamentalmente por astaxantina (Meyers, 1994), han sido suficientes para lograr pigmentar la piel de los alevines de bocinegro, aún no se han determinado los requerimientos de astaxantina de esta especie, por lo que es interesante evaluar qué efecto tendría la inclusión de una cantidad inferior o superior de este carotenoide en su dieta. Asimismo, la búsqueda de fuentes alternativas de astaxantina que resulten efectivas a la hora de pigmentar la piel de los ejemplares de esta especie y disminuyan los altos costes que supondría el incluir fuentes derivadas de crustáceos en las dietas de *Pagrus pagrus*, puede despertar igualmente el interés del sector acuícola. Un estudio más exhaustivo de la eficacia de incorporación y el metabolismo de los carotenoides en la piel del bocinegro es uno de los objetivos principales de los siguientes capítulos.

Teniendo en cuenta los resultados de esta primera experiencia, se puede afirmar que la inclusión de $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de “astaxantina” procedente de camarón además de ser efectiva para pigmentar la piel de los ejemplares de cultivo, parece no afectar, al menos de modo general, a la supervivencia, crecimiento ni composición lipídica de los ejemplares de cultivo, si bien resultaría interesante el determinar también algún tipo de indicador directo de la oxidación lipídica para concluir en relación a este último aspecto. Por esta razón, en la siguiente experiencia se ha planteado realizar el análisis de peróxidos directamente en la piel, para establecer cómo afecta a éste parámetro, la inclusión de un antioxidante tan potente como la astaxantina, en la dieta de los alevines de bocinegro mantenidos en cautividad.

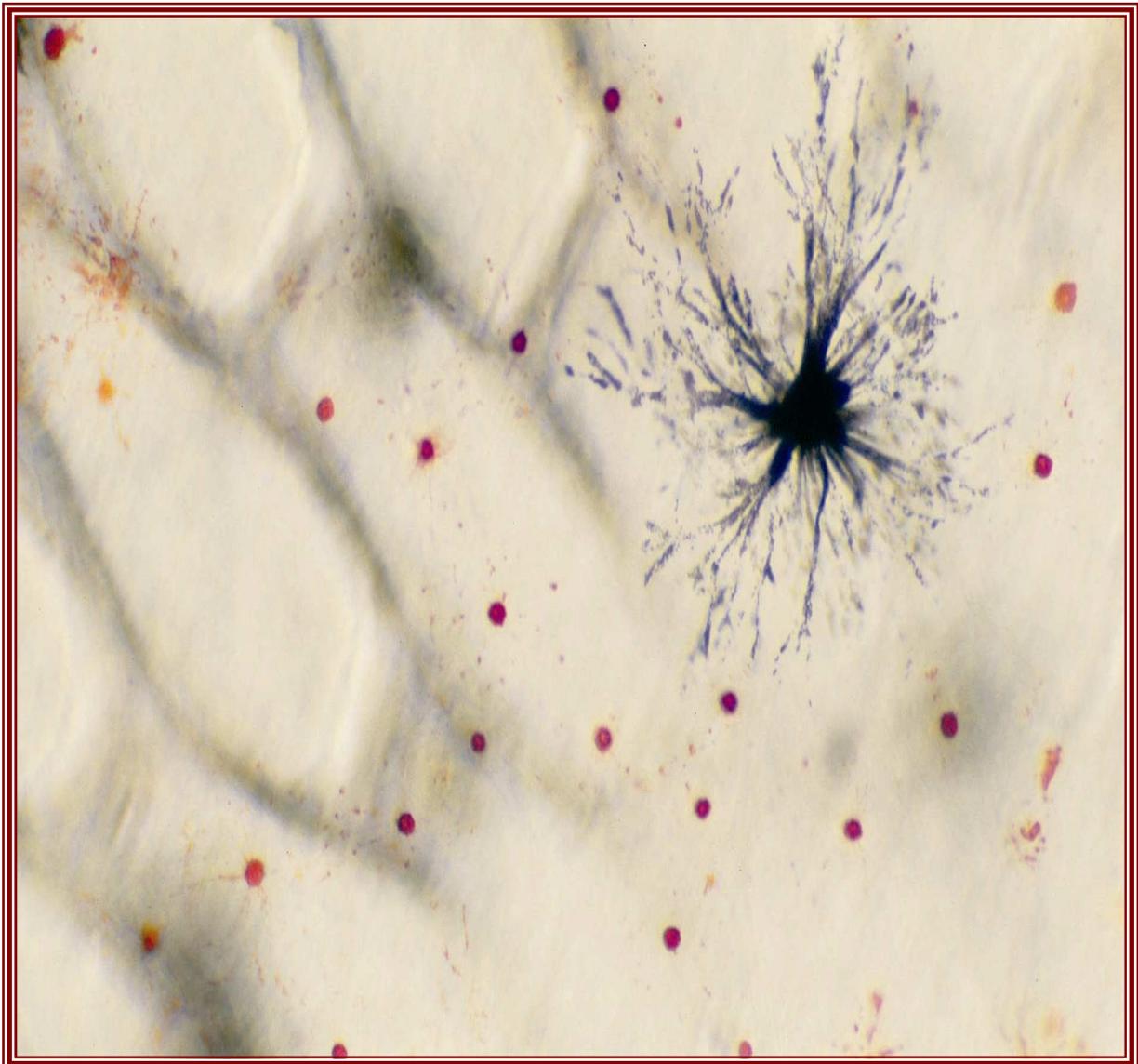
Los resultados del presente experimento han dado lugar a la siguiente publicación científica así como, a la siguiente comunicación en panel presentada en el VIII Congreso Nacional de Acuicultura:

∞ Cejas, J.R.; Almansa, E.; Tejera, N.; Jerez, S.; Bolaños, A. y Lorenzo, A., 2003b. Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. *Aquaculture* 218, 457-469.

∞ Almansa, E.; Cejas, J.R.; Tejera, N.; Santamaría, F.J.; Bolaños, A. y Lorenzo, A. 2001b. “Influencia del aporte de carotenoides en la dieta sobre la pigmentación de la piel en alevines de bocinegro (*Pagrus pagrus*)”. VIII Congreso Nacional de Acuicultura, Santander, 23-25 de Mayo de 2001, pp. 92-93.

Experimento II

Evaluación del efecto de distintas fuentes, formas químicas y niveles dietarios (25 y 50 mg·kg⁻¹ de dieta) de astaxantina, sobre el desarrollo, pigmentación, perfil de carotenoides, nivel de peróxidos y composición lipídica de la piel del bocinegro.



4.2 Experimento II

Nociones introductorias

Los resultados obtenidos en el experimento anterior (Cejas et al., 2003b) indican que el camarón es capaz de suministrar a los alevines de *Pagrus pagrus* los carotenoides necesarios para que éstos pigmenten su piel, adquiriendo una coloración rojiza similar a la que poseen los individuos del medio natural. La eficacia del camarón como fuente de carotenoides para el bocinegro ha sido confirmada por otra experiencia posterior a la realizada por nuestro grupo investigador, en la que se ha utilizado harina de carcasa de camarón para suplementar la dieta de alevines de *Pagrus pagrus*, obteniéndose buenos resultados en cuanto a pigmentación se refiere (Kalinowski et al., 2005). La explicación de esta efectividad reside lógicamente en el hecho de que los crustáceos decápodos son ricos en el carotenoide astaxantina, especialmente en su forma esterificada (Meyers, 1994).

Como ya se comentó anteriormente en esta memoria, son múltiples los ensayos realizados en los que se ha demostrado la eficacia de fuentes de carotenoides derivadas de crustáceos para pigmentar organismos acuícolas. Sin embargo, aunque efectivas, estas fuentes presentan algunas desventajas. Se ha comprobado que las harinas elaboradas con crustáceos pueden resultar demasiado voluminosas, lo que es contraproducente a la hora de compactar las dietas, se deterioran rápidamente (Fujita et al., 1983), contienen altos niveles de minerales que pueden desequilibrar el aporte de estos micronutrientes en la dieta (Ibrahim et al., 1984), y pueden elevar los costes de producción. Además, también se ha observado que los pellets que contienen harinas provenientes de crustáceos poseen una menor consistencia y se dispersan fácilmente por ser más inestables al contacto con el agua, problema que puede

derivar del mayor volumen aportado por la harina y que en definitiva, se traduce en pérdidas de tipo económico para el sector acuícola.

Esta problemática ha generado el que exista una búsqueda de otras fuentes alternativas de carotenoides capaces de promover una buena coloración en la piel del bocinegro. Por ejemplo, Chatzifotis et al. (2005) han estudiado el efecto de tres fuentes de carotenoides; el alga *Haematococcus pluvialis* (rica en el carotenoide astaxantina), el β -caroteno y el licopeno, encontrando que $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina dietaria proveniente del alga producía un efecto positivo en la coloración de la piel de los alevines de bocinegro, efecto que no se daba con las otras dos fuentes de carotenoides.

La efectividad de una fuente de carotenoides, en términos de deposición y pigmentación, es específica de cada especie (Ha et al., 1993). Además no todas las especies muestran los mismos patrones para el metabolismo de los carotenoides. En la trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*), la mayoría de los diésteres de astaxantina son absorbidos y acumulados en sus integumentos manteniendo sus configuraciones, pero, a su vez, pueden ser parcialmente metabolizados a zeaxantina (Katsuyama et al., 1987).

Hemos visto que en el caso del bocinegro la adición de astaxantina en la dieta de los ejemplares de cultivo es capaz de promover una coloración externa rojiza (Cejas et al., 2003b; Chatzifotis et al., 2005; Kalinowski et al., 2005). Además, estudios muy recientes realizados mediante cromatografía en capa fina (TLC) muestran que el extracto de carotenoides de la piel de bocinegros salvajes presenta una elevada proporción de astaxantina diéster (Pavlidis et al., 2006). Sin embargo, no se han realizado análisis de tipo espectral para determinar el perfil de carotenoides presentes en la piel de los ejemplares de cultivo en relación con la forma química en la que estos pigmentos dietarios se depositan, es decir, no existe información de qué es lo que sucede con la astaxantina que ingiere el animal, si existe transformación de este

carotenoide o si se deposita en la misma forma química en que se suministra. Tampoco existen estudios sobre la eficacia de las distintas formas químicas en que puede estar presente la astaxantina dietaria.

Teniendo en cuenta estos aspectos, y sin perder la perspectiva de que es necesario buscar una buena fuente de carotenoides, por ser este un ingrediente que puede elevar considerablemente el coste del pienso, se diseñó el presente experimento.

Así, su objetivo principal ha sido comparar la efectividad de **diferentes fuentes:** natural o sintética y **niveles:** 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de cada una de las fuentes anteriores de astaxantina dietaria, para pigmentar la piel del bocinegro. Para ello no sólo nos centramos en comparar cómo se coloreaban los ejemplares sometidos a estudio, sino también analizamos el contenido total, los perfiles y las formas químicas de los carotenoides depositados finalmente en la piel de estos peces. Esta información es particularmente útil para resolver la cuestión planteada anteriormente, esto es, determinar si la astaxantina dietaria es transformada o por el contrario se deposita directamente en la piel del *Pagrus pagrus*.

Asimismo, teniendo en cuenta que, como sucede en otros peces marinos (Arts et al., 2001; Sargent et al., 2002; Tocher, 2003), los tejidos del bocinegro son ricos en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) como el eicosapentaenoico (EPA) [20:5(n-3)] y el docosahexaenoico (DHA) [22:6(n-3)] (Rueda et al., 1997; Cejas et al., 2003b), y que estos compuestos son particularmente sensibles al ataque de especies reactivas derivadas del metabolismo oxidativo, en el presente estudio también tratamos de evaluar la acción de la astaxantina dietaria frente a la peroxidación lipídica. Es un hecho probado que la astaxantina es capaz de proteger a los PUFAs contra la oxidación y se ha visto que desarrolla un papel protector frente a los efectos de la luz UV (Guerin et al., 2003). Por lo tanto, evaluar el contenido de peróxidos lipídicos presente en la piel de los bocinegros alimentados con los

distintos tratamientos y determinar la composición lipídica de dichas muestras resulta interesante para establecer si la fuente, nivel o forma química de la astaxantina suministrada actúa en mayor o menor grado como antioxidante o si por el contrario este papel protector es asumido por otros antioxidantes presentes en la fórmula basal de la dieta o por los propios mecanismos antioxidantes del pez.

Condiciones experimentales

Alevines de bocinegro (*Pagrus pagrus*) obtenidos en cautividad, con un peso medio de $5,0 \pm 1,1$ g, fueron divididos en 18 grupos de 50 peces cada uno (6 tratamientos, con sus tres réplicas).

Cada grupo de peces fue mantenido en un tanque de 1m^3 (Fig. 4.II.1) con un flujo de agua de mar de 10 l/min, en condiciones de fotoperíodo natural. El nivel de oxígeno fue mantenido cerca del nivel de saturación mediante aireación continua. La temperatura del agua se mantuvo entre 22,5 y 23,4 °C a lo largo del experimento.



Fig 4.II.1. Fotografía de los tanques empleados en el experimento 2.

Cinco de los tratamientos dietarios fueron fabricados por BIOMAR S.A. con arreglo a nuestro diseño experimental; una dieta basal sin carotenoides añadidos (B) y 4 dietas experimentales, con la misma formulación base que la dieta basal pero con diferentes fuentes y niveles de astaxantina añadida. Dos de las dietas experimentales fueron suplementadas con 25 y 50 mg·kg⁻¹ (N25 y N50) de una fuente esterificada natural de astaxantina, el alga *Haematococcus pluvialis*, comercializada como NatuRoseTM (Cyanotech, Hawaii). Las otras dos, fueron suplementadas también con 25 y 50 mg·kg⁻¹ (CP25 y CP50), pero de una fuente de astaxantina libre, sintética, el producto Carophyll[®] Pink (10% CWS, DSM Nutritional Products Ltd). Un sexto tratamiento (B+C), utilizado también en el experimento anterior y compuesto por un 88% de la dieta basal (B) más un 12% de camarón descongelado (*Pleisonika sp.*), fue utilizado como control positivo (Cejas et al., 2003b).

Durante 4 meses los peces fueron alimentados diariamente con una cantidad de dieta que osciló entre el 4,2 y 3% de su peso corporal, ajustando los ratios de alimentación a la biomasa. Cada mes los peces fueron medidos para determinar su peso y longitud, dos parámetros necesarios a la hora de determinar el factor de condición de los ejemplares. Este índice permite definir el correcto crecimiento de los peces, determinando los cambios de condición de los mismos en relación a la edad, sexo y ciclo estacional y puede emplearse como índice de productividad de las masas de agua (Bolger y Connolly, 1989). Los ejemplares a los que se les realizó estas medidas fueron luego retornados a los tanques. La mortalidad fue registrada diariamente, pudiéndose calcular de este modo los índices de supervivencia a lo largo del experimento. La pigmentación de la piel fue también evaluada de modo visual y mediante fotografías.

Al final del periodo experimental, esto es, a los 4 meses de alimentación, se sacrificaron 3 peces de cada tanque (9 por tratamiento) mediante shock hipotérmico.

Teniendo en cuenta que el tejido que se pigmenta en el bocinegro es la piel, en la presente experiencia se procedió a analizar este tejido de forma aislada en lugar de la carcasa, para lo que fue necesario separar la piel del músculo. Una vez obtenidas las muestras de piel necesarias, éstas fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80 °C, hasta la realización de los análisis. Se determinaron los contenidos totales y perfiles de carotenoides, contenidos de astaxantina, nivel de peróxidos lipídicos, así como el nivel de lípido total (LT), perfil de clases lipídicas y ácidos grasos del lípido total, triacilglicéridos (TAG) y del total de lípidos polares (TP). Los protocolos seguidos para llevar a cabo estos análisis han sido ampliamente detallados en el apartado de Material y Métodos de la presente memoria (Pág. 45-57).

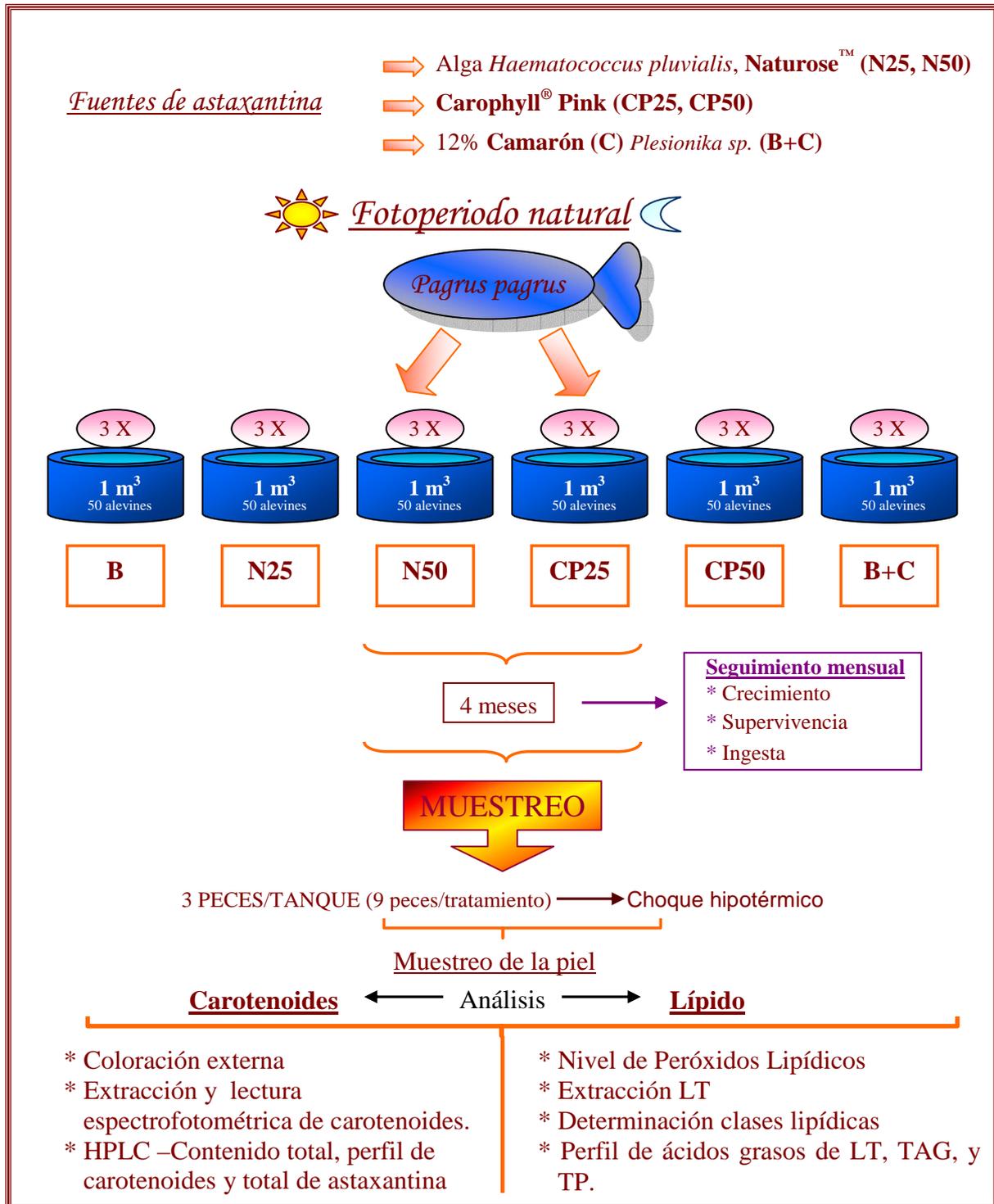


Fig. 4.II.2. Esquema del diseño experimental. Fuentes de astaxantina: Alga *Haematococcus pluvialis* (Naturese™, N) rica en astaxantina monoéster; astaxantina sintética libre Carophyll® Pink (CP); 12% camarón (C) (*Plesionika sp.*) descongelado y rico en astaxantina diéster. B, dieta basal; LT, lípido total; TAG, triacilglicéridos; TP, total de polares.

Resultados y discusión

La composición proximal de la dieta basal utilizada para formular todos los tratamientos dietarios se muestra en la Tabla 4.II.1.

Tabla 4.II.1

Composición proximal (% p.s) de la dieta basal utilizada para formular todos los tratamientos dietarios.

<u>Composición proximal</u>	<u>(%)</u>
Proteína	45
Grasa	23
Carbohidratos	16,4
Ceniza	7,8
Humedad	5,9

p.s: peso seco

Con el fin de confirmar que el nivel de astaxantina de los tratamientos dietarios N25, N50, CP25 y CP50 concordaba con el de la formulación y que estas dietas no habían sufrido deterioro durante su almacenaje, dicho contenido de astaxantina se analizó por HPLC al final del período experimental, siendo en todos los casos los valores determinados algo superiores a los niveles de formulación encargados a la empresa de piensos BIOMAR S.A y no existiendo diferencia significativa entre las distintas fuentes para un mismo nivel de suplementación (Fig 4.II.3, Tabla 4.II.2). Asimismo, se determinaron los contenidos de carotenoides presentes en el camarón empleado para suplementar nuestro control positivo (B+C), siendo el resultado ($271,1 \pm 20,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (p.s)) muy similar al obtenido en nuestra experiencia previa. De este total de carotenoides, $264,6 \pm 12,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (p.s) corresponden a astaxantina, es decir, en torno a un 97,6%. Teniendo en cuenta que el porcentaje de suplementación fue del 12%, el contenido real de astaxantina aportado por la dieta B+C sería $31,7 \pm 1,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (p.s), también muy similar a los $31,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de carotenoides del capítulo anterior. Este valor

justifica, a su vez, los niveles de suplementación experimentales elegidos en este estudio, es decir, 25 y 50 mg·kg⁻¹ (Fig. 4.II.3, Tabla 4.II.2).

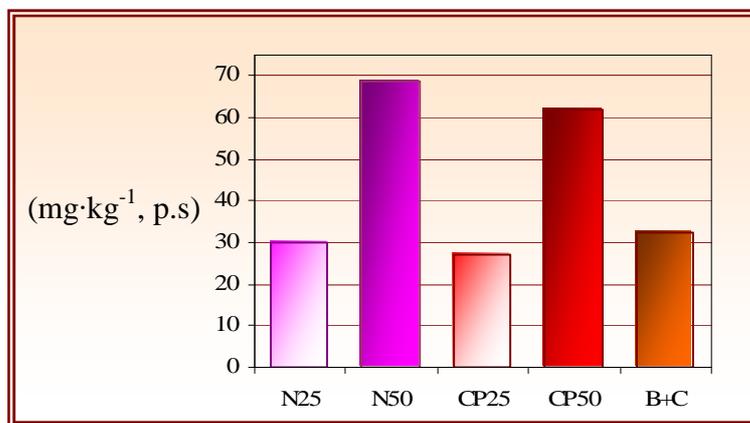


Fig. 4.II.3. Contenido en astaxantina (mg·kg⁻¹) de los tratamientos dietarios empleados.

Tabla 4.II.2

Valores analizados (mg·kg⁻¹) de astaxantina en las dietas suplementadas.

Tratamientos dietarios	N25	N50	CP25	CP50	B+C
Contenido de astaxantina (mg·kg ⁻¹)	29,8	68,6	27,1	61,8	31,7

N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% de dieta basal + 12% de camarón descongelado. El nivel de astaxantina suplementado por la dieta B+C que se representa en esta tabla corresponde al 12% del nivel presente en los camarones empleados en esta dieta (264,6 mg·kg⁻¹ (p.s)).

De los análisis realizados mediante HPLC también se desprende que la mayoría de la astaxantina presente en las dietas suplementadas con Naturose™ se encuentra en su forma química monoéster (Fig. 4.II.4a), mientras que en el camarón utilizado en la dieta B+C predomina la forma diéster (Fig. 4.II.4b). En las dietas suplementadas con Carophyll® Pink, la astaxantina está en un 100% en su forma libre y presenta diferentes isómeros (All-E-astaxantina, 13Z-astaxantina y 9Z-astaxantina) (Fig. 4.II.4c).

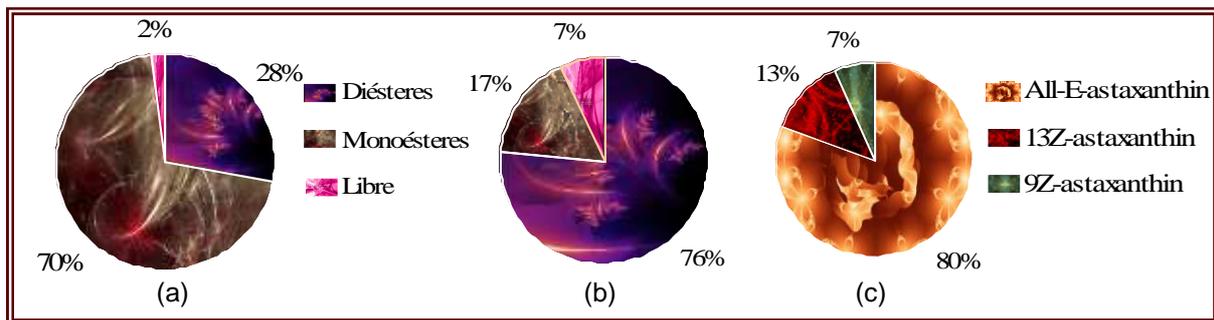


Fig. 4.II.4. Perfil de astaxantina (%) presente en las dietas suplementadas con Naturose™ (a), camarón (b) y Carophyll® Pink (c).

La composición en clases lipídicas de la dieta basal (B) y del camarón suministrado en la dieta B+C está representada en la figura 4.II.5 y en la Tabla 4.II.3, siendo el lípido polar de la dieta basal inferior al aportado por el camarón. Se puede observar además que, como ocurría en el experimento anterior, el camarón es particularmente rico en colesterol.

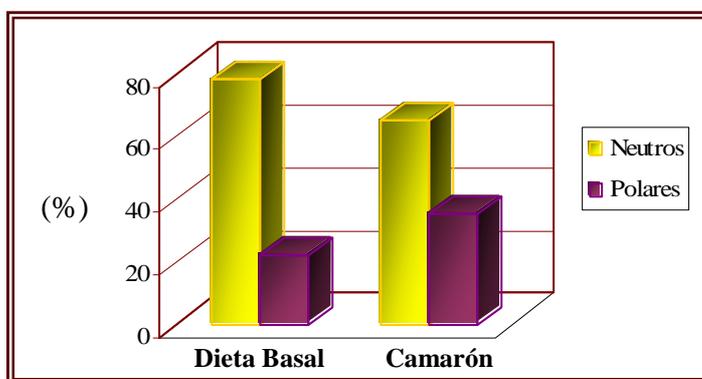


Fig. 4.II.5. Contenidos de lípidos neutros y polares en la dieta basal y el camarón, (n=3).

Tabla 4.II.3

Contenido de lípido total y perfil de clases lipídicas, de la dieta basal (B) y del camarón (C).

	B	C
Lípido Total (% p.s.)	19,5 ± 1,1	5,4 ± 0,4
Clases Lipídicas (% LT)		
Esfingomiélinea	1,0 ± 0,2	0,3 ± 0,1
Fosfatidilcolina	8,5 ± 1,2	16,1 ± 0,1
Fosfatidilserina	1,2 ± 0,0	3,5 ± 0,3
Fosfatidilinositol	1,2 ± 0,0	1,6 ± 0,1
Fosfatidilglicerol ^a	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,4
Fosfatidiletanolamina	8,1 ± 1,5	12,0 ± 0,3
Colesterol	10,8 ± 0,9	25,3 ± 0,5
Ácidos grasos libres	5,5 ± 1,0	11,8 ± 0,5
Triacilglicerol	51,3 ± 0,6	25,2 ± 0,8
Ésteres de esterolés	10,7 ± 0,8	2,5 ± 0,4
Total lípidos neutros	78,3 ± 0,2	64,8 ± 0,8
Total lípidos polares	21,7 ± 0,2	35,2 ± 0,8

Media ± desviación estándar (n=3). ^a También puede incluir ácido fosfatídico y cardiolipina. p.s.: peso seco.

Respecto a la composición en ácidos grasos de la dieta basal empleada en la presente experiencia podemos afirmar que, al igual que en el experimento 1, se caracteriza por presentar una proporción de monoénos superior a la del camarón, y un porcentaje de saturados inferior al suplementado por este crustáceo (Fig. 4.II.6, Tabla 4.II.4). Sin embargo, hay que destacar que tanto las proporciones de n-6 como de n-3 HUFA suministradas por la dieta basal son, en este caso, similares a las aportadas por el camarón (Fig. 4.II.6, Tabla 4.II.4).

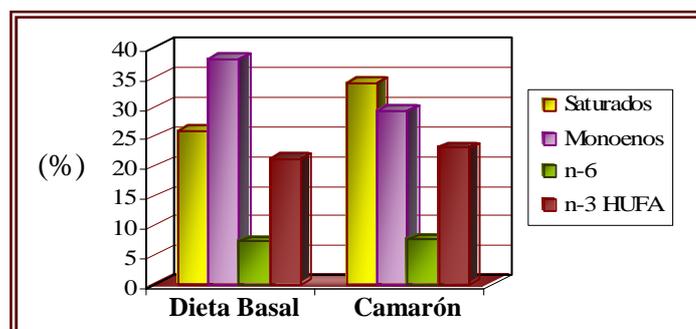


Fig. 4.II.6. Proporciones de los principales grupos de ácidos grasos de la dieta basal y del camarón.

Tabla 4.II.4

Perfil de ácidos grasos del lípido total de la dieta basal (B) y del camarón (C) (peso húmedo %).

	B	C
14:0	5,6 ± 0,3	3,4 ± 0,2
15:0	tr	0,8 ± 0,2
16:0	17,5 ± 0,5	21,0 ± 0,3
16:1 ^a	6,1 ± 0,3	7,1 ± 0,2
17:0	0,5 ± 0,0	1,3 ± 0,0
16:3	0,7 ± 0,4	1,0 ± 0,1
18:0	1,6 ± 0,3	6,3 ± 0,2
18:1 ^a	19,7 ± 0,2	18,4 ± 1,0
18 : 2 n-6	5,4 ± 0,4	2,4 ± 0,5
18:3 n-3	2,1 ± 0,3	0,6 ± 0,1
18:4 n-3	2,6 ± 0,2	tr
20 : 0	0,0	1,1 ± 0,2
20:1 ^b	5,1 ± 0,7	1,7 ± 0,1
20:4 n-6	0,5 ± 0,0	3,0 ± 0,4
20:5 n-3	8,9 ± 0,4	10,6 ± 0,2
22:1 ^b	6,0 ± 1,3	1,1 ± 0,3
21 : 5 n-3	0,0	0,6 ± 0,1
22:5 n-6	0,5 ± 0,4	0,7 ± 0,2
22:5 n-3	tr	0,8 ± 0,1
22:6 n-3	11,1 ± 0,3	10,8 ± 0,5
24:1 n-9	0,9 ± 0,5	0,7 ± 0,2
UK	0,7 ± 0,3	2,9 ± 0,0
Totales		
Saturados	25,8 ± 1,2	33,9 ± 0,1
Monoenos	37,9 ± 3,0	29,3 ± 1,6
n-6	7,3 ± 0,1	7,6 ± 0,7
n-3	26,0 ± 1,9	24,0 ± 1,1
n-3 HUFA	21,2 ± 1,3	23,0 ± 1,0
DHA/EPA ^c	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0

Media ± desviación estándar (n=3). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3–0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

Al igual que en el experimento anterior, el crecimiento y supervivencia de los ejemplares sometidos a estudio no se vieron afectados por la presencia de astaxantina en la dieta (Tabla 4.II.5).

Tabla 4.II.5

Peso (g), talla (cm), supervivencia (%) y factor de condición ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) de los alevines de bocinegro al comienzo de la experiencia y tras 4 meses de alimentación con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.

Dietas	Inicial	B	N25	N50	CP25	CP50	B+C
Peso	5,0 ± 1,0	71,4 ± 3,1	68,7 ± 9,4	70,7 ± 3,1	66,0 ± 1,1	71,3 ± 0,3	78,4 ± 2,7
Talla	5,8 ± 0,4	13,7 ± 0,3	13,5 ± 0,6	13,5 ± 0,2	13,3 ± 0,0	13,6 ± 0,0	14,3 ± 0,5
Supervivencia	100 ± 0,0	79,2 ± 5,8	82,5 ± 2,5	81,5 ± 8,3	73,3 ± 7,2	86,7 ± 1,4	85,8 ± 8,0
Factor de Condición	2,56	2,78	2,79	2,87	2,81	2,83	2,68

Media ± desviación estándar (n° inicial de peces por tratamiento: 150). B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado.

Sin embargo, y una vez más, el 100% de los peces que recibieron un tratamiento con astaxantina, ya fuera sintética (CP25, CP50) o natural (N25, N50, B+C), mostraron una coloración rojiza en su piel, mientras que los peces alimentados con la dieta basal (B) mostraron una piel de coloración grisácea (Fig. 4.II.7). Estos resultados vienen a confirmar que la inclusión de astaxantina en la dieta, cualquiera que sea su origen, promueve la pigmentación rojiza de la piel de los ejemplares de bocinegro (*Pagrus pagrus*) sometidos a experimentación.

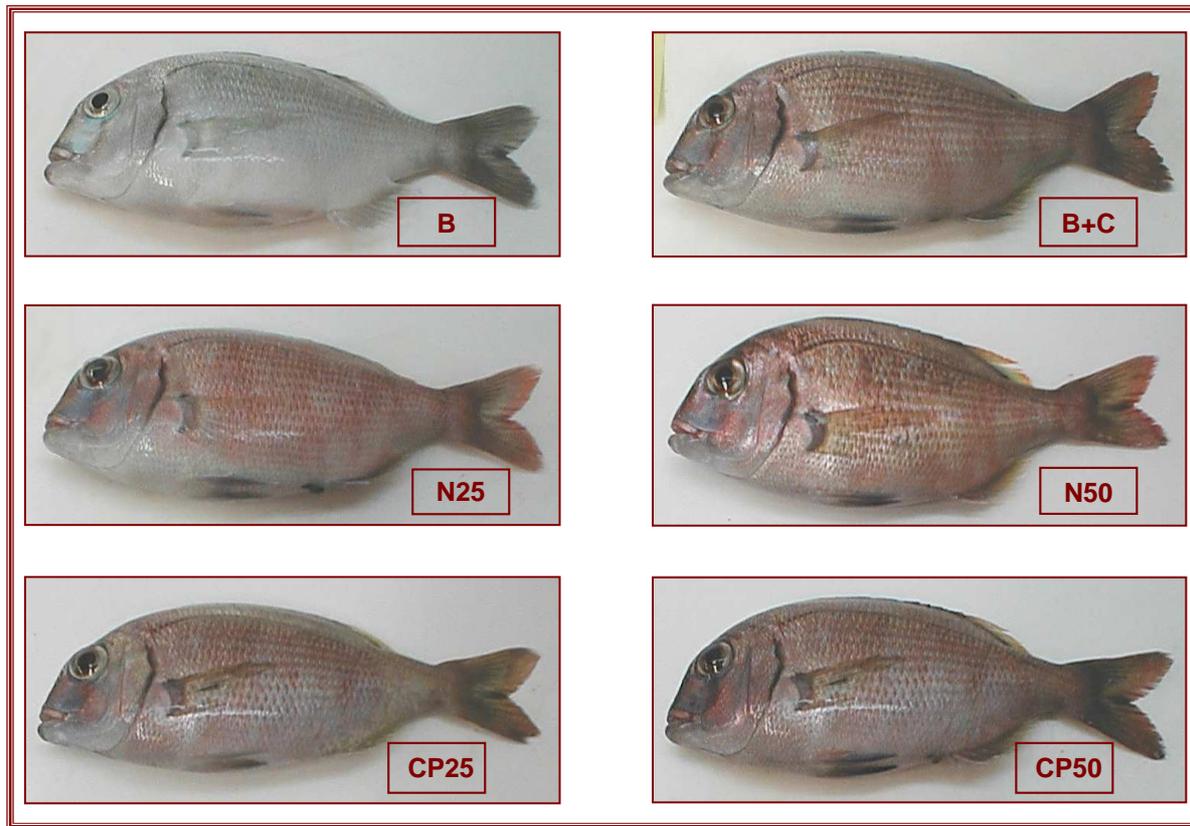


Fig. 4.II.7. Fotografía de los peces de los tratamientos ensayados. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado.

De modo adicional y con el objetivo de realizar un estudio más completo de la pigmentación de los ejemplares de bocinegro, en este experimento determinamos la presencia de cromatóforos en la piel de algunos individuos de los distintos tratamientos. Para ello, se tomaron del tejido dérmico de los ejemplares algunas escamas, cuyos cromatóforos fueron fotografiados utilizando una cámara fotográfica acoplada a un microscopio óptico. De este modo, fue posible observar los melanóforos y, en su caso, los xantóforos conteniendo los carotenoides (Fig. 4.II.8).

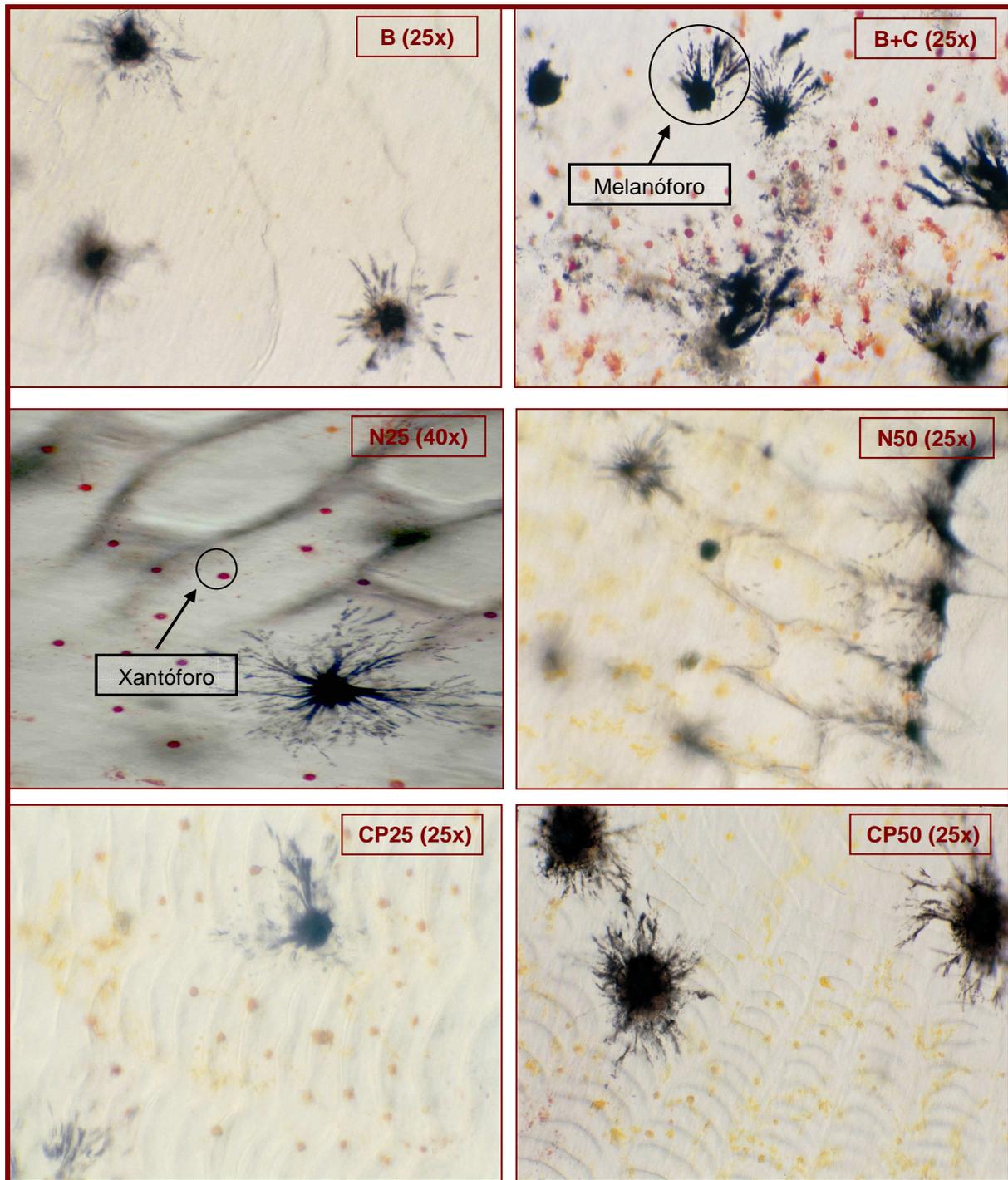


Fig. 4.II.8. Fotografías de escamas de peces alimentados con los distintos tratamientos. Cada imagen está identificada en la esquina superior derecha con el tratamiento al que pertenece y el aumento al que fue tomada en el microscopio óptico. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado.

A pesar de que todas las dietas suplementadas con astaxantina produjeron peces coloreados, la forma esterificada de este carotenoide (N25, N50 y B+C) dio mejor resultado en términos de tonalidad y regularidad en la pigmentación, que la astaxantina libre (CP25 y CP50). Estos últimos tratamientos daban lugar a una coloración más desigual y menos “natural” que la resultante al utilizar astaxantina esterificada. En este sentido, y de forma particular, los tratamientos N25 y B+C fueron los que produjeron un tono rojizo más parecido al que presentan los ejemplares de esta especie en el medio natural (Fig. 4.II.7). Este hecho, se traduce en que la inclusión de 25 mg·kg⁻¹ de astaxantina esterificada en la dieta podría ser suficiente para promover una buena pigmentación en el *Pagrus pagrus*. Teniendo en cuenta el alto coste que supone la inclusión de los carotenoides en las dietas, a nivel comercial, el utilizar menores dosis de éstos se traduce también en un menor coste de producción, lo que reportaría mayores beneficios a los acuicultores.

De los análisis de los extractos de carotenoides realizados mediante HPLC (Fig. 4.II.9, Tabla 4.II.6) se desprende que el contenido total de carotenoide presente en la piel de los peces alimentados con los 5 tratamientos experimentales (N25, N50, CP25, CP50, B+C) (43,7 – 68,8 mg·kg⁻¹) fue muy superior al de los peces alimentados con la dieta basal (B) (7,1 mg·kg⁻¹). Aunque no existieron diferencias significativas entre los contenidos de carotenoides de los peces alimentados con dietas suplementadas con NatuRose™ (N25, N50) y los alimentados con la dieta control positivo (B+C), el grupo de peces alimentados con la dieta N50 presentó valores algo más elevados que los alimentados con la N25 y la B+C (Tabla 4.II.6, Fig. 46). Por otro lado, el contenido total de carotenoides en la piel de los peces alimentados con las dietas suplementadas con Carophyll® Pink (CP25, CP50) fueron similares a aquellos encontrados en los alimentados con NatuRose™ 25 mg·kg⁻¹ (N25) y con

el control positivo (B+C), pero menores que los presentes en los peces alimentados con NatuRose™ 50 (Fig. 4.II.9, Tabla 4.II.6).

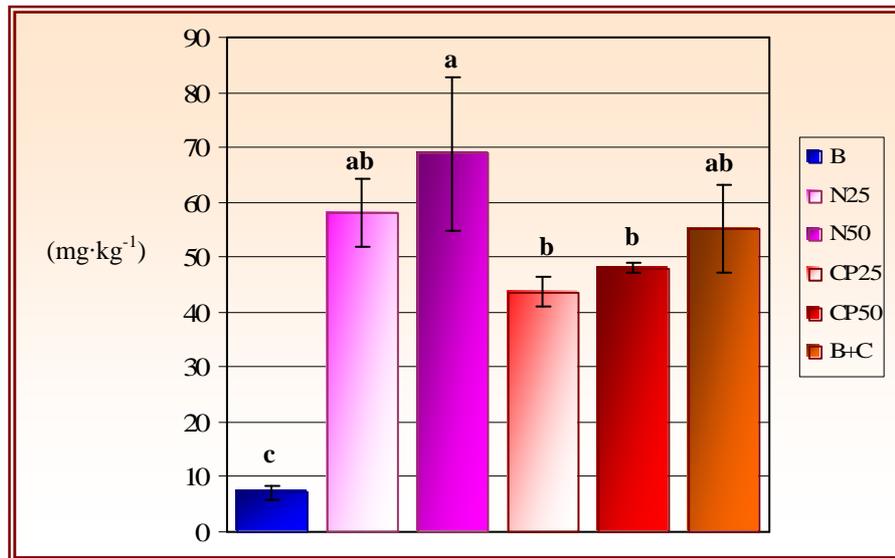


Fig. 4.II.9. Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios: B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tabla 4.II.6

Contenido total de carotenoides y astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), perfil de carotenoides (%) y nivel de peróxidos lipídicos ($\text{meq O}_2\cdot\text{kg}^{-1}$ de lípido) de la piel de peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.

Dietas	B	N25	N50	CP25	CP50	B+C
Total						
Carotenoides	7,1 ± 1,3 c	58,1 ± 6,2 ab	68,8 ± 14,0 a	43,7 ± 2,8 b	48,8 ± 10,4 b	55,2 ± 8,1 ab
Astaxantina	2,8 ± 0,2 c	48,9 ± 4,8 a	46,0 ± 4,4 a	29,1 ± 2,4 b	31,6 ± 4,0 b	41,0 ± 11,1 ab
Carotenoides						
A. diéster	39,0 ± 4,6 b	79,6 ± 8,9 a	63,3 ± 5,3 a	65,2 ± 5,5 a	63,3 ± 8,1 a	71,7 ± 0,9 a
A. monoéster	0,8 ± 0,2 b	4,4 ± 1,8 a	3,4 ± 1,5 ab	1,3 ± 0,4 b	1,4 ± 0,4 b	2,4 ± 0,8 ab
A. libre	0,0 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
T. diéster	60,2 ± 4,7 a	15,8 ± 8,9 c	33,1 ± 6,3 b	33,4 ± 5,9 b	35,1 ± 8,3 b	25,8 ± 1,2 bc
Peróxidos	13,3 ± 0,9 a	10,0 ± 1,1 b	9,9 ± 0,8 b	10,6 ± 1,3 ab	10,5 ± 1,9 ab	9,5 ± 0,5 b

Media ± desviación estándar (n=9). B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado. A, astaxantina; T, tunaxantina. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Los análisis realizados utilizando HPLC también revelaron que el carotenoide predominante en la piel de los peces alimentados con las dietas experimentales fue la **astaxantina**. Los contenidos de este pigmento en los distintos tratamientos siguieron un patrón similar al descrito anteriormente para el contenido total de carotenoides. Así, los contenidos de astaxantina presentes en los peces alimentados con los 5 tratamientos experimentales (N25, N50, CP25, CP50, B+C) fueron significativamente superiores (31,6-48,9 mg·kg⁻¹) a los encontrados en los peces alimentados con la dieta basal (B) carente de carotenoides (2,8 mg·kg⁻¹) (Fig. 4.II.10, Tabla 4.II.6). No se encontraron sin embargo, diferencias significativas entre el contenido de astaxantina presente en la piel de aquellos peces alimentados con NatuRose™ (N25, N50) y el encontrado en la piel de los alimentados con el control positivo (B+C), si bien, en este caso los peces del tratamiento N25 presentaron contenidos algo más elevados de astaxantina que el del tratamiento B+C. Por último, los peces alimentados con Carophyll® Pink (CP25, CP50), presentaron contenidos de astaxantina similares a los de los peces de la dieta control positivo (B+C) y menores a los encontrados en los peces alimentados con las dietas suplementadas con NatuRose™ (N25, N50) (Fig. 4.II.10, Tabla 4.II.6).

El hecho de que tras los 4 meses de estudio no existieran diferencias en cuanto al contenido de astaxantina entre los ejemplares alimentados con las dietas N25 y N50, sugiere que podría existir cierto grado de saturación, por encima del cual el animal no podría depositar más astaxantina en la piel. Estudios llevados a cabo en la dorada australiana (*Pagrus auratus*) presentan resultados similares, así, ejemplares alimentados durante 6 meses con dos dietas con diferente contenido en astaxantina libre (36 y 72mg·Kg⁻¹, Carophyll® Pink), dieron como resultado una coloración rojiza similar para ambos grupos de peces al final del experimento (Booth et al., 2004).

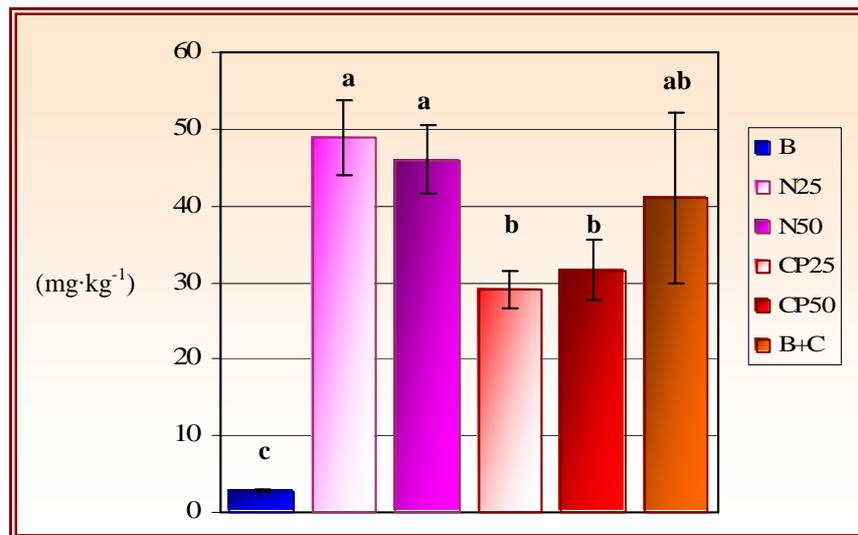


Fig. 4.II.10. Contenido total de astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose[™]; CP25 y CP50, 25 ó $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll[®] Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Si tenemos en cuenta que los peces alimentados con una fuente esterificada de astaxantina (N25, N50, B+C) no sólo presentan una coloración más “natural”, sino que poseen los contenidos más elevados de carotenoide total y astaxantina, los resultados parecen indicar que, a igualdad de aporte dietario de astaxantina, existe una eficiencia metabólica superior de la forma química esterificada comparada con la forma libre de la astaxantina (CP25, CP50). En estudios llevados a cabo en *Chrysophrys major* se han obtenido resultados similares, siendo la pigmentación y el contenido de carotenoides decreciente al utilizar, en este orden, astaxantina diester, astaxantina monoester y astaxantina libre como fuentes de carotenoides en la dieta (Fujita et al., 1983; Nakazoe et al., 1984; Ito et al., 1986; Ha et al., 1993). Esto contrasta con lo observado para salmón y trucha, en los que la forma libre de astaxantina (Carophyll[®] Pink) parece dar mejores resultados que la forma esterificada de este carotenoide en cuanto a coloración del músculo se refiere (Schiedt et al., 1985; Foss et al., 1987; Storebakken et al., 1987). La mayor eficiencia de las fuentes de

astaxantina esterificada en nuestro experimento, podría ser explicada bajo diferentes puntos de vista. Por un lado, cabe esperar una mayor degradación de la astaxantina libre en las dietas por ser ésta más susceptible que la esterificada de ser degradada durante su almacenaje en los 4 meses de experimentación. No obstante, y para confirmar que el aporte de carotenoides era adecuado y no se veía modificado por estos factores, el análisis de las dietas se realizó al final de la experiencia, comprobándose así que la mayor presencia de astaxantina en la piel de los bocinegros alimentados con fuentes esterificadas del carotenoide no era debida a un aporte dietario superior al de las dietas suplementadas con Carophyll® Pink. En segundo lugar, podría tratarse de una mayor solubilidad intestinal y mejor incorporación de los ésteres de astaxantina a las micelas respecto a la forma comercial no esterificada. Así, los ésteres de astaxantina podrían ser más fácilmente disueltos (mayor biodisponibilidad) en los lípidos dietarios, mientras que los productos sintéticos como el Carophyll® Pink, al menos en parte, consisten en nanopartículas y agregados embebidos en una matriz y protegidos por una cubierta de carbohidratos (Horn y Rieger, 2001), que necesita ser disuelta antes de que la astaxantina pueda ser absorbida. Sin embargo, esto no explicaría las diferencias encontradas entre especies.

En general, los carotenoides esterificados necesitan ser hidrolizados antes de ser absorbidos (Furr y Clark, 1997), aunque este hecho no se ha comprobado en el tracto gastrointestinal del bocinegro. De cualquier modo, se ha comprobado que los carotenoides esterificados con ácidos grasos son sustratos de lipasas y de la colesterol esterasa (Breithaupt et al., 2002). Más aún, se ha demostrado que la lipasa aislada de *Candida rugosa* y las enzimas lipolíticas aisladas del intestino de salmón atlántico (*Salmo salar*, L. 1758) y trucha tienen diferente selectividad. Las dos últimas poseen mayor selectividad hacia ácidos grasos altamente insaturados, incluyendo al EPA (20:5 n-3) y DHA (22:6 n-3) comparados con

otros más saturados (Halldorsson y Haraldsson, 2004). De acuerdo con esto, la mayor efectividad de la astaxantina esterificada encontrada en el bocinegro y otros espáridos en cuanto a absorción del tracto gastrointestinal y pigmentación resultante de los tejidos, frente a la menor eficacia de estas fuentes en salmónidos, podría ser explicada por las diferencias encontradas en cuanto a la selectividad de las enzimas lipolíticas por ciertos ácidos grasos y el porcentaje de hidrólisis de los sustratos.

En el caso del bocinegro, los análisis realizados con HPLC revelan que independientemente de la forma química suministrada en la dieta, la forma química en la que esta especie deposita la astaxantina en la piel, es la forma esterificada, predominando por encima de cualquier otra, la forma diéster de este pigmento. Estos resultados están en la misma línea que los obtenidos por Pavlidis et al. (2006) utilizando cromatografía en placa fina (TLC) en ejemplares salvajes de esta misma especie y los obtenidos en *Chrysophrys major*, en que la astaxantina diéster es también el carotenoide prioritario presente en la piel (Nakazoe et al., 1984).

Los análisis de HPLC revelaron también la presencia de un segundo pigmento en la piel de los ejemplares de *Pagrus pagrus* del presente estudio. Se trata de un carotenoide que muestra el espectro de absorción característico de la **tunaxantina** (Fig. II.11), una xantofila predominante en diferentes tejidos de especies de peces marinos como la dorada japonesa, el medregal del Japón, la caballa, el arenque, la sardina y algunas especies de atún (Shahidi et al., 1998). Teniendo en cuenta que en todos los tratamientos experimentales la astaxantina ha sido la única fuente de carotenoide utilizada, la presencia de tunaxantina en la piel del bocinegro alimentado con estas dietas sugiere que la astaxantina ha sido metabolizada a tunaxantina. De hecho, varios estudios sostienen que en algunos peces existe un paso metabólico reductivo desde astaxantina a tunaxantina, vía β -caroteno triol, zeaxantina y 3'-

epiluteína (Matsuno, 1991, 2001; Schiedt, 1998). La presencia de este carotenoide en la piel de ejemplares de *Chrysophrys major* y en los integumentos del medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*) alimentados con astaxantina diéster como única fuente de carotenoides en la dieta (Fujita et al., 1983; Ibrahim et al., 1984; Miki et al., 1985; Ha et al., 1993), refuerza esta hipótesis. Del mismo modo, ejemplares de la trucha alpina o salvelino (*Salvelinus alpinus* (L.)) alimentados con dietas suplementadas con astaxantina libre (Carophyll® Pink), también depositaron tunaxantina en su piel junto a otras xantofilas amarillas como la luteína y la zeaxantina (Bjerkeng et al., 2000).

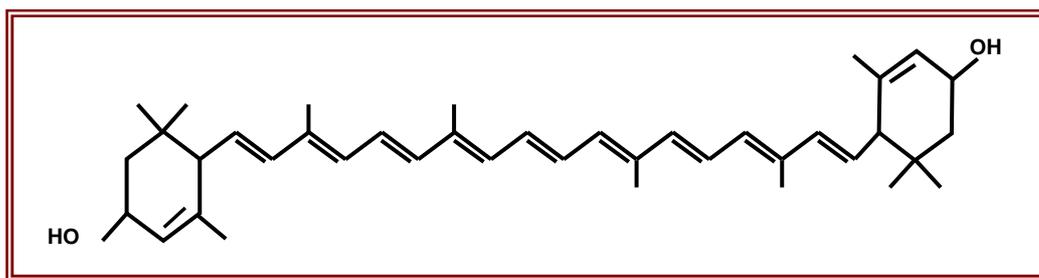


Fig. 4.II.11. Estructura química del carotenoide tunaxantina.

Las proporciones relativas de ésteres de tunaxantina presentes en la piel de los peces alimentados con los 5 tratamientos experimentales fueron siempre menores que las del carotenoide astaxantina, mientras que en la piel de los alimentados con la dieta basal (B), sucede lo contrario, es decir, la proporción de tunaxantina esterificada fue al menos dos veces superior a la de la astaxantina diéster (60% vs 39%) (Fig. 4.II.12, Tabla 4.II.6).

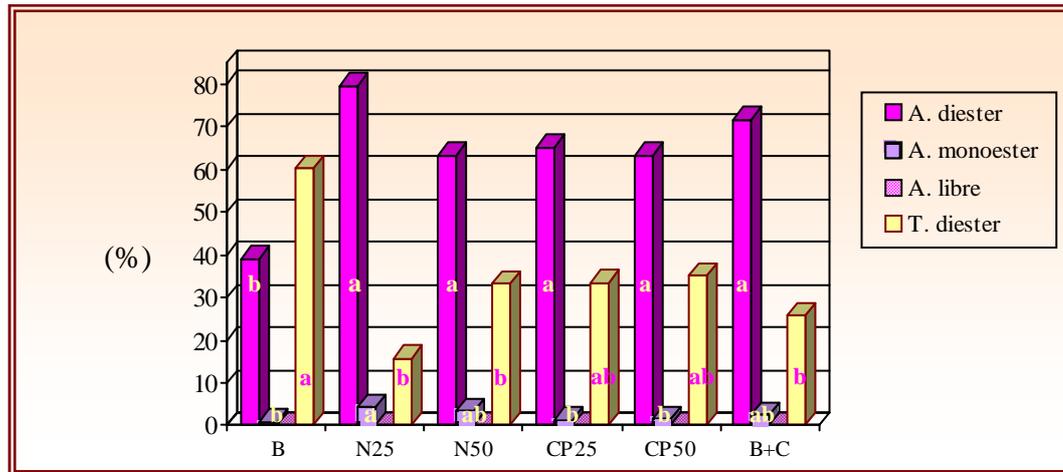


Fig. 4.II.12. Perfil de carotenoides (%) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado, (n=9). A, astaxantina; T, tunaxantina. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05).

Estos resultados, en cuanto a proporciones de tunaxantina en la piel, coinciden con los encontrados por Ha et al. (1993) en *Chrysophrys major*, en un experimento en el que los ejemplares control habían recibido también una dieta carente de astaxantina. Teniendo en cuenta los bajos niveles de carotenoide total presentes en la piel de los peces alimentados con la dieta basal (B) de nuestro experimento (7,1 mg·kg⁻¹), este porcentaje de tunaxantina esterificada (60% del total) se traduciría en un pequeño contenido de este carotenoide en términos absolutos (4,3 mg·kg⁻¹). Las diferencias observadas entre tratamientos en los porcentajes de tunaxantina, probablemente refleja la dinámica entre la dosis ingerida y las transformaciones metabólicas que tienen lugar en el organismo.

Respecto a los análisis de **peróxidos lipídicos** presentes en las muestras de piel de los bocinegros del presente estudio, el nivel más alto de estos compuestos fue observado en los peces alimentados con la dieta basal (B) (13,3 meq O₂·kg⁻¹ de lípido), seguido de los peces alimentados con los tratamientos CP25 (10,6 meq O₂·kg⁻¹ de lípido) y CP50 (10,5 meq O₂·kg⁻¹ de lípido) (Fig. 49, Tabla 4.II.6). Por el contrario, los niveles más bajos de peróxidos lipídicos fueron hallados en los peces alimentados con los tratamientos que contenían las

fuentes naturales esterificadas de astaxantina; N25 (10,0 meq $O_2 \cdot kg^{-1}$ de lípido), N50 (9,9 meq $O_2 \cdot kg^{-1}$ de lípido) y B+C (9,5 meq $O_2 \cdot kg^{-1}$ de lípido) (Fig. 4.II.13, Tabla 4.II.6).

A pesar de esta tendencia, en la que fuentes de astaxantina esterificada parecen generar un nivel de peróxidos menor en la piel, las diferencias encontradas no fueron significativas entre las fuentes de astaxantina esterificada y las fuentes de astaxantina libre.

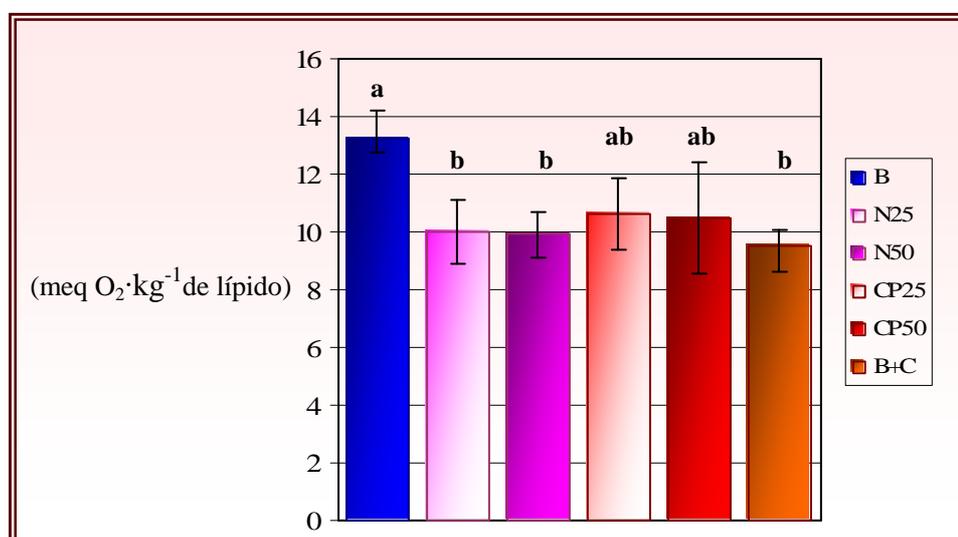


Fig. 4.II.13. Nivel de peróxidos lipídicos (meq $O_2 \cdot kg^{-1}$ de lípido) presente en las muestras de piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal; N25 y N50, 25 ó 50 $mg \cdot kg^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 $mg \cdot kg^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Estudios realizados en modelos de membrana *in vitro* han puesto de manifiesto que los carotenoides son potentes antioxidantes y pueden trabajar sinérgicamente con la vitamina E (Nishigaki et al., 1994; Bell et al., 2000). De hecho, existen multitud de trabajos que han puesto de manifiesto la habilidad que poseen varios de estos compuestos para interferir en las reacciones producto de la acción de los radicales libres, particularmente con aquellas que derivan en la peroxidación lipídica (Tacon, 1981; Burton, 1989; Torrisen, 1989; Liebler, 1993; Krinsky, 1993; Britton, 1995b; Woodall et al., 1997; Martin et al., 1999). Como ya se

ha comentado con anterioridad, esta actividad desarrollada por los carotenoides resulta particularmente importante en peces, que poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en sus tejidos, los cuales pueden ser fácilmente atacados por los radicales libres, dando lugar a peróxidos lipídicos (Halliwell y Chirico, 1993). Nuestros resultados, que evidencian una mayor cantidad de peróxidos en los peces alimentados con la dieta basal carente de carotenoides, son similares a los mostrados por Miki (1991), quien, por su actividad, describió a la astaxantina tanto libre como esterificada, como compuestos “quenchers” contra el oxígeno singlete cuando son empleados *in vivo*.

El estado de oxidación lipídica puede ser determinado no sólo midiendo el nivel de peróxidos lipídicos presentes en las muestras, sino también evaluando otros productos de la peroxidación primaria como son las pérdidas de ácidos grasos insaturados o de la peroxidación secundaria, como puede ser la formación de carbonilos e hidrocarburos gaseosos (Halliwell y Chirico, 1993).

Teniendo en cuenta que el análisis de los peróxidos lipídicos arrojó un resultado interesante a nuestra investigación, se decidió realizar un estudio más profundo del perfil lipídico de las muestras, con el fin de determinar si también éste se había visto influenciado por la adición o no de astaxantina a la dieta.

Con este fin, realizamos el análisis del contenido de lípido total y del perfil de clases lipídicas de dicho lípido, encontrando que en ambos parámetros no se evidenciaban diferencias entre los distintos tratamientos dietarios. Independientemente de la dieta utilizada, los triacilgliceroles (TAG) fueron la clase lipídica predominante entre los lípidos neutros, mientras que la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) presentaron los mayores porcentajes dentro de los lípidos polares, resultados que concuerdan, a su vez, con

los encontrados en el lípido extraído de carcasa analizado en nuestra primera experiencia (Tabla 4.II.7).

Tabla 4.II.7

Contenido de humedad y lípido total, y composición de clases lipídicas de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.

Dietas	B	N25	N50	CP25	CP50	B+C
Humedad (%)	57,8 ± 3,8	57,5 ± 4,1	57,0 ± 2,7	56,0 ± 3,1	55,2 ± 3,5	57,7 ± 3,5
Lípido Total (% p.s)	18,1 ± 1,5	20,1 ± 2,2	21,2 ± 1,6	20,9 ± 2,5	20,2 ± 1,5	18,7 ± 2,7
Clases Lipídicas (% LT)						
Esfingomielina	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,7 ± 0,4	0,5 ± 0,2
Fosfatidilcolina	6,3 ± 1,9	7,1 ± 2,3	5,6 ± 1,1	4,7 ± 1,5	6,0 ± 1,6	6,1 ± 0,7
Fosfatidilserina	1,1 ± 0,5	1,1 ± 0,5	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,2
Fosfatidilinositol	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,2
Fosfatidilglicerol ^a	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,7 ± 0,6	0,5 ± 0,5
Fosfatidiletanolamina	3,5 ± 1,3	3,7 ± 1,3	2,7 ± 0,5	2,4 ± 0,8	3,1 ± 1,1	3,5 ± 0,8
Colesterol	9,6 ± 1,7	8,5 ± 1,5	8,1 ± 0,9	9,0 ± 2,2	8,0 ± 1,4	10,4 ± 0,8
Triacilglicerol	71,7 ± 8,2	69,1 ± 8,8	77,7 ± 3,8	77,4 ± 6,8	73,4 ± 6,2	70,5 ± 2,6
E.E. y ceras	5,7 ± 2,1	8,3 ± 2,5	3,5 ± 1,1	4,3 ± 1,4	6,4 ± 1,4	6,6 ± 1,4
Total lípido neutro	87,0 ± 4,5	85,9 ± 5,0	89,2 ± 2,1	90,7 ± 3,4	87,8 ± 4,1	87,6 ± 2,1
Total lípido polar	13,0 ± 4,5	14,1 ± 5,0	10,8 ± 2,1	9,3 ± 3,4	12,2 ± 4,1	12,4 ± 2,1

Media ± desviación estándar (n=9). ^a Puede incluir también ácido fosfatídico y cardioplipina. p.s.: Peso seco. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose[™]; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll[®] Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado. E.E, ésteres de esteroides.

Teniendo en cuenta que las pérdidas de ácidos grasos insaturados son consideradas como un indicador primario de peroxidación lipídica, en la presente experiencia analizamos el perfil en ácidos grasos tanto del lípido total como de los triacilglicéridos (TAG) y del total de lípidos polares (TP).

Así, los ácidos grasos predominantes en el LT de todas las muestras de piel fueron 18:1, 16:0, seguido por 22:6n-3 (DHA), 16:1, 20:5n-3 (EPA), 22:1, 20:1 y 18:2n-6; los cuales representaron aproximadamente un 70% del lípido total. (Tabla 4.II.8).

Si bien existen diferencias significativas entre algunos ácidos grasos, éstas no parecen seguir ninguna tendencia o patrón específico en relación con la fuente, nivel o forma química de la astaxantina suministrada. Ello podría explicarse si se tiene en cuenta que los valores de los ácidos grasos de cada réplica (n=9) de un mismo tratamiento fueron muy similares entre sí, por lo que pequeñas variaciones entre tratamientos resultaron estadísticamente significativas.

Tabla 4.II.8

Principales ácidos grasos del lípido total (LT) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.

Dietas	B	N25	N50	CP25	CP50	B+C
14:0	3,8 ± 0,3	3,8 ± 0,2	4,0 ± 0,3	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,0
14:1	0,8 ± 0,0 a	0,9 ± 0,1 a	tr b	tr b	tr b	tr b
16:0	18,1 ± 0,1	17,6 ± 0,5	17,2 ± 0,8	17,8 ± 0,6	17,3 ± 0,4	17,5 ± 0,3
16:1 ^a	7,4 ± 0,2 b	7,3 ± 0,2 bc	6,7 ± 0,5 cd	6,4 ± 0,6 d	6,7 ± 0,2 cd	8,2 ± 0,1 a
18:0	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,1
18:1 ^a	22,6 ± 0,9	22,2 ± 1,0	22,0 ± 1,0	22,5 ± 0,9	22,1 ± 0,5	22,0 ± 0,7
18:2 n-6	4,5 ± 0,2	4,6 ± 0,1	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,7 ± 0,1
18:3 n-3	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0
18:4 n-3	1,5 ± 0,2 b	1,6 ± 0,2 ab	1,7 ± 0,1 ab	1,8 ± 0,2 a	1,8 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 ab
20:1 ^b	5,1 ± 0,2 ab	5,0 ± 0,2 b	5,4 ± 0,3 a	5,2 ± 0,2 ab	5,3 ± 0,2 ab	5,0 ± 0,1 ab
20:4 n-6	tr b	0,5 ± 0,0 a	tr ab	0,5 ± 0,0 a	tr ab	tr ab
20:5 n-3	6,5 ± 0,2 b	6,7 ± 0,2 ab	6,5 ± 0,3 b	7,0 ± 0,3 a	6,9 ± 0,2 ab	6,6 ± 0,1 ab
22:1 ^b	5,4 ± 0,2 bc	5,1 ± 0,2 c	5,8 ± 0,2 a	5,6 ± 0,3 ab	5,7 ± 0,2 ab	5,4 ± 0,1 bc
22:5 n-3	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
22:6 n-3	12,8 ± 1,4	13,6 ± 1,3	13,0 ± 0,6	13,0 ± 0,7	13,5 ± 1,0	12,9 ± 0,4
UK	1,3 ± 0,3	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,3	1,3 ± 0,2
Totales						
Saturados	25,1 ± 0,2	24,8 ± 0,4	24,6 ± 1,0	25,1 ± 0,3	24,6 ± 0,4	24,7 ± 0,2
Monoenos	42,4 ± 1,1	41,5 ± 1,0	41,2 ± 1,7	41,2 ± 0,7	41,5 ± 0,4	42,1 ± 0,3
n-6	5,8 ± 0,2 c	6,0 ± 0,1 bc	6,3 ± 0,3 a	6,3 ± 0,1 ab	6,1 ± 0,1 ab	6,0 ± 0,1 bc
n-3	23,9 ± 1,1	25,0 ± 1,0	24,2 ± 0,6	24,8 ± 0,4	25,3 ± 0,8	24,1 ± 0,3
n-3 HUFA	20,7 ± 1,3	21,8 ± 1,2	20,8 ± 0,5	21,3 ± 0,4	21,8 ± 0,8	20,9 ± 0,4
DHA/EPA ^c	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,1

Media ± desviación estándar (n=9). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado. Las medias que llevan letras distintas presentan diferencias significativas (p<0.05).

En todas las muestras de piel, independientemente del tratamiento dietario, los ácidos grasos predominantes de los TAG fueron 18:1, seguido por 16:0, 16:1, 22:6n-3 (DHA),

22:1, 20:1, 14:0 y 20:5n-3 (EPA); los cuales representaron en torno al 80% de esta clase lipídica. No se encontró ninguna diferencia significativa entre la composición de ácidos grasos de los triacilglicéridos (TAG) de la piel de los 6 tratamientos dietarios (Tabla 4.II.9).

Tabla 4.II.9

Principales ácidos grasos de los triacilglicéridos (TAG) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.

Dietas	B	N25	N50	CP25	CP50	B+C
14:0	4,5 ± 0,7	4,8 ± 0,5	5,0 ± 0,6	4,8 ± 0,6	4,9 ± 0,6	4,4 ± 0,4
15:0	tr	tr	tr	tr	0,5 ± 0,2	tr
16:0	19,5 ± 2,2	21,2 ± 3,2	21,2 ± 2,5	20,4 ± 3,0	20,2 ± 2,6	19,5 ± 2,3
16:1 ^a	7,9 ± 0,8	8,2 ± 0,4	8,8 ± 0,8	8,2 ± 0,9	8,7 ± 1,0	8,0 ± 0,6
18:0	3,9 ± 0,4	4,2 ± 0,5	4,2 ± 0,7	3,8 ± 0,3	4,0 ± 0,4	3,8 ± 0,6
18:1 ^a	24,3 ± 2,0	25,0 ± 1,3	25,5 ± 2,4	24,6 ± 2,5	24,5 ± 2,5	24,3 ± 1,7
18:2 n-6	4,5 ± 0,3	4,0 ± 1,0	3,8 ± 1,1	4,4 ± 0,7	4,0 ± 0,8	4,6 ± 0,5
18:3 n-3	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,5	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,4 ± 0,3
18:4 n-3	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,6	0,9 ± 0,5	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,4
20:1 ^b	5,6 ± 0,4	5,8 ± 0,6	6,1 ± 0,6	5,6 ± 0,6	5,8 ± 0,5	5,5 ± 0,5
20:5 n-3	4,5 ± 1,7	3,4 ± 2,2	3,0 ± 2,3	4,0 ± 2,2	3,6 ± 2,0	4,5 ± 1,8
22:1 ^b	6,4 ± 0,4	6,5 ± 0,7	7,0 ± 0,7	6,5 ± 0,7	6,8 ± 0,6	6,3 ± 0,7
22:5 n-3	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,4	tr	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,3
22:6 n-3	7,6 ± 3,6	5,6 ± 3,4	4,8 ± 3,9	6,6 ± 3,8	5,8 ± 3,8	7,3 ± 3,1
UK	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,6	1,8 ± 0,7	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,7	1,7 ± 0,3
Totales						
Saturados	29,0 ± 3,2	31,3 ± 4,3	31,6 ± 4,0	30,0 ± 4,0	30,2 ± 3,6	28,8 ± 3,3
Monoenos	45,7 ± 3,5	47,0 ± 3,2	49,2 ± 4,6	46,5 ± 4,5	47,8 ± 4,3	45,7 ± 3,4
n-6	5,5 ± 0,5	4,8 ± 1,1	4,5 ± 1,3	5,2 ± 1,0	4,8 ± 1,0	5,5 ± 0,7
n-3	16,1 ± 6,3	12,3 ± 7,3	10,6 ± 7,8	14,3 ± 7,4	12,9 ± 7,3	15,8 ± 6,1
n-3 HUFA	13,3 ± 5,7	10,0 ± 6,2	8,6 ± 6,7	11,7 ± 6,4	10,5 ± 6,3	13,0 ± 5,3
DHA/EPA ^c	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,1

Media ± desviación estándar (n=9). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado.

Finalmente, los ácidos grasos más representativos del total de lípidos polares (TP) fueron 16:0, 18:1, seguido por 22:6n-3 (DHA), 18:0 y 20:5n-3 (EPA), representando en torno a un 70% de los ácidos grasos de esta fracción lipídica (Tabla 4.II.10).

A pesar de que se encontraron algunas diferencias significativas entre tratamientos en algunos ácidos grasos concretos de los lípidos polares (18:4n-3 y 20:1), tanto el total de saturados, como de monoenos, n-6 y n-3 fueron iguales entre los seis tratamientos dietarios.

Tabla 4.II.10

Principales ácidos grasos del total de lípido polar (TP) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.

Dietas	B	N25	N50	CP25	CP50	B+C
14:0	1,1 ±0,1	1,2 ±0,3	0,8 ±0,2	0,9 ±0,3	1,0 ±0,1	1,0 ±0,0
16:0	24,0 ±0,6	27,9 ±2,9	25,4 ±2,6	28,3 ±2,8	23,1 ±0,5	26,5 ±2,0
16:1 ^a	3,4 ±0,5	3,7 ±0,3	4,5 ±0,3	3,9 ±0,4	4,1 ±0,9	3,5 ±0,6
18:0	7,9 ±0,4	8,3 ±1,2	8,6 ±0,9	9,2 ±1,3	8,1 ±0,8	8,7 ±0,6
18:1 ^a	16,0 ±1,4	17,1 ±1,7	18,5 ±1,7	16,7 ±2,2	15,8 ±0,6	15,6 ±1,3
18:2 n-6	3,8 ±0,5	3,8 ±0,2	4,1 ±0,2	3,5 ±0,7	3,9 ±0,5	3,6 ±0,6
18:3 n-3	tr	0,6 ±0,1	tr	tr	0,5 ±0,1	tr
18:4 n-3	1,4 ±0,3 a	0,7 ±0,2 ab	0,5 ±0,0 b	1,3 ±0,5 a	1,1 ±0,3 ab	1,2 ±0,2 a
20:1 ^b	1,8 ±0,2 bc	2,0 ±0,0 ab	2,3 ±0,2 a	1,6 ±0,2 c	1,8 ±0,1 bc	1,7 ±0,1 bc
20:4 n-6	2,2 ±0,2	1,7 ±0,5	1,7 ±0,4	1,6 ±0,3	2,0 ±0,4	2,0 ±0,4
20:5 n-3	5,9 ±1,1	4,8 ±2,0	4,9 ±1,2	4,3 ±1,0	5,3 ±0,9	5,1 ±1,1
22:1 ^b	1,3 ±0,4	0,6 ±0,5	1,1 ±0,1	1,0 ±0,2	1,1 ±0,2	1,0 ±0,1
22:5 n-3	1,1 ±0,3	0,9 ±0,1	0,9 ±0,3	0,9 ±0,3	1,0 ±0,1	1,1 ±0,4
22:6 n-3	16,1 ±2,9	14,8 ±5,2	14,8 ±4,2	12,4 ±4,9	17,0 ±2,8	14,2 ±2,8
UK	2,9 ±0,3	2,3 ±0,5	2,4 ±0,7	3,3 ±0,5	2,5 ±0,4	3,4 ±0,8
Totales						
Saturados	34,8 ±1,6	39,0 ±7,0	36,9 ±4,0	40,3 ±4,2	34,1 ±1,6	37,9 ±3,0
Monoenos	25,3 ±2,6	25,9 ±1,5	28,8 ±2,0	26,3 ±2,5	26,1 ±0,8	25,5 ±2,0
n-6	8,0 ±1,2	7,1 ±0,2	7,1 ±0,9	6,7 ±0,3	7,8 ±0,7	7,7 ±0,4
n-3	26,0 ±3,5	22,6 ±8,2	22,0 ±5,9	19,6 ±5,9	26,1 ±3,0	22,7 ±3,5
n-3 HUFA	24,0 ±3,8	21,2 ±8,0	20,9 ±5,8	17,9 ±5,8	24,5 ±3,3	21,0 ±3,7
DHA/EPA ^c	2,8 ±0,5	3,1 ±0,3	3,0 ±0,2	2,8 ±0,6	3,2 ±0,1	2,8 ±0,3

Media ± desviación estándar (n=9). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0.3– 0.5%; 0.0. valores ≤ 0.3%. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado. Las medias que llevan letras distintas presentan diferencias significativas (p<0.05).

Aunque las pérdidas en ácidos grasos insaturados pueden ser consideradas como un signo de peroxidación lipídica cuando se establece un estado de deficiencia en antioxidantes, se ha observado que en algunos tejidos específicos como el hígado puede existir una superproducción compensatoria de PUFAs (Baker y Davies, 1996). En la presente experiencia, no se hallaron signos de pérdidas ni de superproducción de ácidos grasos

insaturados en el LT ni en las fracciones de TAG y TP de la piel. Tal y como se comentó con anterioridad, las pequeñas diferencias encontradas en ciertos ácidos grasos no parecen seguir un patrón específico relacionado con los distintos tratamientos dietarios sino más bien parecen estar relacionadas con la homogeneidad existente en los resultados dentro de un mismo tratamiento.

En definitiva, los resultados sugieren que la astaxantina dietaria no ejerció un papel protector relevante en lo que respecta a la composición en PUFA de la piel de los distintos grupos de peces. Sin embargo, y de acuerdo al nivel de peróxidos, sí parece haber un cierto papel protector de la astaxantina, si bien, los resultados indican que en el grupo de peces alimentados con la dieta basal (B) ese papel antioxidante podría haber sido suplido por la vitamina E y/u otros antioxidantes añadidos en el “premix” durante la formulación del pienso basal (B).

Como conclusión de la presente experiencia se puede afirmar que los alevines de bocinegro son capaces de utilizar eficientemente tanto la astaxantina esterificada de origen natural como la libre de origen sintético añadidas en la dieta, depositándola en su piel en su forma mayoritariamente diester y adquiriendo como resultado un color externo rojizo aceptable respecto al de los ejemplares del medio natural. No obstante, el aporte dietario de la forma esterificada de este carotenoide genera una aparente mayor eficiencia en términos de deposición y de una coloración “más natural” y homogénea de los ejemplares

De los resultados obtenidos también se desprende que los ejemplares objeto de estudio fueron capaces de transformar la astaxantina dietaria en el carotenoide tunaxantina, el cual también se depositó en su piel en su forma ester.

Asimismo, del presente experimento se extrae que una dosis de entre 25- 30 mg·kg⁻¹ de astaxantina en la dieta podría ser suficiente para pigmentar al bocinegro, lo que sugiere el interés de ensayar dosis inferiores del pigmento.

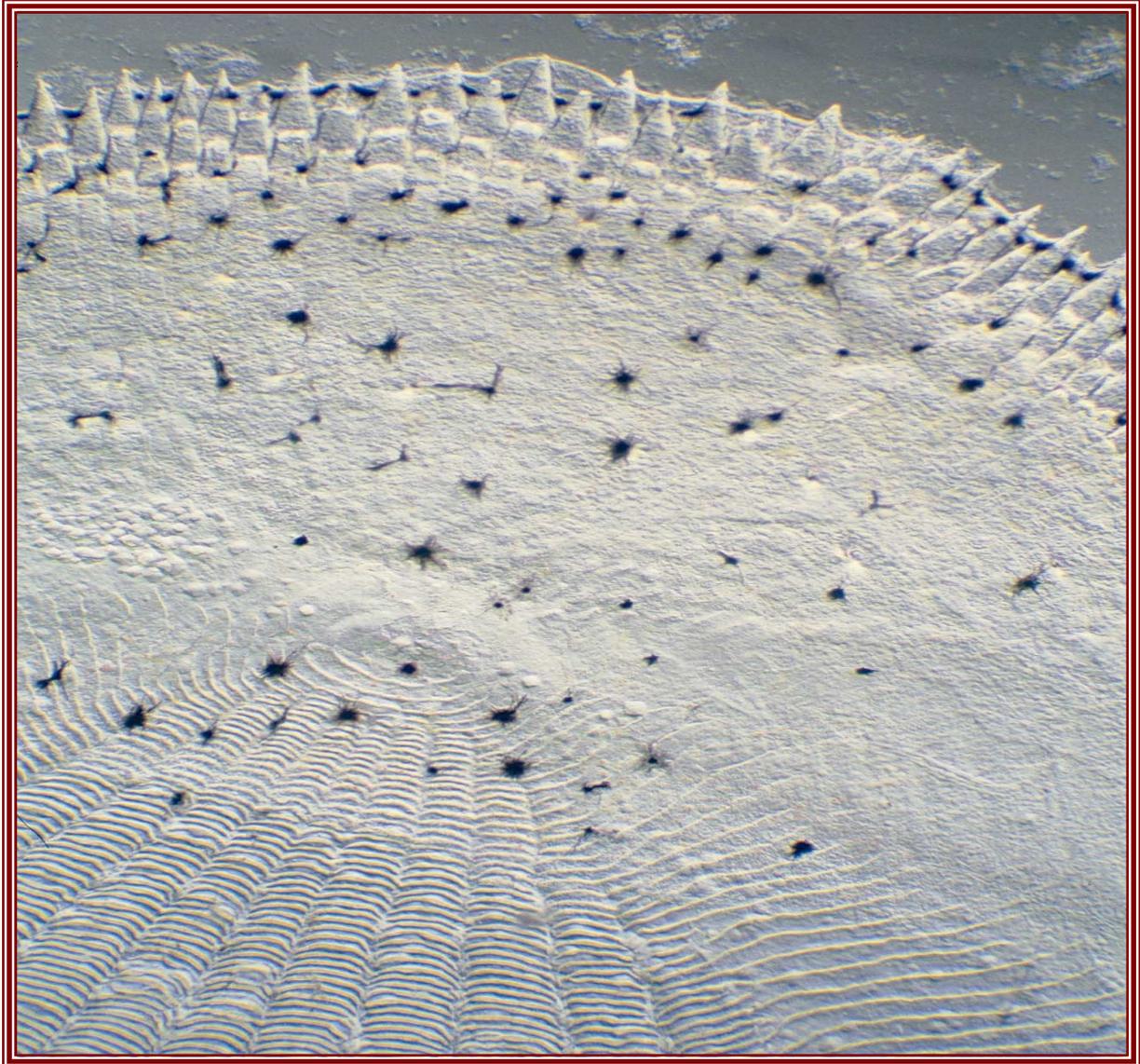
Los resultados de la presente experiencia dietaria han dado lugar a la siguiente publicación científica y comunicación a congreso:

∞ Tejera, N., Cejas, J. R., Rodríguez, C., Bjerkeng, B., Jerez, S., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2007. Pigmentation, carotenoids, lipid peroxides and lipid composition of skin of red porgy (*Pagrus pagrus*) fed diets supplemented with different astaxanthin sources. *Aquaculture* 270, 218–230.

∞ Tejera, N., Cejas, J.R., Jerez, S., Rodríguez, C., Bolaños, A., Santamaría, F.J., Lorenzo, A. 2003. Efecto de diferentes fuentes de astaxantina en la dieta sobre la pigmentación de alevines de bocinegro (*Pagrus pagrus*). Abstracts del IX Congreso Nacional de Acuicultura, 12– 16 Mayo 2003, Cádiz, España. pp. 468-469.

Experimento III

Evaluación del efecto de distintas fuentes, formas químicas y niveles dietarios (8 y 16 mg ·kg⁻¹ de dieta) de astaxantina, así como de distintos niveles dietarios de cantaxantina (25 y 50 mg ·kg⁻¹ de dieta) sobre el desarrollo, pigmentación, perfil de carotenoides, nivel de peróxidos y composición lipídica de la piel del bocinegro.



4.3 Experimento III

Nociones introductorias

Los resultados obtenidos en la experiencia previa indican que suplementar la dieta de alevines de bocinegro con $25\text{-}30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina podría ser suficiente para obtener ejemplares correctamente pigmentados. De dichos resultados también se desprende que podría existir cierto grado de saturación en lo que respecta a la deposición de astaxantina en la piel de los ejemplares sometidos a estudio. Así, los bocinegros alimentados con dietas suplementadas con $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina, depositaron cantidades similares de este carotenoide a la de los que recibieron las dietas suplementadas con $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Considerando el alto coste que supone la inclusión de astaxantina en la dieta, el ajustar la dosis de este carotenoide en las dietas de los ejemplares de cultivo se convierte en una prioridad que debe ser abordada en el ámbito de la investigación para llevar a cabo el cultivo de esta especie a escala comercial. Teniendo en cuenta este aspecto, en el presente experimento se planteó evaluar la efectividad de niveles más bajos (8 y $16\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de las fuentes de **astaxantina** utilizadas en el Experimento II de la presente memoria, es decir, el alga *Haematococcus pluvialis* comercializada como NatuRose™ y la astaxantina sintética comercializada como Carophyll® Pink, para pigmentar de una forma adecuada la piel del bocinegro.

Asimismo, dado que el buscar nuevas fuentes de carotenoides capaces de pigmentar los organismos de cultivo ha suscitado el interés de varios grupos de investigación y empresas productoras de piensos acuícolas, en la presente experiencia se decidió ensayar cómo afectaba la inclusión en la dieta de dos niveles (25 y $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) del carotenoide **cantaxantina**, comercializado como Carophyll® Red, a la hora de pigmentar la piel del bocinegro.

Tal y como se ha realizado en la experiencia previa, en el presente estudio tuvimos en cuenta no sólo la pigmentación adquirida por los ejemplares de cultivo, sino también analizamos el contenido total, los perfiles y las formas químicas de los carotenoides depositados finalmente en la piel de los peces sometidos a estudio.

Del mismo modo, a fin de evaluar cómo afectaba la inclusión del carotenoide cantaxantina y de niveles más bajos del carotenoide astaxantina en las dietas de bocinegro en cuanto a protección frente a la peroxidación lipídica, en el presente estudio también evaluamos el contenido de peróxidos lipídicos y la composición lipídica de la piel de los bocinegros de los distintos tratamientos dietarios.

Condiciones experimentales

Alevines de bocinegro (*Pagrus pagrus*) obtenidos en cautividad, con un peso medio de $8,6 \pm 2,5$ g, fueron divididos en 21 grupos de 50 peces cada uno (7 tratamientos, con tres réplicas).

Cada grupo de peces fue mantenido en un tanque de 1m^3 (Fig. 4.III.1) con un flujo de agua de mar de 10 l/min, en condiciones de fotoperíodo natural. El nivel de oxígeno fue mantenido cerca del nivel de saturación mediante aireación continua. La temperatura del agua se mantuvo entre 21,9 y 24,5 °C a lo largo del experimento.



Fig. 4.III.1. Fotografía de algunos de los tanques empleados en el experimento 3.

Siete tratamientos dietarios fueron fabricados por BIOMAR S.A de acuerdo a nuestro diseño experimental. Una dieta basal sin carotenoides añadidos (**B**) y 6 dietas experimentales, con la misma formulación base que la dieta basal pero con diferentes fuentes y niveles de carotenoide añadido. Dos de las dietas experimentales fueron suplementadas con 8 y 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (**N8** y **N16**) de la fuente esterificada natural de astaxantina, el alga *Haematococcus pluvialis* comercializada como **NatuRose**[™] (Cyanotech, Hawaii) y otras dos dietas fueron suplementadas también con 8 y 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (**CP8** y **CP16**), pero de una fuente de astaxantina libre sintética, el producto **Carophyll**[®] **Pink** (Carophyll[®] Pink 10% CWS, DSM Nutritional Products Ltd). Otros dos tratamientos adicionales fueron formulados suplementando la dieta comercial con 25 y 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (**CR25** y **CR50**) de una fuente de cantaxantina sintética, el producto **Carophyll**[®] **Red** (Carophyll[®] Red 10%, DSM Nutritional Products Ltd).

Al igual que en el experimento previo, durante 4 meses los peces fueron alimentados diariamente con una cantidad de dieta equivalente al 4,2 - 3% de su peso corporal, ajustando

las tasas de alimentación a la biomasa. Cada mes los peces fueron medidos para determinar su peso y longitud, dos parámetros necesarios para determinar el factor de condición de los ejemplares. Los peces a los que se les realizó estas medidas fueron luego retornados a los tanques. La mortalidad fue registrada diariamente, pudiéndose calcular, de este modo, los índices supervivencia a lo largo del experimento. La pigmentación de la piel fue también determinada de modo visual y mediante fotografías.

Al final del periodo experimental, esto es, a los 4 meses de alimentación, se sacrificaron 3 peces de cada tanque mediante shock hipotérmico (9 por tratamiento). Al igual que en la experiencia anterior, en el presente experimento se procedió a analizar los contenidos totales y perfiles de carotenoides, y los contenidos de astaxantina de la piel. Del mismo modo, se determinó el nivel de peróxidos lipídicos, así como la composición lipídica corporal, esto es, el contenido de lípido total, la composición en clases lipídicas de dicho lípido y el perfil de ácidos grasos del lípido total (LT), de los triacilglicéridos (TAG) y del total del lípido polar (TP). Los protocolos seguidos para llevar a cabo estos análisis han sido ampliamente detallados en el apartado de Material y Métodos de la presente memoria (Pág. 45-57).

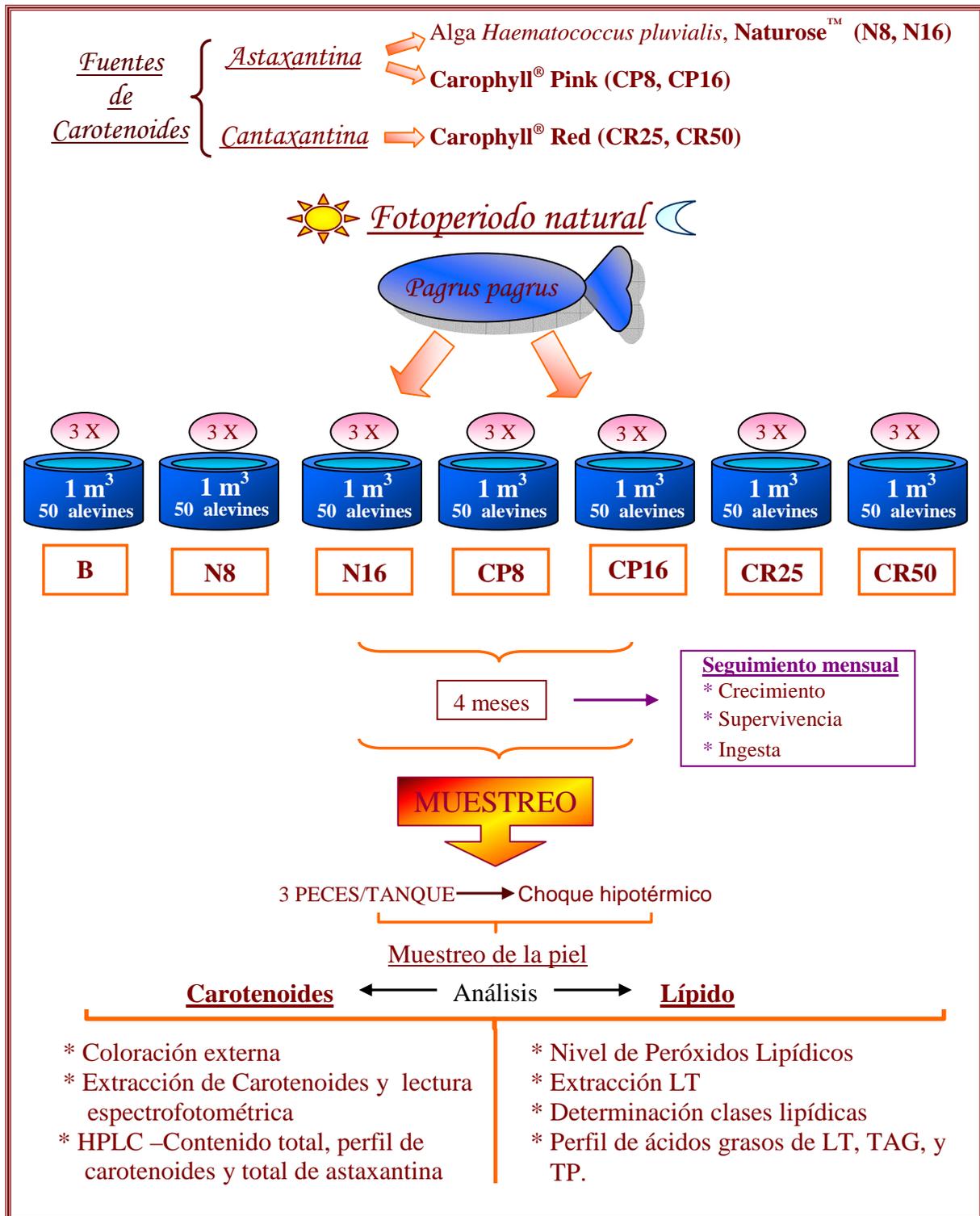


Fig. 4.III.2. Esquema del diseño experimental. Fuentes de astaxantina: El alga *Haematococcus pluvialis* (Naturese™, N) rica en astaxantina monoéster y la astaxantina sintética libre Carophyll® Pink (CP). Fuente de cantaxantina: Carophyll® Red. B, dieta basal; LT, lípido total; TAG, triacilglicéridos; TP, total de polares.

Resultados y discusión

La dieta basal con la que se formularon todos los tratamientos experimentales (Tabla 4.III.1) presenta la misma composición proximal que la empleada en el experimento anterior.

Tabla 4.III.1

Composición proximal (% p.s) de la dieta basal utilizada para formular todos los tratamientos dietarios.

Composición proximal	(%)
Proteína	45
Grasa	23
Carbohidratos	16,4
Ceniza	7,8
Humedad	5,9

p.s: peso seco

El contenido en astaxantina de los tratamientos dietarios N8, N16, CP8 y CP16 y de cantaxantina de los tratamientos CR25 y CR50 fueron determinados en laboratorio (HPLC), presentando, los tratamientos formulados con astaxantina, valores inferiores a los niveles de formulación encargados a la empresa de piensos BIOMAR, S.A (Fig. 4.III.3, Tabla 4.III.2).

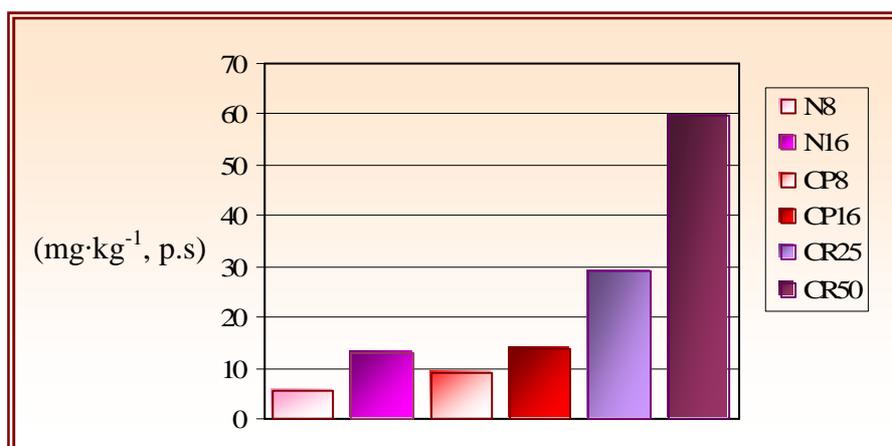


Fig. 4.III.3. Contenidos en astaxantina y cantaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de los tratamientos dietarios empleados.

Tabla 4.III.2

Valores analizados ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de astaxantina y cantaxantina en las dietas suplementadas.

Tratamientos dietarios	N8	N16	CP8	CP16	CR25	CR50
Contenido de astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	5,4	12,8	9,1	13,7	29,1	59,6

N8 y N16, 8 o 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cantaxantina-Carophyll® Red.

La composición en clases lipídicas de la dieta basal empleada para formular todos los tratamientos y su perfil de ácidos grasos están representados en las Tablas 4.III.3 y 4.III.4, respectivamente.

Tabla 4.III.3

Contenido de lípido total (% p.s.), y perfil de clases lipídicas (% de lípido total), de la dieta basal (B)

B	
Lípido Total	19,5 ± 1,1
Clases Lipídicas	
Esfingomiélin	0,7 ± 0,4
Fosfatidilcolina	6,4 ± 1,6
Fosfatidilserina	0,8 ± 0,2
Fosfatidilinositol	1,2 ± 0,3
Fosfatidilglicerol ^a	1,0 ± 0,2
Fosfatidiletanolamina	9,1 ± 1,7
Colesterol	9,9 ± 0,6
Ácidos grasos libres	5,1 ± 1,0
Triacilglicerol	56,5 ± 1,7
Ésteres de esteroides	9,4 ± 0,5
Total lípidos neutros	80,9 ± 0,2
Total lípidos polares	19,13 ± 0,2

Media ± desviación estándar (n=3). a También puede incluir ácido fosfatídico y cardiolipina. p.s.: Peso seco.

Tabla 4.III.4

Perfil de ácidos grasos del lípido total de la dieta basal (B) (peso húmedo %).

B	
14:0	5,9 ± 0,3
15:0	tr
16:0	18,3 ± 1,4
16:1 ^a	7,0 ± 0,2
16:2	1,0 ± 0,0
17:0	1,0 ± 0,0
16:3	tr
16:4	1,1 ± 0,1
18:0	3,2 ± 0,2
18:1 ^a	11,7 ± 0,1
18 : 2 n-6	4,3 ± 0,1
18:3 n-3	1,2 ± 0,1
18:4 n-3	2,9 ± 0,2
20 : 0	0,0
20:1 ^b	6,1 ± 0,3
20:4 n-6	0,6 ± 0,0
20:4 n-3	0,6 ± 0,0
20:5 n-3	11,0 ± 0,4
22:1 ^b	7,3 ± 0,3
22: 2 n-6	tr
22:5 n-6	0,0
22:5 n-3	1,1 ± 0,1
22:6 n-3	11,9 ± 0,5
24:1 n-9	0,0
UK,	1,1 ± 0,3
Totales	
Saturados	29,1 ± 1,6
Monoenos	32,5 ± 0,4
n-6	6,0 ± 0,1
n-3	28,7 ± 1,3
n-3 HUFA	24,6 ± 1,0
DHA/EPA ^c	1,1 ± 0,0

Media ± desviación estándar (n=3). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3–0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

La composición de la astaxantina presente en las fuentes empleadas para suplementar las dietas empleadas en este experimento coincide con la descrita en el experimento anterior, ya que la mayoría de la astaxantina presente en las dietas suplementadas con NaturoseTM se

encuentra en su forma química monoéster y en las dietas suplementadas con Carophyll® Pink, la astaxantina es libre y presenta diferentes isómeros. Sin embargo, el análisis de la cantaxantina reveló un solo pico cromatográfico correspondiente a la forma química predominante en que se presenta este carotenoide, la forma trans.

Al igual que en las experiencias previas, el crecimiento o supervivencia de los ejemplares sometidos a estudio no se vio afectado por la presencia de carotenoides en la dieta (Tabla 4.III.5).

Tabla 4.III.5

Peso (g), talla (cm), supervivencia (%) y factor de condición ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) de los alevines de bocinegro al comienzo de la experiencia y tras 4 meses de alimentación con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.

	Inicial	B	N8	N16	CP8	CP16	CR25	CR50
Peso	8,6 ± 2,5	63,9 ± 1,1	61,6 ± 1,2	63,6 ± 3,2	64,5 ± 2,0	64,4 ± 1,3	64,3 ± 2,8	78,4 ± 2,7
Talla	6,8 ± 0,7	12,9 ± 0,1	12,5 ± 0,1	12,8 ± 0,1	12,9 ± 0,2	12,8 ± 0,2	13,0 ± 0,3	14,3 ± 0,5
Supervivencia	100 ± 0,0	81,1 ± 3,8	81,1 ± 5,1	83,3 ± 8,8	88,9 ± 5,1	77,8 ± 1,9	78,9 ± 5,1	85,8 ± 8,0
Factor de Condición	2,7	3,0	3,1	3,1	3,0	3,1	3,0	3,0

Media ± desviación estándar (nº inicial de peces por tratamiento=150). B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 o 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cantaxantina-Carophyll® Red.

En lo referente al aspecto externo de los ejemplares de cultivo, en el presente experimento no se obtuvieron buenos resultados de pigmentación, no observándose una diferencia clara entre tratamientos. Así, todos los peces presentaron un aspecto externo poco coloreado, si bien en los peces que recibieron las dietas suplementadas con astaxantina, ya fuera sintética (CP8, CP16) o natural (N8, N16), se observa una ligera coloración rosada en su piel, mientras que en los peces alimentados con la dieta basal (B) y con cantaxantina (CR25 y CR50) la coloración externa resulta bastante más clara y grisácea (Fig.4.III.4). Estos resultados indican que los niveles de astaxantina empleados en la presente experiencia resultaron insuficientes a la hora de promover una correcta pigmentación de la piel. En cuanto

a los ejemplares alimentados con las dietas suplementadas con 25 y 50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina, la incorrecta pigmentación obtenida (Fig.4.III.4), coincide con la descrita por Kalinowski et al., (2005) al emplear 100 mg·kg⁻¹ de este carotenoide para alimentar ejemplares de esta misma especie. Este hecho indica que esta especie no puede, o al menos no de forma eficaz, transformar este carotenoide en la astaxantina que finalmente se depositará y pigmentará su piel. En este sentido, estos resultados son similares a los descritos para ejemplares de dorada japonesa (*Chrysophrys major*), especie, que tampoco puede llevar a cabo esta transformación química (Nakazoe et al., 1984; Ha et al., 1993).

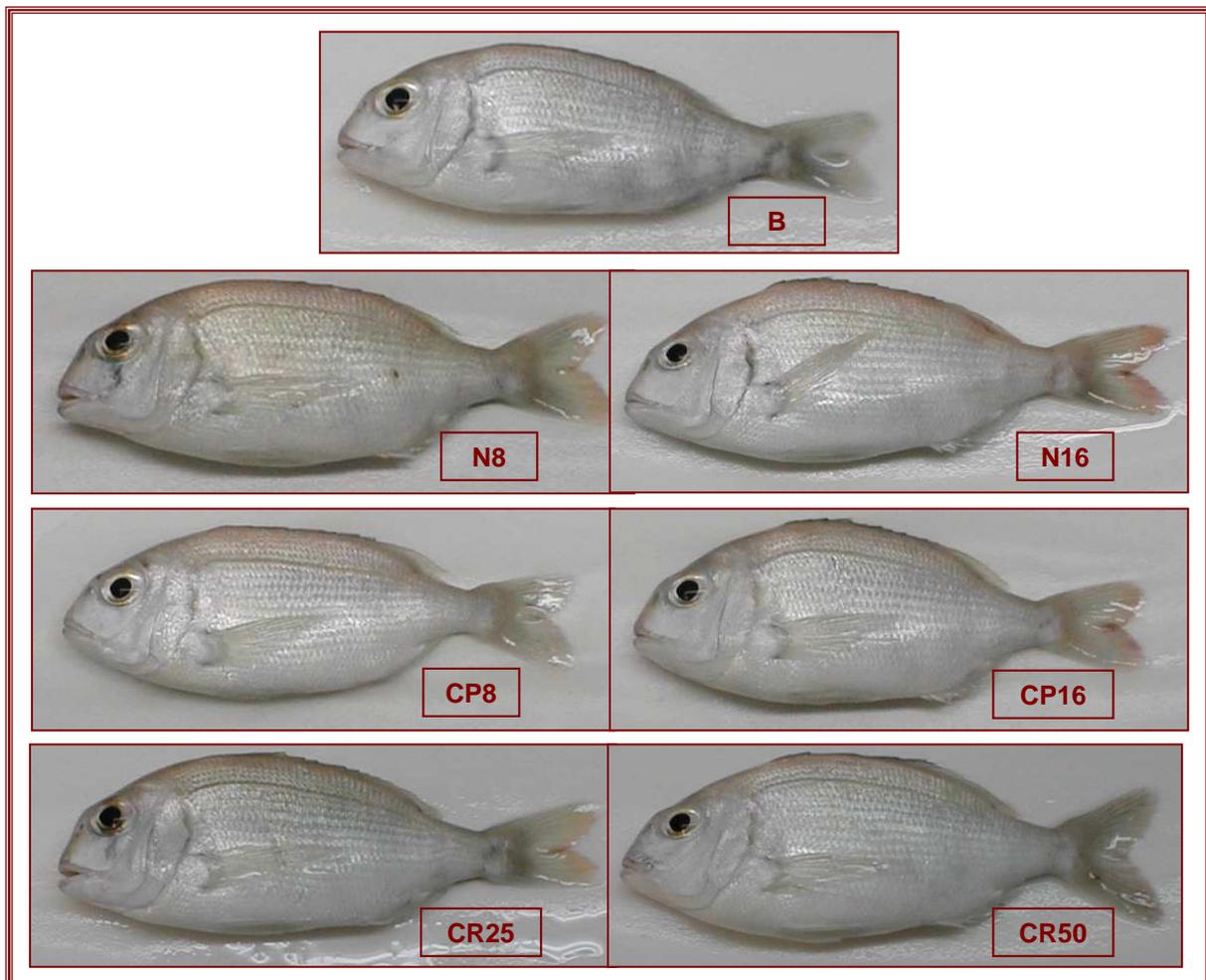


Fig. 4.III.4. Fotografía de los peces de los tratamientos ensayados. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina-Carophyll® Red.

A diferencia del experimento anterior, en el presente no es posible concluir en cuanto a eficiencia de las fuentes de astaxantina ensayadas para pigmentar los alevines objeto de estudio, ya que los resultados no fueron positivos y no se aprecia una diferencia sustancial entre los ejemplares alimentados con distintos niveles y fuentes de astaxantina.

En cuanto a la deposición de carotenoides en la piel de los ejemplares de bocinegro, si bien ésta fue en general muy baja, los análisis realizados mediante HPLC confirman que existe una mayor eficiencia de la fuente de astaxantina esterificada. Así, los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con $16 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Naturose[™] (N16) presentaron los mayores valores en cuanto a contenido total de carotenoide en la piel ($9,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Fig. 4.III.5, Tabla 4.III.6). Dichos resultados fueron superiores a los obtenidos empleando $8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina en su forma ester (N8, $6,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), grupo que presentó unos valores ligeramente superiores a los obtenidos empleando la dieta suplementada con $8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina libre (CP8, $4,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Este último grupo, presentó a su vez, valores similares a los presentes en la piel de los peces alimentados con las dietas CP16, CR25, CR50 y B ($3,7$; $3,1$, $2,2$ y $2,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente) (Fig. 4.III.5, Tabla 4.III.6).

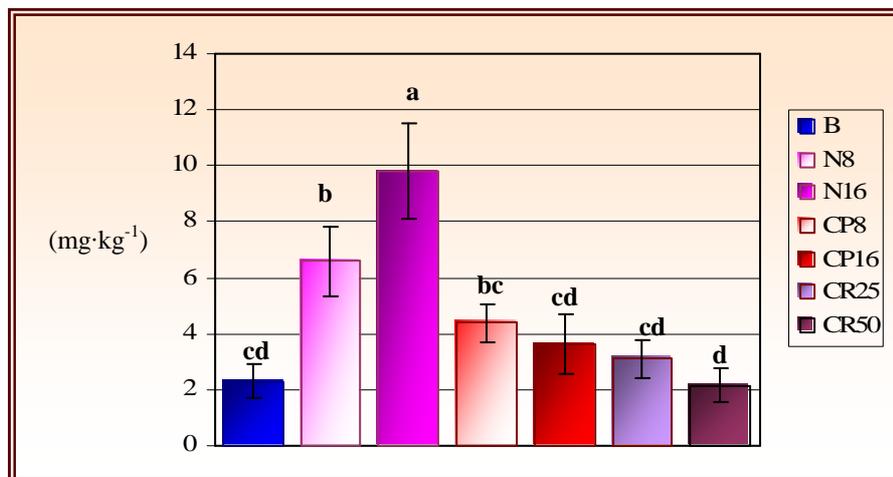


Fig. 4.III.5. Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cantaxantina-Carophyll® Red, (n=9). * Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tabla 4.III.6

Contenido total de carotenoides y astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), perfil de carotenoides (%) y nivel de peróxidos lipídicos ($\text{meq O}_2\cdot\text{kg}^{-1}$ lípido) de la piel de peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.

	B	N8	N16	CP8	CP16	CR25	CR50
Total							
Carotenoides	2,3 ± 0,6 cd	6,6 ± 1,2 b	9,8 ± 1,7 a	4,4 ± 0,7 bc	3,7 ± 1,1 cd	3,1 ± 0,7 cd	2,2 ± 0,6 d
Astaxantina	0,7 ± 0,1 d	3,2 ± 0,6 b	6,6 ± 0,9 a	1,5 ± 0,2 c	1,1 ± 0,3 cd	0,6 ± 0,2 d	0,5 ± 0,2 d
Carotenoides							
A. diéster	26,8 ± 3,8 cd	47,2 ± 9,2 ab	64,7 ± 9,4 a	32,1 ± 2,7 bc	29,0 ± 1,3 cd	18,7 ± 6,1 cd	16,7 ± 7,4 d
A. monoéster	0,6 ± 0,7 b	1,9 ± 0,1 a	2,1 ± 0,3 a	1,0 ± 0,6 ab	0,9 ± 0,2 ab	1,3 ± 0,8 ab	2,7 ± 0,2 a
A. libre	0,0 ± 0,0 c	0,2 ± 0,0 b	0,2 ± 0,2 b	0,4 ± 0,0 b	0,2 ± 0,1 b	0,4 ± 0,2 b	1,1 ± 0,6 a
T. diester	72,6 ± 4,5 a	50,7 ± 9,3 b	33,0 ± 9,6 c	66,5 ± 3,0 a	69,9 ± 1,5 a	80,3 ± 5,7 a	79,4 ± 5,9 a
Peróxidos	20,4 ± 3,3 a	10,7 ± 1,5 b	9,3 ± 4,1 b	14,0 ± 1,1 ab	11,4 ± 2,8 b	14,7 ± 2,6 ab	16,4 ± 3,9 ab

Media ± desviación estándar (n=9). B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cantaxantina-Carophyll® Red. A, astaxantina; T, tunaxantina. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

De estos análisis realizados mediante HPLC se desprende además, que sólo en aquellos ejemplares alimentados con la dieta suplementada con 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Naturese[™], éste carotenoide vuelve a presentarse como el predominante de entre los que se depositan en su piel. Así, los peces alimentados con el tratamiento N16 presentaron un contenido de astaxantina en la piel (6,6 mg·kg⁻¹), significativamente superior al depositado en aquellos ejemplares alimentados con la dieta N8 (3,2 mg·kg⁻¹). A su vez este valor fue significativamente superior al contenido de astaxantina que depositaron el resto de peces del presente estudio. La deposición de astaxantina en los ejemplares CP fue inesperadamente baja (1,5 y 1,1 mg·kg⁻¹) y similar a la de los que fueron alimentados con las dietas suplementadas con cantaxantina CR25, CR50 y al control negativo (B) (0,6; 0,5 y 0,7 mg·kg⁻¹, respectivamente) (Tabla 4.III.6, Fig. 4.III.6).

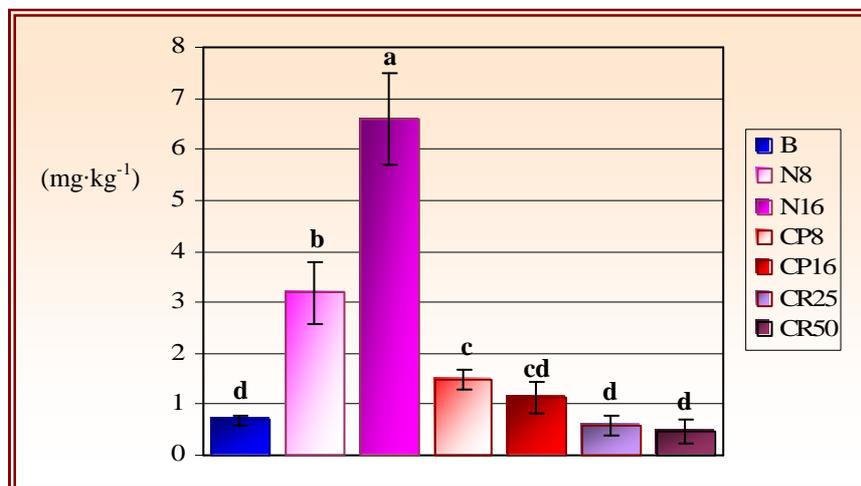


Fig. 4.III.6. Contenido total de astaxantina (mg·kg⁻¹) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose[™]; CP8 y CP16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll[®] Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina-Carophyll[®] Red, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p< 0,05).

Los resultados obtenidos en el presente experimento vuelven a poner de manifiesto que existe una mayor eficiencia, en términos de deposición de carotenoides, en general, y de astaxantina en particular, de la fuente de astaxantina esterificada (Naturose™) respecto a la forma libre (Carophyll® Pink) de este carotenoide. En este caso, los resultados en cuanto a diferencias de deposición de astaxantina en la piel son aún más contundentes que en el Experimento II. Así, para dosis similares de astaxantina en las dietas N16 y CP16 (12,8 y 13,7 mg·kg⁻¹ reales, respectivamente, Tabla 4.III.2), la piel de los ejemplares N16 presentaban contenidos 6 veces superiores de astaxantina. Por lo tanto, se refuerza la hipótesis planteada previamente en este documento, de que existe una eficiencia metabólica superior de la forma química esterificada (B+C, N8, N16, N25, N50), si la comparamos con la forma libre de la astaxantina (CP8, CP16, CP25, CP50) a la hora de depositarse en la piel de los alevines de bocinegro. Sin embargo, a diferencia del experimento previo, dicha eficiencia no se tradujo en una buena pigmentación ni en una coloración más “natural” de la piel. La explicación de esta pigmentación “rosada” tan tenue parece residir en las bajas dosis empleadas en este experimento, lo que nos lleva a concluir que será necesario emplear niveles superiores a los utilizados en esta experiencia (8 y 16 mg·kg⁻¹), para obtener buenos resultados de coloración en los ejemplares de cultivo, sin desperdiciar al mismo tiempo este costoso ingrediente dietario.

Al igual que en experiencias previas, los resultados obtenidos en cuanto a composición de carotenoides de los ejemplares, confirman que la forma química en la que el *Pagrus pagrus* deposita la astaxantina es la forma ester, siendo la forma diéster de este pigmento la que predomina por encima de cualquier otra. Igualmente, en el presente estudio se ha detectado la presencia del carotenoide tunaxantina en la piel de los ejemplares de *Pagrus pagrus*, hecho que confirma la existencia de un paso metabólico reductivo desde

astaxantina a tunaxantina descrito para otras especies (Fujita et al., 1983; Ibrahim et al., 1984; Miki et al., 1985; Matsuno, 1991, 2001; Ha et al., 1993; Schiedt, 1998; Bjerkgeng et al., 2000). De hecho, la presencia de tunaxantina en la piel del bocinegro alimentado con dietas suplementadas sólo con astaxantina apoya esta posible transformación metabólica. Sin embargo, tal y como se observó en el experimento previo, hay que destacar la presencia de este carotenoide en los ejemplares que no recibieron astaxantina a través de su dieta. Tal es el caso de los peces que fueron alimentados con la dieta basal y con las dietas suplementadas con cantaxantina. También es necesario destacar el hecho de que en la piel de los ejemplares alimentados con las dietas suplementadas con astaxantina Carophyll® Pink, los porcentajes de diester de tunaxantina sean superiores a los presentes en aquellos peces que recibieron la forma esterificada de la astaxantina en su dieta y que los peces alimentados con la dieta N8 depositaron porcentajes de este carotenoide superiores a los presentes en los ejemplares alimentados con el tratamiento N16. Teniendo en cuenta los bajos niveles de carotenoide total presentes en la piel de los peces alimentados con las dietas basal (B) ($2,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), CR25 ($3,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), CR50 ($2,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), CP8 ($4,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y CP16 ($3,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), estos porcentajes de tunaxantina esterificada (72,6%, 80,3%, 79,4%, 66,5% y 69,9% del total, respectivamente) se traducirían en pequeños contenidos de este carotenoide en términos absolutos ($1,6$; $2,5$; $1,7$; $2,9$ y $2,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente). En el caso de los peces alimentados con las dietas N8 y N16, los porcentajes de tunaxantina presentes (50,7% y 33%, respectivamente) se traducirían en cantidades absolutas de este carotenoide superiores a las descritas en el resto de tratamientos ($3,4$ y $3,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de tunaxantina, respectivamente), lo que avala el hecho de que mayores niveles de astaxantina en la piel se correspondan también con mayores niveles de tunaxantina. A la vista de estos resultados, podemos sugerir que, al igual que en la experiencia previa, la deposición de este carotenoide

podría reflejar nuevamente la dinámica entre la dosis de astaxantina ingerida y las transformaciones metabólicas que tienen lugar en el organismo (Tabla 4.III.6, Fig. 4.III.7).

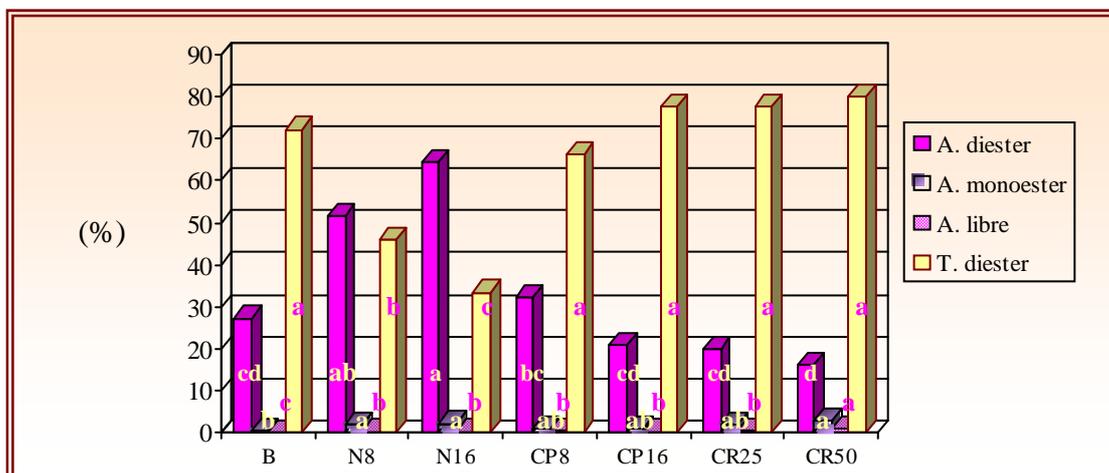


Fig. 4.III.7. Perfil de carotenoides (%) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina-Carophyll® Red, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p< 0,05).

En lo que respecta a los análisis de peróxidos lipídicos presentes en las muestras de piel del presente experimento, y como ocurrió en el experimento anterior, el nivel más alto de estos compuestos (20,4 meq O₂·kg⁻¹ de lípido) fue observado en los peces alimentados con la dieta basal (B), no suplementada con carotenoides. Este contenido fue sólo algo superior, al presente en los peces alimentados con los tratamientos CR25 (14,7 O₂·kg⁻¹ de lípido), CR50 (16,4 meq O₂·kg⁻¹ de lípido) y CP8 (14,0 meq O₂·kg⁻¹ de lípido) (Tabla 4.III.6, Fig. 4.III.8). Estos niveles de peróxidos obtenidos al utilizar el carotenoide cantaxantina (CR25 y CR50) y el nivel más bajo de astaxantina-Carophyll® Pink (CP8), fueron, a su vez, similares aunque algo superiores a los niveles más bajos de peróxidos lipídicos, encontrados en los peces alimentados con los tratamientos CP16 (11,4 meq O₂·kg⁻¹ de lípido), N8 (10,7 meq O₂·kg⁻¹ de lípido) y N16 (9,3 meq O₂·kg⁻¹ de lípido) (Tabla 4.III.6, Fig. 4.III.8).

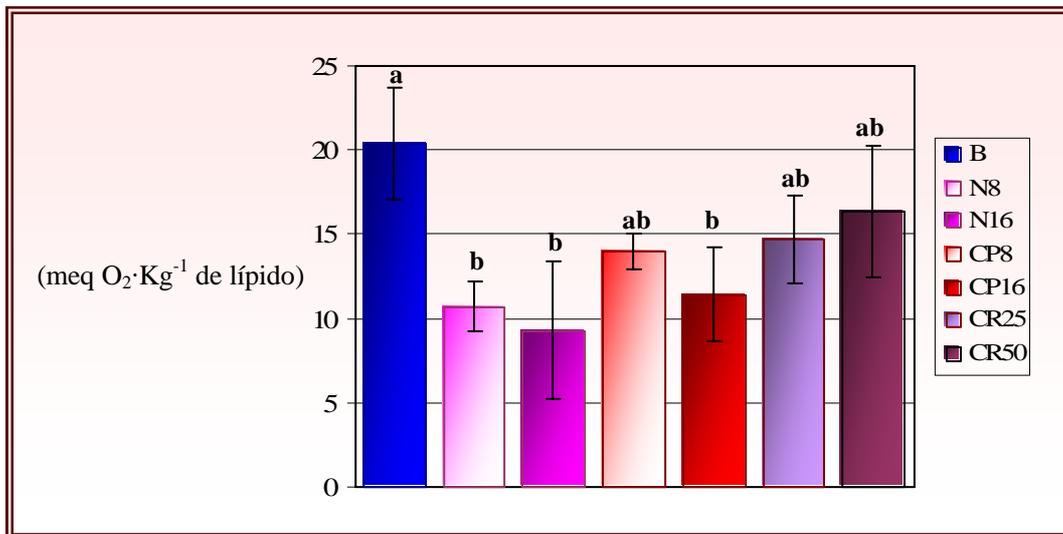


Fig. 4.III.8. Nivel de peróxidos lipídicos (%) presente en las muestras de piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina-Carophyll® Red, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p< 0,05).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en la experiencia anterior, en la que aquellos peces alimentados con las fuentes de astaxantina esterificada (N25, N50 y B+C), presentaron menores niveles de peróxidos lipídicos. En este caso, los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con el mayor nivel de astaxantina libre (CP16) también presentaron niveles más bajos de estos productos de peroxidación lipídica. Hay que destacar que los valores observados en la piel de los peces alimentados con las dietas N8, N16 y CP16 son muy similares a los determinados en el experimento anterior para las dietas N25, N50 y CP50. Esto indicaría que la inclusión de niveles de astaxantina esterificada inferiores a los empleados en la experiencia anterior, o bien la inclusión de una dosis de 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink sería suficiente para observar cierto papel protector de la piel frente a las peroxidaciones lipídicas.

Asimismo, hay que destacar que en el presente experimento se pone de manifiesto la menor acción antioxidante desarrollada por el carotenoide cantaxantina, ya que a pesar de

ser suplementado en mayores dosis (25 y 50 mg·kg⁻¹), a la vista de los valores de peróxidos en piel, desarrolla un pobre papel protector. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Miki (1991), que comparó la actividad antioxidante de varios carotenoides con la desarrollada por la astaxantina. En dichos experimentos la cantaxantina también presentaba menor eficacia que la astaxantina a la hora de evitar la peroxidación lipídica. Este hecho demuestra que no sólo el grupo cromóforo y la presencia de grupos cetónicos en la molécula, determinan las diferencias en cuanto a capacidad antioxidante en los carotenoides. Así, también los grupos hidroxilos que están presentes en la molécula de astaxantina y no en la de cantaxantina, influyen incrementando la actividad antioxidante que puede desarrollar en mayor medida la astaxantina.

Con el fin de estudiar cómo afecta la inclusión tanto de cantaxantina como de menores dosis de astaxantina en la dieta a la composición lipídica corporal de los alevines de bocinegro, realizamos el análisis del contenido del lípido total y del perfil de clases lipídicas de dicho lípido, encontrando que en ambos parámetros no existieron diferencias entre los distintos tratamientos dietarios. Al igual que en experiencias previas, los triacilgliceroles (TAG) fueron la clase lipídica predominante entre los lípidos neutros, mientras que la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) presentaron los mayores porcentajes dentro de los lípidos polares (Tabla 4.III.7).

Tabla 4.III.7

Contenido de humedad (%) y lípido total (% p.s), y composición de clases lipídicas (% del lípido total) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.

Dietas	B	N8	N16	CP8	CP16	CR25	CR50
Humedad	66,5 ± 1,8	65,4 ± 1,4	64,7 ± 2,7	66,1 ± 4,4	66,6 ± 3,2	65,1 ± 3,6	67,6 ± 2,9
Lípido Total	16,1 ± 4,4	16,8 ± 2,1	15,6 ± 4,5	14,5 ± 3,0	16,3 ± 2,1	15,9 ± 2,4	14,7 ± 2,3
Clases Lipídicas							
Esfingomielina	1,6 ± 0,8	0,8 ± 0,3	1,5 ± 0,5	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,7	0,6 ± 0,6	0,6 ± 0,1
Fosfatidilcolina	6,8 ± 2,1	6,1 ± 3,8	7,7 ± 1,2	6,9 ± 0,9	6,1 ± 2,0	7,1 ± 3,0	5,8 ± 0,8
Fosfatidilserina	2,0 ± 0,6	1,5 ± 0,9	2,2 ± 0,3	1,6 ± 0,0	1,5 ± 0,7	1,6 ± 0,5	1,5 ± 0,4
Fosfatidilinositol	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,6	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2
Fosfatidiletanolamina	4,8 ± 1,5	4,6 ± 3,4	6,0 ± 0,5	4,4 ± 0,2	4,0 ± 0,9	4,0 ± 0,7	3,2 ± 0,8
Colesterol	13,3 ± 6,6	15,3 ± 2,5	17,7 ± 0,4	12,1 ± 0,8	13,2 ± 2,0	15,5 ± 2,1	15,1 ± 2,5
Ácidos grasos libres	1,7 ± 1,5	3,7 ± 5,4	1,4 ± 1,3	1,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,3	0,6 ± 1,0
Triglicéridos	60,5 ± 14,9	60,4 ± 6,6	53,0 ± 5,4	63,5 ± 2,2	66,2 ± 8,0	62,8 ± 11,7	67,4 ± 5,9
E.E y ceras	8,3 ± 2,7	6,7 ± 2,6	8,9 ± 2,6	8,5 ± 1,9	7,4 ± 1,9	5,6 ± 4,4	5,3 ± 0,9
Total lípido neutro	83,9 ± 4,9	86,1 ± 8,6	81,0 ± 2,6	85,1 ± 1,4	86,8 ± 4,6	86,0 ± 5,0	88,3 ± 2,3
Total lípido polar	16,1 ± 4,9	13,9 ± 8,6	19,0 ± 2,6	14,9 ± 1,4	13,2 ± 4,6	14,0 ± 5,0	11,7 ± 2,3

Media ± desviación estándar (n=9). p.s.: Peso seco. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina-Carophyll® Red. E.E, ésteres de esteroides.

Los ácidos grasos predominantes en el lípido total de todas las muestras de piel fueron 16:0 y 18:1, seguidos por 22:6n-3 (DHA), 16:1, 20:5n-3 (EPA), 22:1, 20:1 y 18:0; los cuales representaron en torno a un 78% del lípido total. (Tabla 4.III.8).

Esta composición en ácidos grasos es muy similar a la observada en el LT de los ejemplares de la experiencia anterior, lo que parece indicar que dicho perfil de ácidos grasos no se ha visto influenciado por la inclusión de las menores dosis de astaxantina empleadas en el presente experimento.

Tabla 4.III.8

Principales ácidos grasos del lípido total (LT) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.

Dietas	B	N8	N16	CP8	CP16	CR25	CR50
14:0	4,1 ± 0,6	4,4 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,4 ± 0,3	3,9 ± 0,7	4,2 ± 0,4	4,0 ± 0,4
16:0	20,3 ± 1,0	20,9 ± 1,3	21,5 ± 1,6	21,0 ± 1,3	20,9 ± 1,3	19,4 ± 1,8	19,8 ± 1,4
16:1 ^a	8,5 ± 0,8 ab	8,4 ± 0,7 ab	7,7 ± 0,6 b	8,2 ± 0,4 ab	7,6 ± 0,8 ^b	8,6 ± 0,5 ^a	8,4 ± 0,6 ^a
16:2	1,0 ± 0,0 ab	0,9 ± 0,0 b	0,9 ± 0,1 b	1,0 ± 0,1 abc	0,9 ± 0,1 ^{bc}	1,1 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,1 ^a
18:0	4,8 ± 0,3	5,0 ± 0,4	5,1 ± 0,6	4,9 ± 0,3	5,2 ± 0,9	4,3 ± 0,4	4,8 ± 0,6
18:1 ^a	17,8 ± 1,6	17,6 ± 1,2	18,3 ± 1,5	17,2 ± 1,1	18,9 ± 2,1	17,4 ± 1,4	17,7 ± 1,0
18 : 2 n-6	4,1 ± 0,2	3,9 ± 0,3	4,1 ± 0,3	3,9 ± 0,2	3,8 ± 0,2	4,0 ± 0,3	3,9 ± 0,1
18:3 n-3	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
18:4 n-3	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,4 ± 0,2
20:1 ^b	4,9 ± 0,4	5,2 ± 0,2	5,2 ± 0,3	5,1 ± 0,3	4,9 ± 0,4	4,8 ± 0,5	4,7 ± 0,4
20:4 n-6	0,9 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,1 ab	0,7 ± 0,1 ab	0,7 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,1 ^{ab}	0,8 ± 0,2 ^{ab}
20:5 n-3	5,9 ± 0,8	6,6 ± 0,8	6,7 ± 1,0	6,8 ± 0,7	6,4 ± 1,0	6,1 ± 1,2	6,0 ± 1,2
22:1 ^b	4,9 ± 0,5	5,1 ± 0,3	5,1 ± 0,4	4,8 ± 0,3	4,9 ± 0,4	4,9 ± 0,5	4,8 ± 0,4
22:5 n-3	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,4	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2
22:6 n-3	9,4 ± 1,8	11,8 ± 2,5	9,8 ± 1,9	11,9 ± 1,1	10,8 ± 2,5	10,3 ± 1,7	10,3 ± 2,0
24:1 n-9	1,4 ± 0,4 ^{ab}	1,0 ± 0,1 ^b	0,9 ± 0,1 ^{ab}	1,0 ± 0,1 ^b	1,1 ± 0,3 ^b	1,3 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,2 ^a
UK.	2,3 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,3	1,6 ± 0,5	1,1 ± 0,6	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,3
Totales							
Saturados	30,5 ± 1,5	31,5 ± 1,9	32,1 ± 2,7	31,7 ± 1,5	31,4 ± 2,2	30,2 ± 1,8	30,3 ± 2,2
Monoenos	37,7 ± 2,6	36,2 ± 2,3	36,4 ± 2,3	36,4 ± 1,8	37,7 ± 2,0	38,0 ± 1,9	37,3 ± 2,2
n-3	19,5 ± 2,4	22,8 ± 3,3	20,6 ± 3,1	23,3 ± 1,9	22,4 ± 3,3	20,7 ± 3,5	21,5 ± 3,1
n-6	5,8 ± 0,4	5,2 ± 0,9	5,3 ± 0,5	5,2 ± 0,6	5,1 ± 0,5	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,3
DHA/EPA ^c	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,4

Media ± desviación estándar (n=9). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina-Carophyll® Red. Las medias que llevan letras distintas presentan diferencias significativas (p<0,05).

Asimismo, y al igual que en el experimento anterior, los datos de ácidos grasos fueron muy homogéneos dentro de cada tratamiento. Si bien se observaron algunas diferencias, éstas no parecen seguir ninguna tendencia o patrón específico.

En todas las muestras de piel, independientemente del tratamiento dietario, los ácidos grasos predominantes de los triacilglicéridos (TAG) fueron el 16:0 y 18:1, seguidos por 16:1, 22:6n-3 (DHA), 22:1, 20:1, 14:0 y 18:0; los cuales representaron en torno al 82% de esta clase lipídica (Tabla 4.III.9).

Este perfil de ácidos grasos vuelve a ser similar al encontrado en los triacilglicéridos del experimento anterior.

Tabla 4.III.9

Principales ácidos grasos de los triacilglicéridos (TAG) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.

Dietas	B	N8	N16	CP8	CP16	CR25	CR50
14:0	5,6 ± 0,5 a	4,6 ± 0,6 ab	5,5 ± 0,8 a	4,4 ± 0,5 b	4,6 ± 0,2 ab	5,5 ± 0,8 ab	5,2 ± 0,7 ab
16:0	24,7 ± 1,2 ab	24,0 ± 1,3 abc	26,4 ± 2,9 a	20,7 ± 1,8 c	21,8 ± 1,5 bc	23,0 ± 2,8 abc	23,5 ± 3,0 abc
16:1 ^a	8,6 ± 0,9	9,2 ± 0,6	9,6 ± 0,8	8,4 ± 0,4	8,9 ± 0,8	8,9 ± 0,4	8,5 ± 0,6
16:2	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
18:0	5,4 ± 0,4	4,0 ± 0,5	5,8 ± 0,9	3,6 ± 0,4	3,7 ± 0,2	4,9 ± 0,6	5,3 ± 0,9
18:1 ^a	20,4 ± 1,9 ab	22,1 ± 1,7 a	21,5 ± 2,3 ab	18,6 ± 1,1 b	20,3 ± 1,5 ab	19,0 ± 1,2 b	19,3 ± 1,7 ab
18 : 2 n-6	3,5 ± 0,3	3,8 ± 0,2	3,2 ± 0,6	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,3	3,6 ± 0,6	3,6 ± 0,5
18:3 n-3	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2
18:4 n-3	1,1 ± 0,1 b	1,1 ± 0,2 b	1,0 ± 0,6 ab	1,7 ± 0,3 a	1,4 ± 0,3 ab	1,4 ± 0,5 ab	1,4 ± 0,5 ab
20:1 ^b	6,5 ± 0,3	6,9 ± 0,8	5,9 ± 0,7	6,2 ± 0,5	6,6 ± 0,3	6,0 ± 0,9	6,0 ± 0,5
20:5 n-3	3,7 ± 0,7	3,3 ± 0,7	2,9 ± 1,9	5,7 ± 1,2	4,5 ± 1,0	4,9 ± 2,1	4,9 ± 2,0
22:1 ^b	6,6 ± 0,5	6,7 ± 0,7	5,8 ± 0,8	6,4 ± 0,5	6,4 ± 0,3	6,1 ± 0,9	6,3 ± 0,6
22:5 n-3	0,6 ± 0,2 ab	0,4 ± 0,3 b	0,5 ± 0,3 b	1,1 ± 0,2 a	0,8 ± 0,2 ab	0,8 ± 0,3 ab	0,8 ± 0,4 ab
22:6 n-3	6,4 ± 1,9 bc	5,3 ± 0,9 abc	5,2 ± 2,6 c	9,3 ± 1,1 a	7,1 ± 1,9 ab	8,5 ± 2,5 c	8,9 ± 2,8 bc
24:1 n-9	1,0 ± 0,2 bc	1,2 ± 0,3 abc	0,9 ± 0,1 c	1,6 ± 0,2 a	1,3 ± 0,3 ab	0,9 ± 0,2 c	1,0 ± 0,2 bc
UK	0,9 ± 0,3	1,8 ± 0,8	1,5 ± 0,4	1,9 ± 0,6	2,3 ± 0,6	1,2 ± 1,0	0,6 ± 0,1
Totales							
Saturados							
Monoenos	37,2 ± 1,7 a	33,8 ± 1,8 ab	38,4 ± 4,1 a	29,7 ± 2,4 b	31,3 ± 1,8 b	35,2 ± 4,5 ab	34,6 ± 4,9 ab
n-3	43,5 ± 1,9	45,6 ± 2,0	43,1 ± 3,4	41,7 ± 2,1	42,8 ± 2,6	41,6 ± 2,6	40,6 ± 3,1
n-6	13,2 ± 2,7 ab	11,1 ± 1,7 b	12,1 ± 4,8 ab	19,3 ± 2,9 a	15,1 ± 3,5 ab	16,6 ± 5,5 ab	18,9 ± 4,7 ab
n-3 HUFA	4,0 ± 0,5 b	4,5 ± 0,4 ab	3,8 ± 0,8 b	5,3 ± 0,5 a	4,7 ± 0,5 ab	4,1 ± 0,8 ab	4,5 ± 0,8 ab
DHA/EPA ^c	1,7 ± 0,4	1,6 ± 0,4	2,4 ± 1,8	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2	2,0 ± 1,1	2,2 ± 1,1

Media ± desviación estándar (n=9). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina-Carophyll® Red. Las medias que llevan letras distintas presentan diferencias significativas (p<0,05).

Igualmente, aunque el perfil de ácidos grasos de esta clase lipídica (TAG) presente algunas diferencias significativas, éstas no parecen estar asociadas a los cambios dietarios inducidos en cuanto a fuente y nivel de carotenoides.

Finalmente, los ácidos grasos más representativos del total de polares (TP) fueron el 16:0 y 18:1, seguidos por el 22:6n-3 (DHA), 18:0, 20:5n-3 (EPA) y 16:1 representando en

torno a un 79% de los ácidos grasos de esta fracción lipídica (Tabla 4.III.10). Cabe destacar además, que en el TP el 22:6n-3 es el doble que en los TAG, siendo también superior el nivel de 20:5n-3 en los lípidos polares. Este perfil de lípidos polares más rico en n-3 HUFA concuerda con lo descrito para otras especies de peces (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003).

Estos resultados vuelven a ser muy similares a los descritos en la experiencia anterior, lo que confirma que la adición de dosis más bajas de astaxantina en la dieta no afecta a la composición lipídica de los ejemplares sometidos a estudio.

Tabla 4.III.10

Principales ácidos grasos del total de polares del lípido total (TP) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.

Dietas	B	N8	N16	CP8	CP16	CR25	CR50
14:0	0,9 ± 0,7	0,9 ± 0,5	0,7 ± 0,3	1,1 ± 0,5	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,2
16:0	28,9 ± 3,3	29,0 ± 2,1	29,2 ± 1,7	28,6 ± 1,6	26,3 ± 0,9	27,8 ± 1,2	28,8 ± 3,5
16:1 ^a	5,6 ± 1,2	5,0 ± 0,6	4,8 ± 0,5	6,2 ± 0,9	4,8 ± 0,9	4,9 ± 1,6	5,1 ± 0,9
18:0	7,9 ± 1,9	7,9 ± 1,5	8,9 ± 1,6	10,2 ± 1,3	8,5 ± 1,7	7,8 ± 1,9	8,0 ± 1,9
18:1 ^a	18,8 ± 1,3	20,1 ± 1,3	18,8 ± 0,8	18,0 ± 1,4	18,7 ± 1,8	18,2 ± 0,8	18,8 ± 0,9
18 : 2 n-6	2,7 ± 1,0	2,9 ± 0,8	3,2 ± 0,4	2,4 ± 0,4	3,4 ± 0,6	3,1 ± 0,3	3,0 ± 0,6
20:1 ^b	1,9 ± 0,5	2,6 ± 0,4	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,2	1,8 ± 0,4	2,2 ± 0,7
20:4 n-6	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,5	1,5 ± 0,4	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,4
20:5 n-3	5,6 ± 1,0	5,3 ± 1,1	5,1 ± 1,1	6,3 ± 1,2	6,2 ± 1,3	6,3 ± 1,6	5,8 ± 0,8
22:1 ^b	1,7 ± 0,5	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,6
22:5 n-3	0,9 ± 0,4	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,2
22:6 n-3	12,8 ± 2,7	10,7 ± 2,0	10,4 ± 1,1	10,5 ± 1,3	14,5 ± 1,8	13,3 ± 3,0	13,0 ± 3,4
24:1 n-9	3,8 ± 1,2	3,7 ± 0,7	4,2 ± 0,8	2,8 ± 0,6	3,2 ± 0,9	4,3 ± 0,9	3,8 ± 0,6
UK	2,1 ± 0,7	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,5	1,6 ± 0,7	1,5 ± 0,6	1,7 ± 0,7	1,7 ± 0,8
Totales							
Saturados	39,2 ± 5,4	39,7 ± 3,4	40,7 ± 1,7	42,1 ± 2,0	37,2 ± 1,5	38,1 ± 2,9	38,9 ± 5,4
Monoenos	31,9 ± 1,8	29,2 ± 1,4	31,6 ± 1,6	31,2 ± 1,6	27,5 ± 2,6	31,0 ± 2,8	31,3 ± 2,3
n-3	20,3 ± 3,5	17,3 ± 3,1	16,9 ± 0,9	18,1 ± 2,5	22,8 ± 3,0	21,2 ± 5,3	20,5 ± 3,9
n-6	4,6 ± 1,2	5,7 ± 1,0	5,8 ± 0,8	4,0 ± 1,2	6,3 ± 1,0	6,0 ± 0,9	5,4 ± 1,3
n-3 HUFA	19,8 ± 3,7	16,9 ± 3,0	16,4 ± 0,9	17,7 ± 2,4	22,0 ± 3,0	21,1 ± 5,5	20,2 ± 3,9
DHA/EPA ^c	2,3 ± 0,4	2,1 ± 0,4	2,1 ± 0,6	1,7 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,4

Media ± desviación estándar (n=9). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3–0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina-Carophyll® Red.

Como conclusión de la presente experiencia se puede afirmar que las dosis de astaxantina empleadas no resultan adecuadas para obtener una pigmentación aceptable de los alevines de bocinegro y que la cantaxantina resulta ineficaz como fuente de carotenoide para pigmentar la piel de esta especie.

Del mismo modo, en este experimento la fuente esterificada de astaxantina vuelve a mostrarse como la más eficaz a la hora de promover la deposición de carotenoides en general, y de astaxantina en particular, en la piel de los ejemplares de cultivo. Igualmente, los diésteres de astaxantina y tunaxantina son las formas prioritarias en las que los ejemplares de bocinegro depositan estos carotenoides dietarios en su piel.

Los resultados obtenidos en la presente experiencia apuntan a que será necesario emplear dosis superiores a las ensayadas para obtener buenos resultados en cuanto a pigmentación del bocinegro, pudiendo situarse el rango de suplementación entre unos 20-30 mg·kg⁻¹ de astaxantina dietaria.

Por último y teniendo en cuenta que la mayor parte de la producción acuícola actual de pescado está basada en el engorde de alevines en jaulas marinas flotantes, cuyas condiciones lumínicas son diferentes a las presentes en tanques de cultivo, el objetivo del siguiente experimento fue llevar a cabo una experiencia dietaria comparando la coloración de los ejemplares en ambos sistemas de cultivo, en condiciones de igualdad de suplementación dietaria de astaxantina.

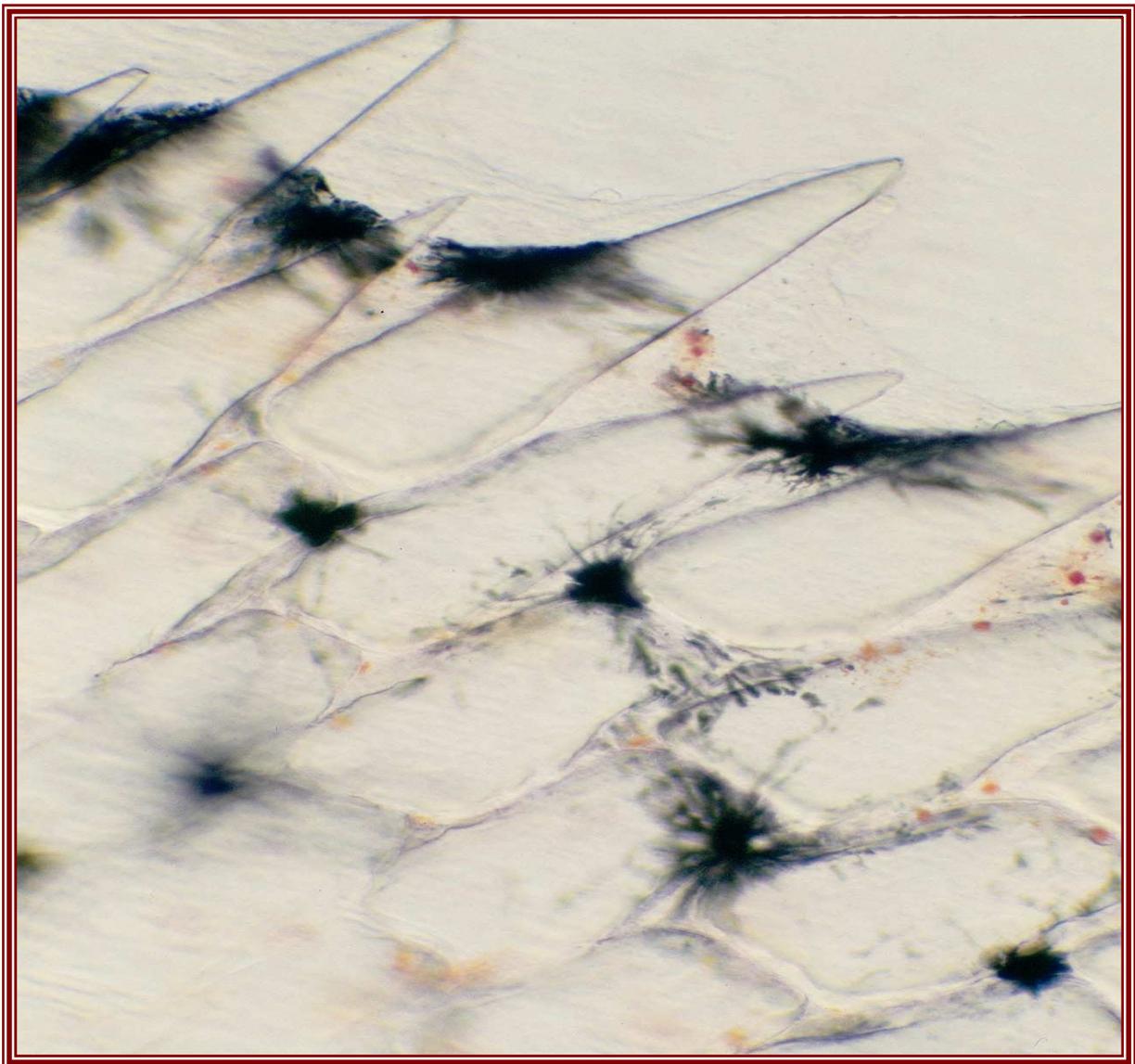
Los resultados de la presente experiencia dietaria han dado lugar a las siguientes comunicaciones a congreso:

∞ Tejera, N.; Cejas, J.R.; Bolaños, A.; Rodríguez, C., Jerez, S.; Villamandos, J.E.; Lorenzo, A., 2005. Los carotenoides en la pigmentación del bocinegro (*Pagrus pagrus*). Abstracts del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17–21 Octubre 2005, Valencia, España, pp. 42-43. Presentación Oral.

∞ Tejera, N., Cejas, J.R, Rodríguez, C., Jerez, S., Bolaños, A., Lorenzo, A. 2008. “Effect of astaxanthin supplemented feeds on pigmentation and carotenoid composition of *Pagrus pagrus* skin” The 15th International Symposium on Carotenoids. Okinawa, Japan. Poster presentation.

Experimento IV

Estudio comparado del desarrollo, pigmentación, perfil de carotenoides, nivel de peróxidos y composición lipídica de la piel de bocinegros alimentados, en tanques de cultivo o jaulas marinas flotantes, con una dieta suplementada con astaxantina.



4.4 Experimento IV

Nociones introductorias

Los experimentos realizados hasta el momento con el fin de mejorar la pigmentación del bocinegro producido en cautividad, demuestran que la inclusión dietaria de unos 25-30 mg·kg⁻¹ del carotenoide astaxantina promueve la coloración rojiza de la piel, dando lugar a ejemplares que pueden tener una mayor aceptación en el mercado. Sin embargo, es importante destacar que dichas experiencias han sido realizadas en tanques, un sistema de cultivo que resultaría económica y técnicamente inviable en muchas regiones, de cara a la producción comercial de peces, incluido el bocinegro. Si tenemos en cuenta la alta productividad que se puede lograr utilizando como sistema de cultivo las jaulas flotantes y la presencia en muchos países de aguas costeras susceptibles de ser utilizadas para este tipo de sistema, el uso de estas estructuras puede desarrollar un importante papel en el incremento de la producción de peces a nivel mundial (Chua y Tech, 2002). De hecho, el sistema mayoritario de cultivo de peces y el adecuado para las condiciones propias de nuestras costas es el de las jaulas marinas flotantes, siendo particularmente atractivos los estudios encaminados a establecer la idoneidad de estos sistemas en el cultivo de nuevas especies de interés acuícola, incluyendo al bocinegro.

Sin embargo, aunque la elección de este método de cultivo parezca ideal para la especie objeto de estudio, el bocinegro (*Pagrus pagrus*), el cultivo de especies “coloreadas” presenta algunas dificultades técnicas a tener en cuenta previamente a su comercialización. Experiencias de cultivo realizadas con especies como la dorada australiana (*Pagrus auratus*),

han demostrado que los ejemplares presentan una coloración más oscura en su piel cuando son cultivadas en este tipo de estructuras (Booth et al., 2004). Este hecho podría ser consecuencia de la proximidad de las jaulas marinas a la superficie y por tanto del efecto que puede tener la exposición a la luz solar sobre el aumento en la producción y concentración de melanina en la piel (Matsui et al., 1992). En este sentido, investigaciones llevadas a cabo por Adachi et al. (2005) han confirmado que ejemplares de dorada japonesa cultivados en jaulas marinas pueden presentar también una coloración oscura y que tanto la cantidad como el tamaño de los melanocitos presentes en su piel es superior a la de los ejemplares de esta especie cultivados en jaulas protegidas, o a la de los capturados del medio marino. Los análisis histológicos realizados por los autores indicaron que el oscurecimiento de la piel de los ejemplares de jaulas desprotegidas iba acompañado de un acúmulo de eumelanina, producto del exceso de radiación ultravioleta recibida al estar expuestos a la luz solar.

También los resultados expuestos durante una de las charlas-debate del reciente X Congreso Nacional de Acuicultura en relación con el cultivo en jaulas del besugo en las costas del Cantábrico, señalan la posible relación entre el oscurecimiento de los ejemplares y su exposición a la luz solar.

El efecto del espectro lumínico en la coloración de la piel de ejemplares de bocinegro mantenidos en tanque ha sido estudiado por Van der Salm et al. (2004), mostrando que los peces mantenidos bajo un espectro azul mostraban un color corporal más claro que aquellos expuestos al espectro lumínico completo, los cuales presentaban una coloración similar a la observada en ejemplares mantenidos en jaulas marinas cerca de la superficie del agua. De modo similar, Chatzifotis et al. (2005) han observado que los ejemplares de *Pagrus pagrus* cultivados en tanque poseen mayores contenidos de melanina en comparación con los

individuos del medio natural, lo cual se traduce en una reducción considerable de la luminosidad de su piel.

A pesar de que existe alguna información acerca de los contenidos de melanina y la luminosidad de la piel de bocinegros expuestos a diferentes espectros e intensidades lumínicas, hasta la fecha no hay estudios publicados que determinen cómo las condiciones en mar abierto pueden afectar a la deposición de carotenoides en la piel de esta especie. Con este propósito, se diseñó una experiencia piloto utilizando ambos sistemas de cultivo, es decir, tanque y jaula, para cultivar alevines de bocinegro a los que se les suministró una dieta comercial suplementada con astaxantina. Así, en la presente experiencia se planteó comparar no sólo el color de la piel de los ejemplares sometidos a estudio, sino determinar los contenidos de carotenoides y astaxantina depositados en la piel de estos peces mantenidos en ambos sistemas de cultivo.

Asimismo, si tenemos en cuenta resultados de estudios como los realizados con fibroblastos de riñón en los que se ha mostrado que la astaxantina es más efectiva a la hora de restaurar la alteración de las actividades endógenas de enzimas antioxidantes y evitar la peroxidación lipídica inducida por la luz U.V que el β -caroteno y la luteína (O'Connor y O'Brien, 1998), investigar cómo pueden afectar las diferentes condiciones medioambientales propias de ambos sistemas de cultivo, a la deposición de astaxantina y, por tanto, a los niveles de peróxidos lipídicos de ambos grupos de peces, ha sido otro propósito del presente experimento.

Por último y como en experiencias anteriores, decidimos realizar un estudio de la composición lipídica de las muestras de piel de ambos grupos de peces, los cultivados en jaula y los cultivados en tanque, a fin de determinar la exposición a condiciones naturales de

mayor luminosidad presentes en mar abierto, afectaban a su perfil de ácidos grasos poliinsaturados.

Condiciones experimentales

Para llevar a cabo la presente experiencia, alevines de bocinegro producidos mediante la tecnología Mesocosmos, en el Centro Costero de Canarias y con un peso medio de $5,0 \pm 1,5$ g, fueron divididos en dos grupos. Unos 100 peces se mantuvieron en el citado centro (Fig. 4.IV.1a), en un tanque de 10-m^3 de capacidad, con un flujo de agua de mar de 30 l/min y la aireación necesaria para mantener el nivel de oxígeno cercano a la saturación. Un número superior de alevines (en torno a 2.000) fueron transferidos a una jaula marina tipo polar circle de unos 10m de diámetro (Fig. 4.IV.1b), ubicada en las instalaciones de la empresa CEDRA S.L.L, la cual se encuentra situada en la costa de San Andrés, muy cerca del Centro Costero de Canarias. La empresa se dedica al engorde de dorada y lubina en este tipo de estructuras flotantes y puso a nuestra disposición tanto sus instalaciones, como los instrumentos y personal necesario para el desarrollo de esta experiencia piloto de engorde de bocinegro en jaula.

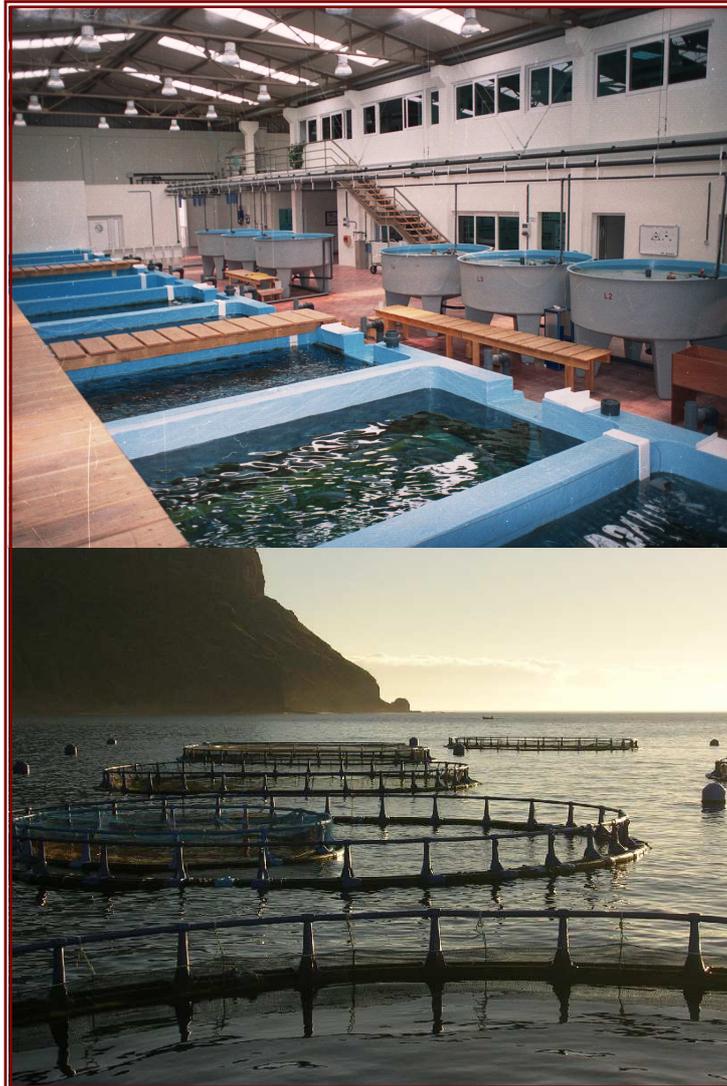


Fig. 4.IV.1. a.- Imagen del tanque tipo empleado en esta experiencia. b.- Fotografía de jaulas marinas propiedad de Cedra S.L.L.

Como se puede observar en la Fig. 4.IV.1a, el tanque experimental se encontraba ubicado en el interior de una instalación cubierta y, por tanto, estaba expuesto a una menor intensidad lumínica, al menos, respecto a la superficie de la jaula situada en mar abierto.

Durante 17 meses, los peces mantenidos en tanque (T) y en jaula (J), fueron diariamente alimentados con una dieta suplementada con astaxantina y fabricada por BIOMAR S.A. En este caso, se trataba de una dieta comercial suplementada con astaxantina

sintética y que la productora de piensos tenía también interés en ensayar. Dicha dieta fue analizada en nuestro laboratorio (HPLC), comprobándose que estaba suplementada con 25 mg·kg⁻¹ de astaxantina libre procedente del producto Carophyll® Pink (10% CWS, DSM Nutritional Products Ltd). Esta formulación coincide además, con la uno de los tratamientos dietarios que ya había sido ensayado en el Experimento II.

Cada 2 meses, se midieron peces procedentes de la jaula y del tanque, para determinar su talla y peso, siendo retornados al sistema de cultivo una vez determinados dichos parámetros. Los índices de crecimiento y supervivencia fueron calculados a lo largo del experimento y los ratios de alimentación ajustados a la biomasa. La mortalidad fue registrada diariamente.

Al final del periodo experimental se realizó una evaluación visual de la pigmentación y se realizaron fotografías de ejemplares de ambos tratamientos. Asimismo, transcurridos los 17 meses de alimentación, se procedió a sacrificar a 6 peces de cada grupo mediante shock hipotérmico, para tomar muestras de piel y congelarlas inmediatamente en nitrógeno líquido. Igual que en experimentos anteriores, dichas muestras se mantuvieron a -80 °C hasta poder realizar los análisis pertinentes. Se establecieron los contenidos totales y perfiles de carotenoides, así como los contenidos de astaxantina y de peróxidos lipídicos. También se realizó la determinación del contenido de lípido total y sus clases lipídicas, así como los perfiles de ácidos grasos del lípido total, de los triacilglicéridos y del total del lípido polar. Todos los protocolos de análisis han sido ampliamente descritos en el apartado de Material y Métodos de la presente memoria (Pág. 45-57).

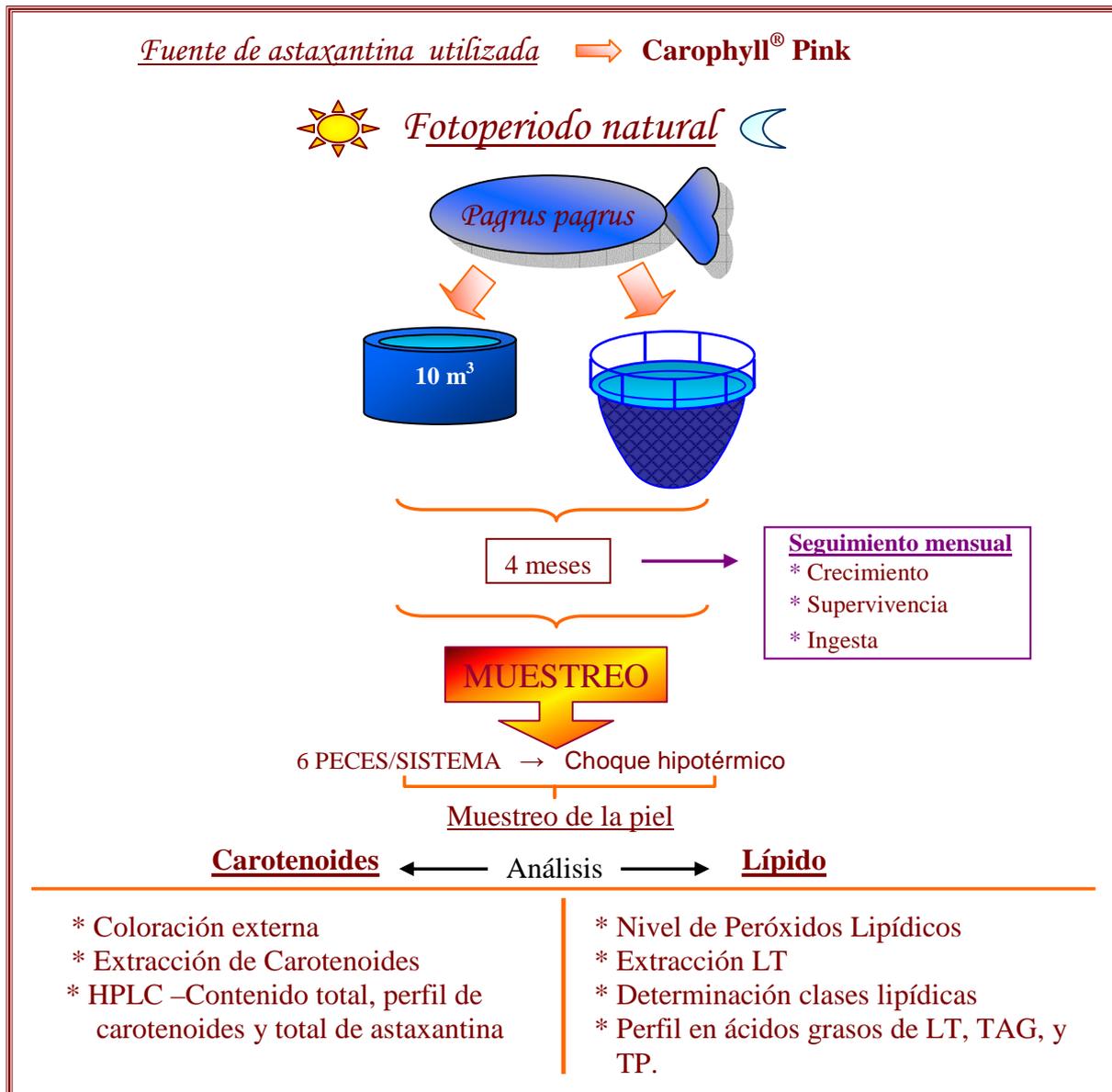


Fig. 4.IV.2. Esquema del diseño experimental. Fuente de astaxantina: astaxantina sintética libre Carophyll® Pink. Experiencia realizada en diferentes sistemas de cultivo, tanque y jaula flotante.

Resultados y discusión

La composición proximal, clases lipídicas y ácidos grasos de la dieta fue muy similar a las de las dietas basales empleadas en los experimentos anteriores y se presentan en las Tablas 4.IV.1-4.IV.2.

El nivel de astaxantina de la dieta se analizó utilizando HPLC, siendo el valor encontrado de $22,0 \pm 3,7$, muy similar al esperado según la formulación de BIOMAR (Tabla 4.IV.1).

Tabla 4.IV.1

Valor analizado ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de astaxantina, composición proximal (% p.s) y perfil de clases lipídicas (% de lípido total) de la dieta suplementada con $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink (CP25).

	CP25
Astaxantina	$22,0 \pm 3,7$
Humedad	$8,5 \pm 0,2$
LT	$17,2 \pm 0,0$
Proteína	45
Carbohidratos	15,5
Ceniza	7
Clases lipídicas (%)	
Esfingomielina	$1,1 \pm 0,1$
Fosfatidilcolina	$9,6 \pm 0,5$
Fosfatidilserina	$1,3 \pm 0,3$
Fosfatidilinositol	$1,3 \pm 0,4$
Fosfatidilglicerol ^a	$1,6 \pm 0,5$
Fosfatidiletanolamina	$7,4 \pm 0,7$
Colesterol	$10,1 \pm 0,4$
Ácidos grasos libres	$8,7 \pm 0,7$
Triacilglicéridos	$51,0 \pm 4,5$
Esteres de esteroides	$8,0 \pm 1,8$
Lípidos neutros	$77,8 \pm 1,5$
Lípidos polares	$22,2 \pm 1,5$

Media \pm desviación estándar (n=3). ^a También puede incluir ácido fosfatídico y cardiolipina. p.s.: Peso seco.

Tabla 4.IV.2

Perfil de ácidos grasos (%) del lípido total de la dieta suplementada con 25 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink (CP25).

CP25	
14:0	5,6 ± 0,2
16:0	17,3 ± 0,3
16:1 ^a	6,8 ± 0,4
16:2	0,8 ± 0,0
17:0	0,7 ± 0,2
16:4	0,5 ± 0,1
18:0	3,2 ± 0,1
18:1 ^a	16,2 ± 0,6
18:2 n-6	5,8 ± 0,1
18:3 n-3	1,5 ± 0,1
18:4 n-3	2,1 ± 0,2
20:1 ^b	5,8 ± 0,3
20:4 n-6	0,6 ± 0,0
20:4 n-3	0,8 ± 0,0
20:5 n-3	8,3 ± 0,2
22:1 ^b	6,0 ± 0,0
22 : 2 n-6	0,5 ± 0,2
22:5 n-3	1,7 ± 0,1
22:6 n-3	10,3 ± 0,3
24:1 n-9	0,6 ± 0,1
UK	3,5 ± 1,1
Totales	
Saturados	26,8 ± 0,4
Monoenos	35,5 ± 0,5
n-6	7,8 ± 0,6
n-3	24,8 ± 0,7
n-3 HUFA	21,1 ± 0,4
DHA/EPA ^c	1,2 ± 0,0

Media ± desviación estándar (n=3). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3–0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

Tras 17 meses de alimentación, los peces mantenidos tanto en tanque como en jaula no presentaron diferencias de crecimiento ni de supervivencia, si bien el factor de condición en jaula resulta inferior frente al valor obtenido en tanque en esta y las experiencias anteriores (Tabla 4.IV.3).

Tabla 4.IV. 3

Peso (g), talla (cm), supervivencia (%) y factor de condición de los alevines de bocinegro procedentes de tanque (T) o jaula (J), al comienzo de la experiencia y tras 17 meses de alimentación con 25 mg·kg⁻¹ de astaxantina Carophyll® Pink (CP25).

Dietas	Initial	T	J
Peso (g)	5,0 ± 1,5	404,4 ± 47,4	463,6 ± 36,3
Talla (cm)	5,3 ± 0,8	23,8 ± 2,5	25,0 ± 1,7
Supervivencia (%)	100 ± 0,0	80,2 ± 6,8	78,5 ± 3,5
Factor de Condición (g·cm ⁻³)	3,3	2,9	2,5

Media ± desviación estándar (50 peces por tratamiento). B, tanque; J, jaula.

Tal y como se muestra en las siguientes fotografías (Fig. 4.IV.3), ambos grupos de peces mostraron una coloración rojiza en su piel, lo que indica que al igual que en las experiencias previas, los peces fueron capaces de utilizar eficientemente la astaxantina presente en la dieta.



Fig. 4.IV.3. Fotografía de los peces de tanque (a) y jaula (b) alimentados con la dieta CP25 (25 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink).

Sin embargo, hay que puntualizar que aunque ambos grupos lograron pigmentar su piel, los peces mantenidos en jaula (J) presentaron una coloración mucho más oscura que los peces mantenidos en tanque (T). Se observó además, que el contenido de carotenoides obtenido en la piel de los peces de jaula (J) respecto a los de tanque (T) es significativamente superior (68,7 y 26,0 mg·kg⁻¹, respectivamente). Esta mayor cantidad de pigmento explicaría, a su vez, esta diferencia de coloración (Fig. 4.IV.4, Tabla 4.IV.4).

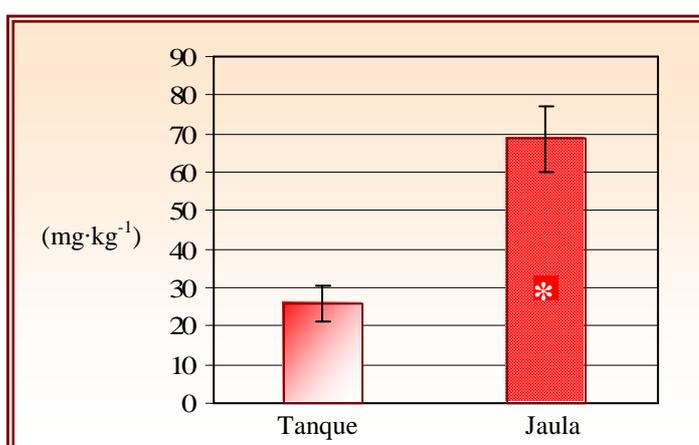


Fig. 4.IV.4. Contenido total de carotenoides (mg·kg⁻¹) presente en la piel de los peces de tanque y jaula alimentados con 25 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink, (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos (p< 0,05).

Tabla 4.IV.4

Contenido total de carotenoides y astaxantina (mg·kg⁻¹), perfil de carotenoides (%) y nivel de peróxidos lipídicos (meq O₂· kg⁻¹ lípido) de la piel de peces mantenidos en tanque (T) y jaula (J).

	T	J	
Total (mg·kg⁻¹)			
Carotenoides	26,0 ± 4,6	68,7 ± 8,5	*
Astaxantina	21,4 ± 5,0	48,7 ± 8,3	*
Carotenoides (% del total)			
Astaxantina diéster	79,6 ± 4,3	68,3 ± 3,1	*
Astaxantina monoéster	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,6	
Tunaxantina diester	17,8 ± 3,1	29,0 ± 5,2	*
Peróxidos (meq O ₂ / Kg lípido)	9,6 ± 1,9	3,6 ± 1,2	*

Media ± desviación estándar (n=6). *Diferencias significativas entre tratamientos (p< 0,05).

Al igual que en los experimentos anteriores, la astaxantina fue el carotenoide predominante en la piel de los bocinegros mantenidos en ambas estructuras. Si bien, nuestros

resultados mostraron un contenido dos veces superior de astaxantina en la piel de los peces mantenidos en jaula (J) respecto a los ejemplares mantenidos en tanque (T) (48,7 y 21,4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente) a pesar de que ambos grupos fueron alimentados con la misma dieta (Tabla 4.IV.4, Fig. 4.IV.5).

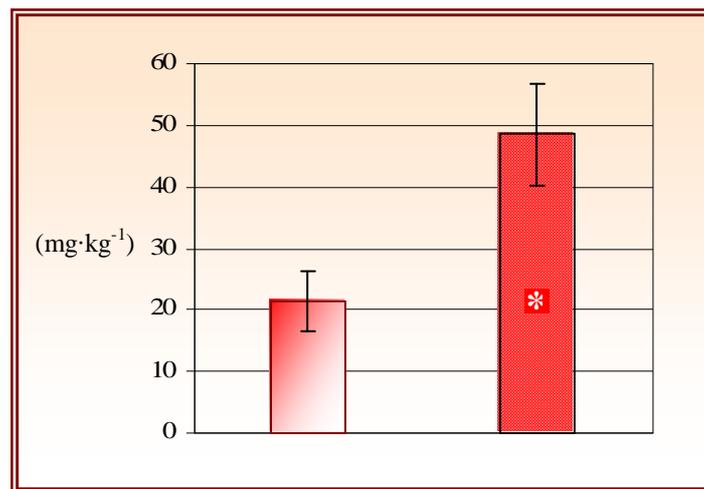


Fig. 4.IV.5. Contenido total de astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces de tanque y jaula alimentados con $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink, (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

En este sentido, experimentos realizados con ejemplares de dorada australiana (*Pagrus auratus*) cultivados en jaulas sin coberturas que los protegieran de la luz solar, arrojaron resultados similares a los nuestros, observándose en su piel contenidos de astaxantina superiores a los que presentaban ejemplares de la misma especie cultivados en estructuras flotantes protegidas con mallas que evitaban en un 50% y 95% el paso de la luz del sol. En dichos experimentos, los individuos menos expuestos a la luz solar presentaban mayores valores de luminosidad en la piel, no sólo como resultado de la menor deposición de astaxantina, sino también probablemente de la menor deposición de melanina en su piel (Booth et al., 2004). Según Pavlidis et al. (2006), la pigmentación más oscura observada en los peces mantenidos en jaulas al descubierto se debe tanto a la acumulación de eumelanina

como a una mayor deposición de astaxantina en su piel, que podría desarrollar un papel protector frente a los rayos U.V. a los que están altamente expuestos en este tipo de cultivo.

Al igual que en la experiencia anterior, nuestros resultados también mostraron que en cuanto a composición en carotenoides, las formas ester vuelven a ser predominantes en la piel del bocinegro (Tabla 4.IV.4, Fig. 4.IV.6).

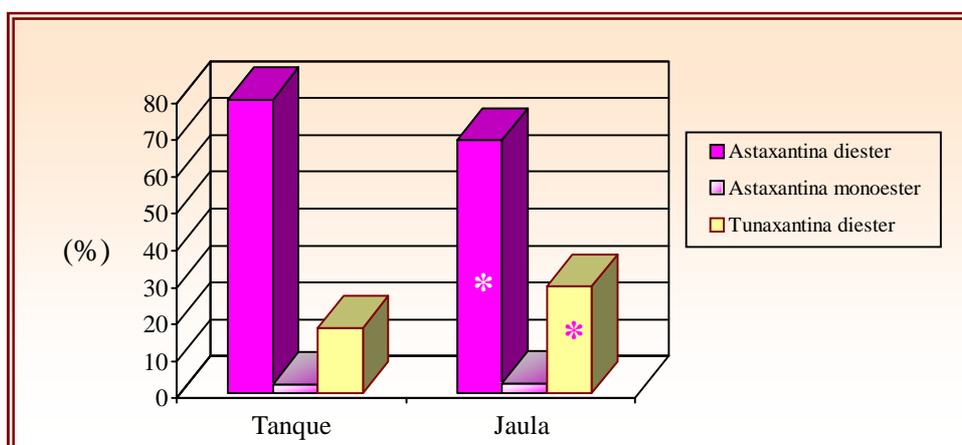
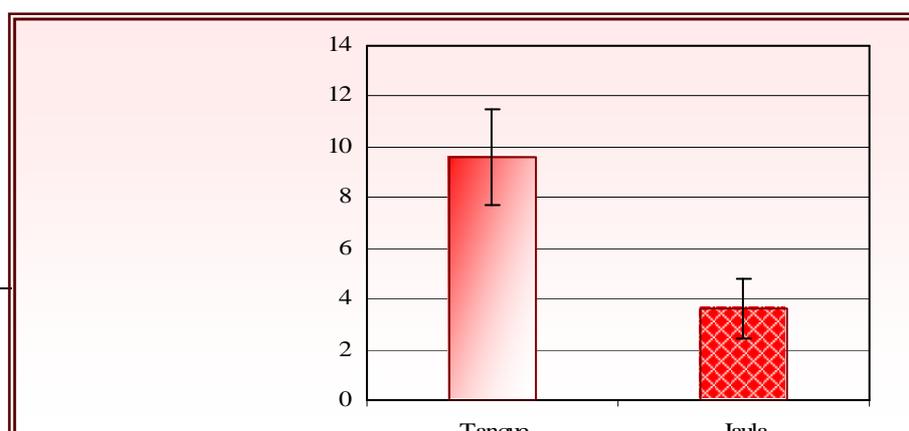


Fig. 4.IV.6. Perfil de carotenoides (%) presente en la piel de los peces de tanque y jaula alimentados con $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll[®] Pink, (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Así, la forma química predominante en la que los ejemplares de ambos grupos experimentales (T y J) depositan la astaxantina en la piel es la diester, siendo menores los porcentajes de astaxantina monoester y no identificándose en este caso astaxantina en su forma libre. Asimismo, la tunaxantina en su forma diester aparece como segundo carotenoide en orden de importancia en la piel de los bocinegros sometidos a estudio. Los porcentajes de este carotenoide fueron superiores en la piel de los peces mantenidos en jaula (29%) respecto a los mantenidos en tanque (17,8 %) (Tabla 4, Fig. 4.IV.6). Si tenemos en cuenta que este carotenoide presente en numerosas especies de teleósteos (Shahidi et al., 1998), puede derivar de la transformación de la astaxantina dietaria (Matsuno, 1991, 2001;

Schiedt, 1998) que también se deposita en mayor medida en los peces mantenidos en jaulas, las diferencias observadas en cuanto a porcentajes de tunaxantina parecen implicar, una vez más, una mayor tasa de transformación metabólica de astaxantina a tunaxantina presente en los ejemplares que depositan más astaxantina en su piel. No obstante, si tenemos en cuenta que no realizamos rigurosos estudios de marcaje y seguimiento metabólico de los carotenoides en el bocinegro, resulta imposible concluir de modo fehaciente acerca de este y otros aspectos metabólicos. Sí podemos, sin embargo, afirmar que existen diferencias metabólicas entre los ejemplares sometidos a estudio debido a las diferentes condiciones a las que están expuestos, ya que el origen de los ejemplares y la formulación de la dieta en este experimento fueron los mismos para los peces mantenidos en tanque (T) y para los peces mantenidos en jaula (J). Teniendo en cuenta la importancia de la luz en la coloración de la piel, podemos deducir también que las diferencias observadas, fueron debidas a la diferencia de intensidad lumínica de los sistemas de cultivo ensayados.

Otro resultado interesante obtenido en este experimento, hace referencia al nivel de peróxidos existente en la piel de los peces de ambos grupos, siendo significativamente superior el valor encontrado en la piel de los peces mantenidos en tanque ($9,6 \text{ meq O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ de lípido) respecto a la piel de los ejemplares de jaula ($3,6 \text{ meq O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ de lípido) (Tabla 4.IV.4, Fig. 4.IV.7).



(meq O₂·kg⁻¹ de lípido)



Fig. 4.IV.7. Nivel de peróxidos lipídicos (meq O₂·kg⁻¹ de lípido) presente en las muestras de piel de los peces de tanque y jaula alimentados con 25 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Carophyll[®] Pink, (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos (p< 0,05).

La importancia de este resultado radica en el hecho de que los menores valores de peróxidos se obtuvieron en el grupo de peces mantenido en jaula, que depositó mayores niveles de astaxantina en su piel. Por otra parte, el nivel de peróxidos presente en los peces de tanque es consistente con el obtenido utilizando la misma dieta en el Experimento II (CP25, 10,6 meq O₂·kg⁻¹ de lípido), el cual resultó inferior al obtenido utilizando una dieta basal sin carotenoides (B, 13,3 meq O₂·kg⁻¹ de lípido). Esto indica que, como en los experimentos anteriores, la astaxantina dietaria sí está ejerciendo un papel protector contra la peroxidación lipídica en ambos grupos de peces, y que su acción es superior en aquel grupo que está expuesto en mayor medida a los rayos UV, por lo que ha depositado mayor cantidad de astaxantina en la piel. Las claras diferencias encontradas en cuanto a niveles de peróxidos en piel, unido al hecho de que numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* prodigan la actividad de la astaxantina como antioxidante (Kurashige et al., 1990; Palozza y Krinsky, 1992; Kang et al., 2001), protegiendo a los ácidos grasos insaturados frente a la oxidación (Jørgensen y Skibsted, 1993), justifican realizar un análisis de la composición lipídica, evaluando en particular posibles diferencias en los perfiles de PUFA, indicadores de si las diferencias en el sistema de cultivo empleado afectan al perfil de ácidos grasos de la piel.

A tal fin, determinamos el contenido de lípido total (LT), perfil de clases lipídicas y la composición en ácidos grasos del lípido total, de los triacilglicéridos (TAG) y del total de polares (TP). De los resultados hallados en cuanto a lípido parece que los individuos de jaula

son ligeramente más grasos, si bien, los contenidos y perfiles de clases lipídicas tanto de lípido neutro como de lípido polar se desprende que las diferentes condiciones medioambientales no influyeron en estos parámetros, no encontrándose diferencias significativas entre los peces de ambos sistemas de cultivo. Asimismo, los resultados también mostraron que la clase lipídica más abundante en ambos grupos de peces fue la de los triacilglicéridos (TAG) y que los fosfolípidos más representativos fueron la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE), no encontrándose diferencias tampoco a nivel de clases lipídicas (Tabla 4.IV.5).

Tabla 4.IV.5

Contenido de humedad (%) y lípido total (% p.s), y composición de clases lipídicas (% del lípido total) de la piel de los peces mantenidos en tanque (T) y jaula (J).

	T	J
Humedad	66,5 ± 5,1	64,9 ± 4,7
Lípido Total	9,5 ± 2,4	14,3 ± 2,7
Clases Lipídicas		
Esfingomielina	0,43 ± 0,22	0,23 ± 0,11
Fosfatidilcolina	4,68 ± 0,38	4,41 ± 0,27
Fosfatidilserina	0,87 ± 0,06	0,65 ± 0,12
Fosfatidilinositol	0,29 ± 0,04	0,35 ± 0,08
Fosfatidiletanolamina	2,75 ± 0,52	2,83 ± 0,48
Colesterol	9,38 ± 1,34	8,43 ± 0,25
Ácidos grasos libres	1,42 ± 0,91	2,36 ± 0,53
Triacilglicerol	74,27 ± 1,76	75,93 ± 1,47
Ésteres de esteroides	5,53 ± 2,47	4,77 ± 1,29
Total lípido neutro	90,60 ± 1,61	91,48 ± 1,03
Total lípido polar	9,06 ± 1,04	8,52 ± 1,03

Media ± desviación estándar (n=6). p.s.: Peso seco.

En cuanto a la composición en ácidos grasos, los resultados mostraron que los ácidos grasos con mayor representación en el lípido total (LT) de la piel de los bocinegros tanto de tanque (T) como de jaula (J) fueron el 18:1, el 16:0, el 22:6n-3, el 16:1 y el 18:2n-6. Éstos, representaron el 63,6% y el 63,0% del LT, respectivamente (Tabla 4.IV.6).

Tabla 4.IV.6

Principales ácidos grasos del lípido total (LT) (% peso) de la piel de los peces mantenidos en tanque (T) y jaula (J).

	T	J
14:0	4,1 ± 0,4	4,6 ± 0,4
16:0	18,2 ± 0,8	17,9 ± 1,4
16:1 ^a	6,6 ± 0,3	7,0 ± 0,4
16:2	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
17:0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0
18:0	3,4 ± 1,3	3,9 ± 0,3
18:1 ^a	22,5 ± 0,5	21,1 ± 0,6
18:2 n-6	5,3 ± 1,0	7,7 ± 0,9
18:3 n-3	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,2
18:4 n-3	1,5 ± 0,4	1,3 ± 0,3
20:1 ^b	5,4 ± 0,5	3,4 ± 3,0
20:4 n-6	5,4 ± 0,5	3,4 ± 3,0
20:4 n-3	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,1
20:5 n-3	6,3 ± 1,1	5,6 ± 1,2
22:1 ^b	5,3 ± 0,6	6,9 ± 4,6
22:5 n-3	1,4 ± 0,4	1,8 ± 0,4
22:6 n-3	11,4 ± 2,4	9,5 ± 2,1
24:1 n-9	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1
UK	1,5 ± 1,0	1,9 ± 0,7
Totales		
Saturados	26,7 ± 2,2	27,7 ± 2,0
Monoenos	41,0 ± 1,7	39,1 ± 2,7
n-6	6,6 ± 0,7	9,1 ± 1,2
n-3	22,5 ± 3,7	20,6 ± 4,3
n-3 HUFA	19,6 ± 3,3	17,8 ± 3,8
DHA/EPA ^c	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1

Media ± desviación estándar (n=6). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

Asimismo, los ácidos grasos más importantes dentro de los TAG fueron el 18:1, el 16:0, el 16:1, el 20:1, el 22:6n-3, el 22:1 y el 18:2n-6, representando un 73,9% y un 75,5% de esta clase lipídica para los peces de T y J, respectivamente (Tabla 4.IV.7).

Tabla 4.IV.7

Principales ácidos grasos de los triacilglicéridos (TAG) (% peso) de la piel de los peces mantenidos en tanque (T) y jaula (J).

	T	J			
14:0	4,8 ± 0,4	5,3 ± 0,1	16:1 ^a	8,8 ± 0,5	9,1 ± 0,4
15:0	tr	0,5 ± 0,0	16:3	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
16:0	20,3 ± 1,7	19,8 ± 0,1	18:0	5,5 ± 1,9	5,3 ± 0,7
			18:1 ^a	21,8 ± 1,0	22,2 ± 0,2

18:2 n-6	5,5 ± 1,5	6,1 ± 0,3
18:3 n-3	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1
18:4 n-3	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,0
20:1 ^b	5,9 ± 0,6	6,8 ± 0,2
20:4 n-3	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,0
20:5 n-3	4,4 ± 0,9	3,9 ± 0,7
22:1 ^b	5,7 ± 0,1	5,9 ± 0,4
22:5 n-3	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,1
22:6 n-3	5,9 ± 0,7	5,6 ± 0,5
24:1 n-9	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0
UK,	1,7 ± 0,4	1,1 ± 0,1
Totales		
Saturados	31,3 ± 4,0	31,3 ± 0,7
Monoenos	43,4 ± 1,0	45,2 ± 1,1
n-6	14,6 ± 2,2	13,2 ± 0,4
n-3	6,9 ± 1,8	7,3 ± 0,4
n-3 HUFA	12,5 ± 1,9	11,1 ± 0,5
DHA/EPA ^c	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,4

Media ± desviación estándar (n=6). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3–0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

Respecto a la composición en ácidos grasos del total de lípidos polares (TP), los ácidos grasos más importantes fueron el 16:0, el 22:6n-3, el 18:1, el 18:0, el 16:1 y el 20:5n-3, representando un 80,3% y un 79,5% del TP para ambos grupos de peces, respectivamente (Tabla 4.IV.8).

Tabla 4.IV.8

Principales ácidos grasos del total de lípido polar (TP) (% peso) de la piel de los peces mantenidos en tanque (T) y en jaula (J).

	T	J
14:0	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0,5
15:0	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,3
16:0	34,6 ± 3,2	31,7 ± 3,3
16:1 ^a	5,0 ± 1,2	6,1 ± 0,2
17:0	tr	0,6 ± 0,1
16:3	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1
16:4	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2
18:0	11,4 ± 2,1	10,3 ± 0,7
18:1 ^a	12,7 ± 2,9	11,8 ± 2,6
18:2 n-6	2,8 ± 1,2	3,9 ± 0,9

20:1 ^b	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,5
20:2 n-6	0,6 ± 0,0	tr
20:4 n-6	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,2
20:5 n-3	4,8 ± 1,7	5,8 ± 1,2
22:1 ^b	1,7 ± 0,7	1,5 ± 0,5
22:5 n-3	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,5
22:6 n-3	11,8 ± 3,4	13,8 ± 2,0
24:1 n-9	0,5 ± 0,5	0,8 ± 0,1
UK	3,5 ± 0,7	2,7 ± 0,6
Totals		
Saturates	49,0 ± 1,5	44,7 ± 3,9
Monoenes	22,4 ± 1,4	23,3 ± 3,0
n-3	17,7 ± 4,5	21,2 ± 1,1
n-6	5,1 ± 1,5	5,8 ± 0,9
n-3 HUFA	17,7 ± 4,5	20,9 ± 1,3
DHA/EPA ^c	2,5 ± 0,3	2,5 ± 0,8

Media ± desviación estándar (n=6). Los totales incluyen algunos componentes no mostrados. ^a Contiene isómeros n-9 y n-7; ^b Contiene isómeros n-11 y n-9; ^c 22:6n-3/20:5n-3; tr. valores 0,3– 0,5%; 0,0 valores ≤ 0,3%.

Como se puede observar en los datos mostrados y de modo similar a las Experiencias I, II y III descritas previamente, en el presente experimento no se hallaron signos de pérdidas o de sobreproducción de ácidos grasos polinsaturados en el LT y en las fracciones de TAG y de TP, que pudieran relacionarse con una respuesta a un estado de estrés oxidativo (Halliwell y Chirico, 1993; Baker y Davies, 1996). Estos resultados indican que a pesar de los distintos niveles de peróxidos encontrados en la piel de los ejemplares, ni las diferentes condiciones medioambientales establecidas, ni la cantidad de astaxantina suplementada o depositada, marcaron diferencias de composición de ácidos grasos de la piel de individuos mantenidos en tanques en tierra o en jaulas flotantes.

Teniendo en cuenta la buena pigmentación adquirida por los peces cultivados en tanque, así como el exceso de coloración y los altos niveles de astaxantina que se depositaron en la piel de los peces de jaula, como protección probable frente a la mayor incidencia de radiaciones U.V a las que se vieron expuestos estos ejemplares, nuestros resultados sugieren que el emplear niveles más bajos de astaxantina para suplementar las

dietas de los peces mantenidos en jaulas, podría dar buenos resultados en cuanto a pigmentación se refiere, siempre y cuando, se utilice algún tipo de estructura que cubra las instalaciones, reduciendo de este modo la intensidad de luz a la que están expuestos los ejemplares en estas instalaciones en mar abierto. El emplear menores dosis de astaxantina en estas condiciones a la hora de suplementar los piensos podría dar lugar a ejemplares correctamente pigmentados para su comercialización, y por otro lado, se traduciría en una reducción de los costes de producción, lo cual resulta interesante para los productores acuícolas.

Asimismo, de los resultados de las experiencias II y III en las que se muestra que la astaxantina procedente del alga *Haematococcus pluvialis* (Naturose™) es más eficaz en cuanto a deposición y pigmentación de la piel, se desprende que unos 20-25 mg·kg⁻¹ de astaxantina-Naturose™, en un sistema de jaulas cubiertas con estructuras capaces de reducir la intensidad lumínica, podría resultar efectivo y rentable para engordar alevines de bocinegro a escala comercial. Bajo estas premisas se desarrolla actualmente el Proyecto de Transferencia de Resultados de Investigación (PETRI, ref. PTR1995-0933-OP-02-01) titulado “Suplementación de piensos con astaxantina para la adecuada coloración del pargo (*Pagrus pagrus*) en condiciones de cultivo comercial”, coordinado por la Universidad de La Laguna y en la que participan el Instituto Español de Oceanografía y la empresa de cultivos CEDRA S.L.L. Ello ha sido posible gracias a los resultados preliminares (Cejas et al., 2003b; Tejera et al., 2007) obtenidos en el proyecto CICYT y que han sido expuestos en la presente memoria.

Los resultados del Experimento IV, han sido expuestos en las siguientes comunicaciones a congresos:

∞ Tejera, N.; Cejas, J.R.; Bolaños, A.; Rodríguez, C., Jerez, S.; Villamandos, J.E.; Lorenzo, A., 2005. Los carotenoides en la pigmentación del bocinegro (*Pagrus pagrus*). Abstracts del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17–21 Octubre 2005, Valencia, España, pp. 42-43. Presentación Oral.

∞ Tejera, N.; Cejas, J.R.; Bolaños, A.; Jerez, J. Pérez; O. Monroig; V. Martín; Lorenzo, A. 2007. “Efecto de la suplementación de la dieta con astaxantina sobre la pigmentación y carotenoides de la piel de *Pagrus pagrus* mantenidos en tanques y jaulas” Abstracts del XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, España.

∞ Tejera, N., Cejas, J.R, Rodríguez, C., Jerez, S., Bolaños, A., Lorenzo, A. 2008. “Effect of astaxanthin supplemented feeds on pigmentation and carotenoid composition of *Pagrus pagrus* skin” The 15th International Symposium on Carotenoids. Okinawa, Japan. Poster presentation.



Conclusiones

5. Conclusiones

1. Los bocinegros alimentados en tanques con dietas suplementadas con 25-50 mg·kg⁻¹ de astaxantina fueron capaces de utilizar de manera eficiente este carotenoide, presentando una coloración rojiza que podría ser aceptable desde el punto de vista comercial. Sin embargo, los ejemplares alimentados con dosis inferiores a las reseñadas, presentan un aspecto externo poco coloreado.

2. La tonalidad blanco-grisácea observada en la piel de los ejemplares alimentados con 25-50 mg·kg⁻¹ de cantaxantina, ponen de manifiesto que el bocinegro no es capaz de utilizar de forma eficiente este carotenoide para pigmentar su piel.

3. A igualdad de suplementación dietaria de astaxantina, la mayor pigmentación y acumulación de carotenoides en la piel de los bocinegros mantenidos en jaula respecto a los de tanque, apuntan a que una mayor intensidad lumínica incrementa la deposición de pigmento en esta especie, sugiriéndose que el uso de menores niveles de astaxantina en la dieta podría lograr una coloración más adecuada en los individuos cultivados en jaulas.

4. La mejor coloración y deposición de carotenoides y astaxantina en la piel de los ejemplares alimentados con las fuentes esterificadas de este pigmento, ponen de manifiesto la mayor efectividad de esta forma química para pigmentar la piel de esta especie.

5. Independientemente de la forma química de la astaxantina suplementada, los ejemplares de esta especie depositaron este carotenoide en su piel, mayoritariamente en su forma diester.

6. La mayor presencia de diesteres de tunaxantina en la piel de los ejemplares alimentados con astaxantina como único carotenoide en la dieta, indica la capacidad de esta especie para transformar metabólicamente la astaxantina suministrada en tunaxantina.

7. La ausencia de incrementos de astaxantina en la piel de los bocinegros alimentados con cantaxantina, muestra la incapacidad de esta especie para transformar metabólicamente la cantaxantina suministrada en astaxantina.

8. Los menores niveles de peróxidos lipídicos presentes en la piel de los ejemplares que depositaron mayores contenidos de astaxantina señala el papel protector desarrollado por este carotenoide frente a las peroxidaciones lipídicas.

9. La similitud encontrada en los patrones lipídicos y de ácidos grasos entre los ejemplares de los distintos tratamientos dietarios, parece indicar que el metabolismo lipídico del animal no se vio afectado por la adición de carotenoides en la dieta, ni por factores medioambientales tales como las distintas intensidades de luz presentes en tanques y jaulas de cultivo.

10. Desde el punto de vista aplicado y con el fin de abaratar los costes de producción de piensos suplementados con astaxantina para el engorde de bocinegros en jaulas, se sugiere no utilizar dosis superiores a $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de pienso (p.s) de astaxantina esterificada y cubrir las jaulas con estructuras capaces de disminuir la intensidad lumínica en la superficie de las mismas.



Bibliografía

6. Bibliografía

- Abellán, E., 1999.** Culture of common dentex (*Dentex dentex* L.): Present knowledge, problems and perspectives. Seminar of the CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean on "Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification", Zaragoza (Spain), 24-28 May 1999. CIHEAM-IAMZ 47, 157-168.
- Abellán, E., García-Alcazar, A., García-Alcazar, S., y Martín, P., 1994.** Cultivo de nuevas especies de espáridos mediterráneos: Experiencias de preengorde y engorde del Sargo común (*Diplodus sargus*, Linnaeus, 1758) y del sargo picudo (*Diplodus puntazzo*, Cetti, 1777). Informes Técnicos Instituto Español de Oceanografía. 148, 1-11.
- Adachi, K., Kato, K., Wakamatsu, K., Ito S., Ishimaru, K., Hirata, T., Murata, O., Kumai, H., 2005.** The histological analysis, colorimetric evaluation, and chemical quantification of melanin content in suntanned fish. *Pigment Cell Research*, 18, 6, pp. 465-468.
- Akhtar, P., Gray, J.I., Cooper, T.H., Garling, D.L., Booren, A.M., 1999.** Dietary pigmentation and deposition of α -tocopherol and carotenoids in rainbow trout muscle and liver tissue. *J. Food Sci.* 64, 234-239.
- Ako, H., Tamaru, C. S., Asano, L., Yuen, B., Yamamoto, M., 2000.** Achieving natural coloration in fish under culture. UJNR Technical Report 28.
- Al-Khalifa, A.S., Simpson, K., 1988.** Metabolism of astaxanthin in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 91 B(3), 563-568.

- Almaida-Pagán, P.F., Rubio, V.C., Mendiola, P., De Costa, J., Madrid, J.A., 2006.** Macronutrient selection through post-ingestive signals in sharpsnout seabream fed gelatine capsules and challenged with protein dilution. *Physiology & Behavior* 88 (4-5), 550-558.
- Almansa, E., Pérez, M.J., Cejas, J.R., Badía, P., Villamandos, J.E., Lorenzo, A., 1999.** Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season. *Aquaculture* 170, 323-336.
- Almansa, E., Martín, M.V., Cejas, J.R., Badía, P., Jerez, S., Lorenzo, A., 2001a.** Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *J. Fish Biol.* 59, 267-286.
- Almansa, E., Cejas, J.R., Tejera, N., Santamaría, F.J., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2001b.** Influencia del aporte de carotenoides en la dieta sobre la pigmentación de la piel en alevines de bocinegro (*Pagrus pagrus*). Abstracts VIII Congreso Nacional de Acuicultura. Acuicultura y desarrollo sostenible. Mayo 22-25. Santander, España, pp 92-93.
- Anderson, S., 2000.** Salmon Color and the Consumer. IIFET 2000 Proceedings, Hoffmann-La Roche Limited.
- APROMAR, 2006.** La acuicultura marina de peces en España. Informe de la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos.
- Arts, M. T., Ackman, R. G., Holub, B. J., 2001.** “Essential fatty acids” in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 122–137.
- Baker, R.T.M., Davies, S.J., 1996.** Increased production of docosahexaenoic acid (22: 6n-3, DHA) in catfish nutritionally stressed by the feeding of oxidized oils and the modulatory effect of dietary α -tocopheryl acetate. *J. Fish Biol.* 49, 748– 752.

- Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, R. K., 1999.** Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science* 77(5), 658-666.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., Bush, A. I., 2004.** Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery* (3), 205-214.
- Barua, A.B., Kostic, D., Olson, J.A., 1993.** New simplified procedures for the extraction and simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols and carotenoids in human serum. *J. Chromatography* 617, 257-264.
- Bast, A., Haanen, G. R., VandenBerg, H., 1998.** Antioxidant effects of carotenoids. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 68, 399–403.
- Bell, J.G., D.R., Macdonald, F.M., Sargent, J.R., 1994.** Effect of supplementation with (20:3n-6), (20:4n-6) and (20:5n-3) on the production of prostaglandin-e and prostaglandin-f on the 1-series, 2-series and 3-series in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Act.* 1211, 335-342.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., Macdonald, F.M., Sargent, J.R., 1995.** Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 139-151.
- Bell, J.G., Fardnale, B.M., Bruce, M.P., Navas, J.M., Carrillo, M., 1997.** Effects of broodstocks dietary lipid on fatty acid composition of eggs from sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 149, 107-119.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 2000.** Depletion of a-tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 130, 1800–1808.
- Bell, J.G., Sargent, J.R., 2003.** Araquidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218, 491-499.

- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estévez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R. 2003a.** Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211-220.
- Bell, J.G., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R. 2003b.** Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh in fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil “wash out”. *Aquaculture* 218, 515-528.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., González, M.M., Fernández-Palacios, H., 1999.** Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* 179, 265-275.
- Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Hernández Blanco, I., Hoffmann, T., Martin, H. D., Mayer, B., Noack, P., Ruck, C., Schmidt, M., Schülke, I., Sell, S., Ernst, H., Haremza, S., Seybold, G., Sies, H., Stahl W., Walsh R., 2001.** Quantitative assessment of antioxidant properties of natural phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The carotene in antioxidant functions. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 559-568.
- Biesalski, H.K., 1992.** Vitamins and carotenoids as biological antioxidants. 4th Forum on Livestock Nutrition. 4-5 November 1992, Basf Fine Chemicals.
- Bjerkeng, B., 2000.** Carotenoid pigmentation of salmonid fishes - recent progress. In: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 de Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Bjerkeng, B., Hatlen, B., Jobling, M., 2000.** Astaxanthin and its metabolites idoxanthin and crustaxanthin in flesh, skin, and gonads of sexually immature and maturing Arctic charr (*Salvelinus alpinus* (L.)). *Comp. Biochem. Physiol.* 125B, 395–404.

- Bolger, T., Connolly, P.L., 1989.** The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *J. Fish. Biol.* 34, 171-182.
- Boonyaratpalin, M., Unprasert, N., 1989.** Effects of pigments from different sources on colour changes and growth of red *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 79, 375-380.
- Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G., Schlipalius, L. E., 2001.** Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research* 32 (1), 182.
- Booth, M.A., Warner-Smith, R.J., Allan, G.L., Glencross, B.D., 2004.** Effects of dietary astaxanthin source and light manipulation on the skin colour of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). *Aquaculture Research*. 35, 458-464.
- Borowitzka, G.A., Huisman, J.M., Osborn, A., 1991.** Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*: I. Effects of nutrients on growth and cell type. *J. Appl. Phycol.* 3, 295–304.
- Boussiba, S., Fan, L., Vonshak, A., 1992.** Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymol.* 213, 386–391.
- Bragadóttir, M., 2001.** Endogenous antioxidants in fish. Master of Science Thesis, University of Iceland.
- Breithaupt, D.E., Bamedi, A., Wirt, U., 2002.** Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes?. *Comp. Biochem. Physiol.* 132B, 721-728.
- Britton, G. 1995a.** UV/Visible spectroscopy. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds). *Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy*, 13-62. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston.
- Britton, G. 1995b.** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal* 9, 1551-1558.

- Bruce, M., Oyen, F., Bell, G., Asturiano, J.F., Fardnale, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Bromage, N., 1999.** Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture* 177, 85-97.
- Burton, G.W., 1989.** Antioxidant action of carotenoids. *J.Nutr.* 119, 109-111.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Corraze, G., Coves, D., 2000.** Dietary lipid level affects fatty acid composition and hydrolases activities of intestinal brush border membrane in seabass. *Fish. Physiol. Biochem.* 23, 165-172.
- Cárdenas, S., Manchado, M., Naranjo, J. M., 2006.** The redbanded seabream *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae): a new promising species in aquaculture. Abstracts of the World Meeting *AQUA 2006*. "Linking Tradition and Technology. Highest Quality for the Consumer". Fortezza da Basso Convention Centre. Firenze (Florence), Italy. May 9-13, pp: 138.
- Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994.** Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexanoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 128, 315-333.
- Castillo, R., Negré-Sadargues, G., Lenel, R., 1982.** General survey of carotenoids in crustacean. In: Britton, G., Goodwin, T. W., (Eds.), *Carotenoids, Chemistry and Biochemistry*. Pergamon Press, Oxford, UK, 211-224.
- Castriota, L., Finoia, M. G., Andaloro, F., 2005.** Trophic interactions between *Xyrichtys novacula* (labridae) and juvenile *Pagrus pagrus* (sparidae) in the central Mediterranean Sea. *Electronic Journal of Ichthyology* 2, 54-60.

- Cejas J.R., Forés R., Santamaría, F.J., Samper, M., Villamandos, J.E., Jerez, S., 1997a.** Experiencia preliminar de cultivo larvario de bocinegro *Pagrus pagrus* en régimen de cultivo semiintensivo (mesocosmos). Actas VI Congreso Nacional de Acuicultura.
- Cejas J.R., Villamandos, J.E., Jerez, S., Santamaría, F.J., Forés, R., Fernández-Palacios, H., 1997b.** Reproducción de bocinegro *Pagrus pagrus* en cautividad en las islas canarias. Actas VI Congreso Nacional de Acuicultura.
- Cejas, J.R., Pérez, O., Forés, R., Santamaría, F.J., Pérez, S., 1999a.** Aspectos del cultivo larvario semiextensivo de bocinegro (*P.pagrus*). Poster. Actas VII Congr.Nac.Acuicult., pp: 81.
- Cejas, J.R., Forés, R., Samper, M., Villamandos, J.E., Jerez, S., 1999b.** Resultados preliminares de engorde del bocinegro (*P.pagrus*). Poster. Actas VII Congr. Nac. Acuicult., pp: 83.
- Cejas, J.R., Almansa, E., Villamandos, J. E., Badía, P., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2003a.** Lipid and fatty acid composition of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). Aquaculture 216 (1-4), 299-313.
- Cejas, J., Almansa, E., Tejera, N., Jerez, S., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2003b.** Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. Aquaculture 218, 457-469.
- Cejas, J.R., Almansa, E., J.E., Jerez, S., Bolaños, A., Samper, M., Lorenzo, A., 2004a.** Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white seabream, *Diplodus sargus*. Comp. Biochem. Physiol. B 138 (1), 91-102.
- Cejas, J.R., Almansa, E., J.E., Jerez, S., Bolaños, A., Felipe, B., Lorenzo, A., 2004b.** Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. Comp. Biochem. Physiol. B 139 (2), 209-216.

- Chatzifotis, S., Pavlidis, M., Doñate Jimeno C., Vardanis, G., Sterioti, A., Divanach, P., 2005.** The effect of different carotenoid sources on skin coloration of cultured red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Research* 36 (15), 1517-1525.
- Chien, Y. H., Shiau, W. C., 2005.** The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* Bate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 318, 201–211.
- Choubert, G., 1979.** Tentative utilization of Spirulina algae as a source of carotenoid colourings for rainbow trout. *Aquaculture* 18, 135–143.
- Choubert, G., Luquet, P., 1983.** Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) pigmentation. Influence of fat content of the diet. *Aquaculture* 32, 19-26.
- Choubert, G., Heinrich, O., 1993.** Carotenoid pigments of the green alga *Haematococcus pluvialis*: assay on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture* 112, 217–226.
- Choubert, G., Mendes-Pinto, M. M., Morais, R., 2006.** Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effect of dietary astaxanthin and lipid sources. *Aquaculture* 257, 429–436.
- Christiansen, R., Lie, O., Torrissen, O.J., 1995.** Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. First-feeding fry. *Aquacult. Nutr.* 1, 189-198.
- Christiansen, R., 1996.** The effects of astaxanthin on the early life stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Dr. Scient Thesis, University of Bergen, Norway.
- Christie, W.W., 1982.** *Lipids Analysis*, 2nd edn. Pergamon, Oxford.

- Chua T.E., Tech E., 2002.** Introduction and history of cage culture. In: Woo, P. T. K., Bruno, D., W., Lim, L. H. S. (Eds). CAB International 2002. Diseases and disorders of finfish in cage culture, 1-39.
- Copeman, L. A., Parrish, C. C., Brown, J. A., Harel, M., 2002.** Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285-304.
- Coral-Hinostroza, G., Huberman, A., de la Lanza, G., Monroy-Ruiz, J., 1998.** Muscle pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on oil-extracted pigment from langostilla (*Pleuroncodes planipes*) compared with two commercial sources of astaxanthin. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 7, 31–45.
- Coutteau, P. Geurden, I., Camara, M. R., Bergot, P., Sorgeloos, P., 1997.** Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155, 149-164.
- Craig, J.C., 1985.** Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture* 47, 61-88.
- Czeczuga, B., 1980a.** Carotenoids in fish. XXIV. *Sardina pilchardus* Walb. (Clupeidae). *Hydrobiologia* 69 (3), 277-279.
- Czeczuga, B., 1980b.** Carotenoids in fish. XXIII. Syngnathidae family. *Hydrobiologia* 70 (3), 197-199.
- D'Anna, G., Giacalone, V. M., Badalamenti, F., Pipitone, C., 2004.** Releasing of hatchery-reared juveniles of the white seabream *Diplodus sargus* (L., 1758) in the Gulf of Castellammare artificial reef area (NW Sicily). *Aquaculture* 233 (1-4), 251-268.
- Di Mascio, P., Murphy, M. E., Sies, H., 1991.** Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53,194-200.

- Divanach, P., Kentouri, M., Charalambakis, G., Pouget, F., Sterioti, A., 1993.** Comparison of growth performance of six Mediterranean fish species reared under intensive farming conditions in Crete (Greece), in raceways with the use of self feeders. Production, Environment And Quality. Ghent Belgium European Aquaculture Society 1993 no. 18, 285-297.
- Divanach, P., Sterioti, A., Papapetrou, M., Kentouri, M., 1997.** Preliminary results on the larviculture of *Pagrus pagrus* under extensive rearing conditions. Proceedings of 5th Hellenic Symposium on Oceanography and Fisheries. Kavala, Greece, April 15-18. Vol. 2, pp. 187-190.
- Dópido, R., 2006.** Caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica de enterocitos aislados a lo largo del tracto intestinal de la dorada (*Sparus aurata*). Efectos de la deficiencia en n-3 y n-6 PUFA. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de La Laguna. España.
- Elejalde Guerra, J.I., 2001.** Oxidación, entre la vida y la enfermedad. An. Med. Interna (Madrid) 18, 1-4.
- Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1999.** Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids. Aquaculture 180, 321-343.
- Estévez, A., Kaneko, T., Seikai, T., Tagawa, M., Tanaka, M., 2001.** ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachidonic acid-enriched live prey. Aquaculture 192, 309– 319.
- Estévez, A., Vallejo, O., 2003.** Efecto de la densidad de rotífero y del adelanto de la distribución de artemia durante el cultivo larvario del dentón (*Dentex dentex*). Abstracts del IX Congreso Nacional de Acuicultura, 12– 16 Mayo 2003, Cádiz, España. pp. 395– 396.

- Fábregas, J., Domínguez, A., Maseda, A., Otero, A., 2003.** Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 545–551.
- Fan, L., Vonshak, A., Boussiba, S., 1994.** Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 30, 829–833.
- FAO, 2003.** Orientaciones Técnicas Para La Pesca Responsable 5 Supl.1.
- Fernández-Jover, D., López Jimenez, J. A., Sánchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J., Gimenez Casalduero, F., Martínez López, F. J., Dempster, T., 2007.** Changes in body condition and fatty acid composition of wild Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*, Steindachner, 1868) associated to sea cage fish farms. *Marine Environmental Research* 63, 1–18.
- Floyd, R.A., 1990.** Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *The FASEB Journal* 4, 2587-2597.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H., 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Foss, P., Storebakken, T., Austreng, E., Liaaen-Jensen, S., 1987.** Carotenoids in diets for salmonids. V. Pigmentation of rainbow trout and sea trout with astaxanthin and astaxanthin dipalmitate in comparison with cantaxanthin. *Aquaculture* 65, 293-305.
- Fujita, T., Satake, M., Watanabe, T., Kitajima, C., Miki, W., Yamaguchi, K., Konosu, S., 1983.** Pigmentation of cultured red sea bream with astaxanthin diester purified from krill oil. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49(12), 1855-1861.
- Furr, H.C., Clark, R.M., 1997.** Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *J. Nutr. Biochem.* 8, 364-377.
- Galli, C., Marangoni, F., 2006.** N-3 fatty acids in the Mediterranean diet. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 75, 129–133.

- Ganga, R., Bell, J.G., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., 2005.** Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 142, 410 – 418.
- García-García, B., Cerezo, J., 2003.** Variación del índice de condición en función del tipo de tanque de estabulación en el dentón (*Dentex dentex*). Abstracts del IX Congreso Nacional de Acuicultura, 12– 16 Mayo 2003, Cádiz, España. pp. 395– 396.
- Geurden, I., Bergot, P., Schwarz, L., Sorgeloos, P., 1998.** Relationship between dietary phospholipids classes and neutral lipid absorption in newly weaned turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 217-228.
- Gill, I., Valivety, R., 1997a.** Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Trends in Biotechnology* 15 (10), 401-409.
- Gill, I., Valivety, R., 1997b.** Polyunsaturated fatty acids, Part 2: Biotransformations and biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* 15(11), 470-8.
- Giménez, G., Estévez, A., Lahnsteiner, F., Zecevic, B., Bell, J.G., Henderson, R.J., Piñera, J.A., Sanchez-Prado, J.A., 2006.** Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture* 260 (1-4), 232-243.
- Göçer, M., Yanar, M., Kumlu, M., Yanar, Y., 2006.** The effects of red pepper, Marigold flower, and synthetic astaxanthin on pigmentation, growth, and proximate composition of *Penaeus semisulcatus*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30, 359-365.
- Goodwin, T.W., Jamirkon, M., 1954.** Studies in carotenogenesis: II. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochem. J.* 57, 376–381.
- Goodwin, T.W., 1984.** *The Biochemistry of the Carotenoids*, vol. II. Animals, 2nd edn. Chapman & Hall, London, 224 pp.

- Gouveia, L., Gomes, E., Empis, J., 1996.** Potential use of a microalgal (*Chlorella vulgaris*) in the colouring of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Leben Unter Fors* 202, 75–79.
- Gouveia, L., Gomes, E., Empis, J., 1997.** Use of *Chlorella vulgaris* in diets for rainbow trout to enhance pigmentation of muscle. *J. Appl. Aquacult.* 7, 61–70.
- Gouveia, L., Choubert, G., Gomes, E., Rema, P., Empis, J., 1998.** Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source for salmonids: Effect of dietary lipid content on pigmentation, digestibility and muscular retention. *Aquacult. Int.* 6 (4), 269–279.
- Gouveia, L., Choubert, G., Gomes, E., Pereira, N., Santinha, J., Empis, J., 2002.** Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. *Aquacult. Res.* 33, (12) 987-993.
- Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O., Empis, J., 2003.** Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. *Aquaculture Nutrition* 9, 123-129.
- Grigorakis, K., Alexis, M. N., Taylor, K. D. A., Hole, M., 2002.** Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 477–484.
- Guerin, M., Hosokawa, H., 2001.** Pigmentation of red seabream with natural astaxanthin derived from the alga *Haematococcus pluvialis*: comparison with synthetic astaxanthin. *Aquaculture 2001 conference, Book of Abstracts*, 263 p. *Aquaculture conference*, World Aquaculture Society, Lake Buena Vista, Florida, January 2001.
- Guerin, M., Huntley, M. E., Olaizola, M., 2003.** *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* 21, 210-216.
- Ha, B.S., Kang, D.S., Kim, J.H., Choi, O.S., Ryu, H.Y., 1993.** Metabolism of dietary carotenoids and effects to improve the body color of cultured flounder and red sea bream. *Bull. Korean Fish. Soc.* 26(2), 91-101.

- Haila, M. K., Lievonen, M., Heinonen, M., 1996.** Effects of lutein, lycopene, anatto, and γ -tocopherol on autoxidation of triglycerides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2096–2100.
- Halldorsson, A., Haraldsson, G.G., 2004.** Fatty acid selectivity of microbial lipase and lipolytic enzymes from salmonid fish intestines toward astaxanthin diesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81, 347-353.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Press, Oxford, UK.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715-725.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Lölliger, J., Aruoma, O.I., 1995.** The characterization of antioxidants. *Fd. Chem. Toxic.* 33 (7), 601-617.
- Harel, M., Tandler, A., Kissil, G.W., 1994.** The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on eggs composition and egg quality. *Br. J. Nutr.* 72, 45-48.
- Hernández, C. M., Fernández-Palacios, H., Fernández-Palacios, J.E., 1990.** Preliminary study on embryonic and larval development of red porgy, *Pagrus pagrus* (Pisces, Sparidae), under culture conditions. *Vieraea* 19, 215-224.
- Hernández, M.D., Martínez, F.J., Jover, M., García-García, B., 2007.** Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture* 263, 159-167.
- Hernández-Cruz, C. M., Salhi, M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S., González, M.M., Fernández-Palacios, H., 1999.** Rearing techniques for red porgy (*Pagrus pagrus*) during larval development. *Aquaculture* 179, 489-497.

- Hidalgo, M.C., Pérez-Jiménez, A., Morales, A .E., Arizcun, M., Abellán, E., Cardenete G., 2003.** Aspectos nutritivos de la alimentación de juveniles de dentón con dietas experimentales conteniendo distintas fuentes y niveles de hidratos de carbono. Abstracts del IX Congreso Nacional de Acuicultura, 12–16 Mayo 2003, Cádiz, España. pp. 372– 374.
- Horn, D., Rieger, J., 2001.** Organic nanoparticles in the aqueous phase-Theory, experiment, and use. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 4330-4361.
- Horwitz, W., 1980.** *Methods of Analysis*, 13th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Ibeas, C., Izquierdo, M.S., Lorenzo, A., 1994.** Effects of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 127, 177-188.
- Ibeas, C., Cejas, J., Gómez, T., Jerez, S., Lorenzo, A., 1996.** Influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. *Aquaculture* 142, 221-235.
- Ibeas, C., Cejas, J.R., Badía, P., Gómez, T., Lorenzo, A., 1997.** Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio (EPA/ DHA) of dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 150, 91-102.
- Ibrahim, A., Shimizu, C., Kono, M., 1984.** Pigmentation of cultured red sea bream, *Chrysophrys major*, using astaxanthin from antarctic krill, *Euphausia superba*, and a mysid, *Neomysis sp.* *Aquaculture* 38, 45–57.
- Ingle de la Mora, G., 2002.** Incremento al valor agregado de salmónidos a través de su pigmentación con colorantes naturales. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola*

- VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Ito, Y., Kamata, T., Tanaka, Y., Sameshima, M., 1986.** Studies on the improvement of body color of red sea bream *Pagrus major* by astaxanthin and astaxanthin ester. *Suisanzoshoku* 34, 77-80.
- Izquierdo, M.S., 1996.** Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2, 183-191.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001.** Effects of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42.
- Jerez, S., 2006.** Valoración de la calidad de puesta de la dorada (*Sparus aurata*) en función de la edad de los reproductores. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de La Laguna. España.
- Johnson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J., 1980.** *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* 20, 123-134.
- Johnson, E. A., 2003.** *Phaffia rhodozyma* : colorful odyssey. *Int. Microbiol.* 6, 169–174.
- Jørgensen, K., Skibsted, L. H., 1993.** Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Z Lebensm Unters Forsch* 196, 423-429.
- Jover, M., Riera, F., Grau, A., Pastor E., Perez L., Espinos, F. J., 1999.** Resultados preliminares de crecimiento del dentón (*Dentex dentex*) en jaulas flotantes, alimentado con piensos extrusionados de diferente contenido en proteína y lípidos. *AquaTIC* 7.
- Judé, S., Roger, S., Martel, E., Besson, P., Richard, S., Bougnoux, P., Champeroux, P., Le Guennec, J-Y., 2006.** Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: A comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 90, 299–325.

- Kalinowski, T., Robaina, L., Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Izquierdo, M.S., 2005.** Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture* 244, 223– 231.
- Kalogeropoulos, N., Alexis, M. N., Henderson, R.J., 1992.** Effects of dietary soybean and cod –liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 104, 293-308.
- Kang, J. O., Kim, S. J., Kim, H., 2001.** Effect of astaxanthin on the hepatotoxicity, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the liver of CCl₄-treated rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 23(2), 79-84.
- Katayama, T., Ikeda, N., Harada, K., 1965.** Carotenoids in Sea Breams, *Chrysophrys major*, Temminck and schlegel. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 31, 947-952.
- Katayama, T., Shintani, K., Shimaya, M., Imai, S., Chichester, C., 1972.** The Biosynthesis of Astaxanthin-IX. The Transformation of labelled astaxanthin from the diet of sea bream, *Chrysophrys major* Temminck and Schlegel, to their body astaxanthin. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38, 1399-1403.
- Katsuyama, M., Komori, T., Matsuno, T., 1987.** Metabolism of three stereoisomers of astaxanthin in the fish, rainbow trout and tilapia. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 86(1), 1-5.
- Kentouri, M., Koumoundourus, G., Divanach, P., Sterioti, A., 1992.** The embryonic development of red porgy (*Pagrus pagrus*) and of common dentex (*Dentex dentex*) in Crete. C.I.E.S.M. XXXIIIe Congress-Assemble Pleniére Triest, 12-17 Oct. 1992.
- Kentouri, M., Papandroulakis, N., Divanach, P., 1995.** Specific diversification in Greek finfish mariculture. Proceedings of the seminar of the CIHEAM network on socio-economic and legal aspects of aquaculture in the mediterranean (SELAM), Montpellier (France), 17-19 May 1995.

- Kiokias, S., Gordon, M., 2003.** Dietary supplementation with a natural carotenoid mixture decreases oxidative stress. *European Journal of Clinical Nutrition* 57, 1135–1140.
- Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Wahli, P. D. W., Willson, T. M., Lenhard, J. M., Lehmann, J. M., 1997.** Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ (nuclear receptor/ligand/transcription/fibrate). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4318–4323.
- Kodrie-Brown, A., 1998.** Sexual dichromatism and temporary color changes in the reproduction of fishes. *Amer. Zool.* 38, 70-81.
- Kolios, P., Kiritsis, S., Katribusas, N., 1997.** Larval-rearing and grow out of the red porgy (*Pagrus pagrus*) in the Riopesca hatchery (Greece). *Hydrobiologia* 358 (1-3), 321-325.
- Koven, W.M., Kissil, G.W., Tandler, A., 1989.** Lipid and n-3 HUFA requirements of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture* 79, 185-191.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W., Skalan, D., Friezlander, O., Harel, M., 1990.** The effect of dietary of (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 91, 131-141.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W., Skalan, D., 1992.** The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larvae *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* 104, 91-104.
- Krajnovic-Ozretic, M., Najdek, M., Ozretic, B., 1994.** Fatty acids in liver and muscle of farmed and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 611 – 617.
- Krinsky, N.I., 1993.** Actions of carotenoids in biological systems. *Annu.Rev. Nutr.* 13, 561-587.

- Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M., Utsumi, K., 1990.** Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem. Pys. & Med. NMR.* 22, 27-38.
- Labbe, C., Loir, M., Kaushik, S., Maisse, G., 1991.** The influence of both rearing temperature and dietary lipid origin on fatty acid composition of spermatozoan polar lipids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Effect on sperm cryopreservation tolerance. In: *Fish Nutrition in Practice* (INRA ed.), Biarritz (France), June 24-27, 1991.
- Labropoulou, M., Machias, A., Tsimenides, T., 1999.** Habitat selection and diet of juvenile red porgy, *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). *Fish Bull.* 97, 495–507.
- Lambertsen, G., Braekkan, O. R., 1971.** Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. *J Sci. Food Agric.* 22, 99-101.
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., Wolk, A., 2004.** Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 935– 45.
- Latscha, T., 1990.** Carotenoids – Their nature and significance in animal feeds. Roche reports: 110 pp.
- Latscha, T., 1991.** Carotenoids in aquatic animal nutrition. Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop. Thailand and Indonesia, September 19-25, 1991, American Soybean Association, Singapore, pp. 68-79.
- Liao, W.L., Nur-E-Borhan, S.A., Okada, S., Matsui, T., Yamaguchi, K., 1993.** Pigmentation of cultured black tiger prawn by feeding with a Spirulina supplemented diet. *Nippon Suisan Gakkaishi/Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 59, 165–169.
- Liebler, D. C., 1993.** Antioxidant reactions of carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 691, 20-31.
- Linares, F., Olmedo, M., Peleteiro, J. B., 2002.** Biochemical composition of blackspot seabream larvae, *Pagellus bogaraveo*, fed with rotifer enriched with three different microalgae. *European Aquaculture Society. Special publication* 32, 301-303.

- Linares, F., Olmedo, M., Peleteiro, J. B., 2003.** Crecimiento y composición bioquímica de larvas de besugo, *Pagellus bogaraveo*, alimentadas con artemia enriquecida con tres microalgas diferentes. Abstracts del IX Congreso Nacional de Acuicultura, 12– 16 Mayo 2003, Cádiz, España. pp. 459– 461.
- Lorenz, T., 1998.** A review of astaxanthin as a carotenoid and vitamin source for sea bream. BioAstin™ Technical Bulletin #052.
- Lorenz, T., 2000.** Astaxanthin, nature's super carotenoid. BioAstin™ Technical Bulletin #062.
- Lorenz, T., Cysewski, G. R., 2000.** Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in Biotechnology 18, 160-167.
- Mallampalli, R.K., Salome, R.G., Spector, A.A., 1994.** Regulation of CTP: cholinephosphate cytidyltransferase by polyunsaturated n-3 fatty acids. Am. J. Physiol. 267, 641-648.
- Manooch, C.S., 1975.** A study of taxonomy, exploitation, life story, ecology and tagging of the red porgy *Pagrus pagrus* L., of the Carolinas. PhD thesis, North Carolina State University, Raleigh, 275 pp.
- Maragoudaki, D., Paspatis, M., Kentouri, M., 1999.** Influence of stocking density on growth of juvenile red porgy *Pagrus pagrus* under different feeding conditions. Aquacult. Res. 30 (7), 501-508.
- Martín, M.V., 2003.** Estudio de la influencia de los ácidos grasos n-3 HUFA de la dieta en la composición corporal de reproductores de dorada (*Sparus aurata* L.) durante el desarrollo gonadal. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de La Laguna. España.
- Martin, H.D., Ruck, C., Schmidt, M., Sell, S., Beutner, S., Mayer, B., Walsh, R., 1999.** Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. Pure Appl. Chem. 71, 2253-2262.

- Matsui, S., Tanabe, T., Furuichi, M., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., 1992.** Reduction of black lines in the muscle of cultured red sea bream and improvement of the body colour. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 1459-1464.
- Matsuno, T., 1991.** Xanthophylls as precursors of retinoids. *Pure & Appl. Chem.* 63 (1), 81-88.
- Matsuno, T., 2001.** Aquatic animal carotenoids. *Fisheries science* 67, 771-783.
- McEvoy, L.A., Estévez, A., Bell, J.G., Shields, R.J., Gara, B., Sargent, J.R., 1998a.** Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acids on the pigmentation success of Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Bull. - Aquac. Assoc. Can.* 98-4, 17– 20.
- McEvoy, J., Bell, J. G., Sargent, J. R., 1998b.** Alternative carotenoid pigment sources for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Abstracts VIII International symposium on nutrition and feeding of fish. Recent Advances in finfish & crustacean nutrition. Las Palmas de Gran Canaria, 1 -4 junio.
- McNulty, H. P., Byun, J., Lockwood, S. F., Jacob, R. F., Mason, R. P., 2007.** Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1768 (1), 167-174.
- Mena-Sellés, C., García-García, B., 2002.** Importancia de la proteína vegetal en la dieta natural de poblaciones salvajes de Sargo picudo *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777): sus implicaciones en el cultivo intensivo. *AquaTIC* 17.
- Méndez, E., Anastasiadis, P., Kentouri, M., Pavlidis, M., Divanach, P., 1995.** Preliminary data on spawning activity of five mediterranean teleost species kept in captivity in Crete (Greece). En: Castelló, F., Calderer, A. (Eds.), *Actas V Congreso Nacional de Acuicultura*, San Carles de la Rápita, Spain, pp. 398-403.

- Meyers, S.P., 1994.** Developments in world aquaculture, feed formulations, and role of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66, 1069–1076.
- Miki, W. 1991.** Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure & Appl. Chem.* 63, 141-146.
- Miki, W., Yamaguchi, K., Konosu, S., Takane, T., Satake, M., Fujita, T., Kuwabara, H., Shimeno, S., Takeda, M., 1985.** Origin of tunaxanthin in the integument of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Comp.Biochem. Physiol.* 80B, 195-201.
- Mnari, A., Bouhlel, I., Chraief, I., Hammami, M., Romdhane, M.S., El Cafsi, M., Chaouch, A., 2007.** Fatty acids in muscles and liver of Tunisian wild and farmed gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Food Chemistry* 100, 1393–1397.
- Mori, T., Makabe, K., Yamaguchi, K., Konosu, S., Arai, S., 1989.** Comparison between krill astaxanthin diester and synthesised free astaxanthin supplemented to diets in their absorption and deposition by juvenile coho salmon (*Onchorynchus kisutch*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 93 (2), 255-258.
- Morimoto, T., Amano, T., Okamoto, M., 1989.** The accumulation of pigments from paprika and other sources in the integument of fancy red carp, *Cyprinus carpio*. *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Toba, Japan, Aug. 28– Sept. 1, 385– 397.
- Mourente, G., Odriozola, J.M., 1990a.** Effects of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 8, 93-101.
- Mourente, G., Odriozola, J. M., 1990b.** Effect of broodstock diets on total lipids and fatty acid composition of larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) during yolk sac stage. *Fish Physiol. Biochem.* 8, 103-110.

- Mourente, G., Tocher, D.R., 1993.** The effects of weaning on to a dry pellet diet on brain lipid and fatty acid composition in post-larval gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 104, 605-611.
- Mourente, G., Rodríguez, A., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1993.** Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 112, 79-98.
- Muñoz, J. L., Benhamou, Y., Lozano, I., Padilla, F., Cárdenas, S., 2005.** Cultivo de juveniles de hurta *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae) entre 4 y 9 meses de edad. Abstracts del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17–21 Octubre 2005, Valencia, España. pp. 404–405.
- Mylonas, C. C., Papadaki, M., Pavlidis, M., Divanach, P., 2004.** Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. *Aquaculture* 232 (1-4), 637-649.
- Nakazoe, J., Ishii S., Kamimoto, M., Takeuchi, M., 1984.** Effects of supplemental carotenoid pigments on the carotenoid accumulation in young sea bream (*Chrysophrys major*). *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 113, 29-41.
- Navas, J.M., Bruce, M.P., Thrush, M., Farndale, B.M., Bromage, N., Zanuy, S., Carrillo, M., Bell, J.G., Ramos, J., 1997.** The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on eggs quality in the European sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.). *J. Phys. Biol.* 57, 760-773.
- Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000.** Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017-1024.

- Negre-Sadargues, G., Castelo, R., Petit, H., Sancé, S., Martinez, R.G., Milicua, J.C.G., Choubert, G., Trilles, J.P., 1993.** Utilization of synthetic carotenoids by the prawn *Penaeus japonicus* reared under laboratory conditions. *Aquaculture* 110, 151– 159.
- Nishigaki, I., Dmitrovskii, A.A., Miki, W., Yagi, K., 1994.** Suppressive effect of astaxantin on lipid peroxidation induced in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 16, 161– 166.
- O'Connor, I., O'Brien, N. 1998.** Modulation of UVA light-induced oxidative stress by β -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* 16, 226–230.
- Okada, S., Liao, W. L., Mori, T., Yamaguchi, K., Watanabe, T., 1991.** Pigmentation of cultured striped jack reared on diets supplemented with blue-green alga *Spirulina maxima*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 1403–1406.
- Olmedo, M., Linares, F., Peleteiro, J. B. 2002.** Engorde de juveniles de besugo *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768) cultivados en tanques y jaulas. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4), 37-40.
- Olmedo, M., Linares, F., Álvarez-Blázquez, B., Peleteiro, J. B., 2005.** Estado actual del cultivo de besugo, *Pagellus bogaraveo*. Abstracts del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17–21 Octubre 2005, Valencia, España. pp. 356– 357.
- Olsen, E., Henderson, R.J., 1989.** The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double development HPTLC and scanning densitometry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 129, 189– 197.
- Omara-Alwala, T. R., Chen, H. M., Ito, Y., Simpson, K. L., Meyers, S. P., 1985.** Carotenoid pigment and fatty acid analyses of crawfish oil extracts. *J. Agric. Food Chem.* 33, 260-263.

- Ozorio, R. O. A., Valente, L. M. P., Pousao-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2006.** Growth performance and body composition of white seabream (*Diplodus sargus*) juveniles fed diets with different protein and lipid levels. *Aquaculture Research* 37 (3), 255 -263.
- Padilla, F., Muñoz, J., Cárdenas, S., 2005.** Engorde de la hurta *Pagrus auriga* en jaulas. Abstracts del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17–21 Octubre 2005, Valencia, España. pp. 360– 361.
- Pajuelo, J. G., Lorenzo, J.M., 1996.** Life history of the red porgy *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae) off the Canary Islands, central east Atlantic. *Fisheries Research* 28, 163-177.
- Palozza, P., Krinsky, N. I., 1992.** Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *Methods in enzymology* 213, 403- 420.
- Pastor, E., Grau, A., 2002.** Efecto de la frecuencia de alimentación en alevines de dentón *Dentex dentex* Linnaeus, 1758 durante la fase de preengorde. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4), 115-117.
- Pavlidis, M., Papandroulakis, N., Divanach, P., 2006.** A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: preliminary results for coloration of red skin Sparidae. *Aquaculture* 258, 211-219.
- Peleteiro, J.B., Olmedo, M., Álvarez-Blázquez, B., 2000.** Culture of *Pagellus bogaraveo*: Present knowledge, problems and perspectives. CIHEAM. FAO. Cahiers options méditerranéennes 47, 141-151.
- Peleteiro, J. B., Olmedo, M., Alvarez-Blázquez, B., Linares, F., 2002.** Reproduction control of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* B., in captivity. *European Aquaculture Society. Special publication* . 32, 424-426.
- Pérez, M.J., Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Jerez, S., Lorenzo, A., 2007.** Lipid and fatty acid content in wild white seabream (*Diplodus sargus*) broodstock at different stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 146, 187-196.

- Piedecausa, M.A., Mazón, M.J., García García, B., Hernández, M.D., 2007.** Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture* 263, 211-219.
- Ponce-Palafox, J. T., Arredondo-Figueroa, J .L., Vernon-Carter, E. J., 2004.** Pigmentación de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) con carotenoides de flor de Cempasuchil (*Tagetes erecta*) en comparación con la astaxantina. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 3, 219-225.
- Prieto, M., Castaño, F., Sierra, J., Logato, P., Botero, J., 2006.** Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos: Copépodos y mesocosmos. *Rev.MVZ Córdoba* 11 (1), 30-36.
- Psota, T. L., Gebauer, S. K., Kris-Etherton, P., 2006.** Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk. *The American Journal of Cardiology* 98 (4A), 1-18.
- Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., Olsen, Y., 1997.** The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103-115.
- Rajasingh, H., Øyehaug, L., Våge, D. I., Omholt, S.W., 2006.** Carotenoid dynamics in Atlantic salmon. *BMC Biology* 4(10), 1-15.
- Rao, AV., Agarwal, S., 1998.** Bio-availability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutrition Cancer* 31, 199–203.
- Reiffel, J. A., McDonald, A., 2006.** Antiarrhythmic Effects of Omega-3 Fatty Acids. *The American Journal of Cardiology* 98 (4A), 50-60.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G., Olsen, Y., 1997.** A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155, 207-221.

- Rinchard, J., Czesny, S., Dabrowski K., *En prensa.*** Influence of lipid class and fatty acid deficiency on survival, growth, and fatty acid composition in rainbow trout juveniles. *Aquaculture*.
- Robin, J.H., Skalli, A., 2007.** Incorporation of dietary fatty acid in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) — A methodological approach evidencing losses of highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 263, 227-237.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Izquierdo, M.S., Mora, J., Lorenzo, A. y Fernandez-Palacios, H., 1993.** Essential fatty acid requirements of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management* 24, 295-304.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Lorenzo, A., Izquierdo, M.S., Cejas, J.R., 1994.** n-3 HUFA requirement of larval gilthead seabream *Sparus aurata* when using high levels of eicosapentaenoic acid. *Comp. Biochem. Physiol. B* 107, 693-698.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Díaz, M., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Lorenzo, A., 1997.** Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. *Aquaculture* 150, 77-89.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badía, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Lorenzo, A., 1998a.** The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture* 169, 9-23.
- Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Badía, P., Samper, M., Lorenzo, A., 1998b.** Influence of n-3 highly unsaturated fatty acid deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 177-187.
- Rodríguez, C., Acosta, C., Badía, P., Cejas, J. R., Santamaría, F. J., Lorenzo, A., 2004.** Assessment of lipid and essential fatty acids requirements of black seabream

- (*Spondyliosoma cantharus*) by comparison of lipid composition in muscle and liver of wild and captive adult fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 139, 619–629.
- Rueda, F. M., Lopez J.A., Martínez, F. J., Zamora, S., Divanach, P., Kentouri, M., 1997.** Fatty acids in muscle of wild and farmed red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture Nutrition* 3 (3), 161-165.
- Rueda, F. M., Martínez, F.J., Zamora, S., Kentouri, M., Divanach, P., 1998.** Effect of fasting and refeeding on growth and body composition of red porgy, *Pagrus pagrus* L.. *Aquacult. Res.* 29(6), 447-452.
- Saavedra, M., Conceição, L.E.C., Pousão-Ferreira, P., Dinis, M.T., 2006.** Amino acid profiles of *Diplodus sargus* (L., 1758) larvae: Implications for feed formulation. *Aquaculture* 261(2), 587-593.
- Saito, A., Reiger, L. W., 1971.** Pigmentation of brook trout by feeding dried crustacean wastes. *J. Fish Res.Can.* 28, 509-512.
- Sanderson, G.W., Jolly, S.O., 1994.** The value of Phaffia yeast as a feed ingredient for salmonid fish. *Aquaculture* 124, 193– 200.
- SanGiovanni, J. P., Chew, E.Y., 2005.** The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 24, 87–138.
- Santocono, M., Zurria, M., Berrettini, M., Fedeli, D., Falcioni, G., 2006.** Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 85, 205–215.
- Sargent, J.R., Bell, M.V., Tocher, D.R., 1993.** Docosahexaenoic acid and development of brain and retina in marine fish. *Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects.* Drevon C.A., Bakaas I. and. Krokan H.E. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995.** Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 183-198.

- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997.** Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., McEvoy, L.A., Tocher, D.R., Estévez, A., 1999.** Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191-199.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002.** The lipids. En: Halver, H.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish nutrition*, 3rd ed. Elsevier, USA, 181-257.
- Schiedt, K., 1998.** Absorption and metabolism of carotenoids in birds, fish and crustaceans. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds), *Carotenoids*, vol 3. Biosynthesis and metabolism. Birkhäuser, Basel, Switzerland, pp. 285-358.
- Schiedt, K., Leuenberger, F. J., Vecchi, M., Glinz, E., 1985.** Absorption retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout salmon and chicken. *Pure and Applied Chemistry* 57, 685-692.
- Schmidt, E. B., Rasmussen, L. H., Rasmussen, J. G., Joensen, A. M., Madsen, M. B., Christensen, J. H., 2006.** Fish, marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease: A minireview with focus on clinical trial data. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75, 191–195.
- Schneider, R., Hardy, R.W., Brannon, E. L., 1979.** The use of dietary supplements to improve the flesh color of salmonids. *Research in Fisheries, Annual report of the College of Fisheries, University of Washington, Seattle*, 65.
- Scott, T.M., Rasco, B.A., Hardy, R.W., 1994.** Stability of krill meal, astaxanthin, and canthaxanthin color in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during frozen storage and cooking. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 3, 53-63.
- Sérot, T., Gandemer, G., Demaimay, M., 1998.** Lipid and fatty acid compositions of muscle from farmed and wild adult turbot. *Aquac. Int.* 6, 331– 343.

- Shahidi, F., Metusalach, Brown J. A., 1998.** Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science* 38(1), 1-67.
- Shanta, N.C., Decker, E.A., 1994.** Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of the A.O.A.C International* 77(2), 421-424.
- Sies, H., 1997.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291-295.
- Silva, P., Andrade, C. A. P., Timóteo, V. M. F. A., Rocha, E., Valente, L. M. P., 2006.** Dietary protein, growth, nutrient utilization and body composition of juvenile blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich). *Aquaculture Research* 37 (10), 1007–1014.
- Simpson, K.L., Kamata, T., 1979.** Use of carotenoids in fish feeds. *Proceedings of World Symposium on Finfish Nutrition and Feed Technology, Hamburg, 20–23 June, 1978.* Volume II, Heenemann, Berlin, 415–424.
- Simpson, K.L., Katayama, T., Chichester, C.O., 1981.** Carotenoids in fish feeds. In: Bauernfeind, J.C., (Ed.), *Carotenoids as colourants and vitamin A precursors.* Academic Press, London and New York, 463–538.
- Skalli, A., Robin, J. H., 2004.** Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture* 240, 399-415.
- Skalli, A., Robin, J. H., Le Bayon, N., Le Delliou, H., Person-Le Ruyet, J., 2006.** Impact of essential fatty acid deficiency and temperature on tissues' fatty acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 255, 223-232.
- Skrede, G., Storebakken, T., 1986.** Characteristics of color in raw, baked and smoked wild and pen-reared Atlantic salmon. *J. Food Sci.* 51, 804-808.
- Smith, R. C., Baker, K. S., 1978.** Penetration of UV-B and biologically effective dose rates in natural waters. *Photochem. Photobiol.* 29, 311-323.

- Soejima, T., Katayama, T., Simpson, K.L., 1980.** The carotenoid composition of eight geographical strains of *Artemia* and the effect of diet on the carotenoid composition of *Artemia*. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), International Study on *Artemia*: XII. The Brine Shrimp *Artemia*, Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology, vol. 2. Universa Press, Wetteren, Belgium. 613 pp.
- SOFIA 2004.** Estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). Informe, FAO Fisheries Department.
- Sommer, T.R., Potts, W.T., Morrissy, N.M., 1990.** Recent progress in the use of processed microalgae in aquaculture. *Hydrobiologia* 204-205, 435-443.
- Sommer, T.R., Potts, W.T., Morrissy, N.M., 1991.** Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout. *Aquaculture* 94, 79–88.
- Sommer, T.R., Da Souza, F.M.L., Morrissy, N.M., 1992.** Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture* 106, 63–74.
- Spinelli, J., Lehman, L., Wieg, D., 1974.** Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. *J. Fish Res. Board Can.* 31, 1025–1029.
- Spinelli, J., Mahnken, C., 1978.** Carotenoid deposition in penreared salmonids fed diets containing oil extracts of red crab (*Pleuroncodes planipes*). *Aquaculture* 13, 213–223.
- Stahl, W., Sies, H., 2005.** Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740, 101– 107.
- Storebakken, T., No, H. K., 1992.** Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture* 100, 209–229.
- Storebakken, T., Foss, P., Schiedt, K., Austreng, E., Liaaen-Jensen, S., Manz, U., 1987.** Carotenoids in diets for salmonids. IV. Pigmentation of Atlantic salmon with astaxanthin, astaxanthin dipalmitate and canthaxanthin. *Aquaculture* 65, 279-292.

- Storebakken, T., Sørensen, M., Bjerkeng, B., Hiu, S., 2004.** Utilization of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of enzymatic cell wall disruption and feed extrusion temperature. *Aquaculture* 236, 391–403.
- Tacon, A.G., 1981.** Speculative review of possible carotenoid function in fish. *Prog. Fish. Cult.* 43(4), 205-208.
- Tanaka, Y., Katayama, T., Simpson, K.L., Chichester, C.O., 1976.** The biosynthesis of astaxanthin – XX. The carotenoids in marine red fish and the metabolism of the carotenoids in sea bream (*Chrysophrys major* (Temminck and Schlegel)). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 42(10), 117-1182.
- Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Couvreur, P., Tew, K.D., 2002.** Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother* 56, 215–222.
- Tejera, N., Cejas, J.R., Jerez, S., Rodríguez, C., Bolaños, A., Santamaría, F.J., Lorenzo, A., 2003.** Efecto de diferentes fuentes de astaxantina en la dieta sobre la pigmentación de alevines de bocinegro (*Pagrus pagrus*). Abstracts del IX Congreso Nacional de Acuicultura, 12–16 Mayo 2003, Cádiz, España, pp. 468-469.
- Tejera, N., Cejas, J.R., Bolaños, A., Rodríguez, C., Jerez, S., Villamandos, J.E., Lorenzo, A., 2005.** Los carotenoides en la pigmentación del bocinegro (*Pagrus pagrus*). Abstracts del X Congreso Nacional de Acuicultura, Comunicación oral, 17–21 Octubre 2005, Valencia, España. pp. 42-43.
- Tejera, N., Cejas, J. R., Rodríguez, C., Bjerkeng, B., Jerez, S., Bolaños, A., Lorenzo A., 2007.** Pigmentation, carotenoids, lipid peroxides and lipid composition of skin of red porgy (*Pagrus pagrus*) fed diets supplemented with different astaxanthin sources. *Aquaculture*, doi:10.1016/j.aquaculture.2007.01.019.

-
- Terao, J., 1989.** Antioxidant activity of B-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 24 (7), 659-661.
- Tinoco, J., 1982.** Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. *Prog. Lipid Res.* 21(1), 1-45.
- Tocher, D.R., 2003.** Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11 (2), 107-184.
- Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1987.** The effect of calcium ionophore A23187 on the metabolism of arachidonic and eicosapentaenoic acids in neutrophils from a marine fish rich in n-3 (polyunsaturated fatty acid). *Comp. Biochem. Physiol. B* 87, 733-739.
- Torrissen, O.J., 1984.** Pigmentation of salmonids – Effect of carotenoids in eggs and start-feeding diet on survival and growth rate. *Aquaculture* 43, 185-193.
- Torrissen, O.J., 1985.** Pigmentation of salmonids: factors affecting carotenoid deposition in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 46, 133-142.
- Torrissen, O.J., 1989.** Pigmentation of salmonids – Interactions of astaxanthin and cantaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. *Aquaculture* 79, 363-374.
- Torrissen, O.J., 1990.** Biological activities of carotenoids in fishes. In: Takeda, M., Watanabe, T., eds. *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish, (pp. 337-399). Tokyo University of Fisheries, Tokyo.
- Torrissen, O., Braekkan, O.R., 1979.** The utilization of astaxanthin-forms by rainbow trout (*Salmo gairdneri*), in *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Vol. 2, Eds. Halver, J. E., Thiews, K. H. Heenemann GmbH & Co., Berlin 42, 377.
- Torrissen, O.J., Christiansen, R., 1995.** Requiriments for carotenoids in fish diets. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 225-230.
- Torrissen, O.J., Hardy, R. W., Shearer, K. D., 1989.** Pigmentation of salmonids. Carotenoid deposition and metabolism. *Critical Reviews in Aquatic Sciences* 1 (2), 209-225.

- Tsushima, M., Nemoto, H., Matsuno, T., 1998.** The accumulation of pigments from paprika in the integument of goldfish *Carassius auratus*. *Fish. Sci.* 64, 656– 657.
- Vagner, M., Infante, J.L. Zambonino, Robin, J.H., Person-Le Ruyet, J., 2007.** Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage? *Aquaculture*, doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.031.
- Vaidyanathan, V.V., Rao, K.V., Sastry, P.S., 1994.** Regulation of diacylglycerol kinase in rat brain membranes by docosahexaenoic acid. *Neurosci. Lett.* 179 (1-2), 171-174.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1), 44-84.
- Van der Salm, A.L., Martínez, M., Flik G., Wendelaar Bonga, S.E., 2004.** Effects of husbandry conditions on the skin colour and stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 241, 371–386.
- Vassallo-Agius, R., Watanabe, T., Satoh, S., Kiron, V., Imaizumi, H., Yamazaki, T., Kawano, K., 2001.** Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for broodstock yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquac. Res.* 32 (Suppl. 1), 263– 272.
- Vassallo-Agius, R., Watanabe, T., Imaizumi, H., Yamazaki, T., 2002.** Spawning performance of yellowtail fed dry pellets containing paprika and squid meal. *Fish. Sci.* 68, 230– 232.
- Vecchi M., Muduna, V., Glinz. E., 1987.** HPLC separation and determination of astacene, semiastacene, and other keto-carotenoids. *J. High Res. Chrom. and Chrom. Commun.* 10, 348- 351.

- Vernon-Carter, J., Palafox, J.T.P., Islas, R.P., 1994.** Bioensayo de pigmentación de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con extractos de chile ancho (*Capsicum annuum*). Arch. Latinoam. Nutr. 44, 252-255.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., Bell, J. G., 2005a.** The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. Aquaculture 249, 353–365.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., 2005b.** Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquaculture 245, 193–209.
- Wang, C., Harris, W. S., Chung, M., Lichtenstein, A. H., Balk, E. M., Kupelnick, B., Jordan, H. S., Lau, J., 2006a.** n₃ Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. Am J Clin Nutr. 84, 5–17.
- Wang, Y-J., Chien, Y-H., Pan, C-H., 2006b.** Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. Aquaculture 261 (2), 641-648.
- Watanabe, T., Takeuchi, T., Saito, M., Nishimura, K., 1984.** Effect of low protein-high calory or essential fatty acid deficiency diet on reproduction of rainbow trout. Nippon Suissan Gakkaishi 50, 1207-1215.
- Wenk, M. R., 2006.** The emerging field of Lipidomics Nature reviews, Drug discovery 4, 594-610.
- Woodall, A. A., Britton, G., Jackson, M. J., 1997.** Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. Biochimica et Biophysica Acta 133, 575–586.

- Yanar, M., Kumlu, M., Celik, M., Yanar, Y., Tekelioglu, N., 1997.** Pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with carotenoids from red pepper. Israeli J. Aquacult. Badmidgeh 49, 193-198.
- Yanar, Y., Büyükçapar, H., Yanar, M., M., Göcer, 2007.** Effect of carotenoids from red pepper and marigold flower on pigmentation, sensory properties and fatty acid composition of rainbow trout. Food Chemistry 100, 326–330.
- Yanishlieva, N.V., Aitzetmüller, K., Raneva, V.G., 1998.** β -Carotene and lipid oxidation. Fett/Lipid 100, 444-462.
- Yong, Y.Y.R., Lee, Y.K., 1991.** A possible role of photoprotection for secondary carotenoids in the cytoplasm of the green alga *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). Phycologia 30, 257–261.
- Young, A. J., Lowe, G. M., 2001.** Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. Archives of Biochemistry and Biophysics 385 (1), 20–27.
- Young, G. G., Conquer, J., 2005.** Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. Reprod. Nutr. Dev. 45, 1–28.
- Zar, J.H., 1984.** Biostatistical analysis, 2nd. edn. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 718 pp.



Anexos

ANEXO 1. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.I.1.	Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), humedad (%), lípido (% p.s), y composición de clases lipídicas (% del lípido total) de la dieta basal (B) y del camarón (C) (peso húmedo %).	65
Tabla 4.I.2.	Perfil de ácidos grasos del lípido total de la dieta basal (B) y el camarón (C) (peso húmedo %).	66
Tabla 4.I.3.	Peso (g), talla (cm), supervivencia (%), tasa de crecimiento e índice de conversión de los alevines de bocinegro después de 4 meses de alimentación con la dieta basal (B) y la dieta basal suplementada con camarón (B+C)	67
Tabla 4.I.4.	Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), humedad (%) y lípido (% p.s), y composición de clases lipídicas (% del lípido total) de la carcasa de los peces alimentados con las dietas B y B+C (peso húmedo).	69
Tabla 4.I.5.	Perfil de ácidos grasos del lípido total (LT) (peso húmedo %) de la carcasa de bocinegros alimentados con las dietas B y B+C.	71
Tabla 4.I.6.	Perfil de ácidos grasos de los triacilglicéridos (TAG) (peso húmedo %) de la carcasa de bocinegros alimentados con las dietas B y B+C.	72
Tabla 4.I.7.	Perfil de ácidos grasos de la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) (peso húmedo %) de la carcasa de bocinegros alimentados con las dietas B y B+C.	75
Tabla 4.II.1.	Composición proximal (% p.s) de la dieta basal utilizada para formular todos los tratamientos dietarios.	88
Tabla 4.II.2.	Valores analizados ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de astaxantina en las dietas suplementadas.	89
Tabla 4.II.3.	Contenido de lípido total y perfil de clases lipídicas, de la dieta basal (B) y camarón (C).	91
Tabla 4.II.4.	Perfil de ácidos grasos del lípido total de la dieta basal (B) y del camarón (C) (peso húmedo %).	92
Tabla 4.II.5.	Peso (g), talla (cm), supervivencia (%) y factor de condición ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) de los alevines de bocinegro al comienzo de la experiencia y tras 4 meses de alimentación con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.	93

Tabla 4.II.6.	Contenido total de carotenoides y astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), perfil de carotenoides (%) y nivel de peróxidos lipídicos ($\text{meq O}_2\cdot\text{kg}^{-1}$ de lípido) de la piel de peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.....	97
Tabla 4.II.7.	Contenido de humedad y lípido total, y composición de clases lipídicas de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.....	106
Tabla 4.II.8.	Principales ácidos grasos del lípido total (LT) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.	107
Tabla 4.II. 9.	Principales ácidos grasos de los triacilglicéridos (TAG) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.	108
Tabla 4.II.10.	Principales ácidos grasos del total de lípido polar (TP) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N25, N50, CP25, CP50 y B+C.	109
Tabla 4.III.1.	Composición proximal (% p.s) de la dieta basal utilizada para formular todos los tratamientos dietarios.....	118
Tabla 4.III.2.	Valores analizados ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de astaxantina y cantaxantina en las dietas suplementadas.....	119
Tabla 4.III.3.	Contenido de lípido total y perfil de clases lipídicas de la dieta basal (B).....	119
Tabla 4.III.4.	Perfil de ácidos grasos del lípido total de la dieta basal (B).	120
Tabla 4.III.5.	Peso (g), talla (cm), supervivencia (%) y factor de condición ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) de los alevines de bocinegro al comienzo de la experiencia y tras 4 meses de alimentación con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.....	121
Tabla 4.III.6.	Contenido total de carotenoides y astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), perfil de carotenoides (%) y nivel de peróxidos lipídicos ($\text{meq O}_2\cdot\text{kg}^{-1}$ lípido) de la piel de peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50	124
Tabla 4.III.7.	Contenido de humedad y lípido total, y composición de clases lipídicas de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.....	131

Tabla 4.III.8. Principales ácidos grasos del lípido total (LT) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.....	132
Tabla 4.III. 9. Principales ácidos grasos de los triacilglicéridos (TAG) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.	133
Tabla 4.III.10. Principales ácidos grasos del total de lípido polar (TP) (% peso) de la piel de los peces alimentados con las dietas: B, N8, N16, CP8, CP16, CR25 y CR50.	134
Tabla 4.IV.1. Valor analizado ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de astaxantina, composición proximal (% p.s) y perfil de clases lipídicas (% de lípido total) de la dieta suplementada con $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink (CP25).....	144
Tabla 4.IV.2. Perfil de ácidos grasos (%) del lípido total de la dieta suplementada con $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink (CP25).....	145
Tabla 4.IV.3. Peso (g), talla (cm), supervivencia (%) y factor de condición de los alevines de bocinegro procedentes de tanque (T) o jaula (J), al comienzo de la experiencia y tras 17 meses de alimentación con $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina Carophyll® Pink (CP25).....	146
Tabla 4.IV.4. Contenido total de carotenoides y astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), perfil de carotenoides (%) y nivel de peróxidos lipídicos ($\text{meq O}_2\cdot\text{kg}^{-1}$ lípido) de la piel de peces mantenidos en tanque (T) y jaula (J).....	147
Tabla 4.IV.5. Peso (g), Contenido de humedad (%) y lípido total (% p.s), y composición de clases lipídicas (% del lípido total) de la piel de los peces mantenidos en tanque (T) y jaula (J).....	152
Tabla 4.IV.6. Principales ácidos grasos del lípido total (LT) (% peso) de la piel de los peces mantenidos en tanque (T) y jaula (J)	153
Tabla 4.IV.7. Principales ácidos grasos de los triacilglicéridos (TAG) (% peso) de la piel de los peces mantenidos en tanque (T) y jaula (J).....	154
Tabla 4.IV.8. Principales ácidos grasos del total de polares del lípido polar (TP) (% peso) de la piel de los peces mantenidos en tanque (T) y jaula (J)	155

ANEXO 2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Imagen de un ejemplar salvaje de <i>Pagrus pagrus</i>	5
Figura 1.2	Estructura química de algunos carotenoides importantes.	8
Figura 1.3	Estructura química del carotenoide astaxantina	9
Figura 1.4	Estructura y posición de los cromatóforos en la piel de los peces.	10
Figura 1.5	Proceso de formación de algunas especies reactivas del oxígeno.....	13
Figura 1.6	Estados energéticos de la molécula de oxígeno.El nivel energético basal se corresponde con el estado triplete (a), existiendo dos estados posibles para el oxígeno singlete (b) (Floyd, 1990).....	13
Figura 1.7	Reacciones propias del mecanismo de peroxidación lipídica (Burton, 1989)	15
Figura 1.8	Interacción entre el β -caroteno y los ROO \cdot dietarios (propuesto por Yanishlieva et al., 1998; adaptado de Bragadóttir, 2001).....	15
Figura 1.9	Representación de una membrana lipídica artificial conteniendo los carotenoides zeaxantina y β -caroteno (Young y Lowe, 2001).....	17
Figura 1.10	Estructura de los carotenoides astaxantina y zeaxantina en la que se aprecian los sustituyentes que diferencian ambas moléculas (McNulty et al., 2007).....	18
Figura 1.11	Estructura del ácido graso saturado 18:0 o esteárico y del ácido graso monoinsaturado 18:1n-9 u oleico	20
Figura 1.12	Estructura de los ácidos grasos DHA (22:6n-3) y EPA (20:5n-3).....	21
Figura 1.13	Ruta de síntesis del AA [20:4 (n-6)], EPA [20:5 (n-3)] y DHA [22:6 (n-3)] a partir de los ácidos grasos linoleico [18:2 (n-6)] y linolénico [18:3 (n-3)].	22
Figura 1.14	Estructura de ciertos eicosanoides.....	24
Figura 1.15	a.- Grupos químicos que componen la fosfatidilcolina. b.- Estructura típica de un fosfolípido de membrana.	26
Figura 1.16	Estructura típica de un triacilglicérido	26

Figura 1.17	a.- Carophyll [®] Pink añadido a piensos acuícolas. b.- Estructura y aspecto del producto.....	29
Figura 1.18	a.- Células vegetativas de <i>Haematococcus pluvialis</i> ; b.- Cistes que depositan astaxantina en condiciones desfavorables (Lorenz y Cysewski, 2000).	31
Figura 1.19	Vista aérea de la Corporación Cyanotech en la que se observan sus sistemas de cultivo del alga <i>Haematococcus pluvialis</i> en Kailua-Kona, Hawaii. Los distintos colores de los estanques se corresponden con los distintos estadios por los que pasa el alga durante su producción.	33
Figura 1.20	a.- Flor de <i>Tagetes erecta</i> ; b.- Luteína esterificada, forma química en la que se presenta este carotenoide en los pétalos de la flor.	35
Figura 1.21	a.- Aspecto de la <i>Spirulina sp.</i> al microscopio; b.- <i>Spirulina sp.</i> en la naturaleza, c.- Cultivo a gran escala de esta cianofita.....	36
Figura 1.22	a.- Aspecto de <i>Dunaliella salina</i> al microscopio; b.- Producción de esta alga a gran escala	37
Figura 1.23	Aspecto de <i>Chlorella vulgaris</i> al microscopio.....	37
Figura 3.1	Esquema de los análisis realizados por experimento.	44
Figura 3.2	Imagen del equipo de HPLC propiedad de la ULL.....	47
Figura 3.3	Isómeros químicos más importantes de la astaxantina.....	49
Figura 3.4	Imagen del cromatógrafo de gases propiedad de la ULL.....	57
Figura 4.I.1	Metabolismo de los carotenoides, astaxantina y cantaxantina en salmónidos (Torrissen et al., 1989).....	59
Figura 4.I.2	Experimento 1. Esquema del diseño experimental. Fuente de astaxantina: camarón (<i>Plesionika sp.</i>) descongelado, rico en la forma diéster de este carotenoide.	63
Figura 4.I.3	Contenido en carotenoides (mg·kg ⁻¹) de la dieta comercial y del camarón empleados en el Experimento 1.....	64
Figura 4.I.4	Contenido de lípidos neutros y polares de la dieta basal y del camarón (n=3).....	64
Figura 4.I.5	Proporciones de los principales grupos de ácidos grasos de la dieta basal y del camarón (n=3).....	65
Figura 4.I.6	Fotografía de los alevines de bocinegro alimentados con el tratamiento B+C (88% dieta basal, 12% camarón descongelado)	67

Figura 4.I.7	Fotografía de los alevines de bocinegro alimentados con la dieta B (100% dieta basal).....	68
Figura 4.I.8	Contenido total de carotenoides (mg·kg ⁻¹) presente en las carcasas de los peces alimentados con la dieta basal (B) y con la dieta basal suplementada con camarón (B+C), (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos (p< 0,05).	68
Figura 4.I.9	Principales ácidos grasos del lípido total (a) y de los triacilglicéridos (b), (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos (p< 0,05).....	71
Figura 4.I.10	Principales ácidos grasos de la fosfatidilcolina (a) y de la fosfatidiletanolamina (b), (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos (p< 0,05).	74
Figura 4.II.1	Fotografía de los tanques empleados en el experimento 2	84
Figura 4.II.2	Esquema del diseño experimental. Fuentes de astaxantina: Alga <i>Haematococcus pluvialis</i> (NatuRose™, N) rica en astaxantina monoéster; astaxantina sintética libre Carophyll® Pink (CP); 12% camarón (C) (<i>Plesionika sp.</i>) descongelado y rico en astaxantina diéster. B, dieta basal; LT, lípido total; TAG, triacilglicéridos; TP, total de polares.	87
Figura 4.II.3	Contenido en astaxantina (mg·kg ⁻¹) de los tratamientos dietarios empleados.....	89
Figura 4.II.4	Perfil de astaxantina (%) presente en las dietas suplementadas con NatuRose™ (a), camarón (b) y Carophyll® Pink (c).	90
Figura 4.II.5	Contenidos de lípidos neutros y polares en la dieta basal y el camarón, (n=3).	90
Figura 4.II.6	Proporciones de los principales grupos de ácidos grasos de la dieta basal y del camarón.	91
Figura 4.II.7	Fotografía de los peces de los tratamientos ensayados. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg ⁻¹ de astaxantina-NatuRose™ ; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg ⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado.	94
Figura 4.II.8	Fotografías de escamas de peces alimentados con los distintos tratamientos. Cada imagen está identificada en la esquina superior derecha con el tratamiento al que pertenece y el aumento al que fue tomada en el microscopio óptico. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 mg·kg ⁻¹ de astaxantina-NatuRose™ ; CP25 y CP50, 25 ó 50 mg·kg ⁻¹ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado.	95

Figura 4.II.9	Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios: B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	97
Figura 4.II.10	Contenido total de astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	99
Figura 4.II.11	Estructura química del carotenoide tunaxantina.	102
Figura 4.II.12	Perfil de carotenoides (%) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N25 y N50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado, (n=9). A, astaxantina; T, tunaxantina. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	103
Figura 4.II.13	Nivel de peróxidos lipídicos ($\text{meq O}_2\cdot\text{kg}^{-1}$ de lípido) presente en las muestras de piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal; N25 y N50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP25 y CP50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; B+C, 88% dieta basal + 12% camarón descongelado, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	104
Figura 4.III.1	Fotografía de algunos de los tanques empleados en el experimento 3.....	115
Figura 4.III.2	Esquema del diseño experimental. Fuentes de astaxantina: El alga <i>Haematococcus pluvialis</i> (NatuRose™, N) rica en astaxantina monoéster y la astaxantina sintética libre Carophyll® Pink (CP). Fuente de cantaxantina: Carophyll® Red. B, dieta basal; LT, lípido total; TAG, triacilglicéridos; TP, total de polares.	117
Figura 4.III.3	Contenidos en astaxantina y cantaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de los tratamientos dietarios empleados.	118
Figura 4.III.4	Fotografía de los peces de los tratamientos ensayados. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cantaxantina-Carophyll® Red.....	122

Figura 4.III.5	Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cantaxantina-Carophyll® Red, (n=9). * Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	124
Figura 4.III.6	Contenido total de astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cantaxantina-Carophyll® Red, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	125
Figura 4.III.7	Perfil de carotenoides (%) presente en la piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cantaxantina-Carophyll® Red, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	128
Figura 4.III.8	Nivel de peróxidos lipídicos (%) presente en las muestras de piel de los peces alimentados con los distintos tratamientos dietarios. B, dieta basal carente de astaxantina; N8 y N16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-NatuRose™; CP8 y CP16, 8 ó 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink; CR25 y CR50, 25 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cantaxantina-Carophyll® Red, (n=9). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	129
Figura 4.IV.1	a.- Imagen del tanque tipo empleado en esta experiencia. b.- Fotografía de jaulas marinas propiedad de Cedra S.L.L.	141
Figura 4.IV.2	Esquema del diseño experimental. Fuente de astaxantina: astaxantina sintética libre Carophyll® Pink. Experiencia realizada en diferentes sistemas de cultivo, tanque y jaula marina flotante.	143
Figura 4.IV.3	Fotografía de los peces de tanque (a) y jaula (b) alimentados con la dieta CP25 (25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink).	146
Figura 4.IV.4	Contenido total de carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces de tanque y jaula alimentados con 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll® Pink, (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	147

Figura 4.IV.5	Contenido total de astaxantina ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presente en la piel de los peces de tanque y jaula alimentados con $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll [®] Pink, (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	148
Figura 4.IV.6	Perfil de carotenoides (%) presente en la piel de los peces de tanque y jaula alimentados con $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll [®] Pink, (n=6). * Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	149
Figura 4.IV.7	Nivel de peróxidos lipídicos ($\text{meq O}_2\cdot\text{kg}^{-1}$ de lípido) presente en las muestras de piel de los peces de tanque y jaula alimentados con $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de astaxantina-Carophyll [®] Pink, (n=6). *Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	151