

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**ADICIÓN DE DOS NIVELES DE β -CAROTENO EN LA
ALIMENTACIÓN DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.**

TESIS

Que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

RAÚL YÉPIZ VELÁZQUEZ

ENSENADA, B.C. JUNIO DE 1999.

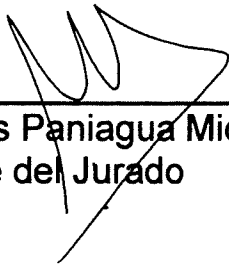
ADICIÓN DE DOS NIVELES DE β -CAROTENO EN LA
ALIMENTACIÓN DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.

TESIS
QUE PRESENTA

Raúl Yépiz Velázquez

para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN
OCEANOGRAFÍA COSTERA


APROBADA POR:



Dr. José de Jesús Paniagua Michel
Presidente del Jurado



Dra. María Teresa Viana
Castrillón
Sinodal Propietario



M.C. Manuel de Jesús
Acosta Ruiz
Sinodal Propietario

Caminante.... son tus huellas, el camino y nada mas
caminante... no hay camino, se hace camino al andar,
al andar se hace camino y al volver la vista atras
se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar.
Caminante no hay camino, sino estelas en la mar
Serrat.

Hay sirena de la mar, si mis redes te alcanzaran
dejarias el coral y vendrias a mi casa
sabes bien que ahi nos faltan las espumas y las algas
si tu quieres lo intentamos, el amor mueve montañas
Victor Manuel.

Porque te quiero a ti, porque te quiero
cerre mi puerta una mañana y me heche a andar
Porque te quiero a ti, porque te quiero
deje los montes y me vine al mar

The reasonable man adapts himself to the world;
the unreasonable man
persists in trying to adapt the world to himself.
Therefore all progress depends on the unreasonable man.
George Bernard Shaw.

DEDICATORIA

A la conjunción de buenas voluntades, sabiduría y humildad, a ese ser que respetamos y tememos, que no podemos ver, pero sabemos que esta ahí y que permite que las cosas sucedan.

A mis padres:

María de la Luz Velázquez con profundo amor y respeto
Manuel Yépiz León tu ausencia solo incrementa tu presencia en mi corazón

A Amelia, mi compañera, por su comprensión, amor y paciencia
A Daniel y Alejandra, nuestros retoños y complemento de nuestra vida.

A mis Hermanos: Guadalupe, Manuel, Julio, Luz María, Socorro, Yadira, Jaime y Gerardo.

Agradecimientos

La culminación de este trabajo fue posible gracias al apoyo, colaboración y voluntad de muchas personas con las cuales me declaro en deuda, espero en su momento poder corresponder a sus enormes consideraciones.

A mi Director de Tesis Dr. José de Jesús Paniagua Michel por sus enseñanzas, motivación, paciencia y sensibilidad. Su ayuda incondicional me fue indispensable para terminar este trabajo.

A mi Sinodal Dra. María Teresa Viana Castrillón, por su integridad académica, por sus revisiones críticas, sugerencias y comentarios que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

A mi Sinodal M.C. Manuel de Jesús Acosta Ruiz por su tiempo, experiencia y observaciones que me apoyaron en todo momento.

Al M.C. Carlos Granados Machuca, por su compañerismo, apoyo en los momentos difíciles y entusiasmo para emprender y realizar lo irrealizable; **SÍ SE PUEDE!**

A los Directores de la Facultad de Ciencias Marinas: Dr. Jorge de la Rosa Velez, M.C. Guillermo Torres Moye, M.C. Eliseo Almanza Heredia y Dr. Roberto Millán Nuñez por impulsar el proyecto de superación del personal académico, cada quien en su momento hizo lo correcto, navegamos en el mismo barco.

Al OCEANÓLOGO Victor Gendrop Funes, no solo por proporcionarme los camarones con los que se realizaron los experimentos, sino por ser amigo y consejero. El compartir a veces no es dividir sino multiplicar.

Al M.C. Marcos Liñan por compartir sus conocimientos sobre carotenoides y al personal del laboratorio de biotecnología del CICESE.

Al la Dra. Elizabeth Orellana Cepeda por su apoyo espiritual, sus consejos y su inducción de confianza que apuntaló mis convicciones en terminar lo que se empieza.

Al Dr. José Zertuche por su sensibilidad, su decidido apoyo y su gran calidad de ser humano.

A los Maestros Graciela Guerra, Ana María Iñiguez, Armando Rodriguez, Raúl Canino, Rigoberto Guardado, Hector Bustos y Dora Waumann por su sincero interes, motivación, apoyo y amistad. La vida es mucho mas llevadera cuando existen personas bondadosas.

A mis compañeros y amigos Arturo Siqueiros, Roberto Escobar, Arturo Esparza, Margarita Cervantes, Enrique Hernandez, Sergio Larios, Francisco Becerril, su motivación y sentido del humor me resultan invaluable.

A todo el personal Administrativo de la Facultad de Ciencias Marinas.

Al Vicerrector de la UABC, Dr. René Andrade Peterson por su atención y consideración en la culminación de mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma de Baja California por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

Al Programa Nacional de Superación del Personal Académico (SUPERA) por la beca proporcionada para mejorar mi desempeño como académico por medio de la Maestría.

RESÚMEN

Los pigmentos carotenoides no son sintetizados *de novo* por los camarones y dependen exclusivamente de los que ingieren en su dieta. El camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, al carecer de carotenoides en su alimentación, puede desarrollar deficiencia de carotenoides, la cual se manifiesta con una pérdida de coloración, que repercute en su presentación como producto de consumo, además de alterar sus procesos fisiológicos. Los carotenoides β -caroteno y astaxantina juegan un papel primordial en este proceso, ya que el β -caroteno se transforma en astaxantina vía reacciones metabólicas y esta le confiere al camarón su característico color rojizo.

El β -caroteno y la astaxantina se consideran las principales fuentes naturales de carotenoides que determinan la pigmentación de los organismos marinos y de los peneidos. Ambas fuentes son producidas *de novo* por las algas y su acumulación masiva es una respuesta a las condiciones de estrés físico-químico (N, temperatura, irradiancia), condición utilizada para la recuperación de pigmentos. De estos pigmentos, el β -caroteno es considerado como el de mayor bioactividad.

Los carotenoides podrian ser considerados nutrientes esenciales en los crustáceos, ya que intervienen en los procesos fisiológicos de muda, reproducción, maduración, fecundidad, por su actividad pro vitamina A, sus propiedades antioxidantes y protección celular de daños fotodinámicos.

En este estudio se incorporó β -caroteno de origen algal, en dos diferentes concentraciones a una dieta comercial, aún cuando no se trabajó bajo condiciones ideales de muestras y réplicas, las observaciones indican, que la concentración mas alta logró elevar la concentración de astaxantina de 0.124 a 0.255 mg/gr y de 0.21 a 0.59 mg/gr en el hepatopáncreas y el integumento respectivamente a un grupo de camarones, mientras que en otro grupo (control) la cantidad de astaxantina disminuyó hasta 0.044 y .015 mg/gr para cada órgano, el análisis estadístico por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis indica que estas diferencias son significativas ($\alpha = 0.05$).

Los cambios en la pigmentación se observaron por cuantificación espectrofotométrica de pigmentos extraídos del hepatopáncreas, el integumento, el músculo y los pedúnculos del camarón con acetona y hexano. Los resultados indican que las concentraciones utilizadas (50 y 100 mg de β -caroteno/100 gr de alimento) son capaces de elevar la pigmentación después de ser suministradas por un período de un mes.

CONTENIDO

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes	3
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. Obtención de Camarones.	12
2. Coeficientes de absorción específica de los carotenoides.	13
3. Inclusiones carotenogénicas.	13
4. Condiciones experimentales.	14
5. Evaluación de parámetros.	15
6. Tratamiento estadístico.	18
III. RESULTADOS	19
Crecimiento y sobrevivencia.	19
Inclusión de β -caroteno en las dietas.	20
Carotenoides en condiciones experimentales.	20
a. β -caroteno.	20
b. Astaxantina.	25
Razones Astaxantina/ β -caroteno.	27
Espectros de absorción y coloración.	27
IV. DISCUSIÓN	38
1. Preparación del alimento con inclusiones de β -caroteno.	38
2. Efectos logrados con la adición de β -caroteno.	40
3. Pigmentación lograda y efectos en la calidad del producto.	44
V. CONCLUSIONES	48
VI. RECOMENDACIONES	49
VII. LITERATURA CITADA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Vías metabólicas del β -caroteno hasta astaxantina en crustáceos de acuerdo a Kurmaly y Latscha (1993).	5
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de extracción de carotenoides.	17
Figura 3. Contenido de β -caroteno en las dietas experimentales.	20
Figura 4. Concentraciones de β -caroteno determinadas en los hepatopáncreas de los camarones <i>L. vannamei</i>	23
Figura 5. Concentraciones de β -caroteno encontradas en los integumentos de los camarones <i>L. vannamei</i>	23
Figura 6. Concentraciones de β -caroteno encontradas en el músculo de los camarones <i>L. vannamei</i>	24
Figura 7. Concentraciones de β -caroteno encontradas en los pedúnculos oculares de los camarones <i>L. vannamei</i>	24
Figura 8. Concentraciones de astaxantina encontradas en los hepatopáncreas de los camarones <i>L. vannamei</i>	26
Figura 9. Concentraciones de astaxantina encontradas en los integumentos de los camarones <i>L. vannamei</i>	26
Figura 10. Concentraciones de astaxantina encontradas en el músculo de los camarones <i>L. vannamei</i>	28
Figura 11. Concentraciones de astaxantina encontradas en los pedúnculos de los camarones <i>L. vannamei</i>	28
Figura 12. Razones Astaxantina/ β -caroteno en función del órgano del camarón	29

Figura 13. Espectros de absorción para los diferentes órganos del camarón <i>L. vannamei</i>	31
Figura 14. Alimento adicionado con β -caroteno.	32
Figura 15. Extractos en hexano de alimento: 1 control, 2 A50 y 3 A100.	32
Figura 16. Extractos por duplicado de: 1 pedúnculo, 2 músculo, 3 integumento, 4 hepatopáncreas.	33
Figura 17. Extractos por duplicado de hepatopáncreas: 1 estanque 2, 2 inicio del experimento y 3 dieta A100.	33
Figura 18. Extractos de hepatopáncreas: 1 control , 2 A50 y 3 A100.	34
Figura 19. Extractos de integumento: 1 control, 2 A50 y 3 A100.	34
Figura 20. Camarones provenientes del estanque 1.	35
Figura 21. Camarones después del experimento: 1 A0, 2 A50, 3 A100.	35
Figura 22. Camarones crudos: 1 A0, 2 A50 y 3 A100.	36
Figura 23. Camarones cocidos: 1 A0, 2 A50, 3 A100.	36
Figura 24. Camarones cocidos sin caparazón: 1 A0, 2 A50 y 3 A100.	37
Figura 25. Detalle de camarones cocidos sin caparazón: 1 A0 y 2 A100.	37

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla I. Crecimiento y sobrevivencia de <i>L. vannamei</i> alimentados con dietas adicionadas con β -caroteno.	19
Tabla II. Concentraciones (mg/gr), máximos y mínimos de β -caroteno y astaxantina para los diferentes órganos del camarón, según su origen.	21
Tabla III. Resultados del análisis de varianza de Kruskal-Wallis para β -caroteno en diferentes partes del camarón. ($\chi^2_{0.05, 2} = 5.99, n=2$) para los diferentes tratamientos.	22
Tabla IV. Resultados del análisis de varianza de Kruskal-Wallis para Astaxantina en diferentes partes del camarón. ($\chi^2_{0.05, 2} = 5.99, n=2$) para los diferentes tratamientos.	25
Tabla V. Colores y concentraciones de β -caroteno y astaxantina para los integumentos de los camarones <i>L. vannamei</i> cocidos.	45

ADICIÓN DE DOS NIVELES DE β -CAROTENO EN LA ALIMENTACIÓN DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.

I. INTRODUCCIÓN

En Peneidos de interés comercial, la nutrición se considera como uno de los factores más importantes que incide en el rendimiento de la producción. Se estima que la alimentación puede llegar a representar el 40 % de los costos de producción de los camarones Peneidos cultivados (CICTUS,1983; Garmendia,1994).

Recientemente, la pigmentación de Peces y crustáceos de interés comercial se considera como uno de los factores de gran influencia, no solo desde el punto de vista antropocéntrico, sino por las injerencias que los pigmentos tienen a nivel de la fisiología de estos organismos (Cortés, 1992).

Numerosos investigadores han estudiado los efectos relacionados a los pigmentos carotenoides en organismos producidos mediante acuicultura, especialmente salmónidos y crustáceos. Esto incluye, funciones como antioxidantes, actividades pro-vitamina A y de refuerzo del sistema inmune, su papel crítico en la reproducción, así como injerencia en las etapas larvarias y poslarvarias. Con el desarrollo a nivel mundial en la acuicultura del camarón y el énfasis en los aspectos nutricionales, se ha incrementado el interés en conocer los efectos de los carotenoides en el metabolismo, sobrevivencia y crecimiento de los crustáceos, además de incrementar su calidad como producto de consumo, (Meyers y Latscha, 1997).

A pesar de que ciertos sectores de la industria alimenticia y de acuicultura suministran fuentes sintéticas de pigmentos carotenoides, existe interés en aprovechar los carotenoides naturales, específicamente algales como colorantes alimenticios, ya que su consumo final supone una dieta más sana. Esta tendencia es iniciada en los setentas en Israel y Australia con la microalga *Dunaliella salina* y posteriormente con *Haematococcus pluvialis*, las cuales son destinadas para la obtención de β -caroteno y astaxantina respectivamente.

La carotenogénesis en ambas especies es inducida bajo condiciones de escaso contenido de nutrientes de nitrógeno, altas salinidades y alta intensidad de luz (Nonomura, 1990; Bernhard, 1990; Ben-Amotz y Avron, 1983; Binkowski *et al.*, 1993; Lee y Soh, 1991). Las microalgas son más eficientes para producirla en comparación a la obtención de carotenoides de otras fuentes naturales, por ejemplo la zanahoria y el aceite rojo de palma. (Kläui, 1981; Nonomura, 1990).

Este cambio en el uso de colorantes naturales se debe a que muchos colorantes artificiales pueden causar reacciones alérgicas en el ser humano. Además, se ha encontrado que algunos de ellos tienen propiedades carcinógenas (Bernhard, 1990).

Evidencias recientes señalan que las fuentes naturales de carotenoides repercuten positivamente en el crecimiento, sistema reproductivo e inmunológico de los consumidores (Cortés, 1992; Miki *et al.*, 1994).

La creciente susceptibilidad a enfermedades y la aparición del síndrome de pigmentación (pérdida progresiva de la coloración natural o la llamada enfermedad azul) en los camarones de cultivo se debe a la carencia de

carotenoides en su alimentación, esto deprecia su valor en relación a los camarones capturados (Liao y Chien, 1989; Howell y Matthews, 1991).

En México no existen estudios sobre la inclusión y efecto de los carotenoides en camarones comerciales como *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*. Por lo que el presente trabajo permitirá contribuir a la tecnología de cultivo dependiente del efecto de sustancias bioactivas *vis-a-vis* carotenoides en las dietas, así como para incrementar su calidad como producto de consumo.

ANTECEDENTES

Los carotenoides forman parte del grupo más importante de pigmentos naturales y son encontrados en todas las familias de los vegetales y en el reino animal. Se estima que más de 100 millones de toneladas son producidas anualmente por la naturaleza. Asimismo, se conocen más de 600 compuestos de carotenoides (Isler, 1971; Kläui, 1981; Dall *et al.*, 1995; Meyers y Latscha, 1997).

En cuanto a organismos marinos se refiere, los carotenoides han sido encontrados en la mayoría de ellos.

En el siglo XIX se iniciaron los estudios acerca de la ocurrencia y detección de carotenoides, siendo el primer aislamiento de carotenoides en 1831 por Wackenroder, (Isler, 1971).

Los primeros informes de la ocurrencia de carotenoides en los crustáceos fueron en 1872, donde se observó el cambio del color de la langosta (Isler, 1971; Castillo *et al.*, 1981).

Los carotenoides de los crustáceos, son básicamente isoprenoides con estructuras de 40 carbonos con dos terminales β y γ . Estos carotenoides pueden ser agrupados principalmente en tres tipos:

- 1) Carotenoides esterificados
- 2) Formas no esterificadas
- 3) Complejos carotenoprotéicos.

En los crustáceos estos tres grupos pueden ser localizados en: el exoesqueleto, tanto en la epicutícula como en la endocutícula, en el integumento (epidermis), hepatopáncreas, gónadas (huevos, ovarios), pedúnculos oculares, hemolinfa y glándula androgénica. Los compuestos de carotenos encontrados en los crustáceos varían según la especie, preferencias alimenticias, disponibilidad de alimentos, distribución geográfica, condición fisiológica y sexo, entre las principales causas, (Castillo *et al.*, 1981).

Los carotenoides han sido mayormente utilizados como colorantes alimenticios, debido a que el color del alimento refleja de una forma u otra la calidad del producto.

Los carotenoides se consideran la fuente principal de coloración animal. Los organismos marinos como los crustáceos son incapaces de sintetizar estos pigmentos por lo que dependen exclusivamente de los obtenidos durante la ingestión. En Peneidos decápodos como en otros invertebrados, los carotenoides se originan del almacenamiento selecto o indiscriminado de los carotenoides dietéticos o de sus modificaciones metabólicas (Dall *et al.*, 1995).

Esta capacidad es característica de los Peneidos, mismos que oxidan y convierten los carotenoides ingeridos como el β -caroteno, la cantaxantina, la zeaxantina y otros pigmentos moleculares en astaxantina (Petit *et al.*, 1990).

Aunque la astaxantina es el carotenoide principal en crustáceos decápodos, las evidencias señalan que se deriva del β -caroteno (D'Abramo *et al.*, 1983; Latscha, 1991a, b). La fig. 1, ilustra las posibles vías metabólicas del β -caroteno desde su ingestión, hasta su depositación tisular como astaxantina.

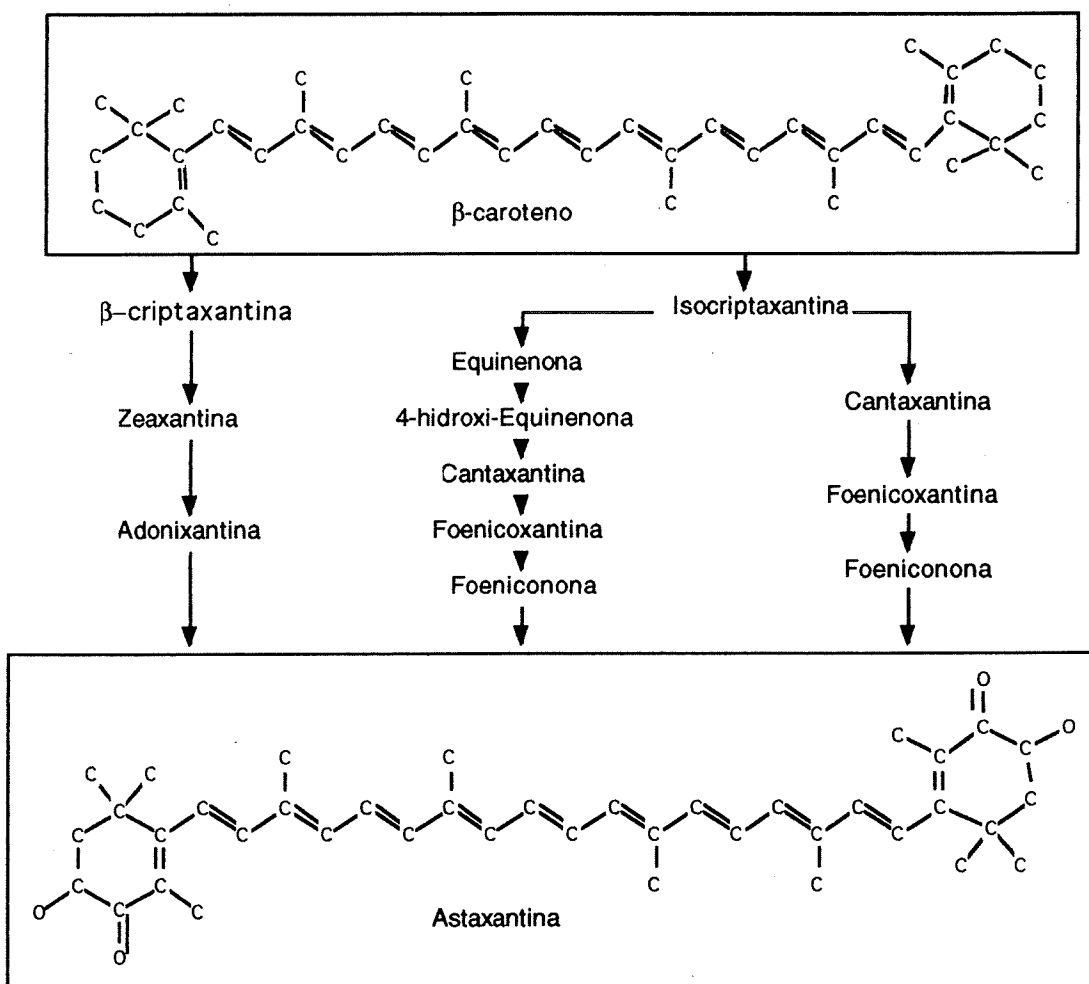


Figura 1. Vías metabólicas del β -caroteno hasta astaxantina en crustáceos de acuerdo a Kurmaly y Latscha (1993).

Aunque desde un punto de vista puramente antropocéntrico, el aspecto más significativo de los carotenoides es el color que confieren a los organismos y alimento (Simpson y Chichester, 1981), los carotenoides además presentan varias funciones y atributos de interés biotecnológico con aplicaciones específicas en organismos de interés comercial. El error ha sido pensar que los carotenoides son útiles únicamente por su aceptación comercial. Sin embargo hoy en día se sabe que son de suma importancia para las funciones que se han mencionado al principio.

Se ha encontrado que los carotenoides tienen gran importancia en la reproducción de algunos organismos como son el salmón, langosta, artemia, trucha, camarón, etc. (Bjerkeng *et al.*, 1992; Foss *et al.*, 1984; Foss *et al.*, 1987). Otro de los beneficios observados es el poder protector contra el cáncer, así como en enfermedades fotosensitivas en el ser humano (Mathew-Roth, 1981, Nonomura, 1990).

A los carotenoides se les ha atribuido un amplio rango de funciones biológicas al realizar numerosos estudios de alimentación con animales no acuáticos, mucha de esta información, ha sido generada en el campo de la medicina (Latscha, 1991).

En los crustáceos no se tienen bien definidas las funciones biológicas que juegan los carotenoides en su organismo (Castillo *et al.*, 1981). Torrison (1990) indicó que entre las funciones propuestas para los carotenoides en acuicultura están: actividad pro-vitamina A, propiedades antioxidantes, efecto positivo en el desarrollo embrionario y larval, protección celular de daños fotodinámicos, mejoramiento del crecimiento, maduración, tasa de

reproducción y fecundidad, y formación de entrecadenas epóxido que actúan como reservas de oxígeno bajo condiciones anóxicas. Meyers y Latscha (1997), mencionan además, numerosas funciones biológicas como estabilización de proteínas/membranas, reducción del colesterol, transporte de calcio y endocrinología entre otras, incluyendo funciones fenológicas asociadas al color, como camuflaje, reproducción y estados de alerta. Un aspecto importante hoy en día es su influencia sobre el sistema inmunológico, para resistir mayormente a las enfermedades.

En investigaciones que se han realizado, se encontró que en la reproducción de *Penaeus japonicus* los carotenoides ingeridos se acumulan en los huevos, donde la astaxantina representa la mayor fuente (Petit *et al.*, 1990). Ceccaldi (1968) informó que en *P. kerathurus* la acumulación de carotenoides ocurre durante la maduración gonadal. En otros Peneidos como *P. esculentus*, la astaxantina predomina en los tejidos en su forma esterificada principalmente en los ovarios, huevos y estadios larvales (Dall *et al.*, 1995).

Estas evidencias sugieren funciones importantes del pigmento asociadas a los órganos reproductivos y en la producción de huevos.

Otro aspecto es la bioactividad que los carotenoides presentan. Por ejemplo, una molécula de β -caroteno al ser ingerido por los consumidores se convierte vía enzimática en dos moléculas de vitamina A (Krinsky, 1991). Otra de las funciones de estos pigmentos es remover los radicales libres de oxígeno, a los cuales se les asocian funciones antioxidantes, inmunodepresoras y de resistencia a enfermedades en los organismos que los ingieren (Choubert, 1979; Nelis *et al.*, 1988).

La creciente susceptibilidad a enfermedades de los camarones cultivados con alimentos balanceados y la aparición del síndrome de pigmentación, asociado además a la baja eficiencia en la digestibilidad, crea la necesidad de adicionar carotenoides, siendo una alternativa los pigmentos algales (Paniagua-Michel, 1995 a y b).

En la literatura existe información de uso de carotenoides en dietas de camarón, sin embargo está más orientada al uso de carotenoides sintéticos. En un experimento de 4 semanas sobre la asimilación de carotenoides por *Penaeus japonicus*, Otazu y Ceccaldi (1984) añadieron al alimento del camarón diferentes dosis de astaxantina (carophyl red[®]) y cantaxantina. Sus resultados registran que la acumulación en la epidermis-hipodermis fue de 23 µg/gr usando astaxantina y de 26 µg/gr usando cantaxantina respectivamente, mientras que en el hepatopáncreas las máximas acumulaciones fueron obtenidas al usar la dieta de 10g/kg para astaxantina y de 0.01g/kg para cantaxantina. Los autores mencionan la importancia de estos pigmentos en la presentación del camarón en el mercado japonés y reportan una relación entre diferentes carotenoides y una gama de colores incluyendo rosa, amarillo, naranja y rojo.

Sommer *et al.* (1991) usaron alimentos balanceados suplementados con *Dunaliella salina* durante 100 días y encontraron concentraciones elevadas de carotenoides y β-caroteno en grupos de langostinos de agua dulce (*Cherax tenuimanus*) comparados con el control, además, los langostinos cuya dieta tenía incluida pasta de *D. salina* registraron altas tasas de crecimiento

Okada *et al.* (1994), experimentaron con diferentes fuentes de carotenoides: β-caroteno, *Spirulina*, *Phaffia* y aceite de krill en la dieta de

camarón tigre negro *Penaeus monodon* y encontraron un marcado incremento en la concentración de carotenoides en el exoesqueleto con la dieta suplementada con *Spirulina*. Los autores sugirieron que la zeaxantina, uno de los carotenoides mayoritarios, fue transformada rápidamente en astaxantina y proponen de manera práctica incorporar 3% de *Spirulina* a la dieta de los camarones por un mes antes de la cosecha. Este aumento en la concentración de carotenoides incide en la presentación y en un mejor valor en el mercado.

Menasveta *et al.* (1993) observaron que un grupo de camarones juveniles de *P. monodon* alimentados con una preparación comercial por dos meses sufrieron un cambio en la pigmentación externa de su color normal verduzco-café a azul pálido y se sospechó que esta condición fue inducida por deficiencias carotenoicas en el alimento. Posteriormente en un experimento de 4 semanas, el color fue tratado de corregir mediante la adición de 50 ppm de astaxantina en una dieta y 5% de alga café (*Chnoospora minima*) en otra. Con la dieta conteniendo astaxantina se logró revertir el efecto volviendo a su color normal verduzco-café, mientras que la dieta adicionada con alga no logró modificar la coloración azul. Los resultados de esta investigación indican un efecto positivo de los carotenoides en la coloración y posiblemente en mejor sobrevivencia y crecimiento.

Chien y Jeng (1992), en un experimento con camarón kuruma *P. japonicus*, probaron 7 dietas conteniendo astaxantina, β -caroteno y harina del alga *D. salina*, donde encontraron que la astaxantina fue más efectiva que el β -caroteno y la harina de *Dunaliella* para elevar la coloración del camarón. Adicionalmente dichos autores no detectaron diferencias en la concentración

de pigmentos después de un período de tres meses, registrándose una correlación positiva entre el contenido de pigmentos y la sobrevivencia.

En estudios de Kontara *et al.* (1997) usando poslarvas de *P. vanamei* demostraron que la alta mortalidad causada por la bacteria *Vibrio harveyi* es afectada por los niveles de astaxantina suplementada en el alimento. Únicamente los niveles más altos de astaxantina en la dieta (1500 mg/kg de dieta) parecieron ser suficientes para obtener una resistencia óptima a la infección.

Se esperaría que los camarones alimentados con estos pigmentos presentaran mayor crecimiento y sobrevivencia lo que podría reflejarse en los rendimientos de los camarones cultivados.

Por lo anterior, es de particular interés, el suministrar estos aditivos en las dietas en etapas críticas del cultivo; así como antes de la cosecha, por su repercusión en la presentación del camarón. En los reproductores, estos metabolitos añadidos en el alimento, podrían ejercer un efecto positivo en la maduración, reproducción y fecundidad, transfiriendo a los productos mayor vitalidad, en estadios larvales y poslarvales. Además, se esperaría una respuesta positiva en lo que se refiere a la resistencia a enfermedades, la velocidad de crecimiento y la sobrevivencia.

Objetivo general

Determinar el efecto de dos concentraciones diferentes de β -caroteno del alga *Dunaliella salina* incorporado en el alimento para mejorar la calidad del camarón *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos específicos

- a) Incorporar dos concentraciones diferentes de β -caroteno extraído de *Dunaliella salina* en el alimento de *L. vannamei*.
- b) Evaluar los niveles de carotenoides en los órganos de poblaciones cultivadas de *L. vannamei*.
- c) Determinar los efectos del β -caroteno natural sobre *L. vannamei* en condiciones de alimentación restringida.
- d) Evaluar la coloración como índice de la calidad del camarón alimentado con β -caroteno algal.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento se realizó en las instalaciones de acuicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California. El procesado de las muestras fue llevado a cabo en los laboratorios de Oceanografía Química (UABC) y los análisis espectrofotométricos fueron determinados en el laboratorio de Biotecnología, departamento de acuicultura del CICESE.

1. Obtención de Camarones

Se utilizaron 100 camarones cultivados de la especie (*Litopenaeus vannamei*) provenientes de las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, los cuales fueron utilizados para el análisis de sus órganos y experimentación posterior. La talla media ($15 \text{ gr} \pm 3$) los ubica como preadultos (juveniles). Los camarones provinieron de dos estanques exteriores de 40 m^2 cada uno, cubiertos con fondos de lona negra utilizados previamente en experimentos de biofiltros. Se registró la presencia en un estanque (1) del alga roja *Gracilaria pacifica*, mientras que en el otro estanque (2) se observó crecimiento algal en las paredes, principalmente de *Ulva sp.* y *Enteromorpha sp.* La alimentación en ambos estanques fue a base del alimento comercial Camaronina[®] con 35% de proteína.

2. Coeficientes de absorción específica de los carotenoides

Para realizar la cuantificación del β -caroteno se utilizó un coeficiente de absorción específico de 2590 en hexano a 450 nm ($A_{1cm}^{1\%} = 2590$) de acuerdo a Britton *et al.* (1981), resultando en una ecuación de $Y = 259X$; donde Y es igual a la absorbencia registrada en unidades arbitrarias (UA) y X, es igual a la concentración de β -caroteno en mg/ml). Para la astaxantina el coeficiente de absorción específico fue de 2100 en hexano, leído a 470 nm ($A_{1cm}^{1\%} = 2100$) según Sommer *et al.* (1991).

La ecuación resultante fue: $Y = 210X$, donde Y es igual a la absorbencia en UA y X es equivalente a la concentración de astaxantina en mg/ml. Posteriormente se usaron estas curvas para determinar y cuantificar los pigmentos extraídos de los órganos de los camarones.

3) Inclusiones carotenogénicas

Con base en el alimento comercial (camaronina 35 de la empresa Purina[®]), se prepararon 2 dietas conteniendo 50 y 100 mg de β -caroteno por 100 gr de alimento.

El alimento comercial fue molido y cernido en tamices de 250 micras, después se le añadió un homogeneizado de 2% (v/v) de ligante (agar), β -caroteno y agua para hacer una mezcla uniforme que fue compactada mediante un extrusor para la fabricación de "pellets". El β -caroteno extraído del alga *Dunaliella salina* fue obtenido mediante donación de la compañía NUTRILITE S. A. de C. V. (Valle Imperial, CA, USA) en una emulsión en

aceite de maíz a una concentración del 3%. El alimento preparado se puso a secar posteriormente a la sombra en un lugar bien ventilado hasta llegar a 12% de humedad, posteriormente se almacenó en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

4) Condiciones experimentales

Los camarones provenientes de los estanques exteriores se sometieron a condiciones de alimentación restringida por un período de aproximadamente tres meses. Esta condición consistió en suministrar una dieta de mantenimiento (camaronina[®]), alternándola con períodos de inanición para promover la remoción de carotenoides de sus cuerpos. En las condiciones de hacinamiento (100 camarones/m²) se observó que existió canibalismo.

Posteriormente, los camarones fueron alimentados con las dietas conteniendo las inclusiones de pigmentos, para probar su respuesta de incorporación de carotenoides. Las dietas fueron proporcionadas en un 3 % de peso corporal. Se realizó la medición de los niveles de carotenoides al principio y al final del experimento, que duró 4 semanas. Si bien, de acuerdo D'Abrahamo y Castell, (1997), estas no son las condiciones adecuadas para experimentación; ellos indican un mínimo de tres réplicas con un mayor número de organismos; debido a la escasez de animales, las pruebas solo se hicieron por duplicado con 4 organismos cada una. De esta manera se instalaron 6 acuarios de 40 l cada uno, en los cuales se colocó a 4 camarones por acuario; los tratamientos fueron: control para el cual se utilizó la camaronina[®] (A0), A50 y A100 (a50 y a100 = alimento con 50 y 100 mg de β -caroteno por cada 100 gr respectivamente).

La temperatura se mantuvo a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mediante baño María con calentadores de acuario (1000 watts), el oxígeno disuelto se estimó con un oxímetro marca Yellow Springs Instruments, mismo que osciló entre 6 y 8 ppm. Se realizó un recambio de agua del 90% diario, además todo el tiempo estuvieron en condiciones de oscuridad para impedir el crecimiento de algas y la posible interferencia por ingestión de pigmentos presentes en las algas.

5. Evaluación de parámetros

- a) **Sobrevivencia.** Se cuantificó el número de camarones sobrevivientes por tratamiento.
- b) **Crecimiento.** Se estimó el crecimiento midiendo el aumento de peso en gramos de los camarones por medio de una balanza electrónica marca Ohaus con 0.01 gr de precisión.
- c) **Análisis de carotenoides.** Al inicio de los tratamientos se sacrificó un grupo de cuatro camarones aparte de los experimentales, a los cuales se les practicó una minuciosa disección para obtener el hepatopáncreas, los pedúnculos oculares, una muestra de músculo y una muestra de integumento (parte del cuerpo inmediatamente bajo el caparazón donde se ubican los cromatóforos). Al final de cada tratamiento, se sacrificaron todos los camarones, obteniéndose de cada uno, las muestras mencionadas anteriormente, mismas fueron que mantenidas en un congelador a -60°C hasta su procesamiento.

El análisis del contenido de β -caroteno y astaxantina se realizó mediante la técnica modificada de Dall *et al.* (1995), utilizando acetona al 90% y hexano como solventes de extracción.

En la Fig. 2 se presenta el diagrama de flujo seguido para el análisis de muestras. Los hepatopáncreas fueron procesados completos (pesos de 350 mg a 1 gr), los pedúnculos oculares (0.105-0.216 gr) de cada camarón fueron procesados completos, del integumento y el músculo se tomó una muestra de cada uno de 200 a 500 mg para su procesamiento.

Todo el proceso de extracción y cuantificación fue realizado en condiciones de penumbra para impedir la acción de la luz sobre los pigmentos y sus metabolitos. Los carotenoides fueron extraídos en 10 ml de acetona al 90%, su maceración y homogeneizado se realizó en morteros de porcelana, dejándose reposar las muestras durante 24 horas. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 2,680 g, y el sobrenadante fue extraído. Una segunda extracción con acetona se realizó, hasta quedar un residuo blanquesino sin carotenoides. Los sobrenadantes de cada extracción se combinaron. Posteriormente los carotenoides fueron transferidos a 10 ml de hexano realizándose el lavado de las muestras con NaCl 2%, para eliminar la acetona. Finalmente se añadió NaSO_3 para deshidratar la muestra destinada para hacer el espectro de absorción.

La concentración de cada pigmento, se cuantificó a partir del máximo registrado, para cada pigmento en el espectro de absorción realizado a 450 nm para el β -caroteno y a 470 nm para la astaxantina, utilizando un espectrofotómetro de barrido continuo con arreglo de diodos marca Hewlett-Packard. Posteriormente al procesamiento, las muestras fueron referidas a un gramo de muestra, para motivos de comparación.

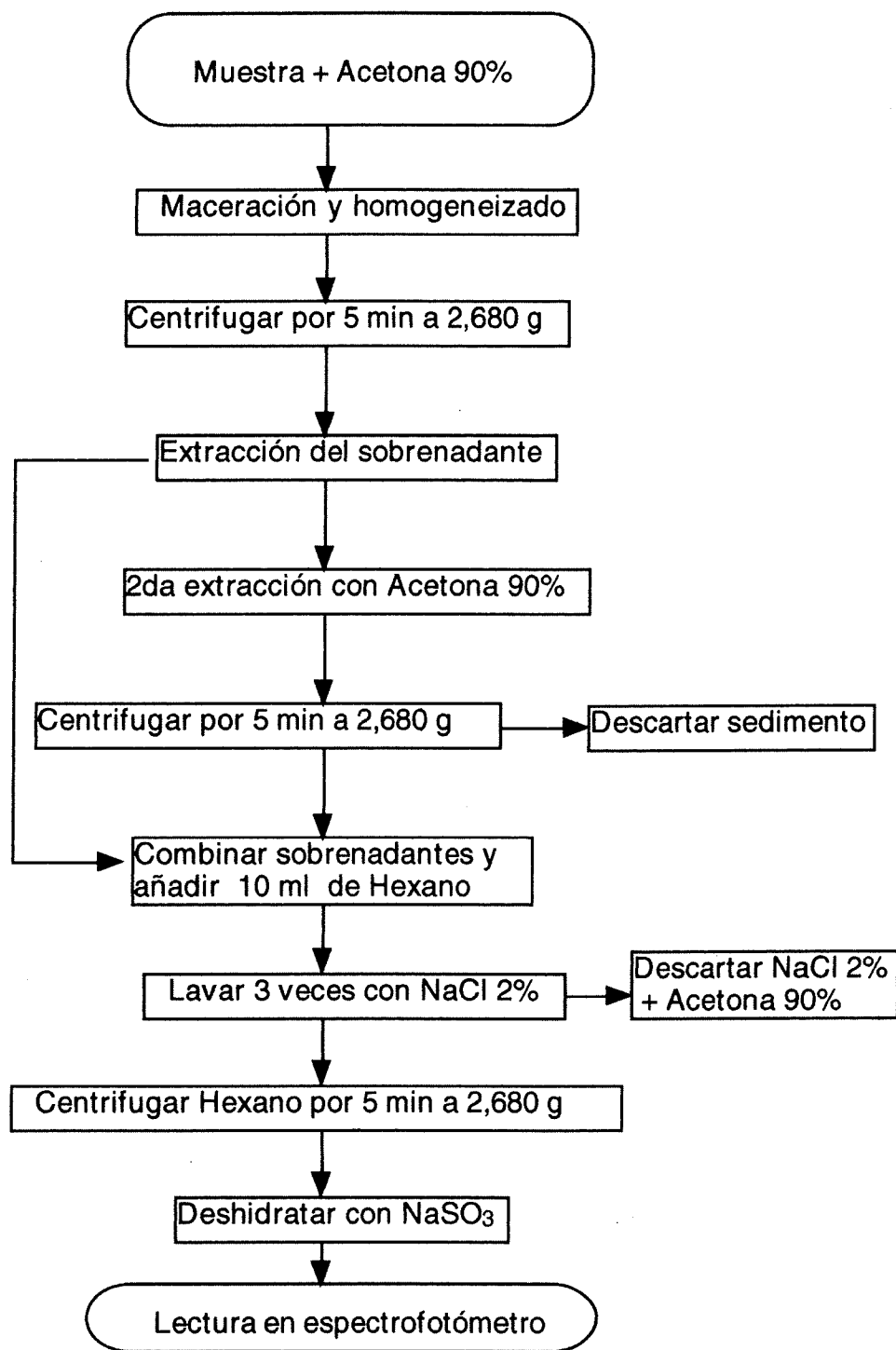


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de extracción de carotenoides.

6. Tratamiento estadístico

Se definieron 3 tratamientos para comparar las concentraciones de los carotenoides:

- 1.- Camarones con dieta control A0 (camaronina, 0 mg β -caroteno)
- 2.- Camarones con dieta A50 (50 mg de β -caroteno por cada 100 gr de alimento)
- 3- Camarones con dieta A100 (100 mg de β -caroteno por cada 100 gr de alimento)

Se graficaron los datos junto con los promedios de todos los resultados. Para evaluar si existieron diferencias entre los distintos tratamientos se realizaron pruebas no paramétricas de análisis de varianza de Kruskal-Wallis, para cada uno de los órganos estudiados (Zar, 1984).

III. RESULTADOS

Crecimiento y sobrevivencia

La Tabla I, muestra el crecimiento logrado en cada uno de los tres tratamientos de inclusión de β -caroteno. Los camarones alimentados con la dieta control aumentaron de peso 1.35 ± 0.17 g con un crecimiento semanal de 0.37 ± 0.04 g respectivamente. Con la dieta A50 se logró un incremento de 1.49 ± 0.52 g reportándose un crecimiento semanal de 0.37 ± 0.13 g, mientras que en el tratamiento A100 aumentó 1.34 ± 0.67 g con un crecimiento semanal de 0.34 ± 0.16 g. Por otra parte la mayor sobrevivencia ($100 \pm 0\%$) ocurrió en la dieta A100, mientras que la dieta A50 obtuvo un $75\% \pm 0$ de sobrevivencia, y la dieta control logró un $87.5 \pm 17.6\%$ de sobrevivencia.

Tabla I. Crecimiento y sobrevivencia de *L. vannamei* alimentados con dietas adicionadas con β -caroteno.

	Tratamientos		
	A0 n=2	A50 n=2	A100 n=2
P. inicial (g)	14.17 \pm 1.51	15.94 \pm 0.24	15.42 \pm 0.45
P. final (g)	15.64 \pm 1.34	17.43 \pm 0.28	16.76 \pm 2.03
Incremento en peso (g)	1.47 \pm 0.17	1.49 \pm 0.52	1.34 \pm 0.67
Crecimiento semanal (g)	0.37 \pm 0.04	0.37 \pm 0.13	0.34 \pm 0.16
Sobrevivencia (%)	87.5 \pm 17.68	75.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0

Inclusión de β -caroteno en las dietas

Los contenidos de β -caroteno en las dietas experimentales se muestran en la Fig. 3, corroborando la adición originalmente planeada para las dietas A100 y A50. Para la dieta control A0, las cantidades de β -caroteno presentes fueron de menos de 1 mg por 100 gr de alimento.

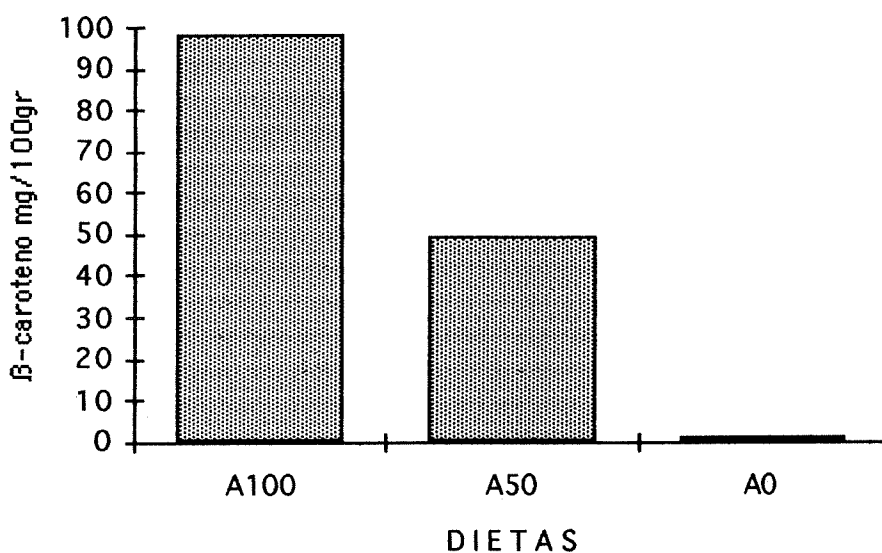


Figura 3. Contenido de β -caroteno en las dietas experimentales.

Carotenoides en condiciones experimentales

a) β -caroteno

En la Tabla II se ilustran los datos obtenidos en este estudio; de los cuatro órganos estudiados, se observó la mayor concentración de

Tabla II. Concentraciones (mg/gr), máximos y mínimos de β -caroteno y astaxantina para los diferentes órganos del camarón, según su origen.

		β-caroteno					
		Estanque 1	Estanque 2	Inicio	A0	A50	A100
Hepatopáncreas (n=2)	Promedio	0.116	0.143	0.092	0.032	0.186	0.160
	Desv. Est.	0.067	0.098	0.023	0.015	0.042	0.048
	Máximo	0.214	0.314	0.114	0.057	0.253	0.219
	Mínimo	0.051	0.063	0.067	0.016	0.138	0.106
Integumento (n=2)	Promedio	0.074	0.050	0.015	0.012	0.038	0.045
	Desv. Est.	0.014	0.020	0.007	0.007	0.010	0.006
	Máximo	0.089	0.074	0.025	0.020	0.051	0.052
	Mínimo	0.051	0.031	0.010	0.003	0.026	0.034
Músculo (n=2)	Promedio	0.004	0.003	0.002	0.002	0.005	0.007
	Desv. Est.	0.002	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003
	Máximo	0.006	0.005	0.003	0.003	0.009	0.012
	Mínimo	0.002	0.002	0.001	0.001	0.003	0.004
Pedúnculo (n=2)	Promedio	0.005	0.008	0.007	0.005	0.005	0.009
	Desv. Est.	0.003	0.014	0.004	0.003	0.003	0.002
	Máximo	0.011	0.033	0.011	0.010	0.008	0.011
	Mínimo	0.000	0.000	0.002	0.002	0.001	0.006

		Astaxantina					
		Estanque 1	Estanque 2	Inicio	A0	A50	A100
Hepatopáncreas (n=2)	Promedio	0.163	0.197	0.124	0.044	0.255	0.220
	Desv. Est.	0.093	0.134	0.031	0.020	0.059	0.064
	Máximo	0.299	0.431	0.157	0.078	0.358	0.296
	Mínimo	0.073	0.088	0.092	0.022	0.187	0.146
Integumento (n=2)	Promedio	0.103	0.070	0.021	0.015	0.052	0.059
	Desv. Est.	0.020	0.028	0.009	0.008	0.014	0.009
	Máximo	0.125	0.103	0.034	0.027	0.071	0.067
	Mínimo	0.072	0.043	0.014	0.006	0.036	0.046
Músculo (n=2)	Promedio	0.006	0.004	0.003	0.003	0.006	0.008
	Desv. Est.	0.002	0.001	0.001	0.001	0.003	0.004
	Máximo	0.008	0.006	0.004	0.005	0.010	0.012
	Mínimo	0.003	0.003	0.001	0.001	0.004	0.003
Pedúnculo (n=2)	Promedio	0.007	0.014	0.008	0.005	0.007	0.011
	Desv. Est.	0.005	0.007	0.003	0.003	0.003	0.003
	Máximo	0.015	0.041	0.012	0.009	0.009	0.014
	Mínimo	0.001	0.001	0.004	0.002	0.003	0.008

β -caroteno en el hepatopáncreas, determinándose para la dieta A50 un promedio de 0.186 ± 0.042 mg/gr, mientras que en la dieta control se estimó el menor valor de 0.032 ± 0.015 mg/gr, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($\alpha=0.05$, Tabla III), Fig. 4.

Tabla III. Resultados del análisis de varianza de Kruskal-Wallis para β -caroteno en diferentes partes del camarón. ($\chi^2_{0.05, 2} = 5.99$, $n=2$) entre los diferentes tratamientos.

	Valor calculado	P	Significancia
Hepatopáncreas	13.34	0.001	Dif. Sig.
Integumento	14.46	0.001	Dif. Sig.
Músculo	14.52	0.001	Dif. Sig.
Pedúnculo	5.76	0.056	No Dif. Sig.

En los integumentos se encontró el valor máximo en el estanque 1 (0.074 ± 0.014 mg/gr). El valor mínimo fue registrado en el tratamiento A0 (control), y fue de 0.012 ± 0.007 mg/gr, el análisis estadístico muestra diferencias significativas entre tratamientos (Tabla III, Fig. 5).

Para los músculos analizados, el valor máximo se obtuvo en el tratamiento A100 (0.007 ± 0.003), Fig. 6., el mínimo ocurrió en el tratamiento A0 (0.002 ± 0.001).

Para los pedúnculos se obtuvo un valor máximo en el tratamiento A100 y el valor mínimo en el tratamiento A0, los demás tratamientos tienen resultados intermedios, reflejándose en el análisis estadístico, el cual no detectó diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 7, Tabla III).

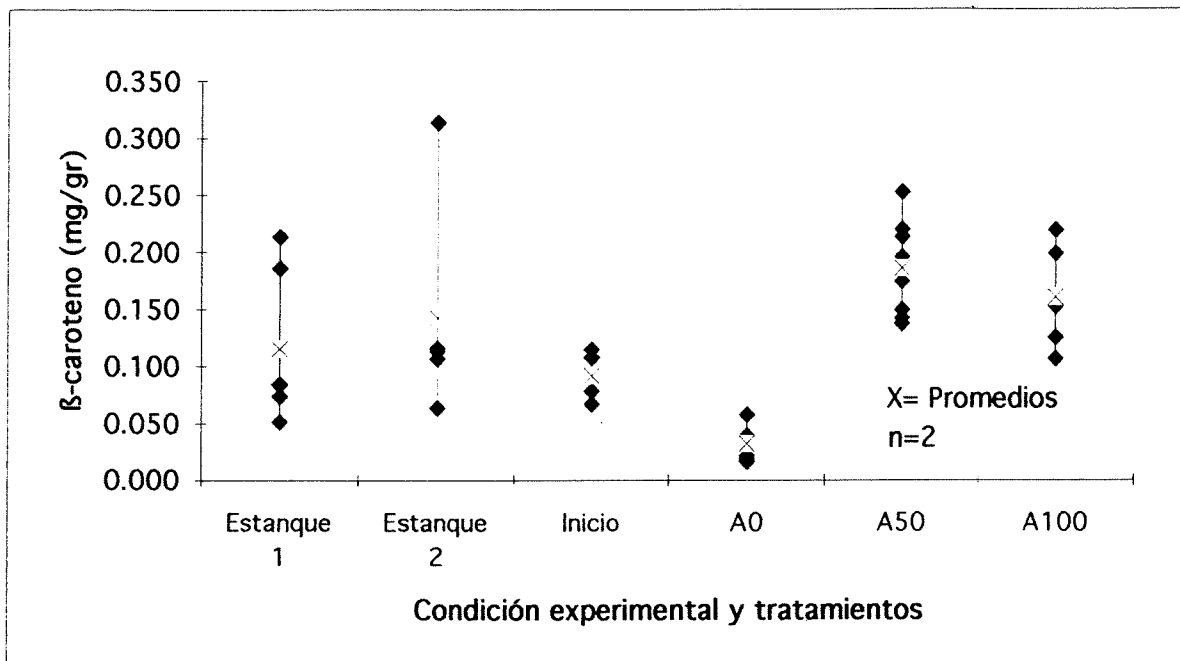


Figura 4. Concentraciones de β -caroteno determinadas en los hepatopáncreas de los camarones *L. vannamei*.

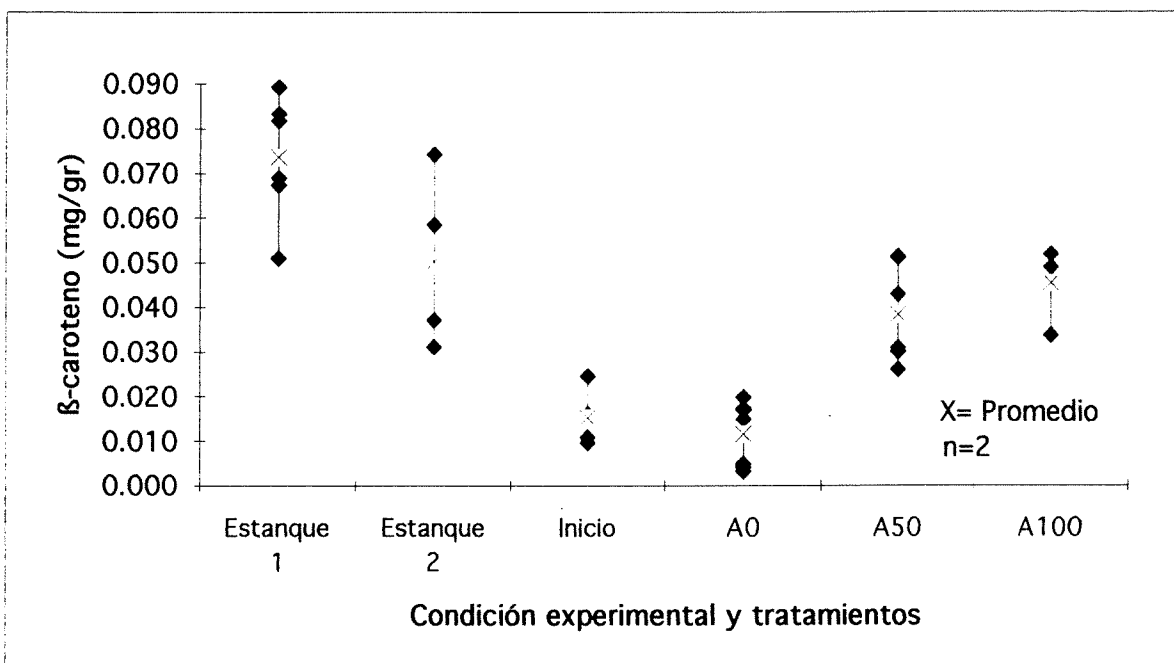


Figura 5. Concentraciones de β -caroteno encontradas en los integumentos de los camarones *L. vannamei*.

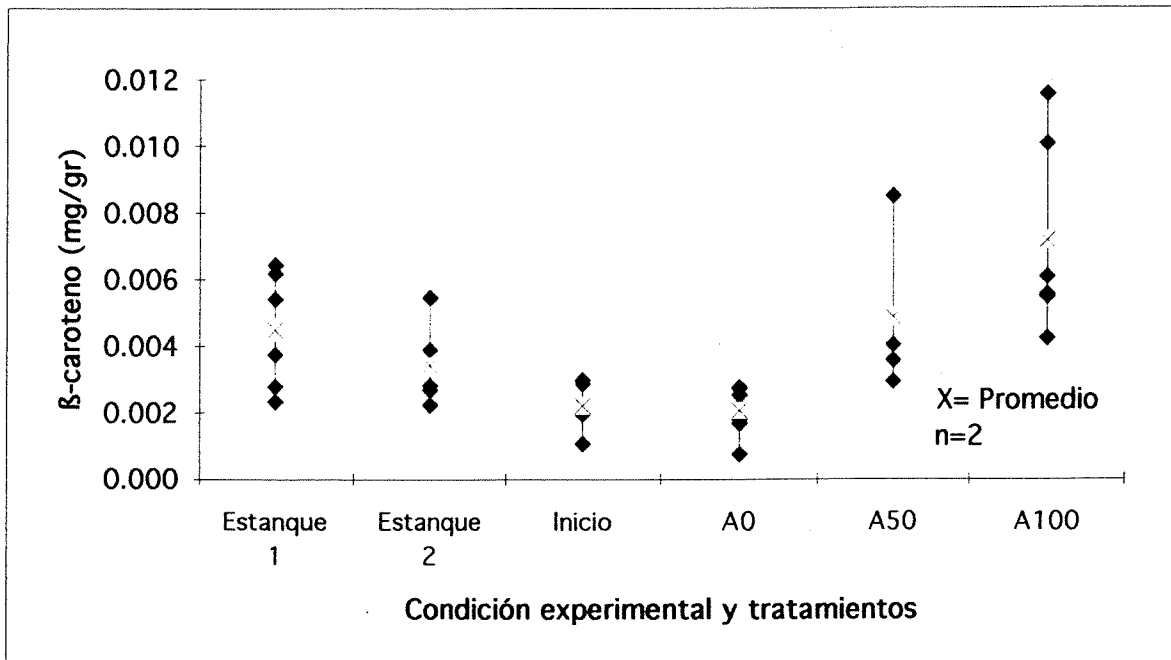


Figura 6. Concentraciones de β -caroteno encontradas en el músculo de los camarones *L. vannamei*.

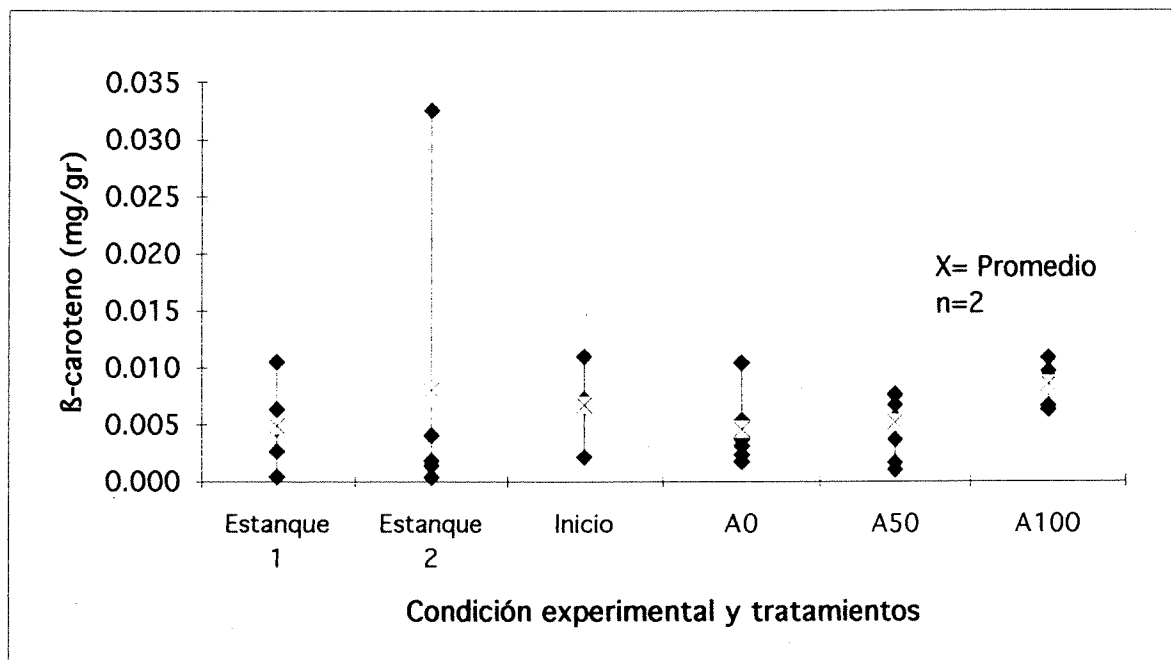


Figura 7. Concentraciones de β -caroteno encontradas en los pedúnculos oculares de los camarones *L. vannamei*.

b) Astaxantina

Los resultados obtenidos para astaxantina presentan un comportamiento muy similar a los obtenidos con β -caroteno (Tabla II). El hepatopáncreas fue el órgano que más concentración obtuvo de este caroteno, seguido del integumento, pedúnculos y músculo.

El valor máximo encontrado en los hepatopáncreas resultó ser de 0.255 ± 0.059 mg/gr para el tratamiento A50 y el mínimo fue registrado en el tratamiento A0 con 0.044 ± 0.020 mg/gr. En este tratamiento se detectaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$), Tabla IV., para las diferentes condiciones experimentales (Fig. 8).

Tabla IV. Resultados del análisis de varianza de Kruskal-Wallis para Astaxantina en diferentes partes del camarón. ($\chi^2_{0.05, 2} = 5.99$, $n=2$) entre los diferentes tratamientos.

	Valor calculado	P	Significancia
Hepatopáncreas	13.33	0.001	Dif. Sig.
Integumento	13.33	0.001	Dif. Sig.
Músculo	8.04	0.018	Dif. Sig.
Pedúnculo	8.57	0.014	Dif. Sig.

Para el integumento, el valor máximo fue observado en las condiciones del estanque 1 con un valor de 0.103 ± 0.020 mg/gr, y el mínimo ocurrió en el tratamiento A0 con 0.015 ± 0.008 mg/gr de astaxantina (Fig. 9).

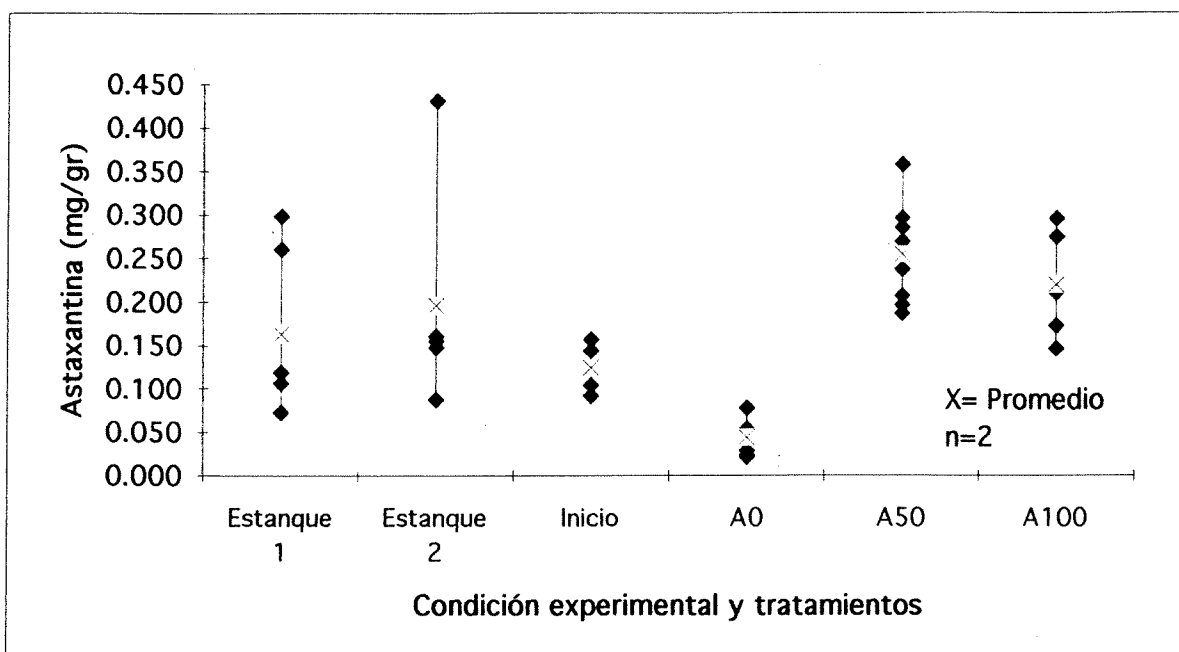


Figura 8. Concentraciones de astaxantina encontradas en los hepatopáncreas de los camarones *Litopenaeus vannamei*.

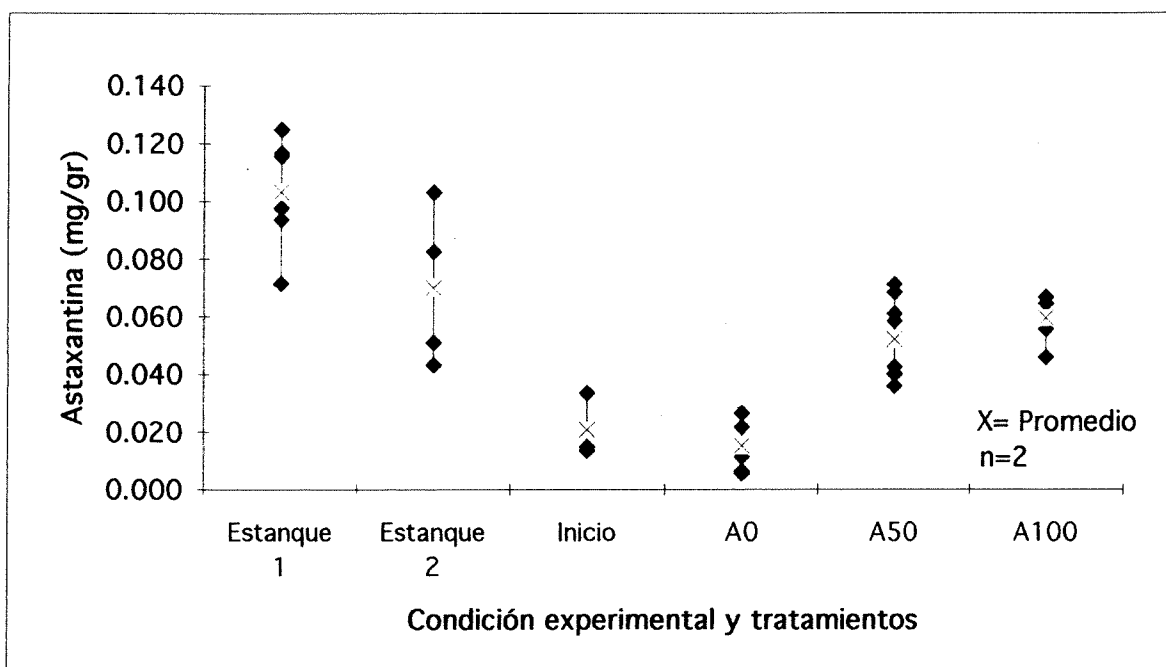


Figura 9. Concentraciones de astaxantina encontradas en los integumentos de los camarones *L. vannamei*.

Para los músculos analizados la máxima concentración de astaxantina se estimó en el tratamiento A100 (0.008 ± 0.004), (Fig. 10) el mínimo ocurrió en el inicio y en el tratamiento control con 0.003 ± 0.001 mg/gr, en este análisis se detectaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

Para los pedúnculos se obtuvo un valor máximo (0.014 ± 0.007 mg/gr) en el estanque 2, siendo el valor mínimo detectado 0.005 ± 0.003 mg/gr) en el tratamiento A0, donde se reflejan diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 11, tabla IV).

Razones Astaxantina/ β -caroteno

Al calcular la proporción Astaxantina/ β -caroteno para los diferentes órganos se encontró que en hepatopáncreas e integumento, este índice varió entre 1.25:1 y 1.41:1, siendo casi constante. Por otra parte este índice mostró una relación inversa entre las razones en músculo y pedúnculos, mostrando además una mayor variabilidad (1.06:1-1.38:1) Fig. 12.

Espectros de absorción y coloración

En la figura 13 se muestran espectros de absorción representativos de cada órgano analizado, el hepatopáncreas y el integumento muestran máximos prominentes en la región entre 400 y 500 nanómetros, mientras que el músculo y el pedúnculo no muestran valores elevados, registrando en general las lecturas de absorbencia más bajas de este estudio. Las mayores concentraciones de carotenoides se determinaron en el hepatopáncreas y las menores en el pedúnculo.

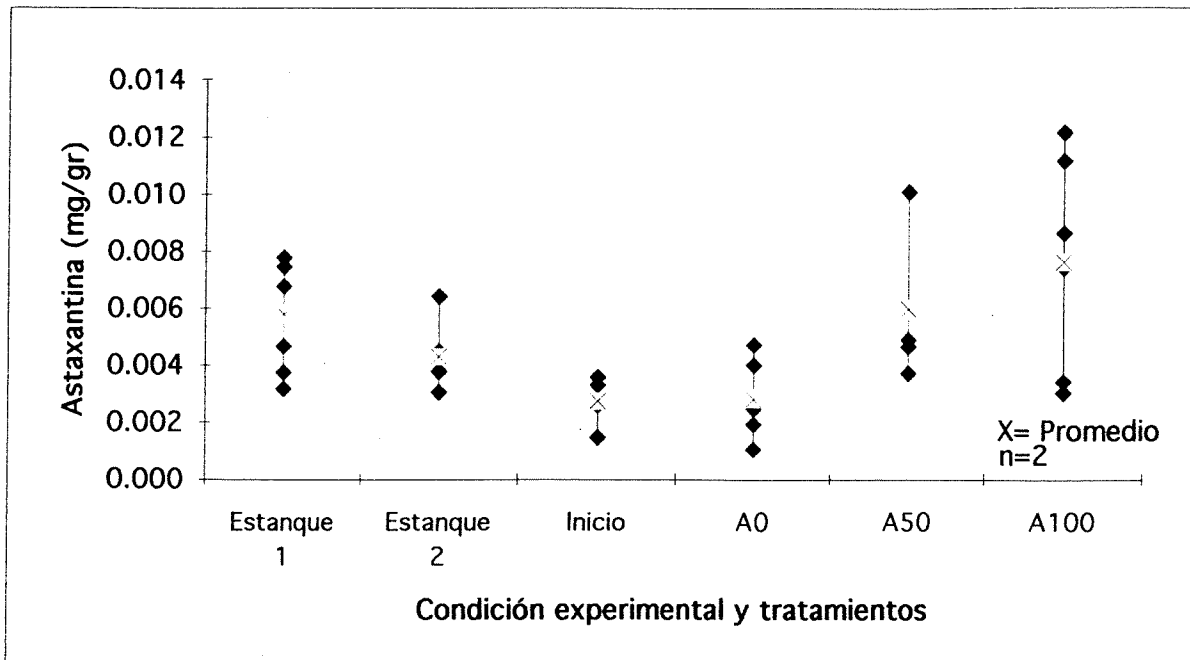


Figura 10. Concentraciones de astaxantina encontradas en los músculos de los camarones *L. vannamei*.

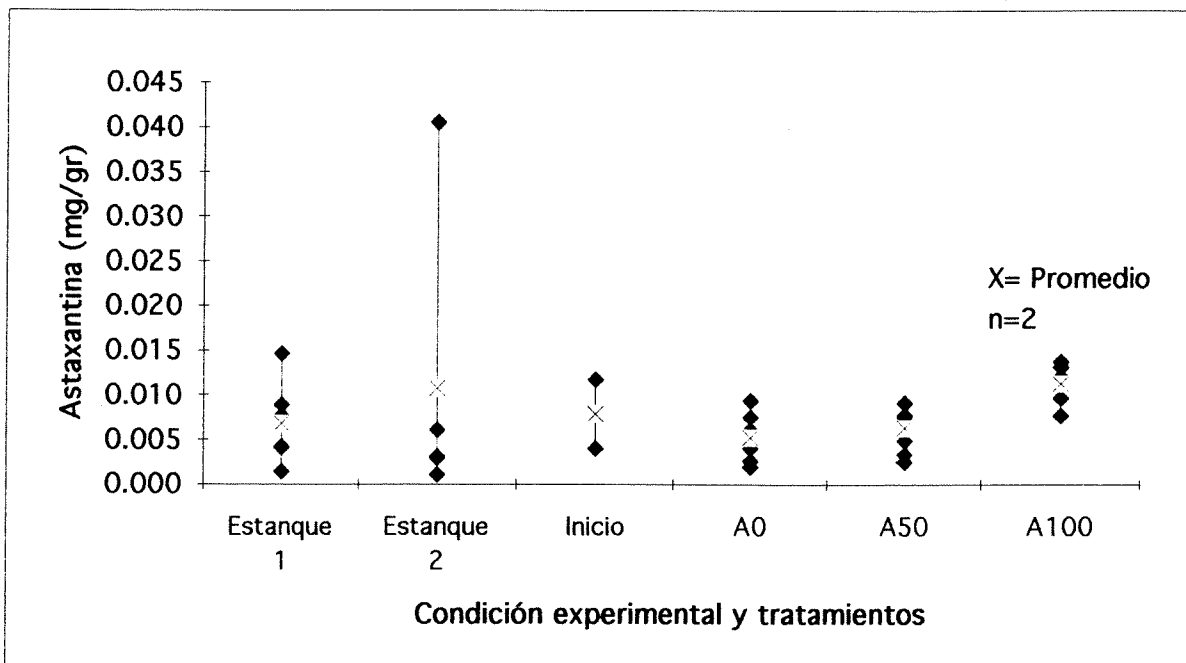


Figura 11. Concentraciones de astaxantina encontradas en los pedúnculos de los camarones *L. vannamei*.

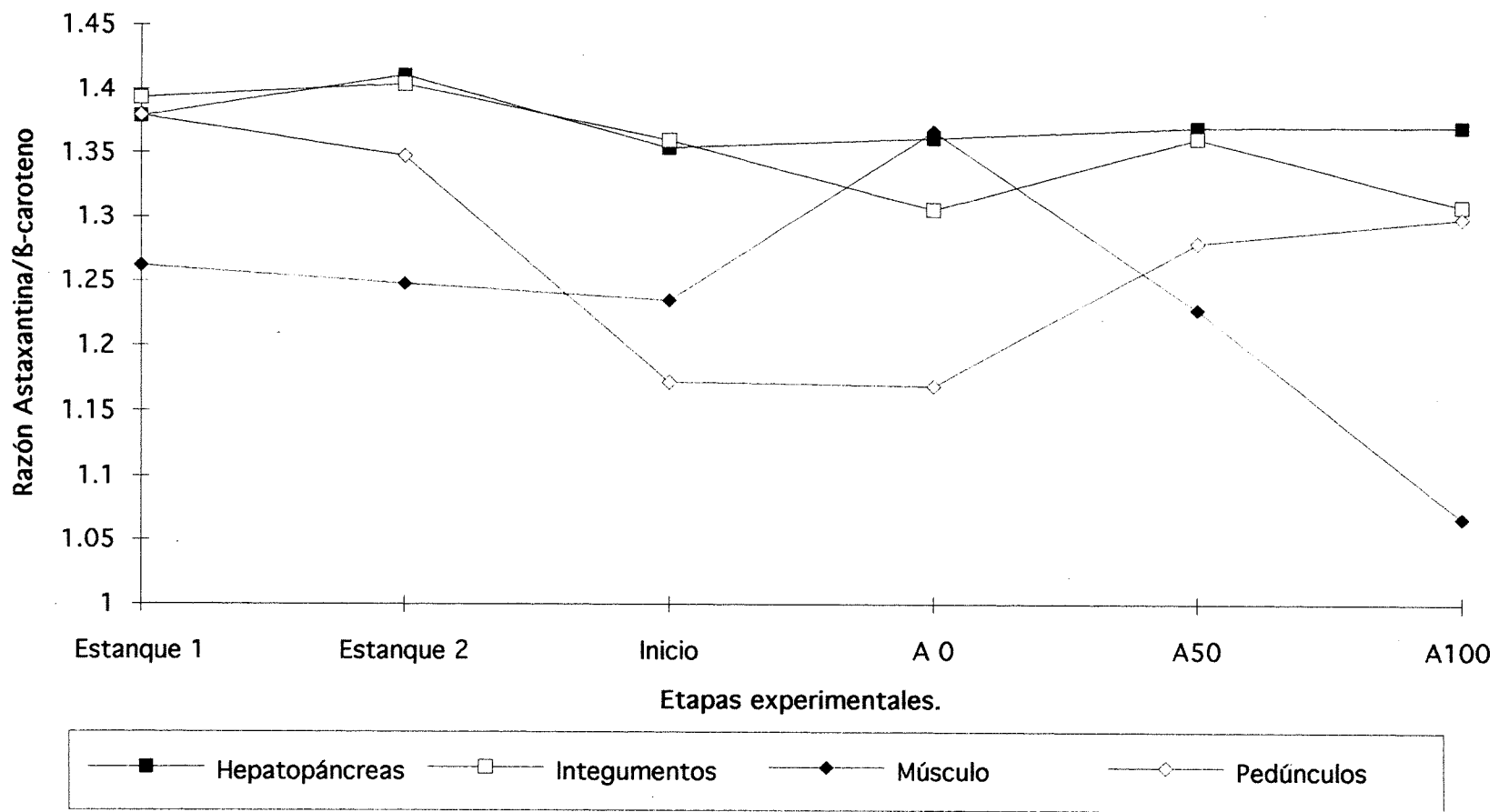


Figura 12. Relación entre el contenido de Astaxantina y β -caroteno en cada órgano del camarón para cada una de las etapas experimentales y tratamientos.

El alimento adicionado con carotenoides sufrió cambios en su apariencia respecto de los "pellets" originales de camaronina[®], siendo más grandes de tamaño y de coloración anaranjada, evidenciando la adición de pigmentos (Fig. 14), sus extractos de β -caroteno en hexano, reflejan las concentraciones relativas encontradas, Fig. 15.

Por otra parte, la figura 16 muestra los extractos del pedúnculo, músculo, integumento y hepatopáncreas en hexano, la menor coloración se observa en el pedúnculo y la mayor el hepatopáncreas. En la figura 17 se observan las diferentes coloraciones obtenidas para el hepatopáncreas de los camarones del estanque 1, al inicio y al final del experimento, destaca la reducción en la intensidad de color al inicio del experimento, mientras que al final la coloración fue la más intensa observada en todo el experimento.

Las figuras 18 y 19 muestran la disminución y aumento de pigmentos del hepatopáncreas y el integumento con base en las dietas ofrecidas.

En la figura 20 se observan los camarones del estanque 1, mientras que en las figuras 21, 22, 23, 24 y 25 presentan los camarones al término del experimento, obteniéndose la coloración mas pálida con la dieta A0, y la más intensa con la dieta A100.

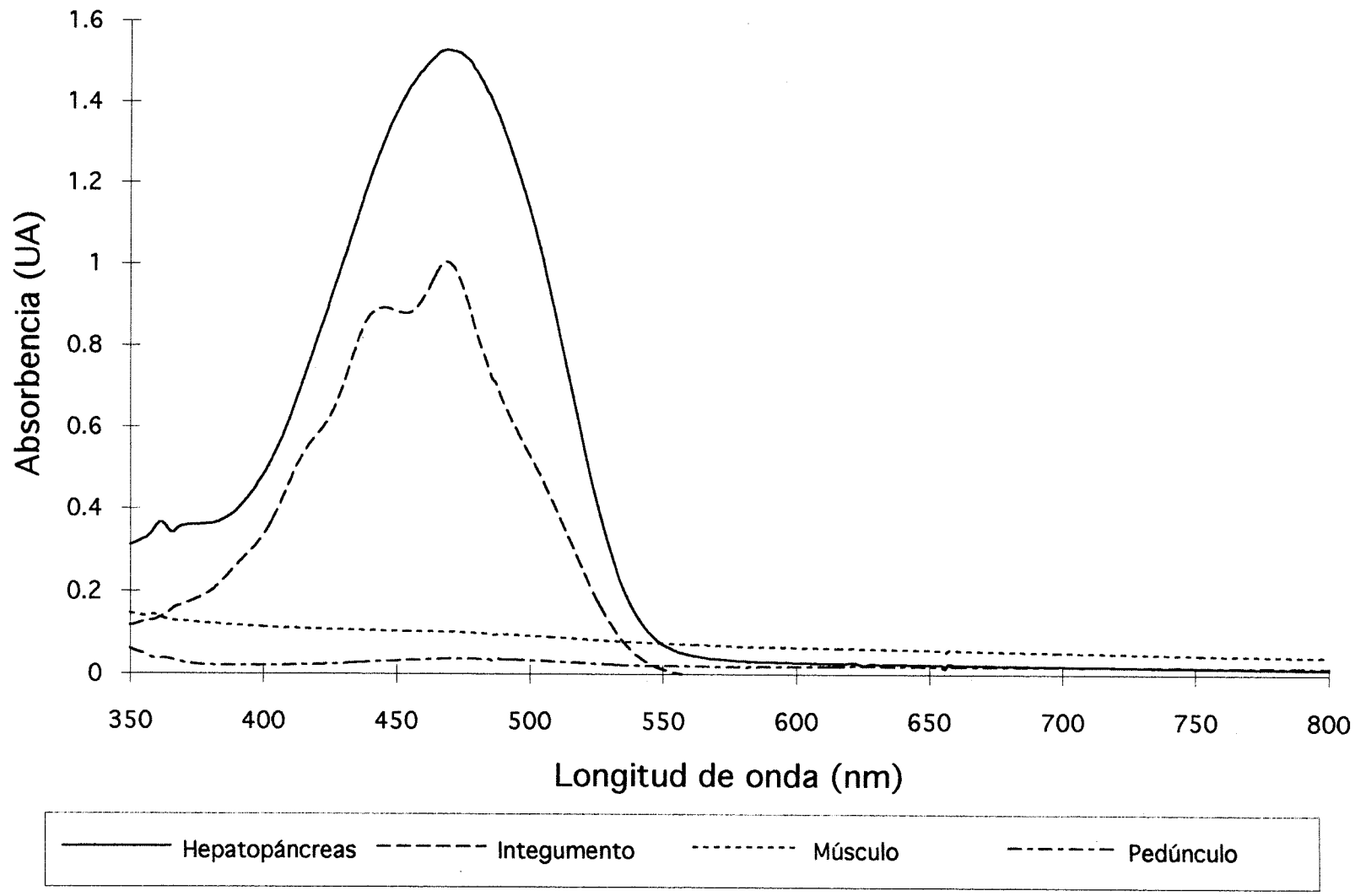


Figura 13. Espectros de absorción tipo para los diferentes órganos del camarón *L. vannamei*.

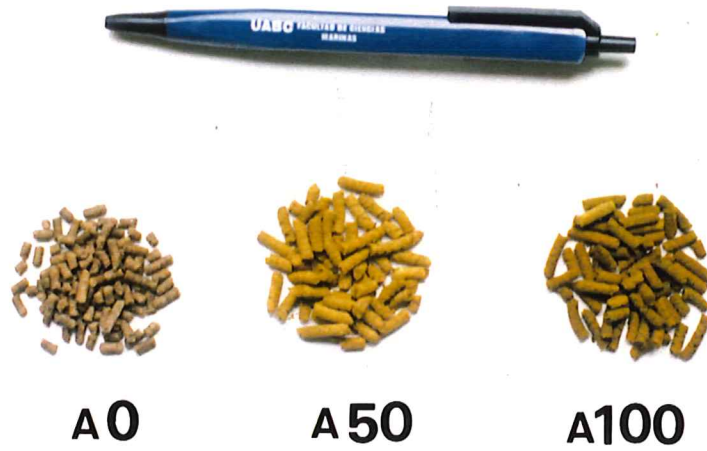


Figura 14. Alimento adicionado con β -caroteno.

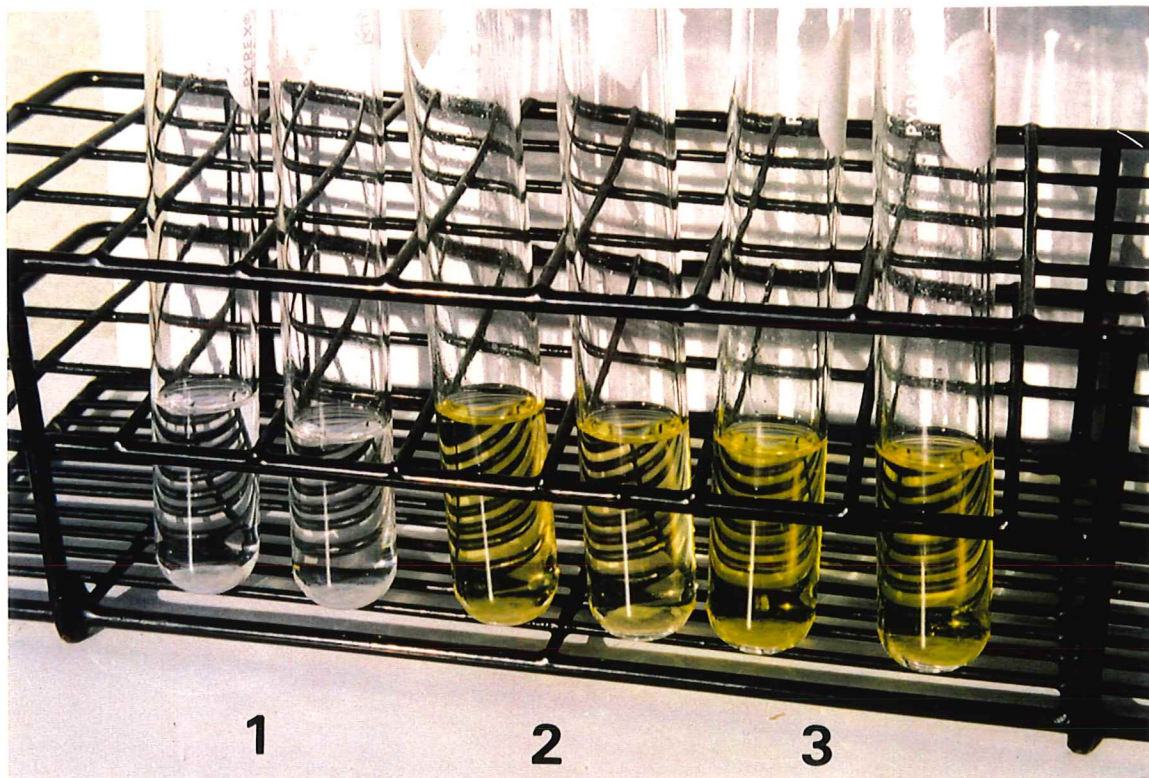


Figura 15. Extractos en hexano de alimento: 1 control, 2 A50 y 3 A100.

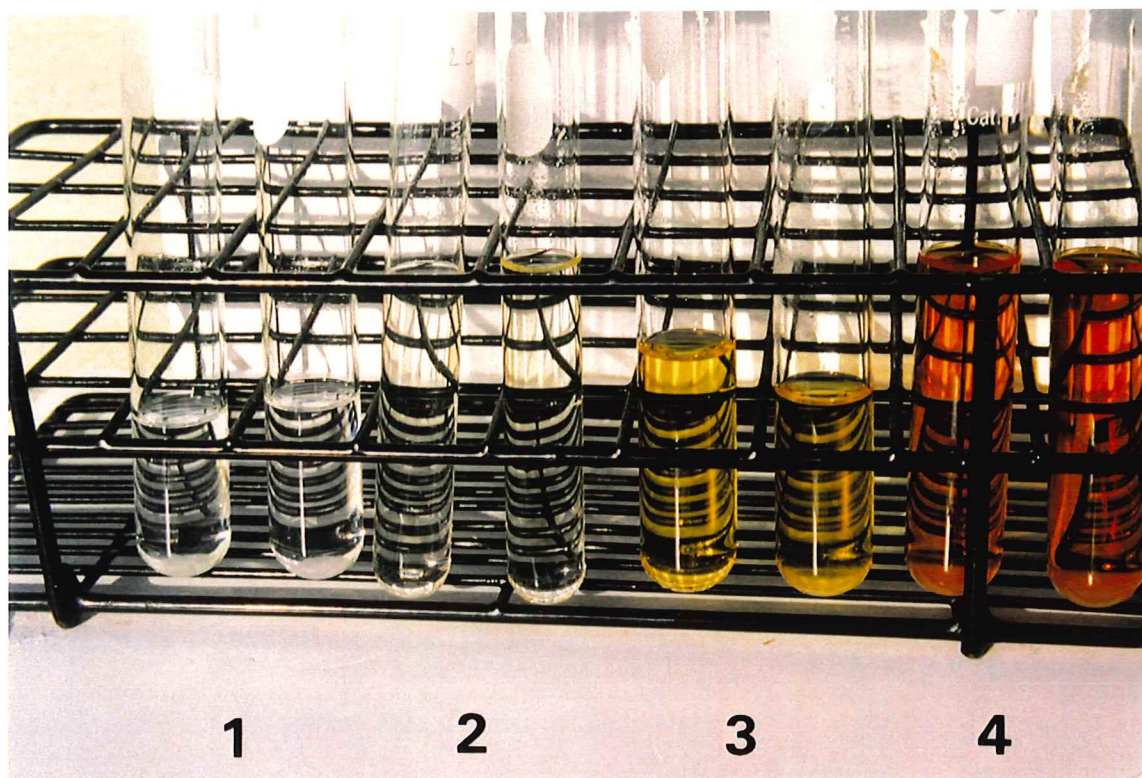


Figura 16. Extractos por duplicado de: 1 pedúnculo, 2 músculo, 3 integumento y 4 hepatopáncreas.



Figura 17. Extractos por duplicado de hepatopáncreas: 1 estanque 2, 2 inicio del experimento y 3 dieta A100.

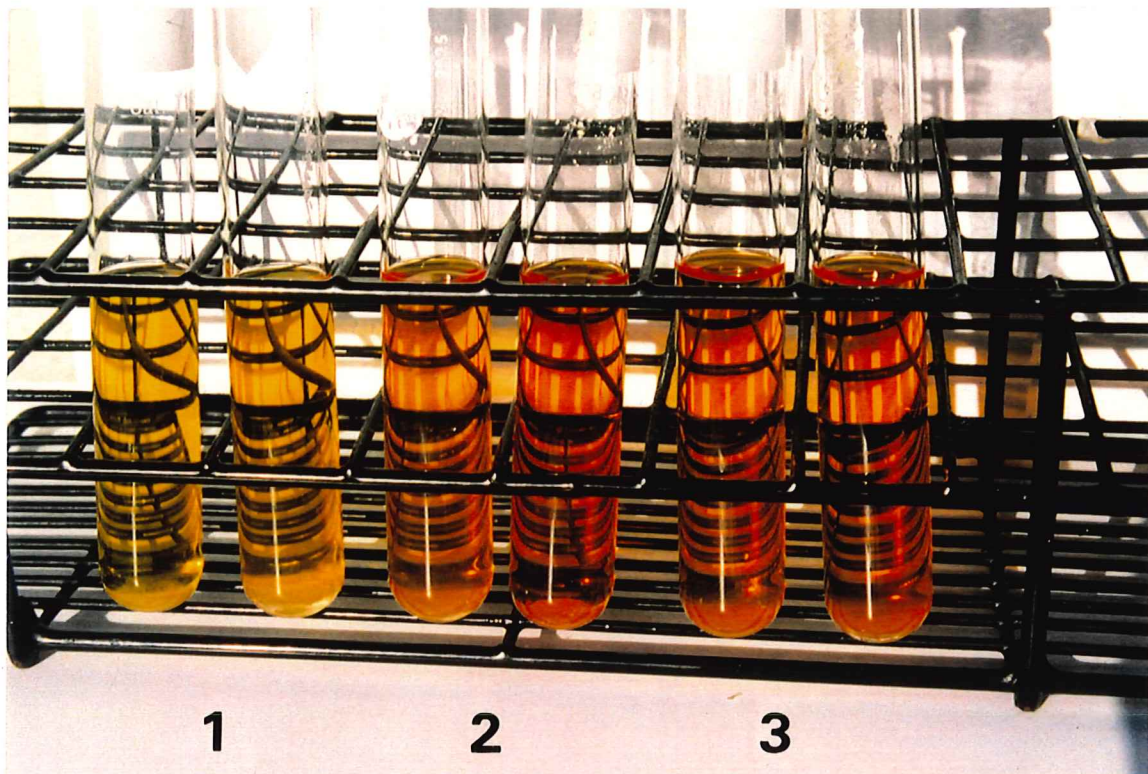


Figura 18. Extractos de hepatopáncreas: 1 A0, 2 A50, 3 A100.



Figura 19. Extractos de integumento: 1 control, 2 A50 y 3 A100.



Figura 20. Camarones provenientes del estanque 1.

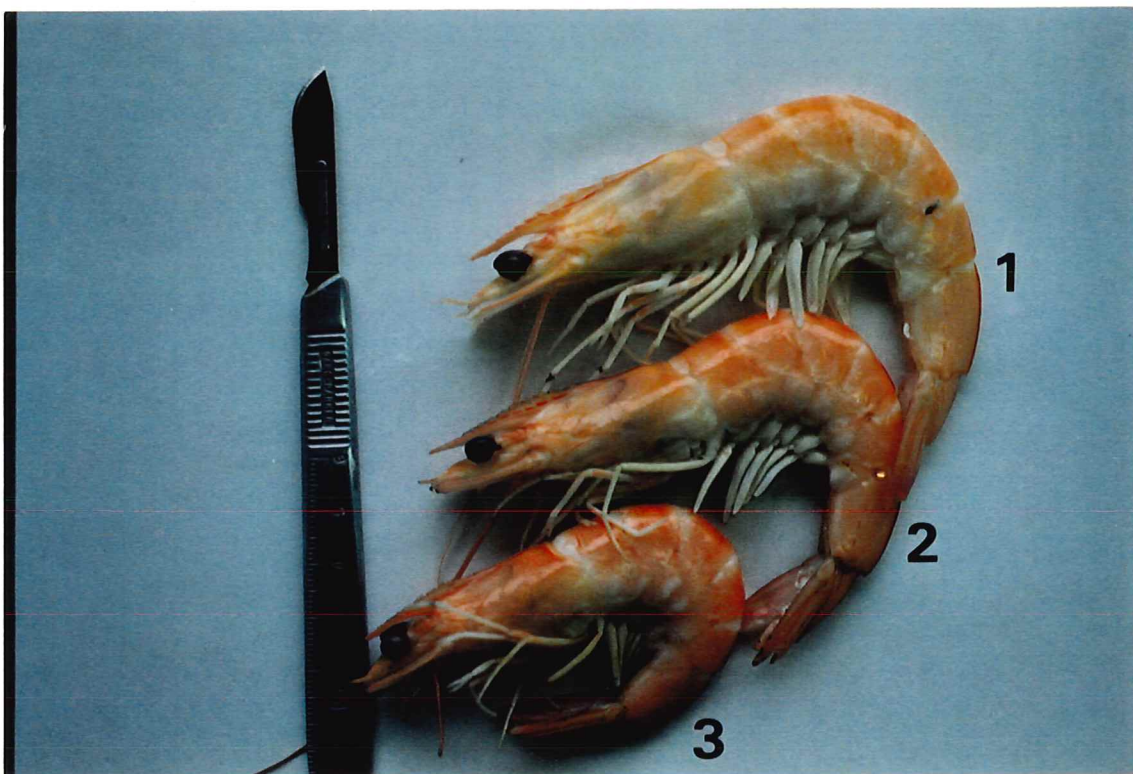


Figura 21. Camarones después del experimento: 1 A0, 2 A50 y 3 A100.

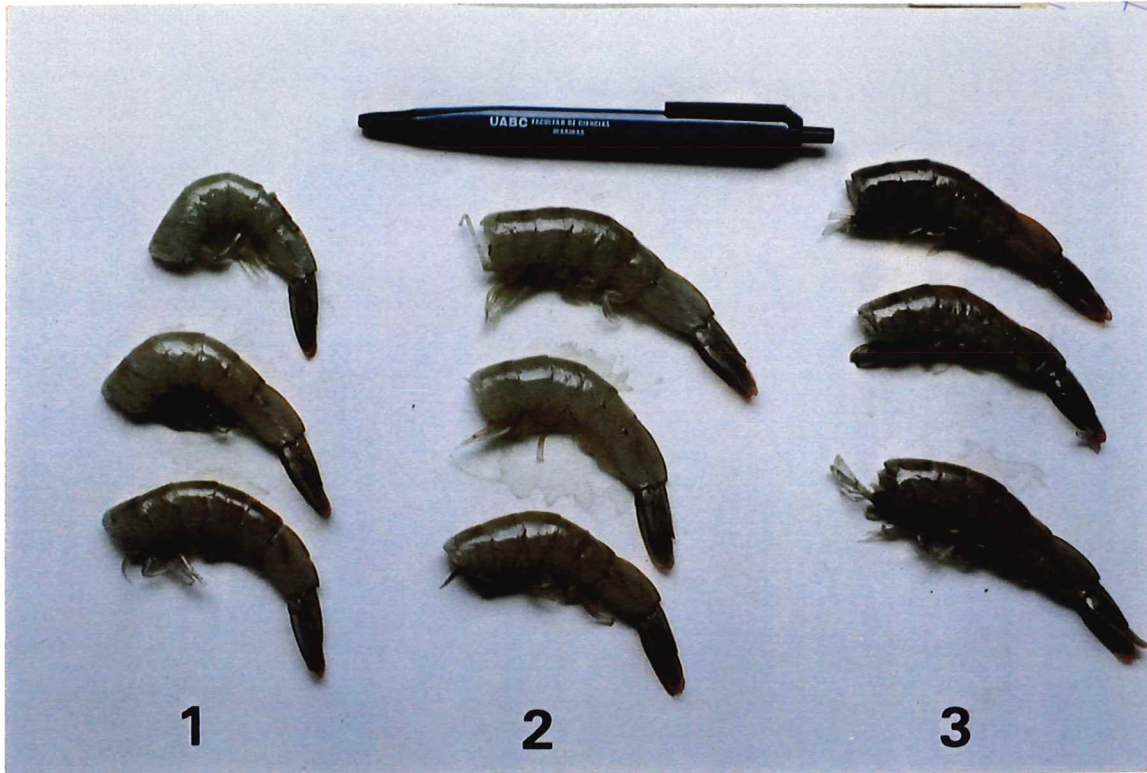


Figura 22. Camarones crudos: 1 A0, 2 A50, 3 A100.

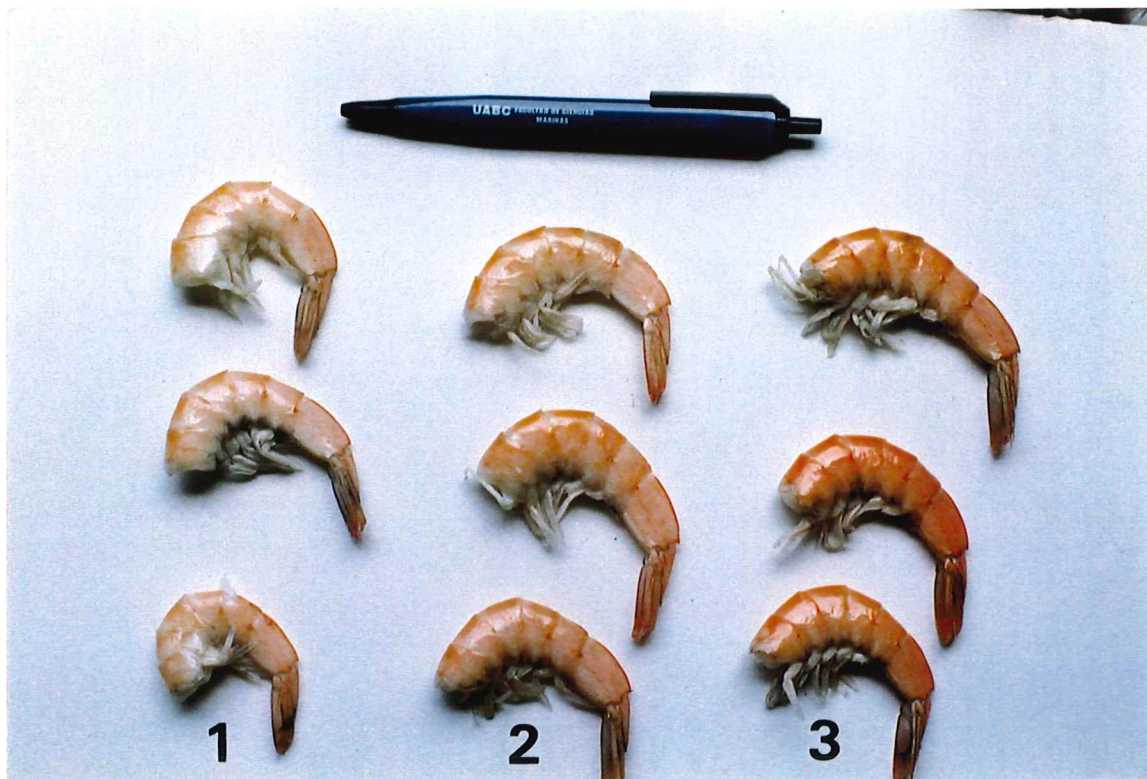


Figura 23. Camarones cocidos: 1 control, 2 A50 y 3 A100.

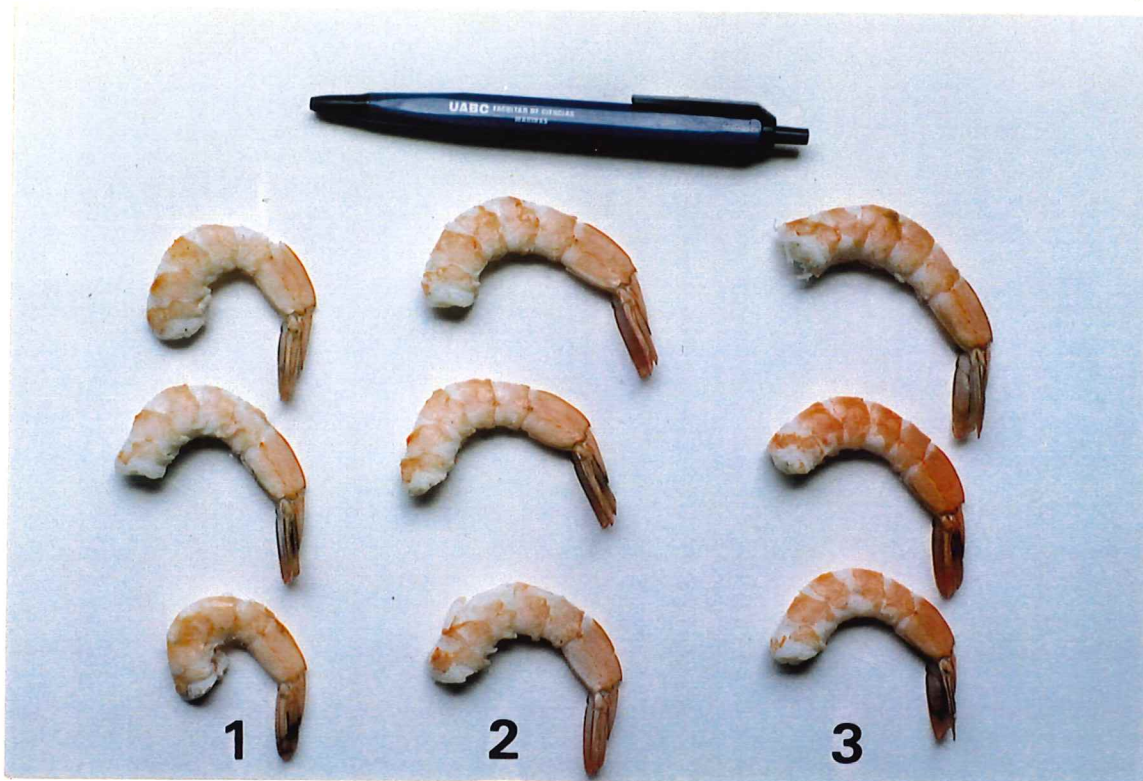


Figura 24. Camarones cocidos sin caparazón: 1 A0, 2 A50, 3 A100.

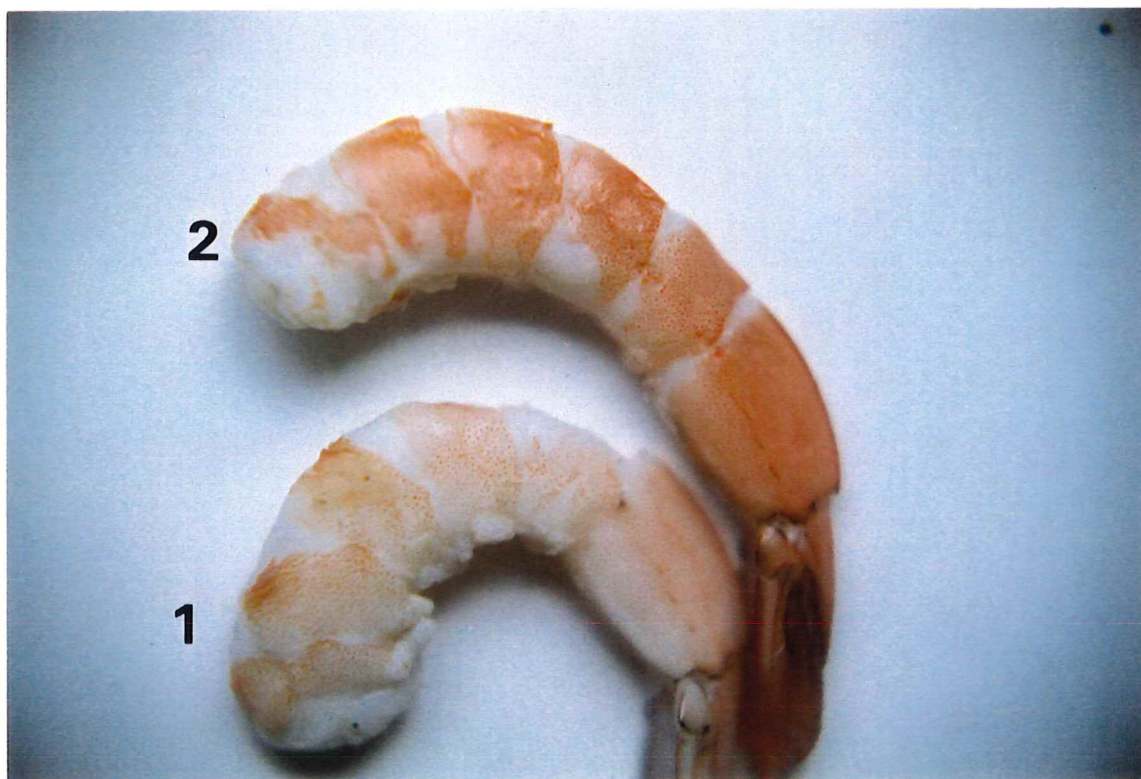


Figura 25. Detalle de camarones cocidos sin caparazón: 1 control y 2 A100.

IV. DISCUSIÓN

1. Preparación del alimento con inclusiones de β -caroteno

La estrategia en la incorporación de metabolitos bioactivos en las dietas estándares comerciales reside en eliminar la posible interferencia por factores relacionados al alimento, esto es necesario para establecer más claramente la relación causa-efecto en los camarones como resultado de la adición de β -caroteno.

El método que se utilizó para la preparación de los alimentos experimentales A50 y A100, cumplió con algunas de las premisas propuestas por D'Abramo y Castell (1994). Principalmente en lo que se refiere a los cuidados en el mezclado de los ingredientes y a la selección del proceso de fabricación que fue dirigida hacia la minimización de la pérdida de nutrientes lábiles al calor.

Consecuentemente se usaron técnicas de peletización o extrusión en frío. En este trabajo el secado de las dietas fue realizado al aire para evitar la destrucción o reducción de la actividad de los nutrientes lábiles.

La adición de β -caroteno junto con su matriz de aceite de maíz pudo tener alguna influencia en el contenido total de lípidos, estos se incrementaron de 8% a 11%. Esto si bien pudo no haberse reflejado nutricionalmente, si pudo haber influido desde el punto de vista de la gustocidad. En el presente trabajo no se midió el consumo del alimento, por lo que no se puede hablar de un efecto de gustocidad; sin embargo, los resultados que se discutirán mas adelante parecen ser un reflejo de la concentración de β -caroteno en la dieta.

El alimento comercial pudiera ser nutritivo y estimular el buen crecimiento y alta frecuencia de muda al ser aplicado en sistemas abiertos donde existe productividad natural, pero puede ser que no contenga suficientes niveles de carotenoides para mantener la pigmentación y otras funciones bioactivas al ser aplicados en sistemas con escasa productividad natural.

Las fórmulas convencionales de alimentos para camarón en ocasiones incluyen de un 5 al 15 por ciento de harina de cabezas de camarón, cuando existe disponibilidad en el mercado; este ingrediente cuando es de buena calidad, contiene cantidades importantes de carotenoides, sin embargo, debido a su procesamiento o pobre manejo su contenido y disponibilidad en forma libre de carotenoides son bajos o aún ausentes, además de que carecen de antioxidantes (Simpson *et al.*, 1981; Cruz *et al.*, 1993; Akiyama *et al.*, 1993). Esto se debe que los carotenoides son sensibles a la luz, calor, oxígeno, oxidantes, enzimas, ácidos y bases, por lo que pueden ser muy inestables, y su efecto pigmentante puede ser reducido o destruido como resultado del método de procesado, condiciones y duración de almacenaje (Meyers y Latcha, 1997.)

La adición de carotenoides en el alimento comercial para camarón en México podría considerarse poco importante, ya que los sistemas actuales de producción son mayormente semi-intensivos, sin embargo existe la tendencia de intensificar los cultivos para obtener mayor producción por unidad de área.

En condiciones de cultivos extensivos o semi-intensivos, los camarones tienen oportunidad de ingerir carotenoides resultantes de la productividad natural; mientras que bajo condiciones de cultivo intensivo, sería necesario añadir carotenoides a la dieta para lograr su coloración normal e

indirectamente beneficiarse en otras funciones metabólicas. El incremento en la coloración obtenida en este trabajo con la máxima inclusión corrobora el efecto del β -caroteno.

Howell y Mathews, (1991) encontraron cantidades insignificantes de carotenoides en alimento comercial para camarón *P. monodon* atribuyéndolo a la no incorporación o al deterioro de los carotenoides. Con un manejo y almacenamiento inadecuado de los alimentos de camarón, existe un significativo deterioro de los lípidos y bajo las mismas condiciones, los carotenoides serían también inestables.

2. Efectos logrados con la adición de β -caroteno

En este experimento los resultados de crecimiento están por debajo de los obtenidos normalmente bajo condiciones normales de cultivos comerciales (≥ 1 gr/ semana), esto pudo ser debido a la condición inicial de los camarones, ya que estuvieron por un período de tres meses sometidos a condiciones desfavorables de alimentación y espacio. Cuando los camarones son sometidos a condiciones inadecuadas para su desarrollo normal por períodos prolongados de tiempo, difícilmente vuelven a tener tasas de crecimiento altas, resultando en enanismo (Reprieto, com. personal)¹ lo cual pudo presentarse con los camarones utilizados.

Aunque el origen de los organismos experimentales pudo influir en el resultado final, por provenir de diferentes estanques, se asume que el aspecto que se buscaba investigar sobre reducción del nivel de carotenoides se logró

¹ M.C. Juan Francisco Reprieto, Consultores Grupo Peñasco, Apdo Postal 27, Empalme, Sonora, México.

mediante el acondicionamiento de tres meses al que se sometieron los organismos (Tabla II, Figs. 4-11), lo cual determinó el nivel basal de carotenoides, más no el de otros constituyentes del organismo.

Un aspecto que habría que reconsiderar en este trabajo es que se utilizaron solo dos repeticiones por tratamiento, con grupos de cuatro organismos, debido a la carencia de material biológico. Esto aún cuando debilita la confiabilidad de los resultados obtenidos, al usar pruebas de comparación no-paramétricas, las cuales tienen 95% de potencia estadística respecto de la estadística paramétrica (Zar, 1984), se presentaron resultados que apoyan la hipótesis de este trabajo. Para obtener mayor validación en los resultados con experimentos futuros con crustáceos, se recomienda por lo tanto, seguir los puntos propuestos por D'Abramo y Castell, 1994.

Los resultados de este trabajo solo se enfocan a β -caroteno y astaxantina, debido a que se buscaba un aprovechamiento directo del β -caroteno proveniente de *D. salina*. Por otra parte, la astaxantina es la manifestación más obvia de la transformación metabólica del β -caroteno y de otros carotenoides en el camarón.

Varios trabajos, (Chien y Jeng, 1992; Cortés, 1992; Menasveta *et al.*, 1993; Nègre-Sadargues *et al.*, 1993) favorecen la inclusión de astaxantina directamente en las dietas bajo el supuesto de mayor eficiencia de asimilación. Sin embargo, un aspecto que debe considerarse es la bioactividad, siendo mayor la del β -caroteno que la astaxantina. Esta propiedad permite la conversión del β -caroteno en dos moléculas de vitamina A (retinal).

En los vertebrados, los retinoides (retinal, retinol y ácido retinoico) juegan un papel importante en la transcripción de genes nucleares específicos

y en la diferenciación celular, lo cual ha sido demostrado histológica y bioquímicamente, (Ross, 1993; Dall, 1995). En este estudio no se investigaron los retinoides, sin embargo, varios autores reportan que se detectan cantidades importantes de retinoides en los pedúnculos oculares. Este registro presupone una función en los procesos de regulación hormonal.

En la práctica, esto es comprobado empíricamente al realizar la remoción de los pedúnculos oculares para promover la maduración gonadal y el desove, además de acelerar los procesos de muda (Castillo *et al.*, 1981; Caillouet, 1972; Primavera *et al.*, 1982; Emmerson, 1983).

En el tratamiento que se usó la mayor concentración de β -caroteno (A100) se obtuvo un 100% de sobrevivencia, lo cual puede ser indicador de que el β -caroteno pudiera tener un efecto de fortalecimiento en este grupo, sin embargo la mortalidad ocurrida en los otros grupos, no permite tener total certeza en este resultado.

Es improbable que un solo compuesto, como en este caso el β -caroteno, provea todos los requerimientos de los organismos. Se deben entonces considerar los efectos combinados de compuestos. Es así como, en un estudio con poslarvas de *P. monodon*, Merchie *et al.* (1998), encontraron un efecto sinérgico entre la vitamina C y la astaxantina, donde ellos observaron una mayor sobrevivencia y resistencia al shock osmótico en poslarvas alimentadas con suplementos de estos compuestos.

Los camarones de los estanques exteriores de cultivo fueron alimentados con el mismo alimento (camaronina), bajo las condiciones de crecimiento a las que estuvieron sometidos, es probable que el camarón se alimentase además del alimento, de la microflora y microfauna que se

desarrolló en el estanque, además de las macroalgas utilizadas previamente como biofiltros, todos los elementos anteriores pueden contener carotenoides naturales (Van Wheel, 1970), esto se refleja en los análisis de los camarones del los estanques 1 y 2, antes del experimento de asimilación de β -caroteno (Tabla 2). Lo anterior es debido a la naturaleza omnívora del camarón, por ejemplo, en su ambiente natural *P. duorarum* se alimenta de hojas, algas, diatomeas, flagelados, poliquetos, nemátodos, camarones, mísidos, copépodos, anfípodos, ostrácodos y moluscos, (Simpson *et al.*, 1981; Joyce, 1965; Broad, 1965).

Estos cambios registrados en este estudio podrían estar relacionados con los determinados en los crustáceos; en estos organismos, los cambios en la cantidad y concentración de pigmentos carotenoides dependen de múltiples factores, incluyendo la embriogénesis, el ciclo sexual, la muda, el color del sustrato y el control hormonal (Goodwin, 1960).

Análogamente a nuestros resultados con β -caroteno, Menasveta *et al.* (1993) encontraron un incremento lineal en la concentración de carotenoides totales en el caparazón de *P. monodon* alimentado con una dieta complementada con 50 ppm de astaxantina. Estos autores sugieren que la concentración debería de ser mayor a 50 ppm debido a las pérdidas que ocurren durante el procesado y almacenamiento del alimento, tales pérdidas no se registraron en este estudio, pues de acuerdo al análisis realizado, los alimentos A50 y A100 contenían 500 y 1000 ppm de β -caroteno respectivamente, aunque en condiciones de procesado industrial si ocurren pérdidas por los volúmenes que se manejan.

En relación a la bio-conversión del alimento preparado con β -caroteno se asume que se presentó una incorporación adecuada en los organismos. Al respecto, Dall *et al.* (1995) sugieren que la conversión de β -caroteno a astaxantina ocurre rápidamente después de la ingestión, ya que solo encontraron estos dos pigmentos en las glándulas digestivas de camarones silvestres.

La casi constante relación entre astaxantina y β -caroteno para hepatopáncreas obtenida en este estudio corrobora, lo obtenido por Dall *et al.* (1995), ya que sugieren un equilibrio en las cantidades de carotenoides. Aunque se presenten pérdidas de astaxantina por excreción o por las mudas, esta se recupera inmediatamente por la presencia del otro pigmento en el alimento o que se encuentre ya almacenado en el cuerpo, debido a las rutas bio-sintéticas que presentan el β -caroteno y la astaxantina. Es importante mencionar que en el presente trabajo se utilizaron técnicas de espectrofotometría, sin embargo existen otros métodos que permiten detectar una mayor diversidad de carotenoides, donde es necesario emplear técnicas de análisis de mayor resolución, como la cromatografía de capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución (Eugster, 1990).

3. Pigmentación lograda y efectos en la calidad del producto

La coloración de los camarones bajo cocción, puede variar en una serie de tonos que van desde el rosa pálido hasta el rojo pasando por tonos de amarillo-naranja. En la tabla V. se separan los colores y las concentraciones observadas en este estudio. En camarones sometidos a cocción es difícil

visualizar el color más apropiado para el consumidor, ya que son apreciaciones subjetivas que dependen de factores como la iluminación, la agudeza visual y la experiencia, además el hecho de que diferentes pigmentos ocurran simultáneamente en los tejidos del camarón.

Para resolver el problema de apreciación en los colores existen cartas comparativas de colores y aparatos (colorímetros) que pueden usarse para obtener consistencia en los colores más buscados por el consumidor (Skrede *et al.*, 1990; Skrede y Storebakken, 1986, Christiansen *et al.*, 1995).

Tabla V. Colores y concentraciones de β -caroteno y astaxantina para los integumentos de *L. vannamei* sometidos a cocción.

Pigmento	Longitud de onda en hexano	Tonos de color	Concentración mg/gr.
β -caroteno	450 nm	Amarillo a anaranjado	0.012 - 0.045
Astaxantina	470 nm	Rosado a rojo	0.015 - 0.103

La medición de pigmentos, así como el uso de colorímetros en los camarones podrían indicar al productor la dosis y tiempo de aplicación de la dieta conteniendo carotenoides para obtener la coloración deseada.

Es necesario investigar más sobre la efectividad del proceso de fabricación en la incorporación de pigmentos en las dietas, ya que en estos experimentos se observó cierta coloración adherida en las paredes de los acuarios; no existiendo certeza de si provenía de la lixiviación del alimento o de las excretas de los camarones, probablemente ambas fuentes contribuyeron a esta coloración. Para estudios posteriores sería recomendable medir la

ingestión de alimento y hacer pruebas de lavado del alimento para calcular la cantidad de alimento consumido, así como el pigmento que es lixiviado antes de ser ingerido.

Los camarones originales de los estanques 1 y 2 mostraron una coloración naranja-rojiza más apreciable, lo cual concuerda con las mayores concentraciones de pigmentos observadas. Esta coloración disminuyó de intensidad después del período de acondicionamiento previa al experimento de asimilación de β -caroteno. Al final del experimento, la pigmentación disminuyó aún más en el tratamiento control a diferencia de los otros dos tratamientos donde aumentó a niveles parecidos o mayores a los inicialmente medidos.

Estos resultados contrastan con los encontrados por Einen y Thomassen (1998), quienes encontraron que el salmón y la trucha no sufren cambios significativos en su coloración, aún después de largos períodos de inanición.

En un estudio de inanición con salmón del Atlántico, Einen *et al.* (1998), reportan cambios significativos en peso, forma del cuerpo y rendimiento de filetes, sin embargo las concentraciones de proteína y ácidos grasos en el músculo fueron ligeramente afectadas, así como tampoco se detectaron cambios significativos en la textura, color y análisis sensorial de los filetes cocinados.

Esta pérdida de color en los camarones no sería demasiado importante si el valor económico no sufriera decrementos. Sin embargo en los países asiáticos, así como en los mercados exigentes de productos de calidad donde la coloración es importante, el valor del camarón puede tener una diferencia de 7 a 26 dólares por kilo, lo cual va en detrimento de las ganancias de los acuacultores (Liao y Chien, 1989).

La coloración es importante ya que usualmente ejerce influencia en la primera impresión del consumidor al proveer una información sensorial y juega un papel importante en el reconocimiento e intensidad del gusto. Estos factores influyen la aceptabilidad general del producto y mejoran la seguridad en su consumo, ya que el color también puede ser indicativo de la frescura e integridad que se refleja en la presteza para ser ingerido (Kläui, 1981).

Es además importante el señalar, que los aditivos pigmentantes en el alimento de los animales también puede causar efectos negativos, así Peterson *et al.* (1966), reportan que la inclusión de un extracto de paprika rico en pigmentos carotenoides en alimento para trucha, resultó en un color amarillo indeseable en la piel de la trucha.

Es importante también considerar el costo que representa la adición de carotenoides en las dietas, Meyers y Sanderson, (1992), reportan que los carotenoides en dietas representan del 10 al 15% del costo del alimento, principalmente para salmón, y que en esas fechas, representaban un mercado mundial de más de 50 millones de dólares.

El β -caroteno de origen algal, tiene un costo aproximado de 800 dls. el Kg (Ernesto Mejia, Comunicación personal)², por lo que sería muy importante determinar las dosis y el tiempo requeridos para ser suministrados a los camarones, cuando se detecte una deficiencia de carotenoides. Además sería importante estudiar los efectos del β -caroteno en otras etapas de la vida del camarón, para mejorar el crecimiento, sobrevivencia, resistencia a enfermedades y eficiencia reproductiva.

² Ing. Ernesto Mejia. Nutrilite, Manager, 250, Schrimpf Road, Calipatria, CA, USA.

V. CONCLUSIONES

1. El β -caroteno del alga *Dunaliella salina* incorporado en el alimento del camarón *Litopenaeus vannamei* ejerce un efecto positivo en la pigmentación externa de camarones previamente privados de carotenoides.
2. Aparentemente, la dosis de 100 mg de β -caroteno en 100 gr de alimento fue la mejor para la sobrevivencia de camarones estresados, ejerciendo un posible efecto de recuperación.
3. Los camarones mantenidos con el alimento balanceado (camaronina®) alternándolo con inanición, disminuyen sus contenidos de pigmentos carotenoides en el cuerpo.
4. De los cuatro órganos analizados, el hepatopáncreas y el integumento poseen las mayores cantidades de β -caroteno y astaxantina, mientras que músculo y pedúnculos registran las menores cantidades.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda que en futuros bioensayos con camarones, sean utilizados grupos con un mayor número de muestras, así como un mayor número de réplicas, para obtener una mejor confiabilidad estadística.
2. Sería interesante considerar el análisis de una gama mas amplia de pigmentos en otros estadios de la vida del camarón, para avanzar en el conocimiento de los carotenoides en los camarones.

VII. LITERATURA CITADA

- Akiyama, D., Dominy, W. G. y Lawrence, A., 1993. Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales. En: "Memorias del primer Simp. Intern. de Nut. y Tecnol. del Alim. para Acuicultura". UANL. 43-79.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M., 1983. On the factor which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawill*. Plant Physiol. 72:593-597.
- Bernhard, K., 1990. Synthetic astaxanthin, the route of a carotenoid from research to commercialisation. In: Carotenoids: Chemistry and Biology. Krinsky, N., M.M. Mathew-Roth and R.F. Taylor. Eds. Plenum Press, New York. 382 pp.
- Binkowski, F. P., Sedmak, J. J. and Jolly, S. O., 1993. An evaluation of *Phaffia* yeast as a pigment source for salmonids. Aquaculture magazine. V.19 2:54-59.
- Bjerkeng, B. Storebakken, T. and Liaaen-Jensen, S., 1992. Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation. Aquaculture, 108:333-346.
- Britton, G., Armit, G., Patel, S. Y. and Shone C. C., 1981. Carotenoproteins. In: carotenoids chemistry and biochemistry. Briton G. and T. W. Goodwin Eds. Proceedings of the 6th International Symposium on carotenoids. Liverpool, U.K. Pergamon Press. 399 pp.

- Broad, A. C., 1965. Environmental requirements of shrimps. *Publ. Publ. Hlth. Serv., Washington (999-WP-25):86-91.*
- Caillouet, A. C., 1972. Ovarian maturation induced by eyestalk ablation in pink shrimp, *Penaeus duorarum* Burkenroad. *Proc. World Maric. Soc.* 3:205-225.
- Castillo, R., Negre-Sadargues G. and Lenel, R., 1981. General survey of the carotenoids in crustacea. In: carotenoids chemistry and biochemistry. Briton G. and T. W. Goodwin Eds. *Proceedings of the 6th International Symposium on carotenoids.* Liverpool, U.K. Pergamon Press. 399 pp.
- Ceccaldi, H.J., 1968. Contribution a l'etude de la biologie des pigments de *Aristeus antennatus* (Risso, 1826). *Recl. Trav. Stn. Mar. Endoume,* 43(59):365-381.
- Chien, Y. H. and Jeng S. C., 1992. Pigmentation of kuruma prawn. *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture,* 102:333-346.
- Choubert, G., 1979. Tentative utilization of spirulin algae as a source of carotenoid pigments for rainbow trout. *Aquaculture.* 18:135-143.
- Christiansen, R., Stuksnaes, G., Estermann, R., and Torrissen, O. J., 1995. Assessment of flesh colour in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Res.* ,25:311-321.
- Cictus, 1983. III taller de cultivo de camarón. Universidad de Sonora. 163 p.
- Cortés, R. C., 1992. Aspectos generales de pigmentación para peces y crustáceos. En: "Memorias del primer Simp. Intern. de Nut. y Tecnol. del Alim. para Acuicultura". UANL. pp 345-353.

- Cruz, L. E., Rique, D. y Martinez J. A., 1993. Evaluación de dos subproductos de camarón en forma de harina como fuente protéica en dietas balanceadas para *Penaeus vannamei*. En: "Memorias del primer Simp. Intern. de Nut. y Tecnl. del Alim. para Acuicultura". UANL. 205-234.
- D'Abramo, L.R., Baum, N.A., Bordner, C.E. and Conkline, D.E., 1983. Carotenoids as a source of pigmentation in juvenile lobster. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40:699-704.
- D'Abramo, L.R., and Castell, J. D., 1994. Metodología para la investigación nutricional. En: "Memorias del Segundo Simp. Intern. de Nut. y Tecnl. del Alim. para Acuicultura". UANL. pp 103-121.
- Dall, W., 1995. Carotenoids versus retinoids (Vitamin A) as essential growth factors in penaeid prawns (*Penaeus semiculcatus*). *Marine Biology*. 124:209-213.
- Dall, W., Smith, D.M. and Moore, L.E., 1995. Carotenoids in the tiger prawn *Penaeus esculentus* during ovarian maturation. *Mar. Biol.*, 123:435-441.
- Einen, O. and Thomassen, M. S., 1998. Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*). II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. *Aquaculture*, 169:37-53.
- Einen, O., Waagan, B. O. and Thomassen, M. S., 1998. Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*). I. Effects in weight loss, body shape, slaughter and fillet-yield, proximate and fatty acid composition. *Aquaculture*, 170:48-60.

- Emmerson, W. D., 1983. Maturation and growth of ablated and unablated *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 32:235-241.
- Eugster, C.H., 1990. Recent progress in carotenoid structures. In: *Carotenoids: Chemistry and Biology*. Krinsky, N., M.M. Mathew-Roth and R.F. Taylor. Eds. Plenum Press, New York. 382 pp.
- Foss, P., Storebakken, T., Austreng, E. and Liaaen-Jensen, S., 1987. Carotenoids in diets for salmonids. V. Pigmentation of rainbow trout and the sea trout with astaxanthin and astaxanthin dipalmitate in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture*, 65:239-305.
- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E. and Streiff, K., 1984. Carotenoids in diets for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture*, 41:213-226.
- Garmendia, N. E. A., 1994. Costo de Producción en sistema semiintensivo. *Memorias del Seminario Internacional de Camaronicultura en México, "Camarón '94"*. Mazatlan, Sin. Feb. 10-12, 1994. México.
- Goodwin, T. W., 1960. *Physiology of crustacea*. Academic press. New York. pp. 101-140.
- Howell, B. K. and Matthews, A. D., 1991. The carotenoids of wild and blue disease affected farmed tiger shrimp (*Penaeus monodon*, Fabricus). *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 98B 2/3:375-379.
- Isler, O., 1971. *Carotenoids*. Hoffmann-LaRoche & CO. LTD. Switzerland. 923 pp.
- Joyce, E. A. Jr., 1965. The commercial shrimps of the northeast coast of Florida. *Fla. State Bd. Conserv., Prof. Pap. Ser.*, 6:224.

- Kläui, H., 1981. Industrial and commercial uses of carotenoids. In: carotenoids chemistry and biochemistry. Britton G. and T. W. Goodwin Eds. Proceedings of the 6th International Symposium on carotenoids. Liverpool, U.K. Pergamon Press. 399 pp.
- Kontara, E. K., Merchie, G., Lavens, P., Robles, R., Nelis, H., De Leenheer, A. and Sorgeloos, P., 1997. Improved larviculture outputs of postlarval shrimp *Penaeus vanamei* through supplementation of l-ascorbyl-2-polyphosphate in the diet. *Aquaculture International*, 5:127-136.
- Krinsky, N. I., 1991. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:238S-46S.
- Kurmaly, K. and Latscha, T., 1993. Health and nutrition complete with astaxanthin. Part 1. Physiological functions. *Aquaculture News*. 1(1):3.
- Latscha, T., 1991a. Carotenoids in aquatic animal nutrition. Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop. D. M. Akiyama and R. K. H. Tan. Eds. American Soybean Association. p. 68-79.
- Latscha, T., 1991b. Crustaceans pigments. *Crustacean nutrition newsletter.*, 7(1):53-60.
- Lee, Y-K. and Soh, C-W., 1991. Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 27:575-577.
- Liao, I.C. and Chien, Y. H., 1989. Evaluation and comparison of culture practices for *Penaeus Japonicus*, *P. penicillatus*, and *P. chinensis* in Taiwan. In: Main and W. Fulks (Editors), The culture of cold tolerant shrimp: Proceedings of an Asian-US Workshop on shrimp culture. The Oceanic Institute, Honolulu, HI. pp 49-63.

- Mathews-Roth, M. M., 1981. Medical applications and uses of carotenoids. In: carotenoids chemistry and biochemistry. Briton G. and T. W. Goodwin Eds. Proceedings of the 6th International Symposium on carotenoids. Liverpool, U.K. Pergamon Press. 399 pp.
- Menasveta, P., Worawattanamateekul, W., Latscha, T. and Clark, J. S., 1993. Correction of black tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) coloration by astaxanthin. *Aquacultural Engineering*, 12:203-213.
- Merchie, G., Kontara, E., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K. and Sorgeloos, P., 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research*, 29:579-585.
- Meyers, S. P. and Sanderson, G. W., 1992. Natural pigments for salmon feeds. *Feed Manage.*, 43(11):12-14.
- Meyers, S. P. and T. Latscha, 1997. Carotenoids. In: Crustacean nutrition, advances in world aquaculture. L. R. D'Abramo, D. E. Coaklin and D. M. Akiyama (Editors). World Aquaculture Society, pp. 164-193.
- Miki, W., Otaki N., Shimidzu, N. and Yokohama, A., 1994. Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. *J. Mar. Biotechnol.*, 2:35-37.
- Nègre-Sadargues, G., Castillo, R., Petit, H., Sancé, S., Gomez Martinez, R., Milicua, J-C. G., Choubert, G. and Trilles, J-P., 1993. Utilization of synthetic carotenoids by prawn *Penaeus japonicus* reared under laboratory conditions. *Aquaculture*, 110:151-159.
- Nelis, H.J.C.F., Chen, H., Sorgelos, P., Jonckheere, P. A., Criel, G.R. and De Leencheer, A.P., 1988. Quantitative and qualitative changes in the

- carotenoids during development of the brine shrimp *Artemia*. *Journal of Lipid Research.*, Vol. 29:491-499.
- Nonomura, A. M., 1990. Industrial Biosynthesis of carotenoids. In: *Carotenoids: Chemistry and Biology*. Krinsky, N., M.M. Mathew-Roth and R.F. Taylor. Eds. Plenum Press, New York. 382 pp.
- Okada, S., Nur-E-Borhan, S. A., Watabe, S. and Yamaguchi, K., 1994. Pigmentation of cultured black tiger prawn by feeding a *Spirulina* supplemented diet. 3rd Int. Marin. Biotech. Conf. Abst. Tromsoe, Norway.
- Otazu, A. M, and Ceccaldi, H. J., 1984. Influence of purified carotenoids added to compound diets on pigmentation of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture*, 36:217-228 (En frances).
- Paniagua-Michel, J., 1995a. Growth of *Dunaliella bardawill* under carotenogenic conditions. *J. Mar. Biotechnology.*, 2:101-104.
- Paniagua-Michel, J. 1995b. On the potential of screened microalgae as food supplement for aquaculture. *World Aquaculture Society Meeting, aquaculture 1995. Book of abstrax.* 185 p.
- Peterson, D. H. , Jager, H. K., Savage, G. M., Washburn, G. N. and Westers, H., 1966. Natural coloration of trout using xanthophylls. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 95:408-414.
- Petit, H., Sance, S., Nègre-Sadargues, G. Castillo, R. and Trilles P.J., 1990. Ontogenic of carotenoid metabolism in the prawn *Penaeus japonicus* Bate (1988) (crustacea penaeidea). A quantitative approach. *Comp. Biochem. Phisiol.* , vol. 99B, no. 3 pp 667-671.

- Primavera, J. H., Young, T., and De los Reyes C., 1982. Survival, maturation, fecundity and hatching rates of unablated and ablated *Penaeus indicus* H. M. Edwards from brackishwater ponds. Proc. Symp. Coastal Aquaculture., 1:48-54.
- Ross, A. C., 1993. Overview of retinoid metabolism. Symposium: Retinoids: cellular metabolism and activation. 76th annual meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology. Anaheim, CA, April 7, 1992.
- Simpson, K. L. and Chichester C. O., 1981. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. Ann. Rev. Nutr., 1:351-374.
- Simpson, K. L., Katayama, T. and Chichester, C. O., 1981. Carotenoids in fish feeds. In: Carotenoids as colorants and vitamins A precursors. Technological and nutritional applications. Baverfend C. (Ed.). Academic Press. New-York, London. 938 pp.
- Skrede, G., Risvik, E., Huber, M., Enerson, G. and Blumlein, L., 1990. Developing a colour card for raw flesh of astaxanthin-fed salmon. J. Food Sci., 55:356-363.
- Skrede, G. and Storebakken, T., 1986. Instrumental colour analysis of farmed and wild Atlantic salmon when raw, baked and smoked. Aquaculture, 53:279-386.
- Sommer, T. R., Morrissy, N. M. and Potts, W. T., 1991. Growth and pigmentation of marron (*Cherax tenuimanus*) fed a reference ration supplemented with the microalga *Dunaliella salina*. Aquaculture, 99:285-295.

- Torrissen, O. J., 1990. Biological activities of carotenoids in fishes. The current status of fish nutrients in aquaculture. In: M. Takeda and T. Watanabe, editors. Proc. of the third Int. Simp. on feed and Nut. of Fish., Tokio Univ. of Fish., Tokio, Japan.
- Van Wheel, P.B., 1970. Digestion in crustacea. In: "Chemical Zoology". (Florkin, M. y Scheer B. Editores). Academic Press. New York and London. 250 pp.
- Zar, H. J., 1984. Biostatistical analysis. Prentice Hall, Englewood Cliff. New Jersey. 720 pp.