

PIGMENTACION DE LA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) CON CAROTENOIDES DE FLOR DE CEMPASUCHIL (*Tagetes erecta*) EN COMPARACION CON LA ASTAXANTINA

PIGMENTATION OF TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) WITH CAROTENOIDS FROM AZTEC MARIGOLD (*Tagetes erecta*) IN COMPARISON TO ASTAXANTHIN

J. T. Ponce-Palafox ^{1*}, J.L. Arredondo-Figueroa ² y E. J. Vernon-Carter ²

¹Lab. de Bioingeniería Acuícola. Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. P.O. Box 584, Cuernavaca, Morelos, México.

²DHB, CBS, Planta Experimental de Producción Acuícola DIPH, CBI. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186. Vicentina-Izt. 09340, México, D. F.

Resumen

Este estudio fue diseñado para determinar los efectos de varias concentraciones de carotenoides de flor de cempasúchil en la dieta sobre la pigmentación de la piel de tilapia. Se utilizaron tres dietas pigmentantes conteniendo carotenoides en concentraciones de 50,100 y 250 mg/kg en la dieta. El grupo control fue alimentado con una dieta sin pigmento de flor de cempasúchil. La mejor estrategia para la pigmentación comercial de la piel de tilapia fue la dieta que contenía 50 mg/kg de astaxantina (Carophyll Pink) durante 60 días.

Palabras claves: astaxantina, tilapia, pigmentación, flor de cempasúchil.

Abstract

This study was designed to determine the effects of various dietary Aztec marigold carotenoid concentrations on the skin pigmentation of tilapia. Three pigmented diets containing carotenoid at concentrations of 50,100 and 250 mg/kg diet. The control group was fed with a non-pigmented diet exclusively. The best strategy for pigmentation was to feed the tilapia with a diet containing astaxanthin (Carophyll Pink) at 50 mg/kg for 60 days.

Keywords: astaxanthin, tilapia, pigmentation, aztec marigold.

1. Introducción

La expansión de la acuicultura en los últimos años ha estimulado el interés en la aplicación bioquímica de los carotenoides para la pigmentación de organismos cultivados, ya que el color proporciona un valor agregado a algunas especies de peces como el salmón y la trucha arco-iris. La tilapia roja se ha producido a base de una selección genética (Lovshin, 1998) y el color rojo en la piel es atractivo en el mercado, no obstante este color no es consistente y por lo tanto el uso de pigmentos en el alimento puede ser una alternativa para mantener la calidad y presentación de la tilapia roja. El pigmento más frecuentemente encontrado en peces y crustáceos es la Astaxantina (3,3'-dihidroxi-β-caroteno 4,4-dione) la cual, con

sus ésteres es el principal pigmento en la carne del salmón, dando un color rosa a rosanaranjado. Por otra parte la cantaxantina está estructuralmente relacionada con estos compuestos y puede considerarse un intermedio en su biogénesis (Gordon y Bauernfeind, 1981).

Algunos factores que determinan el grado de pigmentación de los organismos son los antecedentes genéticos del pez, el estado de maduración sexual y el peso. Durante la maduración sexual el pez decrece el nivel de astaxantina en la carne, pero se incrementa progresivamente en las gónadas (Torrissen, 1984; Storebakken y col., 1987; Torrissen y Naevdal, 1988). Al utilizar ingredientes vegetales como fuentes pigmentantes en la dieta en peces se han inducido otras

*Autor para la correspondencia: E-mail: jesus.ponce@usa.net
Tel. (77) 73297000 Ext. 3512

coloraciones como es el caso de la alga *Spirulina* que da una tonalidad amarilla parda (Choubert, 1979); flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), que produce una coloración amarilla parda (Lee y col., 1978) y *Phaffia rhodozima* que presenta una tonalidad rosa salmonada Johnson y col., 1980).

Los estudios de pigmentación en la tilapia son escasos, sin embargo Wagner et al. (2002) han estudiado la aparición de los melanóforos pigmentantes en las líneas originarias de tilapia roja de Tailandia y organismos silvestres de *O. niloticus* utilizados para producir progenies artificiales de silvestre X silvestre y roja X roja. En condiciones naturales *Oreochromis niloticus* se alimenta de algas y detritos. La administración de astaxantina en tilapia roja a varias concentraciones tiene una función nutricional positiva en el metabolismo intermedio, como lo demuestran los exámenes histológicos del hígado (Segner y col., 1989). Al alimentar a esta especie con cuatro fuentes de pigmentos como *Spirulina*, *Tagetes erecta*, cabeza de camarón y cúrcuma (*Cucurma longa*), los peces desarrollan color rojo, dorado y naranja. La base de las aletas de los peces que se alimentaron con *Tagetes erecta*, desarrollaron una coloración amarilla (Boonyaratpalin y Unprasert, 1989).

El pigmento mas utilizado de manera comercial es la astaxantina sintética, cuyo uso está siendo restringido en países que consumen grandes cantidades de camarones y salmónidos, como es el caso de los Estados Unidos, Japón y la Comunidad Económica Europea. Lo anterior aunado a otros problemas entre los que se encuentra la toxicidad de algunos pigmentos sintéticos, hace necesario el desarrollo de alternativas para la obtención de pigmentos carotenoides de origen natural. Por lo que la finalidad del presente

trabajo fue determinar el efecto de la oleorresina esterificada de pétalos de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) microencapsulada y agregada en diferentes dosis en la dieta y comparándola con el pigmento comercial Carophyll Pink, como una alternativa del uso de pigmentos naturales para propósitos de acuicultura.

2. Materiales y métodos

El experimento tuvo una duración de 60 días. Los ejemplares de tilapia utilizados en el experimento (*Oreochromis niloticus*, de la línea Stirling), se obtuvieron del Centro Acuícola de Zacatepec, en el Estado de Morelos y fueron trasladados a la Planta Experimental de Producción Acuícola, en la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, donde se aclimataron durante cinco semanas, alimentándolas con una dieta control antes de iniciar el experimento. Los organismos se seleccionaron de acuerdo a la talla (Tabla 1) y a sus características fenotípicas (utilizando únicamente organismos sin franjas laterales) y se colocaron en tanques de plástico de 680 litros cada uno, con sistema de recirculación de agua, a una densidad de 20 organismos por tanque y 60 organismos por tratamiento.

Se utilizaron tres grupos experimentales y un control con tres repeticiones por tratamiento. Las fuentes de pigmento utilizadas fueron: Carophyll Pink (8% astaxantina sintética, Hoffman-La Roche, Base Switzerland) en una concentración de 50 mg/kg (dieta de referencia CP), 6.5% de carotenoides totales conteniendo 90% de luteína de oleorresina de flor de cempasúchil, Bioquimex-Reka, S.A. de C.V. Querétaro, México, en forma microencapsulada en una concentración de 100 mg/kg (dieta D100) y 250 mg/kg (dieta D250). Se adiciono un exceso de 5% de pigmento para obtener la concentración esperada.

Tabla 1. Crecimiento, sobrevivencia y factor de conversión de alimento de las tilapias en los diferentes tratamientos.

Parámetro/tratamiento	DC	CP	D100	D250
Peso inicial (g)	32.5 ^a	32.0 ^a	31.5 ^a	32.0 ^a
Peso final (g)	68.0 ^a	75.3 ^a	72.6 ^a	71.7 ^a
Tasa de crecimiento	0.53 ^a	0.62 ^a	0.59 ^a	0.55 ^a
Sobrevivencia (%)	82.0 ^a	85.0 ^a	86.0 ^a	83.0 ^a
FCA	1.5 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.4 ^a

DC = Dieta Control; D100 = 100 mg/kg de carotenoides esterificados; D200 = 200 mg/kg de carotenoides esterificados; CP = 50 mg/kg astaxantina sintética (Carophyll Pink).

Tabla 2. Composición de las dietas experimentales para la pigmentación de la piel de tilapia.

Ingredientes	DC	D100	D250	CP
Harina de pescado	30	30	30	30
Harina de soya	14	14	14	14
Harina de salvadillo	20	20	20	20
Harina de sorgo	18	18	18	18
Harina de trigo	8	8	8	8
Almidón	8.5	8.32	8.09	8.4
Ácido Ascórbico	0.5	0.5	0.5	0.5
Premezcla mineral	0.5	0.5	0.5	0.5
Premezcla vitamínica	0.5	0.5	0.5	0.5
Fuente de pigmento	-	0.18	0.41	0.1
	100	100	100	100
Proteína cruda	30.5	31.2	32.3	29.8
Lípidos	5.3	5.2	5.4	5.1
Digestibilidad	91	94	92	93

DC = Dieta Control; D100 = 100 mg/kg de carotenoides esterificados; D200 = 200 mg/kg de carotenoides esterificados; CP = 50 mg/kg astaxantina sintética (Carophyll Pink).

La dieta control (Tabla 2) se preparó siguiendo el criterio de FAO (1987). El diámetro del pellet utilizado fue de 2 mm y la longitud de 5 mm. Los peces fueron alimentados manualmente dos veces al día en una proporción de 3% del peso corporal durante 60 días. La cantidad de alimento fue disminuyendo de acuerdo al tamaño de las muestras experimentales. El contenido de proteína y lípidos fueron determinados basándose en los métodos oficiales de análisis de la AOAC (1995). La mortalidad fue registrada diario y el peso individual al inicio, 20, 40 y 60 días. Se efectuaron determinaciones diarias de oxígeno disuelto, pH y temperatura. Cada dos semanas se determinó la alcalinidad total, siguiendo los métodos convencionales descritos en Arredondo y Ponce-Palafox (1998). El agua de los tanques fue cambiada totalmente cada semana. Para determinar el color aparente se utilizó una escala de color del 1 al 8 modificada de Foss y col. (1984). El contenido total de pigmentos en piel como en las dietas se determinó de acuerdo a los métodos utilizados en Arredondo y col. (2003). En el caso de la piel, ésta fue separada siguiendo el contorno del opérculo y

las aletas dorsal, caudal y abdominal. Las muestras fueron refrigeradas y procesadas posteriormente con un espectrofotómetro como se describe en Arredondo y col., (2003). El efecto de los tratamientos fue identificado utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con cuatro dietas como variables independientes, previa transformación logarítmica de los datos. La prueba de Tukey fue realizada para determinar los efectos entre las dietas (Montgomery, 1984).

3. Resultados

Las condiciones de calidad de agua registradas durante el experimento se muestran en la Tabla 3. Los datos indican que el pH, la temperatura y la alcalinidad, se mantuvieron estables a lo largo del experimento y dentro de los intervalos aceptables para esta especie. La concentración de oxígeno disuelto en el agua de los tanques presentó la mayor fluctuación con un coeficiente de variación de 22%, pero siempre por arriba de los niveles críticos (>2.5 mg/l)

Tabla 3. Parámetros físico-químicos del agua del sistema experimental.

VARIABLES	X	n	C.V.
pH	8.2±0.25	195	3
O.D. (mg/l)	6.6±0.97	195	22
Temperatura (°C)	29.1±2.04	200	7
Alcalinidad mg/l)	297±11.35	20	4

Tabla 4. Concentración de carotenoides totales (g/kg) en la piel de la tilapia.

Tiempo	DC	CP	D100	D250
0 días	18.5±1.32			
60 días	19.0±2.65 ^a	24±5.31 ^{a,b}	30±3.43 ^b	47±5.42 ^c

DC = Dieta Control; D100 = 100 mg/kg de carotenoides esterificados;
D200 = 200 mg/kg de carotenoides esterificados; CP = 50 mg/kg astaxantina sintética (Carophyll Pink).

Tabla 5. Coloración de la piel de tilapia en las dietas experimentales al final del experimento.

Tratamiento	Escala	Color	n
DC	1-2	Plateado	65
CP	7-8	Blanco y rosa	31
D100	3-4	Amarillo claro	30
D250	5-6	Amarillo intenso	30

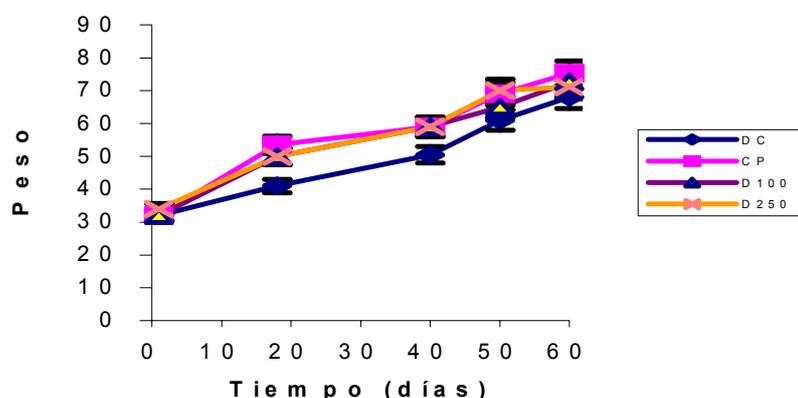


Fig. 1. Crecimiento de las tilapias durante el experimento de pigmentación.

Con respecto al crecimiento de los organismos (Fig. 1), se encontró que el incremento en peso promedio fue de 0.54 g/día y no existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($\alpha= 0.05$), lo que demuestra que la dieta con pigmento no tuvo ningún efecto negativo sobre la tasa de crecimiento de los organismos. Tampoco se observó una relación entre la frecuencia de alimentación y la ganancia en peso. La Tabla 4 muestra la concentración de carotenoides totales en la piel de la tilapia al inicio y a los 60 días de la aplicación de las dietas experimentales. Los resultados muestran que la mayor asimilación del pigmento se presentó

significativamente en la dieta D250 y fue menor en las otras dietas. No se encontraron diferencias significativas entre la demás dieta D100 y CP. Los resultados de la escala de color (Tabla 5) indican diferencias aparentes entre los tratamientos. A partir de la segunda semana se observó un aumento en el color de la piel de la tilapia en los tratamientos donde se adicionaron pigmentos. El color se intensificó en las semanas siguientes. Se encontró que los carotenoides de la flor de cempasúchil proporcionan un color amarillo con varias tonalidades dependiendo de la concentración en la piel de la tilapia y el de Carophyll Pink fue tendiendo al color rosado.

Discusión

Los valores de pH, temperatura, oxígeno y alcalinidad se encontraron dentro del intervalo aceptable para la especie. La densidad de los organismos por otra parte se mantuvo baja. En estas condiciones experimentales las tilapias utilizadas en el ensayo lograron una tasa de crecimiento y sobrevivencia adecuada, que permite validar los resultados de las dietas con pigmentos.

A pesar de que se lograron detectar diferencias significativas en la concentración de carotenoides entre la dieta D250, las diferencias externas de color no fueron muy aparentes, ya que se ha encontrado que las especies carnívoras como el salmón y la trucha fijan mejor el color tanto en el músculo como en la piel y en las especies herbívoras esto no es así debido al tipo de dieta que consumen a pesar de asegurar su ingestión. Sin embargo, la aplicación de luteína en el alimento favorece el metabolismo de la tilapia y ayuda a mejorar la tasa de crecimiento.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran una relación dosis-respuesta en la administración de la oleoresina esterificada, ya que al aumentar la dosis se incrementa la depositación en la piel de la tilapia, esto se ha encontrado también en otras especies donde se han hecho experimentos como es el caso de la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Choubert y Storebakken, 1989). Estos autores mencionan un valor de depositación máximo de tres semanas, después de ese lapso aunque se siga incrementando la ingestión de pigmentos no se observa un aumento en los valores y se mantiene constantes. En la tilapia se encontró que alrededor de la tercer semana se mantuvo estable el color y de esta etapa en adelante el cambio de color fue insignificante.

El nivel de carotenoides influencia la tasa de depositación en la piel de la tilapia, siendo similar al obtenido en músculo y piel en los salmónidos (Storebakken y col., 1987). Al comparar los resultados obtenidos de la depositación de los pigmentos de la flor de cempasúchil en la piel de la tilapia con los obtenidos en el trabajo de Katsuyama y Matsuno (1988) en la tilapia encontramos que fueron menores los de este trabajo ya que ellos registraron una depositación del 3.3% en la piel después de alimentar las tilapias con diésteres de astaxantina obtenidos del krill del Atlántico y una mezcla de isómeros de astaxantina libre. Este resultado concuerda con el obtenido en éste experimento al utilizar el carophyll Pink.

Conclusiones

La piel de la tilapia se pigmenta con los carotenoides de la flor de cempasúchil. La depositación en la piel muestra una relación dosis-respuesta. Se encontró que la coloración fue hacia el color amarillo lo cual desde el punto de vista comercial tiene que mejorarse. La mejor estrategia para la pigmentación comercial de la piel de tilapia sigue siendo la de la dieta que contenía 50 mg/kg de astaxantina, durante 60 días ya que la coloración fue rosada.

Referencias

- AOAC (1995). *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, EUA.
- Arredondo, J. L., Pedroza, R., Ponce-Palafox, J. T. y Vernon-Carter, E. J. (2003). Pigmentation of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2, 101-108.

- Arredondo, J. L. y Ponce-Palafox, J. T. (1998). *La Calidad del Agua en Acuicultura: Conceptos y Aplicaciones*. AGT Editor. S.A. México D.F. 250 p.
- Bonyaratpalin, M. y Unprasert, N. (1989). Effects of pigments from different sources on colour changes and growth of red *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 79, 375-380.
- Choubert, G. y Storebakken, T. (1989). Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentation of rainbow trout feed various dietary carotenoid concentration. *Aquaculture* 81, 69-77.
- Food and Agriculture Organization. (1987). Feed and feeding of fish and shrimp. A manual on the preparation and presentation of compound feeds for shrimp and fish in aquaculture. *ADCP/REP/87/26*, Roma, 275 p.
- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, S. y Steriff, 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, 179-193.
- Gordon, H. T. y Bauernfeid, J. C. (1981). Carotenoids as food colorants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 18, 1-59 p.
- Katsuyama, M. y Matsuno, T. (1988). Carotenoid and vitamin A, and metabolism of carotenoids, beta-carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin in *Tilapia nilotica*. *Comparative Biochemistry Physiology* 90 (b), 131-139.
- Lee, R. G., Neamtu, G. G., Lee, T. C. y Simpson, K. L. (1978). Pigmentation of rainbow trout with extracts of floral parts from *Tagetes erecta* and *Cucurbita maxima inarica*. *Revue Reumaine de Biochemie* 15(4), 287-293.
- Lovshin, L.L. (1998). Criteria for Selecting Nile Tilapia and Red Tilapia for Culture. Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University, Alabama EUA. 13 p.
- Montgomery, D.C. (1984). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons. Nueva York.
- Segner, H., P. Arend, K. Von Poepring-Hausen y Schmidt, H. (1989). The effect of feeding astaxanthin to *Oreochromis niloticus* and *Colisa labiosa* on the histology of liver. *Aquaculture* 79, 381-390.
- Storebakken, T., Foss, P., Schiedt, K., Austreng, E., Liaaen-Jensen, S. y Manz, U. (1987). Carotenoids in diets for salmonids. IV. Pigmentation of Atlantic salmon with astaxanthin, astaxanthin dipalmitate and cantaxanthin. *Aquaculture* 65, 279-292.
- Torrison, O. J. (1984). Effects of carotenoids in eggs and start-feeding on survival and growth rate. *Aquaculture* 43, 185-193.
- Torrison, O. J. y Naevdal, G. (1988). Pigmentation of salmonids. Variation in flesh carotenoids of Atlantic salmon. *Aquaculture* 68, 305-310.
- Wagner, A., Penman, D.J., Cunha, E. y McAndrew, B. (2002). Melanophore appearance in wild and red *Tilapia* embryos. *Pigment Cell Research* 5(1), 57.