



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Influencia de la adición de extractos de carotenoides naturales en la dieta de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sobre la pigmentación y estabilidad del filete

Erwin Giovanni Torres Sánchez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Posgrado de Ciencia y Tecnología de Alimentos
Bogotá, Colombia

2018

Influencia de la adición de extractos de carotenoides naturales en la dieta de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sobre la pigmentación y estabilidad del filete

Erwin Giovanni Torres Sánchez

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director:

PhD, Héctor Suárez Mahecha

Codirector:

PhD, Carlos Alberto Fuenmayor Bobadilla

Línea de Investigación:

Calidad de alimentos

Grupo de Investigación:

Ciencia y tecnología de productos cárnicos y acuícolas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Posgrado de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2018

Al Sol por el silencio, el agua, la esperanza, la lucha, el hierro, los volcanes; por acudir a mis venas y a mi boca; por hablar por mis palabras y mi sangre.

A mi Madre, mi ejemplo de lucha y tenacidad. A Adriana, mi otra mitad y compañía. A mi familia por motivarme a escalar. A la extensión de mi alma y vocación: Gatito, Tico, Loki, Negra, Flamma, Zebra. A Apis mellifera por aceptarme conocer y amar.

Agradecimientos

Cuando veo mi vida en retrospectiva y analizo cuáles han sido mis metas y cómo he llegado a conseguirlas, soy consciente que nunca hubieran sido posibles sin la ayuda, el apoyo y el aliento de muchas personas.

Primero, quiero agradecer a mi director de tesis, Dr. Héctor Suárez Mahecha por su aliento y apoyo incondicional. También, agradezco al Dr. Carlos Alberto Fuenmayor Bobadilla por su orientación y consejo. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Amanda Consuelo Díaz Moreno por su generoso apoyo técnico y logístico en este proyecto. Agradezco a la Dirección de Investigación Sede Bogotá (DIEB) de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, por la financiación de este proyecto bajo el macro-proyecto 'Aprovechamiento de matrices alimentarias con potencial colorante para uso como aditivo natural en alimentos procesados'.

Agradezco especialmente al Dr. Miguel Ángel Landinez Parra por su desinteresado apoyo para la realización de este proyecto. También, agradezco al personal de la empresa Truchas de la Sierra Ltda., en particular al MSc. Rafael Rosado Puccini, por su generoso apoyo en la realización de la parte experimental. Agradezco a Yolanda Quiñonez Segura por su generosa ayuda durante la fase de laboratorio, y al Dr. Carlos Mario Zuluaga Domínguez por su valioso apoyo en el análisis estadístico. Todavía hay muchas otras personas, que de una u otra manera, han contribuido al éxito de esta Maestría. Deseo agradecer, sin ningún orden en particular, al Dr. Luis Felipe Gutiérrez por su ayuda, ejemplo, consejos y enseñanzas; al Sr. Baudilio de Apiarios 'Don Baudilio S.A.S.' y a sus colmenas; al personal del ICTA por su apoyo en varias tareas; al Dr. Jorge Tello por su generosa ayuda.

Agradezco a mis amigos, familiares y colegas, quienes me han apoyado de varias maneras a lo largo de mi vida académica. A mi madre, Cecilia quien ha sido mi ejemplo de lucha incansable. A Adriana Castiblanco, mi otra mitad, mi novia y compañera.

Resumen

En términos de atributos sensoriales, la preferencia de consumo de productos acuícolas como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se encuentran influenciada por la coloración rosado-rojo de su filete. La coloración característica de los salmónidos silvestres se presenta debido al consumo de carotenoides en la dieta en condiciones naturales procedente de crustáceos principalmente, y se asocia con mayor calidad de su carne como alimento. En la alimentación de trucha arco iris cultivada en sistemas controlados, de hecho, se emplean colorantes sintéticos, incluyendo sustancias carotenoides de síntesis (especialmente xantófilas), con el objetivo de lograr una pigmentación de la carne similar a aquella lograda en condiciones naturales de crecimiento.

Por otra parte, una de las principales problemáticas de la industria acuícola, especialmente del manejo de productos de pescado en fresco, es el rápido deterioro debido a daños microbianos, enzimáticos y químicos, siendo sus lípidos y proteínas particularmente propensos a daños por reacciones de tipo oxidativo. De hecho, debido a la alta susceptibilidad de los ácidos grasos del pescado a los procesos oxidativos, que afectan el perfil sensorial y el valor nutricional, los índices de oxidación son una prioridad en el control de calidad de estos productos. Por este motivo, existe un gran interés en el desarrollo de estrategias de conservación del pescado y de los productos pesqueros enfocados en retardar la degradación lipídica y proteica.

En este estudio preliminar, se evaluó el efecto del uso de carotenoides extraídos del polen apícola sobre color y la calidad del filete de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en refrigeración. Se alimentaron un total de 144 truchas con un peso inicial de $206,3 \pm 6,2$ g durante 8 semanas, utilizando cuatro dietas experimentales: a) sin adición de carotenoides (C-), b) con adición de astaxantina sintética (50 mg kg^{-1}) (C +), c) carotenoides de polen extraídos en aceite vegetal (25 mg kg^{-1}) (P1), y d) carotenoides de polen extraídos en aceite vegetal (50 mg kg^{-1}) (P2). Se evaluaron parámetros durante el

período de cultivo como ganancia de peso-GP, ganancia de longitud-GL, tasa de crecimiento específico-TCE, factor de condición-FC, índice hepatosomático-IHS e índice vícerosomático-IVS. Las truchas fueron sacrificadas, y los filetes obtenidos fueron almacenados durante un periodo de 21 días en refrigeración a 0 ± 2 °C, para evaluación de parámetros físicos (color), químicos (composición proximal, perfil lipídico, pH, nitrógeno básico volátil total-N-BVT, valor de peróxidos-VP y ácido tiobarbitúrico-SR-TBA), microbiológicos y sensoriales (en el filete fresco y cocido).

Al final del periodo de cultivo de 56 días, el uso de carotenoides en la dieta de las truchas no afectó parámetros como la GP, GL, TCE, FC e IHS ($p > 0,05$). Se encontraron diferencias significativas en IVS de los diferentes tratamientos ($p < 0,05$). El análisis de calidad muestra que el valor nutricional de los filetes de trucha de los grupos tratados con las dietas P1, P2 y C- tuvieron menor contenido de agua y mayores niveles de proteína, grasa y cenizas en comparación con el grupo C+ ($p < 0,05$). No hubo diferencias entre los grupos de filetes cocidos en atributos sensoriales como aroma, sabor y textura ($p > 0,05$). La evaluación instrumental y sensorial muestra que los filetes frescos del grupo C+ obtuvieron los puntajes más altos de color y mayor deposición de carotenoides en el filete, en comparación con los otros grupos ($p < 0,05$). La inclusión de carotenoides en la dieta de los peces fue eficiente para mantener bajos niveles de pH, N-BVT, VP y SR-TBA, incluso hasta el día 21 del periodo de refrigeración, en comparación con una dieta sin adición de carotenoides.

Palabras clave: Apis mellifera, polen apícola, aceite vegetal, carotenoides totales, color, oxidación lipídica.

Abstract

In terms of sensory attributes, the preference for consumption of aquaculture products such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is influenced by the red-pink coloration of its fillet. The characteristic coloration of wild salmonids occurs due to the consumption of carotenoids in the diet under natural conditions mainly from crustaceans, and this is associated with higher quality of their meat as food. The culture of rainbow trout in controlled systems, in fact, dyes are used commercially, including carotenoids synthetic (especially xanthophylls), with the aim of achieving a pigmentation of the fillet similar to that achieved under natural growth conditions.

Besides, one of the main problems of the aquaculture industry, especially the management of fresh fish products, is the rapid deterioration due to microbial, enzymatic and chemical damage, with its lipids and proteins particularly prone to damage by oxidation reactions. In fact, due to the high susceptibility of fish fatty acids to oxidative processes, which affect the sensory profile and nutritional value, oxidation rates are a key in the quality control of these products. For this reason, there is great interest in the development of conservation strategies for fish-derived foods focused on slowing down lipid and protein degradation.

In this preliminary study, the effect of the use of carotenoids extracted from bee pollen on color and the quality of trout fillet rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in refrigeration was evaluated. A total of 144 rainbow trout with an initial weight of 206.3 ± 6.2 g were fed for 8 weeks with one of four experimental diets: a) no added carotenoids (C-), b) with addition of synthetic astaxanthin (50 mg kg^{-1}) (C+), c) with bee pollen carotenoids extracted in vegetable oil (25 mg kg^{-1}) (P1), and c) with bee pollen carotenoids extracted in vegetable oil (50 mg kg^{-1}) (P2). Parameters such as weight gain-GP, length gain-GL, specific growth rate-TCE, condition factor-FC, hepatosomatic index-IHS and vicero somatic index-IVS, were evaluated during the culture period. The trout were slaughtered, and the fillets obtained were stored during a period of 21 days at 0 ± 2 °C, for evaluation of physical (color), chemicals (proximal composition, lipid profile, pH, total volatile basic

nitrogen-N-BVT, peroxide value-VP and thiobarbituric acid-SR-TBA), microbiological and sensorial (in the fresh and cooked fillet) parameters.

At the end of the 56-day culture period, the use of carotenoids in the trout diet does not affect parameters such as GP, GL, TCE, FC and HIS ($p>0.05$). Significant differences were found in IVS of different groups ($p <0.05$). The quality analysis shows that the nutritional value of the trout fillets of groups treated with diets P1, P2 and C-, had lower water content and higher levels of protein, fat and ash compared with the C+ group ($p<0.05$). There were no differences between groups of fillets cooked in sensory attributes such as aroma, flavor and texture ($p>0.05$). The instrumental and sensory evaluation shows that fresh fillets of the C+ group obtained the highest color scores and the highest deposition of total carotenoids in fillet, in comparison with the other groups ($p<0.05$). The inclusion of carotenoids in the diet of the fish was efficient to maintain low levels of pH, N-BVT, VP and SR-TBA, even up to day 21 of the cooling period, compared to a diet without addition of carotenoids.

Keywords: *Apis mellifera*, bee pollen, vegetable oil, total carotenoids, color, lipid oxidation.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XVII
Lista de tablas.....	XVIII
Lista de abreviaturas.....	XIX
Introducción.....	1
Hipótesis y objetivos.....	4
Hipótesis	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
1. Marco teórico.....	5
1.1. Generalidades de los carotenoides.....	5
1.1.1. Extracción de carotenoides	8
1.2. Entorno de la producción de trucha en Colombia	8
1.3. Carotenoides en la dieta de trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	10
1.3.1. Metabolismo y absorción	11
1.3.2. Efecto de los carotenoides sobre el color del filete	13
▪ Evaluación del color en salmónidos.....	15
1.3.3. Efecto de los carotenoides sobre el valor nutricional del filete	19
1.3.4. Efecto de los carotenoides sobre el estatus sanitario	20
1.3.5. Efecto de los carotenoides sobre la oxidación lipídica	21
1.4. Entorno de la apicultura en Colombia	25

1.5. Polen apícola	25
1.5.1. Origen botánico.....	26
1.5.2. Composición química y nutricional del polen apícola colombiano.....	26
▪ Contenido de humedad.....	27
▪ Carbohidratos	27
▪ Fibra dietaria.....	27
▪ Azúcares reductores	27
▪ Lípidos	28
▪ Proteína	29
▪ Cenizas	30
▪ Compuestos bioactivos	31
1.5.3. Uso de polen apícola en alimentación de animales domésticos	31
2. Materiales y métodos	35
2.1. Polen apícola	35
2.2. Extracción de carotenoides	36
2.2.1. Determinación de carotenoides totales.....	36
▪ En polen apícola	36
▪ En aceite vegetal (AV) y aceite vegetal pigmentado (AVP)	37
2.3. Dietas experimentales.....	37
2.4. Condiciones y manejo de los peces	39
2.4.1. Evaluación de parámetros zootécnicos	40
2.5. Calidad y estabilidad del filete	42
2.5.1. Análisis proximal	42
2.5.2. Perfil lipídico.....	43
2.5.3. Análisis microbiológico	43
2.5.4. Análisis sensorial.....	44
▪ Evaluación del color y contenido de carotenoides.....	44

2.5.5. Medición del pH	45
2.5.6. Nitrógeno básico volátil total (N-BVT)	45
2.5.7. Valor de peróxidos	46
2.5.8. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SR-TBA)	47
3. Resultados y discusión	49
3.1. Polen apícola	49
3.1.1. Origen botánico	49
3.1.2. Contenido de carotenoides	51
▪ En polen apícola	51
▪ En aceite vegetal (AV) y aceite vegetal pigmentado (AVP)	51
3.2. Composición proximal de las dietas	53
3.3. Parámetros de desempeño e índices corporales	54
3.3.1. Análisis global de los datos durante el periodo de cultivo	57
3.4. Evaluación del filete en refrigeración	60
3.4.1. Calidad del filete	60
▪ Composición proximal	60
▪ Perfil lipídico	62
3.4.2. Análisis microbiológico	65
3.4.3. Análisis sensorial	65
▪ Color y contenido de carotenoides totales (CT)	67
3.4.4. Estabilidad del filete	70
▪ Nivel de pH	70
▪ Nitrógeno básico volátil total (N-BVT)	73
▪ Valor de peróxidos (VP)	74
▪ Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SR-TBA)	75
3.4.5. Análisis global de los datos durante el periodo de refrigeración	76
4. Conclusiones y recomendaciones	79
4.1. Conclusiones	79

4.2. Recomendaciones.....	81
5. Anexos	82
5.1. Anexo 1. Formato de prueba de aceptación para consumidores.....	83
5.2. Anexo 2. Metodología análisis microbiológico	84
5.3. Anexo 3. SalmoFan™	86
5.4. Anexo 4. Metodología análisis proximal	87
6. Bibliografía	89

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Estructura de carotenoides usados en alimentos.....	7
Figura 1-2 Representación de la absorción intestinal de carotenoides	13
Figura 1-3 Proceso de oxidación lipídica	24
Figura 2-1 Distribución de las jaulas en el estanque	40
Figura 3-1 Fotografías de los tipos polínicos encontrados en los tamices n°12 y n°16. .	50
Figura 3-2 AVP obtenido en diferentes proporciones de extracción sólido-líquido: 0,25:1, 0,5:1, 0,75:1 y 1:1 w/v, polen:aceite vegetal.	52
Figura 3-3 <i>Score</i> y <i>Loading plot</i> obtenidos mediante PCA de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides durante 8 semanas.	59
Figura 3-4 <i>Score</i> y <i>Loading plot</i> obtenidos mediante PCA de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre parámetros en los filetes evaluados en los días 1, 7, 14 y 21 en refrigeración.	77
Figura 5-1 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre el color del filete (Escala SalmoFan™)	86

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Exportaciones de filetes frescos o refrigerados de trucha	9
Tabla 1-2 Exportaciones de filetes congelados de trucha	9
Tabla 1-3 Uso de carotenoides sintéticos y naturales en la dieta de trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	17
Tabla 1-4 Carbohidratos en polen apícola (en base seca)	28
Tabla 1-5 Lípidos en polen apícola (en base seca).....	29
Tabla 1-6 Proteína en polen apícola (en base seca).....	30
Tabla 1-7 Contenido de cenizas en polen apícola (en base seca)	31
Tabla 1-8 Contenido de bio-compuestos en polen apícola (en base seca)	31
Tabla 3-1 Colores, códigos y taxones asociados a los tamices n°12 y n°16	50
Tabla 3-2 Contenido de carotenoides del AVP extraído en distintas proporciones	52
Tabla 3-3 Composición de las dietas experimentales (base húmeda)	53
Tabla 3-4 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides durante 8 semanas sobre parámetros de desempeño e índices corporales.....	55
Tabla 3-5 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre la composición de los filetes en el día 1 de refrigeración (base húmeda)	62
Tabla 3-6 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre el perfil lipídico de los filetes en el día 1 de refrigeración (porcentaje de la fracción lipídica)	64
Tabla 3-7 Calidad microbiológica de los grupos de filetes de trucha almacenados en el día 1 de refrigeración	65
Tabla 3-8 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre atributos sensoriales del filete en el día 7 de refrigeración	67
Tabla 3-9 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre el color y contenido de carotenoides de los filetes en el día 1 de refrigeración.....	68
Tabla 3-10 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides durante 8 semanas sobre la estabilidad del filete almacenado hasta 21 días	73

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>AV</i>	Aceite vegetal
<i>AVP</i>	Aceite vegetal pigmentado
<i>CT</i>	Carotenoides totales
<i>DHA</i>	Ácido docosahexaenoico
<i>DPA</i>	Ácido docosapentaenoico
<i>EPA</i>	Ácido eicosapentaenoico
<i>FC</i>	Factor de condición
<i>GL</i>	Ganancia de longitud
<i>GP</i>	Ganancia de peso
<i>IHS</i>	Índice hepatosomático
<i>IVS</i>	Índice vicerosomático
<i>N-BVT</i>	Nitrógeno básico volátil total
<i>PCA</i>	Análisis de componentes principales
<i>RP</i>	Residuo de polen
<i>SR-TBA</i>	Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
<i>TCE</i>	Tasa de crecimiento específico
<i>VP</i>	Valor de peróxidos

Introducción

La pesca y la acuicultura son importantes fuentes de alimentos, nutrición, ingresos y medios de vida para cientos de millones de personas en el mundo. El pescado proporciona no sólo proteínas de elevado valor, sino también una gran variedad de micronutrientes esenciales, que incluyen vitaminas D, A y B, minerales como calcio, yodo, zinc, hierro y selenio, y ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como el ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA), y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (FAO, 2012).

El pescado es uno de los productos alimenticios más comercializados del mundo, cuya producción alcanzó en 2016 un máximo histórico de 171 millones de toneladas, y un consumo per cápita de 20,3 kg. El fortalecimiento de la demanda y los precios más elevados incrementaron el valor de las exportaciones mundiales de pescado en 2017 a 152.000 millones de USD, de las que un 54 % procedía de países en desarrollo (FAO, 2018).

El color de la carne es un factor importante en la industria acuícola, ya que este determina la preferencia de los consumidores por especies como la trucha arco iris y otros salmónidos, en las cuales se espera encontrar un color rosado o rojo en el filete (Keleştemur & Çoban, 2016). En estas especies los carotenoides astaxantina y cantaxantina se encuentran asociados a la pigmentación del filete y la piel (Hendry & Houghton, 1996). La trucha arco iris es incapaz de sintetizar estos carotenoides y por lo tanto depende de su aporte en la dieta. En la trucha silvestre, la principal fuente de estos pigmentos son los crustáceos. En el caso de los cultivos intensivos de trucha, el pigmento debe agregarse a la dieta durante la última fase de alimentación previa al sacrificio (Choubert & Heinrich, 1993). La similitud en tono e intensidad de color comparado con el que presentan los salmónidos silvestres, y su estabilidad en la carne durante el congelamiento, hacen que los aditivos sintéticos astaxantina y cantaxantina

sean la principal fuente comercial de pigmento para salmónidos (Choubert, Brisbarre, & Baccaunaud, 2011; Ingle de la Mora, 2002).

No obstante, en países como Estados Unidos el uso de pigmentos sintéticos como la astaxantina para la coloración de la carne de trucha requiere una declaración en la etiqueta que advierta al consumidor que se trata de un producto con adición de pigmento (Wrolstad & Culver, 2012). En este sentido, la legislación entorno a productos acuícolas orgánicos (UE Regulación N° 710/2009) de la Unión Europea reconoce solamente el uso de astaxantina natural como fuente de pigmento para la coloración de la carne y prohíbe el uso de aditivos sintéticos en la cría de salmónidos (Roncarati et al., 2011).

Actualmente, el mercado mundial de carotenoides experimenta gran crecimiento debido al aumento de la demanda para aplicaciones en la industria y al aumento de la evidencia sobre beneficios asociados para la salud. En este contexto, el aumento de la demanda de colorantes es uno de los principales factores que impulsan el crecimiento del mercado de carotenoides extraídos de fuentes de origen natural (Marz, 2015). Se ha evaluado la inclusión de carotenoides en la dieta de las truchas procedentes de fuentes naturales como algas verdes (Choubert & Heinrich, 1993), pimentón rojo (Ingle de la Mora, Arredondo-Figueroa, Ponce-Palafox, Barriga-Soca, & Vernon-Carter, 2006), flor de caléndula (Yanar, Büyükçapar, Yanar, & Göcer, 2007), y otras fuentes vegetales (Amar, Kiron, Akutsu, Satoh, & Watanabe, 2012; Amar, Kiron, Okamoto, Satoh, & Watanabe, 2000; Sheikhzadeh, 2013), reportándose en general una coloración aceptable del filete, con resultados variables.

Adicionalmente, se ha demostrado que la suplementación de truchas con carotenoides y antioxidantes reduce los efectos causados por la oxidación lipídica. Dado que ese fenómeno es un factor importante para la calidad de los alimentos, especialmente en aquellos como el pescado que contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, la inclusión de estos compuestos a la dieta de los peces afecta positivamente el estatus sanitario y mejora parámetros de bienestar, que se ven reflejados en la calidad sensorial, nutricional y estabilidad de la carne durante su almacenamiento (Kamireddy et al., 2011; Keleştemur & Seven, 2013).

El polen apícola es una materia prima importante debido a sus características nutricionales, en particular, su contenido de carbohidratos 48,8–52,5 %, proteína 18,7–28 %, lípidos 1,1–7,3 %, fibra dietética 12,8–14.5 % y de cenizas 1,7–3,0 % (Zuluaga

Domínguez, Serrato B., & Quicazán Sierra, 2014); también es conocido por sus propiedades funcionales, en especial su actividad antioxidante de 0,041 y 0,052mM trolox g⁻¹ para TEAC y FRAP, respectivamente, contenido de fenoles totales 16,28 mg ácido gálico g⁻¹, vitamina E 119 µg α-tocoferol g⁻¹ y alto contenido de carotenoides totales de hasta 2.149 mg β-caroteno equivalente kg⁻¹ (Salazar González, 2014).

En Colombia, el altiplano cundiboyacense es reconocido por tener una ventaja comparativa para la apicultura, debido a sus características agroecológicas y floración de diversas especies durante todo el año. En comparación con la producción promedio de los principales países exportadores de este producto como España, Portugal, China, Brasil y Argentina, que no superan los 15 kg de polen por colmena por año, la producción de polen en Colombia se estima entre 35,4 y 48,9 Kg por colmena por año (Gutiérrez Ortiz, Osorio Tangarife, & Salamanca Grosso, 2010; Zuluaga Domínguez et al., 2014). Adicionalmente, en promedio el contenido de carotenoides totales presentes en el polen colombiano es superior al de países como España e Italia, 74,2 % y 88,7 % respectivamente (Gardana, Del Bo', Quicazan, Correa, & Simonetti, 2018).

Con este estudio preliminar se evaluaron extractos de polen apícola como colorante y conservante natural del filete de trucha en refrigeración. Con los resultados obtenidos se espera ofrecer una alternativa de mercado al polen diferenciado y darle valor agregado a la producción en cautiverio de trucha arco iris suplementada con carotenoides naturales.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La inclusión en la dieta de la trucha arco iris de carotenoides extraídos de polen apícola podría contribuir con la pigmentación del filete y extender su vida útil en refrigeración.

Objetivo general

Evaluar la pigmentación y estabilidad del filete de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando en la dieta extractos oleosos de carotenoides obtenidos de polen apícola.

Objetivos específicos

- Caracterizar el polen seco y su derivado oleoso, con el fin de adicionarlo como aditivo natural en alimentación de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
- Evaluar el efecto de la adición de carotenoides extraídos de polen apícola sobre parámetros productivos de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
- Evaluar el efecto de la adición de carotenoides extraídos de polen apícola sobre la pigmentación y la estabilidad del filete de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

1. Marco teórico

1.1. Generalidades de los carotenoides

Los carotenoides son metabolitos secundarios de plantas con una variedad de aplicaciones fisiológicas, de salud e industriales. Son uno de los productos naturales más comunes en la naturaleza. Estos compuestos isoprenoides son de naturaleza lipofílica y son sintetizados no solo en todos los organismos fotosintéticos, como las plantas (incluidas las algas) y las cianobacterias, sino también en algunas bacterias y hongos no fotosintéticos. Los carotenoides son responsables de muchos de los colores rojo, amarillo y naranja de los órganos de las plantas, y también actúan como atrayentes para los polinizadores de las flores (Hannoufa & Hossain, 2012). En las plantas, los carotenoides son componentes esenciales de los sistemas fotosintéticos involucrados en la recolección de luz, y juegan un papel importante en la prevención del daño foto-oxidativo. Como antioxidantes, los carotenoides desempeñan roles fisiológicos importantes en animales y plantas. En los humanos, los carotenoides ejercen efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cánceres, y enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Wrolstad & Culver, 2012).

Además, algunos carotenoides se usan como suplementos en las formulaciones de alimentos para animales y peces, y también como colorantes naturales en las industrias de alimentos y cosméticos (Hannoufa & Hossain, 2012). Además de sus propiedades colorantes, carotenoides como β -caroteno, citranaxantina, β -criptoxantina y β -apo-8'-caroteno, y astaxantina solo para el caso de los peces, poseen actividad provitamina A (EFSA, 2005).

En la **Figura 1-1** se presentan las estructuras de algunos carotenoides usados como colorantes en alimentos. Estos tienen una estructura isoprenoide de 40 carbonos, siendo solubles en solventes no polares e insolubles en agua. Algunos son acíclicos como el licopeno, mientras que otros como el β -caroteno contienen estructuras terminales en

forma de anillo, en particular de β -ionona (Wrolstad & Culver, 2012). Algunos códigos de colorantes aprobados en la clasificación para alimentos de la Unión Europea son capsantina (E160c), beta-apo-8'-caroteno (E160e), éster etílico de ácido beta-apo-8'-carboténico (E160f), luteína (E161b), criptoxantina (E161c), zeaxantina (E161h), citranaxantina (E161i), y astaxantina (E161j) (EFSA, 2005).

Los carotenoides se dividen en dos categorías principales: i) carotenos, que contienen carbono e hidrógeno, tales como α -caroteno, β -caroteno y licopeno; ii) xantofilas, que contienen oxígeno además de carbono e hidrógeno, presente en forma de alcohol (-OH) (por ejemplo, luteína), cetona (=O) (por ejemplo, cantaxantina), una combinación de alcohol y cetona (por ejemplo, astaxantina), o como ésteres de alcohol (por ejemplo, fucoxantina). Aparte de estas dos clases, apocarotenoides y carotenoides C50 son otras categorías de carotenoides (Saini & Keum, 2018). En animales invertebrados como camarones, cangrejos y langostas, la astaxantina y carotenoides asociados se presentan en grandes concentraciones, siendo responsables de tonalidades verde, morado o azul cuando el animal está vivo, y rojo en el momento del deceso y la cocción (Hendry & Houghton, 1996).

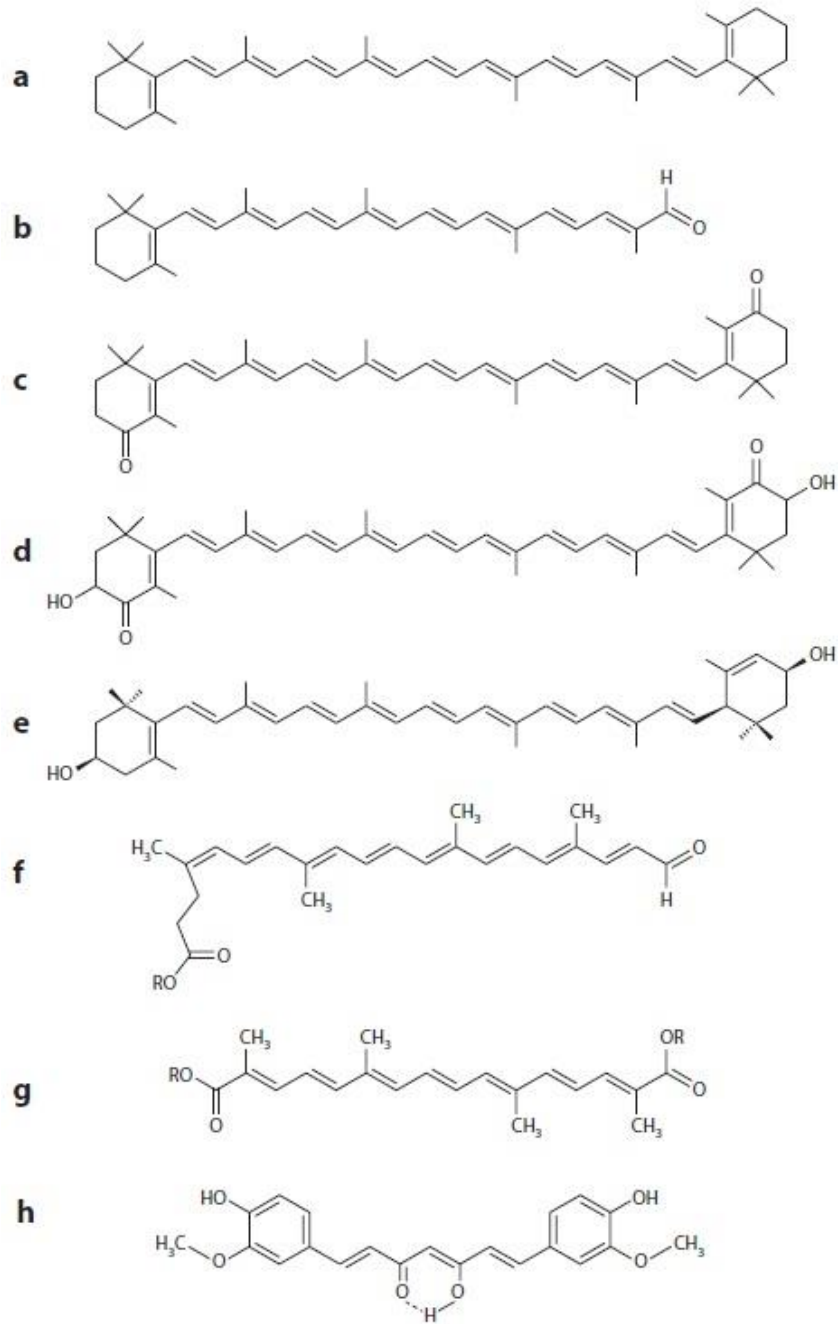


Figura 1-1 Estructura de carotenoides usados en alimentos

(a) β -caroteno, (b) β -apo-8'-caroteno, (c) cantaxantina, (d) astaxantina, (e) luteína, (f) bixina (R = CH₃), norbixina (R = H), (g) crocina (R = gentiobiosa) y (h) curcumina. Fuente: (Wrolstad & Culver, 2012)

1.1.1. Extracción de carotenoides

Debido a su naturaleza hidrofóbica, los carotenoides se extraen usando solventes orgánicos. Generalmente, solventes no polares como hexano, éter de petróleo o tetrahidrofurano, son la mejor herramienta para la extracción de carotenoides no polares o xantofilas esterificadas, mientras que los solventes polares como acetona, etanol y acetato de etilo son apropiados para la extracción de carotenoides polares (Ritter & Purcell, 1981; Saini & Keum, 2018).

Los métodos de extracción de carotenoides procedentes de fuentes naturales se pueden clasificar en cinco niveles de desarrollo tecnológico y científico: i) el método Soxhlet, maceración, extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés), y extracción asistida por ultrasonido (UAE, por sus siglas en inglés); ii) extracción líquida presurizada (PLE, por sus siglas en inglés); iii) extracción asistida por pulsos de campo eléctrico (PEF, por sus siglas en inglés); iv) extracción por fluido supercrítico (SFE, por sus siglas en inglés); y v) extracción asistida por enzimas (EAE, por sus siglas en inglés). Estos métodos de extracción de carotenoides difieren en el modo de desintegración celular y el grado de temperatura y presión aplicadas durante el proceso (Saini & Keum, 2018).

Para extraer carotenoides de fuentes naturales (para análisis y aplicación comercial), el principal requisito es que el método de extracción sea simple, rápido y económico. A diferencia de los solventes orgánicos convencionales, la extracción de carotenoides con solventes no tóxicos y ambientalmente seguros (llamados solventes verdes) ha aumentado significativamente en los últimos años. Una alternativa para la extracción de carotenoides es el uso de aceites vegetales comestibles como solventes en el proceso (Saini & Keum, 2018).

1.2. Entorno de la producción de trucha en Colombia

La producción acuícola a nivel mundial se prevé que crezca de 47 millones de toneladas (ton.) reportadas en 2006 a 94 millones de (ton.) en 2030, mientras que la producción de la pesca disminuya de 65 millones de (ton.) a 58 millones de (ton.) durante ese mismo periodo. Para alimentar a la creciente población del mundo, la acuicultura tiene que llegar a una adición de 47 millones de (ton.) para satisfacer las necesidades de proteína de

cerca de 9.000 millones de habitantes (Agronet, 2017). En la **Tabla 1-1** y **Tabla 1-2** se presentan las cantidades en (ton.) y valores en USD de las exportaciones de filetes de trucha frescos y congelados realizados durante el periodo comprendido entre 2012 y 2016 por los principales países exportadores. De acuerdo con cifras oficiales, Colombia ocupa el puesto 17 a nivel mundial, con 1.100 (ton.) promedio de exportación de trucha durante el periodo comprendido entre 2012 y 2016 (Agronet, 2015).

Tabla 1-1 Exportaciones de filetes frescos o refrigerados de trucha

Puesto	País	2012		2013		2014		2015		2016	
		ton.	USD	ton.	USD	ton.	USD	ton.	USD	ton.	USD
1	Chile	7.872	61.377	7.619	69.453	6.568	76.258	5.897	58.557	3.215	32.977
2	Noruega	565	4.679	329	3.075	203	2.080	1.078	9.191	3.120	31.902
3	Estados Unidos	1.756	16.716	2.548	20.180	2.819	21.713	2.266	18.202	1.550	14.605
6	Perú	134	1.173	30	263	62	761	454	4.461	794	7.967
20	Colombia	265	2.089	230	1.927	298	2.605	232	2.195	124	1.006

Fuente: (ITC, 2018)

Tabla 1-2 Exportaciones de filetes congelados de trucha

Puesto	País	2012		2013		2014		2015		2016	
		ton.	USD	ton.	USD	ton.	USD	ton.	USD	ton.	USD
1	Chile	42.869	369.118	32.870	307.482	24.582	289.666	23.305	204.262	19.084	204.081
2	Noruega	701	6.712	831	8.240	920	11.496	1.357	12.744	2.136	20.787
3	China	2.038	23.887	2.036	22.131	1.772	22.316	1.591	20.936	2.081	27.249
6	Perú	511	4.659	741	6.154	374	3.294	430	3.853	773	6.972
14	Colombia	267	1.809	247	1.696	240	1.660	177	1.149	217	1.453

Fuente: (ITC, 2018)

Colombia produce actualmente cerca de 230.000 (ton.) de pescado al año, de las cuales 80.000 son producidas por la acuicultura; 150.000 por pesca (de esas, 80.000 son de río y el resto de mar). La tilapia representó el 62 % de la producción nacional seguida por la cachama con el 20 %, y la trucha con el 15 % en 2017 (Agronet, 2017). A su vez, en el país se consumen 350.000 (ton.), por lo que se importa anualmente 150.000 (ton.), principalmente salmón, basa y algunos enlatados. Colombia exporta camarón, tilapia, atún y moluscos; el 90 % de la producción de piscicultura se consumen el país y el 10 % se exporta (Medina C., 2018).

La baja competitividad en comparación con Perú o Ecuador, y el no aprovechamiento de las actuales oportunidades comerciales del sector acuícola obedecen a varias razones, entre las cuales se pueden mencionar diversos factores como tener una privilegiada posición geográfica, caracterizada por presentar una alta biodiversidad de especies y ecosistemas con un limitado número de individuos que no pueden ser aprovechados racionalmente dada su fragilidad; los altos costos de movilización de los insumos y los productos, debido a la mala calidad de las vías y el alto precio de la gasolina; altos costos de materias primas como el maíz y la harina de pescado; la falta de acceso por parte del

sector pesquero a embarcaciones con tecnología de punta, que permita la exploración a mar abierto; el cambio climático y el aumento en la tala indiscriminada de bosques, que afecta nacimientos de agua; y la minería irresponsable, que contamina fuentes hídricas con metales pesados, entre otros factores (Medina C., 2018).

Pese a estos factores, los productos Biobasados, entendidos como aquellos que son producto de la Biodiversidad, en Colombia pueden representar una fuente potencial de ingresos para la acuicultura orgánica. Por su condición geográfica, mares y aguas continentales que cuenta, así como el potencial de mercado interno y externo con los acuerdos comerciales celebrados con Estados Unidos y la Unión Europea, Colombia tiene un gran potencial de desarrollo de la acuicultura (Agronet, 2011; FAO, 2016). De acuerdo con el Plan Colombia Siembra 2015-2018, la tilapia y la trucha son productos de importancia nacional para la exportación, en el contexto del Programa Estratégico de Interés Nacional-PINES de la Cadena de la Acuicultura (Agronet, 2015).

1.3. Carotenoides en la dieta de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

La trucha arco iris como alimento es importante para la dieta humana. De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), el consumo de 100 g de trucha representa un alimento bajo en sodio (2 % del valor diario); también es una buena fuente de niacina (29 % del valor diario), vitamina B6 (17 % del valor diario), fósforo (27 % del valor diario) y selenio (19 % del valor diario), y una muy buena fuente de proteínas (46 % del valor diario) y vitamina B12 (105 % del valor diario), con base en los valores diarios de requerimiento (en porcentaje) (% 'Daily Value', por sus siglas en inglés) de niños de 4 años en adelante y adultos, con base en una dieta de referencia de 2,000 calorías. Adicionalmente, aporta EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico), que son ácidos grasos poliinsaturados esenciales importantes en el mantenimiento de la estructura de las células y del sistema inmune, que nuestro organismo necesita para funcionar correctamente y no es capaz de producir por su cuenta, en una concentración de 468 mg de y 520 mg, respectivamente (Nast, 2018).

Un aspecto de calidad que no tiene que ver con el aporte nutricional de la trucha arco iris y otros salmónidos es el color. Este determina la preferencia de los consumidores por este tipo de peces. La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es incapaz de sintetizar astaxantina y cantaxantina, compuestos asociados a la pigmentación del filete y la piel característica de los salmónidos, y por lo tanto depende de su aporte en la dieta. En la trucha silvestre, la principal fuente de estos pigmentos son los crustáceos. En los cultivos intensivos de trucha se utilizan aditivos sintéticos en el alimento (pigmentos carotenoides), durante la última fase de alimentación previa al sacrificio. En los años 90's, el costo de producción aumentó hasta en un 20 %, por el uso de pigmentante (Choubert & Heinrich, 1993). Actualmente, en Colombia este costo se incrementa en un 5,01 %¹ por kg de alimento, con base en los precios del mercado nacional consultados hasta octubre de 2018.

1.3.1. Metabolismo y absorción

Los carotenoides son compuestos que siguen la vía de absorción de la grasa en la dieta. En la **Figura 1-2** se presenta el esquema de absorción intestinal de los carotenoides. Una vez son liberados desde la matriz alimentaria, los carotenoides son solubilizados en glóbulos de grasa de varios tamaños en el estómago. Los carotenoides no polares migran hacia el centro de las micelas, mientras que las xantofilas, con mayor polaridad, se orientan en la superficie de la monocapa junto con proteínas, fosfolípidos y ácidos grasos parcialmente ionizados (Page, 2001).

En la trucha arco iris, las rutas metabólicas de astaxantina (3,3'-dihidroxy- β -caroteno-4,4'-dione) y cantaxantina (β , β -caroteno-4,4'-dione) permiten la formación de xantofilas amarillas y carotenos. La astaxantina es reducida a zeaxantina vía β -adonixantina, mientras que la cantaxantina es reducida a β -caroteno vía equinenona. Los carotenoides son transportados en la sangre mediante lipoproteínas, siendo el hígado el principal órgano responsable de su metabolismo. Ambos carotenoides son posteriormente metabolizados en vitamina A y absorbidos en la pared del intestino. En truchas inmaduras, los carotenoides astaxantina y cantaxantina son depositados principalmente

¹ El costo de 1 kg de alimento concentrado para trucha en fase de levante (sin pigmento) cuesta en promedio \$1,05 dólares americanos (USD). El costo de 1 kg de alimento concentrado para trucha en fase de engorde (con pigmento sintético) cuesta en promedio \$1,11 USD.

en forma libre en la carne, ligados a la actomiosina del músculo blanco. Con la maduración sexual, estos carotenoides son transferidos desde el músculo y la piel hasta las gónadas (Storebakken & No, 1992).

La astaxantina es un carotenoide natural con propiedad pigmentante de color rojo que se presenta en levaduras, algas, crustáceos y peces predadores como los salmónidos (EFSA, 2005). De estos organismos se transfiere a la cadena alimenticia y se almacena en organismos que tienen la capacidad de hacerlo. En situaciones de cultivo donde los peces y los crustáceos no son capaces de obtener suficiente "pigmento silvestre" para pigmentar satisfactoriamente sus tejidos, las preparaciones de astaxantina pueden incorporarse a la alimentación formulada (BASF-Global, 2017).

La astaxantina está aprobada por la Unión Europea para salmón y trucha en niveles de 100 mg kg^{-1} en suplementación completa a partir de los 6 meses de edad y sin límite de tiempo (y para peces ornamentales). La capacidad de absorción es limitada, y en el salmón puede tener una tasa de retención máxima de aproximadamente 10 mg kg^{-1} de carne, y en la trucha un nivel más alto de aproximadamente entre $10\text{-}25 \text{ mg kg}^{-1}$ de carne (EFSA, 2005). La absorción está determinada por factores como la presencia de astaxantina libre o esterificada, y factores dietarios, principalmente el nivel de inclusión en la dieta de lípidos, y la digestibilidad aparente que se estima entre $51\text{-}70 \%$ (Storebakken & No, 1992), y la excreción de astaxantina no digerida que puede superar el 40% (EFSA, 2005).

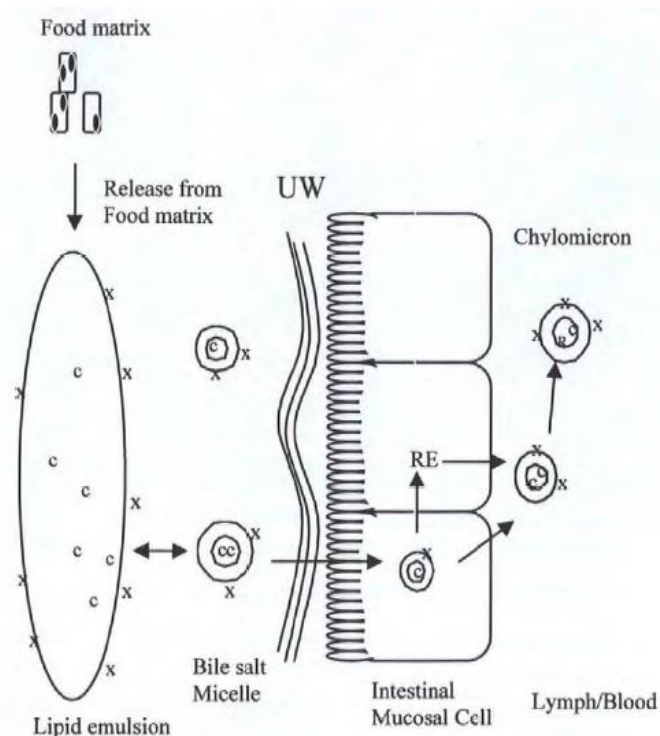


Figura 1-2 Representación de la absorción intestinal de carotenoides

C: carotenoides; X: xantofilas; UW: capa de agua; R: retinol; RE: ésteres de retinilo. Fuente: (Page, 2001)

Una forma de mejorar la absorción de carotenoides es producir emulsiones concentradas con estos compuestos. La biodisponibilidad de carotenoides como astaxantina se considera baja, debido a su forma física. Cuando la astaxantina se disuelve en una emulsión de agua en aceite es más biodisponible (Ribeiro, Rico, Badolato, & Schubert, 2005). Otra ventaja de las emulsiones de agua en aceite enriquecidas con carotenoides es su potencial para aplicaciones en sistemas alimentarios. Para la adición de pigmentos, el uso de emulsiones es frecuente en las formulaciones. Los extractos contienen una mezcla de carotenoides individuales con otros compuestos lipídicos (Wrolstad & Culver, 2012).

1.3.2. Efecto de los carotenoides sobre el color del filete

En la **Tabla 1-3** se presenta el resumen de los principales carotenoides sintéticos y naturales utilizados en la dieta de trucha arco iris, su efecto sobre el color (escala CIE $L^*a^*b^*$) y concentración en el filete en mg kg^{-1} de carne.

En general, para alcanzar una concentración de carotenoides entre $6\text{-}7 \text{ mg kg}^{-1}$ de carne, apropiada para obtener el nivel de pigmento adecuado para el estándar del mercado

europeo, las truchas con un rango de peso inicial entre 0,1 y 0,5 kg son alimentadas con pigmento en la dieta hasta alcanzar el doble de su peso. Para truchas con peso inicial entre 0,5 y 1,0 kg, este objetivo se alcanza cuando las truchas incrementan su peso entre 30 y 40 % (Storebakken & No, 1992). De acuerdo con este último estudio, la concentración de carotenoides en el filete no aumenta cuando la dosis de pigmento se encuentra por encima de 50 mg kg⁻¹ de dieta. La digestibilidad de los carotenoides en las truchas se deprime cuando la dosis de pigmentante excede esta recomendación.

Con el uso de astaxantina sintética procedente de distintas casas comerciales Carophyll® Pink de DSM (Dutch State Mines), Lucantin® Pink de BASF (Badische Anilin und SodaFabrik) y Wisdem® Pink de Wisdom Company, en una concentración de 100 mg kg⁻¹ de alimento durante un periodo de 8 semanas, se obtiene una concentración de carotenoides en el filete entre (8,01 - 8,60 mg kg⁻¹), y no se presentan diferencias en la coloración entre los productos comerciales, obteniéndose valores L* de (45,10 - 49,03), a* de (20,70 - 21,82) y b* de (24,06 - 26,62), y un puntaje de 28 en el abanico colorimétrico SalmoFan™ (Zhang et al., 2013).

Por otra parte, con una inclusión de 100 mg kg⁻¹ de astaxantina sintética en la dieta, y variando el esquema de alimentación: un día sí y otro día no, es posible optimizar el uso de concentrado con pigmento reduciendo los costos de producción durante la última fase de alimentación previa al sacrificio de las truchas (Choubert, Cravedi, & Laurentie, 2009; Choubert & Heinrich, 1993).

Se ha reportado que la inclusión de β-caroteno sintético en la dieta de truchas, mejora la coloración de la piel y en menor medida la coloración del filete, en comparación con una dieta sin adición de carotenoides (Baron et al., 2013; Keleştemur & Çoban, 2016).

En el caso de las fuentes naturales, la sustitución de harina de pescado en proporciones del 7,5 y 10 % por cianobacterias *Spirulina platensis* en la dieta de truchas, produce un color aceptable del filete para su comercialización en el mercado (Teimouri, Amirkolaie, & Yeganeh, 2013b, 2013a). De igual forma, las algas verdes *Haematococcus pluvialis* contienen una concentración importante de carotenoides totales, aproximadamente 2,0 ± 0,2 % de la materia seca. Con la inclusión de esta alga en la dieta de las truchas se obtiene un nivel de pigmentación del filete aceptable (Choubert & Heinrich, 1993). Cuando *H. pluvialis* se vehiculiza en aceite de oliva y/o aceite de pescado, el uso del alga

presenta resultados aceptables en la pigmentación del filete, pero su poder de coloración no es superior en comparación con el uso de astaxantina sintética en la misma concentración (Choubert, Mendes-Pinto, & Morais, 2006). También, la inclusión de pimentón (*Capsicum annuum*) en forma de extracto oleoso en la dieta de truchas permite obtener resultados similares en el color del filete en comparación con el uso astaxantina sintética (Ingle de la Mora et al., 2006).

- **Evaluación del color en salmónidos**

La evaluación del color de la carne de los salmones se puede realizar por medio de métodos de análisis sensorial en test descriptivos o comparativos, a través de la comparación del color con colores estandarizados, o por medio del análisis instrumental. El método más utilizado hasta la fecha por la industria salmonera chilena es la evaluación del color del filete por medio de un abanico colorimétrico, desarrollado para salmón pigmentado con astaxantina sintética y se usa tanto para filetes como para secciones de salmón. La utilización del abanico se hace en condiciones específicas de luminosidad y lugar de evaluación en el pez. Su principal limitante es que se trata de un método subjetivo y no cuantitativo, que depende de la apreciación visual del observador (Castro & Sepúlveda, 1994).

Tabla 1-3 Uso de carotenoides sintéticos y naturales en la dieta de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Fuente	Dosis (mg kg ⁻¹ dieta)	Peso inicial (g)	Duración (semanas)	L* ¹	a* ¹	b* ¹	Carotenoides en el filete (mg kg ⁻¹)	Fuente
Astaxantina	29-31	6,5 -120	62	-	-	-	5,5 – 8,0	(Nickell & Bromage, 1998)
β-caroteno	30-70	60,3	12	-	-	-	0,476-0,843	(Keleştemur & Çoban, 2016)
Astaxantina	50	101	10	30,5	11	7	2,2	(Teimouri et al., 2013a, 2013b)
Astaxantina	50	87,3	17	25	12	18	4,64	(Safari, Mehraban, & Atash, 2015)
Astaxantina	70	120,51	8	-	-	-	5,62	(Yanar et al., 2007)
Astaxantina	75	185	6	37,98-38,50	6,67-7,21	10,89-10,99	20	(Choubert et al., 2006)
Astaxantina	80	150	6	51,6	9,1	17,7	7,1	(Ingle de la Mora et al., 2006)
Astaxantina	90	453	8	42,4	6,7	6,2	5,8	(Roncarati et al., 2011)
Astaxantina	100	140	4	58,2	-	-	11,8	(Choubert & Heinrich, 1993)
Astaxantina	100	52,07	8	45,10-49,03	20,70-21,82	24,06-26,62	8,01-8,60	(Zhang et al., 2013)
Cantaxantina	200	140	4	62,0	-	-	10,1	(Choubert & Heinrich, 1993)
Astaxantina	100-200	165	6	38,01-39,66	-	-	11,1-18,1	(Choubert et al., 2009)
<i>Spirulina platensis</i>	31,5-126	101	10	31,1	4,5-14,3	4-14,1	1,8-4,3	(Teimouri et al., 2013a, 2013b)
<i>Bixa orellana</i>	50-250	87,3	17	25	12	18	4,66-7,40	(Safari et al., 2015)
<i>Capsicum annum</i>	70	120,51	8	-	-	-	5,27	(Yanar et al., 2007)
<i>Tagetes erecta</i>	70	120,51	8	-	-	-	4,75	(Yanar et al., 2007)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	75	185	6	40,16-41,33	3,95-4,65	5,88-7,25	12	(Choubert et al., 2006)
<i>Capsicum annum</i>	80-120	150	6	54,7	4,6-6,4	11,0-18,6	5,6-6,3	(Ingle de la Mora et al., 2006)
<i>Euphasia superba</i>	90	453	8	43,6	5,7	5,9	4,8	(Roncarati et al., 2011)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	100	140	4	58,5	-	-	6,2	(Choubert & Heinrich, 1993)

¹ Los valores entregados se definen en un espacio cromático de coordenadas rectangulares (L*a*b*). La variable L* representa la claridad, L* = 0 para el negro y L* = 100 para el blanco; la escala a* representa el rojo/verde, +a* intensidad en el rojo y -a* intensidad en el verde; la escala b* representa el amarillo/azul, +b* intensidad en el amarillo y -b* intensidad en el azul.

La colorimetría instrumental es un método objetivo y más preciso que el anterior. Se utiliza un colorímetro de refractancia, que puede medir la intensidad de un haz de luz en función de su color (longitud de onda), y que entrega información basada en un sistema de valores definido para este efecto por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE, por sus siglas en francés). En general, las mediciones se procesan en tres ubicaciones a lo largo del filete por encima de la línea lateral: cerca a la cabeza, en medio y cerca a la cola (Choubert & Heinrich, 1993; Teimouri et al., 2013b).

Los valores entregados se definen en un espacio cromático de coordenadas rectangulares ($L^*a^*b^*$) junto con otro de coordenadas cilíndricas ($L^*H^*C^*$) (Choubert et al., 2009; Ingle de la Mora et al., 2006). La medición del triestímulo $L^*a^*b^*$ es usada en su relación a la respuesta al color del ojo humano. La variable L^* representa la claridad, $L^* = 0$ para el negro y $L^* = 100$ para el blanco; la escala a^* representa el rojo/verde, $+a^*$ intensidad en el rojo y $-a^*$ intensidad en el verde; la escala b^* representa el amarillo/azul, $+b^*$ intensidad en el amarillo y $-b^*$ intensidad en el azul; el croma (C^*) es una expresión de la intensidad y nitidez del color; el matiz (H^*) es una medida angular, donde 0° indica un matiz rojo y 90° denota un matiz amarillo (Teimouri et al., 2013b). Diversos investigadores han tratado de definir la correlación de estos valores en el filete con el grado de pigmentación del abanico colorimétrico, describiendo distintas correlaciones (Castro & Sepúlveda, 1994).

También, se ha hecho análisis del color mediante el uso de imágenes. En un cuarto cerrado con iluminación artificial se toman fotografías con una cámara digital montada sobre un trípode, usando el flash de la cámara para asegurar consistencia en las imágenes. La cámara se ubica a 25 cm por encima de los especímenes para capturar la totalidad de la imagen. Las fotografías del filete se toman teniendo en cuenta una velocidad del obturador de 10, apertura de F16 y un zoom de 35. Las fotos se observan utilizando formatos como RGB y las imágenes se analizan con el software Adobe Photoshop CS4, que puede interpretarse bajo diferentes sistemas de espacios cromáticos (Teimouri et al., 2013b).

1.3.3. Efecto de los carotenoides sobre el valor nutricional del filete

Se han usado fuentes de crustáceos como harina de krill (*Euphasia superba*) como fuente de proteína y pigmento para evaluar la coloración del filete, resultando un color rosado-rojo pálido de buena aceptación entre los consumidores. En el perfil lipídico del

filete de las truchas suplementadas con harina de krill, la proporción de ácidos poliinsaturados omega-3, EPA, DPA, y DHA, así como la relación de ácidos n-3/n-6 es mayor en comparación con el uso de astaxantina sintética (Roncarati et al., 2011).

También, se ha usado flor de caléndula (*Tagetes erecta*) para evaluar el color, el perfil lipídico y las propiedades sensoriales del filete de trucha, obteniéndose un color amarillo indeseable por el panel evaluador. No obstante, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados como EPA y DHA es significativo en comparación con truchas alimentadas con una dieta sin adición de carotenoides (Yanar et al., 2007).

Igualmente, aunque la vitamina E no es un carotenoide, su inclusión en concentraciones entre 200 y 5.000 mg kg⁻¹ en la alimentación de truchas con peso inicial de 603 g durante nueve semanas, mejoró el perfil lipídico de la carne al aumentar la concentración de ácidos grasos insaturados, poliinsaturados y omega-3, y disminuyó la cantidad de ácidos grasos saturados y omega-6 (Kamireddy et al., 2011).

1.3.4. Efecto de los carotenoides sobre el estatus sanitario

Los carotenoides pueden actuar como extintores de moléculas libres de oxígeno y secuestrantes de radicales libres gracias a la presencia de enlaces dobles en sus estructuras (Lee & Schwartz, 2012). Se ha demostrado que los carotenos, además de ser pigmentos, tienen otros efectos biológicos y funciones nutricionales que son esenciales para la salud de los peces (Yeganeh, Teimouri, & Amirkolaie, 2015).

Cuando se tratan truchas con oxitetraciclina (OTC, por sus siglas en inglés), que es el principal antibiótico usado para contrarrestar la mayoría de enfermedades bacterianas, se incrementan los niveles de manodialdehído (MDA) en el filete. El uso de 10 mg de licopeno kg⁻¹ de peso vivo, en truchas con peso inicial de 168 g durante intervalos de 14 días, reduce los efectos causados por la administración del medicamento OTC, proporcionando un efecto protector en contra del estrés oxidativo. El licopeno funciona como estimulante, activando los sistemas inmune y celular de las truchas tratadas con medicamentos (Yonar, 2012).

De igual forma, cuando se suplementan alevinos de trucha con peso inicial de 0,11 g durante seis semanas con 100 mg de carotenoides totales kg⁻¹ de dieta, a partir de

fuentes naturales como *Dunaliella salina*, *Phaffia rhodozyma*, *Tagetes erecta*, y *Capsicum annuum*, en comparación con fuentes sintéticas de β -caroteno, astaxantina y cantaxantina, se evidencian efectos potenciales importantes en la resistencia de los peces en contra de enfermedades inoculadas como el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV, por sus siglas en inglés), causante de mortalidades de hasta 80 %. También, se reducen los costos en la industria acuícola generados por medicamentos, cuyo uso puede desarrollar organismos patógenos cada vez más resistentes a los antibióticos (Amar et al., 2012).

En condiciones de producción intensiva, los peces son susceptibles al estrés y a infecciones causadas por distintos patógenos. Una alta densidad en el cultivo de trucha reduce el consumo de alimento y la ganancia de peso, generando pérdidas económicas a los acuicultores al comprometer la productividad de los lotes y la calidad de la carne (Sahin et al., 2014). El sistema endógeno antioxidante de los peces incluye enzimas, y antioxidantes exógenos como vitamina E, vitamina C y carotenoides, que eliminan los radicales libres de oxígeno en el cuerpo, protegiendo las células del daño oxidativo. La propiedad antioxidante en el animal vivo está estrechamente relacionada con la calidad del filete y su vida útil (Zhang et al., 2013).

1.3.5. Efecto de los carotenoides sobre la oxidación lipídica

La reacción espontánea del oxígeno con compuestos orgánicos es una de las reacciones más importantes en los organismos vivos. Muchas enfermedades crónicas se deben a perturbaciones en el metabolismo de los ácidos grasos. Por ejemplo, un exceso de ácidos grasos en la dieta conduce a enfermedades cardiovasculares y a una descontrolada peroxidación lipídica causa inflamaciones y se asocia con la artritis, cáncer y aterogénesis. Los lípidos son los sustratos más oxidables en un alimento y esta reacción afecta muchos parámetros cualitativos, como el aroma producido por la formación o modificación de compuestos volátiles, el sabor producido por los hidroxiácidos entre otros, modifica el color debido a reacciones tipo Maillard entre las proteínas y sustancias originadas por los lípidos, provoca cambios de textura debido a reacciones de entrecruzamiento, y causa pérdidas del valor nutricional en el alimento por la destrucción de algunas vitaminas liposolubles. El proceso de oxidación de los lípidos en los alimentos ocurre fundamentalmente debido a los ácidos grasos insaturados a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres. Este proceso se inicia

con pequeñas cantidades de oxígeno, por lo cual resulta difícil evitarlo; sin embargo, se puede controlar o retardar usando adecuadamente las diferentes técnicas de conservación, combinadas con el uso de antioxidantes (Rojano, 1997).

El pescado recién capturado es un alimento altamente deseado por su sabor y alto valor nutritivo; sin embargo, el pescado fresco es extremadamente susceptible al deterioro. El pescado se altera como consecuencia de la combinación de ciertas reacciones químicas, la actividad enzimática endógena y por el crecimiento microbiano. La alteración del pescado almacenado y, por tanto la pérdida de calidad, puede ocasionar el desarrollo de olores y sabores desagradables, textura excesivamente blanda, pérdida de la capacidad de retención de agua, etc. El sabor y el aroma característicos del pescado deteriorado vienen dados por los productos metabólicos de la actividad de los microorganismos, que utilizan los constituyentes solubles en agua de los tejidos para desarrollarse (Fuentes López, García Martínez, & Fernández Segovia, 2013).

La oxidación lipídica es un factor importante para la calidad de los alimentos, especialmente en aquellos como el pescado que contiene altas concentraciones de grasas insaturadas. La grasa de los pescados incluye hasta un 40 % de ácidos grasos de cadena larga (14-22 átomos de carbono) altamente insaturados, algunos con cinco o seis enlaces dobles, y otros considerados 'esenciales' como EPA y DHA. No obstante, los ácidos grasos de cadena larga son altamente susceptibles a la oxidación (Secci & Parisi, 2016).

La oxidación lipídica es un proceso que consiste en tres fases: inicio, propagación y terminación. La **Figura 1-3** presenta el esquema del proceso. Puede ocurrir a través de un mecanismo autosuficiente de participación de enzimas y radicales libres. Se inicia cuando un ácido graso de cualquier entidad química es atacado por radicales libres. Estos radicales reaccionan con un átomo de hidrógeno de un carbono metileno que pertenece a las cadenas laterales de los ácidos grasos, iniciando así la reacción de auto-oxidación. Subproductos del proceso de oxidación como MDA y óxidos de colesterol tienen propiedades tóxicas (Khanum & Thevanayagam, 2017). La oxidación lipídica es una de las mayores preocupaciones durante el procesamiento y almacenamiento del pescado, dado que contribuye con el deterioro de la calidad y disminuye la vida útil de los

productos (Kamireddy et al., 2011). El MDA, otros aldehídos y alcoholes, presentan un olor desagradable que no es aceptable para los consumidores (Zhang et al., 2013).

El uso de carotenoides y antioxidantes en la dieta de los peces puede reducir los cambios negativos en la calidad de la carne asociados con la oxidación lipídica. El uso de astaxantina sintética de distintas casas comerciales en la dieta de truchas, disminuye el deterioro del filete al reducir el contenido de MDA entre 33 y 40 %, en comparación con una dieta sin adición de carotenoides (Zhang et al., 2013).

El uso de licopeno en concentraciones entre 200 y 400 mg kg⁻¹, en truchas con peso inicial de 18 g durante 12 semanas, compensa la depresión en el consumo de alimento y ganancia de peso, causadas por una alta densidad de siembra (100 kg m³ ⁻¹), y disminuye la concentración de MDA en el hígado, plasma, y filete durante el almacenamiento (Sahin et al., 2014).

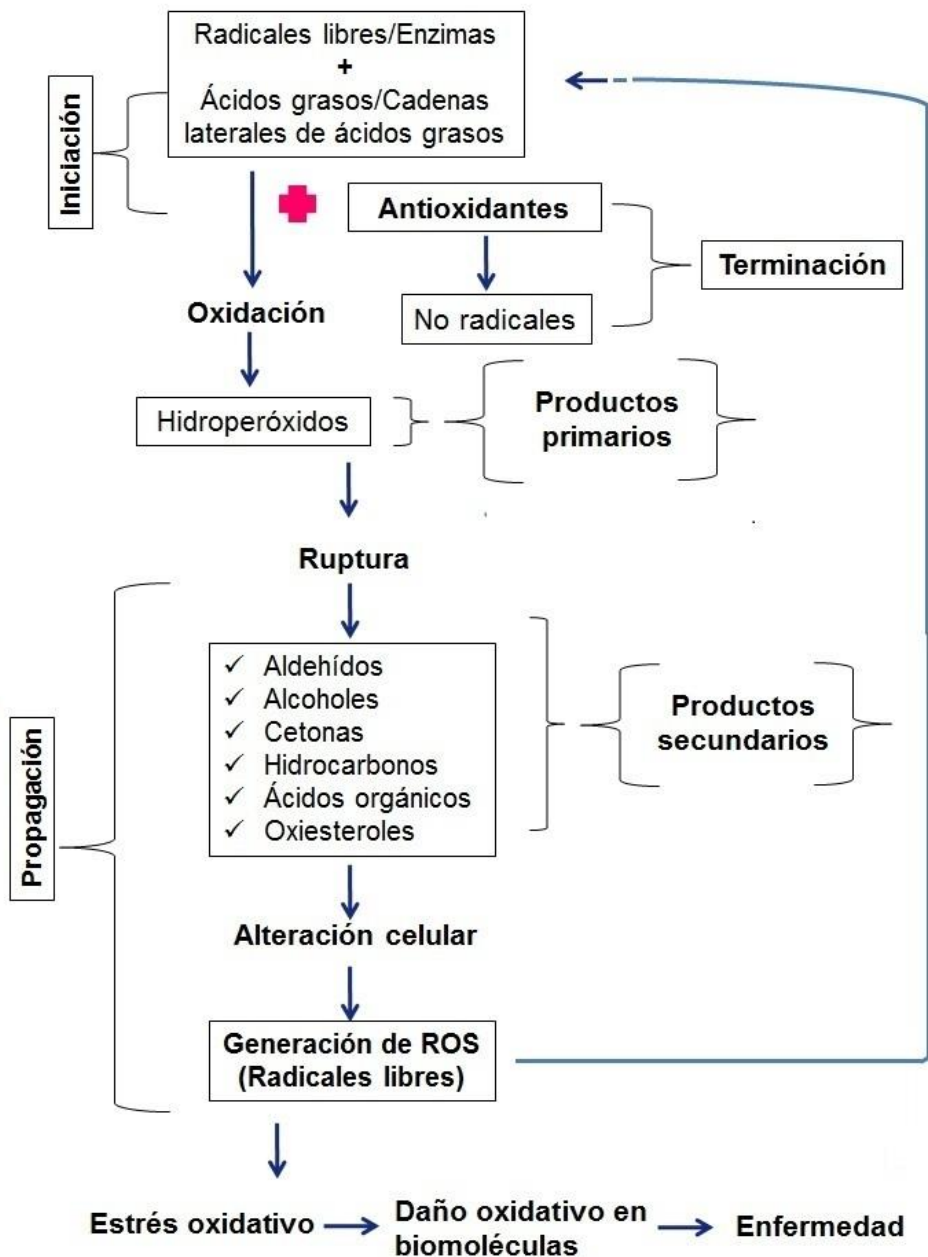


Figura 1-3 Proceso de oxidación lipídica
Fuente: Adaptado de (Khanum & Thevanayagam, 2017)

1.4. Entorno de la apicultura en Colombia

En Colombia la producción a partir de las abejas se da mediante productos como miel, polen y propóleos y en menor escala para jalea real, apitoxina y miel de abejas sin aguijón. Actualmente se producen entre 1.600 y 2.000 toneladas de miel al año y alrededor de 150 toneladas de polen, dependiendo de la favorabilidad de las condiciones climáticas para la producción (Agronet, 2011).

La miel de abejas es el principal producto de la colmena en el mundo, con una producción anual de alrededor de 1 millón 700 mil (ton.), siendo el principal productor China, seguida por Turquía, Argentina, Ucrania y Rusia, países que en conjunto producen casi el 50 % de la miel del mundo; Colombia ocupó el puesto 74 de los países productores con 2.000 (ton.) durante el año 2013 (Agronet, 2016). La producción nacional de miel se destina principalmente al consumo interno y esporádicamente se exporta en pequeñas cantidades con destino a Ecuador, Estados Unidos, Haití, Corea del Sur, Perú, Costa Rica y aparentemente también a Venezuela sin registro de exportación (Agronet, 2016).

En el caso del polen apícola, los principales países exportadores son España, Portugal, China, Brasil y Argentina, con un promedio por colmena por año de 15 kg; Colombia produce entre 35,4 y 48,9 Kg colmena-año⁻¹ (Gutiérrez Ortiz et al., 2010; Zuluaga Domínguez et al., 2014). En 2017, Colombia produjo aproximadamente 206 (ton.) de polen con cerca de 8.700 colmenas en producción, de las cuales 17 (ton.) fueron de exportadas hacia Panamá, principalmente, y el resto aprovechado en el mercado nacional mediante el consumo directo o como suplemento proteico en alimentos balanceados para niños y adultos mayores. Gracias a las condiciones geográficas, políticas y económicas del país, se estima que para el 2025, el número de colmenas en producción de polen llegue a 16.000. El consumo per cápita en Colombia es muy bajo, de aproximadamente 3,8 g de polen año⁻¹, y uno de los retos del sector apícola es incrementar el consumo dándole valor agregado (Agronet, 2011).

1.5. Polen apícola

Los granos de polen son unidades reproductivas paternas (gametofitos) formadas en las anteras de las plantas adultas. El polen es transferido al estigma de una flor, en un proceso llamado polinización, a través del viento, el agua y/o varios animales, en su

mayoría insectos, entre los cuales las abejas, cerca de 30.000 especies, son uno de los más importantes (Krell, 1996). Para las abejas (*Apis mellifera*) el polen es la principal fuente de nutrientes tales como proteínas, minerales y grasas (Estevinho, Rodrigues, Pereira, & Fea's, 2012).

Los pellets de polen contienen colorantes lipídicos provenientes de las anteras de las flores. Los múltiples colores que exhiben los pellets varían de blanco a café oscuro, pasando por amarillo, rojo, verde y variedades de grises, y ocurren dependiendo de los taxones botánicos de los cuales proceden y de su composición química. El polen mantiene las mismas propiedades bioquímicas y organolépticas de la planta de origen (Almeida-Muradian, Pamplona, Coimbra, & Barth, 2005).

1.5.1. Origen botánico

La mayoría de investigaciones realizadas en polen apícola se han hecho en polen multifloral. Una estrategia para aumentar nuestro entendimiento de la flora y vegetación que pueden ser objeto de extracción de compuestos bioactivos útiles en aplicaciones de la industria alimentaria, estética y farmacológica es mediante la identificación de los polinizadores como centinelas de la información ambiental (Lambert, Piroux, Puyo, Thorin, & Larhantec, 2012).

El estudio realizado por Montoya Pfeiffer y Nates Parra caracteriza el valor proteico de distintas especies de polen que componen el polen multifloral predominante en Colombia. Las especies de mayor preferencia y su contenido de proteína fueron nabo forrajero (*Brassica rapa*: 29,27 %), diente de león (*Hypochaeris radicata*: 20,93 %), trébol rojo (*Trifolium pratense*: 29,29 %), eucalipto (*Eucalyptus globulus*: 27,32 %), retamo liso (*Teline monspessulana*: 28,89 %), y cilantro (*Coriandrum sativum*: 21,12 %) (Montoya Pfeiffer & Nates Parra, 2011). En países como Venezuela, se han realizado estudios para evaluar el valor nutricional de las especies de mayor frecuencia en la localidad de Cacute, en términos de atributos de color, textura, olor, y composición proximal (Vit, Herrera, Rodríguez, & CarmonaJuan, 2008).

1.5.2. Composición química y nutricional del polen apícola colombiano

El polen apícola es un producto de origen natural, que tiene gran potencial nutricional y funcional. Es una materia prima importante debido a sus características nutricionales y propiedades funcionales importantes.

- **Contenido de humedad**

El contenido de humedad de polen deshidratado procedente del altiplano cundiboyacense ha sido evaluado mediante el método gravimétrico. Se estima que este contenido oscila entre (3,4-8,3 %) (Barajas Ortiz, Cortes Rodriguez, & Rodríguez Sandoval, 2009; Benavides Guevara, 2016; Chavarro Pulido, 2013; Durán Jiménez & Quicazán Sierra, 2014; Fuenmayor Bobadilla et al., 2014; Gutiérrez Cortés, 2012).

- **Carbohidratos**

Los carbohidratos son los principales componentes presentes en el polen. Se trata especialmente de polisacáridos como almidón y otros presentes en la cubierta externa. Los azúcares de bajo peso molecular como fructosa, glucosa y sacarosa representan el 90 % de los azúcares presentes en el polen. El contenido total de carbohidratos del polen procedente del altiplano se encuentra entre (48,8 - 52,5 %) (Durán Jiménez & Quicazán Sierra, 2014), incluyendo fibra dietaria, polisacáridos y azúcares reductores (Salazar González & Díaz Moreno, 2016).

- **Fibra dietaria**

Para la zona del altiplano se reporta un contenido de fibra dietaria total entre (12,9 - 14,5 %), fibra dietaría insoluble (10,63 - 17,6 %) y un rango de (2,21 - 4,64 %) de fibra dietaría soluble (Díaz Moreno, Zuluaga Domínguez, Morales, & Quicazán Sierra, 2012; Fuenmayor Bobadilla et al., 2014; Gutiérrez Cortés, 2012).

- **Azúcares reductores**

El contenido de monosacáridos, como fructosa y glucosa, proviene generalmente de la mezcla que hacen las abejas durante la formación del pellet de polen cuando agregan néctar. El contenido de azúcares reductores se encuentra entre (32,9 - 39,8 %) (Salazar González & Díaz Moreno, 2016). En la **Tabla 1-4** se presenta el contenido de carbohidratos en polen apícola proveniente del altiplano cundiboyacense.

Tabla 1-4 Carbohidratos en polen apícola (en base seca)

Carbohidrato (%)	Contenido	Método de cuantificación	Referencias
Fibra dietaria total	12,9 – 14,5	Digestión enzimática	(Díaz Moreno et al., 2012;
Fibra dietaria insoluble	10,63 – 17,6		Fuenmayor Bobadilla et al., 2014;
Fibra dietaria soluble	2,2 – 4,6		Gutiérrez Cortés, 2012)
Fructosa	18,1 – 21,3	Cromatografía ² (HPLC)	(Fuenmayor Bobadilla et al., 2014)
Glucosa	11,6 – 20,3		
Sacarosa	4,5 – 9,0		

▪ Lípidos

La grasa del polen está constituida por lípidos citoplásmicos internos y lípidos externos de una capa adhesiva que cubre el grano. Sin embargo, el contenido de lípidos que reporta la mayor parte de la literatura se refiere principalmente al contenido graso de la cubierta externa y puede constituir solo una pequeña fracción de la grasa total del material (Barajas Ortiz et al., 2009). Los resultados de grasa oscilan entre [4,4-7,3 %] con base en la materia seca (Barajas Ortiz et al., 2009; Barajas Ortiz, Martínez, & Rodríguez-Sandoval, 2011; Durán Jiménez & Quicazán Sierra, 2014; Fuenmayor Bobadilla et al., 2014; Zuluaga Domínguez, 2015). Un estudio revela que entre (60 - 90 %) de los lípidos del polen se compone de ácidos grasos, de estos, cerca del (50 - 60 %) son ácidos grasos insaturados C18: oleico, linoleico (omega-6) y linolénico (omega-3). Los principales ácidos grasos saturados en polen son mirístico (C14), palmítico (C16) y esteárico (C18), respectivamente (Bogdanov, 2015). Esta relación entre ácidos grasos saturados e insaturados hacen del polen una fuente interesante para la nutrición humana (Saa Otero, Díaz Losada, & Fernández Gómez, 2000). El contenido de lípidos y los principales ácidos grasos presentes en el polen del altiplano cundiboyacense se presenta en la **Tabla 1-5**.

² La cromatografía es una técnica para separar mezclas de sustancias en sus componentes sobre la base de su estructura y composición molecular. Esto implica una fase estacionaria (un sólido o un líquido soportado en un sólido) y una fase móvil (un líquido o un gas). La fase móvil fluye a través de la fase estacionaria y transporta los componentes de la mezcla con ella. Los componentes de la mezcla que muestran interacciones más fuertes con la fase estacionaria se moverán más lentamente a través de la columna que los componentes con interacciones más débiles. Esta diferencia en las tasas causa la separación de los componentes. Las separaciones cromatográficas se pueden llevar a cabo usando una variedad de fases estacionarias, que incluyen sílice inmovilizado en placas de vidrio (cromatografía en capa fina; TLC), gases volátiles (cromatografía de gases, GC), papel (cromatografía en papel) y líquidos (cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC) (Kadiyam, 2015).

Tabla 1-5 Lípidos en polen apícola (en base seca)

Componente (%) AG: Ácidos grasos	Contenido	Método de cuantificación	Referencias
Lípidos	4,4 – 7,3	Soxhlet	(Barajas Ortiz et al., 2009, 2011; Durán Jiménez & Quicazán Sierra, 2014; Fuenmayor Bobadilla et al., 2014; Zuluaga Domínguez, 2015)
AG Insaturados (AGI)	49,2 – 72,7	Cromatografía (GC)	(Fuenmayor Bobadilla et al., 2014)
AG Saturados (AGS)	27,3 – 50,8		
AG totales (ω -3)	15 – 51,2		
AG totales (ω -6)	10 – 23,1		
AG totales (ω -9)	4,9 - 13		
Relación (AGI/AGS)	1 – 2,7		
Relación (ω -3) / (ω -6)	0,9 – 4,9		

▪ Proteína

El contenido de proteína es uno de los más altos para pólenes provenientes de los municipios que componen el altiplano cundiboyacense, entre (18,7-25,4 %) (Barajas Ortiz et al., 2009; Benavides Guevara, 2016; Durán Jiménez & Quicazán Sierra, 2014; Fuenmayor Bobadilla et al., 2014; Gutiérrez Cortés, 2012; Gutiérrez Ortiz et al., 2010; Zuluaga Domínguez, 2015). En general, el contenido de proteína se calcula mediante el método estándar Kjeldahl, usando un factor de N x 6,25. No obstante, la literatura reporta que se debe hacer con base en un factor de N x 5,6 (Bogdanov, 2015). En la **Tabla 1-6** se presenta el contenido de proteína y aminoácidos presentes en el polen proveniente del altiplano cundiboyacense.

Tabla 1-6 Proteína en polen apícola (en base seca)

Componente (%)	Contenido	Método de cuantificación	Referencias
Proteína	18,7 – 25,4	Kjeldahl (N x 6.25)	(Barajas Ortiz et al., 2009; Benavides Guevara, 2016; Durán Jiménez & Quicazán Sierra, 2014; Fuenmayor Bobadilla et al., 2014; Gutiérrez Cortés, 2012; Gutiérrez Ortiz et al., 2010; Zuluaga Domínguez, 2015)
<i>(AA, % de la fracción proteica)</i>			
Aspartato	1,54 – 2,53	HPLC	(Benavides Guevara, 2016; Zuluaga Domínguez, 2015)
Glutamato	1,66 – 3,04		
Serina	0,56 – 1,40		
Histidina	0,47 – 1,59		
Glicina	0,43 – 1,25		
Treonina	0,21 – 1,20		
Arginina	0,49 – 1,41		
Alanina	0,59 – 1,46		
Tirosina	0,30 – 0,78		
Valina	0,42 – 1,14		
Fenilalanina	0,45 – 1,17		
Isoleucina	0,52 – 1,03		
Leucina	0,65 – 1,86		
Lisina	0,24 – 1,10		
Prolina	0,56 – 1,57		

▪ Cenizas

El contenido de cenizas del polen procedente del altiplano se encuentra entre (2,1- 2,9 %) (Barajas Ortiz et al., 2009; Durán Jiménez & Quicazán Sierra, 2014; Fuenmayor Bobadilla et al., 2014; Gutiérrez Cortés, 2012). Dentro de los minerales que componen las cenizas, el potasio es el más concentrado, seguido en orden decreciente por calcio, magnesio, sodio, hierro, zinc y cobre. En la **Tabla 1-7** se presenta el contenido de cenizas.

Tabla 1-7 Contenido de cenizas en polen apícola (en base seca)

Componente	Contenido	Método de cuantificación	Referencias
Cenizas (%)	2,1 – 2,9	Incineración en mufla	(Barajas Ortiz et al., 2009; Durán Jiménez & Quicazán Sierra, 2014; Fuenmayor Bobadilla et al., 2014; Gutiérrez Cortés, 2012)
Sodio (mg kg ⁻¹)	90 – 137	HPLC	(Benavides Guevara, 2016; Zuluaga Domínguez, 2015)
Potasio (mg kg ⁻¹)	5.029 – 5.625		
Calcio (mg kg ⁻¹)	1.696 – 1.717		
Hierro (mg kg ⁻¹)	63,0 – 70,7		
Magnesio (mg kg ⁻¹)	844 – 1.029		
Cobre (mg kg ⁻¹)	8,6 – 13,4		
Zinc (mg kg ⁻¹)	32,7 – 47,4		

▪ Compuestos bioactivos

Dentro de los compuestos bioactivos que se encuentran en el polen del altiplano se tiene β -caroteno, vitamina E y componentes antioxidantes, entre otros compuestos. En la **Tabla 1-8** se presenta el contenido de algunos compuestos bioactivos identificados en polen proveniente del altiplano cundiboyacense.

Tabla 1-8 Contenido de bio-compuestos en polen apícola (en base seca)

Componente	Contenido	Método de cuantificación	Referencias
β -caroteno (mg kg ⁻¹)	170-2.149	Espectrofotometría	(Barajas Ortiz et al., 2009; Chavarro Pulido, 2013; Chavarro Pulido, Salazar González, Díaz Moreno, & Quicazán Sierra, 2012b; Salazar González, 2014)
Vitamina E (μ g g ⁻¹)	39,24 – 119	HPLC	(Chavarro Pulido, 2013; Chavarro Pulido, Salazar González, Díaz Moreno, & Quicazán Sierra, 2012a; Chavarro Pulido et al., 2012b; Salazar González, 2014)
Fenoles totales (mg g ⁻¹)	14,9 – 21,2	Espectrofotometría	(Chavarro Pulido et al., 2012b)
FRAP ^{*1} (mM [Fe ³⁺])	0,074 – 0,078		
TEAC ² (mM Trolox g ⁻¹)	0,067 – 0,073		

*Comúnmente, la capacidad antioxidante se mide utilizando un ensayo de decoloración, empleando dos técnicas, ¹FRAP: Recuperación de Fluorescencia Posterior al Foto-blanqueamiento, la cual sirve para para medir dinámicas moleculares; y ²TEAC: Capacidad Antioxidante equivalentes al estándar de Trolox.

1.5.3. Uso de polen apícola en alimentación de animales domésticos

El polen apícola es un alimento natural que ha sido utilizado en la dieta de animales domésticos. Su inclusión en una proporción de 1 % en la dieta de gallinas ponedoras incrementa el porcentaje de postura al día y la masa del huevo, así mismo disminuye el consumo de concentrado. Se observa mejoramiento de la calidad del huevo en términos

de grosor de la cáscara, proporción de volumen y mayor coloración de la yema, en comparación con una dieta sin adición de polen (Abou El-Naga, 2014).

Adicionalmente, se ha demostrado que la inclusión de polen en una proporción de 2,5 % en la dieta de cerdos mejora la conversión alimenticia y ganancia de peso (Krell, 1996). Igualmente, su inclusión en una proporción de 1 % en la dieta de conejos mejora el porcentaje de supervivencia en neonatos y aumenta la producción de leche materna en las hembras (Dias et al., 2013).

Así mismo, su inclusión en la dieta de pollos machos Ross 308 en una proporción de 800 mg kg⁻¹ de dieta, disminuye la oxidación lipídica de la pechuga y los perniles de esta estirpe de pollos, ya que se reporta menor contenido de MDA durante el congelamiento durante 6 meses, en comparación con una dieta sin adición de polen en la dieta (Haščík, Omer, Elimam, Bobko, & Kačániová, 2011).

Por otra parte, la inclusión de polen en la formulación de carne reestructurada en una proporción de 3 y 4,5 %, disminuye la pérdida de grasa y agua durante la cocción, aumenta el contenido de ácidos grasos insaturados omega -3 y -6, disminuye la oxidación lipídica y disminuye el crecimiento de microorganismos durante pruebas de vida útil, sin afectar la calidad sensorial del producto terminado (Turhan, Yazici, Saricaoglu, Mortas, & Genccelep, 2014).

El polen puede ingresar a los ambientes acuáticos de los campos agrícolas y rurales por el agua de lluvia, el viento, los insectos y tener efectos a largo plazo en los peces. Estos efectos aparecen como reacciones fisiológicas y bioquímicas en poblaciones o ecosistemas. Un estudio evaluó la capacidad antioxidante de un extracto de polen apícola en alcohol, utilizado en diferentes concentraciones en el agua de engorde de 49 hembras de trucha arco iris, con peso inicial de 48,54 ± 5,12, sobre parámetros bioquímicos del cerebro. Se adicionó polen seco en concentraciones de 0,5; 2,5; 5; 10; 20; y 30 mg l⁻¹ durante 96 h, y se evaluaron los niveles de malondialdehído, estatus antioxidante total, status oxidante total, índice de estrés oxidativo y cantidad total de grupos sulfidrilos libres, en tejido encefálico de los peces. Se encontró que los niveles de malondialdehído disminuyeron en los grupos tratados con polen en concentraciones de 0,5; 2,5; 5; 10; 20; y 30 mg l⁻¹ de agua, en comparación con el grupo control (p<0,05). El nivel más alto del status antioxidante total (p<0,05) y el nivel más bajo del status oxidante

total ($p < 0,05$) fue para el grupo de peces tratado con 10 mg de polen l^{-1} de agua. De acuerdo con Gulhan y colaboradores, el suministro de 10 mg de polen por litro de agua en el cultivo de trucha, mejora parámetros de bienestar reflejados en parámetros productivos y de calidad de los peces (Gulhan, Akgul, Dastan, & Dastan, 2014).

2. Materiales y métodos

2.1. Polen apícola

2.1.1. Origen botánico

En este estudio, se utilizó polen seco proveniente de apiarios 'Los Cerezos' ubicados en el municipio de Viracachá (departamento de Boyacá, Colombia) (5.4343986, -73.2973843), colectado durante las cuatro primeras semanas del mes de septiembre de 2017.

Utilizando un juego de tamices estándar ASTM, el polen fue seleccionado con base en su tamaño de partícula. Del polen obtenido en los tamices n° 12 (1,7 mm) y n° 16 (1,18 mm) se clasificaron los pellets por color con ayuda de una carta de colores Pantone® (Formula Guide Coated & Uncoated, USA) (León Bonilla & Nates-Parra, 2012).

Luego, se realizó análisis palinológico mediante acetólisis, de acuerdo con la metodología propuesta por González Gutiérrez, con modificaciones mínimas. Para esto, se contaron 20 corbículas de cada color encontrado en los tamices n°12 y n°16 en un tubo de polipropileno para centrífuga de 50 ml, al cual se le agregaron 25 ml de ácido glacial, se homogenizó mediante agitación en un vórtex durante 2 min, dejando la muestra 24 h en reposo, para luego centrifugar durante 3 min a 3.000 rpm, y se decantó el sobrenadante. Al material resultante se le añadieron 25 ml de mezcla acetolítica (1:9 ácido sulfúrico – anhídrido acético), se homogenizó y se calentó en un baño de agua en ebullición durante 5 min, se centrifugó por 3 min a 3.000 rpm y se decantó. Luego, la muestra se lavó con 25 ml de ácido acético glacial, se homogenizó, se centrifugó durante 3 min a 3.000 rpm y se decantó. El material polínico se lavó con 25 ml de alcohol al 70 %, se homogenizó, se centrifugó a 3.000 rpm, y se decantó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió dos veces más con alcoholes al 95 y 97 %, respectivamente.

Los tubos con las muestras de polen, se ubicaron en una gradilla en posición vertical, haciendo el montaje de cada muestra de forma semipermanente utilizando el método glicero-gelatina fucsina (González Gutiérrez, 2016). La identificación de los tipos polínicos se hizo mediante el conteo en 30 campos con un microscopio óptico (40x y 100x) y con ayuda de claves palinológicas de referencia identificadas en la palinoteca del Laboratorio de Investigaciones en Abejas de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Para determinar la dominancia de los tipos polínicos se tuvo en cuenta el siguiente criterio: polen dominante (>45 % del total), polen secundario (16-45 %), polen importante (3-15 %) y polen ocasional (<3 %) (Barth, 2004).

2.2. Extracción de carotenoides

El polen seco seleccionado en los tamices n°12 y n°16 fue pulverizado con un molino eléctrico, y luego se pasó a través de un tamiz n° 60. Para extraer carotenoides se llevó a cabo una extracción sólido-líquido en aceite vegetal (AV) a temperatura ambiente (18 ± 2 °C), utilizando varias relaciones de polen y aceite de girasol (Oleocali®, Colombia) (Sachindra & Mahendrakar, 2005), con el fin de determinar la concentración de carotenoides. La mezcla de polen y aceite se dejó en agitación constante en oscuridad durante 24 h. En seguida, la mezcla se centrifugó a 3.500 rpm durante 10 min para separar la capa de aceite vegetal pigmentado (AVP) (sobrenadante) del residuo de polen (RP) (sedimento). Se determinó el contenido de carotenoides del AVP obtenido.

2.2.1. Determinación de carotenoides totales

- **En polen apícola**

Se determinó el contenido de carotenoides totales (CT) del polen seco seleccionado y pulverizado, siguiendo la metodología descrita por Salazar González. Se pesaron 50 mg de polen en un tubo de polipropileno para centrifuga de 50 ml. Se agregaron 2 ml de acetona (99,5%, Panreac, Alemania), se homogenizó mediante agitación en un vórtex durante 1 min y se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 min, se recuperó el sobrenadante filtrándolo a través de un filtro de papel Whatman N° 4 y se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 25 ml. Se repitió 5 veces este procedimiento. En seguida, se llevó a volumen el matraz con acetona y se midió la absorbancia a 450 nm, usando acetona

como blanco en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, USA) en una celda de cuarzo de 1 cm. Se preparó una curva de calibración usando β -caroteno estándar $\geq 97\%$ (UV) (Sigma Aldrich) en un rango de concentración desde 0,10 hasta 3,50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, obteniéndose la ecuación ($y = 0,2151m - 0,0141$, $R^2 = 0,9992$), donde y es absorbancia (adimensional, unidades de absorbancia) y m es concentración ($\mu\text{g } \beta$ -caroteno ml^{-1}). Los CT se calcularon en miligramos equivalentes de β -caroteno por kilogramo de polen seco (Salazar González, 2014).

- **En aceite vegetal (AV) y aceite vegetal pigmentado (AVP)**

El contenido de CT en el AVP se determinó siguiendo la metodología descrita por Szydłowska-Czerniak y colaboradores. Se disolvieron 0,04-0,06 g de AV, o de AVP, en n-hexano 95,0 % (Panreac, Alemania), empleando un matraz aforado de 25 ml. Se llevó a volumen el matraz con hexano y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando n-hexano como blanco en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, USA) en una celda de cuarzo de 1 cm. Se preparó una curva de calibración usando β -caroteno estándar $\geq 97\%$ (UV) (Sigma Aldrich) en un rango de concentración desde 0,10 hasta 3,50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, obteniéndose la ecuación ($y = 0,2879m - 0,0935$, $R^2 = 0,9993$) donde y es absorbancia (adimensional, unidades de absorbancia) y m es concentración ($\mu\text{g } \beta$ -caroteno ml^{-1}). Los CT se calcularon en miligramos equivalentes de β -caroteno por litro, considerando un valor de densidad del aceite de 0,92 (Szydłowska-Czerniak, Trokowski, Karlovits, & Szłyk, 2011).

2.3. Dietas experimentales

Se prepararon cuatro dietas experimentales (tratamientos) añadiendo cantidades requeridas de carotenoides a una dieta comercial (DC)³ sin pigmento, extruida, de 3,5 mm de tamaño de pellet (Solla®, Trucha 43 %, registro ICA 12783AL), siguiendo la metodología empleada por Bowen y colaboradores (Bowen et al., 2002).

³ Ingredientes: harina de pescado, arroz grano, torta de soya, harina de carne, aceite de pescado, fosfato bicálcico y/o fosfato tricálcico, DL-Metionina, L-Lisina, Treonina, vitaminas A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, cloruro de colina, niacina, biotina, pantotenato de calcio, ácido fólico, sulfatos de hierro, cobre y magnesio, óxido y/o sulfato de zinc, yodato de calcio, selenito de sodio, antioxidante BHT (Solla, 2005).

Se prepararon dos dietas control. La primera, llamada 'control negativo' (C-), en la cual se adicionó AV a la DC. La segunda, llamada 'control positivo' (C+), en la cual se adicionó AV y astaxantina sintética (Lucantin® Pink, BASF Alemania) en una concentración de 50 mg kg⁻¹ de dieta. Se prepararon dos dietas agregando por balance de materia AVP a la DC. La primera, llamada 'polen uno' (P1), en la cual se adicionó AVP de tal forma que se obtuviese una concentración de CT aproximada de 25 mg kg⁻¹ de alimento. La segunda, llamada 'polen dos' (P2), en la cual se adicionó AVP de tal forma que se obtuviese una concentración de CT aproximada de 50 mg kg⁻¹ de alimento.

Para la dieta C+ se mezcló Lucantin® Pink con agua destilada. Luego, esto se mezcló con AV y lecitina de soya. La mezcla se homogenizó en un Ultra-Turrax (IKA®T18 básico) durante 2 min a 1.500 rpm. La emulsión de astaxantina resultante se añadió lentamente (10 minutos) junto con los pellets de la dieta basal (10 kg), en una batea de polietileno para alimentos, mientras los pellets y la emulsión fueron mezclados manualmente con una espátula de silicona (Tramontina®, Colombia). Luego, la mezcla fue dejada en reposo durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. No hubo evidencia de aceite residual en el recipiente de mezcla después del proceso.

Las dieta C- se preparó utilizando AV, agua destilada, lecitina de soya, y se siguió el mismo procedimiento descrito para la preparación de la dieta C+. Las dietas P1 y P2 fueron preparadas utilizando AVP, agua destilada, lecitina de soya, y se siguió el mismo procedimiento llevado a cabo con las dietas C+ y C-.

A seguir, las dietas se empacaron al vacío, en una empacadora (minipack®-torre, Italia), en raciones de 1 kg, utilizando bolsas de polietileno de 70 micras (Evapack, Colombia) con un porcentaje del 95 % de vacío. Las dietas fueron protegidas de la luz, y se mantuvieron a una temperatura entre (0 ± 2 °C) hasta su suministro a los peces.

Dentro de las ventajas que se tienen de recubrir los pellets de concentrado con una fase oleosa después de la granulación es que permite aumentar el contenido de aditivos, calorías y absorción de vitaminas liposolubles y ácidos grasos esenciales, aumentando la proporción de aceite en los gránulos sin afectar su textura. Los recubrimientos oleosos pueden impregnarse profundamente en los gránulos de alimento, asegurando una buena

mezcla y calidad, disminuyendo la dispersión de partículas y polvo del alimento al ambiente (AmisyGroup, 2000).

Una vez preparadas las dietas, se cuantificó el contenido de CT mediante espectrofotometría. Se pre-homogenizaron 10 g de pellets de cada dieta en un molino eléctrico, siguiendo la metodología descrita previamente en la página 36. El contenido de CT fue calculado en miligramos equivalentes de β -caroteno por kilogramo de alimento.

Adicionalmente, se realizó el análisis proximal de las dietas. El porcentaje de humedad se determinó mediante secado en estufa de aire forzado a 105 °C. El contenido de ceniza se determinó por combustión en mufla a 550 °C. El contenido de proteína bruta ($N \times 6,25$) se determinó utilizando el método estándar Kjeldahl y el contenido de grasa bruta se determinó mediante extracción Soxhlet, ver página 87 (AOAC, 2005).

2.4. Condiciones y manejo de los peces

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones de la finca Truchas de la Sierra Ltda (4,807090, -73,877312), ubicada en el municipio de Guasca (Departamento de Cundinamarca, Colombia). Se utilizó un estanque de concreto (12 m x 2,5 m x 1 m) con recambio de agua (>50 %) cada 2 h. Cada dos semanas, durante el periodo de experimentación, se registraron temperatura y oxígeno disuelto, usando un termómetro y un oxímetro digitales, tanto en la entrada como en la salida del flujo de agua, obteniendo rangos entre (9,1-10,7 °C), y (7,6-7,8 mg O₂ l⁻¹), respectivamente.

Se utilizó un total de 144 truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en fase de engorde, con un peso y talla inicial de (206,3 ± 6,2 g) y (26,5 ± 0,3 cm), respectivamente. Las truchas se distribuyeron en 12 jaulas flotantes (0,8 m x 0,8 m x 1,0 m), construidas con tubos de PVC y malla plástica, alojando 12 truchas por jaula, para una biomasa inicial de 3,9 kg m³⁻¹. Las 12 jaulas se distribuyeron aleatoriamente entre las cuatro dietas experimentales (tres jaulas por tratamiento). En la **Figura 2-1** se presenta un el esquema de numeración y distribución de las jaulas en el estanque de concreto y el producto de la aleatorización de las jaulas entre las dietas experimentales.

Las truchas fueron alimentadas manualmente tres veces al día (7:00 h - 12:00 h -17:00 h) durante un período de ocho semanas, utilizando una ración entre 1,88 y 2,16% de la biomasa, ajustando la ración cada 14 días.



Water input	
Cage 1 - P2	Cage 2 - C-
Cage 3 - P1	Cage 4 - C+
Cage 5 - C+	Cage 6 - P1
Cage 7 - P2	Cage 8 - C-
Cage 9 - C-	Cage 10 - C+
Cage 10- P1	Cage 12 - P2
Water outlet	

Figura 2-1 Distribución de las jaulas en el estanque

Se alojaron 12 truchas por jaula (Cage) y se distribuyeron tres jaulas por tratamiento, los cuales fueron C-: control negativo, 1.4 mg carotenoides totales kg⁻¹; C+: control positivo, 50 mg astaxantina kg⁻¹; P1: Polen 1, 25 mg carotenoides totales kg⁻¹; P2: 50 mg carotenoides totales kg⁻¹.

2.4.1. Evaluación de parámetros zootécnicos

Los días 0, 14, 28 y 42, se tomaron 6 individuos de cada jaula y se evaluaron parámetros según **Ecuación 2-1**, **Ecuación 2-2**, **Ecuación 2-3** y **Ecuación 2-4** (Heinen, Hankins, & Subramanyam, 1995; Jalili, Tukmechi, Agh, Noori, & Ghasemi, 2013; Keleştemur & Seven, 2013):

Ecuación 2-1 Ganancia de peso

$$(GP, \%) = \left[\frac{(\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)})}{\text{Peso inicial (g)}} \right] \times 100$$

*Ganancia de peso*⁴

$$(GP, \text{g/d}) = \left[\frac{(\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)})}{\text{Periodo (d)}} \right]$$

Ecuación 2-2 Tasa de crecimiento específico

$$(TCE, \%/d) = \left[\frac{(\text{Log e Peso final (g)} - \text{Log e Peso inicial (g)})}{\text{Periodo (d)}} \right] \times 100$$

Ecuación 2-3 Ganancia de longitud

$$(GL, \%) = \left[\frac{(\text{Longitud final (cm)} - \text{Longitud inicial (cm)})}{\text{Longitud inicial (g)}} \right] \times 100$$

*Ganancia de longitud*⁵

$$(GL, \text{mm/d}) = \left[\frac{(\text{Longitud final (mm)} - \text{Longitud inicial (mm)})}{\text{Periodo (d)}} \right]$$

Ecuación 2-4 Factor de condición

$$(FC, \%) = \left[\frac{\text{Peso del pez (g)}}{\text{Longitud del pez (cm)}^3} \right] \times 100$$

Al final de las 8 semanas (día 56), antes de la primera alimentación, los peces se sumergieron en una mezcla 1:1 de agua con hielo durante 10 min, lo que provocó su insensibilización. Luego, los peces fueron sacrificados con un corte en la vértebra cervical. El sacrificio se realizó siguiendo las recomendaciones de la FAO y la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (Leary et al., 2013). Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (Resolución CB-FMVZ-UN-65-18) (Bogotá, Colombia). En este día se evaluaron los parámetros descritos y dos parámetros adicionales (Zhang et al., 2013) según **Ecuación 2-5** y **Ecuación 2-6**:

Ecuación 2-5 Índice hepatosomático

$$(IHS, \%) = \left[\frac{\text{Peso del hígado (g)}}{\text{Peso del pez (g)}} \right] \times 100$$

Ecuación 2-6 Índice vicerosomático

$$(IVS, \%) = \left[\frac{\text{Peso de víceras (g)}}{\text{Peso del pez (g)}} \right] \times 100$$

⁴ La ganancia de peso fue calculada en gramos al día (g d^{-1}), siendo el *periodo* de 56 días.

⁵ La ganancia de longitud fue calculada en milímetros al día (mm d^{-1}), siendo el *periodo* de 56 días.

A seguir, se obtuvieron los filetes de las truchas retirando manualmente con un cuchillo la cabeza y la cola; las espinas y huesos se retiraron cortando manualmente las espinas hasta la base de la espina dorsal, y luego quitando esta última. Los filetes con piel y en corte 'mariposa' obtenidos en cada uno de los cuatro tratamientos fueron lavados con agua potable y empacados individualmente, en bolsas de polietileno de grado alimentario y transportados en una cava de poliuretano con hielo durante 90 min hasta el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia (ICTA). En seguida, se empacaron al vacío en una empacadora (mini-pack®-torre, Italia), como barrera para el oxígeno, promotor principal de la degradación de la calidad y vida útil de la carne fresca, utilizando bolsas de polietileno de 70 micras (Evapack, Colombia) con un porcentaje del 95% de vacío. Los filetes fueron almacenados a 0 ± 2 °C durante un período de refrigeración de 21 días, con el fin de evaluar su calidad y estabilidad mediante pruebas físico químicas y sensoriales.

2.5. Calidad y estabilidad del filete

Una vez los filetes fueron almacenados en refrigeración, se evaluaron parámetros de calidad, que son recomendados para comercialización del producto fresco como el análisis microbiológico, la composición proximal, el perfil lipídico, y el análisis sensorial del producto, en especial la evaluación del color y su contenido de carotenoides totales en la carne.

Adicionalmente, se evaluaron parámetros en el filete en los días 1, 7, 14 y 21, del periodo de refrigeración. Se tuvieron en cuenta parámetros para evaluar la estabilidad del filete que se basan en reacciones de tipo oxidativo y evalúan la degradación de proteínas, en el caso del pH y el nitrógeno básico volátil total, y la oxidación primaria y secundaria de las grasas presentes en el filete fresco, en el caso del valor de peróxidos y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Fuentes López et al., 2013).

2.5.1. Análisis proximal

Las muestras de filete se prepararon seleccionando aleatoriamente tres peces de cada tratamiento a los cuales se les retiró la piel del filete izquierdo y se tomaron manualmente hasta 10 g de carne con la ayuda de un sacabocados de 1 1/2 pulgadas, en tres

posiciones a lo largo de la línea anterior de los mismos: cerca a la cabeza, entre la cabeza y la cola, y cerca a la cola. En seguida, la carne de cada tratamiento fue homogenizada con la ayuda de un molino eléctrico, en intervalos de encendido de 5 s y reposo de 10 s, hasta obtener una pasta homogénea. De esta, se tomaron masas de sub-muestras y se sometieron a análisis proximal (contenido de humedad, proteína, grasa y cenizas), de acuerdo con metodologías recomendadas por la AOAC, ver página 87 (AOAC, 2005).

2.5.2. Perfil lipídico

Se hizo una extracción lipídica de los filetes siguiendo el método de Folch (Folch et al., 1957; Rincón y Albarracín, 2013). La preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos y el análisis de cromatografía de gases se hicieron siguiendo el método de Salcedo y colaboradores (Salcedo, Quin, Melgarejo, Herna, & Ferna, 2018). Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon usando una solución de metanol y trifluoruro de boro (Sigma Aldrich) en un medio ácido a 60 °C durante 15 min. Luego, a 30 °C, se adicionó 1 ml de n-hexano 95,0% (Panreac, Alemania), agitando la muestra. El sobrenadante de la mezcla fue eliminado con una pipeta Pasteur. La fase orgánica se usó para la separación de ésteres de metilo con sulfato de sodio anhidro. El análisis se hizo con un cromatógrafo de gases 4890 D (Agilent Technologies, USA) equipado con auto muestreador y autoinyector. Se utilizó una columna HP-5 de 60 m x 0.250 mm x 0.25 µm. Para la detección, un detector de ionización de llama (FID) y el puerto del inyector se mantuvieron a 260 °C. El programa de calentamiento de la columna comenzó a 150 °C y aumentó a 300 °C a 5 °C min⁻¹. La velocidad de flujo del gas de arrastre, helio, fue de 1 ml min⁻¹, el flujo de hidrógeno fue de 30 ml min⁻¹, y el flujo de aire sintético fue de 300 ml min⁻¹. La composición cualitativa de ácidos grasos se determinó por comparación de los tiempos de retención de los picos obtenidos con los de patrones (Sigma Aldrich) de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs). Luego, estos fueron cuantificados como porcentaje de la relación entre el área del pico individual y las áreas de los picos totales de los ácidos grasos (Salcedo et al., 2018).

2.5.3. Análisis microbiológico

En el día 1 del periodo de refrigeración se evaluó la calidad microbiológica de los filetes de acuerdo con la legislación colombiana vigente (ICONTEC, 2009). Los análisis

microbiológicos se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del ICTA. Se evaluaron parámetros como conteo en placa de coliformes, *Staphylococcus* coagulasa positiva, *E. coli*, *Salmonella*, y *Vibrio*, de acuerdo con los protocolos descritos por Holguín Hernández, ver página 84 (Holguín Hernández, 1998). Con los resultados obtenidos se tomó la decisión de realizar un análisis proximal a los filetes, debido al riesgo biológico potencial que representa el consumo de productos pesqueros en Colombia.

2.5.4. Análisis sensorial

Se llevó a cabo una evaluación sensorial entre 60 consumidores (panel evaluador no entrenado): estudiantes, profesores y visitantes de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, siguiendo la metodología propuesta por Yanar y colaboradores. Se determinó la aceptación de aroma, sabor, textura y color de los filetes utilizando una escala hedónica de cinco puntos (1 = no me gusta nada, 5 = me gusta mucho). Las muestras se identificaron con códigos aleatorios de tres dígitos. Para los análisis de aroma, sabor y textura, el filete izquierdo entero con piel, en cada tratamiento, fue cocinado al vapor hasta alcanzar una temperatura interna de 72 °C. A seguir, se le quitó la piel al filete y se cortó en raciones con la ayuda de un sacabocados de 1 1/2 pulgadas, y se presentó inmediatamente a los consumidores. Durante la evaluación sensorial, a los consumidores se suministró agua y galletas entre muestras. El análisis de color se realizó en filetes crudos empacados al vacío, evaluando la preferencia de los consumidores por el color de los grupos de filetes. Los análisis de aroma, sabor y textura se realizaron independientemente del análisis visual del color (Yanar et al., 2007). Se escogió el día 7 para evaluar los atributos sensoriales de los filetes de trucha por tratarse del punto medio de la vida útil estimada. En este punto, se considera que el producto ha desarrollado atributos de maduración y aún no ha empezado el tiempo crítico de deterioro del filete por oxidación, estimado en 14 días de acuerdo con los reportes hechos por Moroney y colaboradores (Moroney et al., 2015).

- Evaluación del color y contenido de carotenoides

Se evaluó el color del filete de trucha usando un ChromaMeter CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc, Japón) equipado con un área de medición de 8 mm de diámetro, fuente de

luz C y ángulo de observación de 2°. El Chroma Meter se calibró en el sistema de coordenadas de color CIE LAB utilizando un blanco estándar. Se hicieron mediciones del filete entero en tres lugares: cerca de la cabeza, entre la cabeza y la cola y cerca de la cola. El promedio de estas tres mediciones se calculó para determinar los valores L*, a* y b* (Choubert et al., 2006; Roncarati et al., 2011).

Adicionalmente, el color de los filetes enteros fue comparado con el abanico colorimétrico SalmoFan™ (DSM, Colombia), que adopta una escala que varía desde 20 (rojo pálido) hasta 34 (rojo oscuro), bajo condiciones estandarizadas de lugar y fuente de luz artificial. Este método fue utilizado porque es fácil de utilizar, comparar y adquirir por los productores (Roncarati et al., 2011).

El contenido de carotenoides se evaluó siguiendo el método de Teimouri y colaboradores (Teimouri et al., 2013b). Se pesaron 5 g de sub-muestra de filete en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml, adicionando 10 ml de acetona (99,5%, Panreac, Alemania) y 2 g de sulfato de sodio anhidro. La mezcla fue homogenizada durante 20 s en un Ultra-Turrax (IKA®T18 básico). Las muestras se almacenaron durante 24 h en oscuridad a temperatura de refrigeración (0 ± 2 °C). Las soluciones se centrifugaron a 3.500 rpm durante 15 min y se filtraron a través de un papel de filtro Whatman N° 4. Se hicieron lavados sucesivos del precipitado hasta la desaparición del color. Los pigmentos de carotenoides en acetona se transfirieron a un matraz aforado de 50 ml. La absorbancia se midió a 450 nm contra acetona como referencia en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, USA) en una celda de cuarzo de 1 cm. Los CT en las muestras se calcularon en miligramos de β -caroteno equivalentes por kilogramo de carne, de acuerdo con la curva de calibración en acetona descrita previamente, ver página 36.

2.5.5. Medición del pH

Se pesaron 10 g de filete y se adicionaron 90 ml de agua destilada en un vaso de precipitados de 250 ml. La mezcla fue homogenizada en un Ultra-Turrax (IKA®T18 básico) durante 10 s. El pH se midió con un pH-metro Jenway® 3510 (Bibby Scientific Ltd, Reino Unido) (Moroney et al., 2015).

2.5.6. Nitrógeno básico volátil total (N-BVT)

La determinación del contenido en N-BVT⁶ en muestras pescado puede realizarse mediante diferentes metodologías analíticas como son el método de microdifusión, el método de destilación directa o la destilación de un extracto sin proteína mediante ácido tricloroacético (Fuentes López et al., 2013). La determinación del N-BVT se realizó mediante destilación directa, siguiendo la metodología aprobada por la 'Commission of the European Communities' (CEC, 1995). Se mezclaron 10 g de filete con 150 ml de agua destilada y 2 g de MgO. Luego, la solución se puso en una unidad de destilación hasta obtener 50 ml de extracto. El flujo de salida de la destilación se sumergió en un receptor con 20 ml de solución de ácido bórico, con indicador de Tashiro, durante 15 min. Las bases volátiles totales se valoraron con una solución de ácido clorhídrico estándar y su concentración se calculó de acuerdo con la Ecuación 2-7:

$$\text{Ecuación 2-7 Nitrógeno básico volátil total}$$

$$N - BVT \left(\frac{mg}{100 g} \right) = \left[\frac{((V_m - V_b) \cdot 0,14 \cdot 2 \cdot 100)}{W} \right]$$

Donde V_m = volumen de ácido clorhídrico 0,01 M gastados en la valoración de la muestra (ml); V_b = volumen de ácido clorhídrico 0,01M gastados en la valoración del blanco (ml); y W = peso de la muestra (g, en peso fresco).

2.5.7. Valor de peróxidos

La determinación del VP se hizo siguiendo la metodología aprobada por la 'Commission of the European Communities' (CEC, 2016). Se pesaron 2 g de grasa de filete, extraídos por el método Soxhlet, en un matraz y se añadió una solución de ácido acético glacial y cloroformo. Luego, se agregó una solución concentrada de yoduro de potasio. Se hizo valoración con una solución estandarizada de tiosulfato de sodio. El VP se calculó de acuerdo con la Ecuación 2-8:

$$\text{Ecuación 2-8 Valor de peróxidos}$$

$$VP (mEq. O_2 / kg) = \frac{N \cdot (V_m - V_b) \cdot 1000}{W}$$

⁶ El término general de nitrógeno básico volátil total (N-BVT) incluye todas aquellas bases nitrogenadas volátiles, como son la trimetilamina (producida por el deterioro bacteriano), dimetilamina (producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación), amoníaco (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos) y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros (Fuentes López et al., 2013).

Donde V_m = volumen de tiosulfato de sodio gastados en la valoración de la muestra (ml); V_b = volumen de tiosulfato de sodio gastados en la valoración del blanco (ml); N = normalidad del tiosulfato de sodio (0.01 N) y W = peso de la muestra (g, en peso fresco).

2.5.8. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SR-TBA)

La determinación de las SR-TBA se hizo siguiendo el método de Tarladgis y colaboradores (Tarladgis, Watts, Younathan, & Dugan Jr., 1960). Diez gramos de filete fueron mezclados con 97 ml de agua destilada, 3 ml de solución estandarizada de ácido clorhídrico y antiespumante de silicona en un matraz Kjehlahl. La mezcla se destiló hasta obtener 50 ml. Luego, 5 ml del destilado y 5 ml de reactivo TBA se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 35 min. Se midió la absorbancia a 532 nm contra un blanco (sin adición de muestra) usando un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10 S (Thermo Scientific, USA). Los productos de oxidación se calcularon de acuerdo con la Ecuación 2-9:

Ecuación 2-9 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

$$SR - TBA (mg MDA/kg) = \frac{((A - b) \cdot 72,03 \cdot V)}{(W \cdot m \cdot 1000)}$$

Donde A = absorbancia a 532 nm; V = volumen del extracto (ml); W = peso de la muestra (g, en peso fresco); m la pendiente y b la intersección en y de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración elaborada.

2.6. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se llevó a cabo bajo un diseño completamente al azar. Todos los datos fueron evaluados para la normalidad de la distribución y la homogeneidad de la varianza.

En el periodo de cultivo, las unidades experimentales fueron las jaulas, asignadas aleatoriamente ($n= 3$ jaulas) a cada tratamiento, evaluado cada parámetro de forma independiente.

En el periodo de refrigeración, las unidades experimentales fueron los filetes de cada tratamiento. Todos los parámetros evaluados y mediciones físico-químicas fueron llevados a cabo por triplicado. Para comparar los tratamientos, se realizaron análisis de varianza con una vía de clasificación (ANAVA). Las comparaciones entre promedios se

hicieron mediante el 'Tests de Diferencias Mínimas Significativas' (LSD, por sus siglas en inglés), utilizando el software SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc., USA).

Para el análisis sensorial, las diferencias de los parámetros de aroma, olor, sabor, textura y color, se determinaron usando la mediana de los datos y el análisis mediante estadística no paramétrica, y comparación de medianas mediante una prueba de Friedman.

Por otra parte, se realizó análisis global de los datos mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), que es una técnica estadística que busca reducir la dimensionalidad de los datos, manteniendo la mayor cantidad de información posible de la varianza obtenida. La información obtenida durante el periodo de cultivo y durante el periodo de refrigeración, se estudió independientemente mediante el análisis de dos gráficos (*score plot* y *loading plot*), los cuales son herramientas que permiten establecer relaciones entre muestras, entre variables, y entre muestras con respecto a las variables (Zuluaga Domínguez, 2015). Se empleó el software Matlab R2017a versión 9.2. (Math Works Inc., USA).

3. Resultados y discusión

3.1. Polen apícola

3.1.1. Origen botánico

En la **Tabla 3-1** se presentan los códigos de los colores Pantone®, el color aparente, y los taxones hallados en este estudio. En la **Figura 3-1** se muestran las fotografías obtenidas en el microscopio. Se obtuvieron 8 montajes en lámina, uno por cada color, y se determinaron los tipos polínicos. Se observa que 6 de las muestras analizadas corresponden con pólenes dominantes *Raphanus sativus*, *Eucalyptus globulus*, *Monocotiledónea*, *Salix humboldtiana*, *Asteraceae* e *Hypochaeris radicata*, asociados a un color Pantone®. Las 2 muestras restantes corresponden con muestras secundarias, *T. repens* y *S. humboldtiana*, y *T. repens* y *T. pratense*, donde el color resultante es una mezcla de distintos tipos polínicos. Los tipos polínicos hallados en este estudio son consistentes con los tipos polínicos identificados previamente en un estudio más amplio realizado en el altiplano Cundiboyacense y Santander, en Colombia, cuyo objetivo fue identificar recursos florales no maderables, y en cual se identificaron 63 tipos polínicos, destacándose por su alta frecuencia de aparición especies como *H. radicata*, *Raphanus*, *T. pratense* y *E. globulus* (Chamorro García, León Bonilla, & Nates-Parra, 2013).

Otro estudio cuyo objetivo fue determinar y comparar la composición nutricional y fitoquímica de polen apícola comercial producido en Colombia, Italia y España, revela que el polen colombiano en su mayoría es de origen multifloral, con *Brassica napus*, *Taraxacum officinale* y *Trifolium pratense* como los principales tipos polínicos clasificados como dominantes (Gardana et al., 2018).

Tabla 3-1 Colores, códigos y taxones asociados a los tamices n°12 y n°16

Código Pantone®	Color aparente	Tipos polínicos
1235		<i>Raphanus sativus</i> (100 %)
1245		<i>T. repens</i> (53,67 %), <i>S. humboldtiana</i> (46,33 %)
1255		<i>Eucalyptus globulus</i> (100 %)
1375		Monocotiledónea (100 %)
1385		<i>Salix humboldtiana</i> (100 %)
1575		<i>T. repens</i> (58,47 %), <i>T. pratense</i> (41,53 %)
1585		Asteraceae (100 %)
137		<i>Hypochaeris radicata</i> (100 %)

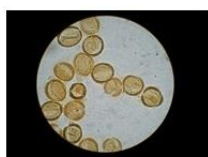
a) *Raphanus sativus*b) *Trifolium repens*c) *Eucalyptus globulus*d) *Hypochaeris radicata*e) *Salix humboldtiana*f) *Monocotiledona*g) *Trifolium pratense*

Figura 3-1 Fotografías de los tipos polínicos encontrados en los tamices n°12 y n°16.
a) *Raphanus sativus* b) *Trifolium repens* c) *Eucalyptus globulus* d) *Hypochaeris radicata* e) *Salix humboldtiana* f) *Monocotiledónea* g) *T. pratense*

3.1.2. Contenido de carotenoides

- En polen apícola

En este estudio, el contenido de CT en muestras de polen seco evaluadas por triplicado obtenido mediante espectrofotometría fue de $1.169,40 \pm 4,23$ mg de β -caroteno equivalente kg^{-1} de polen seco. Este valor es consistente con el valor reportado por la mayoría de estudios realizados en Colombia para el altiplano cundiboyacense, que oscila entre 170 y 2.149 mg de β -caroteno equivalente kg^{-1} de polen (base seca) (Barajas Ortiz et al., 2009; Chavarro Pulido, 2013; Chavarro Pulido et al., 2012b; Salazar González, 2014). Un estudio reciente cuyo objetivo principal fue determinar y comparar la composición nutricional y fito-química de polen apícola comercial producido en apiarios de Colombia, Italia y España, estima el contenido de carotenoides totales (en mg equivalentes de zeaxantina por kg^{-1} de polen), evaluado mediante espectrofotometría y cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo (LC-DAD), en $221 \pm 10,6$ y $207 \pm 9,1$, respectivamente, sin encontrar diferencias entre una u otra metodología de análisis (Gardana et al., 2018). Si bien el contenido nutricional y bio activo del polen apícola varía por la oferta floral y por la época del año (Estevinho et al., 2012), el contenido de carotenoides totales hallado en el presente estudio es 5,6 veces el valor reportado en el estudio de Gardana y colaboradores; esto obedece a que la cuantificación de los carotenoides se hizo con estándares diferentes como β -caroteno y zeaxantina, respectivamente.

Por otra parte, el estudio de Gardana y colaboradores reporta que el polen producido en el altiplano cundiboyacense en Colombia contiene mayor cantidad lípidos totales, y gran cantidad de ácido α -linolénico, en comparación con pólenes comerciales producidos en Italia y España. Todas las muestras de polen colombiano tuvieron carotenoides esterificados, siendo zeaxantina unida a dos residuos de ácido láurico, y luteína, los dos carotenoides principales del polen producido en la zona. Los carotenoides no esterificados detectados en cantidades traza fueron luteína, zeaxantina, β -caroteno y fitoeno (Gardana et al., 2018).

- En aceite vegetal (AV) y aceite vegetal pigmentado (AVP)

El contenido de CT del aceite vegetal pigmentado utilizado en este estudio, relación 0,25:1, en muestras evaluadas por triplicado mediante espectrofotometría fue de 278,72

$\pm 7,81$ mg de β -caroteno equivalente l^{-1} de aceite. La concentración de CT del AVP obtenido con esta relación se tuvo en cuenta para la adición de carotenoides por balance de materia a las dietas experimentales.

La concentración de CT obtenida por triplicado para diferentes relaciones de extracción se presentan en la **Tabla 3-2**. En la **Figura 3-2** se presenta la imagen del AVP obtenido de la mezcla de aceite de girasol y polen en distintas proporciones. La concentración de CT en el AVP más alta se obtuvo con la relación 1:1, $690,67 \pm 8,41$ mg de β -caroteno equivalente l^{-1} de aceite.



Figura 3-2 AVP obtenido en diferentes proporciones de extracción sólido-líquido: 0,25:1, 0,5:1, 0,75:1 y 1:1 w/v, polen:aceite vegetal.

Tabla 3-2 Contenido de carotenoides del AVP extraído en distintas proporciones

Relación	Carotenoides totales (mg β caroteno l^{-1} aceite)
Aceite de girasol	$14,35 \pm 0,10$
Extracto 1:1	$690,67 \pm 8,41$
Extracto 0,75:1	$618,89 \pm 1,34$
Extracto 0,50:1	$453,99 \pm 12,18$
Extracto 0,25:1	$278,72 \pm 7,81$

Se presentan los promedios de los parámetros evaluados en muestras por triplicado \pm desviación estándar.

En este estudio preliminar, los parámetros de temperatura y tiempo fueron 18 ± 2 °C y 24 ± 2 h. Como se aprecia en la **Tabla 3-2**, a medida que se aumenta la proporción de polen utilizada en el aceite, se incrementa el contenido de carotenoides totales. De acuerdo con la búsqueda realizada, no se hallaron reportes sobre el uso de aceites vegetales para la extracción de carotenoides y compuestos liposolubles de polen apícola.

En el estudio de Sachindra y Mahendrakar se evaluaron diferentes aceites vegetales para la extracción de carotenoides residuales de camarones. Desperdicios de camarones recuperados en plantas de procesamiento fueron mezclados con aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de mostaza, aceite de soya, aceite de salvado de arroz, y aceite de coco, y puestos en extracción sólido-líquido a una temperatura de 70

°C durante 2 h. Se encontró que el mayor contenido de carotenoides totales recuperado se obtuvo con la utilización de aceite vegetal, 26,3 mg kg⁻¹ desperdicios de camarón) de desecho se obtuvo por extracción con aceite de girasol, en comparación con los otros aceites. De manera similar, el rendimiento de carotenoides aumenta con el aumento de la relación aceite: residuos (1:1) (Sachindra & Mahendrakar, 2005).

3.2. Composición proximal de las dietas

La adición a la DC de una emulsión de agua en aceite, para vehiculizar los carotenoides naturales o sintéticos, aumentó su contenido de humedad y grasa, pero no sus niveles de proteína y cenizas ($p < 0,05$). Las dietas C-, C+, P1 y P2, no presentaron diferencias en los niveles de humedad, proteína, grasa y cenizas ($p > 0,05$). En la **Tabla 3-3** se presenta la composición proximal y el contenido de carotenoides totales de las dietas DC, C-, C+, P1, P2.

Tabla 3-3 Composición de las dietas experimentales (base húmeda)

Composición proximal	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Cenizas (%)	CT (mg β-caroteno kg ⁻¹)*
Dieta comercial (DC)	6,72 ^b ± 0,07	44,30 ± 0,07	10,16 ^b ± 0,12	8,84 ± 0,11	0,84 ± 0,01
Control negativo (C-)	7,29 ^a ± 0,10	44,26 ± 0,05	14,27 ^a ± 0,04	8,77 ± 0,05	1,42 ± 0,03
Control positivo (C+)	7,34 ^a ± 0,01	44,24 ± 0,04	14,18 ^a ± 0,09	8,78 ± 0,02	50,23 ± 0,02
Polen uno (P1)	7,30 ^a ± 0,08	44,25 ± 0,01	14,23 ^a ± 0,07	8,73 ± 0,07	24,73 ± 0,07
Polen dos (P2)	7,30 ^a ± 0,02	44,28 ± 0,02	14,21 ^a ± 0,18	8,72 ± 0,03	48,22 ± 0,03

Se presentan los promedios de los parámetros evaluados en muestras por triplicado ± desviación estándar. Promedios en la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes (LSD Tests) ($p < 0,05$). * No se le realizaron pruebas de ANAVA.

En este estudio se empleó una dieta comercial sin pigmento, cuyo fabricante recomienda utilizar durante el periodo de levante de las truchas con rango de peso entre 30 y 120 g de peso vivo, y garantiza una composición proximal mínima de proteína de 43,0 %, grasa de 12,0 %, fibra de 4,0%, y máxima de cenizas de 12,0 % y humedad de 13,0 % (en base húmeda) (Solla, 2005). Cuando se evaluó la composición proximal de la DC, se encontró que la mayoría de estándares en términos de humedad, proteína y cenizas, fueron cumplidos. No obstante, el valor de grasa hallado estuvo por debajo de dicho estándar. Las dietas experimentales C-, C+, P1, y P2 no presentaron diferencias en su composición proximal ($p > 0,05$), con excepción del contenido de CT, el cual fue intencionalmente agregado. La composición de las dietas fue similar y estuvo de acuerdo con las recomendaciones en alimentación de truchas en fase de engorde, con rangos de

humedad entre 7,2 y 8,3%, proteína entre 44,1 y 44,3 %, lípidos entre 18,3 y 20,1%, y cenizas entre 9,4 y 10,1% (Roncarati et al., 2011).

3.3. Parámetros de desempeño e índices corporales

Los resultados encontrados para los parámetros de GP, GL, TCE, FC, IHS y IVS se presentan en la **Tabla 3-4**. Durante el experimento en la fase de cultivo no se presentó mortalidad. No hubo diferencias significativas en parámetros de desempeño como GP, GL, TCE, y el FC; ni tampoco en índices corporales como el IHS ($p > 0,05$).

En el presente estudio, la *ganancia de peso* estuvo en rangos de 86,33 y 104,71 % (3,21 y 3,81 g d⁻¹) para las truchas suplementadas con las dietas C-; 86,75 y 110,37 % (3,38 y 3,92 g d⁻¹) para el grupo C+; 98,95 y 101,81 % (3,71 y 3,77 g d⁻¹) para el grupo P1; y 103,08 y 120,8 % (3,55 y 4,57 g d⁻¹) para el grupo P2.

La *ganancia de longitud* estuvo en rangos de 13 y 16,04 % (0,62 y 0,76 mm d⁻¹) para las truchas suplementadas con las dietas C-; 13,73 y 17,55 % (0,65 y 0,83 mm d⁻¹) para el grupo C+; 14,54 y 17,04 % (0,72 y 0,78 mm d⁻¹) para el grupo P1; y 16,17 y 18,05 % (0,72 y 0,78 mm d⁻¹) para el grupo P2.

El *índice hepatosomático* estuvo en rangos de 1,56 y 1,7% para las truchas suplementadas con las dietas C-; 1,46 y 1,82 % para el grupo C+; 1,54 y 1,62 % para el grupo P1; y 1,48 y 1,64 % para el grupo P2.

Los resultados hallados en este estudio son consistentes con otros reportes, en los que se ha demostrado que la suplementación con carotenoides no tiene efectos significativos sobre parámetros de crecimiento en las truchas. Zhang y colaboradores evaluaron el uso de astaxantina sintética procedente de distintas casas comerciales, en una concentración de 100 mg kg⁻¹ de alimento, en truchas con peso inicial de 52,07 ± 0,61 g durante un periodo de 8 semanas. Se reporta un rango para ganancia de peso de 97,28 y 100,01 %, y un rango para el IHS de 0,94 y 1,20 %; no se presentaron diferencias significativas en parámetros como el peso final de las truchas (Zhang et al., 2013). También, se han evaluado fuentes naturales de carotenoides como pimentón (*Capsicum annum*) y flor de caléndula (*Tagetes erecta*) en una concentración de 70 mg kg⁻¹ de alimento, en truchas con peso inicial de 120,51 ± 0,75 g durante un periodo de 8 semanas, obteniendo un

rango para ganancia de peso de 93,8 y 105,1 %; no se presentaron diferencias significativas en la GP (Yanar et al., 2007).

Tabla 3-4 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides durante 8 semanas sobre parámetros de desempeño e índices corporales

Parámetros	Tratamientos			
	C-	C+ (50 ppm)	P1 (25 ppm)	P2(50 ppm)
Peso inicial (g)	206,11 ± 3,34	207,80 ± 7,20	208,47 ± 9,92	202,86 ± 4,67
Peso final (g)	402,83 ± 14,60	412,08 ± 11,89	417,83 ± 22,78	430,21 ± 27,62
GP (%)	95,52 ± 9,19	98,56 ± 11,81	100,38 ± 1,43	111,94 ± 8,86
GP (g d ⁻¹)	3,51 ± 0,30	3,65 ± 0,27	3,74 ± 0,03	4,06 ± 0,51
Longitud inicial (cm)	26,43 ± 0,06	26,50 ± 0,01	26,47 ± 0,06	26,43 ± 0,15
Longitud final (cm)	30,27 ± 0,34	30,65 ± 0,51	30,65 ± 0,40	30,96 ± 0,43
GL (%)	14,52 ± 1,52	15,64 ± 1,91	15,79 ± 1,25	17,11 ± 0,94
GL (mm d ⁻¹)	0,69 ± 0,07	0,74 ± 0,09	0,75 ± 0,03	0,75 ± 0,03
TCE (% d ⁻¹)	0,79 ± 0,09	0,82 ± 0,09	0,86 ± 0,02	0,92 ± 0,06
FC inicial (%)	1,12 ± 0,02	1,12 ± 0,04	1,12 ± 0,05	1,10 ± 0,01
FC final (%)	1,45 ± 0,01	1,43 ± 0,05	1,45 ± 0,04	1,45 ± 0,05
IHS (%)	1,63 ± 0,07	1,64 ± 0,18	1,58 ± 0,04	1,56 ± 0,08
IVS (%)	9,54 ^{ab} ± 0,74	9,69 ^a ± 0,41	8,80 ^b ± 0,31	9,30 ^{ab} ± 0,15

C-: control negativo, 1,4 mg carotenoides totales kg⁻¹; C+: control positivo, 50 mg astaxantina kg⁻¹; P1: Polen 1, 25 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹; P2: 50 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹. GP: ganancia de peso; GL: ganancia de longitud; TCE: tasa de crecimiento específico; FC: factor de condición; IHS: índice hepatosomático; IVS: índice vicerosomático. Promedio de los tratamientos en muestras evaluadas por triplicado ± desviación estándar (n=3 jaulas). Promedios en la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes (LSD Tests) (p<0,05).

El reporte de Sheikhzadeh contradice estos resultados. Se reporta que la suplementación con cultivos de hortalizas como tomate (*Solanum lycopersicum*) y pimentón (*Capsicum annuum*), en una concentración de 4,5 % del alimento seco de trucha arco iris, con peso inicial de 150 ± 9 g durante 8 semanas, mejora parámetros de estatus sanitario, que están correlacionados con un aumento significativo en los parámetros de crecimiento, en comparación con una dieta sin adición de carotenoides, GP de 52,7 % en comparación con la tasa del grupo sin adición de carotenoides de 30,5 % (Sheikhzadeh, 2013).

Por otra parte, en el presente estudio se encontraron diferencias significativas en el IVS de los distintos grupos de peces (p<0,05). Los índices IHS y IVS son indicadores del estado de condición de los peces. Al final de las 8 semanas de suplementación, en ningún tratamiento se presentaron signos clínicos de enfermedad en el estado de los órganos. El índice IVS presentó diferencias significativas entre los tratamientos, mostrando el menor índice para el grupo P1 con 8,80 %, y el más alto para el grupo C+

con 9,7 % ($p < 0,05$), de acuerdo con los datos resumidos en la **Tabla 3-4**. No obstante, no se presentaron diferencias entre los grupos C-, P2 y P1, y tampoco entre los grupos C+, P2 y C-.

Las vísceras se descartan como subproducto durante el procesamiento. Por lo tanto, reducir la cantidad de vísceras en relación con el peso corporal total y reducir la concentración de lípidos de las vísceras benefician tanto al productor de pescado como al procesador (Chaiyapechara, Liu, Barro, Hard, & Dong, 2003). De acuerdo con Bugeon y colaboradores, una mayor producción en el filete se asocia con un mayor crecimiento muscular y menor crecimiento de tejido adiposo visceral. En la trucha arco iris el incremento en la producción del filete obedece a la deposición tanto de tejido muscular como adiposo, a diferencia del ganado vacuno y los cerdos, en los que una gran masa de tejido muscular implica bajo contenido de grasa muscular, y viceversa. Mayores porcentajes de grasa y tejido adiposo visceral en las truchas, contribuyen con menor rendimiento del filete, y viceversa (Bugeon et al., 2010).

En el presente estudio no observamos un patrón en el comportamiento de los datos para el índice IVS, que indique cómo los tratamientos evaluados afectan este parámetro en la población de truchas. Es posible que la suplementación con extractos carotenoides procedentes del polen contribuyan con un mejor desempeño del sistema digestivo de las truchas, que se ve reflejado en mayores tasas de crecimiento y menor contenido de grasa visceral.

Los carbohidratos, presentes en harinas y trigos, y lípidos, presentes en aceite de pescado o vegetal, de la dieta son la principal fuente de energía en la mayoría de las dietas para animales domésticos. La capacidad de los peces para utilizar carbohidratos varía: los peces herbívoros u omnívoros de aguas templadas utilizan niveles más altos de carbohidratos que los peces carnívoros de agua fría y los peces marinos (Ighwela, Ahmad, & Abol-Munafi, 2014). La suplementación de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), con peso inicial de $2,1 \pm 0,2$ g, con maltosa en proporciones de 0, 20, 25, 30 y 35 %, durante 12 semanas, no tiene efecto sobre el IVS de la población evaluada (Ighwela et al., 2014). En el caso de la trucha arco iris, se ha evaluado el uso de dos dietas con niveles diferenciados de lípidos totales, 27,5 y 12,6 %, respectivamente, en alimentación de alevinos durante un periodo de 24 meses. Se ha demostrado que una

alta ingesta de lípidos en la dieta de los peces se asocia con un alto índice IVS durante los primeros 12 meses de crecimiento. No obstante, al final de 24 meses, los distintos grupos de peces no presentan diferencias en este parámetro (Jobling, Koskela, & Savolainen, 1998).

3.3.1. Análisis global de los datos durante el periodo de cultivo

Se aplicó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para verificar la similitud entre tratamientos según parámetros de desempeño (GP, GL, TCE y FC) durante el tiempo (56 días). El resultado del PCA muestra que los dos primeros componentes principales explican el 95,47 % de la varianza total de los datos, como se muestra en la **Figura 3-3**. El valor propio y la varianza del componente '1' fueron 2,82 y 70,69 %, respectivamente. El valor propio y la varianza del componente '2' fueron 0,99 y 24,78 %, respectivamente. Las imágenes del *score plot* y *loading plot* permiten agrupar los tratamientos y mostrar su diferenciación debido a la adición de extractos carotenoides en la dieta en los días 14, 28, 42, y 56, en el primer componente principal (70,69 %), que tiene el mayor poder de descripción de las muestras, en parámetros como la GP, GL, TCE y FC. En el día 14, parámetros como GP, GL, TCE y FC, evaluados en los distintos grupos fue similar. En el día 28, los grupos se diferenciaron en la GP, TCE y GL, obteniendo promedios descendentes para los grupos P2>P1>C->C+. Durante el día 42, los grupos P1 y P2 se comportaron de forma similar, alcanzando un mayor valor en el FC, y por ende en la GP y GL, en comparación con los grupos C- y C+. Al final del día 56, los grupos P2 y P1 exhibieron los valores más altos en la GL y el FC, respectivamente. A su vez, el FC del grupo C+ fue mayor que el del grupo C-.

Aunque no se presentaron diferencias significativas en el análisis realizado mediante pruebas ANAVA, el PCA permite evidenciar un crecimiento diferenciado en los distintos grupos de truchas, debido a la adición de extractos carotenoides a la dieta.

El sistema endógeno antioxidante de los peces incluye enzimas, y antioxidantes exógenos como vitamina E, vitamina C y carotenoides, que eliminan los radicales libres de oxígeno en el cuerpo, protegiendo las células del daño oxidativo (Zhang et al., 2013). El extracto obtenido o AVP se caracterizó mediante su contenido de CT expresados como miligramos equivalentes de β -caroteno por litro de aceite. No obstante, el polen contiene otros compuestos diferentes a carotenoides, que no fueron evaluados, como

ácidos grasos insaturados, fosfolípidos, y fito esteroides, hormonas, y vitaminas liposolubles, que tienen efectos biológicos benéficos en el sistema inmune en los animales, y son responsables de mayores tasas de crecimiento y desempeño productivo (Yeganeh et al., 2015).

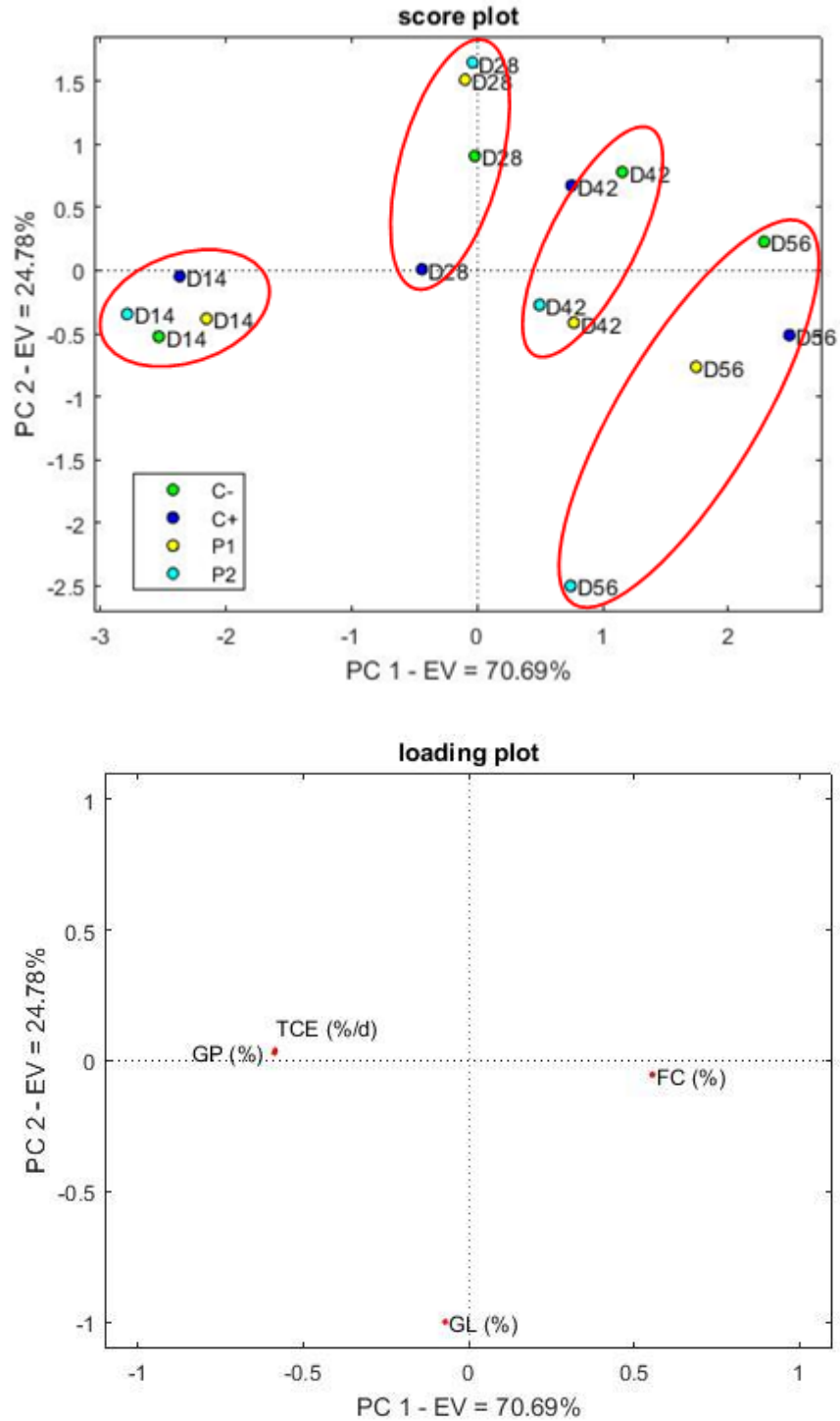


Figura 3-3 Score y Loading plot obtenidos mediante PCA de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides durante 8 semanas.

C-: control negativo (verde), 1.4 mg carotenoides totales kg^{-1} ; C+: control positivo (azul oscuro) 50 mg astaxantina kg^{-1} ; P1: Polen 1 (amarillo), 25 mg equivalentes de β -caroteno kg^{-1} ; P2: polen 2 (azul claro), 50 mg equivalentes de β -caroteno kg^{-1} . GP: ganancia de peso; GL: ganancia de longitud; TCE: tasa de crecimiento específico; FC: factor de condición.

3.4. Evaluación del filete en refrigeración

3.4.1. Calidad del filete

Los parámetros de calidad evaluados fueron el análisis microbiológico, la composición, el color y el análisis sensorial de los filetes.

- Composición proximal

La composición proximal de los filetes se presenta en la **Tabla 3-5**. Existen diferencias significativas en la composición del filete de los diferentes grupos. En promedio, el mayor contenido de humedad se presentó en los filetes de trucha del grupo C+ ($p < 0,05$). Entre los grupos C- y P1 no presentaron diferencias en el contenido de humedad, así como tampoco se encontró diferencia en este parámetro entre los grupos P1 y P2 ($p > 0,05$). De igual forma, el mayor contenido de proteína y cenizas se presentó en los filetes de trucha del grupo P2 ($p < 0,05$). Entre los grupos C- y P1, tampoco se presentaron diferencias en el contenido de proteína y cenizas ($p > 0,05$). En promedio, el menor contenido de proteína y cenizas se presentó en los filetes de trucha del grupo C+ ($p < 0,05$). El mayor contenido de lípidos totales se presentó en los filetes de trucha del grupo P2, seguido del grupo P1 ($p < 0,05$). Entre los grupos C- y P1 no presentaron diferencias en el contenido de lípidos ($p > 0,05$).

De acuerdo con el PCA realizado durante la fase de cultivo, ver página 59, pese a no encontrarse diferencias significativas en los parámetros de desempeño al final del día 56, hubo un crecimiento diferenciado, que posiblemente pudo tener efecto sobre la composición del filete, como se ve reflejado en los datos resumidos en la **Tabla 3-5**.

En este sentido, investigadores evaluaron la composición proximal de una población de 84 truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en distintos tamaños (desde 4,8 hasta 38,5 cm) y pesos (desde 1,11 hasta 725 g), con el fin de determinar la correlación de las variables como GP, GL y FC, con la composición proximal de los filetes. Se encontró que las macronutrientes que constituyen el cuerpo de los peces se correlacionan con su tamaño y peso ($p < 0,05$). En la medida en que aumentan la longitud y el peso de los peces, se incrementan las cantidades en porcentaje de proteína y grasa en el filete, mientras que el contenido en porcentaje de agua y cenizas disminuyen (Naeem, Salam,

& Zuberi, 2016). De acuerdo con Naeem y colaboradores, los cambios ocurridos en la composición proximal del pescado entero, o en los filetes de pescado, obedecen a factores como el tamaño de los peces, el FC, la altura del estanque, la temperatura del agua, o el sexo, entre otros. El FC se utiliza como índice de crecimiento. Un cambio de peso en una longitud particular, o un cambio de longitud sin el cambio correspondiente en el peso, conduce a la alteración del FC.

Este hallazgo podría explicar en el presente estudio, la relación que existe entre el nivel de proteína y grasa de los distintos tratamientos y su GP durante el periodo de cultivo. Al final del periodo de cultivo, de acuerdo con los resultados obtenidos, los peces con mayor promedio de peso fueron en su orden P2>P1>C+>C-. Durante el primer día del periodo de refrigeración, los filetes de los grupos con mayor promedio de grasa como porcentaje del peso fresco fueron en su orden P2>P1>C+>C-. Similarmente, los filetes de los grupos con mayor promedio de proteína como porcentaje del peso fresco fueron en su orden P2>P1>C->C+.

El valor nutricional del grupo de filetes de trucha tratados con la dieta C+ reportados en este estudio, es consistente con otros reportes hechos en truchas suplementadas con astaxantina sintética. Cuando se incluye astaxantina sintética de distintas casas comerciales en una concentración de 100 mg kg⁻¹ durante un periodo de 8 semanas, los filetes de trucha no presentan diferencias en su composición proximal, obteniendo rangos de 76,1-76,6 % de humedad, 19,4-20,4 % de proteína, 1,3-1,4 % de cenizas y 2,0-3,3 % de lípidos (Zhang et al., 2013). Contrariamente, se ha investigado el efecto de niveles crecientes de astaxantina sintética, en una concentración entre 0 y 100 mg kg⁻¹ de alimento, sobre la composición proximal del filete de alevinos de trucha. Se ha encontrado que a mayor concentración de astaxantina en la dieta, disminuye el nivel de proteína en el filete (Rahman, Khosravi, Chang, & Lee, 2016). Este último hallazgo podría explicar el comportamiento en los contenidos decrecientes de proteína descritos previamente: P2>P1>C->C+, y la razón por la cual, pese a que el grupo C+ tiene mayor GP que el grupo C-, el uso de astaxantina sintética en el grupo C+ pudo afectar negativamente el nivel de proteína en el filete.

Tabla 3-5 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre la composición de los filetes en el día 1 de refrigeración (base húmeda)

Parámetros	Tratamientos			
	C-	C+ (50 ppm)	P1 (25 ppm)	P2(50 ppm)
Humedad (%)	74,86 ^b ± 0,67	76,72 ^a ± 0,25	74,45 ^{bc} ± 0,45	73,69 ^c ± 0,50
Proteína (%)	22,27 ^b ± 0,05	20,11 ^c ± 0,14	22,45 ^b ± 0,03	23,16 ^a ± 0,06
Grasa (%)	5,45 ^c ± 0,07	5,53 ^c ± 0,03	5,99 ^b ± 0,10	6,47 ^a ± 0,07
Cenizas (%)	1,56 ^b ± 0,03	1,40 ^c ± 0,01	1,53 ^b ± 0,01	1,63 ^a ± 0,01

C-: control negativo, 1.4 mg carotenoides totales kg⁻¹; C+: control positivo, 50 mg astaxantina kg⁻¹; P1: Polen 1, 25 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹; P2: 50 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹. Promedio de los tratamientos en muestras evaluadas por triplicado ± desviación estándar (n=3 filetes). Promedios en la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes (LSD Tests) (p<0,05).

▪ Perfil lipídico

Se hizo una cuantificación de ácidos grasos mediante la integración de las curvas de cromatogramas obtenidos para cada grupo de filetes en el día 1 del periodo de refrigeración. La composición porcentual de ácidos grasos de los grupos de filetes suplementados con las dietas C-, C+, P1 y P2 se presenta en la **Tabla 3-6**.

La inclusión de extractos de carotenoides en la dieta de las truchas afectó algunos ácidos grasos del perfil lipídico de los filetes. Se presentaron diferencias significativas en el filete de los distintos grupos, en el contenido de algunos ácidos grasos como C14:0, C17:0, C24:1, C18:3 n-3 (p<0,05). No obstante, no se presentaron diferencias en el contenido total de ácidos grasos saturados, ácidos grasos mono insaturados y ácidos grasos poliénoicos n-3, incluyendo los ácidos grasos esenciales EPA y DHA, ácidos grasos insaturados, ácidos grasos poliinsaturados, ni tampoco en la relación de ácidos saturados: insaturados, ni la relación de ácidos grasos n-3:n-6 (p>0,05).

Los principales ácidos grasos presentes en los filetes fueron C16:0, C18:1 y C18:2 n-6. De acuerdo con otros reportes, los niveles de C20:5 n-3 (EPA), y C22:6 n-3 (DHA) obtenidos en este estudio fueron bajos, en comparación con el uso de otras fuentes de carotenoides. Yanar y colaboradores alimentaron truchas durante un periodo de 8 semanas con flor de caléndula, pimentón, y astaxantina sintética en concentraciones de 1,8%, 5% y 70 mg kg⁻¹ de dieta, respectivamente, encontrando niveles de C16:0 entre 16,3 y 18,7%; niveles de C18:1 entre 17,9 y 20,9 %; y niveles de C18:2 n-6 entre 5,15 y 5,71 %. El contenido de EPA osciló entre 5,73 % para pimentón y flor de caléndula, y 5,95 % para astaxantina sintética. Los niveles promedio de DHA fueron 14,6% para astaxantina sintética, y 14,4% para para pimentón y flor de caléndula (Yanar et al., 2007).

Igualmente, el estudio llevado a cabo por Roncarati y colaboradores con harina de krill en concentración de 90 mg kg^{-1} en truchas durante 8 semanas reporta un contenido de EPA de 4,8 % para astaxantina y 8,9 % para harina de krill, y DHA de 13,5 % para astaxantina y 16,4 % para harina de krill, en el filete (Roncarati et al., 2011).

En este estudio, se empleó aceite de girasol para vehiculizar la astaxantina sintética y los carotenoides extraídos del polen apícola. El aceite de girasol se compone principalmente de ácidos grasos monoinsaturados (64,3 %) y ácidos grasos poliinsaturados (28,6 %), que presentan cantidades pequeñas (0,1 %) de ácidos polienoicos n-3 y gran cantidad de ácido linoleico (C18:2n-6, 58-67 %). No se reportan grandes cantidades de EPA, DHA o DPA en el aceite de girasol. Los ácidos grasos polienoicos n-3 son comunes en pescados, y en algunos aceites vegetales como soya y canola (USDA, 2018).

Un estudio evaluó el valor nutricional del filete de truchas suplementadas durante 18 semanas con dietas en las cuales se adicionaron diferentes fuentes de lípidos: una dieta con inclusión de aceite de pescado con cantidades abundantes de C20:5 n-3 (EPA) y 22:6 n-3 (DHA); aceite de linaza con cantidades abundantes C18:3 n-3; y aceite de girasol con cantidades abundantes de C18:2 n-6. Se encontró que la reducción del contenido de aceite de pescado en el alimento para peces cultivados da como resultado una dilución del contenido de ácidos polienoicos n-3, especialmente EPA y DHA. No obstante, el tipo de aceite vegetal alternativo utilizado desempeña un papel notable en la calidad nutricional final del filete. El aceite de linaza proporcionó un buen contenido final de ácidos polienoicos n-3, mientras que el aceite de girasol tuvo un efecto negativo, no solo en el contenido total de ácidos n-3, sino también en la relación de ácidos n-3:n-6. (Turchini, Hermon, & Francis, 2018). Sin embargo, la implementación de aceites vegetales como el aceite de linaza reduce la concentración de micronutrientes como mercurio en el filete de las truchas (Turchini et al., 2018).

Se ha evaluado la sustitución total y parcial de aceite de pescado (OF) con aceites vegetales como aceite de semilla de algodón (CSO), aceite de canola (CO), mezclas (50% OF, 25% CSO y 25% CO) y (50% CSO y 50% CO), en la dieta de truchas durante 12 semanas y su efecto en el perfil lipídico del filete. Se encontró que es posible reemplazar totalmente el aceite de pescado con aceites vegetales en las dietas de las truchas sin afectar negativamente parámetros de crecimiento o la utilización del alimento. Además, los perfiles de ácidos grasos de las dietas con aceite vegetal se reflejan en los

perfiles de ácidos grasos de los filetes de los peces, caracterizados por alto contenido de ácidos linoléico y oleico, y bajo contenido de ácidos poliénoicos n-3. Como estrategia en fase de finalización, es posible con re-suplementación de OF en la dieta de las truchas durante los últimos 84 días previos al sacrificio, restaurar la composición de ácidos grasos énoicos n-3 en alevinos de trucha suplementados total o parcialmente con aceites vegetales y sus mezclas (Yıldız, Eroldoğan, Ofori-Mensah, Engin, & Baltacı, 2018).

Tabla 3-6 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre el perfil lipídico de los filetes en el día 1 de refrigeración (porcentaje de la fracción lipídica)

Perfil de ácidos grasos (AG), % del total de AG	Tratamientos			
	C-	C+ (50 ppm)	P1 (25 ppm)	P2(50 ppm)
Saturado (S)				
C14:0	1,24 ^a ± 0,08	1,07 ^b ± 0,01	1,16 ^{ab} ± 0,05	1,11 ^{ab} ± 0,07
C16:0	15,15 ± 1,22	14,49 ± 0,52	14,92 ± 0,48	14,47 ± 0,50
C17:0	0,20 ^b ± 0,02	0,16 ^b ± 0,01	0,29 ^a ± 0,05	0,15 ^b ± 0,01
C18:0	4,44 ± 0,11	4,65 ± 0,38	4,69 ± 0,06	5,41 ± 0,80
C20:0	1,30 ± 0,51	1,33 ± 0,33	1,60 ± 0,08	1,06 ± 0,38
C22:0	0,20 ± 0,02	0,28 ± 0,07	0,23 ± 0,00	0,24 ± 0,06
Total AGS	22,54 ± 0,90	21,98 ± 0,64	22,89 ± 0,46	22,43 ± 1,65
Mono insaturado (MI)				
C16:1	3,61 ± 0,15	2,39 ± 0,15	3,06 ± 0,73	3,00 ± 0,62
C17:1	0,27 ± 0,02	0,24 ± 0,08	0,22 ± 0,001	0,25 ± 0,01
C18:1	35,51 ± 1,19	33,65 ± 1,73	35,17 ± 1,37	35,72 ± 3,11
C20:1	0,51 ± 0,01	0,39 ± 0,11	0,24 ± 0,32	0,52 ± 0,16
C24:1	0,26 ^{ab} ± 0,00	0,30 ^a ± 0,06	0,26 ^{ab} ± 0,02	0,19 ^b ± 0,03
Total AGMI	40,15 ± 1,02	36,96 ± 1,48	38,95 ± 1,76	39,68 ± 3,87
Poliénoico (n-3)				
C18:3 n-3	1,51 ^a ± 0,18	1,03 ^b ± 0,07	1,23 ^{ab} ± 0,06	1,49 ^a ± 0,24
C20:5 n-3, EPA	1,50 ± 0,13	1,49 ± 0,17	1,58 ± 0,27	1,05 ± 0,19
C22:5 n-3, DPA	0,32 ± 0,07	0,28 ± 0,12	0,26 ± 0,03	0,23 ± 0,01
C22:6 n-3, DHA	3,53 ± 0,61	5,13 ± 1,5	4,28 ± 0,67	3,82 ± 2,24
Total AG n-3	6,86 ± 0,37	7,93 ± 1,85	7,36 ± 1,036	6,59 ± 2,18
Poliénoico (n-6)				
C18:2 n-6	25,25 ± 0,11	27,09 ± 1,83	25,34 ± 1,35	26,04 ± 0,78
C18:3 n-6	1,69 ± 0,25	1,86 ± 0,09	1,69 ± 0,11	1,57 ± 0,05
C20:2 n-6	0,19 ± 0,14	0,12 ± 0,08	0,09 ± 0,02	0,17 ± 0,08
C20:3 n-6	1,25 ± 0,47	1,47 ± 0,16	1,58 ± 0,17	1,15 ± 0,14
C20:4 n-6	1,42 ± 0,15	1,82 ± 0,71	1,45 ± 0,18	1,78 ± 0,70
C22:2 n-6	0,67 ± 0,10	0,76 ± 0,09	0,67 ± 0,10	0,57 ± 0,12
Total AG n-6	30,45 ^b ± 0,25	33,13 ^a ± 1,00	30,81 ^b ± 0,06	31,30 ^{ab} ± 0,04
Total AG insaturado (AGI)	77,46 ± 0,90	78,02 ± 0,64	77,115 ± 0,46	77,57 ± 1,65
Total AG poliinsaturado (AGPI)	37,31 ± 0,12	41,06 ± 0,84	38,17 ± 2,22	37,89 ± 2,22
Total AGS: Total AGI	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,03
AG n-3:AG n-6	0,23 ± 0,14	0,24 ± 0,06	0,24 ± 0,02	0,21 ± 0,07

C-: control negativo, 1.4 mg carotenoides totales kg-1; C+: control positivo, 50 mg astaxantina kg-1; P1: Polen 1, 25 mg equivalentes de β-caroteno kg-1; P2: 50 mg equivalentes de β-caroteno kg-1. Promedio de los tratamientos en muestras evaluadas por triplicado ± desviación estándar (n=3 filetes). Promedios en la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes (LSD Tests) (p<0,05).

3.4.2. Análisis microbiológico

Los resultados del análisis microbiológico evaluados durante el día 1 del periodo de refrigeración se muestran en la **Tabla 3-7**. No hubo recuentos de microorganismos indicadores que superaran los límites de calidad establecidos por la NTC 1443 (ICONTEC, 2009), y tampoco se detectó la presencia de microorganismos patógenos que pudieran afectar la salud humana. De acuerdo con los resultados de este análisis, se procedió de forma segura a realizar las pruebas sensoriales con ayuda de consumidores no entrenados.

Tabla 3-7 Calidad microbiológica de los grupos de filetes de trucha almacenados en el día 1 de refrigeración

Parámetros	Tratamientos				NTC 1443
	C-	C+ (50 ppm)	P1 (25 ppm)	P2(50 ppm)	
Coliformes totales (ufc g ⁻¹)	<10	<10	<10	<10	Máx 400
<i>E. coli</i> (ufc g ⁻¹)	<10	<10	<10	<10	Máx 400
<i>Staphylococcus coagulasa (+)</i> (ufc g ⁻¹)	<100	<100	<100	<100	Máx 1000
<i>Salmonella sp</i> (ufc g ⁻¹)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente
<i>Vibrio cholerae</i> (ufc g ⁻¹)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente

C-: control negativo, 1.4 mg carotenoides totales kg⁻¹; C+: control positivo, 50 mg astaxantina kg⁻¹; P1: Polen 1, 25 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹; P2: 50 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹.

3.4.3. Análisis sensorial

El panel de consumidores encuestados en este estudio fueron 60 personas con edades entre los 18 y 60 años de edad, de las cuales 35 fueron mujeres y 25 hombres. En la **Tabla 3-8** se presenta la variación en atributos sensoriales de filetes cocidos y frescos de los distintos tratamientos evaluados en una escala hedónica de cinco puntos.

No se presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de filetes cocidos en parámetros como olor, sabor, textura, y aceptación en general ($p > 0,05$). De acuerdo con la búsqueda realizada, no se hallaron reportes sobre el uso de polen apícola en alimentación de peces y su evaluación en parámetros sensoriales como el color, aroma, sabor, o textura.

No obstante, un estudio evaluó el uso de polen apícola seco, en concentraciones de 1.000, 1.500, 2.500, 3.500, y 4.500 mg kg⁻¹ de alimento, en la suplementación de pollos de engorde y su efecto en atributos sensoriales como el aroma, sabor, y jugosidad de la carne. El polen apícola tiene un efecto positivo sobre el sabor, aroma, y la jugosidad, en porciones como la pechuga y el perril, en comparación con el tratamiento control ($p < 0,05$). La ternura de la carne no se ve afectada por la adición de polen a la dieta de

los pollos, y durante la cocción, no se ven afectados parámetros como la capacidad de retención de agua, (Haščík, Garlík, Bobko, & Kročko, 2013).

También, se han estudiado el aroma, sabor y la aceptabilidad del color de filetes de truchas alimentadas con flor de caléndula (*Tagetes erecta*), pimentón (*Capsicum annum*) y astaxantina sintética, en una concentración de 70 mg kg⁻¹ de alimento, en comparación con una dieta sin adición de carotenoides, en truchas con peso inicial de 120,51 ± 0,75 g durante 8 semanas. Los filetes frescos de truchas suplementadas con astaxantina sintética tuvieron (p<0,05) puntuaciones de aceptabilidad del color mayores que los otros tres grupos. La inclusión de carotenoides tuvo efecto significativo en el aroma y el sabor de los filetes cocidos de trucha arco iris. Los menores puntajes para estos parámetros lo obtuvieron los filetes del grupo de truchas suplementadas con la dieta sin adición de carotenoides (p<0,05). Las puntuaciones de los otros tres grupos fueron similares (p>0,05) (Yanar et al., 2007).

Por otra parte, en el presente estudio los tratamientos exhibieron diferencias significativas en los puntajes de aceptabilidad del color de los filetes frescos. Como se aprecia en la **Tabla 3-8**, los filetes frescos del grupo C+ obtuvieron puntuaciones de color significativamente mayores en comparación con los otros tres grupos (p<0,05).

En el estudio llevado a cabo por Yanar y colaboradores, los consumidores prefirieron el filete fresco de trucha de color rojo obtenido a partir de truchas suplementadas con astaxantina sintética, en comparación con un filete sin pigmentación obtenido a partir de truchas sin suplemento de carotenoides, y un filete con tonalidades amarillas ocasionadas por la inclusión de flor de caléndula en la dieta de las truchas (Yanar et al., 2007).

Uno de los motivos por los cuales los filetes del grupo de truchas suplementadas con las dietas C-, P1 y P2, obtuvieron una mediana de '3' ('Ni me gusta ni me disgusta') entre los consumidores, en comparación con los filetes del grupo de truchas suplementadas con la dieta C+ '5' ('Me gusta mucho'), es debido a que el color del filete fresco fue pálido, ver **Figura 5-1**, lo cual es contrario con la preferencia y aceptación general de los consumidores, para este tipo de especies. La inclusión de carotenoides tuvo efecto significativo en las puntuaciones de aceptabilidad del color, lo que sugiere que los

consumidores no entrenados percibieron claramente las diferencias aparentes de color que motivaron su valoración (Yanar et al., 2007). De acuerdo con el análisis *post hoc*, los consumidores no percibieron diferencias en el color de los filetes frescos de los grupos C, P1 y P2 ($p>0.05$).

Tabla 3-8 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre atributos sensoriales del filete en el día 7 de refrigeración

Parámetro	Tratamientos				<i>(p-value)</i>
	C-	C+ (50 ppm)	P1 (25 ppm)	P2(50 ppm)	
Aroma	3	4	3	4	0,3107
Sabor	4	4	3	3	0,2841
Textura	4	4	4	4	0,1523
Color	3 ^b	5 ^a	3 ^b	3 ^b	<0,01*

C-: control negativo, 1,4 mg carotenoides totales kg^{-1} ; C+: control positivo, 50 mg astaxantina kg^{-1} ; P1: Polen 1, 25 mg equivalentes de β -caroteno kg^{-1} ; P2: 50 mg equivalentes de β -caroteno kg^{-1} . Dentro de cada parámetro se presenta la mediana. *Mediana en la misma fila con diferente letra es significativamente diferente (prueba *post hoc*), $p<0,05$ es significativamente diferente (Kruskal Wallis Tests).

■ Color y contenido de carotenoides totales (CT)

En la **Tabla 3-9** se presenta la variación en los parámetros de color y la concentración de CT en los filetes de los distintos grupos.

El valor L^* del grupo C- fue significativamente mayor que el de los grupos C+, P1 y P2 ($p<0,05$); los grupos P1 y P2 no presentaron diferencias en este parámetro ($p>0,05$). A su vez, los grupos P1 y P2 obtuvieron valores de L^* significativamente mayores que el grupo C+ ($p<0,05$). El valor de escala rojo/verde superficial a^* de los filetes del grupo C+, fue significativamente mayor que los otros grupos ($p<0,05$); el valor a^* de los grupos P1 y P2 fue significativamente mayor que el valor del grupo C- ($p<0,05$). Los grupos P1 y P2 no presentaron diferencias en este parámetro ($p>0,05$). El valor de escala amarillo/azul superficial b^* de los filetes del grupo C+, fue significativamente mayor que los valores de los grupos C-, P1 y P2 ($p<0,05$). El valor b^* del grupo P2 fue superior al valor b^* de los grupos C- y P1 ($p<0,05$). Los grupos C- y P1 no presentaron diferencias en este parámetro ($p>0,05$).

Como se aprecia en la **Figura 5-1** y como se muestra en la **Tabla 3-9**, los filetes del grupo C- no alcanzaron el puntaje mínimo de la escala colorimétrica de 20 puntos de la escala SalmoFan™. El puntaje de los filetes del grupo C+ fue significativamente mayor que el valor de los grupos P1 y P2 ($p<0,05$). El puntaje obtenido en los filetes de los

grupos P1 y P2 fue similar ($p < 0,05$). Los resultados hallados en este estudio para el grupo C+, consistente con el valor en la escala SalmoFan™ reportado por Zhang y colaboradores, quienes hicieron una inclusión de 100 mg kg^{-1} de astaxantina sintética en la dieta de truchas con peso inicial de $52,07 \text{ g}$ durante 10 semanas (Zhang et al., 2013). Al evaluar una concentración de 90 mg kg^{-1} de carotenoides a partir de harina de krill (*Euphasia superba*) o astaxantina sintética en alimentación de truchas durante 8 semanas, Roncarati y colaboradores reportan para el filete obtenido de los peces suplementados con harina de krill un valor de 27,7 puntos y para astaxantina de 30,8 puntos en la escala en la escala SalmoFan™ (Roncarati et al., 2011).

Tabla 3-9 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre el color y contenido de carotenoides de los filetes en el día 1 de refrigeración

Parámetro	Tratamientos			
	C-	C+ (50 ppm)	P1 (25 ppm)	P2(50 ppm)
L^*	$58,33^a \pm 3,22$	$46,29^c \pm 0,84$	$51,67^b \pm 3,28$	$51,58^b \pm 1,86$
a^*	$-0,87^c \pm 0,53$	$4,81^a \pm 1,00$	$0,57^b \pm 0,39$	$1,10^b \pm 0,56$
b^*	$6,41^{bc} \pm 1,35$	$9,58^a \pm 0,78$	$5,00^c \pm 0,93$	$7,37^b \pm 1,18$
SalmoFan™	<i>n.d.</i>	$25,70^a \pm 0,60$	$20,33^b \pm 0,60$	$21,00^b \pm 0,01$
CT (mg kg^{-1} filete fresco)	$0,31^d \pm 0,01$	$1,62^a \pm 0,03$	$0,50^c \pm 0,02$	$0,60^b \pm 0,02$

C-: control negativo, $1,4 \text{ mg}$ carotenoides totales kg^{-1} ; C+: control positivo, 50 mg astaxantina kg^{-1} ; P1: Polen 1, 25 mg equivalentes de β -caroteno kg^{-1} ; P2: 50 mg equivalentes de β -caroteno kg^{-1} . Dentro de cada parámetro y día de almacenamiento, promedio de los tratamientos en muestras evaluadas por triplicado \pm desviación estándar. Promedios en la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes (LSD Tests) ($p < 0,05$). *n.d.* no detectado.

El valor de CT de los filetes del grupo C-, fue significativamente menor que los otros grupos ($p < 0,05$). El valor CT de los filetes de trucha del grupo C+ fue significativamente mayor que el de los otros grupos, seguido por el grupo P2 y el grupo P1, respectivamente ($p < 0,05$). El valor de CT de los filetes de trucha del grupo P2 fue significativamente mayor que el del grupo P1 ($p < 0,05$).

Los valores bajos de L^* en los filetes se deben al aumento en la concentración de pigmento de la carne proporcionada por la deposición de carotenoides en el músculo del pez (Safari et al., 2015). El aumento en los valores de a^* y b^* están directamente relacionados con la concentración de carotenoides en el filete, especialmente xantofilas como astaxantina y cantaxantina, ligadas de forma libre en enlaces hidrofílicos en la actomiosina del músculo blanco (Storebakken & No, 1992; Teimouri et al., 2013b).

Los resultados hallados en este estudio son consistentes con otros reportes, en los que se han evaluado fuentes naturales y sintéticas de carotenoides sobre la pigmentación del filete de trucha. Un estudio evaluó el efecto de dos tipos de aceite, aceite de pescado y aceite de oliva, para vehiculizar carotenoides a partir del alga verde *Haematococcus pluvialis*, y/o astaxantina sintética, en una concentración de CT de 80 mg kg⁻¹ de alimento, sobre el color y la concentración de carotenoides totales en el filete, en truchas con peso inicial de 150 g, suplementadas durante 6 semanas. Se encontró que se obtienen diferencias significativas en parámetros de color como L*, a*, b*, H*, y C*, y en el contenido de CT. El grupo de truchas suplementadas con astaxantina sintética obtuvo rangos para L* entre 37,98 y 38,50; a* entre 6,67 y 7,21; b* entre 10,89 y 10,99; H* entre 56,54 y 58,63; C* entre 12,79 y 13,17, y una concentración de CT en el filete fresco de 20 mg kg⁻¹ de carne; mientras que el uso de una fuente natural como *Haematococcus pluvialis* obtuvo rangos para L* entre 40,16 y 41,33; a* entre 3,95 y 4,65; b* entre 5,88 y 7,25; H* entre 55,77 y 57,55; C* entre 7,13 y 8,63, y una concentración de CT en el filete fresco de 12 mg kg⁻¹ de carne. El uso del alga verde presenta resultados aceptables en la pigmentación del filete, pero su poder colorante es inferior en comparación con el uso de astaxantina sintética en el mismo nivel de inclusión en la dieta de los peces (Choubert et al., 2006).

Contrariamente, el uso de astaxantina sintética y/u oleorresina de pimentón (*Capsicum annuum*) han sido evaluados en una concentración de 80 y 120 mg de CT kg⁻¹ de alimento, en truchas con peso inicial de 150 ± 14 g durante un periodo de 6 semanas, encontrando diferencias significativas en el color y contenido de CT. El grupo de truchas suplementadas con astaxantina sintética obtuvieron promedios para L* de 51,6; a* de 9,1; b* 17,7; H* de 62,6; C* de 19,9, y una concentración en promedio de CT en el filete fresco de 7,1 mg kg⁻¹ de carne; mientras que el uso de una fuente natural como de pimentón (*Capsicum annuum*) obtuvo rangos para L* entre 46,8 y 54,7; a* entre 4,6 y 6,4; b* entre 11,0 y 18,6; H* entre 67,6 y 72,5; C* entre 12,0 y 19,7, y una concentración de CT en el filete fresco entre 5,6 y 6,3 mg kg⁻¹ de filete. La inclusión del pimentón (*Capsicum annuum*) en forma de oleorresina en la dieta de la trucha, permite obtener resultados similares del color del filete en comparación con el uso de astaxantina sintética (Ingle de la Mora et al., 2006).

En este estudio preliminar se alimentaron truchas por un periodo de 8 semanas y se hizo una inclusión de 25 mg kg⁻¹ en la dieta P1 y 50 mg kg⁻¹ en la dieta P2. A partir de la evaluación del color y el contenido de CT, se encuentra que las truchas suplementadas con extractos carotenoides presentes en las dietas P1 y P2 mostraron un color rosado pálido, ver página 86, detectable a nivel instrumental pero imperceptible para el ojo humano.

3.4.4. Estabilidad del filete

Los parámetros que se evaluaron en función del tiempo de refrigeración fueron pH, N-BVT, VP, y SR-TBA.

- Nivel de pH

Como se muestra en la **Tabla 3-10**, los grupos obtuvieron valores de pH inicial y final de 6,41 y 6,69 para C-, 6,38 y 6,67 para C+, 6,36 y 6,62 para P1, y 6,41 y 6,64 para P2, respectivamente. Como puede verse en esta tabla, en el día 1 los valores de pH de los grupos C+ y P1 fueron significativamente más bajos que los grupos C- y P2 ($p < 0,05$). Entre los grupos C+ y P1 no presentaron diferencias en este parámetro, ni tampoco entre los grupos C- y P2 ($p < 0,05$). Durante los días 7, 14 y 21, los valores de pH del grupo P2 fue significativamente menores que el de los otros grupos ($p < 0,05$). Al final de 21 días, el valor de pH del grupo C- fue significativamente mayor que el de los otros grupos ($p < 0,05$). Durante los primeros 14 días, el pH de los grupos C-, P1, y P2 se mantuvo relativamente estable, en comparación con el comportamiento de los valores de pH del grupo C+.

Una vez el animal es sacrificado, se produce un descenso rápido e inesperado de oxígeno y nutrientes en todas las células del organismo, lo que lleva a que el músculo comience a procesar las reservas de glucógeno para sintetizar energía, trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés), produciéndose un cambio del metabolismo aeróbico por metabolismo anaeróbico. A medida que se agotan las reservas para la producción de ATP, se genera fosfato inorgánico, lo que estimula en las células hipóxicas la degradación de glucosa a piruvato. Esta reacción conlleva a la formación y acumulación de ácido láctico, que es el principal responsable de la caída del pH celular (Quali, 1992).

En el presente estudio, no se tiene claro el motivo por el cual se encontraron diferencias de pH en los filetes de los distintos grupos de truchas durante el día 1 de refrigeración. Posiblemente, pudo deberse al manejo que tuvieron los peces en finca. Durante el desarrollo de este proyecto, los peces fueron sacrificados durante la mañana del 4 de febrero de 2018, de las cuales se requirieron aproximadamente 5 horas para terminar el proceso. Los peces fueron sacados de sus jaulas y puestos en un balde con agua y hielo, en confinamiento durante un periodo de 15 minutos aproximadamente. Una vez se evidenció nado lateral, se procedió al sacrificio. Se tuvo en cuenta el siguiente criterio: sacrificar los animales de las jaulas de un mismo tratamiento, empezando en orden C-, C+, P1 y P2, por lo cual, momentos de espera en los eslabones del sacrificio pudieron afectar el comportamiento de pH.

Se han estudiado distintos métodos y momentos del sacrificio de truchas, y su relación con parámetros en la sangre de los peces y su relación con el pH durante el periodo de refrigeración del filete. Los resultados sugieren que, en la mayoría de los casos, los niveles de cortisol, lactato y niveles de CO₂ en sangre aumentaron, mientras que el pH y O₂ en sangre disminuyeron con el número de etapas agregadas al proceso de sacrificio. Se encuentra que un aumento en los niveles de CO₂ en la sangre, los niveles de pH disminuyeron significativamente de $7,6 \pm 0,02$ en el estanque a $7,5 \pm 0,02$ en el transporte, y entre 7,3 y 7,4 en respuesta al bombeo después del hacinamiento (Merkin, Gjerstad, Nortvedt, Roth, & Dahl-Paulsen, 2010). El método de sacrificio también influye en los niveles de pH durante el almacenamiento del filete.

De acuerdo con la búsqueda realizada, no se hallaron reportes sobre el uso de polen apícola en alimentación de peces y su evaluación en el pH. Se ha evaluado el uso de polen apícola seco, en concentraciones de 1.000, 1.500, 2.500, 3.500, y 4.500 mg kg⁻¹ de alimento, en la suplementación de pollos de engorde y su efecto en el pH de la carne. Se encontró que los valores de pH del perril y la pechuga, de los pollos suplementados con polen, fueron mayores y se mantuvieron estables al final de las 24 h, excepto en dosis de 1500 y 2500 mg kg⁻¹ de alimento ($p < 0,05$) (Haščík, Elimam, Garlík, Bobk, & Čuboň, 2013). De igual forma, el uso de polen apícola y probióticos, evaluados en conjunto en diferentes concentraciones, como suplemento en alimentación de pollos de 45 días de la estirpe 'Cobb 500', sobre en el valor de pH del perril durante 24 h en congelamiento. Se encontró que los pollos alimentados con 1.000 mg de polen y 3.000 mg de probióticos

tuvieron un pH mayor pero más estable en el pernil a las 24 h de almacenamiento, en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) (Adhikari et al., 2017).

Se ha evaluado el uso de carotenoides a partir de algas rojas (*Rhodophyta*) *P. palmata* en concentraciones de 0, 5, 10, y 15 % de inclusión en la alimentación de salmón del atlántico (*S. salar*) con peso inicial promedio de 170,4 g durante 16 semanas, y el efecto sobre el pH. El pH de los filetes de salmón fresco osciló entre 6,27 y 6,33 durante el período de almacenamiento de 15 días y no se vio afectado por la adición de *P. palmata* en la dieta (Moroney et al., 2015).

Durante el período de almacenamiento, los valores de pH de los filetes de trucha aumentaron ($p < 0,05$). Este comportamiento podría explicarse debido a la degradación de proteínas que tiene lugar durante el almacenamiento, producto de actividad enzimática y microbiana, que liberan péptidos, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados que tienen una reacción básica y aumentan el pH (Alçiçek, 2011). El descenso gradual del pH es un activador de algunas de las proteínas que intervienen en la desarticulación de la estructura de las proteínas musculares o proteínas que participan en el proceso de muerte celular programada, y también de la inactivación de proteínas que intervienen en el mantenimiento y metabolismo de la fibra muscular (Quali, 1992). Ningún grupo de truchas superó el límite máximo permitido por la legislación colombiana vigente, incluso en el día 21, en términos de calidad según la NTC 1443, cuyo rango establecido de pH es (5,8-6,8) (ICONTEC, 2009).

Tabla 3-10 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides durante 8 semanas sobre la estabilidad del filete almacenado hasta 21 días

Parámetro	Tratamientos			
	C-	C+ (50 ppm)	P1 (25 ppm)	P2(50 ppm)
pH				
Día 1	6,41 ^a ± 0,02	6,38 ^b ± 0,01	6,36 ^b ± 0,01	6,41 ^a ± 0,02
Día 7	6,51 ^b ± 0,01	6,60 ^a ± 0,08	6,50 ^{bc} ± 0,01	6,43 ^c ± 0,01
Día 14	6,55 ^a ± 0,02	6,52 ^{ab} ± 0,01	6,50 ^b ± 0,03	6,46 ^c ± 0,01
Día 21	6,69 ^a ± 0,01	6,67 ^b ± 0,01	6,62 ^d ± 0,01	6,64 ^c ± 0,01
N-BVT, mg N·100g ⁻¹				
Día 1	20,60 ^d ± 0,20	25,60 ^a ± 0,30	21,30 ^c ± 0,20	22,70 ^b ± 0,20
Día 7	21,30 ^c ± 0,30	25,93 ^a ± 1,62	22,70 ^{bc} ± 0,30	23,40 ^b ± 0,40
Día 14	21,30 ^d ± 0,10	25,60 ^b ± 0,20	27,00 ^a ± 0,10	24,20 ^c ± 0,10
Día 21	34,10 ^a ± 0,20	32,70 ^b ± 0,20	29,80 ^d ± 0,30	31,30 ^c ± 0,40
VP, mEq O ₂ ·kg ⁻¹				
Día 1	1,90 ^a ± 0,09	2,00 ^a ± 0,06	1,48 ^b ± 0,05	1,50 ^b ± 0,17
Día 7	1,63 ^a ± 0,09	1,74 ^a ± 0,04	1,36 ^b ± 0,06	1,64 ^a ± 0,08
Día 14	2,34 ^a ± 0,18	2,26 ^a ± 0,11	1,57 ^c ± 0,12	1,99 ^b ± 0,04
Día 21	3,67 ^a ± 0,31	2,75 ^b ± 0,09	1,94 ^c ± 0,06	2,25 ^c ± 0,13
SR-TBA, mg MDA·kg ⁻¹				
Día 1	0,10 ^a ± 0,01	0,06 ^c ± 0,01	0,10 ^a ± 0,01	0,08 ^b ± 0,01
Día 7	0,19 ^a ± 0,01	0,12 ^b ± 0,01	0,17 ^a ± 0,01	0,09 ^c ± 0,01
Día 14	0,28 ^a ± 0,01	0,24 ^b ± 0,02	0,19 ^c ± 0,01	0,09 ^d ± 0,01
Día 21	0,35 ^a ± 0,01	0,33 ^a ± 0,01	0,23 ^b ± 0,01	0,14 ^c ± 0,01

C-: control negativo, 1,4 mg carotenoides totales kg⁻¹; C+: control positivo, 50 mg astaxantina kg⁻¹; P1: Polen 1, 25 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹; P2: 50 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹. Dentro de cada parámetro y día de almacenamiento, promedio de los tratamientos en muestras evaluadas por triplicado ± desviación estándar. Promedios en la misma fila con diferente letra minúscula son significativamente diferentes (LSD Tests) (p<0,05).

▪ Nitrógeno básico volátil total (N-BVT)

Los valores de N-BVT de los filetes de trucha se muestran en la **Tabla 3-10**. Los grupos obtuvieron valores iniciales y finales de 20,60 y 34,10 para C-, 25,60 y 32,70 para C+, 21,30 y 29,80 para P1, y 22,70 y 31,30 para P2, respectivamente. En el día 21, en promedio el valor de N-BVT del grupo C- fue significativamente más alto que los valores presentados por los otros grupos, seguidos por C+, P2 y P1 (p<0,05). Al igual que en el caso del pH, los valores de N-BVT aumentaron en todos los grupos durante el periodo de refrigeración (p<0,05), debido quizás a las mismas razones de descomposición de proteínas, actividad enzimática y de microorganismos que se da en los filetes, una vez el

pH disminuye. De acuerdo con la NTC 1443, en Colombia el límite máximo de N-BVT es 30 mg N 100 g⁻¹ (ICONTEC, 2009). En la clasificación de calidad de pescado y productos pesqueros, se propone un valor de 35 mg N 100 g⁻¹ como el "límite de aceptabilidad" (Özyurt, Özkütük, Şimşek, & Yeşilsu, 2015). En el presente estudio, todos los grupos cumplen este parámetro los días 1, 7 y 14. En el día 21, los grupos C- y C+ no cumplen la legislación colombiana vigente, mientras que los grupos P1 y P2 se encuentran por debajo o cerca de este límite, y por debajo del límite de aceptabilidad. En el presente estudio, al final del periodo de refrigeración evaluado se evidencia que la adición de carotenoides en la dieta de la trucha fue efectiva para controlar los valores de N-BVT de los filetes.

Estos resultados son consistentes con otros estudios. Se ha demostrado que el suministro de carotenoides como antioxidantes prolonga la vida útil del pescado en refrigeración (Keleştemur & Çoban, 2016). Esto es debido a un crecimiento bacteriano lento o a una capacidad disminuida de las bacterias para la desaminación oxidativa de compuestos nitrogenados no proteicos o ambos, debido al efecto de los carotenoides y compuestos antioxidantes (Mahdi, Rezaei, Hadi, Mohamad, & Hosseini, 2010).

▪ Valor de peróxidos (VP)

Los niveles de VP como productos primarios de la oxidación lipídica se muestran en la **Tabla 3-10**. Los grupos obtuvieron valores VP iniciales y finales de 1,90 y 3,67 para C-, 2,00 y 2,75 para C+, 1,48 y 1,94 para P1, y 1,50 y 2,25 para P2. Los días 1, 7, 14 y 21 se presentaron diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$). Durante el periodo de refrigeración, se observó una disminución en el día 7, que obedece a la descomposición de hidroperóxidos en metabolitos secundarios. Estos resultados son consistentes con los datos encontrados para la trucha arco iris durante el periodo de almacenamiento en frío o en congelamiento (Özyurt et al., 2015). En el día 14 y 21, los filetes de los grupos P1 y P2 obtuvieron los valores más bajos de N-BVT ($p < 0,05$). Estos valores son consistentes con los valores de VP en filetes de trucha refrigerados, reportado hasta el día 14 por Özyurt y colaboradores, 1,39 -1,82 mEq O₂ kg⁻¹ (Özyurt et al., 2015).

De acuerdo con la búsqueda realizada, no se encontraron reportes del uso de polen apícola en alimentación de peces y su efecto sobre el VP en el filete. El AVP contiene compuestos liposolubles del polen, y probablemente contiene altos niveles de vitamina E.

Se ha demostrado que el aumento de los niveles de a-tocoferol en las dietas de la trucha puede ralentizar el nivel de oxidación de lípidos en los filetes de pescado durante el almacenamiento en refrigeración (Kamireddy et al., 2011; Yildiz & Gün, 2006). El a-tocoferol actúa durante la fase de iniciación de la oxidación lipídica al actuar como secuestrante de las especies químicas oxidantes. Gracias a esta capacidad, los antioxidantes pueden desempeñar un papel central para limitar los efectos perjudiciales del estrés (antes del sacrificio o en el sacrificio) y el almacenamiento en filetes frescos (Secci & Parisi, 2016).

▪ Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SR-TBA)

El análisis de SR-TBA se utiliza para determinar los productos secundarios de la oxidación lipídica que provocan cambios desagradables de sabor, color y olor, y contribuyen al deterioro de la textura en los productos pesqueros (Özyurt et al., 2015). Los niveles de SR-TBA se muestran en la **Tabla 3-10**. Los grupos obtuvieron valores iniciales y finales de SR-TBA de 0,10 y 0,35 para C-, 0,06 y 0,33 para C+, 0,10 y 0,23 para P1, y 0,09 y 0,14 para P2. En los días 14 y 21, los valores de TBA-RS de los grupos P1 y P2 fueron significativamente más bajos que los valores obtenidos en los grupos C- y C+ ($p < 0,05$). Estos valores son consistentes con los valores de RS-TBA (0,08 a 0,24) reportados por Mahdi y colaboradores (Mahdi et al., 2010). Los valores de RS-TBA encontrados en este estudio, son más bajos que los valores reportados por Yildiz y colaboradores durante 9 días de almacenamiento en refrigeración (2,2 y 16,2 mg MDA kg^{-1}) de truchas suplementadas con niveles crecientes de vitamina E (Yildiz & Gün, 2006), y los valores reportados por Ehsani y colaboradores durante 12 días de almacenamiento en refrigeración (0,4 y 4,4 mg de MDA kg^{-1}) en truchas suplementadas con licopeno antes y después del sacrificio (Ehsani, Jasour, & Agh, 2018), así como los resultados hallados hasta el día 14 en refrigeración hecho por Özyurt y colaboradores, 0,96 y 1,02 mg de MDA kg^{-1} (Özyurt et al., 2015).

Ibrahim Sallam ha propuesto que el nivel máximo de aceptabilidad para SR-TBA en pescado (congelado, refrigerado o almacenado con hielo) es de 5 mg MDA kg^{-1} , mientras que el pescado puede ser consumido hasta un nivel de 8 mg MDA kg^{-1} , citado por (Mahdi et al., 2010). En este estudio, aunque se observó un ligero aumento durante el periodo de refrigeración en los valores de RS-TBA en todos los grupos, los valores de SR-TBA

fueron inferiores a estos límites propuestos durante el período de almacenamiento de 21 días, probablemente debido a la tardía oxidación lipídica primaria.

De acuerdo con la búsqueda realizada, no se hallaron reportes sobre el uso de polen apícola en alimentación de trucha arco iris y su efecto sobre la oxidación lipídica del filete.

Se ha demostrado que el suministro de propóleo en una concentración entre 10 y 30 g kg⁻¹ de alimento en comparación con el suministro de vitamina E en una concentración de 60 mg kg⁻¹ de alimento, y una dieta sin adición de antioxidantes en truchas con peso inicial de 42,27 ± 2,14 g durante 12 semanas, disminuyen los niveles de MDA en el filete de las truchas, causados por estrés hipóxico generado por bajas tasas de flujo de agua (0,9 y 2,1 l min⁻¹), en comparación de una dieta sin adición de carotenoides (Keleştemur & Seven, 2013).

3.4.5. Análisis global de los datos durante el periodo de refrigeración

Se aplicó un PCA, para verificar la similitud entre tratamientos según parámetros como CT, color (L*, a* y b*, C*, y H*), pH, N-BVT, VP, y SR-TBA durante el tiempo (21 días en refrigeración). El resultado del PCA muestra que los dos primeros componentes principales explican el 81,5 % de la varianza total de los datos, como se muestra en la **Figura 3-4**.

El valor propio y la varianza del componente '1' fueron 4,76 y 47,63 %, respectivamente. El valor propio y la varianza del componente '2' fueron 3,39 y 33,87 %, respectivamente. Los grupos de truchas se diferenciaron en los días 1, 7, 14, y 21, en el primer componente principal (47,63 %), que tiene el mayor poder descriptivo de las muestras durante el periodo de refrigeración en la mayoría de parámetros. Los filetes de trucha del grupo C+, en los días 1, 7, 14, y 21, mantuvo los mayores valores para variables como CT, a* y b*, C*, y los menores valores para L* y H*. Los filetes de los grupos P1 y P2, tuvieron valores positivos en estos parámetros durante el periodo de refrigeración. Los filetes del grupo C-, obtuvieron valores negativos en estos parámetros durante los primeros 14 días del periodo de refrigeración. En todos los grupos, durante los días 14 y 21, se evidenció un aumento en los valores de pH, N-BVT, VP, y SR-TBA, exhibiendo los mayores extremos los filetes del grupo C-.

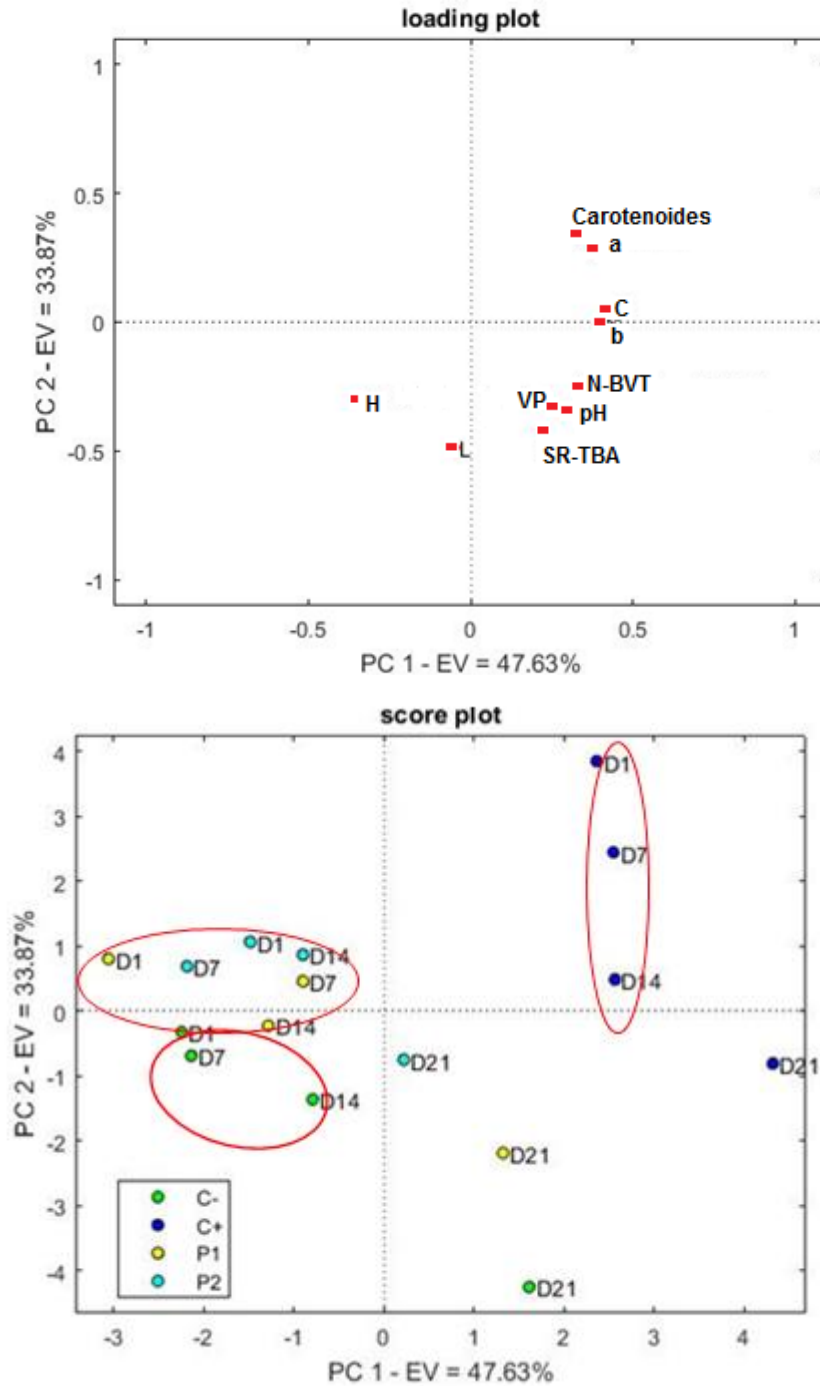


Figura 3-4 Score y Loading plot obtenidos mediante PCA de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre parámetros en los filetes evaluados en los días 1, 7, 14 y 21 en refrigeración.

C-: control negativo (verde), 1,4 mg carotenoides totales kg^{-1} ; C+: control positivo (azul oscuro) 50 mg astaxantina kg^{-1} ; P1: Polen 1 (amarillo), 25 mg equivalentes de β -caroteno kg^{-1} ; P2: polen 2 (azul claro), 50 mg equivalentes de β -caroteno kg^{-1} . CT: carotenoides totales; color: $L^*a^*b^*H^*C^*$; pH; N-BVT: nitrógeno básico volátil total; VP: valor de peróxidos; SR-TBA: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

El polen seleccionado empleado en la realización de este proyecto exhibe tipos polínicos dominantes de *Raphanus sativus*, *Eucalyptus globulus*, *Monocotiledónea*, *Salix humboldtiana*, *Asteraceae* e *Hypochaeris radicata*, asociados a un color en la escala Pantone®. Los tipos polínicos secundarios encontrados son *T. repens* y *S. humboldtiana*, y *T. repens* y *T. pratense*, donde el color resultante es una mezcla de distintos tipos polínicos.

En este estudio, el contenido de carotenoides totales en muestras de polen seco evaluadas mediante espectrofotometría fue de $1.169,40 \pm 4,23$ mg de β -caroteno equivalente kg⁻¹ de polen seco. El contenido de carotenoides totales del aceite vegetal pigmentado utilizado en este estudio, relación 0,25:1, evaluadas mediante espectrofotometría fue de $278,72 \pm 7,81$ mg de β -caroteno equivalente l⁻¹ de aceite.

Durante el experimento, en la fase de cultivo no se presentó mortalidad. Los grupos de truchas no presentaron diferencias en parámetros de desempeño como ganancia de peso, ganancia de longitud, tasa de crecimiento específico, factor de condición, e índices corporales como el índice hepatosomático. Se encontraron diferencias significativas en el índice vicerosomático de los distintos grupos de peces. No obstante, no se presenta un patrón en el comportamiento en los datos, por lo cual, en el presente estudio no es claro cómo los tratamientos evaluados afectan este parámetro en la población de truchas.

Se aplicó un análisis de componentes principales para verificar la similitud entre tratamientos según parámetros de desempeño durante el periodo de cultivo. El resultado muestra que los dos primeros componentes principales explican el 95,47 % de la varianza total de los datos, mostrando que, en promedio, los grupos de truchas crecieron de forma diferente a partir del día 28 de suplementación, mostrando valores altos en

parámetros como ganancia de peso, ganancia de longitud, y tasa de crecimiento específico, en grupos de truchas suplementadas con carotenoides.

Durante el periodo de refrigeración, se presentaron diferencias significativas en la composición del filete de los diferentes grupos. Este estudio aporta una serie de evidencias sobre las características nutricionales de los filetes de trucha arco iris cultivados en granja y alimentados con una dieta basal con adición de astaxantina sintética o carotenoides del polen, vehiculizados en aceite de girasol, que pueden resultar útiles para el sector acuícola, con respecto a las consideraciones de formulación de alimentos y los nuevos mercados.

De acuerdo con el análisis sensorial, los consumidores no percibieron diferencias en el color de los filetes frescos de los grupos 'control', 'polen uno' y 'polen dos'. Los filetes frescos del grupo de truchas suplementadas con astaxantina sintética obtuvieron puntuaciones de color significativamente mayores en comparación con los otros grupos. Las truchas que no recibieron carotenoides en su dieta no alcanzaron el puntaje mínimo en la escala SalmoFan™.

Adicionalmente, se aplicó un análisis de componentes principales según parámetros fisicoquímicos durante el periodo de refrigeración. El resultado muestra que los dos primeros componentes principales explican el 81,5 % de la varianza total de los datos. Los filetes de trucha del grupo suplementado con astaxantina sintética mantuvieron, en promedio, los mayores valores para variables de color ($L^*a^*b^*$) y contenido de carotenoides totales. Los filetes de los grupos suplementados con las dietas 'polen uno' y 'polen dos' exhibieron valores positivos en estos parámetros durante el periodo de refrigeración. Los filetes del grupo de truchas suplementadas con la dieta 'control negativo' mostraron los menores valores en estos parámetros.

En todos los grupos de filetes, durante los días 14 y 21, se evidenció un aumento en los valores de pH, nitrógeno básico volátil total, valor de peróxidos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Sin embargo, en todos los grupos estos valores se mantuvieron por debajo de los límites exigidos por las autoridades sanitarias hasta el día 14 del periodo de refrigeración.

Los valores en estos parámetros del grupo suplementado con la dieta 'control negativo', fueron mayores que los valores que registraron los grupos suplementados con carotenoides, mostrando la efectividad de estos últimos compuestos para retardar los efectos de la degradación del pescado.

4.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar la formulación y fabricación de las dietas de las truchas mediante la adición de diferentes combinaciones de inclusión del AVP, con el fin de evaluar, corroborar y ampliar los resultados obtenidos en este estudio en cuanto a la evaluación de parámetros de crecimiento, calidad y estabilidad del filete de truchas alimentadas con carotenoides naturales.

Se recomienda hacer una formulación combinada entre tratamientos sintéticos y naturales, con el fin de evaluar su grado de sinergia o antagonismo en las variables estudiadas.

5. Anexos

5.1. Anexo 1. Formato de prueba de aceptación para consumidores

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA)
Sede Bogotá



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

PANEL DE CONSUMIDORES DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

Nombre _____

Género M F Edad 18-25 25-40 40-60 Mayores de 60

Apreciado panelista, califique las muestras 342 y 658 de acuerdo a las siguientes características:

1. No me gusta nada
2. No me gusta
3. Ni me gusta ni me disgusta
4. Me gusta
5. Me gusta mucho

Formato de diligenciamiento de las muestras.

	Muestra XXX					Muestra XXX				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Aroma		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Textura		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Producto en general		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Usted compraría este producto? Si No Cuál?

¿Por qué?

5.2. Anexo 2. Metodología análisis microbiológico

Se evaluaron los parámetros microbiológicos establecidos en la normativa colombiana vigente (NTC 1443). Para la toma de muestras se siguió la metodología establecida en la NTC 4491-3. Se evaluó el recuento de *Staphylococcus aureus* (NTC 4779), *E. coli* (NTC 4458), *Salmonella* (NTC 4574), *Vibrio* (ISO 21872-1). Adicionalmente, se inocularon muestras de trucha de cada tratamiento en agar estándar para conteo de plato y se incuban a 30°C por 48 h y a 4°C por 10 días para determinar las cargas de mesófilos y sicrofilos, respectivamente. Se siguieron las metodologías descritas por (Holguín Hernández, 1998).

Dilución y homogeneización de la muestra

Se pesaron 11 g de filete en bolsas estériles y se agregaron a frascos estériles con 99 ml de agua peptonada (APE) al 0,1%. Posteriormente se agitan hasta obtener una mezcla homogénea. Se realizan diluciones seriadas en base 10 (hasta 10⁻³).

Recuento en placa de microorganismos sicrofilos

Se tomó una alícuota 1 ml de cada una de las diluciones en cajas de Petri estériles y se adicionaron 15 ml de agar tipo Agar Plate Count fundido y mantenido a una temperatura de 45°C mezclando el inóculo con el medio de cultivo adicionado. Una vez solidificado el medio de cultivo se invierten placas e incuban a una temperatura de 30 ± 2°C durante 48 h, y luego a 4 ± 2°C por 10 días. Se realizó el recuento de las UFC/g, teniendo en cuenta el factor de dilución y el intervalo establecido en la normativa para este tipo de microorganismos.

Recuento de *Staphylococcus aureus*

Se utilizó el método horizontal para el recuento de stafilococos coagulasa positiva. Se sembró 0.1 ml a partir de las diluciones 10⁻¹ y 10⁻² en Agar Baird Parker, se incubó a 37 ± 2 °C durante 48 h. Se consideraron sospechosas las colonias negras con halo claro alrededor. A las colonias sospechosas se les realizó la prueba de coagulasa sembrándolas en caldo BHI a 37 ± 2 °C durante 24 h. Se mezclaron 0.3 ml de caldo BHI con crecimiento y 0.3 de plasma de conejo en un tubo estéril, se incubó a 37 ± 2 °C

durante 6 h evaluando la presencia de coagulación. Luego, se realizó coloración de Gram para verificar la morfología de las células.

Determinación de *Salmonella Sp.*

Se agregaron 20 gramos de trucha en 225 ml de caldo lactosa y se incubó a 37 ± 2 °C durante 24 h. Se sembró 1 ml del caldo con crecimiento en dos tubos, uno con caldo tetrionato, otro con caldo selenito cistina, y se incubó a 37 ± 2 °C durante 24 h. Se sembró por agotamiento a partir de los dos tubos en agar XLD y SB.

Coliformes totales, y determinación de *Escherichia coli*

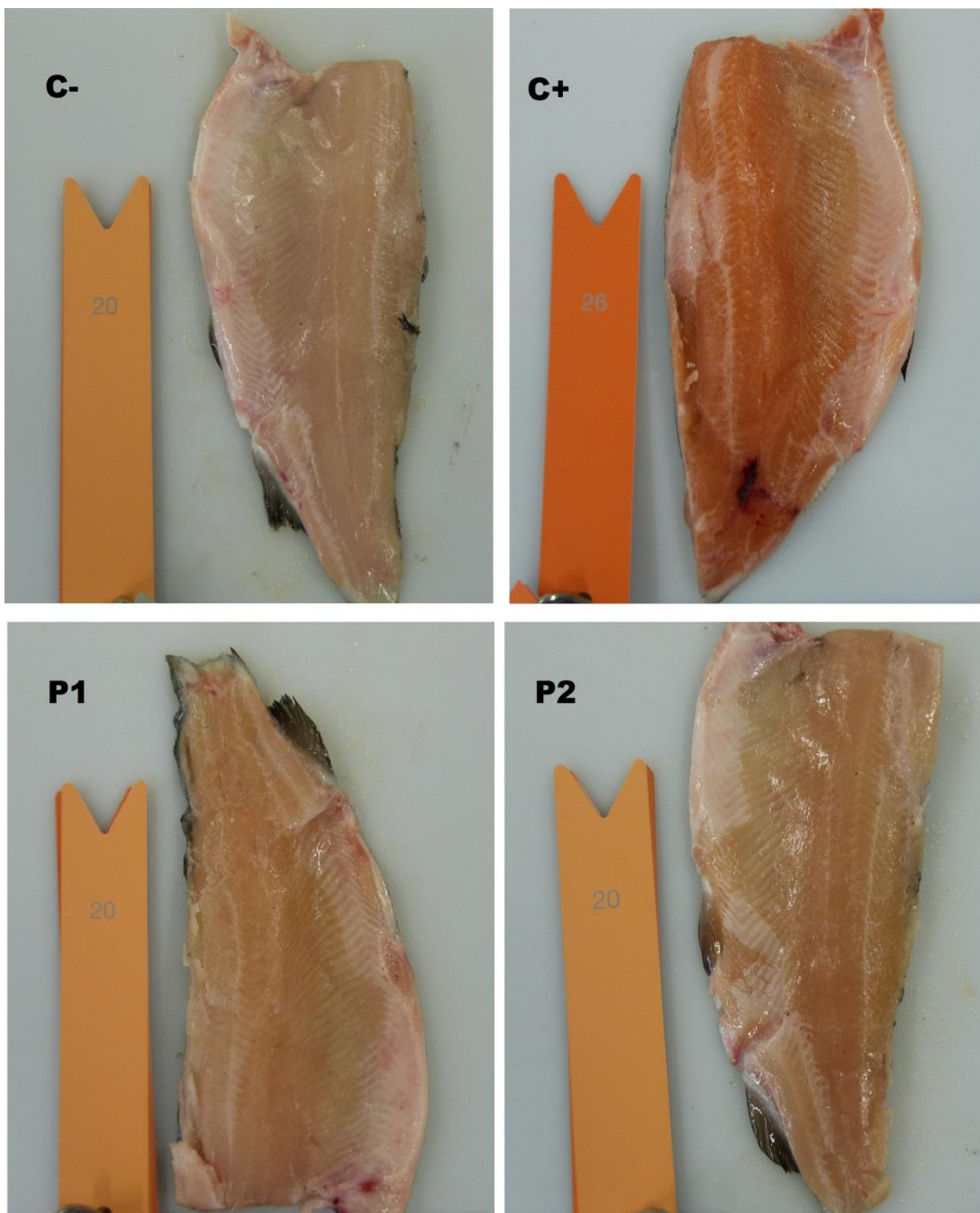
Se dosificó 1 ml de cada diluciones del homogenizado inicial en tubos con caldo lactosa Bilis Verde Brillante (2%), en series de tres tubos por dilución, y se incubaron a 37 ± 2 °C 2 días, verificando la ausencia de aire. Luego, se registraron los tubos con turbidez y producción de gas, para hacer la prueba confirmativa. La prueba confirmativa se hace sembrando por estría con un asa los tubos positivos en una placa de agar Eosina Azul de metileno (EMB) para determinar la presencia o no de *Escherichia coli*, incubando las placas a 37 ± 2 °C durante 2 días.

Determinación de *Vibrio cholerae*

El *V. cholerae* debe enriquecerse durante 6-8 h en APW a 35 ± 2 °C durante 18 h seguido de aislamiento en agar TCBS. Para determinaciones cuantitativas, se inoculan las muestras en estrías desde la parte superior del agar TCBS como medio actualmente avalado para selectividad/diferencial de esta especie. Se sembró por agotamiento y no se observaron

5.3. Anexo 3. SalmoFan™

Figura 5-1 Efecto de la suplementación de trucha arco iris con extractos de carotenoides sobre el color del filete (Escala SalmoFan™)



C-: control negativo, 1,4 mg carotenoides totales kg⁻¹; C+: control positivo, 50 mg astaxantina kg⁻¹; P1: Polen 1, 25 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹; P2: 50 mg equivalentes de β-caroteno kg⁻¹.

5.4. Anexo 4. Metodología análisis proximal

Humedad: se realiza con base en el método 925.10 de la AOAC con algunas modificaciones. Se pesan 5g y se someten a secado por 24 h a 70°C en estufa con circulación de aire. Los resultados se determinan mediante gravimetría en un equipo UT6 marca Heraeus Instruments.

Proteína: se determina según el método oficial 981.10 de la AOAC con algunas modificaciones, siguiendo el método Kjeldahl y utilizado un factor de conversión de 6.25, en un equipo Kjeltex 8100 marca FOSS.

Grasa: el contenido de grasa se determina mediante el método gravimétrico con extracción con éter de petróleo en un dispositivo tipo Soxhlet según el método oficial AOAC 945.16.

Cenizas: se realiza de acuerdo con el método 942.05 de la AOAC con algunas modificaciones, en un equipo marca Hotpack. Se pesan 3g de la muestra y se someten a pre-calcinación para eliminar materia orgánica, seguido de una calcinación a 600°C.

6. Bibliografía

- Abou El-Naga, M. K. (2014). Effect of bee pollen supplementation on productive and reproductive performance of norfa chicken. *Egyptian Poultry Science Association*, 34(1), 119–132.
- Adhikari, A., Adhikari, B., Dhungana, S. K., Lee, K.-E., GC, A., Kang, S.-M., ... Lee, I.-J. (2017). Effect of bee pollen and probiotics on growth performance, organs, and thigh meat pH of broiler Cobb 500. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(1), 79–82. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.7.1.79-82>
- Agronet. (2011). Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura (CPAA). Retrieved July 17, 2017, from <https://sioc.minagricultura.gov.co/Apicola/Documentos/004 - Documentos Competitividad Cadena/004 - D.C. - 2011 Marzo – Plan Estrategico de Accion 2011-2015.pdf>
- Agronet. (2015). *Acuicultura. Cifras sectoriales*. Bogotá D.C. Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Retrieved from <https://sioc.minagricultura.gov.co/Acuicultura/Documentos/002 - Cifras Sectoriales/002 - Cifras Sectoriales - 2015 Acuicultura.pptx>.
- Agronet. (2016). *Apicultura. Cifras Sectoriales*. Retrieved from <https://doi.org/https://sioc.minagricultura.gov.co/Apicola/Documentos/002 - Cifras Sectoriales/002 - Cifras Sectoriales - 2016 Octubre.pptx>
- Agronet. (2017). *Acuicultura. Cifras Sectoriales*. Retrieved January 23, 2018, from <https://sioc.minagricultura.gov.co/Acuicultura/Documentos/002 - Cifras Sectoriales/002 - Cifras Sectoriales - 2017 Octubre Acuicultura.pptx>.
- Alçiçek, Z. (2011). The effects of thyme (*Thymus vulgaris* L .) oil concentration on liquid-smoked vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) fillets during chilled storage. *Food Chemistry*, 128, 683–688. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.087>
- Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S., & Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>
- Amar, E. C., Kiron, V., Akutsu, T., Satoh, S., & Watanabe, T. (2012). Resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) experimental infection following ingestion of natural and synthetic carotenoids. *Aquaculture*, 330, 148–155. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.007>

- Amar, E. C., Kiron, V., Okamoto, N., Satoh, S., & Watanabe, T. (2000). Effects of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 66, 1068–1075. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00170.x>
- AmisysGroup. (2000). Why Feed Pellet Fat/Oil Coating is Needed? Retrieved February 18, 2018, from <http://www.feed-pellet-mill.com/application/feed-pellet-fat-coating.html>
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis*. (W. Horwitz, Ed.) (18th ed.). J. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International.
- Barajas Ortiz, J. P., Cortes Rodriguez, M., & Rodríguez Sandoval, E. (2009). Effect of temperature on the drying process of bee pollen from two zones of Colombia. *Journal of Food Process Engineering*, 35(2012), 134–148. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00577.x>
- Barajas Ortiz, J. P., Martínez, T., & Rodríguez -Sandoval, E. (2011). Evaluación del efecto de la temperatura de en el secado de polen apícola procedente de dos zonas de Cundinamarca. *Dyna (Colombia)*, 78(165), 48–57.
- Baron, C. P., Svendsen, G. H., Lund, I., Jokumsen, A., Nielsen, H. H., & Jacobsen, C. (2013). Organic plant ingredients in the diet of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Impact on fish muscle composition and oxidative stability. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(12), 1367–1377. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300157>
- Barth, O. M. (2004). Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. *Scientia Agricola*, 61(3), 342–350. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162004000300018>
- BASF-Global. (2017). Lucantin® Pink (Astaxanthin). Retrieved May 20, 2017, from <https://nutrition.basf.com/en/Animal-nutrition/Lucantin-Pink.html>
- Benavides Guevara, R. M. (2016). *Evaluación de pretratamientos en el polen apícola como alternativa de adecuación para un sustrato de fermentación láctica*. Repositorio Institucional UN.
- Bogdanov, S. (2015). Pollen : Production , Nutrition and Health : A Review. *Bee Product Science*, (April), 1–35.
- Bowen, J., Soutar, C., Serwata, R. D., Lagocki, S., White, D. A., Davies, S. J., & Young, A. J. (2002). Utilization of (3S,3'S)-astaxanthin acyl esters in pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 8, 59–68.
- Bugeon, J., Lefevre, F., Cardinal, M., Uyanik, A., Davenel, A., & Haffray, P. (2010). Flesh quality in large rainbow trout with high or low fillet yield. *Journal of Muscle Foods*, 21(4), 702–721. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2010.00214.x>
- Castro, E., & Sepúlveda, C. (1994). Metodologías utilizadas en la determinación de la pigmentación y pigmentos en tejidos pellets. In *Control de calidad de insumos y*

- dietas acuícolas*. México, D.F.: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Retrieved from Metodologías utilizadas en la determinación de la pigmentación y pigmentos en tejidos pellets
- CEC. Commission of the European Communities, Commission decision of 8 March 1995 fixing the total volatile basic nitrogen (TVB-N) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used (95/149/EC) (1995). Official Journal of the European Communities.
- CEC. Commission of the European Communities, Commission implementing regulation (EU) 2016/1784 of 1 of 30 September 2016 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis (2016). Official Journal of the European Communities.
- Chaiyapechara, S., Liu, K. K. M., Barro, F. T., Hard, R. W., & Dong, F. M. (2003). Proximate Composition, Lipid Oxidation, and Sensory Characteristics of Fillets from Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Fed Diets Containing 10% to 30% Lipid. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(3), 266–277. <https://doi.org/s>
- Chamorro García, F. J., León Bonilla, D., & Nates-Parra, G. (2013). Bee pollen as non-wood forest product in the eastern Andean highlands of Colombia. *Colombia Forestal*, 16(1), 53–66.
- Chavarro Pulido, N. A. (2013). *Influencia del proceso de deshidratación en la calidad físico-química y bioactiva del polen apícola*. Repositorio Institucional UN.
- Chavarro Pulido, N. A., Salazar González, C. Y., Díaz Moreno, A. C., & Quicazán Sierra, M. C. (2012a). Cuantificación de Vitamina E en muestras comerciales de polen apícola. *VITAE, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica.*, 19, 357–359.
- Chavarro Pulido, N. A., Salazar González, C. Y., Díaz Moreno, A. C., & Quicazán Sierra, M. C. (2012b). Evaluación del efecto de la temperatura de secado sobre el contenido total de compuestos fenólicos en polen apícola. In S. L. Rincón Prat & P. Cuervo-Andrade (Eds.), *Memorias Seminario Internacional Secado de Productos Agrícolas SPA 2012* (pp. 31–36). Bogotá D.C. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- Choubert, G., Brisbarre, F., & Baccaunaud, M. (2011). Impact of dietary carotenoid and packaging during frozen storage on the quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (91), 1075–1082. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4286>
- Choubert, G., Cravedi, J.-P., & Laurentie, M. (2009). Effect of alternate distribution of astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle pigmentation. *Aquaculture*, 286(1), 100–104. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.001>
- Choubert, G., & Heinrich, O. (1993). Carotenoid pigments of the green alga *Haematococcus pluvialis*: assay on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture*, 112(2), 217–226. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0044->

8486(93)90447-7

- Choubert, G., Mendes-Pinto, M. M., & Morais, R. (2006). Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effect of dietary astaxanthin and lipid sources. *Aquaculture*, 257(1), 429–436. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.055>
- Dias, D. M. B., de Oliveira, M. C., da Silva, D. M., Bonifácio, N. P., Claro, D. C., & Marchesin, W. A. (2013). Bee pollen supplementation in diets for rabbit does and growing rabbits. *Acta Scientiarum*, 35(4), 425. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v35i4.18950>
- Díaz Moreno, A. C., Zuluaga Domínguez, C. M., Morales, C., & Quicazán Sierra, M. C. (2012). Determinación de fibra dietaria en polen apícola colombiano. *VITAE, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica.*, 19(1), s454–s456.
- Durán Jiménez, A., & Quicazán Sierra, M. C. (2014). Valoración del cambio de las propiedades nutricionales del polen apícola a diferentes temperaturas de deshidratación. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín*, 67(2), 622–624.
- EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the request from the European Commission on the safety of use of colouring agents in animal nutrition. *The EFSA Journal*, 291, 1–40. https://doi.org/http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/291.pdf.
- Ehsani, A., Jasour, S., & Agh, N. (2018). Rancidity development of refrigerated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets: comparative effects of in vivo and in vitro lycopene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 559–565. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8497>
- Estevinho, L. M., Rodrigues, S., Pereira, A., & Fea's, X. (2012). Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 429–435.
- FAO. (2012). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Rome, Italy: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Retrieved from <http://www.fao.org/publications/sofia/es/>
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Rome, Italy: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Retrieved from <http://www.fao.org/publications/sofia/es/>
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Rome, Italy: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Retrieved from <http://www.fao.org/publications/sofia/es/>
- Fuenmayor Bobadilla, C., Zuluaga Domínguez, C. M., Díaz Moreno, A. C., Quicazán Sierra, M. C., Cosio, M., & Mannino, S. (2014). Evaluación de las propiedades

- fisicoquímicas y funcionales del polen apícola colombiano. *Revista MVZ Córdoba*, 19(1), 4003–4014.
- Fuentes López, A., García Martínez, E., & Fernández Segovia, I. (2013). *Determinación del contenido en Nitrógeno Básico Volátil Total (N-BVT) en pescado fresco*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10251/29836>.
- Gardana, C., Del Bo', C., Quicazan, M. C., Correa, A. R., & Simonetti, P. (2018). Nutrients, phytochemicals and botanical origin of commercial bee pollen from different geographical areas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.07.009>
- González Gutiérrez, K. (2016). Estandarización de la acetólisis de Erdtman (1969) para el análisis palinológico de muestras fecales de murciélagos polinizadores (Phyllostomidae: Glossophaginae – Lonchophyllinae). *Revista Tumbaga*, 1(11), 49–81.
- Gulhan, M. F., Akgul, H., Dastan, T., & Dastan, S. D. (2014). Effects of different concentrations of pollen extract on brain tissues of *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(3), 169–174. <https://doi.org/10.12980/JCLM.2.2014JCLM-2013-0001>
- Gutiérrez Cortés, C. (2012). *Descripción cualitativa de las características macroscópicas y microbiológicas de polen apícola obtenido en el altiplano Cundiboyacense*. Bogotá D.C.
- Gutiérrez Ortiz, M. A., Osorio Tangarife, M. P., & Salamanca Grosso, G. (2010). Implementation of a Model of Quality and Traceability in the Process of Pollen Agroindustrial. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 22, 18–30.
- Hannoufa, A., & Hossain, Z. (2012). Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1, 189–202. <https://doi.org/doi:10.1016/j.bcab.2012.03.004>
- Haščík, P., Elimam, I., Garlík, J., Bobk, M., & Čuboň, J. (2013). The effect of bee pollen as supplement dietary for meat pH, cooling and freezing loses on broiler chickens meat. In *Journal of Environmental and Agricultural Sciences*. Slovak University of Agriculture in Nitra.
- Haščík, P., Garlík, I. O. E. E. J., Bobko, M., & Kročko, M. (2013). Sensory evaluation for broiler meat after addition Slovak bee pollen in their feed mixture. *Potravinárstvo*, 7(1), 107–110. <https://doi.org/10.5219/280>
- Haščík, P., Omer, I., Elimam, E., Bobko, M., & Kačániová, M. (2011). Oxidative stability of chicken meat after pollen extract application in their diet. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1(1), 70–82.
- Heinen, J. M., Hankins, J. A., & Subramanyam, M. (1995). Evaluation of Two Higher-Fat Diets and a Lower-Fat Diet for Rainbow Trout. *Journal of Applied Aquaculture*, 5(2), 73–83. https://doi.org/10.1300/J028v05n02_07

- Hendry, G. A. F., & Houghton, J. D. (Eds.). (1996). *Natural Food Colorants* (Chapman & Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2155-6>
- Holguín Hernández, M. S. (1998). *Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano*. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos-INVIMA.
- ICONTEC. (2009). *Norma Técnica Colombiana NTC 1443. Productos de la pesca y la acuicultura. Pescado entero, medallones y trozos (refrigerados o congelados)*. (I. C. de N. T. (ICONTEC), Ed.). Bogotá D.C. Colombia, Colombia. Retrieved from <https://tienda.icontec.org/producto/impreso-ntc1443-productos-de-la-pesca-y-de-la-acuicultura-pescado-entero-medallones-filetes-y-trozos-refrigerados-o-congelados/?v=42983b05e2f2>
- Ighwela, K. A., Ahmad, A. Bin, & Abol-Munafi, A. B. (2014). The selection of viscerosomatic and hepatosomatic indices for the measurement and analysis of *Oreochromis niloticus* condition fed with varying dietary maltose levels. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 1(3), 18–20.
- Ingle de la Mora, G. (2002). Incremento al valor agregado de salmónidos a través de su pigmentación con colorantes naturales. (Cruz- & N. Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, Eds.), *Avances En Nutrición Acuícola VI. Memorias Del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 Al 6 de Septiembre Del 2002*. Cancún, Quintana Roo, México.
- Ingle de la Mora, G., Arredondo-Figueroa, J. L., Ponce-Palafox, J. T., Barriga-Soca, I. delos A., & Vernon-Carter, J. E. (2006). Comparison of red chilli (*Capsicum annum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet pigmentation. *Aquaculture*, 258(1), 487–495. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.005>
- ITC. (2018). International Trade Center. Retrieved November 2, 2017, from <http://www.intracen.org/>
- Jalili, R., Tukmechi, A., Agh, N., Noori, F., & Ghasemi, A. (2013). Replacement of dietary fish meal with plant sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); effect on growth performance, immune responses, blood indices and disease resistance. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(3), 577–591.
- Jobling, M., Koskela, J., & Savolainen, R. (1998). Influence of dietary fat level and increased adiposity on growth and fat deposition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29(8), 601–607. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00251.x>
- Kadiyam, R. R. (2015). High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications. <https://doi.org/https://laboratoryinfo.com/hplc/>
- Kamireddy, N., Jittinandana, S., Kenney, P. B., Slider, S. D., Kiser, R. A., Mazik, P. M., &

- Hankins, J. A. (2011). Effect of dietary vitamin E supplementation and refrigerated storage on quality of rainbow trout fillets. *Journal Of Food Science*, 76(4), S233–S241. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02121.x>
- Keleştemur, G., & Çoban, O. (2016). Effects of The β -Carotene on the Growth Performance and Skin Pigmentation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1792). *Journal of Fisheries & Livestock Production*, 4(1), 1–3. <https://doi.org/10.4172/2332-2608.1000164>
- Keleştemur, G., & Seven, I. (2013). Effects of dietary propolis and vitamin E on growth performance and antioxidant status in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under different flow rate. *Aquaculture Research*, 44(7), 1120–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03122.x>
- Khanum, R., & Thevanayagam, H. (2017). Lipid peroxidation: Its effects on the formulation and use of pharmaceutical emulsions. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(5), 401–411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.05.003>
- Krell, R. (1996). *Value-Added Products From Beekeeping. Agricultural Services Bulletin No. 124*. Rome, Italy: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm>
- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., & Larhantec, M. (2012). Bees , honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Enviromental Pollution*, 170, 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.012>
- Leary, S., Underwood, W., Lilly, E., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., ... Division, A. W. (2013). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals : 2013 Edition*. Retrieved from <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>
- Lee, J. H., & Schwartz, S. J. (2012). Analysis of Carotenoids and Chlorophylls in Foods. In S. Ötles (Ed.), *Methods of Analysis of Food Components and Additives* (pp. 231–247). Boca Raton: CRC Press.
- León Bonilla, D. A., & Nates-Parra, M. G. (2012). Es posible determinar el origen botánico del polen con base en el color de las cargas corbiculares de las abejas? In *VI Encuentro Colombiano sobre Abejas Silvestres*. Bogotá D.C. Colombia: Repositorio Institucional UN.
- Mahdi, S., Rezaei, M., Hadi, S., Mohamad, S., & Hosseini, H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.006>
- Marz, U. (2015). The Global Market for Carotenoids. *BBC Research (BCC-R)*. <https://doi.org/Report ID: FOD025D>
- Medina C., M. A. (2018). Colombianos consumen 10 kilos de pescado al año, entrevista con Otto Polanco. Retrieved August 22, 2018, from <https://www.elespectador.com/economia/colombianos-consumen-10-kilos-de-pescado-al-ano-articulo-792496>

-
- Merkin, G. V., Gjerstad, C., Nortvedt, R., Roth, B., & Dahl-Paulsen, E. (2010). Effect of pre-slaughter procedures on stress responses and some quality parameters in sea-farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 309((1-4)), 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.025>
- Montoya Pfeiffer, P. M., & Nates Parra, M. G. (2011). *Uso de recursos florales poliníferos por Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) en apiarios de la Sabana de Bogotá y alrededores*. Repositorio Institucional UN.
- Moroney, N. C., Wan, A. H. L., Soler-Vila, A., FitzGerald, R. D., Johnson, M. P., & Kerry, J. P. (2015). Inclusion of *Palmaria palmata* (red seaweed) in Atlantic salmon diets: effects on the quality, shelf-life parameters and sensory properties of fresh and cooked salmon fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 897–905. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6753>
- Naeem, M., Salam, A., & Zuberi, A. (2016). Proximate composition of freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to body size and condition factor from Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 53(2), 468–472. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/16.2653>
- Nast, C. (2018). Fish, trout, rainbow, wild, cooked, dry heat. Retrieved September 18, 2018, from <https://nutritiondata.self.com/facts/finfish-and-shellfish-products/4142/2>
- Nickell, D. C., & Bromage, N. R. (1998). The effect of timing and duration of feeding astaxanthin on the development and variation of fillet colour and efficiency of pigmentation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 169(3), 233–246. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00385-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00385-8)
- Özyurt, G., Özkütük, A. S., Şimşek, A., & Yeşilsu, A. F. (2015). Quality and Shelf Life of Cold and Frozen Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fillets: Effects of Fish Protein-Based Biodegradable Coatings. *International Journal of Food Properties*, 18(9), 1876–1887. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.971182>
- Page, G. I. (2001). Physiological and biochemical factors affecting carotenoid utilization in salmonid fish. Dirdal, Norway: University of Plymouth.
- Quali, A. (1992). Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*, 74, 251–265. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90124-W](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90124-W)
- Rahman, M. M., Khosravi, S., Chang, K. H., & Lee, S.-M. (2016). Effects of Dietary Inclusion of Astaxanthin on Growth, Muscle Pigmentation and Antioxidant Capacity of Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(3), 281–288. <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.3.281>
- Ribeiro, H. S., Rico, L. G., Badolato, G. G., & Schubert, H. (2005). Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. *Journal of Food Science*, 70(2), E117–E123.

- Ritter, E. De, & Purcell, A. E. (1981). Carotenoid analytical methods. In *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors: Technological and Nutritional Applications* (pp. 815–923). New York: Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-082850-0.50017-2>
- Rojano, B. A. (1997). *Oxidación de lípidos y antioxidantes*. Medellín.
- Roncarati, A., Sirri, F., Felici, A., Stocchi, L., Melotti, P., & Meluzzi, A. (2011). Effects of dietary supplementation with krill meal on pigmentation and quality of flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Italian Journal of Animal Science*, *10*, 139–146. <https://doi.org/10.4081/ijas.2011.e27>
- Saa Otero, M. P., Díaz Losada, E., & Fernández Gómez, E. (2000). Analysis of fatty acids , proteins and ethereal extract in honeybee pollen - Considerations of their floral origin. *GRANA*, *39*(4), 175–181. <https://doi.org/10.1080/00173130051084287>
- Sachindra, N. M., & Mahendrakar, N. S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*, *96*, 1195–1200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.018>
- Safari, O., Mehraban, M., & Atash, S. (2015). The effects of dietary supplement of annatto (*Bixa orellana*) seed meal on blood carotenoid content and fillet color stability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *437*, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.012>
- Sahin, K., Yazlak, H., Orhan, C., Tuzcu, M., Akdemir, F., & Sahin, N. (2014). The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density. *Aquaculture*, *418*, 132–138. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.009>
- Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, *240*, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Salazar González, C. Y. (2014). *Evaluación de diferentes condiciones del proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola*. Repositorio Institucional UN.
- Salazar González, C. Y., & Díaz Moreno, A. C. (2016). The Nutritional and Bioactive Aptitude of Bee Pollen for a Solid-State Fermentation Process. *Journal of Apicultural Research*, *8839*(September). <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1205824>
- Salcedo, R., Quin, Y., Melgarejo, L. M., Herna, M. S., & Ferna, J. P. (2018). Variation in the fatty acid profile and quality of ‘ Hass ’ avocados preserved during cold storage. *Acta Hortic.*, *1194*, 1007–1010. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1194.143>
- Secci, G., & Parisi, G. (2016). From farm to fork: Lipid oxidation in fish products. A review. *Italian Journal of Animal Science*, *15*(1), 124–136. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2015.1128687>
- Sheikhzadeh, N. (2013). Influence of Dietary Vegetable Crops on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Immune System and Growth Performance. *Acta Scientiae*

Veterinariae, 41(1), 1–6.

Solla. (2005). *Peces de agua fría*.

Storebakken, T., & No, H. K. (1992). Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*, 100(1), 209–229. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90372-R](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(92)90372-R)

Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., Karlovits, G., & Szłyk, E. (2011). Effect of refining processes on antioxidant capacity , total contents of phenolics and carotenoids in palm oils. *Food Chemistry*, 129, 1187–1192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.101>

Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T., & Dugan Jr., L. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 37(1), 44–48. <https://doi.org/10.1007/BF02630824>

Teimouri, M., Amirkolaie, A. K., & Yeganeh, S. (2013a). The effects of dietary supplement of *Spirulina platensis* on blood carotenoid concentration and fillet color stability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 414, 224–228. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.015>

Teimouri, M., Amirkolaie, A. K., & Yeganeh, S. (2013b). The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 396, 14–19. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.009>

Turchini, G. M., Hermon, K. M., & Francis, D. S. (2018). Fatty acids and beyond: Fillet nutritional characterisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different dietary oil sources. *Aquaculture*, 491, 391–397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.056>

Turhan, S., Yazici, F., Saricaoglu, F. T., Mortas, M., & Genccelep, H. (2014). Evaluation of the Nutritional and Storage Quality of Meatballs Formulated with Bee Pollen. *Korean Journal For Food Science Of Animal Resources*, 34(4), 423–433. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.4.423>

USDA. (2018). Food Composition Databases. Retrieved August 20, 2010, from <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>

Vit, P., Herrera, P., Rodríguez, D., & CarmonaJuan. (2008). Caracterización de polen apícola fresco recolectado en Cacute, en los Andes venezolanos. *Instituto Nacional de Higiene“Rafael Rangel,”* 39(2).

Wrolstad, R. E., & Culver, C. A. (2012). Alternatives to Those Artificial FD & C Food Colorants. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, (3), 59–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101118>

Yanar, Y., Büyükçapar, H., Yanar, M., & Göcer, M. (2007). Effect of carotenoids from red

- pepper and marigold flower on pigmentation, sensory properties and fatty acid composition of rainbow trout. *Food Chemistry*, 100(1), 326–330. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.056>
- Yeganeh, S., Teimouri, M., & Amirkolaie, A. K. (2015). Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Research in Veterinary Science*, 101, 84–88. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.002>
- Yildiz, M., & Gün, H. (2006). Effect of Refrigerated Storage on Fillet Lipid Quality of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) Fed a Diet Containing Different Levels of DL α -Tocopherol Acetate. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 30, 143–150.
- Yıldız, M., Eroldoğan, T. O., Ofori-Mensah, S., Engin, K., & Baltacı, M. A. (2018). The effects of fish oil replacement by vegetable oils on growth performance and fatty acid profile of rainbow trout: Re-feeding with fish oil finishing diet improved the fatty acid composition. *Aquaculture*, 488, 123–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.030>
- Yonar, M. E. (2012). The effect of lycopene on oxytetracycline-induced oxidative stress and immunosuppression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). *Fish & Shellfish Immunology*, 32(6), 994–1001. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.012>
- Zhang, J., Li, X., Leng, X., Zhang, C., Han, Z., & Zhang, F. (2013). Effects of dietary astaxanthins on pigmentation of flesh and tissue antioxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 21(3), 579–589. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9590-9>
- Zuluaga Domínguez, C. M. (2015). *Valorización de polen apícola como alimento mediante el desarrollo de un proceso físico o biotecnológico*. Repositorio Institucional UN.
- Zuluaga Domínguez, C. M., Serrato B., J. C., & Quicazán Sierra, M. C. (2014). Valorization Alternatives of Colombian Bee-Pollen for its Use as Food Resource - A structured Review. *VITAE, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.