

LOS CAROTENOIDES DE LAS TRUCHAS DE VIDA SILVESTRE (*Salmo fario*) DEL RIO PORMA: CAMBIOS ESTACIONALES

*Por M.^a Teresa Fernández Aguado y
Justino Burgos González*

INTRODUCCION

La pigmentación del músculo de los salmónidos despierta un notable interés comercial del que es fiel reflejo el elevado número de investigaciones y trabajos prácticos tendentes a facilitar el depósito de pigmentos de las especies de vida en cautividad. Responsables de la misma son los carotenoides, que según algunos autores⁶ no sólo afectan al color sino también a la textura. Tradicionalmente se ha considerado que los únicos carotenoides cuantitativamente importantes en este sentido son las xantofilas; sin embargo, algunos estudios más recientes^{18,24} demuestran que el patrón de pigmentación del músculo de los salmónidos puede ser considerablemente más complejo; en este estudio se ha pretendido investigar el que ofrece el de las truchas de vida silvestre que habitan los ríos que de la cordillera cantábrica descienden hacia el Duero (*Salmo fario*) así como las variaciones que pueda experimentar a lo largo del año y el posible influjo del sexo.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico

Se utilizaron 27 truchas (14 machos y 13 hembras) de 3 años, todas ellas pigmentadas, capturadas en una zona acotada del río Porma (León) en diciembre de 1974, febrero y junio de 1975 y que fueron conservadas a refrigeración hasta su traslado al laboratorio, no más de 24-36 horas después de su captura.

Divididas en dos lotes, machos y hembras, se homogeneizó su masa muscular y se procedió de inmediato a la extracción de sus pigmentos o se conservó a congelación (-18°C) hasta efectuar los pertinentes análisis.

An. Fac. Vet. León, 1979, 25, 317-332.

Todos los productos utilizados fueron de calidad reactivo. Los carotenoides patrones fueron donados por Hoffman-La Roche, o aislados en el laboratorio a partir de sus fuentes características. El etanol utilizado para los estudios espectrofotométricos se purificó hirviendo a reflujo, durante seis horas, dos litros con 80 g de NaOH y 20 g de granalla de Zn y procediendo a continuación a su destilación fraccionada. El éter etílico fue deshidratado sobre alambre de Na y liberado de peróxidos por destilación sobre polvo de Fe reducido. La acetona fue tratada con permanganato, deshidratada y destilada antes de su uso. El cloroformo, el benceno y el metanol fueron redestilados antes de su empleo.

La eliminación de disolventes de los extractos se efectuó por destilación a presión reducida o en corriente de nitrógeno sin que la temperatura excediera de 40°C.

Identificación de los pigmentos

Además de en el comportamiento cromatográfico y el espectro visible, las identificaciones efectuadas en este trabajo están basadas en:

1. La polaridad relativa calculada de acuerdo con el método de KRINSKY²⁰.

2. La reducción de los grupos ceto, tratando los pigmentos disueltos en alcohol del 95 % con una pequeña cantidad de BH_4Na ¹⁹ y la observación de los cambios así introducidos en el espectro visible, el comportamiento cromatográfico y la polaridad relativa.

3. La deshidratación de los carotenoides con hidroxilos alílicos, al tratar las disoluciones clorofórmicas con una gota de cloroformo saturado con clorhídrico¹⁶, y la observación de los cambios espectrales y de las modificaciones de la polaridad relativa observados al extender el cromóforo.

4. El tratamiento de los pigmentos, disueltos en alcohol, con etanol ácido (0,12 N en alcohol del 99 %)² que transforman los carotenoides con grupos alílicos en sus alcoxiderivados y la observación de los cambios introducidos en su comportamiento cromatográfico en lámina fina de sílica gel.

5. Las modificaciones de la polaridad introducidas por la acetilación de hidroxilos primarios y secundarios, en piridina seca, con anhídrido acético¹².

6. El desplazamiento hipsocrómico de λ max. cuando el pigmento disuelto en éter de petróleo se trata con ClH 0,05 N en etanol al 99 % (prueba de epóxidos)¹⁵.

7. Las modificaciones en la polaridad relativa y el comportamiento cromatográfico y, en ciertos casos, los cambios espectrofotométricos introducidos por la saponificación, efectuada en la oscuridad, en corriente de nitrógeno y a temperatura ambiente, durante 18 horas, con KOH al 6 % (concentración final en etanol del 90 %).

Tanto las cromatografías, como las determinaciones de polaridad relativa y los tratamientos para la identificación de grupos funcionales, al igual que la eliminación de disolventes fueron realizados en cámara oscura. El desarrollo de las cromatografías en columna se realizó bajo atmósfera de nitrógeno.

El cálculo del contenido en carotenoides se efectuó basándose en la extinción a la longitud de onda en la que ofrecían la absorción máxima y utilizando los $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ correspondientes a los productos identificados. En los extractos totales se operó con un $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 2.500, como recomiendan NICOLA y GOODWIN²² y otros^{5, 14} para carotenoides desconocidos.

RESULTADOS

Elección del método de extracción

Alícuotas de triturado homogéneo de una de las muestras fueron sometidas a extracción con: a) cloroformo-metanol, de acuerdo con FOLCH⁸, b) metanol, siguiendo el proceso descrito por SCHWARZEL²⁷, c) acetona, según SAVOLAINEN²⁴ y d) éter etílico, tras la saponificación⁵.

El más eficaz resultó ser la extracción con acetona; los otros tres ofrecían un rendimiento del 61 % (todos y cada uno de ellos) con respecto al método de SAVOLAINEN²⁴.

La Tabla I muestra la evolución de los carotenoides totales observada utilizando el método de extracción con acetona.

TABLA I
Variación de los carotenoides totales a lo largo del año

Fecha	Carotenoides totales (µg/g)	
	Machos	Hembras
Diciembre	0,20	0,68
Febrero	3,36	1,25
Junio	12,20	6,5

Aislamiento e identificación de los diversos carotenoides presentes

Alícuotas de estos extractos fueron cromatografiadas en columnas de alúmina neutra (GRADO, BROCKMAN, SCHODLER, I) utilizando una serie eluotrópica constituida por éter de petróleo (fracción I); acetona/éter de petróleo, 2/98 (fracción II); acetona/éter de petróleo, 6/94 (fracción III); acetona/éter de petróleo, 15/85 (fracción IV); acetona/éter de petróleo, 30/70 (fracción V); acetona (fracción VI); ácido acético/etanol, 3/97, (fracción VII) y ácido acético (fracción VIII).

La fracción (I) carecía de color. La (II), que puede contener mezclas de α y β carotenos^{9, 10}, fue recromatografiada en columnas de hidróxido de calcio-

celita (1/1) eluidas con acetona/éter de petróleo (2/98), obteniéndose únicamente una fracción cuyo espectro en éter de petróleo ofrecía (Fig. 1) máximos a 475, 451, 425 m μ . Calculado su coeficiente de reparto entre hexano/metanol del 95 % se observó un valor de 100/0 común a los diversos carotenos (hidrocarburos)²³. Cocromatografiada la muestra con un patrón de β -caroteno, en lámina fina de alúmina y utilizando como fase móvil 5 % de acetona en éter de petróleo, fue imposible separar la muestra del patrón. El pigmento eluido en esta fracción fue, pues, identificado como β caroteno.

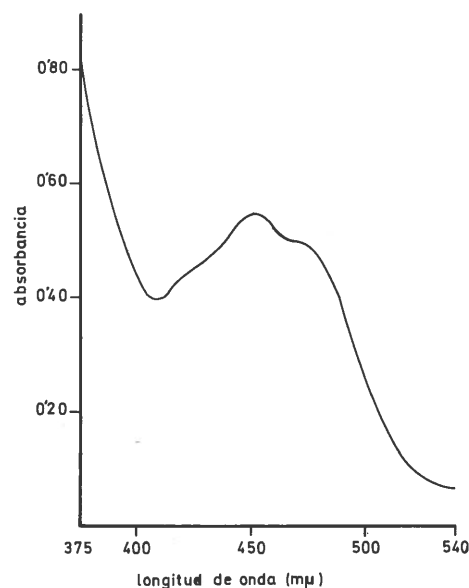


Figura 1.—Espectro en éter de petróleo de la fracción II del músculo de una de las muestras analizadas. Coto de Remellán.

Alícuotas de la fracción (III) fueron disueltas en hexano, acetona y etanol registrándose sus espectros (Figs. 2 y 3) cuyas características sugieren la presencia de un cetocarotenoide⁵. El coeficiente de reparto en éter de petróleo metanol del 95 % dio un valor de 49/51, idéntico al hallado por PETRACEK y ZECHMEISTER²³ para un dicetocarotenoide. Calculada su polaridad relativa se obtuvo un valor de 1,42 que concuerda con la asignada por KRINSKY²⁰ a la presencia de dos grupos ceto conjugados con el anillo. La reducción con borohidruro sódico produjo un cambio de color de anaranjado a amarillo y un desplazamiento hipsocrómico (Fig. 3) de 14 m μ , esperable de la reducción de dos grupos ceto conjugados con un doble enlace en el anillo². El pigmento reducido dio una polaridad relativa de 1,75, concordante con la existencia de dos hidróxilos alílicos. Alícuotas del pigmento original, del reducido, del redu-

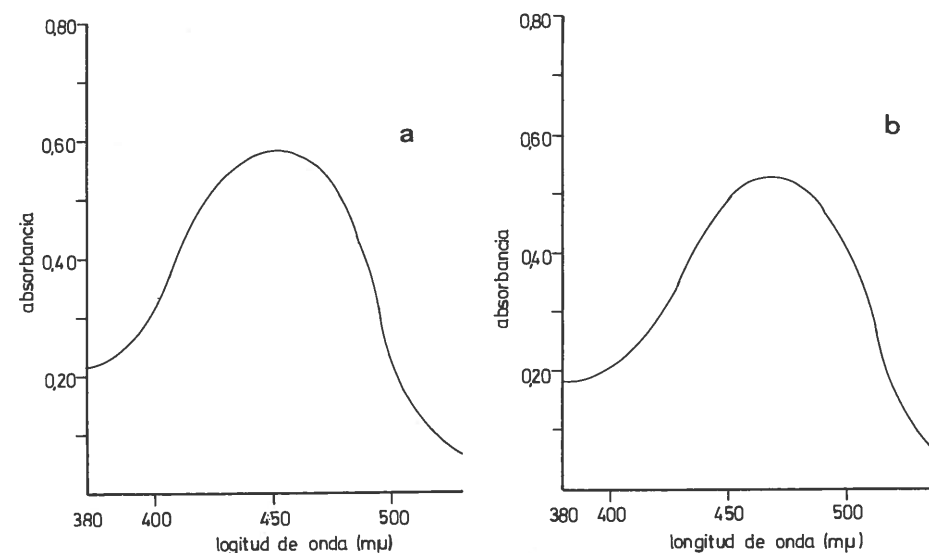


Figura 2.—Espectros de la fracción III del músculo de una de las muestras analizadas en: a) hexano; b) acetona. Coto de Remellán.

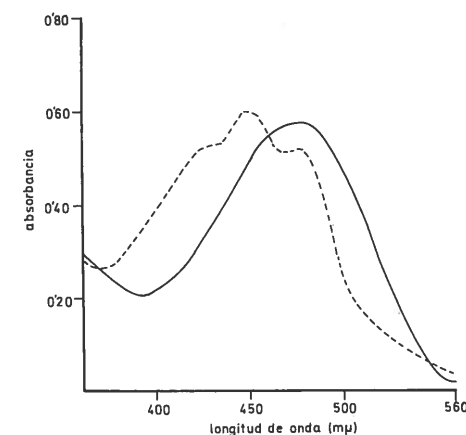


Figura 3.—Espectro en etanol de la fracción III (pigmento original —, pigmento reducido - - -) de una de las muestras analizadas procedentes del coto de Remellán.

cido sometido al test del etanol-ácido² y de un patrón de cantaxantina fueron cromatografiadas en lámina fina de sílica gel G utilizando como fase móvil acetona/éter de petróleo (25/75), obteniéndose unos R_f. de 0,63, 0,41, 0,80 y 0,63 respectivamente (Fig. 4).

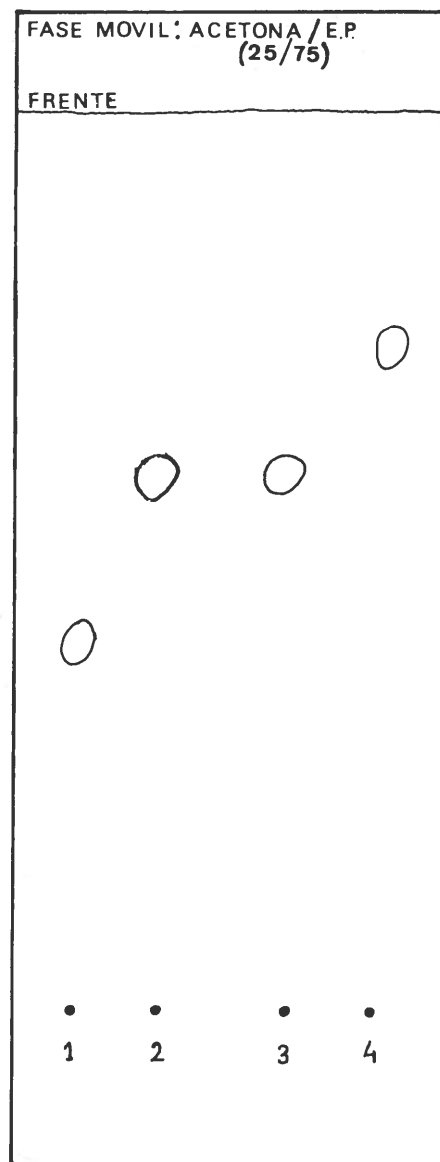


Figura 4.-Cromatografía en lámina fina (sílica gel G) de la fracción III de una de las muestras analizadas procedente del coto de Remellán. Mancha n.º 1 pigmento reducido, n.º 2 pigmento original, n.º 3 cantaxantina patrón, n.º 4 pigmento reducido tratado con metanol-clorhídrico.

El comportamiento cromatográfico, el espectral y las pruebas de grupos funcionales revelan que se trata de cantaxantina. Cocromatografiada con una muestra patrón de cantaxantina no fue posible separarlas. Sometida la cantaxantina patrón a los mismos tests y determinaciones rindió iguales valores.

Fracción (IV).-De la fracción IV, que sólo apareció pigmentada en las truchas de las temporadas de febrero y junio, se aislaron por cromatografía en lámina fina de sílica gel G, y utilizando como fase móvil acetona/éter de petróleo (25/75), 3 pigmentos, pigmento IVa, IVb y IVc de Rf 0,62, 0,66 y 0,71 respectivamente.

El pigmento IVa, de color naranja, presentaba un espectro en éter de petróleo carente de estructura fina, con un máximo hacia 450 m μ . La reducción con borohidruro sódico le confirió estructura fina, con máximos a 470, 445 y 420 m μ , típicos de un cromóforo con 10 dobles enlaces conjugados, lo que permite postular que se trata de un ceto α carotenoide. Dada la escasez de muestra no pudo determinarse la posición del grupo ceto ni detectar la posible existencia de otros grupos funcionales.

El pigmento IVb presentaba un color anaranjado y un espectro (Fig. 5) carente de estructura fina con un máximo hacia 460 m μ ; la reducción con borohidruro sódico produjo un desplazamiento hipsocrómico del mismo de 10 m μ , revelando la reducción de un ceto grupo conjugado con el anillo y confiéndole estructura fina con máximos a 470, 450 y 420 m μ , lo que sugiere la presencia del cromóforo del β caroteno. El pigmento referido no pudo caracterizarse con más precisión.

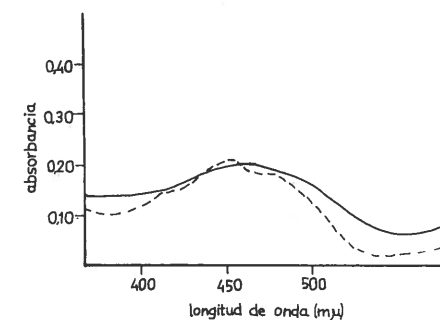


Figura 5.-Espectro en etanol de la fracción IVb de una de las muestras analizadas procedente de coto de Remellán. Pigmento original —, pigmento reducido - - - -.

El pigmento IVc, era más escaso que los anteriores y no pudo realizarse con él ningún estudio.

Fracción V.-Ofrecía color amarillo; al igual que de la fracción anterior, en las muestras de febrero y junio; se separaron de ella en lámina fina de sílica

gel G y utilizando como fase móvil acetona/éter de petróleo (25/75), tres pigmentos: Va, Vb y Vc de Rf: 0,49, 0,57 y 0,64, respectivamente.

El pigmento Va de color amarillo, ofrecía en su forma original y en la reducida con borohidruro espectros que revelan el cromóforo del α caroteno y la posesión de un grupo ceto en el anillo, conjugado con un doble enlace del mismo, tratándose pues de un 4' ceto α carotenoide.

Los espectros del pigmento Vb y su producto de reducción con borohidruro (Fig. 6) revelan que posee el cromóforo del α caroteno. El coeficiente de reparto en hexano/metanol del 95 % dio un valor de 28/72 para el pigmento original (valor adecuado para un cetohidroxicarotenoide) y de 17/83 para la forma reducida, valor concordante con la presencia de dos grupos hidróxilos libres, o uno de ellos esterificado. Sometida una alícuota del pigmento original a acetilación se comprobó que no variaba ni su coeficiente de reparto ni su Rf en lámina fina, por lo que se dedujo que podía tratarse del éster de un hidroxí 4' ceto α caroteno o del 4 hidroxí 4' ceto α caroteno, cuyo hidróxilo no se acetila en las condiciones experimentales usadas. No se dispuso de muestra suficiente para efectuar las pruebas precisas para resolver la duda.

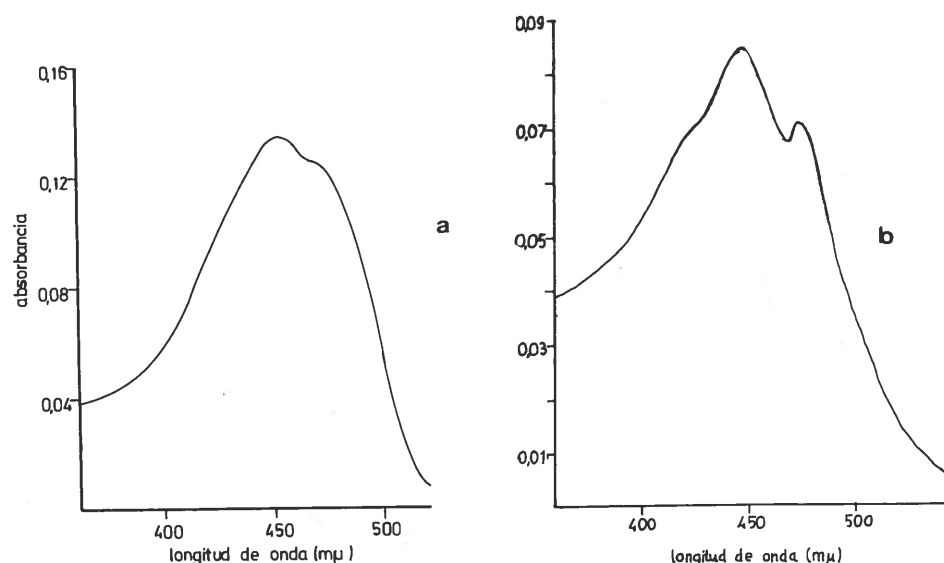


Figura 6.—Espectros de la fracción Vb de una de las muestras analizadas procedente del coto de Remellán. a) éter de petróleo; b) etanol (pigmento reducido).

Los espectros registrados de la forma original y la reducida del pigmento Vc pusieron de manifiesto que se trataba de un 4 ceto α carotenoide, no pudiendo caracterizarse con más precisión dada la escasez de muestra.

Fracción VI.—Sometida dicha fracción a cromatografía en lámina fina, se observaron dos pigmentos: VIa y VIb separados posteriormente por cromato-

grafía en columna de óxido de magnesio/celita (2/1) con acetona/éter de petróleo (35/65) como fase móvil.

El pigmento VIa de color amarillo, ofrecía un espectro en disulfuro de carbono de características idénticas a las del de la luteína.

Su polaridad relativa se estimó en 1,93; el incremento del Rf en la lámina fina de sílica gel G que experimentó al someterlo al test del alcohol ácido² prueba la existencia de al menos un hidróxilo alílico; dio negativa la prueba de epóxidos. Cocromatografiado con luteína patrón fue imposible separarlos.

El pigmento VIb de color anaranjado mostraba espectros de características similares a los de la zeaxantina. La polaridad relativa hallada dio un valor de 2,06, que se aproxima enormemente a la teórica (2,00), dada para la zeaxantina²⁰; las pruebas de epóxidos e hidroxilalilos fueron negativas y resultó imposible resolver cromatográficamente la mezcla de una muestra patrón de zeaxantina y el pigmento VIb, que fue identificado, por tanto, como zeaxantina.

Fracción VII.—Se resolvió por cromatografía en lámina fina de sílica gel G, utilizando como fase móvil acetato de isopropilo/benceno (25/75), en dos pigmentos: VIIa y VIIb y, ocasionalmente, en los machos capturados en la época de verano un tercer componente, pigmento VIIc.

El pigmento VIIa ofrecía espectros idénticos a los que la bibliografía cita para la astaxantina^{5,11} (Fig. 7). Su espectro en etanol, simétrico, con un máximo hacia 480 mμ, y la adquisición de estructura fina con unos máximos hacia 478 y 451 mμ y un hombro hacia 425-30, al reducirlo con borohidruro, revelan que se trata de un β cetocarotenoide con dos grupos ceto conjugados con el anillo. El coeficiente de reparto en hexano/metanol del 95 % fue estimado en 18/82 para el pigmento original y en 6/94 para la forma reducida, sugiriendo la posesión de dos grupos hidróxilos no alílicos además de los dos ceto. La cromatografía en lámina fina de una alícuota sometida a acetilación y otra del pigmento original mostró una disminución de la polaridad con el tratamiento acetilante revelando la posesión de hidróxilos. Las pruebas de hidroxilos alílicos resultaron negativas en el pigmento original y positivas en el reducido; cocromatografiada la muestra con un patrón de astaxantina fueron inseparables, el pigmento original fue, pues, identificado como astaxantina.

El pigmento VIIb presentaba un espectro en hexano simétrico, con un máximo hacia 468 mμ (Fig. 8) sugiriendo que se trataba de un diceto carotenoide. La reducción con borohidruro sódico le confiere estructura fina con máximos a 478 y 451 y un hombro hacia 425 mμ (Fig. 9); el desplazamiento hipsocrómico de 19 mμ es compatible con la posesión de dos grupos ceto conjugados con los dobles enlaces en el anillo. La polaridad relativa, 2,19 puso de manifiesto que debía poseer otros grupos funcionales: hidróxilos, éster o epoxi. Las pruebas para grupos epoxi e hidróxilos alílicos resultaron negativas. La saponificación rindió un producto con el espectro típico del astaceno,

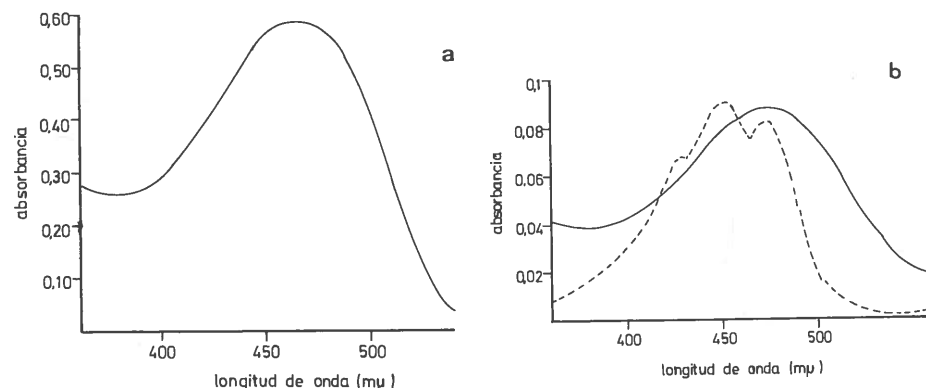


Figura 7.—Espectros en diferentes disolventes de la fracción VIIa de una de las muestras analizadas, procedente del coto de Remellán; a) hexano; b) etanol (pigmento original —, pigmento reducido - - -).

revelando que se trataba de un compuesto similar a la astaxantina. El tratamiento acetilante de hidróxilos primarios o secundarios rindió un producto con un R_f en lámina fina más alto, poniendo de manifiesto que el derivado de astaxantina contenía al menos un hidróxilo libre. Cocromatografiado en lámina fina con astaxantina libre, monoéster y diéster fue inseparable del monoéster. El medio saponificante liberado del insaponificable fue extraído a pH 3-4 con éter etílico y el extracto etéreo sometido al tratamiento de metilación de ácidos grasos de SCHLENK y GALLERMAN²⁶ y cromatografiado en fase gaseosa, como se ha descrito en otras publicaciones⁷, revelando la presencia de no menos de 10 especies de ácidos grasos; véase Tabla II. El pigmento fue pues identificado como astaxantina monoéster.

TABLA II

Composición en ácidos grasos de la astaxantina monoéster del músculo de las truchas (machos y hembras) capturadas en distintas estaciones en el coto de Remellán (Palazuelo)

Ácidos grasos	DICIEMBRE	FEBRERO		JUNIO	
	Machos (%)	Machos (%)	Hembras (%)	Machos (%)	Hembras (%)
C14:0	7,3	17,3	4,3	29,6	12,7
C16:0	30,1	37,8	24,3	27,3	36,4
C16:1	11,8	3,7	7,3	14,7	16,6
C18:0	12,1	30,9	42,5	9,1	10,1
C18:1	18,4	10,4	12,6	10,1	10,5
C18:2	3,0	tr.	2,4	tr.	tr.
C18:3	8,0	—	3,0	»	»
C20:1	0,7	—	—	2,3	8,6
C20:3	1,1	—	—	—	—
C20:5	7,3	—	3,4	6,8	5,1

La polaridad relativa teórica para el monoéster de astaxantina de acuerdo con KRINSKY²⁰ es de 2,91, considerablemente distante de la experimentalmente hallada para el pigmento VIIb y único dato no concordante con la identificación efectuada. Se procedió por tanto a la acetilación de una muestra de astaxantina, para la obtención del diacetato, y a la comparación de las polaridades relativas de la astaxantina y el diacetato observando que la contribución del grupo éster acético a la polaridad era de 0,23 y no de 0,47 como anota KRINSKY²⁰.

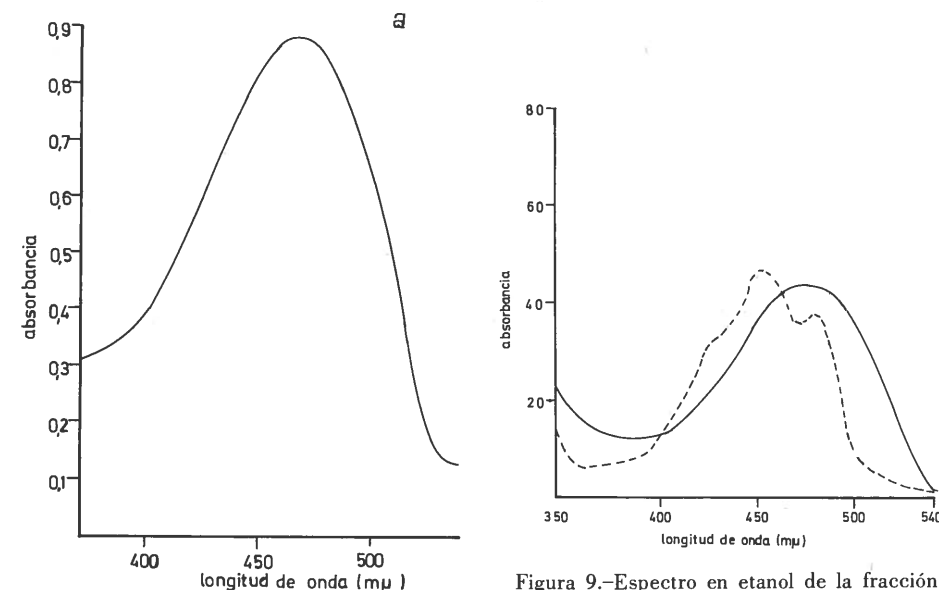


Figura 8.—Espectro en hexano de la fracción VIIb.

Figura 9.—Espectro en etanol de la fracción VIIb de una de las muestras analizadas procedente del coto de Remellán; pigmento original —, pigmento reducido - - -).

El pigmento VIIc mostró un espectro carente de estructura fina, revelando que se trataba de un cetocarotenoide, con un máximo a longitudes de onda 2-3 $m\mu$ más cortas que el pigmento VIIa. La reducción de una alícuota con borohidruro sódico produjo un espectro de características idénticas a las del β caroteno; se saponificó otra alícuota extrayendo el insaponificable y tratando el residuo como procedente para la obtención de sus ácidos grasos y su posterior metilación por el método de SCHLENK y GELLERMAN²⁶. El espectro en hexano del insaponificable (Fig. 10) presenta un máximo hacia 465-475 $m\mu$ concordante con los citados habitualmente para el astaceno, revelando el parentesco del pigmento VIIc con la astaxantina. La cromatografía en fase gaseosa de la fracción que debería contener los ácidos grasos si se tratara de un éster, tras someterla al tratamiento metilante dio (Tabla III) resultados

TABLA III

Composición en ácidos grasos de la astaxantina diéster del músculo de las truchas (machos) capturadas en el mes de junio en el coto de Remellán (Palazuelo)

Ácidos grasos	(%)	Ácidos grasos	(%)
C14:0	8,7	C18:2	trazas
C14:1	0,9	C18:3	4,9
C16:0	27,9	C20:1	trazas
C16:1	17,5	C20:4	1,7
C17:0	1,3	C20:5	10,4
C18:0	8,3	C22:5	2,8
C18:1	10,6	C22:6	4,9

compatibles con lo esperable de un éster de astaxantina. Las pruebas de hidróxilos primarios y secundarios, alílicos o no, resultaron negativas. Se dedujo que se trataba de astaxantina diéster. Cocromatografiado con ella en lámina fina resultaron inseparables; la polaridad relativa, 1,85, concuerda con la determinada experimentalmente en una muestra de astaxantina diacetilada.

Fracción VIII.—Dicha fracción se eluye de la columna de alúmina con ácido acético, mostrando un espectro inespecífico en las muestras de, diciembre y junio y más definido en las de febrero. Se purificó en lámina fina de sílica gel G utilizando como fase móvil dioxano/hexano (80/20). Una alícuota se saponificó, registrándose el espectro del insaponificable en éter de petróleo observándose un espectro mucho más definido y con un máximo hacia 460-470 mμ. La reducción de otra alícuota produjo un espectro similar al de la astaxantina en su forma reducida. El coeficiente de reparto del pigmento original en hexano/metanol del 95 % dio un valor de 10/90, concordante con el esperable de cuatro grupos cetónicos²³ y el de la forma reducida de 6/94, concordante con el de la astaxantina (en su forma reducida). El pigmento fue identificado como astaceno.

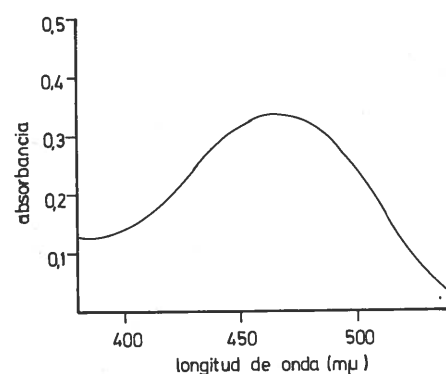


Figura 10.—Espectro en hexano de la fracción VIIc saponificada. Coto de Remellán.

En la Tabla IV queda recogida la abundancia relativa de los distintos carotenoides aislados del músculo de las truchas (machos y hembras) y las variaciones estacionales de la misma.

TABLA IV

Abundancia relativa de los distintos carotenoides aislados del músculo de la trucha y variaciones estacionales de la misma

	DICIEMBRE		FEBRERO		JUNIO	
	*Abundancia relativa Machos	Hembras	*Abundancia relativa Machos	Hembras	*Abundancia relativa Machos	Hembras
β caroteno	20,0	13,3	6,1	3,4	3,5	6,4
Cantaxantina	—	27,5	20,9	25,7	28,1	37,5
Pigmento IVa			0,7	0,8	2,3	1,8
Pigmento IVb						
Pigmento IVc						
Pigmento Va						
Pigmento Vb			1,4	2,5	1,6	6,0
Pigmento Vc						
Luteína	19,6	—	28,2	25,4	8,5	20,1
Zeaxantina	24,0	—	3,8	11,6	5,0	3,1
Astaxantina libre	—	59,2	19,0	9,4	24,6	17,3
» monoéster	30,2	—	12,6	16,5	13,8	7,1
» diéster	—	—	—	—	12,6	—
Astaceno	—	—	6,7	4,6	—	—
Ceto carotenoides (%)	36,2	86,7	53,0	58,5	79,0	61,9

* Calculada sobre la base de la absorbancia de las fracciones eluidas de la columna de alúmina y de la contribución a ella de los distintos pigmentos hallados tras el fraccionamiento y purificación en columna y lámina fina.

DISCUSION

El patrón de pigmentación de las truchas (*Salmo fario*) estudiadas, es muy complejo y comprende β caroteno, cantaxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina (libre, monoéster y diéster) y al menos otros seis carotenoides no identificados, tres de los cuales son α cetocarotenoides y otro un β cetocarotenoide. La mayoría de los pigmentos aislados e identificados en el presente trabajo, han sido puestos de manifiesto en el músculo de otras especies de salmónidos^{24, 28, 30}. La zeaxantina, detectada en el músculo de otros peces de agua dulce y salada, que nosotros sepamos, no ha sido previamente hallada en el músculo de los salmónidos.

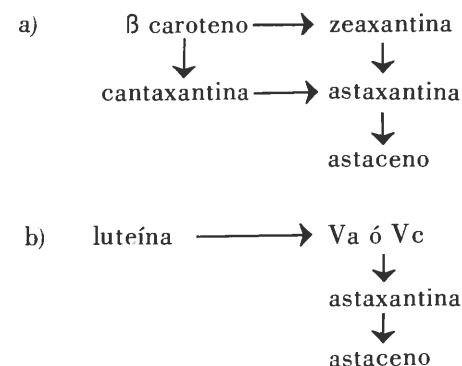
Que la coloración del músculo de las truchas varía con los pigmentos que recibe con la dieta ha sido numerosas veces comprobado^{3, 6, 25} pudiendo depositarse directamente cantaxantina, luteína, α y β carotenos, en pequeñas cantidades²⁴ y astaxantina^{3, 21}, dependiendo el depósito de los mismos no sólo de factores genéticos sino incluso de la forma física en que se ingieren³.

Estudios recientes^{17,18,24} han puesto de manifiesto que los pigmentos ingeridos pueden ser profundamente transformados.

El examen del contenido gastrointestinal de las truchas estudiadas¹ nos permite suponer que los carotenoides dominantes ingeridos a lo largo del año son: β caroteno y luteína y en cantidades más abundantes en la primavera que en el resto de las estaciones, equineona, cantaxantina e hidroxiequineona.

Como puede verse (Tabla IV) la cantaxantina y la astaxantina son los pigmentos dominantes en el músculo de las truchas a lo largo de todo el año.

Parece por todo ello razonable sugerir la operatividad de las siguientes rutas metabólicas:



El incremento en la pigmentación del músculo entre diciembre y junio es probablemente consecuencia de las oscilaciones sufridas por los carotenoides ingeridos con la dieta, deducibles del estudio del contenido gastrointestinal y del cambio que experimentan las condiciones ambientales⁶. A los mismos factores son atribuibles las modificaciones sufridas a lo largo del año por el patrón de pigmentación, observándose un predominio de los cetocarotenoides de diciembre a junio.

En general, cabe también destacar una mayor abundancia de carotenoides en los músculos de los machos que en los de las hembras, hecho explicable si se tiene en cuenta que los carotenoides existentes en el músculo de las hembras sufren un desplazamiento al ovario, durante la maduración de los huevos y etapas anteriores a la freza^{4,29}.

RESUMEN

Del músculo de las truchas *Salmo fario* capturadas a lo largo del año en dos zonas acotadas del río Porma (León) se aislaron diversos pigmentos carotenoides, identificándose los siguientes: β caroteno, cantaxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina (libre, monoéster y diéster) y astaceno y caracterizándose otros seis como cetocarotenoides.

Se observan cambios estacionales en la concentración de los mismos con una tendencia al incremento de los cetocarotenoides hacia el verano.

La abundancia relativa, en el tejido muscular, sugiere la formación de astaxantina a partir de β caroteno.

SUMMARY

The carotenoid pigments of the river trout *Salmo fario* and their seasonal evolution were investigated on trouts captured at different seasons in two defined zones of river «Porma» León (Spain). The following pigments were identified: β carotene, cantaxanthin, lutein, zeaxanthin, astaxanthin (free and mono and diester) and astacene. Six other minor pigments were also present.

Seasonal changes in total carotenoids as well as in the contribution of each one of the identified pigments with a trend towards a increase in the proportion of ketocarotenoids in summer are observed. A metabolic pathway leading from β carotene to astaxanthin operating in *Salmo fario* is proposed on the basis of presumable carotenoids diet content and relative abundance of pigments on trout muscle.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALVAREZ, P. (1975).-Tesis Doctoral Facultad de Biología (León) U. Oviedo.
- 2) BAMJI, M. S. and KRINSKY, N. (1966).-The carotenoid pigments of a radiation resistant *Micrococcus* species. *Biochim. Biophys. Acta*, **115**: 276.
- 3) BESSE, M. P. (1951).-La saumonisation artificielle des salmonides: truites et saumon de fontaine. *Compt. Rend.*, **233**: 637.
- 4) CROZIER, G. (1970).-En «Chemical Zoology». VIII cap. XIII. Pigments of Fishes, pp. 517-18. Ed. Florkin, M./Bradley, T. Academic Press, 1974.
- 5) DAVIES, B. H. (1965).-En «Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments». Analysis of Carotenoids Pigments. Chapter 18, Ed. T. W. Goodwin Academic Press.
- 6) DUREY, H., PETERSON, H., SAVAGE, G. M., WASHBURN, G. N. y WESTERS, H. (1966).-Natural coloration of trout using xanthophylls. *Trans. Amer. Fish Soc.*, **95**: 408.
- 7) FERNÁNDEZ, M. T. y BURGOS, J. (1977).-Fosfolípidos de las truchas de vida silvestre (*Salmo fario*); variaciones estacionales. *An. Fac. Vet. León*, **23**: 145.
- 8) FOLCH, J., LEES, M. y STAMLEY, G. H. S. (1957).-*J. Biol. Chem.*, **226**: 487.
- 9) GILCHRIST, B. M. y LEE W. (1967).-Carotenoids and carotenoid metabolism in *Carcinus maenas* (crustacea: decapoda). *J. Zool. Lond.*, **151**: 171.
- 10) GILCHRIST, B. M. y LEE, W. (1972).-Carotenoid pigments and their possible role in reproduction in the sand Crab, *Emerita analoga*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **42B**: 263.
- 11) HERRING, J. P. (1968).-The carotenoid pigments of *Daphnia*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **29**: 187.
- 12) JENSEN, S. L. (1962).-Kgl. Norske. Videnskab. Selskabs. Skrifter., **8**: 1.
- 13) JENSEN, S. L. y SCHIMIDT, K. (1963).-Die Carotinoide der thiorhodaceae. III Die Carotinoide von *rhodospirillum rubrum* Migula. *Archiv. für Mikrobiologie*, **46**: 138.
- 14) KANEMITSU, T. y AOE, H. (1958).-Studies on the carotenoids of Salmon. I. Identification of the muscle pigments. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**: 209.
- 15) KARRER, P. y JUCKER, E. (1950).-«Carotenoids». Elsevier N. Y.
- 16) KARRER, P. y LEUMANN, E. (1951).-Eschscholtzanthin und anhidroscholtzanthin. *Helv. Chim. Acta*, **34**: 445.
- 17) KATAYAMA, T., YOKOYAMA, H. y CHICHESTER, C. O. (1970).-The biosynthesis astaxanthin. *J. Biochem.*, **1**: 438.
- 18) KATAYAMA, T., KUNISAKY, Y., SHIMAYA, M. y SAMESHIMA, M. (1973).-The Biosynthesis of Astaxanthin. III.-The carotenoids in the Crab. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **39**: 283.
- 19) KRINSKY, N. I. y GOLDSMITH, T. H. (1960).-*Arch. Biochem. Biophys.*, **91**: 271.

- 20) KRINSKY, N. I. (1963).—A relationship between partition coefficients of carotenoids and their functional group. *Anal. Biochem.*, **6**: 293.
- 21) LAMBERTSEN, G. y BRAEKKAN, O. R. (1971).—Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. *J. Sci. Agric.*, **22**: 99.
- 22) NICOLA, M. y GOODWIN, T. W. (1954).—The distribution of carotenoids in some marine invertebrates. *Publ. Staz. Zool. Napoli*, **25**: 145.
- 23) PETRACEK, F. J. y ZECHMEISTER, L. (1956).—Determination of partition coefficients of carotenoids as a tool in pigment analysis. *Anal. Chem.*, **28**: 1.484.
- 24) SAVOLAINEN, J. E. T. y GYLLENBERG, H. G. (1970).—Feeding of rainbow trouts with *Rhodotula sanneii*. Preparations III. Amounts and qualities of carotenoids. *Lebensm. Wissm. Technol.*, **3**: 18.
- 25) SCHMIDT, P. J. y BAKER, E. G. (1969).—Indirect pigmentation of salmon and trout flesh with Canthaxanthin, *J. Fisheries Res. Bod. Can.*, **26**: 357.
- 26) SCHLENK, H. y GALLERMAN, J. L. (1960).—*Anal. Chem.*, **25**: 1.650.
- 27) SCHWARTZEL, F. M. y COONEY, J. J. (1972).—Isolation of 4'hydroxyechinenone from *Micrococcus roseus*. *J. Bacteriol.*, **112**: 1.422.
- 28) STEVEN, D. M. (1948).—Studies on animal carotenoids. I. Carotenoids of the brown trout. *J. Exp. Biol.*, **25**: 369.
- 29) STEVEN, D. M. (1949).—En «Chemical Zoology» VIII cap. XIII. Pigments of Fishes, p. 517. Ed. Florkin, M./Bradley, T. *Academic Press*, 1974.
- 30) THOMMEN, H. y GOOR, V. (1965).—Zum vorkommen von keto-carotinoiden in der forelle. *Naturwissenschaften*, **52**: 161.