

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

**EVALUACIÓN DE UNA DIETA CON INCLUSIÓN DE HARINA DE
SUBPRODUCTOS DE MANGO Y EXTRACTO DE JAMAICA SOBRE EL ESTRÉS
OXIDATIVO INDUCIDO POR BAJA TEMPERATURA EN TILAPIA (*Oreochromis
niloticus*)**

IBQ Gabriel Ebodio Armenta López

**Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de:
Maestría en Ciencias en el Área de Ciencias Agrícolas**

Tepic, Nayarit. Noviembre 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/273/15.

Xalisco, Nayarit; 26 de noviembre de 2015.

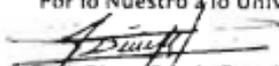
ING. ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Con base al oficio de fecha 23 de noviembre del presente, enviado por los CC. Dr. Edgar Iván Jiménez Ruiz, Dra. María Teresa Sumaya Martínez, Dr. Milton Spanopoulos Hernández, Dr. Manuel Iván Girón Pérez y Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza al C. Gabriel Ebodio Armenta López, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

"Por lo Nuestro a lo Universitario"


Dr. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente

&jas

Tepic, Nayarit a 23 de noviembre, 2015.

Asunto: Liberación de tesis del IBQ Gabriel Ebodio Armenta López

Dr. Juan Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado en Ciencias Biológicas Agropecuarias
Universidad Autónoma de Nayarit
P R E S E N T E

Los que suscribimos, integrantes del comité tutorial del IBQ Gabriel Ebodio Armenta López, declaramos que hemos revisado la tesis titulada "Evaluación de una dieta con inclusión de harina de subproductos de mango y extracto de jamaica sobre el estrés oxidativo inducido por baja temperatura en tilapia (*Oreochromis niloticus*)", por lo que otorgamos nuestra aprobación para continuar con los trámites correspondientes para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológico Agropecuarias, Área de Ciencias Agrícolas.

Comité Tutorial



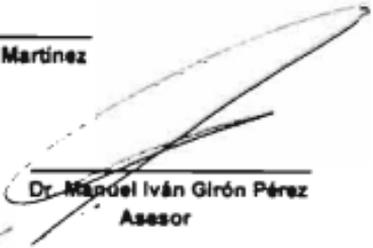
Dr. Edgar Iván Jiménez Ruiz
Director



Dra. María Teresa Samaya Martínez
Co-director



Dr. Milton Spanopoulos Hernández
Asesor



Dr. Manuel Iván Girón Pérez
Asesor



Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán
Asesor

AGRADECIMIENTOS

"Ser agradecido es demostrar la nobleza del alma"

Gracias al Dr. Édgar Jiménez y a la Dra. Teresa Sumaya por la oportunidad de crecer y lograr mis estudios de maestría.

Gracias a los doctores Milton Spanopoulos, Iván Girón y Eduardo Osiris por el gran apoyo para el desarrollo de este proyecto.

Gracias también a mis hermanos del laboratorio: Ernesto Rincones, Óscar Fregoso, Poleth Hernández y Adrián Alvarado por su invaluable amistad y su apoyo en tantas y tantas actividades durante estos 2 años.

Gracias al Dr. Rosendo Balois, al maestro Apatzingán Palomino y a la Dra. Mónica Sánchez por su gran amistad y por su apoyo tanto personal como académico durante mi estancia en la UAN.

Gracias también a mis amigos de la UTA: Mónica Martínez, Esteban Bello, Orlando Jiménez, Sara Hernández, Raquel Medina, Cristina Luna, Ramsés Benitez, Víctor Cabuto, Dinorah, Mary Graciano y a los que pude haber olvidado mencionar por tantos momentos de convivencia y trabajo que compartimos.

Gracias a todas aquellas personas que de alguna u otra forma estuvieron presentes y me apoyaron durante estos 2 años de estancia en esta gran Universidad.

Gracias a Conacyt por la beca que me fue otorgada por la realización de esta investigación y gracias también a la Universidad Autónoma de Nayarit y muy en especial al CBAP por la oportunidad de realizar estos estudios de posgrado.

DEDICATORIAS

Dedico este gran logro a mi familia, que desde que planeé realizar estos estudios me apoyó para que los hiciera y me impulsó a salir adelante ante todas las adversidades que surgieron durante estos 2 años.

Gracias a mi padre Juan Maria Armenta Armenta, que día a día con su ejemplo me guía por el camino del trabajo y la rectitud y que me hace saber que las cosas por las que se lucha son las que más saben cuando se logran. Te amo papá

Gracias a mi madre Crisanta Manuela López López que con su gran amor me impulsa a luchar por lo que quiero y deseo. Te amo mamá.

Gracias a mis pequeños, a Jesús Manuel Armenta López y María Lizbeth Armenta López. Ellos que día tras día me confirman que todos los sacrificios valen la pena cuando uno lucha por sus metas e ideales. Los amo hermanos.

RESUMEN

El estudio sobre el estrés oxidativo en organismos acuáticos ha venido cobrando gran importancia en los últimos años, particularmente en especies con mayor valor comercial como la tilapia. Se ha analizado con mayor amplitud la inducción de esta condición por la contaminación química o biológica del medio acuático, aunque se sabe que la alteración de algunos parámetros fisicoquímicos correspondientes a la calidad del agua como la temperatura así como la concentración de oxígeno y amonio provoca la inducción del estrés oxidativo. En este trabajo se analizó el impacto de la inclusión de harina de subproductos de mango cv. Ataulfo y un extracto acuoso de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fuente de antioxidantes naturales en la elaboración de una dieta funcional para tilapia (*O. niloticus*) sobre el estrés oxidativo inducido por un descenso abrupto de la temperatura. En la primera etapa, organismos de 158.59 ± 8.79 g fueron divididos en 3 tratamientos, según la dieta correspondiente: comercial, de referencia y con inclusión de harina de subproducto de mango y extracto de jamaica. Durante esta primera fase (6 semanas), los organismos fueron alimentados según su tratamiento para permitir el consumo de los antioxidantes contenidos en las mismas. En la etapa 2, la temperatura del agua se disminuyó de $27.8 \pm 0.90^\circ\text{C}$ a $18.49 \pm 0.09^\circ\text{C}$ y se mantuvo durante 24 h con la adición de agua-hielo. En la etapa 3, la temperatura fue reestablecida a $27.8 \pm 0.90^\circ\text{C}$ y mantenida durante 24 h. Se analizó la actividad antirradical y el contenido de algunos compuestos bioactivos en las dietas, así como el hígado y branquias de los organismos para determinar su posible bioacumulación. Respecto al estrés oxidativo, se analizaron algunos de los biomarcadores más empleados como lipiperoxidación, oxidación proteica y actividades enzimáticas de catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. En cuanto a la evaluación de actividad antioxidante en la dietas y el contenido de compuestos bioactivos, la dieta con mango y jamaica presentó los valores más elevados ($P < 0.05$), mientras que en los valores de biomarcadores de estrés oxidativo, los organismos alimentados con esta misma dieta presentaron los valores más bajos ($P < 0.05$). Los resultados del presente estudio sugieren que la DRMJ confiere un efecto quimioprotector a los organismos contra el estrés oxidativo inducido por bajas temperaturas del agua.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Tema	Página
Oficio de aprobación de Posgrado.....	ii
Oficio de aprobación de Comité Tutorial.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Dedicatoria.....	v
Resumen.....	vi
1. Introducción.....	12
2. Revisión de literatura.....	14
2.1 Biología y hábitat de la tiapia.....	14
2.1.1 Antecedentes históricos.....	14
2.1.2 Rasgos morfológicos.....	15
2.1.3 Países productores.....	16
2.2 El mango.....	18
2.2.1 Composición química y nutrimental del mango.....	18
2.2.2 Producción mundial del mango.....	21
2.3 La jamaica.....	21
2.3.1 Composición química y propiedades medicinales.....	24
2.3.2 Aprovechamiento de los desechos agroindustriales.....	24
2.4 Estrés oxidativo.....	25
2.4.1 Definición.....	25
2.4.2 Radicales libres.....	26
2.4.3 Causas de Estrés Oxidativo.....	277
2.4.4 Efecto de las bajas temperaturas sobre el estrés oxidativo de los peces.....	28
2.4.5 Daños causados por estrés oxidativo.....	29
2.4.5.1 Peroxidación lipídica (LPO).....	30
2.4.5.2 Oxidación de proteínas.....	31
2.4.5.3 Daño en ácidos nucleicos.....	31
2.4.6 Mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo.....	31

2.4.6.1 Antioxidantes	31
2.4.6.2 Enzimas	34
2.4.6.2.1 Catalasa	34
2.4.6.2.2 Glutación peroxidasa	36
2.4.6.2.3 Superóxido dismutasa	36
2.5. Antioxidantes en alimentos acuicolas	37
2.5.1 Fuentes de antioxidantes naturales	39
3. Justificación	42
4. Hipótesis	43
5. Objetivos	44
5.1 General	44
5.2 Particulares	44
6. Materiales y métodos	45
6.1 Diseño experimental	45
6.2 Elaboración de harina de subproductos de mango	45
6.3 Elaboración del extracto acuoso de jamaica	45
6.4 Elaboración de las dietas	47
6.5 Bioensayo	47
6.6 Determinaciones analíticas en las dietas	48
6.6.1 Análisis químico-proximal	48
6.6.1.1 Humedad	48
6.6.1.2 Proteína	48
6.6.1.3 Lípidos	49
6.6.1.4 Cenizas	50
6.6.2 Actividad antirradical y compuestos fenólicos totales	50
6.6.2.1 Actividad antirradical (DPPH)	50
6.6.2.2 Compuestos fenólicos totales (CFT)	51
6.6.3 Determinación de α -tocoferol y β -caroteno	51
6.7 Evaluación del estrés oxidativo	52
6.7.1 Cuantificación de proteínas	53
6.7.2 Cuantificación de grupos carbonilos (oxidación de proteínas)	53

6.7.3 Cuantificación de la peroxidación lipídica (LPO)	54
6.7.4 Determinación de la actividad de catalasa (CAT)	55
6.7.5 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx)	55
6.7.6 Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	56
6.8 Análisis de datos.....	57
7. Resultados y discusión.....	58
7.1. Composición químico-proximal de las dietas experimentales	58
7.1.2 Actividad antirradical y contenido de compuestos bioactivos.....	61
7.2 Organismos	64
7.2.1 parámetros zootécnicos	64
7.2.2 Parámetros físico-químicos del agua	64
7.2.3 Determinación de compuestos bioactivos antioxidantes en tejidos	66
7.3 Evaluación de marcadores de estrés oxidativo	70
7.3.1 Oxidación de lípidos	70
7.3.2 Oxidación de proteínas	75
7.3.3 Actividad enzimática de catalasa	79
7.3.4 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa	84
7.3.5 Actividad enzimática de superóxido dismutasa	89
8. Conclusiones	95
9. Perspectivas	96
10. Referencias	97
11. Anexos.....	111

ÍNDICE DE TABLAS

1. Composición nutrimental del mango.....	20
2. Clasificación de los antioxidantes en función al mecanismo de acción	33
3. Análisis proximal de insumos para dietas experimentales.....	59
4. Formulación de las dietas experimentales.....	60
5. Composición proximal de las dietas experimentales.....	62
6. Contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidantes de las dietas experimentales.....	63
7. Parámetros de evaluación biológica.....	65
8. Variables fisicoquímicas del agua para tilapia.....	67
9. Contenido de compuestos bioactivos en hígado.....	68
10. Contenido de compuestos bioactivos en branquias.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Descripción morfológica de la tilapia.....	16
2. Distribución geográfica de la tilapia en el mundo.....	17
3. El mango cv ataulfo.....	19
4. Cálices de jamaica.....	22
5. Esquema del ciclo redox en el estrés oxidativo.....	35
6. Distribución de tratamientos en tanques experimentales.....	46
7. Determinación de oxidación lipídica en hígado.....	71
8. Determinación de oxidación lipídica en branquias.....	73
9. Determinación de oxidación proteica en hígado.....	76
10. Determinación de oxidación proteica en branquias.....	78
11. Determinación de actividad de CAT en hígado.....	80
12. Determinación de actividad de CAT en branquias.....	82
13. Determinación de actividad de GPx en hígado.....	86
14. Determinación de actividad de GPx en branquias.....	87
15. Determinación de actividad de SOD en hígado.....	90
16. Determinación de actividad de SOD en branquias.....	92

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad económica muy importante para la alimentación humana ya que produce alrededor del 50% del pescado que se consume a nivel mundial. En México presenta un buen desarrollo debido a la adaptabilidad y susceptibilidad que tienen muchas especies a ser cultivadas, así como la gran aceptación de alimento que aporta. Especies como la trucha, carpa y tilapia son de las más cultivadas y esta última es de las que más rápidamente se ha introducido en la acuicultura, debido a su facilidad de manejo y capacidad de adaptación a condiciones adversas en su medio de cultivo; también porque presenta una gran demanda tanto en el mercado interno como en Norteamérica (FAO, 2011).

La tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) es un pez nativo de África, posiblemente el más importante dentro del grupo de peces de aguas cálidas y una de las especies predominantes en el comercio a nivel mundial. Gómez *et al.* (2003) afirman que las principales ventajas son su bajo costo de producción, calidad de carne, fácil reproducción y una rápida tasa de crecimiento. En México se producen alrededor de 80,000 t anuales de esta especie mediante la acuicultura, particularmente el estado de Nayarit se encuentra en los primeros lugares de producción, misma que asciende a 1,600 t anuales (CONAPESCA-CSPT, 2014).

La acuicultura tiene grandes retos por superar dentro de los que se encuentran el aumento de la producción, la disminución en los costos y situaciones que provocan la aparición de distintas patologías que interfieren con un buen desarrollo del cultivo. Se ha reportado que algunos factores, tales como los pesticidas, metales pesados, condiciones climáticas y fisicoquímicas adversas provocan estrés oxidativo. Esta condición fisiológica se define como la exposición de células o tejidos a un exceso de sustancias oxidantes, particularmente radicales libres y especies reactivas al oxígeno (EROs). Dicha situación conlleva al desequilibrio entre las sustancias oxidantes y las antioxidantes a favor de las primeras, provocado por factores como deficiencias en el sistema antioxidante, contaminación por químicos (xenobióticos) así como por cambios abruptos en la temperatura del agua, altas concentraciones de amonio y bajas concentraciones de oxígeno disuelto (Cruz *et al.*, 2011). Se han desarrollado numerosas investigaciones con el propósito de encontrar alternativas para erradicar

esta condición, sobre todo se han enfocado en la utilización de antioxidantes sintéticos y naturales suministrándolos a los organismos en cultivo, ya sea de manera directa (intraperitoneal), disueltos en el agua o bien mediante una dieta suplementada con la inclusión de estos compuestos antioxidantes (Sánchez, 2013).

Actualmente se ha optado por sustituir los antioxidantes sintéticos por naturales y con ello evitar los efectos adversos que estos conllevan, ya que se sabe que son cancerígenos (Sánchez, 2013). Los antioxidantes naturales que se han utilizado se extraen de distintas fuentes, tales como tomate, cebolla, brócoli y distintas especias culinarias como orégano, laurel, canela, clavo entre otros. Se sabe también que el mango tiene gran cantidad de compuestos bioactivos (tocoferoles y carotenoides, principalmente) así como la jamaica, que contiene antocianinas, quercetinas, otras sustancias polifenólicas y que además presenta propiedades antibacterianas, diuréticas e hipocolesterémicas (Barreto *et al.*, 2008; Hirunpanich *et al.*, 2005).

En el estado de Nayarit se encuentran algunas empresas que se encargan de despulpar mango, generando grandes cantidades de desechos de esta actividad y que necesitan ser empleados o eliminados de alguna forma amigable con el medio ambiente. Así mismo, en algunos municipios del estado se desperdician gran cantidad de cálices de jamaica que no alcanzan los estándares de calidad para ser exportados y es necesario conferirle valor agregado, para que los productores obtengan la mayor cantidad de ganancias y que continúen con su cultivo.

Las investigaciones que se han realizado han monitoreado el comportamiento de diversos parámetros denominados "biomarcadores de estrés oxidativo", dentro de los que se encuentran la oxidación de lípidos y proteínas, actividades enzimáticas de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-s-transferasa (GST), glutatión reductasa (GR). Estos marcadores se han evaluado en tejidos como hígado, branquias, riñón, sangre, bazo y músculo. Debido a que se buscan alternativas para disminuir o erradicar este problema mediante la aplicación de antioxidantes naturales, este estudio tiene como objetivo incluir harina de subproductos de mango y extracto acuoso de jamaica en una dieta como fuente de compuestos antioxidantes y evaluar el impacto sobre la condición de estrés oxidativo en tilapia sometidas un descenso abrupto de la temperatura del agua (estrés agudo).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Biología y hábitat de la tilapia

La tilapia del Nilo es una especie tropical que prefiere vivir en aguas someras. Las temperaturas letales son: inferior de 11-12 °C y superior de 42 °C, en tanto que la temperatura óptima de crecimiento oscila entre 26 y 32 °C. Es un organismo omnívoro que se alimenta de fitoplancton, perifiton, plantas, pequeños invertebrados, fauna béntica y desechos. Puede filtrar alimentos tales como partículas suspendidas, incluyendo el fitoplancton y bacterias que atrapa en las mucosas de la cavidad bucal, aunque la mayor fuente de nutrición la obtiene pastando en la superficie sobre las capas de perifiton (FAO, 2010).

En estanques, la tilapia alcanza su madurez sexual a la edad de 5 ó 6 meses y el desove inicia cuando la temperatura alcanza 24 °C. El proceso de reproducción empieza cuando el macho establece un territorio, excava un nido a manera de cráter y lo vigila. La hembra madura desova en el nido y tras la fertilización por el macho, la hembra recoge los huevos en su boca y se retira. Ésta incuba los huevos en su boca y cría a los organismos hasta que se absorbe el saco vitelino. La incubación y crianza se completa en un periodo de 1 a 2 semanas, dependiendo de la temperatura. Cuando se liberan las crías, estos pueden volver a entrar a la boca de la madre si les amenaza algún peligro, siendo una incubadora bucal materna. El número de huevos de una ovoposición es mucho menor en comparación con la mayoría de otros peces de cultivo (Soto, 2010; FAO 2011).

2.1.1 Antecedentes históricos

En 1978, la tilapia del Nilo se introdujo a China, actualmente el principal productor mundial y que continuamente ha producido más de la mitad de la producción global de 1992 a 2003. La cría incontrolada de tilapia en estanques que condujo a un excesivo reclutamiento, enanismo y un bajo porcentaje de peces de talla comercial, empañó el entusiasmo inicial que se había generado por la tilapia como un pez para alimentar a vastos sectores de la población. El desarrollo de técnicas de reversión sexual mediante hormonas en los años 70's representó un triunfo importante que permitió el cultivo de poblaciones monosexuadas hasta tallas comerciales uniformes.

Adicionalmente, la investigación en nutrición y sistemas de cultivo, junto con el desarrollo del mercado y avances de procesamiento, condujeron a una rápida expansión de la industria desde mediados de los años 80's. Se cultivan diversas especies de tilapia a nivel comercial, pero la tilapia del Nilo es la predominante mundialmente (FAO, 2010).

2.1.2 Rasgos morfológicos

La tilapia presenta un cuerpo comprimido, escamas cicloideas así como ausencia de protuberancia en la superficie dorsal del hocico. El primer arco branquial tiene entre 27 y 33 filamentos branquiales, la línea lateral se interrumpe, tiene espinas rígidas y blandas continuas, aleta dorsal con 16 o 17 espinas y entre 11 y 15 rayos. La aleta anal tiene 3 espinas y 10 u 11 rayos y posee aleta caudal trunca. Las aletas pectoral, dorsal y caudal adquieren una coloración rojiza en temporada de desove y una aleta dorsal con numerosas líneas negras (Figura 1).

2.1.3 Países productores

De acuerdo con la FAO (2011), la tilapia ha colonizado hábitats diversos, pues es un pez de aguas cálidas, dulces y salobres que puede adaptarse a bajas concentraciones de oxígeno, por lo que también es común que habite en aguas (lénticas), permaneciendo en zonas poco profundas y cercanas a las orillas. La tilapia se ha introducido en todo el mundo y se cría de manera generalizada en trópicos y zonas subtropicales. Aunque Asia domina la producción en la actualidad, se cría cada vez más en condiciones ambientalmente controladas en climas templados. Se encuentra naturalmente distribuida por América Central, sur del Caribe, sur de Norteamérica y el sudeste asiático y Medio Oriente y África (Figura 2).

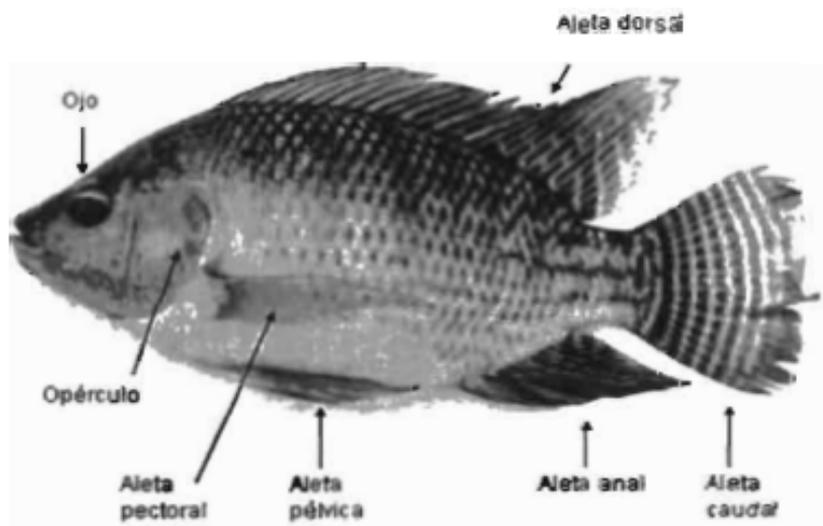


Figura 1. Descripción morfológica de la tilapia. Ubicación de los tejidos externos más importantes del organismo. Tomado de www.sagarpa.gob.mx



Figura 2. Distribución geográfica del cultivo de tilapia en el mundo. Tomado de www.sagarpa.gob.mx

2.2 El mango

El mango (*Mangifera indica* L.) (Figura 3) pertenece a la familia *Anacardiaceae* que incluye alrededor de 600 especies. Es una fruta popular y conocida como el rey de las frutas, se cree que es una de las más antiguas cultivadas, su origen se encontró en la región Indoburma (Asia, Birmania-India). La temperatura óptima de crecimiento de la planta es de 24°-27°C, en suelos con pH alrededor de 5.5-7.5, crece en zonas tropicales a una altitud de hasta 4,000 msnm y a 2,000 msnm y en zonas donde las estaciones estén muy marcadas (Purseglove, 1974). Es una fruta climatérica que en estado de maduración es ideal para consumo y tiene una vida de anaquel muy corta. De acuerdo con el Comité Sistema Producto Mango, en México existen diversas variedades como: Tommy, Haden, Ataulfo, Manila, Keitt, Manzana, Piña canario, Sensation y Kent, que se encuentran disponibles en verano (CSPM, 2010).

El tamaño del fruto varía de 2.5-30 cm de largo, su forma es ovalada o redonda, con un hueso interior de tamaño significativo, crece en árboles de hoja perenne, presenta grandes variedades de tamaño y caracteres. El color depende de la región donde este cultivado, pero abarca mezclas de verde, amarillo y rojo (Popenoe, 1974).

2.2.1 Composición química y nutrimental del mango

La semilla del mango abarca del 9 al 27% aproximadamente del peso total de la fruta, el color de su piel y pulpa varía con la madurez y el cultivo, es buena fuente de provitamina A y su contenido de carotenoides aumenta durante su madurez (Lako, 2007). La parte comestible del fruto corresponde entre el 60 y 75%, su componente mayoritario es el agua (84%), su contenido de azúcar varía entre 10-20% y con una baja cantidad de proteínas (0.5%). También contiene gran cantidad de ácidos, donde el predominante es el ácido cítrico, presentando cantidades considerables de ácido málico, succínico, urónico, tartárico y oxálico (Jagtiani *et al.*, 1988). El mango es una fruta popular y en su mayoría es consumido en estado fresco, ya que es considerada una de las frutas tropicales más deliciosas (Lako, 2007), es también una importante fuente de vitaminas y minerales (Tabla 1).



Figura 3. Mango cv. Ataulfo en madurez de consumo (*Mangifera indica* L.).

Tabla 1. Composición nutricional del mango por cada 100 g.

Componente	Contenido
Agua	81.7 g
Proteínas	0.7 g
Grasa	0.4 g
Carbohidratos totales	16.8 g
Fibra	0.9 g
Calcio	10 mg
Fósforo	13 mg
Hierro	0.4 mg
Sodio	7 mg
Vitamina A	4,600 UI
Tiamina	0.05 mg
Rivoflavina	0.05 mg
Niacina	1.1 mg
Ácido ascórbico	35 mg

Tomado de: Stafford (1983).

2.2.2 Producción mundial del mango

Los principales países productores de mango a nivel mundial son India, China, Pakistán, México, Tailandia, Indonesia y Brasil (FAOSTAT, 2011). En el año 2006, México participó con 6.1 % del total de la producción mundial por debajo de India, China y Pakistán. El rendimiento promedio mundial de los años 2004 a 2006 fue de 7.9 t por hectárea, según los datos estadísticos reportados por la FAO (2011). En la base de datos de la FAO se han reportado que algunos países obtienen hasta 40 ton por hectárea, como sucede en Samoa, o como en las Polinesias donde reportan más de 31 t por hectárea. Brasil, Pakistán y México son los países que han reportado los mayores rendimientos en los últimos años.

A nivel nacional se tienen plantadas aproximadamente 181,000 hectáreas (SAGARPA, 2012) y se producen mangos de diferentes cultivares, los cuales son consumidos o demandados para diversos fines, de hecho, nuestro país ocupa el primer lugar por volumen de exportación en el mundo. En México, la mayor parte de la superficie cultivada se ubica en los estados de Veracruz, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Sinaloa y Chiapas. En los últimos tres años, Guerrero con 295,952 ton, Sinaloa con 244,642 ton, Nayarit con 238,625 ton y Oaxaca con 197,971 ton, encabezan la lista con el mayor volumen producido. Cabe mencionar que éstos se encuentran en los primeros puestos en producción de este fruto debido a que cuentan con una amplia superficie para su plantación, así como por los altos rendimientos que obtienen (SAGARPA, 2012).

2.3 La jamaica

La planta de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Figura 4) es originaria del Continente Asiático y fue llevada a países africanos (Morton, 1987). Sin embargo, Wilson (1994) con base en estudios citogenéticos determinó que el centro de la biodiversidad genética del género *Hibiscus* sección *Furcaria*, se localiza en África. Eventualmente fue adaptada para su cultivo en regiones tropicales y subtropicales en diferentes países de Centro y Sudamérica, habiéndose introducido a México por los españoles en la Época Colonial (Morton, 1987).



Figura 4. Cálices de jamaica en madurez de consumo (*Hibiscus sabdariffa*). Tomado de Lin et al. (2007).

En Brasil se cultiva desde el Siglo XVII, pero llegó a la isla de Jamaica en 1707, donde fue bautizada con el nombre de ese país y alrededor de 1840 se empezó a cultivar en Guatemala.

El cultivo de la jamaica está muy ligado a la producción local y regional y se aprovecha en su mayoría en la venta del cáliz seco. Muchos de los productores le dan un valor agregado mediante la elaboración de productos simples, tales como infusiones concentradas, mermeladas, salsas, licor entre otros (Camelo *et al.*, 2013). Actualmente existen cuatro variedades con un número de registro provisional ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), cuyos nombres comunes son: alma blanca, cotzaltzin, tecoanapa y rosaliz. Asimismo, otras variedades que se pueden encontrar en las diferentes zonas productoras del país son conocidas como: criollas, jersey, china, reina, rica, victor, archer, ultima y real, en algunos casos el mismo material se conoce con diferente nombre en los estados productores (Lin *et al.*, 2007).

Los cálices de jamaica tienen gran diversidad de usos, como por ejemplo se le extraen sus pigmentos para utilizarse como colorantes en la industria textil y cosmética. Actualmente se comercializan distintos productos tales como el té, licores, jaleas, mermeladas y gelatinas, así como helado, jarabes, colorantes naturales, aderezos, conservas y bebidas refrescantes. Las hojas tiernas se consumen en ensaladas y se utilizan como alimento para aves y como abono orgánico. La fibra se emplea para elaborar cordones que sustituyen al cáñamo o yute, por último se extraen aceites comestibles a partir de la semilla (Araiza-flores *et al.*, 2014).

En México, se estima que su consumo asciende a 14 mil ton al año, de las cuales menos del 40% corresponde a producción nacional y el resto corresponde a la importada de países como Sudán, Nigeria y Senegal. La jamaica procedente de Sudán cuesta en el mercado nacional \$50 mexicanos pesos por kilo a mayoristas y se vende al consumidor final en \$75, precio muy por debajo del que se paga por la jamaica orgánica que se produce en México, que llega al comprador final a \$200. Cabe señalar que el bajo precio de la jamaica importada de Sudán se debe a que se ha sometido a un proceso industrial, mediante el cual le extrae gran parte de sus componentes principales (Medina *et al.*, 2013).

2.3.1 Composición química y propiedades medicinales

Los cálices de jamaica dentro de su composición proximal contienen agua, proteínas, grasa, fibra, cenizas, calcio, fósforo, hierro, tiaminas, riboflavina niacina y ácido ascórbico. Las semillas contienen también proteínas, ácidos grasos, celulosa y almidón (Abou *et al.*, 2011).

Las infusiones de jamaica son un poderoso astringente y favorecen la digestión, también son un buen agente emoliente y sedativo, además de utilizarse en condiciones biliares complicadas, en casos de tos, dispepsia y disuria. Por otro lado, se ha comprobado que la jamaica reduce la presión arterial, estimula el peristaltismo, y combinado con jugo de piña pulveriza los cálculos en el riñón (Mungole y Chaturvedi, 2011). En la actualidad, la población en general presenta factores de riesgo muy elevados para padecer enfermedades coronarias, por lo que instituciones del sector salud en México han propuesto el estudio en el consumo de la jamaica como una alternativa viable y efectiva para la prevención de dichos padecimientos y la reducción de grasas en el torrente sanguíneo (Lin *et al.*, 2012).

2.3.2 Aprovechamiento de los desechos agroindustriales

Actualmente en la industria de transformados de frutas y vegetales los principales destinos de los residuos orgánicos generados en sus procesos son la alimentación animal o desecho en vertederos. Sin embargo, estos subproductos contienen sustancias tales como azúcares, ácidos orgánicos, sustancias colorantes, proteínas, aceites y vitaminas que pueden ser de interés en la industria alimentaria, farmacéutica, química y cosmética. Durante las últimas décadas ha aumentado la industrialización de subproductos cítricos orientados a la extracción de flavonoides, hesperidina y naringina, empleados en la industria farmacéutica. Los carotenoides son utilizados como pigmentos naturales para mejorar la coloración de jugos, concentrados y bebidas refrescantes (Infoagro, 2002). En el caso de los subproductos de tomate, cada día es más valorado el licopeno, ya que estudios recientes lo han relacionado con la prevención de cáncer de próstata, así como una menor incidencia de afecciones coronarias. La cáscara de manzana es empleada en la alimentación animal, después de deshidratada puede emplearse para la

producción de pectina, además puede usarse directamente como fibra dietética o como relleno de tartas. La cáscara de mango también es utilizada para la extracción de pectina (Ferreira, 2001).

Otro desecho utilizado como fuente de fibra son las cáscaras de piña, que se usan para la elaboración de galletas, panques y tartas, la fibra del bagazo de caña se incorpora en tortillas y la de cítricos, mientras que la cebada y salvado se utilizan directamente como complementos de fibra (Pérez, 2003). Lo anterior hace constar que se busca dar uso a todos los subproductos o desechos de cualquier proceso industrial, ya sea incluyéndolos directamente en la elaboración de algún otro producto, o mediante la extracción de alguno de sus componentes químicos. En cualquiera de los dos casos, la intención final es conferirles valor agregado.

2.4. Estrés oxidativo

2.4.1 Definición

El estrés oxidativo se define como la condición en la que la concentración de sustancias prooxidantes es mayor a la de las antioxidantes, lo que conlleva a un desorden fisiológico en el organismo (Vinagre *et al.*, 2012). Un elemento clave en esta condición es el oxígeno, que puede considerarse un nutriente esencial para los mamíferos, ya que a partir de él obtienen la energía necesaria para satisfacer sus necesidades en la respiración celular, además, no puede ser sintetizado ni ser sustituido por otro elemento. A pesar de ser esencial, puede resultar tóxico suministrado en concentraciones elevadas e incluso en concentraciones similares a las del aire. En 1777 se describieron por primera vez los efectos negativos del oxígeno sobre los seres vivos, aunque inicialmente se pensó que la toxicidad del oxígeno se debía a que inactivaba directamente algunas enzimas celulares, posteriormente se propuso que los efectos nocivos del oxígeno se debían a los radicales libres y a otras especies reactivas del oxígeno (EROs) que se originaban a partir de él (Gershman, 1964). Esta hipótesis fue desarrollada y aceptada cuando se descubrió la superóxido dismutasa (SOD), una enzima que cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido (O_2^-) para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fridovich, 1975).

Los combustibles biológicos son oxidados por el oxígeno que se reduce escalonadamente en la cadena respiratoria liberando energía gradualmente. Esta reducción es completa en su mayor parte, pero hay una pequeña proporción (2-5%) en que se produce de manera incompleta, formándose moléculas con electrones no apareados en su última capa electrónica, que son extremadamente reactivas y se denominan radicales libres (Mataix y Battino, 2002).

2.4.2 Radicales libres

Un radical libre (RL) se define como cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura (Halliwell *et al.*, 1992). Como consecuencia, son extremadamente reactivos y por tanto tienen una vida corta y una concentración baja en su estado reactivo. Estos pueden ser catiónicos, aniónicos o neutros y normalmente son muy nocivos para la célula. Dependiendo del elemento al que pertenezca el electrón desapareado, serán radicales libres del carbono, azufre, oxígeno, siendo, estos últimos, los más abundantes y de mayor importancia biológica (Pryor, 1986; Cadenas, 1989).

En este contexto, son de gran importancia las denominadas especies reactivas (ER), entre las que destacan las especies reactivas del oxígeno (ERO) donde se engloban: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el anión peróxido (O_2^{2-}), el radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y compuestos no radicales, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2), el ozono (O_3) y el ácido hipocloroso (HClO) (Mataix y Battino, 2002). Estas moléculas se están produciendo continuamente en los sistemas biológicos, muchas son productos intermedios en diferentes reacciones enzimáticas y algunas resultan benéficas para el organismo (Southorn y Powis, 1988; Chanock *et al.*, 1994). No obstante, también algunas de estas especies reactivas pueden provocar graves daños celulares (Halliwell y Gutteridge, 1999). Así, el radical superóxido que se genera principalmente en la mitocondria, afecta a enzimas como la xantina oxidasa y aldehído oxidasa y se ha observado su participación en numerosos procesos citotóxicos, a pesar de ser una especie menos reactiva que otros radicales (Fridovich, 1976; McCord, 1979). Este es

un agente que no actúa directamente, sino que al metabolizarse por la superóxido dismutasa a H_2O_2 , puede actuar como fuente del mismo o de otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición (Cheeseman y Slater, 1993).

El H_2O_2 se produce principalmente en los peroxisomas (35%), en las mitocondrias (15%) y en el citosol (5%) y debido a su capacidad para atravesar las membranas biológicas (Chance *et al.*, 1979), puede producir lisis eritrocitaria, inactivación de enzimas como la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa en células de mamíferos y oxidación de ácidos grasos insaturados, etc. (Halliwell *et al.*, 1992). Al igual que el anión superóxido, presenta una reactividad química limitada. La importancia de la generación del O_{-2} y del H_2O_2 se centra en su capacidad para generar especies mucho más reactivas y peligrosas como el radical hidroxilo, que ataca prácticamente a todas las moléculas biológicas mediante reacciones en las que se ven implicados metales de transición, principalmente hierro y cobre (Halliwell y Gutteridge, 1989; 1990). Su reactividad es alta y prácticamente indiscriminada y se le considera uno de los principales iniciadores de la peroxidación lipídica (Ursini *et al.*, 1982).

Los radicales libres se producen generalmente en la célula a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero si promovida por iones metálicos de transición. En células animales esta producción puede ser derivada del cumplimiento de las funciones fisiológicas o bien producirse de manera accidental.

Los mecanismos de formación de los RL son tres:

1. Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
2. Pérdida de un protón de una molécula.
3. Rotura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace.

2.4.3 Causas de Estrés Oxidativo

El proceso de estrés oxidativo se ha considerado un mecanismo de toxicidad en los organismos y ha permitido su uso como herramienta de diagnóstico para predecir y evidenciar el impacto de los contaminantes sobre los mismos, especialmente los de

origen acuático (Eman y Engy 2014; Guzmán-Guillén *et al.*, 2013). Puede ser originado en peces por la contaminación del medio acuático por xenobióticos como plaguicidas organoclorados u organofosforados, pero también puede presentarse por factores físicos, como por ejemplo un aumento en la concentración de amonio, descensos en la concentración de oxígeno disuelto o descensos abruptos en la temperatura del agua, lo que se conoce como "shock" por frío. Este último se presenta cuando el organismo fue aclimatado o se desarrolla en un cierto rango de temperatura y esta desciende abruptamente, lo que genera una cascada de respuestas fisiológicas (Donaldson *et al.*, 2008; Vinagre *et al.*, 2012). De acuerdo con Auro y Ocampo (1999), el término de estrés agudo también aplica para estas condiciones, ya que se refiere a una situación en la que el pez es expuesto a perturbaciones extremas a corto plazo, como derrames de sustancias químicas o cambios radicales en la concentración de oxígeno, variaciones de temperatura o radiación ultravioleta (Marlek *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2011).

2.4.4 Efecto de las bajas temperaturas sobre el estrés oxidativo de los peces

De acuerdo con Luskchak (2011) y Madeira *et al.* (2013), se conoce desde hace tiempo que la temperatura del agua es un factor importante para la fisiología de los organismos acuáticos, pero no se conocen a ciencia cierta los mecanismos de acción del estrés oxidativo. Sin embargo, se tienen dos hipótesis:

1. A causa del descenso de la temperatura se debilitan los mecanismos de eliminación de EROs.
2. Un aumento en la producción de EROs.

Se han realizado pocos estudios sobre la condición fisiológica de los organismos acuáticos sometidos a temperaturas por debajo de la óptima, tales como el de Peruzzi y Chatain (2000) que trabajaron con *Dicentrarchus labrax*, Friedlander *et al.* (1976) con *Carassius auratus*, Peeters *et al.* (2001) emplearon *Cyprinus carpio* y Ju *et al.* (2002) con *Ictalurus punctatus*. Los resultados de estos estudios muestran que existe un efecto negativo por las bajas temperaturas en diversos parámetros biológicos en peces, afectando a los mecanismos enzimáticos antioxidantes (indicadores de estrés oxidativo) y los niveles de cortisol, glucosa y catecolaminas.

También se afectó la respuesta cerebral, actividad neuronal y comportamiento de los organismos. Al respecto, Wen *et al.* (2002) evaluaron algunos parámetros fisiológicos y hormonales en *Oreochromis mossambicus* que fueron diagnosticados con estrés oxidativo, debido a la disminución de la temperatura del agua desde 25°C hasta 12°C en 12 horas, afectándose los niveles de cortisol y la actividad de algunas enzimas antioxidantes. Verlecar *et al.* (2007) evaluaron el estatus antioxidante de mejillón (*Perna vindex*) en glándula digestiva y branquias, exponiendo a los organismos a bajas temperaturas, lo mismo que Castro *et al.* (2012) que evaluaron el estatus oxidativo en hígado de lenguado (*Solea senegalensis*). Ambas investigaciones encontraron un aumento en algunas de las actividades enzimáticas del sistema redox, así como en el nivel de peroxidación lipídica.

En los estudios anteriormente citados se ha encontrado que existe una relación entre la temperatura del agua y la fisiología de los peces y otros organismos acuáticos, desde cambios en parámetros de estrés como son el cortisol, glucosa-6-fosfato, catecolaminas así como de estatus oxidativo como oxidación de lípidos y enzimas del ciclo redox. Debido a esto surge la importancia de evaluar más parámetros de estrés oxidativo que puedan ser afectados por influencia de shock térmico por frío.

2.4.5 Daños causados por estrés oxidativo

La capacidad de cada radical libre o especie reactiva como agentes prooxidantes está determinada por factores como su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. De este modo, el radical hidroxilo reaccionará con cualquier molécula cercana, dada su elevada reactividad y baja especificidad y su peligro dependerá del compartimento celular en el que se origine o las moléculas a las que ataque. Especies menos reactivas, como el anión superóxido, reaccionarán más específica y selectivamente, teniendo incluso mayores consecuencias biológicas. El orden creciente de reactividad es $O_2^{\cdot-} < H_2O_2 < OH^{\cdot}$. Estos tres compuestos pueden introducirse en determinados compartimentos celulares dada su habilidad para atravesar las membranas e interactuar con pequeñas biomoléculas de bajo peso molecular como las vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos y lípidos, con macromoléculas como las proteínas y ácidos nucleicos o con estructuras

supramoleculares como las membranas y lipoproteínas (Valavanidis *et al.*, 2006; Stoyey, 1996; Ferreira *et al.*, 2005).

Los estados crónicos de estrés oxidativo aceleran los procesos de envejecimiento celular y daño neuronal asociados a los procesos degenerativos en seres vivos (Dumont y Beal, 2011). Dentro de las principales lesiones relacionadas con el estrés oxidativo, particularmente con el ataque de los radicales libres se encuentran la oxidación de las membranas lipídicas (peroxidación lipídica), de proteínas y de ácidos nucleicos (Hermes-Lima, 2005; Alves *et al.*, 2007). Los tejidos que acumulan más daño son los de mayor actividad metabólica, que en el caso de los peces son el hígado, riñón y branquias (Luskchak, 2011; Madeira *et al.*, 2013).

2.4.5.1 Peroxidación lipídica (LPO)

Este evento se ha reportado como uno de los efectos de la acción tóxica de contaminantes ambientales (Sayed *et al.*, 2003), que conduce a pérdida de función celular bajo condiciones de estrés oxidativo (Del Rio *et al.*, 2005). Ésta puede presentarse en lípidos que se encuentran en la membrana celular, hecho que puede alterar la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica, con un consecuente daño y muerte celular (Del Rio *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2007). La LPO proviene de una reacción en cadena, cuyos productos secundarios son capaces de inactivar enzimas, reaccionar con grupos específicos de proteínas e incluso interactuar con el ADN celular. Los ácidos grasos poliinsaturados son un sustrato afín para la peroxidación lipídica y su susceptibilidad aumenta a medida que se eleva el número de enlaces insaturados. Esta se inicia por la sustracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH₂-) en el ácido graso poliinsaturado (LH) generando el radical lipídico (L•) (Hermes-Lima, 2005). Posteriormente se genera un dieno conjugado que reacciona rápidamente con el O₂ para dar origen a un radical peróxido (ROO•) y se forma un hidroperóxido lipídico (LOOH) y un nuevo L•. Los hidroperóxidos lipídicos pueden reaccionar con algunos complejos de metales de transición para dar origen a los radicales alcoxilo (LO•) (Hermes-Lima, 2005).

2.4.5.2 Oxidación de proteínas

Resulta del ataque a las cadenas laterales de aminoácidos, particularmente los grupos tiol (S), los cuales son transformados a disulfuros, ácido sulfenilico y ciertos aminoácidos aromáticos. Esto conduce a una alteración en su estructura y función como en los puentes de hidrógeno de la estructura secundaria de las proteínas (Días-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006). El -OH puede remover protones de los grupos metileno de los aminoácidos llevando a la formación de carbonilos, los cuales tienden a ligar aminas de las proteínas o unirse covalentemente al ADN. Los cofactores de las proteínas también pueden modificarse, como en el caso de la transferencia de electrones al hierro de la hemoglobina, lo cual determina el desarrollo de metahemoglobinemia (Hermes-Lima, 2005; Gluszcak *et al.*, 2007).

2.4.5.3 Daño en ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son moléculas ricas en electrones que pueden unirse covalentemente a contaminantes electrofilicos, conduciendo a la oxidación y fragmentación de desoxirribosas, ruptura y modificación de las bases nitrogenadas (sitios apurínicos) (Valavanidis *et al.*, 2006). La modificación más importante del ADN después del ataque por radicales libres y más usado como biomarcador de estrés oxidativo y genotoxicidad en el organismo vivo es el 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), producto de la hidroxilación de la guanosina (Ansari *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006).

2.4.6 Mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo

2.4.6.1 Antioxidantes

A pesar del daño oxidativo que pueden originar los radicales libres, el organismo cuenta con una serie de sistemas de defensa antioxidante que intentan neutralizar la agresión. Un antioxidante se define como cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo (Halliwell y Gutteridge, 1988; Mataix y Battino, 2002). Según Valko *et al.* (2006). En general, un antioxidante puede desarrollar alguna o varias de las siguientes actividades:

- Atenuar, reducir o incluso anular específicamente la actividad de los radicales libres.
- Quelar metales implicados en el estrés oxidativo como el hierro y cobre.
- Proteger la membrana celular
- Interactuar con otros antioxidantes.

Los sistemas antioxidantes del organismo se caracterizan por su heterogeneidad, ya que pueden estar localizados intra y extracelularmente en multitud de tejidos, pueden ser hidrosolubles y liposolubles y proceder de diferentes fuentes ya que algunos son nutrientes propiamente dichos o provienen de ellos y otros son productos del metabolismo. Existen varias clasificaciones de antioxidantes, según distintos aspectos de los mismos (localización, función, procedencia). La más ampliamente aceptada es la que los agrupa en función de su mecanismo de acción (Tabla 2).

Estos sistemas antioxidantes se producen de forma constante en el organismo, al igual que los radicales libres que pueden agredir la propia estructura celular con pérdida de la misma, así como de su funcionalidad. Ante esta agresión oxidante, el organismo responde intentando neutralizarla, utilizando la defensa antioxidante. Cuando la agresión supera la defensa, se habla de una situación de estrés oxidativo (Mataix y Battino, 2002), es decir, el balance oxidativo existente entre la producción de radicales libres y la de defensas antioxidantes se rompe, ya sea por una sobreproducción de los primeros o por una reducción de las segundas (Halliwell *et al.*, 1992; Halliwell y Chirico, 1993).

Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes en función de su mecanismo de acción

Tipo de Defensa	Mecanismo de acción	Agentes Antioxidantes
Prevención	Impiden la formación de RL: - Descomponen el H ₂ O ₂ - Quelan metales	CAT, GPx, SOD, transferrina, ceruloplasmina
Eliminadores de radicales (scavenger)	Inhiben el inicio de la cadena y rompen la propagación	Vitamina A, E, C, Coenzima Q ₁₀ , Flavonoides y polifenoles
Reparación y síntesis de Novo	Reparan los daños y reconstituyen la membrana celular	Enzimas reparadoras de ADN, proteasas, transferasas

Tomado de Avello y Suwalsky, 2006

2.4.6.2 Enzimas

Se trata de compuestos que proporcionan una función protectora frente a los oxidantes biológicos, disminuyendo la concentración intracelular de radicales libres. Entre ellas destacan la CAT, SOD y GPx. Estas forman parte de un ciclo de óxido-reducción (Redox), en el que la función de una de ellas depende de la otra. Además, como se sabe necesitan de algunos cofactores para funcionar, tales como el hierro y cobre, además de algún compuesto bioactivo como tocoferoles o carotenoides para regresar a la enzima a su estado inicial (Figura 5).

2.4.6.2.1 Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

Se trata de una enzima presente en todas las células animales, plantas y bacterias aeróbicas (Mates *et al.*, 1999). Dentro de las células se encuentra principalmente en los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%) (Nieto, 1993), aunque también se ha localizado en las mitocondrias (Prasad *et al.*, 1994), mostrando una mayor actividad en hígado y eritrocitos. Se trata de una hemoproteína ferroporfirinica con un peso molecular aproximado de 240 kDa (Djordjevic, 2004), que presenta una doble función catalítica-peroxidica. Por un lado, cataliza la reducción de H_2O_2 a agua y oxígeno (Alía y Linden, 1990), observándose que una sola molécula de catalasa puede reducir 6 millones de moléculas de H_2O_2 por minuto (Valko *et al.*, 2006). Esta enzima tiene constantes de velocidad relativamente elevadas, pero presenta una baja afinidad por el sustrato, de manera que son necesarias altas concentraciones de H_2O_2 para activarla. En algunas investigaciones se ha observado que puede verse inactivada a concentraciones de H_2O_2 superiores a 0.1M. Por otro lado, su papel peroxidico se basa en la oxidación de un dador de hidrógeno como el metanol, etanol, fenoles, etc., con el gasto de un mol de peróxido o con el consumo de los hidroperóxidos alquilo (Alía *et al.*, 2005). El predominio de una actividad u otra depende de la concentración de donadores de hidrógeno y de la concentración o producción de H_2O_2 en el sistema (Aebi, 1984).

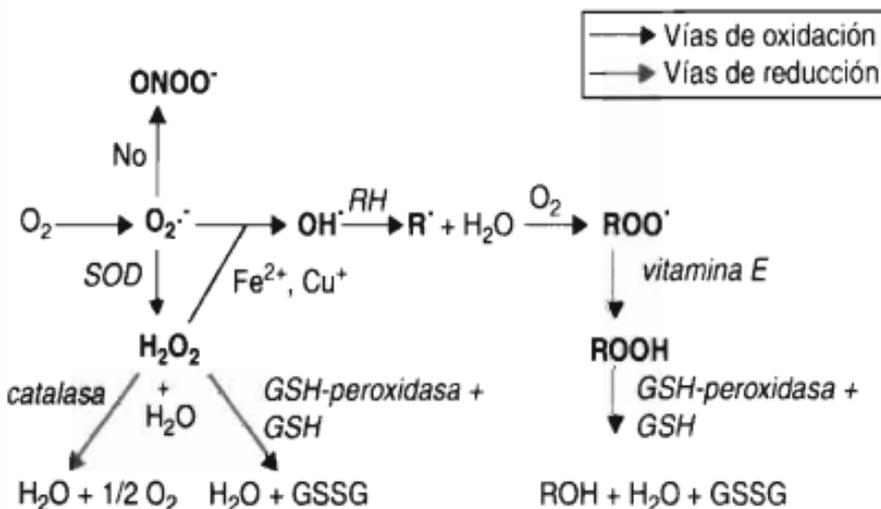


Figura 5. Esquema del ciclo redox. Función de las enzimas antioxidantes. Tomado de Calderón *et al.*, 2013.

2.4.6.2.2 Glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9)

Esta enzima forma parte del grupo de las peroxidasa, las cuales utilizan una gran variedad de donantes de electrones para reducir el H_2O_2 , obteniendo dos moléculas de agua. Están ampliamente distribuidas en las levaduras, plantas, bacterias y en los mamíferos. La glutatión peroxidasa está presente tanto en el citosol (70%) como en la mitocondria (30%) de las células eucariotas (Spalholz y Boylan, 1991). Es un homotetrámero con un peso molecular aproximado de 80 kDa y cuenta en su estructura con cuatro átomos de selenio y grupos sulfhidrilo libres (Nakamura *et al.*, 1974; Chiu *et al.*, 1976). Existen dos formas de esta enzima, una independiente de selenio, activa frente a hidroperóxidos orgánicos y H_2O_2 y otra dependiente de selenio, cuya afinidad por el peróxido de hidrógeno es menor (Mates *et al.*, 1999).

Todas las enzimas con actividad de glutatión peroxidasa catalizan la reacción de los hidroperóxidos, como la del H_2O_2 con el glutatión reducido (GSH), formándose glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y el producto de la reducción del hidroperóxido (Alia *et al.*, 2006b). Estas reacciones llevan acoplado el ciclo del glutatión, de manera que su forma oxidada es reducida por la glutatión reductasa en un proceso dependiente de un reductor como es el NADPH (Alkanhal *et al.*, 2001), el cual se ha propuesto recientemente como antioxidante capaz de neutralizar radicales libres tóxicos y reparar biomoléculas derivadas de los radicales (Kirsch y de Groot, 2001). Esta reacción es esencial para el mantenimiento de los niveles de glutatión reducido.

2.4.6.2.3 Superóxido dismutasa (SOD, 1.15.1.1)

Son las principales enzimas implicadas en la desintoxicación de las EROs mediante el secuestro del radical $O_2^{\cdot-}$ que sufre una dismutación para producir H_2O_2 y oxígeno (Alia *et al.*, 2006a). Se trata de un grupo de metaloproteínas (CuZnSOD, MnSOD, FeSOD y NiSOD), que contienen el correspondiente ión o cofactor metálico (Fridovich, 1998). La FeSOD ha sido aislada en plantas y procariontes mientras que la CuZnSOD, MnSOD y la FeSOD han sido descritas en mamíferos. La CuZnSOD es una enzima intracelular localizada en el citosol, núcleo y peroxisomas de todas las células eucariotas (Crapo *et al.*, 1992), su peso molecular aproximado es de 32kDa y está constituida por dos subunidades idénticas (Tainer *et al.*, 1982), conteniendo

cada una Cu (II) y Zn (II). El Cu (II) es el responsable de su actividad catalítica y puede alternarse entre el estado cuproso y cúprico durante el ciclo catalítico, mientras que el Zn (II) estabiliza la conformación de la enzima (Rotilio *et al.*, 1972). En el citosol, esta enzima puede ser inactivada por el H₂O₂ con la consiguiente formación de Cu (II)-OH, o bien su forma ionizada Cu (II)O⁻ (Hodgson y Fridovich, 1975), además, puede catalizar la peroxidación de numerosos compuestos.

La MnSOD se localiza en la mitocondria donde puede existir en forma dimerica o tetramérica, de manera que cada subunidad contiene un ión Mn (II). En las células eucariotas se encuentra como un homotetrámero localizado en la matriz mitocondrial. Las ERO inducen la expresión de esta enzima, la cual protege la mitocondria de su toxicidad, sobre todo frente al radical O₂⁻ producido durante el transporte electrónico mitocondrial. Además de las citoquinas (proteínas de bajo peso molecular que regulan la interacción de respuestas del sistema inmune), una amplia variedad de metabolitos de las EROs pueden inducir su expresión en distintas células que juegan un papel decisivo en la patogénesis de determinadas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Yoshioka *et al.*, 1994). Es importante mencionar que su mayor actividad se expresa en hígado, corazón y páncreas. Por último, las SOD extracelulares presentan menos actividad que las intracelulares y actúan principalmente en el útero, glándulas tiroideas, páncreas, cordón umbilical y vasos sanguíneos, constituyendo cerca del 70% de su actividad aquella que realiza en las arterias tanto a nivel pulmonar como sistémico (Oury *et al.*, 1996a). Estas regulan tanto los niveles extracelulares del anión superóxido como la actividad del óxido nítrico. Una actividad excesiva de SOD debe ir acompañada de actividad catalasa o glutatión peroxidasa, ya que de no ser así, se acumularía H₂O₂ y se promovería la formación del peligroso radical hidroxilo (Oury *et al.*, 1996b).

2.5. Antioxidantes en alimentos acuícolas

Los alimentos comerciales para la acuicultura tienen la inclusión de antioxidantes de tipo sintético, que se emplean para la preservación de los mismos; entre los más empleados se encuentran el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y el propil galato (PG) (Moure *et al.*, 2001). El problema de estos agentes es que su uso

está restringido en varios países debido a su toxicidad y los efectos negativos que pueden causar a quien los consume, ya que se ha comprobado su efecto cancerígeno y tetrarogénico (Ito *et al.*, 1983; Fraga, *et al.*, 1996). Por lo anterior, ha aumentado el interés por obtener y utilizar antioxidantes de origen natural, ya que se consideran más seguros que los sintéticos. Un gran número de especias y hierbas contienen compuestos que pueden ser extraídos y añadidos a sistemas alimentarios para prevenir su oxidación y causar un efecto benéfico en el consumidor final (Lee y Shibamoto, 2002; Ahn *et al.*, 2007; Rojas y Brewer, 2008; Sasse *et al.*, 2009).

En los últimos años, los antioxidantes naturales provenientes de plantas y sus frutos han sido muy usados en diferentes campos de la industria como preservantes en alimentos y en medicina. Muchos de estos compuestos como la quercetina, α -tocoferol y el β -caroteno presentan una actividad comparable con antioxidantes sintéticos de mayor uso como el BHT y el BHA. Se han realizado gran cantidad de investigaciones para analizar el impacto de suplementar los alimentos acuícolas con antioxidantes naturales. He y Lawrence (1993) observaron en camarones juveniles (*L. vannamei*) que al incrementar el contenido de vitamina E dietética se suprimió la oxidación de lípidos en tejidos hepatopancreático y muscular. Otro estudio en peces realizado por Waagbo *et al.* (1993) demostró un mejoramiento de la respuesta inmune de los organismos al suplementar vitamina C en la dieta. Esto lo atribuyeron al fortalecimiento de su mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo que es causado por toxicidad al aldrin y lindano, concentraciones altas de amonio, baja de concentración de oxígeno.

Por otro lado, Amin y Hashem (2012) realizaron un estudio en bagre (*Clarias gariepinus*), donde se probó la inclusión de α -tocoferol en las dietas sobre el estrés oxidativo causado por deltametrina. Ellos encontraron que la inclusión de este antioxidante ayuda a disminuir el estrés oxidativo. Así mismo, Welker y Congleton (2008) evaluaron el efecto de α -tocoferol combinado con ácido ascórbico (AA), hierro y selenio sobre el estrés oxidativo en salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*), observando que ambos compuestos tienen un efecto positivo sobre el estrés. A su vez, Pan *et al.* (2011) evaluaron la respuesta antioxidante en pez gota de sangre (*Hyphessobrycon eques*) alimentado con adición de β -caroteno y astaxantinas. Estos

autores obtuvieron resultados que demuestran que dichos antioxidantes disminuyen el estrés oxidativo causado por altas concentraciones de amonio. Nakano *et al.* (1999) analizaron el impacto de la suplementación de levadura roja (*Phaffia rhodozyma*) rica en astaxantinas sobre el estrés oxidativo en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y encontraron que la inclusión de este microorganismo ayuda a mantener los niveles de peroxidación lipídica al mínimo.

2.5.1 Fuentes de antioxidantes naturales

Existen diversas fuentes de antioxidantes naturales tales como el tomate, la zanahoria, la cebolla, entre muchas otras frutas y verduras, así como un gran número de especias culinarias (orégano, comino, canela) que contienen antioxidantes como sustancias polifenólicas, tocoferoles, carotenoides y otros compuestos. Dentro de las frutas, el mango es fuente de diversos compuestos antioxidantes, la pulpa de dicho fruto presenta una concentración significativa de compuestos bioactivos, tales como vitamina A, vitamina C, vitamina E, polifenoles y carotenos. En su composición destaca la presencia de una sustancia denominada manguiferina, que en animales de experimentación parece ejercer una acción antioxidante, inmunomoduladora, antiviral y antitumoral (Guha *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2000). Las cáscaras y el hueso del mango que pueden considerarse desechos, contienen compuestos bioactivos, tales como pectina, polifenoles y manguiferina en las cáscaras. Se ha reportado una importante actividad antimicrobiana y antioxidante en extractos de hueso de mango, debido a la gran cantidad de compuestos de fenólicos que contiene (Engels *et al.*, 2009; Ribeiroa *et al.*, 2008; Soong y Barlow, 2004; Maisuthisakula y Gordon, 2009).

Por otro lado, los cálices de la jamaica, que es una planta perteneciente a la familia de las Malváceas (Morton, 1987), contienen diversos compuestos bioactivos como ácido ascórbico, anisaldehído, antocianinas, β -caroteno, β -sitosterol, ácidos málico y cítrico, pectina y quercetina (Hirunpanich *et al.*, 2005; Duke *et al.*, 2003; Li, 2002). A los extractos que se obtienen a partir de los cálices se les han atribuido diversas propiedades como efectos diuréticos y reducción de los niveles de colesterol (Duke *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2002). Por la actividad antioxidante de sus antocianinas,

también pueden ayudar en la prevención y tratamiento de algunos tipos de cáncer (Chen *et al.*, 2003).

Respecto al sector agroindustrial, cabe mencionar que el estado de Nayarit presenta un desarrollo elevado y sostenido, con la existencia de diversas fábricas que producen y transforman grandes cantidades de alimento. Como ejemplo de lo anterior están la industria del mango (*Manguifera indica* L.) y la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), cuya producción se estima en 266,875 y 253.38 ton anuales, respectivamente (SAGARPA-SIAP, 2013). Estos productos presentan algunos inconvenientes durante su producción y procesamiento, en el caso del mango se tienen dos principales, por un lado las grandes pérdidas durante la etapa de post cosecha y el otro es la gran cantidad de desechos que se generan durante su transformación industrial (obtención de la pulpa) como son el hueso, la cáscara y la pulpa adherida a la misma, lo cual representa entre el 35% y el 60% del peso total del fruto (Larrauri *et al.*, 1996). En el caso de la jamaica, ésta presenta grandes pérdidas durante su cosecha y el secado, además de una baja demanda, no solo en el estado sino en todo el país, ya que generalmente se utiliza para preparar infusiones y bebidas.

Como se mencionó anteriormente, se ha investigado el impacto positivo que tienen los antioxidantes para eliminar o minimizar el estrés oxidativo, siendo de mayor relevancia los de origen natural. En este ámbito, los subproductos del procesamiento agroindustrial del mango como la cáscara y el hueso (Sumaya-Martínez *et al.*, 2012) son una fuente muy importante de compuestos con elevada capacidad antioxidante, particularmente vitaminas A, C y E, polifenoles y carotenoides (Barreto *et al.*, 2008; Berardini *et al.*, 2005; Engels *et al.*, 2009; Robles *et al.*, 2009; Ajila *et al.*, 2008). Así mismo, se ha reportado que los extractos acuosos de jamaica presentan propiedades antipiréticas (Reanmongkol e Itharat, 2007), antibacterianas (Castillo-Juárez *et al.*, 2009; Yin y Chao, 2008); diuréticas, antimicóticas, hipocolesterolémicas, antiinflamatorias y antioxidantes (Márquez *et al.*, 2007). Lo anterior se ha asociado a la presencia de moléculas con actividad antioxidante tales como polifenoles, quercetina, ácido L-ascórbico y antocianinas (Maganha *et al.*, 2010).

Incluir en la alimentación acuícola fuentes naturales de antioxidantes como los subproductos del mango (cáscara, hueso y pulpa pegada a ambos) y un extracto acuoso de jamaica, además de proveer una concentración significativa de compuestos bioactivos, aportará valor agregado a un subproducto agroindustrial como el mango y a un producto poco explotado como la jamaica. Por otro lado, puede conferir propiedades funcionales a estos alimentos para contrarrestar el estrés oxidativo en las especies donde se empleen.

3. JUSTIFICACIÓN

El estrés oxidativo comprende un importante aspecto de la toxicología acuícola, por lo que se buscan alternativas para erradicarlo o minimizar sus efectos en los organismos. Se ha encontrado una gran correlación del estrés oxidativo con la ingesta de alimentos industrializados, contaminantes y factores ambientales como cambios bruscos de la temperatura del agua. De acuerdo a lo anterior, se considera importante la inclusión de harina de subproductos de mango y extracto acuoso de jamaica como fuente de antioxidantes naturales en la elaboración de alimento para tilapia, que le confieran efectos positivos para contrarrestar esta condición y proporcionen valor agregado a los mismos.

4. HIPÓTESIS

Una dieta formulada con inclusión de subproductos de mango y extracto de jamaica promoverá la reducción del estrés oxidativo inducido por bajas temperaturas en tilapia (*Oreochromis niloticus*).

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto de una dieta con inclusión de subproductos de mango y extracto de jamaica sobre el estrés oxidativo inducido por baja temperatura en tilapia (*O. niloticus*).

5.2 Particulares

1. Evaluar la actividad antioxidante de las dietas experimentales.
2. Evaluar el contenido de α -tocoferol y β -caroteno en las dietas experimentales.
3. Analizar la bioacumulación de α -tocoferol y β -caroteno en branquias e hígado de tilapia alimentada con la dieta experimental.
4. Analizar el nivel de peroxidación lipídica y proteica en branquias e hígado de tilapia alimentada con la dieta experimental.
5. Analizar la actividad de marcadores enzimáticos relacionados con estrés oxidativo en branquias e hígado de tilapia alimentada con la dieta experimental.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar, de un factor (tipo de dieta) con tres niveles (3 diferentes dietas). Según lo descrito por Marques (1990), se menciona que dicho diseño se emplea adecuadamente cuando las unidades experimentales son suficientemente homogéneas y afirma que es un diseño flexible en cuanto al número de tratamientos a contrastar, así como la cantidad de repeticiones a realizar. La distribución de los tratamientos en los tanques experimentales (bioensayo) se muestra en la figura 6.

6.2 Elaboración de harina de subproductos de mango

Para elaborar la harina de subproductos del mango se emplearon frutos de mango cultivar ataulfo (*Mangifera indica* L.), mismos que se despulparon en un despulpador tipo planta piloto para obtener los subproductos. Posteriormente, éstos se molieron y secaron en un secador solar y por último se pulverizaron y tamizaron con una luz de malla de 400 μm para obtener finalmente la harina.

6.3 Elaboración del extracto acuoso de jamaica

Para la elaboración de este extracto se empleó la metodología de Prenesti *et al.* (2007), que consiste en colocar a ebullición un gramo de cálices de jamaica secos y triturados en 100 mL de agua destilada por 3 minutos, para posteriormente filtrar el extracto con papel filtro.

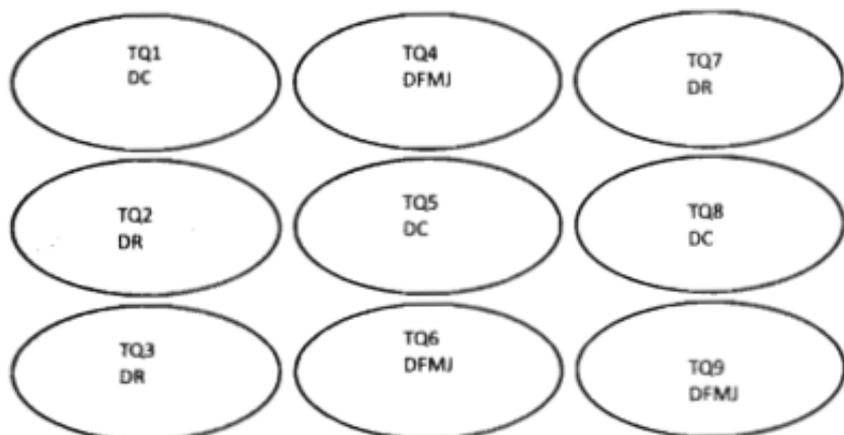


Figura 6. Distribución aleatoria de los tratamientos en los tanques experimentales en la sala de bioensayos.

Acotaciones:

TQ: Tanque

DC: Dieta comercial

DR: Dieta de referencia

DFMJ: Dieta con mango y jamaica

6.4 Elaboración de las dietas

Se elaboraron dos dietas, de referencia (DR) y de referencia con inclusión de subproductos de mango y extracto de jamaica (DRMJ) con 35% de proteína y 8% de lípidos, utilizando como base la propuesta por Bureau y Cho (1994), que contiene los siguientes insumos: harina de pescado, harina de soya, harina de trigo, aceite de pescado, gluten, cloruro de colina, vitaminas y minerales. La dieta DR contenía solo los insumos mencionados, mientras que la DRMJ contó con la inclusión del 10% de harina de subproductos de mango y 60 mL de extracto acuoso de jamaica por cada 100 g de mezcla de insumos secos. Se mezclaron los insumos secos, posteriormente se agregó aceite de pescado, agua o extracto de jamaica y se peletizó en un molino de carne con un dado de 3 mm y se colocó en un secador solar. Para el caso del grupo comercial se utilizó el alimento marca Winfish-Zeigler, que reporta en su tabla nutricional un mínimo de 35% y 8% de proteína y lípidos, respectivamente.

6.5 Bioensayo

Los organismos de estudio fueron machos de tilapia (*O. niloticus*) variedad *chitalada*, alimentados con dieta comercial hasta llegar a un peso aproximado de 180 g, para posteriormente iniciar los tratamientos con sus respectivas dietas durante 6 semanas. Los organismos se distribuyeron en 9 tanques de 500 L, mismos en los que la temperatura se mantuvo a $27.8 \pm 0.90^{\circ}\text{C}$ durante esta etapa 1. Una vez transcurrido este tiempo, se disminuyó la temperatura (con agua-hielo) en los 9 tanques hasta $18.49 \pm 0.09^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo durante 24 h (etapa 2). Posteriormente se restableció la temperatura a 28°C durante 24 h para observar si existe una recuperación en los parámetros de estrés oxidativo evaluados (etapa 3). Se tomaron muestras de branquias e hígado para determinar la concentración de compuestos bioactivos (α -tocoferol y β -caroteno) al inicio y al término de la etapa 1. Para analizar los parámetros de estrés oxidativo (oxidación de lípidos y proteínas y actividades enzimáticas) se realizaron 2 muestreos de hígado y branquias en cada etapa, a las 12 y 24 horas. Se sacrificaron 4 organismos por tanque en cada uno de los muestreos para la extracción de los tejidos, de los cuales se elaboró un pool. De esta manera, se obtuvieron 3 distintos pools (tres tanques) como triplicado por cada tratamiento.

6.6 Determinaciones analíticas en las dietas

6.6.1 Análisis químico-proximal

Para formular y elaborar las dietas fue necesario conocer la composición químico-proximal de los insumos (humedad, proteínas, lípidos y cenizas), así mismo para las dietas ya elaboradas para corroborar que cumplen con los requerimientos nutricionales de los organismos a alimentar.

6.6.1.1 Contenido de humedad

El método utilizado para determinar el contenido de humedad fue el propuesto por Olvera *et al.* (1993). Este se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. El principio operacional del método incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra, se expresa en porcentaje y se utiliza estufa y balanza analítica. La fórmula para determinación de humedad fue la siguiente:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{p1 - p2}{p2 - p3} \times 100$$

Dónde:

p1 = Peso inicial de la charola con muestra

p2 = Peso final de la charola con muestra

p3 = Peso de la charola sin muestra

100 = Factor para convertir el resultado a porcentaje

6.6.1.2 Contenido de proteína

El método utilizado para la determinación del contenido de proteína fue el de la AOAC (1990), que consiste en la técnica del microkjeldahl. Este método consistió en colocar 0.2 g de muestra seca en el matraz Kjeldahl, agregar 4 mL de ácido sulfúrico concentrado y colocar en una parrilla a 400°C, dejar pasar 6 min y agregar 10 mL de H₂O₂ al 30% y dejar en la parrilla nuevamente durante 14 min (fase de digestión). Posteriormente, se aforó a 100 mL con agua destilada, donde la fase de destilación

consistió en colocar 20 mL de la muestra aforada más 20 mL de NaOH al 50% en una unidad de destilación rápida. Se colectaron 50 mL del destilado en un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía 20 mL ácido bórico al 4% y unas gotas de indicador para Tashiro (rojo de metilo con azul de metileno 1:2, en solución etanólica). Por último, se tituló este volumen con ácido sulfúrico 0.2 N hasta que se observó un vire de color. El cálculo del porcentaje de proteína se realizó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de proteína} = \frac{V2 - V1 * N * 14.007 * 6.25 * 100}{W * 1000}$$

Dónde:

V1 = mL de ácido gastado en el blanco

V2 = mL de ácido gastado en la muestra

N = Normalidad del ácido sulfúrico empleado en la titulación

W = Peso de la muestra

6.6.1.3 Contenido de lípidos

Para la determinación del contenido de lípidos se siguió el método de extracción empleando equipo Soxhlet (Olvera *et al.*, 1993). Ésta técnica consistió en colocar 2 g de muestra seca en un dedal, con 120 mL de éter de petróleo y se colocó en recirculación durante 4 h. Posteriormente se secaron los matraces Soxhlet y se pesaron.

La fórmula empleada para el cálculo del contenido de lípidos fue:

$$\% \text{ de lípidos} = \frac{P2 - P1 - P3}{P4} * 100$$

Dónde:

P1 = Peso del matraz limpio

P2 = Peso del matraz con lípidos

P3 = Peso del matraz con blanco (sin muestra)

P4 = Peso de la muestra

6.6.1.4 Contenido de cenizas

Se determinó el contenido de cenizas con el método basado en la calcinación, tomando en cuenta el método propuesto Olvera *et al.* (1993), mismo que manifiesta que las cenizas permanecen como residuo luego de la calcinación de la materia orgánica a una temperatura entre 500 °C y 600 °C. En un crisol de porcelana a peso constante se colocó 1 g de muestra, se calcinó en una mufla a 550 °C por 5 h aproximadamente. Al término de la calcinación se dejó enfriar y se transfirieron los crisoles a un desecador durante una hora. Se pesó de nuevo el crisol con la muestra ya calcinada y se realizaron los cálculos aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} \cdot 100$$

Dónde:

P1 = Peso del crisol limpio y seco

P2 = Peso del crisol con muestra

P3 = Peso final del crisol con muestra (después de calcinar)

6.6.2 Actividad antirradical y compuestos fenólicos totales

Para la evaluación antioxidante y antirradical de las dietas se realizó una extracción etanólica. Esta consistió en colocar 7.5 g de alimento en un matraz Soxhlet con 150 mL de etanol grado reactivo, se colocó en una parrilla de Soxhlet y se mantuvo en reflujo continuo durante 3 h.

6.6.2.1 Actividad antirradical (DPPH)

El reactivo DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracil) es un radical libre estable, que en solución etanólica presenta una coloración violeta fuerte y su máxima absorbancia se obtiene a 520 nm. Si se le adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, el electrón no apareado del DPPH• se aparea e inmediatamente se decolora la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados. La actividad antirradical con base en el DPPH• se evaluó de acuerdo al procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (2001).

Para llevar a cabo esta determinación se alicuotaron 50 μ L del extracto etanólico (muestra) en un tubo eppendorf, posteriormente se le añadieron 250 μ L de reactivo DPPH (0.0074 g/ 100 mL de etanol), se agitó y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Por último se centrifugó la mezcla a 10,000 rpm por 5 min y registró la absorbancia a 520 nm. Los resultados se expresaron como μ moles equivalentes trolox por gramo de alimento en peso seco (μ molesET/g).

6.6.2.2 Compuestos fenólicos totales (CFT)

Se determinaron de acuerdo al método de Stintzing *et al.* (2005), utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Dicho reactivo es una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica. Para la determinación de estos compuestos se agregaron 50 μ L de muestra en un tubo eppendorf, 250 μ L de reactivo Folin (1:10 en agua destilada) y 200 μ L de bicarbonato de sodio (7.5%), se agitó y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se registró la absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido gálico por gramo de alimento en peso seco (mg EAG/g).

6.6.3 Determinación de α -tocoferol y β -caroteno

Ambos compuestos se determinaron por el método de Akhtar *et al.* (1999), quien utilizó una técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y se utilizó un equipo marca Perkin Elmer Serie 200. Para la cuantificación de ambos compuestos primero fue necesario realizar una extracción, para el caso de α -tocoferol se homogenizó un gramo de muestra con 5 mL de agua destilada a 5,000 rpm por 3 min en baño de agua-hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Se colocó 1 mL del homogenizado en un frasco ámbar con 2 mL de pirogalol (20% preparado con etanol grado reactivo) y 300 μ L de hidróxido de potasio (50% preparado con agua destilada). Esta mezcla se agitó y se colocó a baño maria a 70°C con agitación continua durante 30 min. Posteriormente se enfriaron los frascos a chorro de agua por 10 min, se agregaron 4 mL de hexano al 0.005% de BHT, se agitó vigorosamente y se les extrajo la mayor cantidad del hexano con una micropipeta, colocando lo

extraído en otro frasco ámbar (paso repetido 2 veces). Una vez extraída el mayor volumen posible se evaporó el hexano con nitrógeno (N_2) en una campana de extracción. Por último se añadieron 250 μ L de etanol (grado HPLC) al frasco ámbar, se agitó y se filtró con filtro para jeringa con luz de malla de 0.22 μ m. En el último paso se inyectaron 20 μ L de muestra a la columna (Symetry C18, 5 μ m, 3.9 x 150 mm) y se fijó un flujo de 1 mL/min de la fase móvil (50% acetonitrilo, 50% metanol, 1% agua). El detector se ajustó a una longitud de onda de 522 nm.

Para la extracción de β -caroteno se homogenizó un gramo de muestra con 2 g de sulfato de magnesio anhidro hasta obtener un polvo fino. Posteriormente se transfirió este polvo a un frasco ámbar y se agregaron 6 mL de acetona (grado reactivo), se agitó en oscuridad durante 1 hora. Después de esto se filtró con filtro para jeringa de 0.22 μ m. En el último paso se inyectaron 20 μ L de muestra a la columna (marca Supelco, C18, 5 μ m, 25 cm x 4.6 mm) y se fijó un flujo de 1 mL/min de la fase móvil (75% acetona y 25% metanol). El detector se ajustó a una longitud de onda de 460 nm. En ambas determinaciones se utilizaron estándares comerciales de referencia para la identificación y cuantificación de dichos compuestos.

6.7 Evaluación del estrés oxidativo

Para la determinación de los niveles de peroxidación lipídica, cuantificación de proteínas y su grado de oxidación, además de la actividad de los marcadores enzimáticos en los peces, fueron sacrificados 4 organismos por tanque en cada punto de muestreo. El sacrificio se llevó a cabo por dislocación cervical (quiebre de la espina dorsal cerca de la cabeza), posteriormente se diseccionaron para extraer hígado y branquias. Los órganos se colocaron en tubos plásticos debidamente rotulados y se sumergieron en nitrógeno líquido, después se pasaron a congelación a -80°C hasta su utilización. Para los análisis de estrés oxidativo los tejidos fueron homogeneizados en frío con búfer de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (50 mM, pH 7.0) con un homogenizador de tejidos IKA Ultra Turrax a 8000 rpm, durante 3 min en un baño de agua-hielo para evitar el calentamiento de las muestras, se centrifugaron a 12000 g durante 20 minutos a 4°C .

6.7.1 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas en los homogenizados de tejido es un paso previo a las determinaciones enzimáticas, ya que es necesario expresar dichas actividades en función del contenido de mg de proteínas. Para este análisis se empleó el método descrito por Bradford (1976). Se mezclaron 50 μL de muestra con 500 μL de reactivo de Bradford, se agitó e incubaron por 5 min, finalmente se determinó su absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas Sinergy HT. Se empleó una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (Anexo 1). El blanco se preparó con 50 μL de búfer de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (50 mM, pH 7.0) y 500 μL de reactivo Bradford, con el mismo tiempo de incubación.

Nota: Se realizaron diluciones de los sobrenadantes para que las absorbancias de las muestras se ajustaran a la curva estándar. En el caso del tejido hepático, la dilución fue 1:5 y para las branquias fue 1:2.

6.7.2. Cuantificación de grupos carbonilos (oxidación de proteínas)

Se determinó la cantidad de grupos carbonilos resultado de la oxidación de proteínas presentes en la muestra. La 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) reacciona con los grupos carbonilos de las proteínas formando 2,4 dinitrofenilhidrazona, un complejo coloreado que absorbe a 370 nm (Oliver *et al.*, 1987). La homogenización del tejido se realizó como se describió en el punto 8.7. Se tomaron 75 μL del sobrenadante en tubos eppendorf y se agregaron 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, posteriormente se centrifugó a 5000 g durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y añadieron 500 μL de DNPH (10 mM), se agitó e incubó en oscuridad por 1 h con agitación cada 15 min. Después de esto se agregaron 500 μL de TCA al 10%, se agitó en vortex y se centrifugó a 10,000 g por 10 min, se desechó el sobrenadante y añadieron 500 μL de etanol-etilacetato (1:1), se agitó y centrifugó nuevamente a 10,000 g por 5 min. Por último se evaporó el sobrenadante con nitrógeno (N_2) y se resuspendió el precipitado con 750 μL de clorhidrato de guanidina (7 N), se agitó y centrifugó a 5,000 g por 5 min. La absorbancia del sobrenadante se registró a 370 nm y el blanco se preparó con búfer de fosfatos y guanidina.

La fórmula empleada para el cálculo de nmoles de grupos carbonilo por mg de proteína fue:

$$\text{nmGC/mg de proteína} = \frac{\text{absmuestra} - \text{absbco}}{\epsilon * b} * \frac{1}{\text{mg de proteína}} * F * 1000000000$$

Dónde:

nmGC = nmoles de grupos carbonilo

Absmuestra = Absorbancia de la muestra

Absbco = Absorbancia del blanco

ϵ = Coeficiente de extinción molar de la dinitrofenilhidrazona ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

mg proteína = Concentración de proteínas del homogenizado

F = Factor de dilución de la muestra

1000000000: Para convertir a nmoles de grupos carbonilo

6.7.3 Cuantificación de la peroxidación lipídica (LPO)

Los compuestos peroxidados participan fácilmente en una reacción de adición nucleofílica con el ácido tiobarbitúrico (TBA), generando un pigmento rojo que se determina mediante espectrofotometría a 532 nm, para lo que se siguió la metodología de Botsoglou *et al.* (1994). Para esta determinación se homogenizaron 200 mg de tejido con 800 μL de TCA al 5% y 500 μL de hexano al 0.8 % de BHT a 8,000 rpm durante 3 min y se centrifugó a 5,000 g durante 5 min. Posterior a esto se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de TCA al 5% y se agitó nuevamente. Se tomaron 250 μL de la mezcla anterior en tubos eppendorf y se añadieron 250 μL de TBA al 0.8 % (preparado en agua desionizada), se incubaron en baño maria a 70°C durante 30 min. Se enfriaron los tubos a chorro de agua y se centrifugaron a 5,000 g por 5 min. La absorbancia del sobrenadante se registró a 521 nm.

Nota: El blanco consistió en 250 μL de TCA mezclados con 250 μL de TBA, con el mismo tiempo y temperatura de incubación. Para los cálculos se empleó una curva estándar de tetraetoxipropano (TEP) (Anexo 2).

6.7.4 Determinación de la actividad de catalasa (CAT)

Se utilizó el método descrito por Beers y Sizer (1952) modificado, que consiste en determinar el consumo/desaparición de H_2O_2 a 240 nm. Para la evaluación de este enzima se homogenizaron 200 mg de tejido con 500 μ L de búfer de fosfatos, empleando las mismas especificaciones señaladas en el punto 8.7. Se añadieron 2.970 mL de H_2O_2 40 mM a una cubeta de cuarzo para espectrofotómetro, se agregaron 30 μ L del sobrenadante, se mezcló por inversión y se registró la absorbancia a 240 nm cada 15 segundos durante 3 min.

Nota: Para el tejido hepático la dilución empleada fue de 1:10 y para branquias fue de 1:2.

La fórmula empleada para el cálculo de la actividad enzimática de CAT fue:

$$\frac{U}{\text{mg de proteína}} = \frac{\Delta \text{abs}}{\text{min}} \cdot \frac{1000000}{s \cdot b} \cdot \frac{V_m}{V_f} \cdot \frac{1}{\text{mg de proteína}} \cdot F$$

Dónde:

$\Delta \text{abs}/\text{min}$ = Pendiente de la recta

ϵ = Coeficiente de extinción molar del H_2O_2 ($22,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b = Distancia de la celda (1 cm)

1000000 = Factor de conversión de moles a μ moles

V_m = Volumen de la muestra agregada a la cubeta

V_f = Volumen final de reacción en la cubeta

mg = Contenido de proteína del sobrenadante en mg/L

F = Factor de dilución

6.7.5 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

Se utilizó el método descrito por Sigma-Aldrich en la ficha técnica para dicha enzima, que consiste en determinar la desaparición del NADH a 340 nm. Para la evaluación de este enzima se homogenizaron 200 mg de tejido con 500 μ L de búfer de fosfatos, empleando las mismas especificaciones señaladas en el punto 8.7. Posteriormente en una celda de microplaca se agregaron 25 μ L de glutatión reducido (GSH) 20 mM,

30 μL de NADH (0.84 mM), 15 μL de EDTA (50mM), 20 μL de azida de sodio (12.5 mM preparada en búfer de fosfatos), 1 unidad de glutation reductasa (GR) y 75 μL de KH_2PO_4 (0.334 M). Por último se agregaron 25 μL de H_2O_2 (12.5 mM). Se monitoreó la absorbancia durante 5 min cada 15 s a 340 nm.

La fórmula empleada para el cálculo de la actividad enzimática de GPx fue:

$$\frac{U}{\text{mg de proteína}} = \frac{\Delta \text{abs}}{\text{min}} \cdot 1000 \cdot \frac{V_m}{V_f} \cdot \frac{1}{\text{mg de proteína}} \cdot F$$

Dónde:

$\Delta \text{abs}/\text{min}$ = Pendiente de la recta

E = Coeficiente de extinción molar del NADH (6.22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

B = Distancia de la celda (0.7 cm)

1000 = Factor de conversión de milimoles a μmoles

V_m = Volumen de la muestra agregada a la cubeta

V_f = Volumen final de reacción en la cubeta

Mg = Contenido de proteína del sobrenadante en mg/L

F = Factor de dilución

6.7.6 Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)

Se utilizó el método descrito por Beyer y Fridovich (1987) modificado, que consiste en determinar la aparición de nitroblue tetrazolium formazán (NBTF), leído espectrofotométricamente a 560 nm, el cual se produce por la oxidación de nitro blue tetrazolium (NBT) por acción del radical superóxido. Para la evaluación de este enzima se homogenizaron 200 mg de tejido con 500 μL de búfer de fosfatos, empleando las mismas especificaciones señaladas en el punto 8.7. Posteriormente se colocaron 1.5 mL de mezcla reactiva (13 mM de L-metionina, 0.75 mM de NBT, 20 mM de riboflavina en búfer de fosfatos 50mM pH 7.8) en tubos de ensayo, se agregaron 250 μL de muestra a los tubos y se expusieron a luz no incandescente directa por 20 min. La absorbancia se registró a 560 nm.

Nota: Se preparó un testigo en cada corrida que consistió en 250 μ L del búfer de fosfatos + 1.5 mL de mezcla reactiva. Se incubó igual que los tubos conteniendo muestra.

De acuerdo al fundamento de esta técnica, "una unidad enzimática de SOD es igual al 50% de inhibición del nitroblue tetrazolium formazan" (Kuo *et al.*, 2013), con lo que se desarrolló la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{\text{mg de proteína}} = \frac{\Delta \text{abs}T - \Delta \text{abs}m}{50} * 100 * \frac{v_m}{v_f} * \frac{1}{\text{mg de proteína}} * F$$

Dónde:

$\Delta \text{abs}T$ = Pendiente de la recta del testigo

$\Delta \text{abs}m$ = Pendiente de la recta de la muestra

50 = Corresponde al 50% de inhibición

100 = Para calcular el porcentaje inhibición

V_m = Volumen de muestra en la celda

V_f = Volumen final de reacción

mg = Contenido de proteína del sobrenadante en mg/L

F = Factor de dilución

6.8 Análisis de datos

Los resultados se sometieron a un ANOVA de una vía, tomando como factor principal el tipo de dieta (3 niveles), analizando cada variable de respuesta en cada una de las 3 fases, de acuerdo a lo mencionado en el diseño experimental. Se realizaron también pruebas de comparación de medias por el método de Tukey ($p < 0.05$). Todo lo anterior se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 20.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Composición químico-proximal de dietas experimentales

Para la elaboración de las dietas, primero se determinó la composición químico-proximal de los insumos (Tabla 3). Con estos datos se formularon las dietas experimentales, para establecer la cantidad necesaria de cada insumo (Tabla 4). Para la formulación de la dieta de referencia con la inclusión de harina de subproductos de mago y el extracto de jamaica, se ajustaron las cantidades de harina de pescado, trigo y aceite de pescado. Teniendo en cuenta esta formulación, se elaboraron las dietas DR y DRMJ (dieta de referencia y dieta de referencia con inclusión de mango y jamaica, respectivamente), cuyos pellets fueron secados durante 8 horas a temperatura de 39.64 ± 9.22 °C en un secador solar.

En la tabla 5 se presentan los valores de la composición proximal de las dietas, donde se aprecia que el contenido de proteínas no muestra diferencias significativas y presentaron valores cercanos al porcentaje de la formulación inicial proyectada (35%). Akiyama (1995) y Kubarryk (1997), citado por Moreno (2000), recomiendan que los valores óptimos de proteína en la dieta para tilapia (*O. niloticus*) debe manejarse entre un 20-40%, para lograr un desarrollo eficiente de los peces según el estadio de crecimiento en el que se encuentren. En este trabajo se manejó un 35% en las dietas, lo cual está dentro del intervalo óptimo para la especie, según estos autores y la marca comercial de alimento Winfish Zeigler. El contenido de lípidos en las tres dietas no mostró diferencias significativas. Por otro lado, el contenido de humedad de la dieta DC fue más bajo, esto se le atribuye al proceso de secado, ya que la dieta DC es secada por aspersion mientras que las dietas experimentales de este trabajo fueron secadas en un secador solar.

Tabla 3. Análisis proximal de insumos para las dietas experimentales (%).

Insumo	Humedad	Proteína	Lípidos	Cenizas
Harina pescado	5.52±0.85	60.61±4.02	13.86±0.34	19.32±0.58
Harina soya	10.08±0.11	52.71±1.6	1.24±0.24	7.62±0.13
Gluten	7.11±0.09	72.42±2.84	1.1±0.34	0.92±0.03
Harina trigo	11.62±0.03	13.55±0.41	1.93±0.08	0.79±0.01

Promedios de 3 réplicas ± desviación estándar

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Tabla 4. Formulación de las dietas experimentales (%)

Insumo	Dieta de referencia (DR)	Dieta de referencia + MJ (DRMJ)
Harina de pescado	41.85	43.50
Harina de soya	12.00	12.00
Harina de trigo	30.50	19.1
Aceite de pescado	4.95	4.70
Gluten	9.00	9.00
Vitaminas y minerales	1.20	1.20
Cloruro de colina	0.50	0.50
Harina de mango	0.00	10.00
Agua	65 mL/100 g	0.00
Extracto de jamaica	0.00	70 mL/100 g

Formulación base de Buerau y Cho (1994).

7.1.2 Actividad antirradical y contenido de compuestos bioactivos

En la tabla 6 se presentan los resultados de la actividad antirradical y el contenido de compuestos bioactivos en las dietas. En ella se aprecia que con respecto al contenido de estos últimos (α -tocoferol, β -caroteno y fenólicos totales) la dieta DRMJ presentó la mayor concentración, además de la mayor actividad antioxidante. Lo anterior puede atribuirse a la elevada concentración de manguiferina, vitamina C, flavonoides entre otros compuestos antioxidantes como tocoferoles y carotenoides contenidos en los subproductos de mango y el extracto de jamaica y al incluirlos como insumos en la elaboración de la dieta se eleva el contenido de la misma.

Como menciona González-Ocegeda (2013) en su tesis, el contenido de compuesto fenólicos así como la actividad antirradical con base en la capacidad de atrapar el radical libre DPPH de la dieta DC se puede deber a que en su fabricación se añaden cantidades no conocidas de antioxidantes sintéticos como BHA, BHT y BHQT, mismos que tienen naturaleza fenólica.

En cuanto a la dieta DR, esta presenta aproximadamente el doble de compuestos fenólicos con respecto a la DC, pero la mitad de la actividad antioxidante. Esto se puede atribuir a que en su elaboración se incluye harina de trigo, soya y gluten, mismos que presentan una importante concentración de estos compuestos antioxidantes, así como a la pre-mezcla de vitaminas y minerales.

González-Ocegeda (2013) encontró en su investigación que la dieta con inclusión del 10% de pasta de mango ataulfo contenía 0.7 mg EAG/g y 1.9 μ mol ET/g, refiriéndose a CFT y actividad antirradical por DPPH, respectivamente. Estos valores son más bajos que los reportados en el presente estudio y puede deberse a que aunque se incluyó el mismo porcentaje (10%), la inclusión del presente estudio fue en forma de harina y no de pasta húmeda, por lo que al tener menor contenido de humedad la harina, la concentración de los compuestos bioactivos aumenta.

Tabla 5. Composición proximal de las dietas experimentales.

Dieta	Humedad (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)
DC	5.29±0.07 ^b	35.51±0.13 ^a	8.48±0.46 ^a
DR	7.40±0.16 ^a	34.12±0.11 ^a	8.37±0.34 ^a
DRMJ	7.55±0.40 ^a	35.12±1.66 ^a	8.20±0.26 ^a

Promedios de 3 réplicas ± desviación estándar.

Literales iguales en columnas no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$).

Tabla 6. Contenido de compuestos bioactivos y actividad antirradical de las dietas experimentales.

Dieta	CFT (mg EAG/g)	DPPH (μ mol ET/g)	α -tocoferol (mg/kg)	β -caroteno (mg/kg)
DC	2.88 \pm 0.06 ^c	7.80 \pm 0.06 ^b	81.91 \pm 2.26 ^c	4.46 \pm 0.13 ^b
DR	4.82 \pm 0.08 ^b	4.67 \pm 0.14 ^c	115.02 \pm 1.95 ^b	4.95 \pm 0.84 ^b
DRMJ	6.57 \pm 0.17 ^a	8.12 \pm 0.01 ^a	334.15 \pm 3.66 ^a	269.58 \pm 27.47 ^a

Promedios de 3 réplicas \pm desviación estándar.

Literales iguales en columnas no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$)

CFT: Compuestos fenólicos totales. DPPH: Actividad antirradical medida como capacidad para atrapar el radical DPPH.

7.2 Organismos

7.2.1 Parámetros zootécnicos

Los organismos se recibieron inicialmente como alevines con un peso promedio de 1.2 ± 0.3 g y se alimentaron con DC para hacerlos crecer hasta 158.59 ± 8.7 g, para dar lugar a la fase 1, que se refiere al inicio de los distintos tratamientos (dietas). Al término de esta fase e inicio de la fase 2 (estrés), los peces pesaron en promedio 243.65 ± 22.51 g. La ganancia de peso (GP), tasa de conversión alimenticia (TCA) y supervivencia (S) no mostraron diferencia significativa entre tratamientos ($P > 0.05$) (Tabla 7). La ganancia de peso fue mayor a 100 g en los 3 tratamientos, la tasa de conversión alimenticia estuvo alrededor del 1.7, mientras que el porcentaje de supervivencia fue superior al 95%.

7.2.2 Parámetros físico-químicos del agua

Durante el bioensayo, las variables físico químicas (temperatura, pH y oxígeno disuelto) registraron valores que se encuentran dentro de los intervalos recomendados como óptimos para la especie *O. niloticus* (Bautista, 1986; Cantor, 2007).

Dichos parámetros son importantes, ya que influyen directamente en el crecimiento de los organismos, además que con valores fuera de su intervalo óptimo, como es el caso del oxígeno disuelto (por ejemplo cuando se mantiene de 0.2-1.0 mg/L), se considera letal para especies acuáticas. Los valores obtenidos en este estudio (Tabla 8) muestran que la concentración de oxígeno disuelto está por encima del valor considerado letal para este tipo de organismos. Durante las 24 h de estrés (fase 2), la temperatura del agua fue de 18.49 ± 0.09 °C, misma que se mantuvo con la adición de agua-hielo, mientras que durante la etapa 3 (fase de recuperación), la temperatura fue de 27.80 ± 0.90 °C.

Tabla 7. Parámetros de evaluación biológica de los tratamientos (dietas).

Dieta	GP (g)	TC	S (%)
DC	102.87±8.77 ^a	1.71±0.16 ^a	98.92±1.52 ^a
DR	109.04±6.56 ^a	1.52±0.19 ^a	95.56±6.29 ^a
DRMJ	100.53±7.66 ^a	1.74±0.19 ^a	97.78±3.14 ^a

Promedios de 3 réplicas ± desviación estándar.

Literales iguales en columnas no presentan diferencia significativa (P>0.05).

7.2.3 Determinación de compuestos bioactivos antioxidantes en tejidos

En la tabla 9 se aprecia que el contenido de α -tocoferol en hígado no aumentó significativamente en ningún tratamiento durante la fase 1, por lo cual, se puede decir que no hubo bioacumulación del mismo. No obstante, se observa que en los tratamientos DC y DR disminuye la concentración de este compuesto, mientras que en el tratamiento DRMJ los valores no presentan variación, lo cual se puede deber a que el suministro dietario propicia que sus niveles en hígado se mantengan estables. La concentración del β -caroteno tampoco aumentó en ningún tratamiento, pero se observa que mientras los tratamientos DC y DRMJ mantienen sus niveles, en el tratamiento DR se presenta una disminución significativa del mismo. Lo anterior puede explicarse debido a que la dieta DRMJ contiene grandes cantidades de este compuesto. Es posible que no exista bioacumulación de estos compuestos en el tejido hepático dado que pudieron ser utilizados bioquímicamente para algunas de las reacciones propias de dicho órgano. Otro factor puede ser que el tiempo que se suministró la dieta que contenía estos compuestos fue poco para favorecer la bioacumulación.

En la tabla 9 se aprecia que los organismos de los 3 tratamientos presentaron bioacumulación de α -tocoferol en tejido hepático, aunque el tratamiento DRMJ presenta la concentración más elevada, seguido por el tratamiento DR y en último lugar el DC. Esto se debe a que la dieta DRMJ presentó mayor concentración de este compuesto que las 2 restantes (Tabla 6) y al ser suministrada a los peces se favoreció esta situación. Por otra parte, las branquias no presentaron β -caroteno en ninguno de los 3 tratamientos, de acuerdo con los resultados reportados en la tabla 10. Lo anterior se puede explicar debido a que este compuesto y los demás carotenoides como la zeaxantina y cataxantina se bioacumulan mayormente en piel y músculo, ya que cumplen la función de proveer cierta tonalidad rosácea o rojiza a dichos tejidos, como en el caso de los salmónidos (Christiansen, 1996). Así mismo, se puede deber a que este tejido presenta baja concentración de lípidos y dada la naturaleza lipofílica de este compuesto no se favoreció su bioacumulación. El tiempo de consumo de la dieta pudo ser poco para que se presentara la bioacumulación de dicho compuesto.

Tabla 8. Variables fisico-químicas del agua (valores recomendados y obtenidos).

Variable	Valor recomendado (ISA)	Valor obtenido
Temperatura (°C)	26-31	27.99±0.99
Oxígeno disuelto (mg/L)	5	3.9±0.95
pH	7-8	7.19±0.07

ISA: Instituto Sinaloense de Acuicultura

Tabla 9. Contenido de compuestos bioactivos en hígado.

	α -tocoferol (mg/kg)		β -caroteno (mg/kg)	
	T0=48.63 \pm 1.70 ^a	0hE	T0=2.47 \pm 0.14 ^a	0hE
DC	41.73 \pm 0.27 ^b			2.52 \pm 0.02 ^a
DR	23.61 \pm 0.23 ^c			1.21 \pm 0.33 ^b
DRMJ	47.69 \pm 0.43 ^a			2.07 \pm 0.04 ^a

Promedios de 3 réplicas \pm desviación estándar.

El T0 representa el valor inicial para los 3 tratamientos.

Literales iguales entre columnas no presentan diferencia significativa (P>0.05).

Tabla 10. Contenido de compuestos bioactivos en branquias.

	α -tocoferol (mg/kg)		β -caroteno (mg/kg)	
	T0=34.76 \pm 0.30 ^d	0hE	T0=ND	0hE
DC		37.53 \pm 1.11 ^c		ND
DR		42.95 \pm 0.42 ^b		ND
DRMJ		53.80 \pm 1.50 ^a		ND

Promedios de 3 réplicas \pm desviación estándar.

T0 representa el valor inicial para los 3 tratamientos.

Literales iguales entre columnas no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$).

7.3 Evaluación de marcadores de estrés oxidativo

En la evaluación de los parámetros de estrés oxidativo se establecieron códigos para identificar cada punto de muestreo, con dos puntos en cada etapa. En la primera se encuentra 0hE: finalización de la fase de alimentación con las 3 diferentes dietas (cero horas de estrés); fase 2: 12hE y 24hE (12 y 24 horas después de haber disminuido la temperatura del agua para promover el estrés). Por último, en la etapa 3: 12hR y 24hR (12 y 24 horas después de restablecer la temperatura del agua a los 28°C iniciales).

7.3.1 Oxidación de lípidos

De acuerdo con Hermes-Lima (2005), la peroxidación lipídica se ha establecido desde hace ya varios años como uno de los más importantes biomarcadores de estrés oxidativo, dado que es de los principales daños que sufre la membrana celular. El tejido hepático tiene un alto contenido de lípidos, a diferencia de las branquias y el músculo de tilapia, por tal motivo, generalmente presenta mayor concentración de lípidos peroxidados (Chen-Huei y Sue-Lan, 2004).

En la figura 7 se presentan los resultados de lípidos peroxidados en tejido hepático, donde se puede observar que el tratamiento DRMJ tiene los valores más bajos (desde 66.67 en 0hE y 70.5 nmoles de MDA en 24hE) y estables durante los 5 muestreos ($P > 0.05$). Esto se debe a que los organismos de este tratamiento fueron menos afectados por el descenso de la temperatura, posiblemente por el aporte dietario de antioxidantes. Por otro lado, el tratamiento DR presenta los valores más altos (desde 102.15 nmoles de MDA en 0hE y 232.76 en 12hR) en los 5 muestreos ($P < 0.05$) y presenta un aumento sostenido desde el tiempo 0hE hasta 24hR a partir del cual se mantienen dichos valores. Éste comportamiento se presenta en el tratamiento DC, pero este presenta una disminución considerable hasta llegar a presentar valores iguales al tratamiento DRMJ en los puntos 12hE y 24hE ($P < 0.05$). El comportamiento de los últimos 2 tratamientos se debe a que las dietas contienen menor cantidad de antioxidantes que la DRMJ y posiblemente estos organismos produjeron mayor cantidad de radicales libres y ERO's por efecto de la baja temperatura y a su vez estos agentes oxidaron los lípidos del hígado.

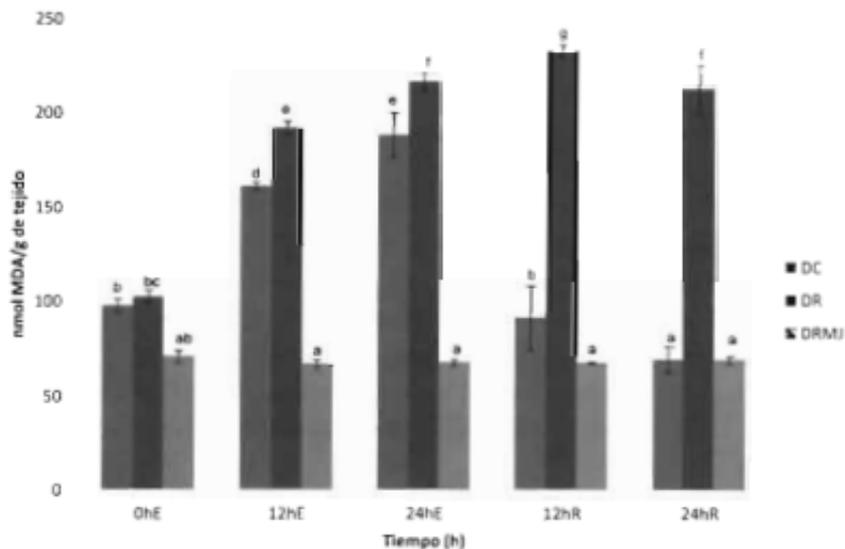


Figura 7. Determinación de oxidación lipídica en hígado. Contenido de nanomoles de malonaldehído por gramo de tejido hepático en peso húmedo. Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). $n=3$

En la figura 8 se presentan los resultados de la peroxidación lipídica en branquias. En esta se observa que en tejido hepático, el tratamiento DRMJ presenta valores más bajos en los 5 muestreos (desde 23.8 nmoles de MDA en el tiempo 0hE hasta 28.33 en el tiempo 12hR) y permanece sin afectación durante todo el experimento ($P>0.05$). Esto se le atribuye a la actividad antioxidante del alimento suministrado, misma que se tradujo en una resistencia fisiológica de los organismos a ser atacados por los radicales libres. El tratamiento DC permanece sin afectación hasta el tiempo 24hE, donde presenta su valor más alto (48.74 nmoles de MDA) ($P>0.05$), para después disminuir y permanecer estables en los tiempos 12hR y 24hR con valores de 23.72 nmoles de MDA ($P>0.05$).

Este comportamiento se puede explicar mencionando que fueron necesarias 24 h de exposición al shock por frío para que los organismos de este tratamiento fueran afectados en su estatus redox en este tejido.

Por otro lado, el tratamiento DR presenta una disminución en el tiempo 12hE (28.36 nmoles de MDA) con respecto a 0hE ($P<0.05$), pero aumenta en el tiempo 24hE (50.17 nmoles de MDA) ($P<0.05$) y permanece con valores altos hasta el tiempo 24hR. Éste tratamiento presenta los valores más elevados de MDA debido a que mostró baja protección antioxidante, motivo por el cual las células branquiales fueron más afectadas por los radicales libres y EROs producidas durante el estrés inducido por el shock por frío.

De acuerdo con la teoría que marca la existencia de un aumento en la concentración de lípidos oxidados en el estado de estrés oxidativo (Hermes-Lima, 2005), al observar los valores de las figuras 7 y 8, se considera que existe una recuperación al respecto en ambos tejidos en el tratamiento DC, no así con DR, mientras que el tratamiento DRMJ no presentó afectación significativa en ninguno tiempo.

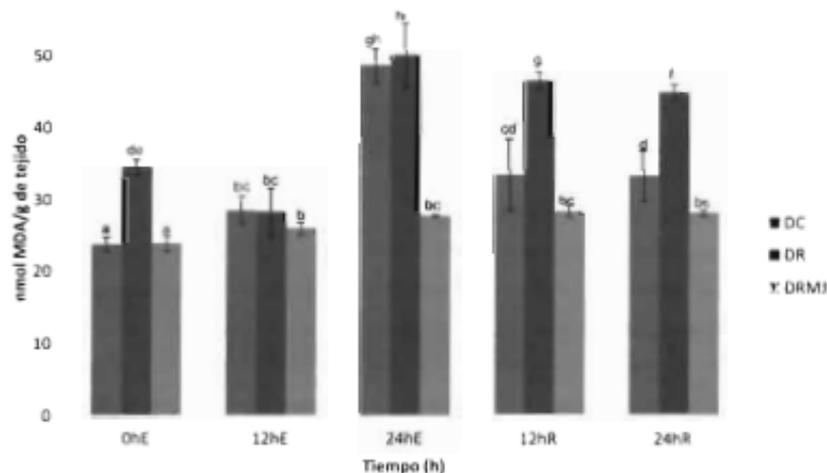


Figura 8. Determinación de oxidación lipídica en branquias. Contenido de nanomoles de malonaldehído por gramo de tejido branquial en peso húmedo. Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). $n = 3$

Esto se le atribuye al efecto quimioprotector del alimento, conferido por la harina de subproductos de mango y el extracto de jamaica. Se aprecia que el hígado es el tejido que presenta mayor concentración de lípidos peroxidados, lo cual puede deberse a que según la FAO (2011), los peces magros tienen reservas lipídicas en este tejido y dado que la tilapia es un pez magro, presenta un mayor contenido de lípidos en el tejido hepático que en las branquias.

Los resultados de este trabajo concuerdan con los de Gutiérrez *et al.* (2012), quienes probaron el efecto quimioprotector de N-acetil cisteína (NAC) contra el estrés oxidativo inducido por cilindrospermopsina *O. niloticus*. Aunque sus valores son mayores, 13000 nm de MDA/g de tejido para el grupo control, 21000 nm de MDA/g para el grupo estresado y 15000 nm de MDA/g para el grupo estresado pero expuesto a NAC.

Por otro lado, Mohamed *et al.* (2015) evaluaron el efecto de la alicina (un potente agente antioxidante contenido en el ajo) contra el estrés oxidativo en *O. niloticus* inducido por deltametrina. De acuerdo con sus resultados, la alicina tiene un efecto benéfico para contrarrestar los niveles de MDA tanto en hígado como en branquias, afectados por la deltametrina. En general, sus valores fueron más bajos que los reportados en este trabajo (desde 4.09 ± 0.19 hasta 8.19 ± 0.32 nm de MDA por g de tejido en hígado), mientras que para las branquias los valores son de 7.17 ± 0.06 hasta 16.38 ± 0.05 . Esto se debe a que emplearon alicina purificada y la adicionaron de manera directa a la dieta, mientras que en este trabajo los compuestos antioxidantes se aportaron de manera indirecta y no purificada mediante la harina de subproductos de mango y el extracto de jamaica.

Puerto *et al.* (2009) evaluaron el papel antioxidante de N-acetil cisteína (NAC) en el estrés oxidativo inducido por microcistinas en *O. niloticus*. Sus resultados muestran un efecto protector de la NAC que depende de la dosis suministrada, resultando una disminución proporcional en la concentración de MDA en hígado de los organismos afectados, hasta llegar a valores iguales a los del grupo control que no tuvo ningún contacto con el antioxidante ni con las microcistinas.

Las diferencias entre los resultados de lipoperoxidación de esta investigación con respecto a las que han sido citadas pueden deberse a la edad, peso y variedad de

los organismos. El estado de salud de los organismos previo al experimento también influye en su desempeño contra cambios en la calidad del agua o contaminación de la misma.

7.3.2 Oxidación de proteínas

Las proteínas son susceptibles a ser oxidadas y liberar sus grupos carbonilo como resultado de este ataque. Por esta razón se han utilizado como biomarcadores en la evaluación del estrés oxidativo y otras afectaciones causadas por pesticidas y plaguicidas en organismos acuáticos (Hermes-Lima, 2005).

En la figura 9 se muestran los resultados de oxidación de proteínas en tejido hepático. En ella se observa que los tratamientos DRMJ y DR presentan los valores más bajos, mismos que no fueron afectados ni por el descenso en la temperatura ni por el restablecimiento de la misma ($P > 0.05$). Los resultados obtenidos oscilan desde 1.15 nmoles de GC/mg de proteína en el tiempo 12hR, hasta 1.31 al tiempo 24hR para el tratamiento DRMJ y de 1.15 al tiempo 24hR hasta 1.55 al tiempo 0hE para el tratamiento DR. Esto se puede deber a que el β -catoteno y α -tocoferol proporcionados por la dieta DRMJ aumentan la defensa antioxidante de los organismos que la consumieron, mientras que en el tratamiento DR los antioxidantes empleados en la elaboración de su dieta pudieron ser suficientes para mantener valores bajos de este parámetro en el tejido mencionado.

Por otro lado, el tratamiento DC presenta afectación hasta el tiempo 24hE, donde la concentración GC aumenta y permanece con valores elevados hasta el último muestreo (24hR) ($P < 0.05$). Se puede inferir que los organismos de este tratamiento no fueron capaces de recuperar sus valores iniciales de este parámetro, debido a que su dieta no aportó la cantidad suficiente de antioxidantes para resistir el impacto de la baja temperatura, por lo cual, la condición de estrés oxidativo permanece al menos durante las 48 h evaluadas.

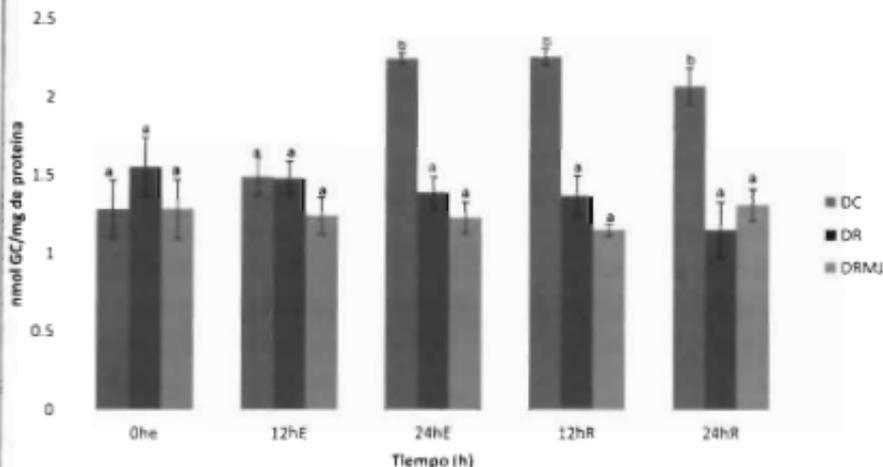


Figura 9. Determinación de oxidación proteica en hígado. Contenido de nanomoles de grupos carbonilo por miligramo de proteína de tejido hepático. Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). $n = 3$

En la figura 10 se presentan los valores de oxidación de proteínas en branquias, donde se observa que los valores más bajos corresponden al tiempo 0hE para los 3 tratamientos ($P < 0.05$), dado que en este punto los organismos no han sido sometidos a ninguna condición adversa. El tratamiento DRMJ presenta un aumento significativo ($P < 0.05$) al tiempo 12hE y a partir de este sus valores se estabilizan hasta el último muestreo (24hR) ($P > 0.05$). El valor más bajo para este tratamiento fue de 3.67 nmoles de GC y el más elevado fue de 5.74, en los tiempos 0hE y 24hE, respectivamente ($P < 0.05$).

Las gráficas 9 y 10 muestran que existe un excelente desempeño de los organismos del tratamiento DRMJ, ya que los resultados obtenidos en el tejido hepático no muestra ninguna afectación, mientras que en branquias si existe un aumento, pero rápidamente los valores se estabilizan. Con esto se considera que existe un gran beneficio por la inclusión de la harina de mango y el extracto acuoso de jamaica, ya que los antioxidantes aportados por estos insumos a la dieta y posteriormente a los organismos tiene un efecto quimioprotector contra la oxidación de proteínas bajo las condiciones experimentales evaluadas.

De manera general, los valores del parámetro de oxidación de proteínas concuerdan con lo reportado por Gutiérrez *et al.* (2012), quienes evaluaron el efecto de la N-acetil cisteína (NAC) contra el estrés oxidativo inducido por cilindrospermopsina en tilapia de la misma especie. Los valores que reportan solo para el tejido hepático van desde 12 nmol de nm GC/mg para el grupo control, 16 nm GC/mg para el grupo estresado y 14 nm GC/mg para el grupo estresado que le fue suministrado NAC. Estos resultados muestran que la NAC contribuye a restaurar los valores de oxidación de proteína en organismos afectados por cilindrospermopsina.

Así mismo, nuestros resultados coinciden con los de Puerto *et al.* (2009), quienes también trabajaron con NAC en *O. niloticus*, solo que el estrés lo promovieron con microcistinas. Los valores que reportan solamente para el tejido hepático son de 8.2 ± 0.02 para el grupo control, 10.6 ± 0.3 para el grupo estresado y 7.2 ± 1.1 GC/mg para el grupo estresado con la protección de la NAC. Al igual que en la investigación de Gutiérrez *et al.* (2012), se puede observar que la NAC logra restablecer los valores de grupos carbonilo en este tejido.

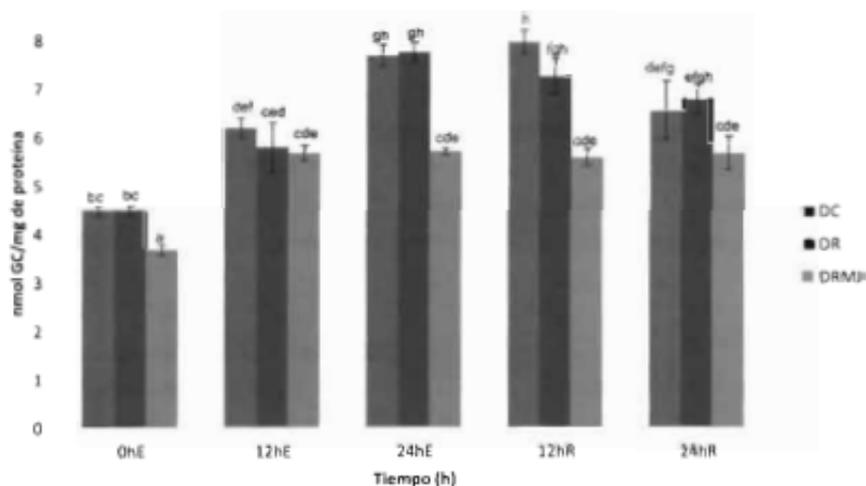


Figura 10. Determinación de oxidación proteica en branquias. Contenido de nanomoles de grupos carbonilo por miligramo de proteína de tejido branquial. Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$), $n = 3$

Por otro lado está la investigación de Prieto *et al.* (2008), quienes realizaron estudios con esta especie, solo que como antioxidante utilizaron trolox (análogo de la vitamina E) y el mismo agente inductor que Puerto *et al.* (2009). Además, evaluaron 2 tiempos de exposición, 24 y 48 h. La otra diferencia es que ellos reportan los resultados en nmoles de grupos carbonilo por gramo de tejido (nm GC/g de tejido) y solo en el tejido de branquias, por lo cual sus valores son más elevados. Al igual que los 2 trabajos anteriores, solo reportan resultados del tejido hepático. Primeramente, si observaron un aumento de la concentración de proteínas oxidadas con respecto al tiempo de exposición. En el grupo control obtuvieron 600 nmoles/g de tejido para el grupo con trolox y 1200 para el grupo sin trolox. Los resultados a las 24 h para el grupo con trolox fueron de 650 nmoles, mientras que el grupo sin trolox fue 2100 nmoles. A las 48 h los valores aumentaron, para el grupo si trolox se obtuvieron 1550 nm mientras que el grupo sin trolox llegó hasta 2450 nmoles/g de tejido. Estos resultados muestran que el trolox, al igual que la inclusión de harina de subproductos de mango y el extracto acuoso de jamaica tiene un efecto quimioprotector en branquias.

7.3.3 Actividad enzimática de catalasa

La enzima catalasa (CAT) fue identificada en 1811, cuando se observó que tejidos tanto de animales como plantas poseían la propiedad de descomponer el H_2O_2 . Esta enzima junto con la superóxido dismutasa (SOD) se consideran como primera defensa en contra de la toxicidad del oxígeno (Pandey *et al.*, 2003). Generalmente, se utilizan juntas, ya que se ha observado una respuesta de inducción simultánea en las actividades de ambas (Dimitrova *et al.*, 1994). Sin embargo, también se ha observado que un exceso de producción de radical anión superóxido inhibe la actividad de CAT (Kono y Fridovich, 1982).

En la figura 11 se presentan los resultados de la actividad enzimática de catalasa en el tejido hepático. En ella se observa que el tratamiento DRMJ muestra actividad estable en los tiempos 0hE y 24hR ($P>0.05$), aunque con un ligero aumento que en los tiempos 12hE, 24hE y 12hR ($P<0.05$).

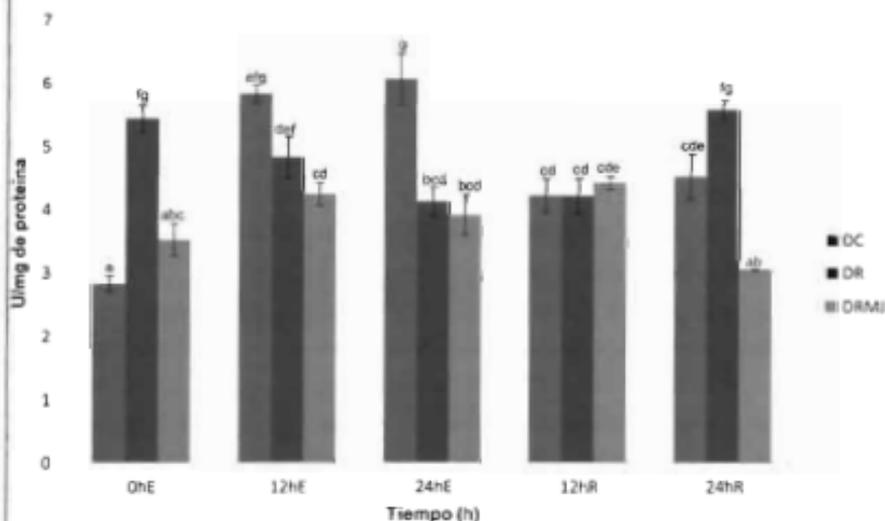


Figura 11. Determinación de actividad de CAT en hígado. Unidades de actividad de CAT por miligramo de proteína de tejido hepático.

Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). $n=3$

Esto indica que la alimentación previa al estrés con la dieta que contenía harina de subproductos de mango y extracto de jamaica mejora las defensas antioxidantes de los organismos por la ingesta de compuestos antioxidante. El tratamiento DC presenta un aumento significativo desde el tiempo 12hE hasta 24hE ($P<0.05$), después sus valores disminuyen y estabilizan en los tiempos 12hR y 24hR ($P>0.05$), llegando a ser cercanos al tiempo 0hE. Por último, el tratamiento DR presentó actividades enzimáticas de CAT muy elevados ($P<0.05$) en el tiempo 0hE, pero después disminuyeron y se mantuvieron hasta el punto 24hR, donde aumentaron nuevamente ($P<0.05$).

En estos últimos 2 tratamientos (DC y DR), los organismos no mostraron un sistema antioxidante capaz de mitigar los efectos adversos inducidos por la baja temperatura, lo cual se puede deber a que sus dietas no contienen la cantidad necesaria de antioxidantes para mantener un sistema redox resistente a dicha condición.

En la figura 12 se muestran los valores de actividad enzimática de CAT para branquias. En la misma se aprecia que el tratamiento DRMJ muestra valores estables en los 3 primeros tiempos de muestreo ($P>0.05$), pero en los tiempos 12hR y 24hR los valores disminuyen ($P<0.05$). Con esto se puede inferir que existe un efecto positivo en el sistema redox celular al ingerir mayor cantidad de compuestos antioxidantes. Por otro lado, el tratamiento DC presenta un aumento al tiempo 12hE ($P<0.05$), posteriormente se aprecia una disminución en los tiempos 24hE y 12hR ($P<0.05$), para luego mantenerse estables ($P>0.05$). Esto indica que los organismos de este tratamiento fueron capaces de recuperar su nivel de actividad de catalasa, aunque hayan sido afectados negativamente por el descenso de la temperatura del ambiente. El tratamiento DR presenta un aumento en los tiempos 12hE y 24hR ($P<0.05$) y una disminución en los tiempos 24hE y 12hR ($P<0.05$). Este comportamiento tan variable puede deberse a que existía un desequilibrio muy fluctuante entre la producción de radicales libres y EROs con respecto a la de antioxidantes, aunado a que la ingesta dietaria de compuestos con esta actividad fue menor que en el tratamiento DRMJ ($P<0.05$), de acuerdo a los resultados de la tabla 5.

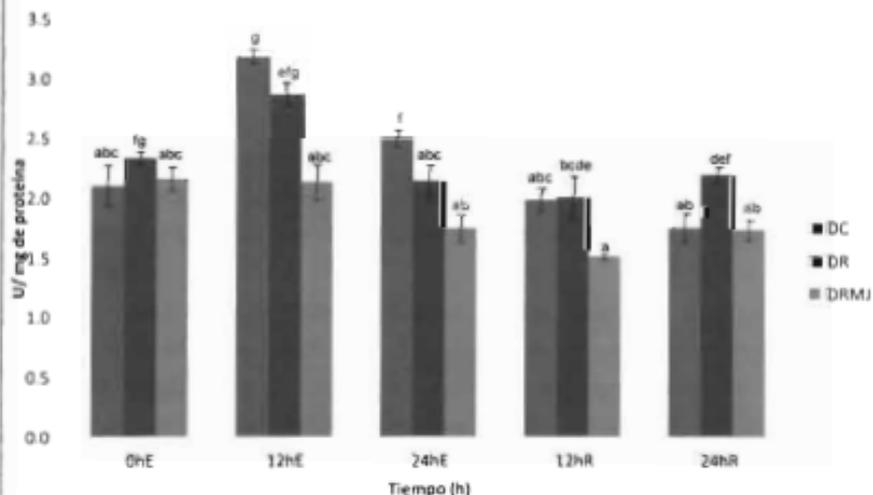


Figura 12. Determinación de actividad de CAT en branquias. Unidades de actividad de CAT por miligramo de proteína de tejido branquial. Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). $n=3$

Como se mencionó anteriormente, la CAT es una de las principales defensas contra el ataque de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Esta actúa en el ciclo redox de la eliminación del radical superóxido, mismo que es convertido en H_2O_2 por la SOD y que la CAT convierte posteriormente en H_2O (Pandey *et al.*, 2003).

Como se puede observar en las figuras 11 y 12, el tejido hepático fue el más afectado en cuanto a este biomarcador, ya que resultó con valores de actividad enzimática mayores que los de branquias. Esto se puede deber a que es en este tejido donde tiene lugar la eliminación del H_2O_2 producido por el propio metabolismo o por la dismutación del radical superóxido. De cualquier manera, en ambos tejidos el tratamiento DRMJ mostró la menor afectación, confirmando con esto que la inclusión de harina de subproductos de mango y el extracto acuoso de jamaica tiene un efecto benéfico al mejorar o aumentar la resistencia del sistema antioxidante de los organismos propiciado por una mayor ingesta de compuestos con actividad antioxidante.

Los resultados de este trabajo contrastan con los reportados por Eman y Engy (2014), quienes suplementaron la dieta de tilapia (*O. niloticus*) con alga verde (*Chlorea vulgaris*) rica en luteína para evaluar el efecto contra el estrés oxidativo provocado por arsénico (As). Estos autores utilizaron un 10% de inclusión de alga verde en la dieta, al igual que en el presente trabajo donde se incluyó ese porcentaje, pero de harina de subproductos de mango. En cuanto al hígado, los resultados obtenidos fueron de 4.0, 1.8 y 3.0 U/g de tejido para los grupos control, expuesto a As y expuesto con la inclusión de alga verde, respectivamente. Para branquias, los resultados fueron 2.2 para el grupo control, 1.6 para el expuesto a As y 2.0 U/g de tejido para el expuesto a As y alimentado con alga verde. El contraste radica en que el As provocó una disminución en la actividad de CAT en ambos tejidos, aunque se ha reportado que en ocasiones los metales pesados y algunos otros elementos químicos tienen este efecto, no solo en esta enzima, sino también en glutatión reductasa y glutatión-s-transferasa (Güluzar y Mustafa, 2010). Para confirmar lo mencionado en el párrafo anterior, se encuentra el trabajo de Güluzar y Mustafa

(2010), que observaron una disminución en la actividad de CAT como resultado de la exposición a metales pesados (Cd, Cu, Cr, Zn y Fe) en *O. niloticus*.

Por otro lado, los resultados de Montovani *et al.* (2009) son similares a los del presente trabajo. Su investigación consistió en evaluar el efecto de la exposición de *O. niloticus* a triclorfon (insecticida organofosforado) sobre el estatus oxidativo, solo que únicamente evaluaron el tejido hepático, donde obtuvieron valores de 7.75 ± 0.48 y 10.12 ± 1.07 U/mg de proteína para los grupos control y expuestos al triclorfor, respectivamente. Con esto se puede notar que existe un aumento en la actividad en CAT en hígado provocado por este insecticida ampliamente utilizado en la práctica de la agricultura.

Por último, Mohamed *et al.* (2015) evaluaron el efecto de la alicina (compuesto con una alta actividad antioxidante encontrado en el ajo) sobre el estrés oxidativo inducido por deltametrina en *O. niloticus*. Aunque sus resultados de actividad de CAT son similares a los de esta investigación para branquias, son más elevados para el tejido hepático. Para el hígado los valores que obtuvieron son 19.31 ± 0.78 , 20.9 ± 1.03 y 19.18 ± 1.19 U/mg de proteína para los grupos control, estresado y estresado con adición de alicina, respectivamente. En cuanto a branquias, los resultados fueron 5.5 ± 0.34 para el grupo control, 6.15 ± 0.37 para el grupo estresado y 5.9 ± 0.4 para el estresado con adición de alicina. De acuerdo con sus resultados, la deltametrina provoca que los valores de actividad de catalasa aumenten en hígado y branquias, al igual que el shock por frío evaluado en el presente estudio. Así mismo, indican que la alicina tiene la capacidad para mantener los valores de esta enzima cercanos a los niveles basales.

7.3.4 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa

Las glutatión peroxidadas son selenoproteínas, excepto la isoforma tipo V y forman parte del sistema antioxidante glutatión peroxidasa (GPx)/glutatión reductasa (GR). Su acción principal es la reducción del H_2O_2 y de lipoperóxidos (L-OOH) por la glutatión peroxidasa (GPx), usando como sustrato el glutatión reducido (GSH) que pasará a su forma oxidada (GSSG), el cual es reducido de nuevo a glutatión libre por la acción de la GR. El sistema antioxidante GPx/GR está relacionado con otros

sistemas antioxidantes, por ejemplo el SOD/CAT. Aunque se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par, ya que la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y a bajas concentraciones actúa la GPx (Beers y Sizer, 1952).

En la figura 13 se muestran los resultados de GPx en tejido hepático, reportados como miliunidades por miligramo de proteína (mU/mg). En ella se observa que el tratamiento DRMJ presentó diferencias significativas hasta el tiempo 12hR, donde se observó una disminución que continuó hasta su valor más bajo a las 24hR ($P < 0.05$). Éste comportamiento puede deberse a que las enzimas dependientes de glutatión son más utilizadas por el organismo para eliminación sustancia químicas que para defender al organismo de una perturbación en los parámetros fisicoquímicos del agua (Ríos *et al.*, 2013) Por otro lado, el tratamiento DC presenta los valores más altos ($P < 0.05$) en el tiempo 0hE, con una disminución al tiempo 12hE ($P < 0.05$), en el tiempo 24hE aumentan nuevamente hasta igualar los valores del tiempo 0hE ($P > 0.05$), finalmente disminuyen en el tiempo 12hR ($P > 0.05$). Por último, el tratamiento DR presenta un comportamiento similar al DC, aunque con valores diferentes ($P < 0.05$)

Los valores para el tratamiento DRMJ oscilaron entre 0.26 y 8.46, para los tiempos 24hR y 0hE respectivamente. Por otro lado, el tratamiento DC resultó con las actividades enzimáticas más elevadas de los 3 tratamientos, mismos que van desde 4.69 al tiempo 12hR hasta 13.91 al tiempo 0hE. Por último, los valores para el tratamiento DR oscilaron entre 2.73 y 13.72, para los tiempo 24hR y 0hE, respectivamente. Los valores de los tratamientos DC y DR son iguales estadísticamente en varios de los puntos de muestreo, debido probablemente a que la administración dietaria de compuestos antioxidantes fue deficiente y a que el tiempo de exposición a la baja temperatura afectó igual a estos organismos.

En la figura 14 se muestran los resultados de actividad enzimática de glutatión peroxidasa de branquias, en la que se puede observar que el tratamiento DRMJ presenta los valores más bajos aunque presenta diferencias significativas ($P > 0.05$), debido tal vez a que la concentración de H_2O_2 en este tejido era muy baja y no

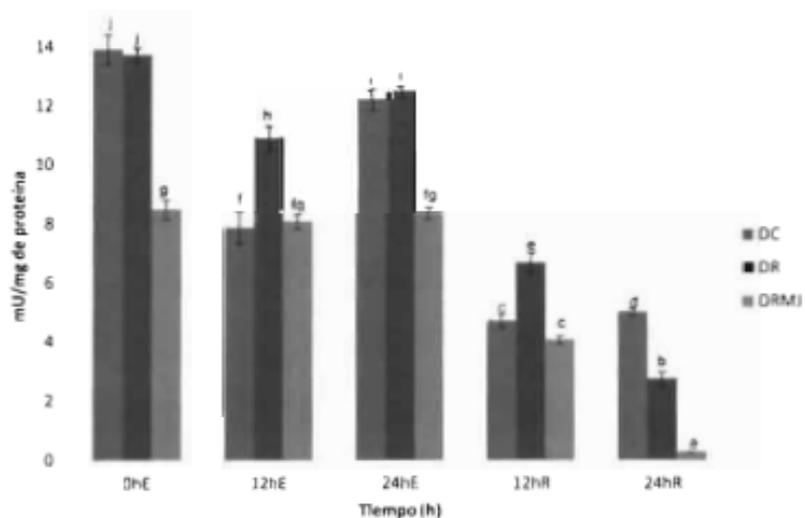


Figura 13. Determinación de actividad de GPx en hígado. Miliunidades de actividad de GPx por miligramo de proteína de tejido hepático. Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). $n=3$

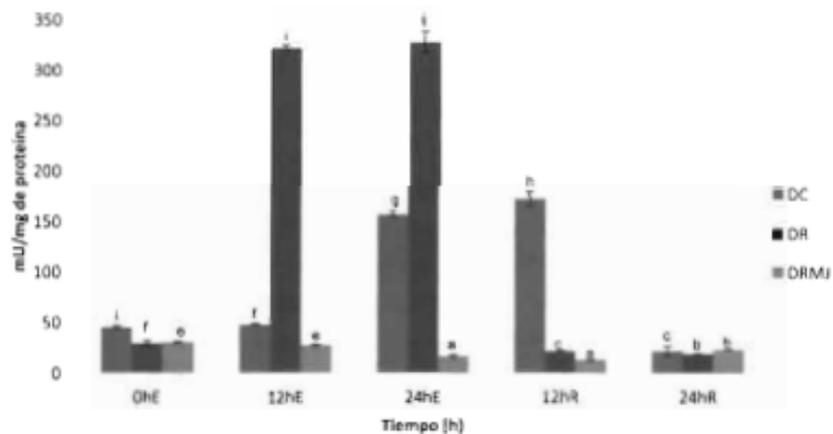


Figura 14. Determinación de actividad de GPx en branquias. Miliunidades de actividad de GPx por miligramo de proteína de tejido branquial.

Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). $n = 3$

requería la producción continua de esta enzima. Por otro lado, el tratamiento DC si resultó con afectaciones significativas ($P < 0.05$), ya que sus valores de actividad enzimática aumentaron en los tiempos 24hE y 12hR, aunque después descendieron en el tiempo 24hR. Por último, el tratamiento DR que fue el más afectado en este tejido, presentó los valores más elevados en los tiempos 12hE y 24hE ($P < 0.05$). Esto puede deberse a que los organismos de este tratamiento presentaron una deficiencia para eliminar el H_2O_2 en este tejido por medio de la catalasa y se subsanó con el aumento en la actividad de GPx, enzima que tiene la misma función para eliminar el H_2O_2 .

En este trabajo las branquias fue el tejido mayormente afectado en cuanto a la actividad de GPx (Figuras 13 y 14), pero en ambos tejidos el tratamiento DRMJ resultó con los valores más bajos durante las 3 fases del experimento. Almeida *et al.* (2002 y 2009) encontraron valores más elevados en la actividad de esta enzima, en ambos casos el estrés oxidativo se indujo con la exposición a cadmio (Cd) en *O. niloticus*. Los resultados que encontraron se sitúan entre 13.84 ± 4.12 y 70.2 ± 5.8 U/g de tejido hepático. Las diferencias tan marcadas entre estos resultados y los encontrados en el presente estudio pueden deberse a que ellos emplearon organismos de entre 30 y 40 g de peso y debido a que se conoce que los peces a menor talla, peso y edad son más susceptibles a desarrollar estrés oxidativo o alguna patología, debido a que su sistema inmune no se ha desarrollado completamente (Ríos *et al.*, 2013). Baysoy *et al.* (2012) encontraron valores más bajos que los de Almeida *et al.* (2002 y 2009), aunque siguen siendo más elevados que los del presente estudio. Ellos investigaron sobre el efecto de la salinidad y biodisponibilidad de cromo y plomo (Cr y Pb) en el sistema antioxidante hepático de *O. niloticus*. Los valores de actividad de GPx que obtuvieron fueron de 0.9 y 1.5 U/mg de proteína para los grupos control y expuestos, respectivamente. La actividad tan elevada reportada en estos trabajos puede deberse a que existían concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno en estos tejidos, dado que la GPx actúa bajo estas condiciones y CAT con concentraciones mayores.

Por otro lado, Ríos *et al.* (2013) evaluaron la alteración de los biomarcadores de estrés oxidativos del tejido hepático en *O. niloticus* expuesta a cilindrospermopsina.

Sus resultados fueron de 3.6 y 6.3 U/mg de proteína para los grupos control y estresado, respectivamente. En este trabajo, los resultados de CAT fueron más elevados que los de GPx, por lo que se puede presumir que la concentración de peróxido de hidrógeno fue lo suficientemente elevada para que se presentara esta situación.

7.3.5 Actividad enzimática de superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que contiene Cu, Zn o Mg en su sitio activo, siendo entonces una metaloproteína, la dependiente de Cu y Zn las que se encuentran en el citosol, mientras que la dependiente de Mg se encuentra en mitocondria. El poder antioxidante de SOD radica en que cataliza la conversión del radical superóxido a H_2O_2 mediante dismutación (Stallings *et al.*, 1992). Las enzimas SOD juegan un papel antioxidante fundamental, su importancia está indicada por su presencia en todos los organismos aerobios examinados. Adicionalmente, la velocidad de las dismutaciones catalizadas por SOD es cercana a su límite de difusión, haciéndola una de las enzimas más activas (Helmunt, 1991; Van der Oost *et al.*, 2003).

En la figura 15 se presentan los resultados de actividad enzimática de superóxido dismutasa para el tejido hepático, reportados en unidades por miligramo de proteína (U/mg de proteína). En ella se observa que el tratamiento DRMJ presenta los valores más bajos de los 3 tratamientos, con un aumento significativo en el tiempo 12hE ($P < 0.05$). Esto indica que a las 12 h de estrés la producción de radical superóxido aumentó debido a la disminución de la temperatura, pero se recuperó el nivel inicial de manera rápida gracias al aporte de los compuestos antioxidantes que neutralizan los radicales libres y permiten que el radical superóxido se genere con menor velocidad.

Por otro lado, el tratamiento DC tiene los valores de actividad más altos de los 3 tratamientos ($P < 0.05$), esto puede deberse a que su dieta tiene menor concentración

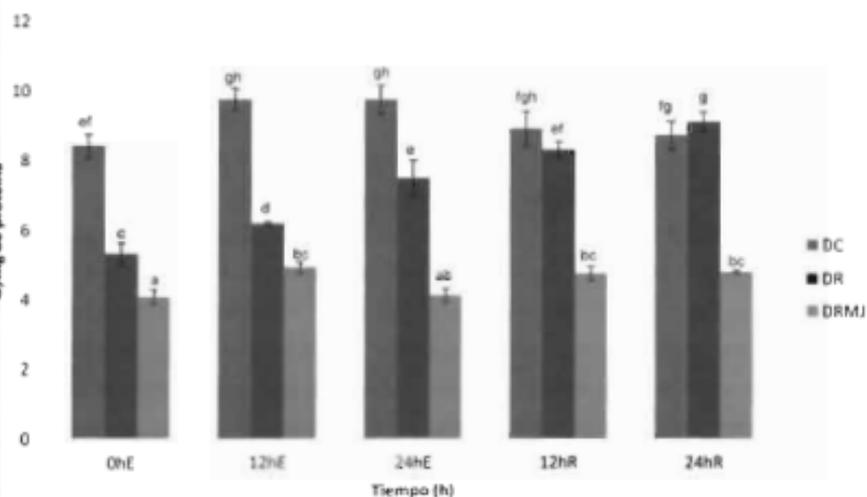


Figura 15. Determinación de actividad de SOD en hígado. Unidades de actividad de SOD por miligramo de proteína de tejido hepático.

Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). $n=3$

de compuestos antioxidantes y por tal motivo esta enzima presenta mayor actividad, ya que se produce un exceso de radicales superóxido.

Se observa un aumento en los tiempos 12hE y 24hE, aunque disminuyen en los tiempos 12hR y 24hR, con valores iguales a los del tiempo 0hE ($P < 0.05$). Esto indica que aunque existe una afectación en este tratamiento, los organismos fueron capaces de recuperar sus niveles normales dado que el daño no fue permanente, sino que al retirar el factor o agente estresante la producción del radical superóxido se normalizó. Por último, en el tratamiento DR se aprecia un aumento significativo ($P < 0.05$) y sostenido desde el tiempo 12hE hasta las 24hR. Este comportamiento se puede deber a que en dicho tratamiento se presentó una sobreproducción del radical superóxido debido a una deficiencia orgánica de compuestos antioxidantes y por ende la incapacidad de neutralizar los radicales libres generados metabólicamente.

En la figura 16 se muestran los resultados de actividad de superóxido dismutasa para las branquias, en esta se puede observar que los valores para el tratamiento DRMJ permanecen sin afectación ($P > 0.05$) y además son los más bajos de los 3 tratamientos. Esto puede deberse a que en dicho tejido la generación del radical superóxido no se afectó por el descenso de la temperatura, ya que los compuestos antioxidantes consumidos mediante la dieta fueron capaces para neutralizar los radicales libres generados. Por otro lado, el tratamiento DC muestra los valores más elevados ($P < 0.05$) pero estables con respecto al tratamiento DRMJ, lo cual puede indicar que durante la etapa 1 aumentó la producción de radicales superóxido, tal vez por causas fisiológicas de los organismos, aunque no se afectó por el shock por frío.

En cuanto el tratamiento DR, este presenta valores con afectación sostenida ($P < 0.05$), ya que se observa un aumento en los tiempos 12hE y 24hE con respecto del 0hE, aunque posteriormente disminuyen en el tiempo 12hR, pero aumenta de nuevo al 24hR. Esto indica que si existió una afectación por efecto de la baja temperatura dado que su capacidad antioxidante fue deficiente debido a la baja ingesta de compuestos con esta actividad.

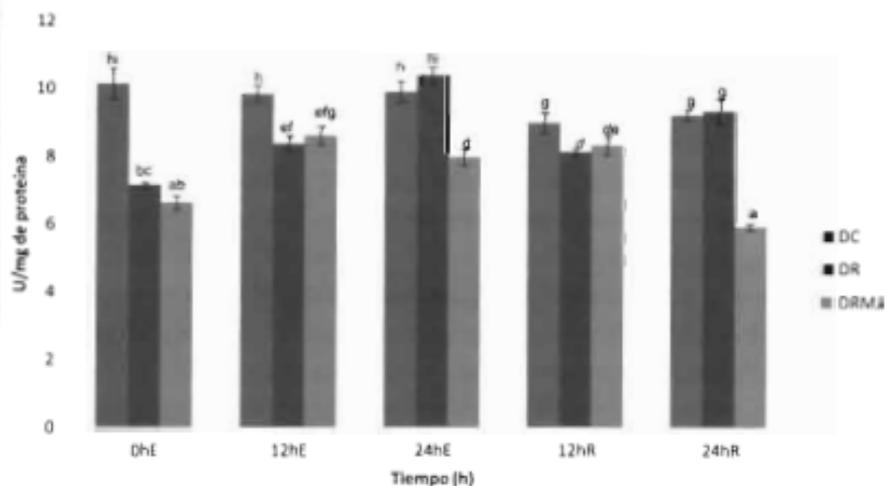


Figura 16. Determinación de actividad de SOD en branquias. Unidades de actividad de SOD por miligramo de proteína de tejido branquial. Literales iguales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). $n = 3$

La superóxido dismutasa es la enzima encargada de dismutar el radical superóxido y convertirlo en H_2O_2 . Es una de las primeras defensas contra el ataque de radicales libres y EROs en el organismo (Pandey *et al.*, 2003).

Los resultados de esta investigación muestran valores de actividades similares en hígado y branquias en cuanto a esta enzima (Figuras 15 y 16), aunque en ambos tejidos la DRMJ mantuvo los valores más bajos de los 3 tratamientos. Esto puede deberse a que los organismos de este tratamiento adquirieron el efecto quimioprotector de los compuestos antioxidantes que consumieron mediante la dieta. Almeida *et al.* (2002 y 2009) obtuvieron resultados más elevados a los del presente estudio en la actividad de esta enzima en su trabajo de investigación con cadmio sobre esta misma especie. Los valores que reportan van desde 143.1 ± 10.6 para el grupo control y 623.7 ± 7.0 (U/mg de proteína) para el grupo estresado. Como ya se mencionó anteriormente, esto puede deberse a que en ellos emplearon organismos más pequeños, de entre 30 y 40 g de peso, que son más susceptibles a ser afectados por cualquier condición climática adversa debido a que su sistema inmunológico es inmaduro. En este aspecto, Castro *et al.* (2012) también obtuvieron resultados más elevados en tejido hepático del orden de 300.9 ± 17.5 y 248.3 ± 19.4 U/mg de proteína para los grupos control y estresados, respectivamente, aunque al igual que en el presente trabajo indujeron el estrés con bajas temperaturas. Estos autores trabajaron con lenguado (*Solea senegalensis*) y a pesar de la diferencia de especies, observaron que el shock por frío provoca una disminución significativa en la actividad de esta enzima, pero un aumento en las enzimas de CAT y GPx, así como en la lipoperoxidación ($P < 0.05$).

Gülzar y Mustafa (2010) también obtuvieron valores más elevados que los del presente estudio (86.11 ± 18.9 U/mg de proteína en promedio) al inducir estrés en *O. niloticus* con Cd, Cu, Cr y Fe. En este trabajo igualmente observó una disminución en la actividad de SOD, pero también en CAT, GPx. Así mismo, Montovani *et al.* (2009) observaron una disminución en la actividad de SOD en *O. niloticus* estresadas con triclorofenol (TRC), encontrando valores similares a los de este trabajo: 3.5 ± 0.2 y 2.87 ± 0.17 U/mg de proteína para los grupos control y estresados, respectivamente.

Por otro lado, Mohebbi *et al.* (2012) evaluaron la influencia dietaria del ajo sobre el estatus redox en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Aunque ellos analizaron el estrés oxidativo en sangre y no indujeron algún tipo de estrés, sus resultados coinciden con los de este trabajo ya que la inclusión de fuentes de antioxidantes naturales en la dieta de los peces mejora su estatus redox, por lo que se puede prevenir o contrarrestar la condición de estrés oxidativo. Mohamed *et al.* (2015) también observaron el efecto benéfico de los antioxidantes naturales al incluir alicina en dieta para *O. niloticus* estresadas con deltametrina. Sus resultados de actividad de SOD aunque son más elevados que los de esta investigación, coinciden al mencionar que el enriquecer los alimentos para peces con antioxidantes naturales les confiere a estos la capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo. Para el tejido hepático, los resultados fueron: 97.56 ± 3.9 , 108.86 ± 4.33 y 87.77 ± 4.63 U/mg de proteína para los grupos control, estresado y estresado con adición de alicina, respectivamente. Para la branquias los valores fueron más bajos: 27.83 ± 1.69 para el grupo control, 33.63 ± 2.7 para el grupo estresado y 19.53 ± 1.66 U/mg de proteína para el grupo estresado con adición de alicina.

Los valores tan elevados de estos trabajos con respecto al presente estudio se puede deber a que las tallas de los organismos fueron diferentes en cada uno de ellos, con diferencias de hasta 150 g de peso. También se puede deber a que posiblemente utilizaron otra variedad de *O. niloticus* ya que no reportan ese dato. Así mismo, otro motivo puede ser que en sí, el factor estresante que utilizaron fue un agente químico o microbiológico, mientras que en el presente estudio fue un agente fisicoquímico y este tiene un efecto directo en el grado del estrés inducido.

8. CONCLUSIONES

La inclusión de harina de subproductos de mango y extracto acuoso de jamaica en la elaboración de una dieta para tilapia aumentó la actividad antioxidante y el contenido de compuestos bioactivos específicos como fenólicos totales, α -tocoferol y β -caroteno en la misma. Así mismo, el suministro de este alimento por 6 semanas mejoró el sistema redox de los organismos y les confirió un efecto quimioprotector contra el efecto del descenso abrupto en la temperatura, de acuerdo a los biomarcadores de estrés oxidativo analizados en esta investigación. Respecto a la bioacumulación de α -tocoferol y β -caroteno en branquias e hígado, posiblemente el corto tiempo de alimentación con esta dieta no favoreció a que se presentara dicha situación.

Con base en los últimos 2 tiempos de muestreos, se puede concluir que suspender el factor estresante (baja temperatura) permite que los valores de los biomarcadores de estrés oxidativo analizados en este estudio regresen a sus niveles iniciales en el tratamiento DRMJ. El descenso abrupto de la temperatura empleado en esta investigación afectó los valores de todos los parámetros analizados denominados como biomarcadores de estrés oxidativo en las dietas que no fueron enriquecidas con antioxidantes naturales.

9. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se recomienda:

1. Aumentar el tiempo de alimentación con la dieta DRMJ al menos 2 semanas más para evaluar si con este tiempo se presenta una bioacumulación de α -tocoferol y β -caroteno.
2. Evaluar los mismos biomarcadores de estrés oxidativo en riñón y bazo para determinar si en estos tejidos se manifiesta alguna afectación por efecto de la baja temperatura.
3. Evaluar si la dieta DRMJ es efectiva contra otro inductor de estrés oxidativo como alguna plaguicida organoclorado y organofosforado.
4. Emplear otra fuente de antioxidantes naturales y/o sintéticos y evaluar si muestra el mismo desempeño que la dieta DRMJ.

10. REFERENCIAS

- Abou A., Abou F., Abou E. (2011). Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of American Science* 7: 445-456.
- Ajila C., Naidu K., Bhato S., Prasado U. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry* 105 (3): 982-988.
- Ajila C., Leelavathi K., Prasado U. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuit with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science* 48 (2): 319-326.
- Alves E., Dias L., Martínez G., Miyamoto S., Onuki J., Barbosa L., Machado G., Manso P., Ronsein G., Sigolo C., Barbosa B., Gracioso M., Gennari M., Di Mascio P. (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146: 588-600.
- Amin K., Hashem K. (2012). Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *Veterinary Research* 8: 45-53.
- Ansari R., Kaur M., Ahmad F., Rahman S., Rashid H., Islam F., Raisuddin S. (2009). Genotoxic and oxidative stress-inducing effects of deltamethrin in the erythrocytes of a freshwater biomarker fish species, *Channa punctata* Bloch. *Environmental Toxicology* 24: 429-436.
- Association of Official Analytical Chemists (1990). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Vol. 1, 15th edition. USA.
- Ariza-Flores R., Serrano V., Navarro S., Ovando M., Vázquez E., Barrios A., Michael A., Guzmán S., Otero A. (2014). Variedades mexicanas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) 'alma blanca' y 'rosaliz' de color claro, y 'cotzaltzin' y 'tecoanapa' de color rojo. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37 (2): 181-185.
- Avello M. and Suwalsky M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)* 494: 161-172.

- Barreto J., Trevisan T., Hull W., Erben G., De Brito E., Pfundstein B., Rtele, G., Spiegelhalder B., Owen R. (2008). Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.). *Journal Agricultural Food Chemistry* 56: 5599–5610.
- Beers R. and Sizer I. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biology Chemistry* 195: 133-140.
- Becker W., Kleinsmith L., Hardin J. (2007). *El mundo de la célula Sexta Ed.*, Madrid: Pearson Educación S.A.
- Berardini N., Schieber A., Klaiber I., Beifuss U., Carle R. and Conrad J. (2005). 7-O-methylcyanidin 3-O- β -D-galactopyranoside, a novel anthocyanin from mango (*Mangifera indica* L.) cv. 'Tommy Atkins' peels. *Chemistry Science* 60 (7): 801–804.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bureau D., Cho C. (1994). Ingredient quality: an essential factor in the formulation of cost-effective aquaculture diets. In: *Expanding Agriculture Co-product Uses in Aquaculture Feeds Workshop Proceedings*, pp. 234–258. Des Moines, IA.
- Cadenas E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* 51: 79-110.
- Calderón J., Muñoz E., Quintanar M. (2013). Estrés Oxidativo y diabetes Mellitus. *Revista de Educación Bioquímica* 32 (2): 53-66.
- Camelo G., Ragazzo J., Jimenez A., Venegas P., Paredes O., del Villar A. (2013). Comparative study of anthocyanin and volatile compounds content of four varieties of mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Plant Foods for Human Nutrition* 68 (3): 294-234.
- Castillo-Juárez I., González V., Jaime-Aguilar H., Martínez G., Linares E., Bye R., Romero I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 122: 402– 405.

- Castro C., Pérez-Jiménez A., Guerreiro I., Peres H., Castro-Cunha M., Olivia-Tales A. (2012). Effects of temperatures and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 163: 372-378.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59: 577-605.
- Chanock S., El B., Smith R., Babior B. (1994). The respiratory burst oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 269: 24519-24522.
- Cheeseman K., Slater T. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 49: 481-493.
- Chen C., Hsu J., Wang S., Chiang H., Yang M., Kao E., Ho Y., Wang C. (2003). Hibiscus sabdariffa Extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 5472-5477.
- Chiu D., Stults F., Tappel A. (1976). Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 445: 558-566.
- Christiansen R. (1996). The effects of astaxanthin on the early life stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Dr. Scient Thesis, University of Bergen, Norway.
- CONAPESCA-CSPTN (2014). Anuario estadístico. Disponible en www.sagarpa.gob.mx. Consultado el 23 de abril del 2015.
- Cruz A., Gehling W., Lomnicki S., Cook R., Dellinger B. (2011). Detection of environmentally persistent free radicals at a Superfund Wood treating site. *Environmental Science & Technology* 45: 6356-6365
- Del Rio D., Stewart A., Pellegrini N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15: 316-28.
- Díaz-Acosta A., Membrillo-Hernández J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico biológicas* 9 (1): 34-44.
- Djordjevic V. (2004). Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology* 237: 57-89.

- Donaldson M., Cookes S., Patterson D., Macdonald J. (2008). Cold Shock and Fish. *Journal of Fish Biology* 73: 1491-1530.
- Duke J., Bogenschutz-Godwin M., Duceillier J., Duke P. (2003). *Handbook of medicinal spices*. CRC Press LLC. New York, USA. 348 p.p.
- Dumont M., Beal M. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 51: 1014-1026.
- Engels C., Knodler M., Zhao Y., Carle R., Ganzle M., Schieber A. (2009). Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57 (17): 7712-7718.
- Esterbauer H., Cheeseman K. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products, malonaldehyde and hydroxynonetal. *Methods in Enzymology* 186: 407-421.
- FAO (2010). Aspectos generales de la tilapia nilótica. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es Consultado o el 10 de mayo de 2015.
- FAO (2011). La acuicultura cubre más de la mitad del consumo mundial. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/94232/icodef>: Consultado el 14 de abril del 2013.
- FAOSTAT (2011). FAO Statistic, Food and Agricultura Organization of the United Nations. Rome, Italy. Disponible en : <http://faostat.fao.org>. Consultado el 15 de junio 2014.
- Ferreira (2001). *Química de los alimentos*. Acribia, Zaragoza, España. 1092 p.p.
- Ferreira M., Moradas-Ferreira P., Reis-Henriques M. (2005). Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology* 71: 39-48.
- Fraga C., Cavanagh E., Carrasquedo F., Lotiti F., Oteiza P. (1996). Antioxidants defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: *Physiology and biochemistry of fishes of the amazon*. Edited by Val A., Almeida M., and Randall D. 323-330 p.p.

- Fridovich I (1975). Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 44: 147-159.
- Fridovich I (1976). Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. In: *Free radicals in biology*. Ed. Pryor. Academic Press, New York. Vol. I, pp. 239-277.
- Fridovich I (1998). Oxygen toxicity: A radical explanation. *Journal of Experimental Biology* 201: 1203-1209.
- Friedlander M., Kotchabhakdi N., Prosser, C. (1976). Effects of cold and heat on behavior and cerebellar function in goldfish. *Journal of Comparative Physiology A*. 112: 19-45.
- Gershman R (1964). Biological effects of oxygen. En: *Oxygen in the animal organism*. Dickens F, Neil E (Eds). New York, McMillan and Co.
- Gluszczak L., Dos Santos D., Silveira B., Rodrigues R., Chitolina M., Vera M., Loro V. (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 146: 519-24.
- Gomez J., Peña B., Salgado I., Guzman M. (2003). Reproductive aspects of *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) at Coateteico lake, Morelos, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 51: 221-228.
- Guha S., Ghosal S., Chattopadhyay U. (1996). Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosyl xanthone. *Chemotherapy* 42: 443-451.
- Guicin I., Buyukokuroglu M. y Kufrevioglu I. (2003). Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal of Pineal Research* 34: 278-281.
- Graham R., Rouser J. (2000). Carotenoids in staple foods: their potential to improve human nutrition. *Food and Nutrition Bulletin* 21: 405-409
- Halliwell B., Gutteridge JMC (1989). In: *Free radicals in biology and medicine*. Edition 2 Editorial Oxford, Clarendon Press.
- Halliwell B, Gutteridge J., Cross C. (1992). Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119: 598-620.

- Halliwell B., Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 57: 724S-725S.
- He H., Lawrence A. (1993). Vitamina E requeriment of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 118: 245-255.
- Helmunt S., 1991. Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants. Academic Press Incorporated U.S.A. 280-300 p.
- Hermes-Lima M. (2005). Oxygen in Biology and Chemistry: Role of Free Radicals. *Functional Metabolism*, John Wiley and Sons, Incorporated 319-368 pp.
- Hernández C., Olvera-Novoa M. A., Hardy R. W., Hermosillo, A., Reyes, C., González-Rodríguez B. (2010). Complete replacement of fish meal by porcine and poultry by-product meals in practical diets for fingerling Nile tilapia. *Aquaculture Nutrition* 16: 44-53
- Hinneburg L., Dorman H. y Hiltunen R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry* 97: 122-129.
- Hirunpanich V., Utaipat A., Morales N., Bunyapraphatsaea N., Sato H., Herunsalee A., Suthinsisang C. (2005). Antioxidant effect of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat lowdensity lipoprotein (LDL). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28 (3): 481-484.
- Hodgson E., Fridovich I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 14: 5294-5299.
- INFOAGRO. 2002. <http://www.infoagro.com/Hortalizas/tomate.Htm>. Consultado el 15 de mayo de 2013.
- Ito N., Fukushima S., Hagiwara A., Shibata M., Ogiso T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of National Cancer Institute* 70 (2): 343-352.
- Jagtiani J., Chan H., Sakai W. (1988). Tropical fruit processing. San Diego, Academic Press, Incorporated 25: 15-105.
- Ju Z., Durham R., Liu Z. (2002). Differential gene expression in the brain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to cold acclimation. *Molecular Genetics and Genomics* 268: 87-95.

- Kim R., Emi M., Tanabe K., Murakami S., Uchida Y., Arihiro K. (2006). Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *The Journal of Pathology* 208 (3): 319-326.
- Kirsch M, de Groot H (2001). NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *FASEB Journal* 15: 1569-1574.
- Kuo W., Huang C., Liu A., Cheng C., Li S., Chang W., Weiss C., Azem A., Jinn T. (2013). CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in *Arabidopsis* chloroplasts. *New Phytologist* 197(1): 99-110
- Kuskoski E., Asuero A., Troncoso A., Mancini-Filho J. y Fett R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas* 25 (4): 726-732.
- Lako J., Trenerry M., Wahlqvist N., Wattanapenpaiboon S., Sotheeswaran M. (2007). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry* 101 (4): 1727-1741.
- Lara M., Olvera -Novoa M., Guzmán- Méndez B., López- Madrid W. (2002). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216: 193-201.
- Larrauri J., Rupérez P., Borroto B. y Saura-Calixto F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: Preparation and characterization. *Food Science and Technology* 29: 729-733.
- Li S. (2002). Chinese and related north American herbs. *Phytopharmacology and therapeutic values*. CRS Press. New York, USA. 598 p.p.
- Lin H., Chen J., Kuo W., Wang C. (2007). Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chemico-Biological Interactions* 165: 59-75.

- Lin H., Chen K., Sheu J., Hsuan S., Wang C., Chen J. (2012). *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chemistry* 132: 880-891.
- Lindsay D., Astley S. (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants (Eurofreda). *Molecular Aspects of Medicine* 23: 1-38.
- Lushchak V. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101: 13-30.
- Madeira D., Narciso L., Cabral H., Vinagre C., Diniz M. (2013). Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 166: 243-250.
- Maganha E., Halmenschlager R., Rosa R., Henriques J., Ramos A., Saffi J. (2010). Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry* 119 (1): 41-48.
- Maisuthisakula, P., Gordon M. (2009). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry* 117 (2): 332-341.
- Malek R., Sajadi H., Abraham J., Grundy M., Gerhard G. (2004). The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 138: 363-373.
- Márquez, V. R.; De la Rosa, C.; Rivero, C. y Medina, M. (2007). Actividad diurética del extracto total acuoso de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. administrado en ratas albinas variedad Wistar. *Scientia et Technica* 33 (2): 377-381.
- Mataix J., Battino M. (2002). En: *Nutrición y alimentación humana*. Vol. II, Capítulo 43: "Estrés oxidativo" Editorial Ergon.
- Mates J., Pérez-Gómez C., De Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32: 595-603.
- McCord J. (1979). In: *Reviews in biochemical toxicology*. Eds. Hodgson, E.; Berd, JR y Philpot, R.M. Elsevier, New York. Vol. I. pp. 190.
- Medina R., Sumaya M., Machuca M., Sánchez M., Balois R., Jiménez E. (2013). Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 variedades de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en función de fenólicos y antocianinas

- totales. *Ciencias Técnicas Agropecuarias* San José de las Lajas 22 (1): 41-44.
- Monje R., Campor H. Tabla de composición de alimentos de Costa Rica: carotenoides y tocoferoles. Tres Ríos, Costa Rica. INCIENSA, 2013.
- Morales F., Jiménez-Pérez S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 72: 119-125.
- Moure A., Cruz J., Franco D., Domínguez J., Sineiro J., Domínguez H., Nunez M. y Parajo J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72: 145-171.
- Mungole A. and Chaturvedi A. (2011). Determination of antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* L. and *Rumex nepalensis spreng*. *International Journal of Pharma and BioSciences* 2: 120-128.
- Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K (1974). Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 358: 251-261.
- Nakano T., Kanmuri T., Sato M., Takouchi M. (1999). Effect of astaxantin rich red yeast on oxidative stress in rainbow trout. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426: 119-125.
- Nieto N. (1993). Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memoria de licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Granada, España.
- Oliver C., Ahn B., Moerman E., Goldstein S., Stadtman E. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry* 262 (12): 5488-5491.
- Olvera N., Martínez P., Real de León E. (1993). Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos. FAO. México. Reporte No: FAO-FI-GCP/RLA/102/ITA. P. 110.
- Osborne D., Voogt P. (1986). Análisis de los nutrientes en los alimentos. Editorial Acirbia S. A. Edición al español de *The analysis of nutrients in foods*. España. P. 258.

- Oury T., Rabouille C., Clot J., Chang L. (1992). Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 10405-10409.
- Oury T., Day B., Crapo J. (1996a). Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 957-965.
- Oury T., Day B., Crapo J. (1996b). Extracellular superoxide dismutase: A regulator of nitric oxide bioavailability. *Laboratory Investigation* 75: 617-636.
- Pan C., Chien Y., Wang Y. (2011). Antioxidant defence to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques steindachneri*) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquaculture Nutrition* 17: 258-266.
- Peeters R., Van den Burg E., Flik G., Wendelaar Bonga S., Van der Linden A. (2001). Stress response in the brain of a common carp submitted to a sublethal cold shock as measured by BOLD and CBV sensitive fMRI. *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 9: 675.
- Pérez (2003). Obtención y cuantificación de fibra dietaria a partir de residuos de algunas frutas comunes en Colombia. *Vitae. Revista de la Facultad de Químicas Farmacéuticas* 9 (1): 5-14.
- Peruzzi S., Chatain B. (2000). Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture* 189, 23-37.
- Popeneo W. 1974. *Manual of tropical and subtropical fruits*, Mc Millan, New York. 474 p (Reimpresión, Hafner Press, New York 1974).
- Prasad T., Anderson M., Stewart C. (1994). Acclimation, hydrogen peroxide and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiology* 105: 619-627.
- Pryor W. (1986). Oxy-radicals and related species: Their formation, life-times, and reactions. *Annual Review of Physiology* 48: 657-667.
- Purseglove J. Anacardiaceae. In *Tropical Crops Dicotyledons*, Longman Group, London, U.K., 1974, pp 18-32.

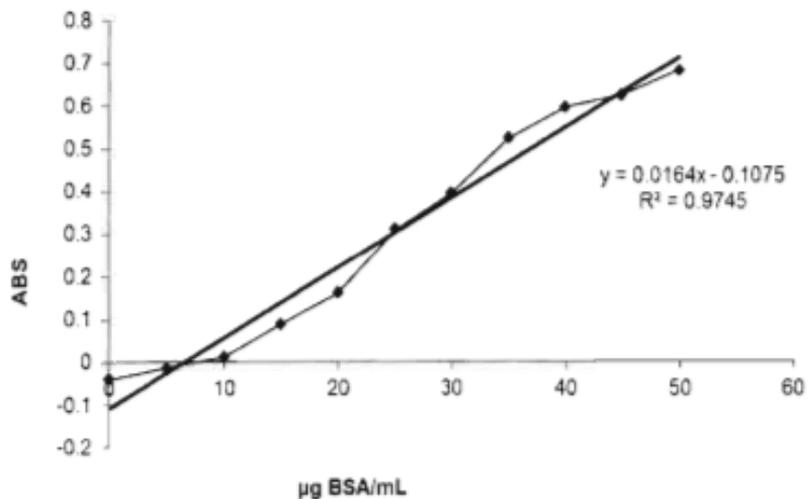
- Reanmongkol W., Itharat A. (2007). Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces in experimental animals. *Journal of Science and Technology* 29 (1): 29-38.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 28: 26-33.
- Ribeiro S., Barbosab L., Queirozc J., Knödlerd M., Schieber A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry* 110 (3): 620-626.
- Robles-Sánchez R., Rojas-Grau M., Ganz M., Odriozola-Serrano I., González-Aguilar G., Martín-Beiloso O. 2009. Effect of minimally processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut "Kent" mango (*Mangifera indica* L.). *Postharvest Biology and Technology* 51 (3): 384-390.
- Rotilio G, Calibrese L, Bossa F, Barza D, Agrò AF, Mondovi B (1972). Properties of the apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzyme activity of bovine superoxide dismutase. *Biochemistry* 11: 2182-2187.
- SAGARPA, CONAPESCA (2011). Anuario estadístico. 2011. Disponible en www.sagarpa.gob.mx. Consultado el 23 de abril del 2013.
- SAGARPA-SIAP. (2013) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en www.sagarpa.gob.mx. Consultado el 22 de abril del 2015.
- Sánchez G., Re L., Giuliani A., Nunez-Selles A. J., Davison G., Leon- Fernández O. (2000). Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacology Research* 42: 565-573.
- Sánchez R. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 12 (2): 187-196.
- Sayed I., Parvez S., Pandey S., Bin-Hafeez, Haque R., Raisuddin S.(2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56:295-301.

- Srisakulwat S., Nagel A., Srumsiri P., Carle R., Sybille-Neidhart S. (2008). Yield and quality of pectins extractable from the peels of Thai mango cultivars depending of fruit ripeness. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 10727-10738.
- Schieber A., Stintzing F. y Carle R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds— recent developments. *Trends in Food Science and Technologies* 12: 401-413.
- Schieber, A., Berardini N. y Carle R. (2003). Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') peels by high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5006-5011.
- Soong Y., Barlow P. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry* 88 (3): 411-417.
- SOTO J. (2010). Cultivo de tilapia en estanquería recubierta con plástico impermeabilizante bajo un sistema de recirculación. Disponible en: [www.sinat.semarnat.gob.mx/dgiraDocs/documentos/camp/estudios/2010\(04C-A2010PDO12.PDF](http://www.sinat.semarnat.gob.mx/dgiraDocs/documentos/camp/estudios/2010(04C-A2010PDO12.PDF). consultado el 15 de noviembre de 2014.
- Southern PA, Powis G (1988). Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceedings* 63: 381-389.
- Spalholz JE, Boylan LM (1991). Glutathione peroxidase: The two seleniumenzymes. In: *Peroxidases on chemistry and biology*. Everse J, Evers KE, Grisham MB (Eds) Boca Raton, CRC Press.
- Stallings W., Bull J. Fee M., Ludwig M (1992). Iron and manganese superoxide dismutases: catalytic inferences from the structures. En: *Molecular Biology of free radical Scavenging systems*. Current communications En cell and Molecular Biology. Scandalios J. Ed. 47-67 p.
- Sumaya-Martínez M., Sánchez L., Torres G., García D. (2012). Value chain of mango and its byproducts in the nutritional and functional properties. *Revista Mexicana de Agronegocios* 30: 826-833.
- Storey K. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29:1715-1733.

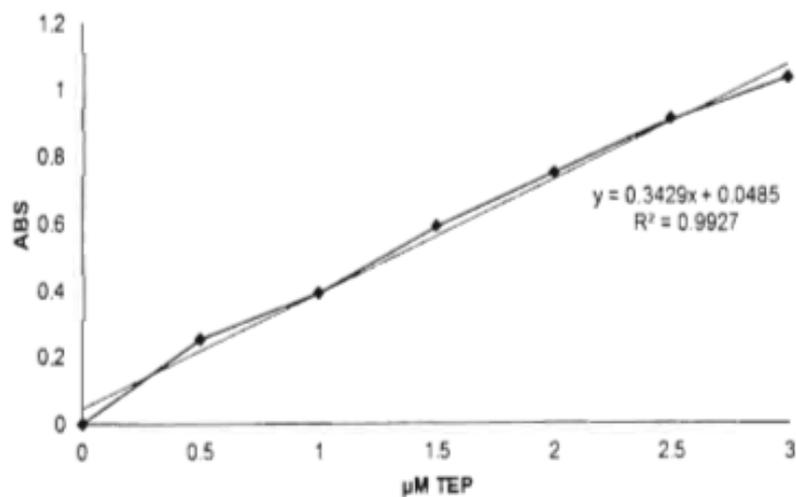
- Tainer J., Getzoff E., Beem K., Richardson J., Richardson D. (1982). Determination and analysis of the 2A structure of copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Molecular Biology* 160: 181-217.
- Tsai P., McIntosh J., Pearce P., Camden B., Jordan B. (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* 35: 351-356.
- Ursini F., Maiorino M., Valente M., Ferri L., Gregolin C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation. *Biochimica et Biophysica Acta* 710: 197-211.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecology toxicology and environmental safety* 64: 178-189.
- Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Assessment Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Verlecar X., Jena K., Chaiy G. (2007). biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chemico-Biological Interactions* 167: 219-226.
- Vinagre C., Madeira D., Narciso L., Cabral H., Diniz M. (2012). Effects of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile Seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators* 23: 274-279.
- Waagbo R., Glette J., Raa-Nielsen E., Sandnes K. (1993). Dietary Vitamin C, Immunity and disease resistance in atlantic salmon. *Fish Physiology and Biochemistry* 12 (1): 61-73.
- Wall A., Olivas F., Velderrain G., González L., de la Rosa L. (2015). El mango: aspectos agroindustriales, valor nutricional/funcional y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria* 31 (1): 67-75.

- Warholm M, Cuthenberg C, Von Barh C, Mannervick B (1985). Glutathione transferases from human liver. *Methods in Enzymology* 113: 499-504.
- Wen-Hsiung C., Lian-Tien S., Ching-Lin T., Yen-Lin S., Ching-Fang C. (2002). Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M and leukocyte phagocytosis in tilapia. *General and Comparative Endocrinology* 126: 90-100.
- Welker T., Conglenton. (2008). Effect of dietary alpha-tocopherol+ascorbic acid, selenium and iron on oxidative stress in sub-yearling Chinook salmon. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93: 15-25.
- Yin, M. y Chao, C. (2008). Anti-Campylobacter, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. *International Journal of Food Microbiology* 127 (2): 73-77.
- Yoshioka T., Homma T., Meyrick B., Takeda M., Moore-Jarrett, Kan V., Ichikawa I. (1994). Oxidants induce transcriptional activation of manganese superoxide dismutase in glomerular cells. *Kidney International* 46: 405-413.

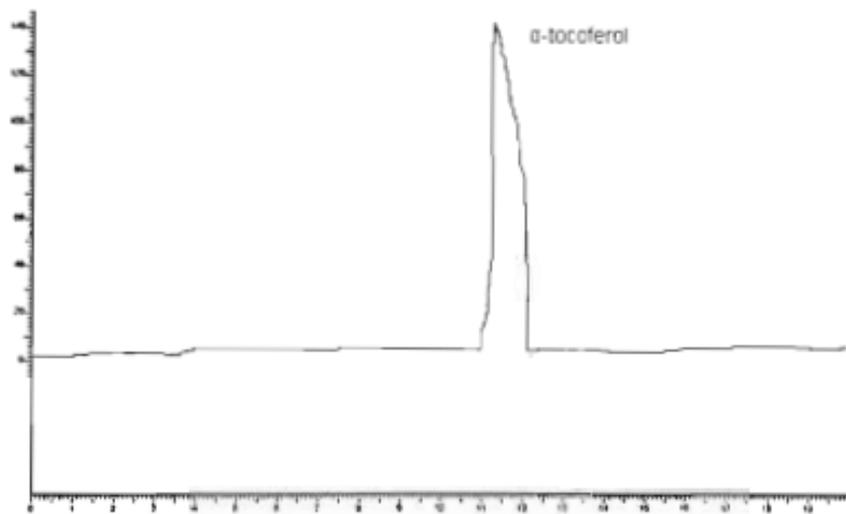
11. ANEXOS



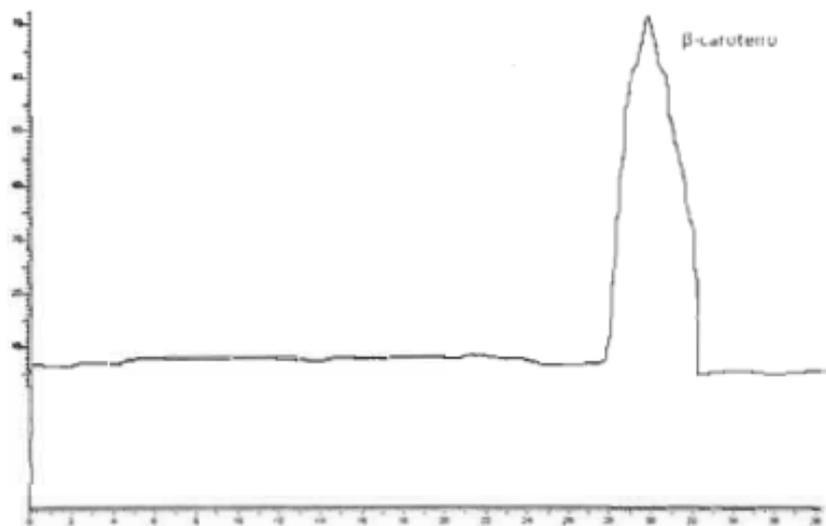
Anexo 1. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) para la cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford.



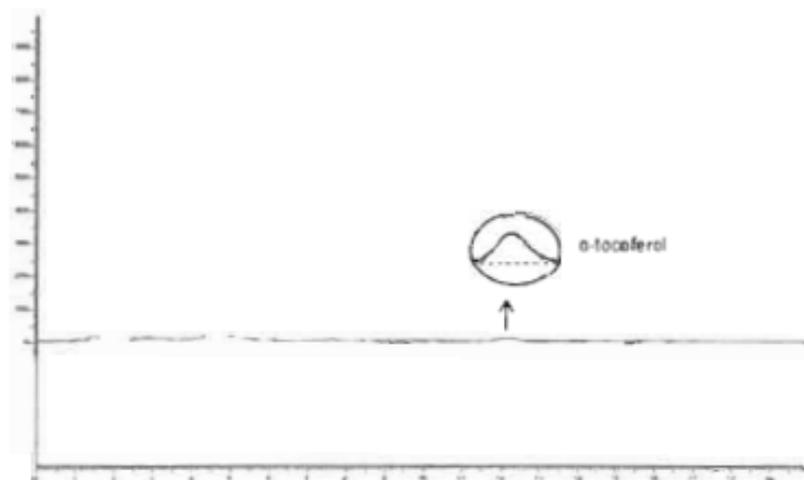
Anexo 2. Curva estándar de tetraetoxipropano (TEP) para la cuantificación de lípidos oxidados.



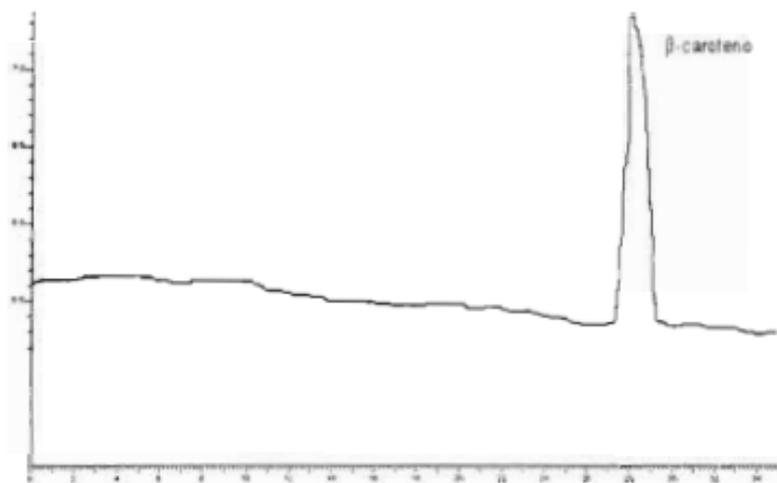
Anexo 3. Cromatograma del estándar de α -tocoferol.



Anexo 4. Cromatograma del estándar de β -caroteno.



Anexo 5. Cromatograma de la determinación de α -tocoferol en a dieta DRMJ.



Anexo 6. Cromatograma de la determinación de β -caroteno en la dieta DRMJ.