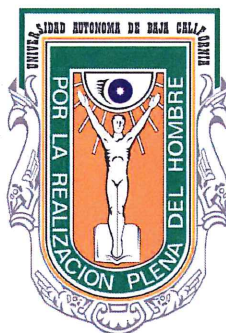


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



“Efecto de la inclusión de harina de uva en dietas para tilapia marina
(*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) bajo estrés térmico y su
efecto en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)”

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENAR EL GRADO DE

LICENCIADO EN OCEANOLOGÍA

PRESENTA

Carlos Paúl Vargas Cossio

Ensenada, Baja California, México, Mayo del 2015

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS
TESIS DE LICENCIATURA

“EFECTO DE LA INCLUSION DE HARINA DE UVAEN DIETAS PARA TILAPIA MARINA
(*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) BAJO ESTRES TERMICO Y SU EFECTO EN LA
ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)”

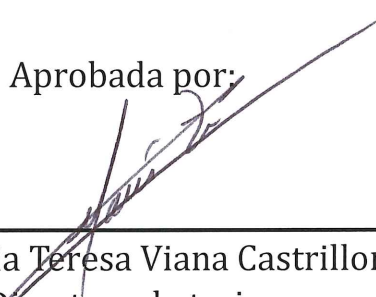
TESIS

LIC. EN OCEANOLOGIA

PRESENTA

CARLOS PAUL VARGAS COSSIO

Aprobada por:



Dra. Maria Teresa Viana Castrillon
Directora de tesis



M. en C. Fernando Barreto Curiel
Sinodal



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



“Efecto de la inclusión de harina de uva en dietas para tilapia marina
(*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) bajo estrés térmico y su
efecto en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)”

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENAR EL GRADO DE

LICENCIADO EN OCEANOLOGÍA

PRESENTA

Carlos Paúl Vargas Cossio

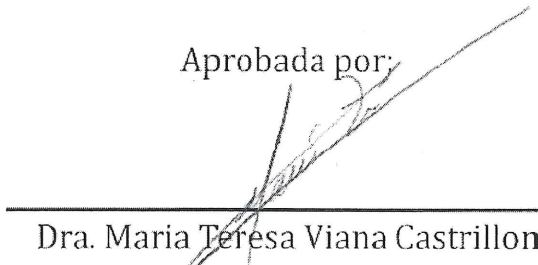
Ensenada, Baja California, México, Mayo del 2015

RESUMEN de tesis para obtener el grado de Licenciado en Oceanología que presenta CARLOS PAÚL VARGAS COSSIO como requisito parcial para su titulación en la Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California, México. Abril 2015

Efecto de la inclusión de harina de uva en dietas para tilapia marina (*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) bajo estrés térmico y su efecto en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

Resumen aprobado por:

Aprobada por:



Dra. Maria Teresa Viana Castrillon
Directora de tesis

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto antioxidante del resveratrol contenido en el subproducto de la uva y su efecto en la reducción del estrés térmico en tilapias adaptadas al agua de mar. Se sabe que en la uva y sobre todo en la piel, existe un compuesto químico llamado resveratrol con alta actividad antioxidante. La zona de Baja California y en especial el municipio de Ensenada, se caracteriza por su alta producción de vinos generando una cantidad considerable de subproductos que hasta el momento no son utilizados. Cuando un organismo entra en estrés, una reacción natural de ellos mismos es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) como producto del metabolismo de lo que les ocasiona el estrés (agentes extraños o estrés). Los ROS, a su vez, dan lugar a que se active la enzima superóxido dismutasa (SOD), que se encarga de neutralizar la producción de dichos compuestos. Si bien esta enzima ayuda a mitigar los procesos de toxicidad y estrés, en demasía propician un desgaste energético. Además de la posibilidad de que su producción no sea suficiente para neutralizar los ROS y éstos puedan llegar a ocasionar la oxidación de lípidos y proteínas e incluso causar el deterioro del ADN. Se conoce también que con la edad los organismos pierden la eficiencia de las enzimas con actividad antioxidantes producidas de forma natural. En los sistemas de producción acuícola, los organismos están expuestos constantemente a muchos factores de estrés tales como altas densidades, falta de oxígeno, cambios de temperatura, mala calidad de agua, entre otros que a su vez los debilitan y exponen a las consecuencias antes descritas. Es así que el presente trabajo consistió en el uso de la tilapia (*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) con un peso promedio de 88 ± 0.4 g adaptadas al agua de mar alimentadas con dietas conteniendo cuatro niveles de harina de uva (HU) 0, 2, 4 y 6%. Al término de 12 semanas las tilapias se expusieron durante 15 días a un estrés térmico (de 29 a 22°C) en donde se midió la actividad de la SOD. El crecimiento obtenido no reflejó diferencias significativas, el cual estuvo entre

0.87 a 0.95 de acuerdo a la tasa de crecimiento térmico (TGC, por sus siglas en inglés), y de 1.4 a 1.6 de tasa específica de crecimiento (SGR, por sus siglas en inglés). La ganancia de peso se reportó entre 248 a 271% con relación al peso inicial. La actividad de la SOD en muestras de músculo e hígado antes y durante el proceso de estrés térmico demostró que los niveles utilizados de HU, si bien lograron disminuir la actividad de la SOD en algunos de los tratamientos, no se logró registrar una clara tendencia en todos los resultados. Por ejemplo, considerando el incremento en actividad de la SOD en los tratamientos control del hígado las dietas del 2 y 4% se mostraron por debajo, mientras que la del 6% si bien no alcanzó los niveles del control, las actividades de la SOD fueron mayores. En el músculo el tratamiento control a los 7 días mostró una mayor actividad, mientras que a los 15 días se registraron los niveles más bajos de la SOD con relación a los tratamientos experimentales. Si bien los datos obtenidos en la presente tesis no cumplieron con la hipótesis planteada, los resultados aquí mostrados son de gran importancia para aprender y obtener datos reales sobre el nivel de estrés producido por los cambios térmicos de temperatura, fenómeno al que muchas especies en cultivo están expuestas de forma cotidiana. El cambio de 29 a 22°C quizás no haya sido significativo para provocar un gran estrés en los organismos, pero existió un incremento substancial en la respuesta medida a través de la actividad de la SOD. Es así que este trabajo nos permitió medir de una manera más fina el efecto del estrés sobre las actividades metabólicas. Sin embargo, no habrá que descartar que las tilapias ya se encontraban sufriendo un estrés crónico al estar adaptadas al agua de mar. Por otro lado también se discute la implicación de utilizar altas proporciones de HU y una posible disminución en la digestibilidad.

Dedicatoria

En especial a mis padres por toda la paciencia otorgada durante el tiempo que duró mi trabajo y mi carrera, y a mi familia que me apoyó incondicionalmente y creyó en mí a lo largo de mis estudios.

A Valeria por su cariño y apoyo, por estar siempre conmigo y alentarme a seguir adelante.

Agradecimientos:

Agradezco enormemente a mi directora de tesis Tere Viana por sus consejos, por siempre darme ánimos para no darme por vencido y continuar preparándome. A mis sinodales Gabriel y Fernando por todo el conocimiento transmitido durante este largo trabajo y no menos importante toda la ayuda y paciencia ofrecida por parte de Griselda y Daniel.

Contenido

I.Introducción.....	1
II. Hipótesis	10
III.Objetivo general	11
III.1 Objetivos específicos	11
IV. Metodología.....	12
IV.1 Obtención de Organismos	12
IV.1.1 Recepción y acondicionamiento de organismos	12
IV.2Proceso de aclimatación.....	13
IV.3 Diseño experimental	14
IV.4 Elaboración de la dieta experimental	15
IV.4.1 Análisis proximales	16
IV.5 Análisis de resveratrol en HPLC.....	18
IV.6 Análisis de la actividad de la SOD:.....	19
IV.7 Análisis de calidad de agua:.....	20
IV.8 Índices biológicos	21
IV.8.1 Crecimiento en Peso (g).....	21
IV.8.2 Ganancia de Peso (%)	21
IV.8.3 Coeficiente Térmico de Crecimiento (TGC).....	21
IV.8.4 Tasa específica de crecimiento	22
IV.8.5 Índice de Supervivencia.....	22
IV.9 Análisis estadístico.....	22
V. Resultados	24
VI. Discusión	29
VII. Conclusiones.....	38

VIII. Recomendaciones	39
IX. Bibliografía	40

Lista de Cuadros:

Cuadro I. Ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas (100g) conteniendo 4 niveles de harina de uva (0, 2, 4 y 6%) para alimentar tilapias marinas (<i>Oreochromis aureus</i> x <i>O. mosambicus</i>).	16
Cuadro II. Composición proximal y contenido de resveratrol (media $\pm$ desviación estándar) de las dietas utilizadas para alimentar a juveniles de tilapia adaptadas a agua de mar (<i>Oreochromis aureus</i> x <i>O. mosambicus</i>) y contenido de resveratrol en mg ($P \leq 0.05$).....	25
Cuadro III. Consumo promedio de alimento por día para cada uno de los tratamientos por organismo (g alimento/org/día).....	25
Cuadro IV. Índices biológicos y tasa de supervivencia de juveniles de tilapia adaptadas a agua de mar (<i>Oreochromis aureus</i> x <i>O. mosambicus</i>) alimentadas con cuatro niveles de resveratrol durante 91 días ($P \leq 0.05$).....	26
Cuadro V. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD; U mg de proteína ⁻¹) en muestras de hígado y músculo (media $\pm$ desviación estándar) de juveniles de tilapia adaptadas a agua de mar (<i>Oreochromis aureus</i> x <i>O. mosambicus</i>) alimentadas con cuatro niveles de resveratrol durante 91 días ($P \leq 0.05$) antes y después de sufrir estrés térmico.	27

Lista de Figuras:

Figura 1. Serie histórica de la producción de tilapia 2002-2011.....	1
--	---

I. Introducción

A nivel mundial, la acuacultura es una práctica que va creciendo de manera acelerada. A una tasa de crecimiento mayor a la de cualquier otro sector de producción animal. Hoy en día la tilapia (o mojarra de agua dulce) es un pez que gracias a su facilidad de cultivo es posible producirla y criarla en todo el país. Siendo esta especie una de las cinco de mayor producción pesquera a nivel nacional (Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca, 2011).



Figura 1. Serie histórica de la producción de tilapia 2002-2011.

En cuanto a su producción, la tilapia presenta un crecimiento importante a partir del año 2002 (Fig. 1) en donde alcanzó las 61,751 toneladas a nivel Nacional, con una producción máxima registrada en el año 2010 con 76,986 toneladas (Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca, 2011).

El éxito de la tilapia se debe a que es un organismo que presenta alta resistencia a sobrevivir en un rango amplio de concentraciones de salinidad, calidad de agua, temperaturas, y densidades, lo que la hace una especie ideal para su cultivo. Es también un organismo con un crecimiento acelerado, y gracias a sus características de ser omnívora, presenta una amplia aceptación a una gran variedad de alimentos.

Adicionalmente cuenta con una carne con buen sabor y textura (Abdel-Fattah , 2006) si se le trata adecuadamente durante la poscosecha (eutanasia por hipotermia).

Por otro lado, la cruce entre las distintas especies de tilapia, lo cual es una práctica común en la acuacultura, da lugar a variedades aún más resistentes a condiciones adversas que sus antecesores al incrementar la variabilidad genética como lo son:

-*O. niloticus* x *O. Aureus* = "Rocky mountain"

-*O. Mossambicus* x *O. Uroleptis hornorum* = Híbrido rojo

-*O. Niloticus* x *O. Niloticus Stirling* = Chocolate

A pesar de estas ventajas, el cultivo de tilapia en México ha experimentado algunos problemas de enfermedades o crecimiento desigual, lo que nos hace pensar que a pesar de las ventajas de su cultivo, la acumulación de distintos factores están contribuyendo a un estrés excesivo y a una disminución en su potencial de desarrollo.

La Secretaria de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA¹) logró desarrollar una especie resistente al agua de mar (híbrido rojo), la cual desde hace más de 15 años fue donada al gobierno de Cuba según información de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). Recientemente esta especie regresó a México, supuestamente con mejores características para su cultivo como lo es un mejor rendimiento en crecimiento de acuerdo a lo señalado en la CONAPESCA (Francisco Nieto, Comunicación personal, 2012²). Es así que se le proporcionó al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad

¹SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación.

² Francisco Nieto CONAPESCA, Director del área de Acuacultura en CONAPESCA.

Autónoma de Baja California (UABC) un lote de tilapia con estas características para ser evaluadas; motivo de este trabajo experimental.

Experimentos anteriores en el IIO demostraron que especies de tilapia definidas por contener propiedades para la adaptación a altas salinidades (variedad GIFFS de Noruega) sufren de estrés, que se manifiesta en el desarrollo de bacteriosis en la piel, reduciendo drásticamente el crecimiento e incluso generando la muerte de los organismos (María Teresa Viana, Comunicación personal, 2014*).

El estrés de los organismos, ya sea por llevar a cabo prácticas de producción intensivas en las que los organismos están confinados a cuerpos de agua con una sobrepoblación, presencia de sustancias tóxicas, cambios bruscos de temperatura, entre otros, dan lugar a estrés, mismo que se traduce a un estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se refiere a una sobre producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés "*Reactive Oxygen Spices*") en comparación con el sistema de defensa antioxidante enzimático (SOD), el cual se activa en presencia de los ROS.

Tales ROS pueden ser ocasionadas por agentes externos estresantes, o bien, ser producidos por el metabolismo natural del organismo (Villa-Cruz *et al.*, 2009). Este estrés oxidativo puede también estar provocado por una falta de nutrientes, vitaminas, y factores ambientales que no permiten el control de las reacciones en cadena que los radicales libres ocasionan (Vélez-Marín *et al.*, 2012).

La mayoría de esos radicales son ROS, tales como el radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, y el anión superóxido. Todos ellos propensos a causar un daño celular

crucial en componentes como lípidos (peroxidación), carbohidratos, proteínas y ADN (Finkel y Holbrook, 2000).

Los animales aeróbicos están continuamente generando radicales libres, como resultado del metabolismo celular natural. Que de no atenuarse genera un daño biológico en macromoléculas (Finkel y Holbrook, 2000).

La estructura atómica de un radical libre presenta un electrón impar en el orbital más externo, lo que los hace ser compuestos muy inestables y reactivos. Para que un radical pueda alcanzar su equilibrio es necesario que tome un electrón de otra molécula vecina con lo que altera la estructura de la misma y convirtiéndola a su vez en un nuevo radical libre, con lo que se genera una reacción en cadena (Aruoma, 1999).

Existen diversas maneras exógenas además del metabolismo celular mediante las cuales pueden formarse ROS (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2009) tales como:

- Altas ingestas de Fe y Cu
- Radiación
- Humo de cigarrillo
- Luz solar
- Shock térmico
- Solventes orgánicos y pesticidas
- Micotoxinas
- Dieta hipercalórica
- Cambios bruscos en el medio ambiente

Todo organismo animal, al igual que las plantas, cuentan con un sistema de protección enzimático antioxidante contra los agentes extraños y estrés (Castro y Márquez, 2006). Este sistema comprende a las enzimas que se encuentran en el hígado principalmente, aunque las hay en otros tejidos, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidada (GPO) como las más conocidas. Entre ellas, la SOD que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, siendo la enzima de mayor actividad (Castro *et al.*, 2012).

La SOD ayuda a proteger a la célula en contra de las reacciones dañinas del superóxido, de tal manera que la SOD hace que el superóxido (O_2^-) se dismute a O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La actividad de la SOD es muy rápida lo cual favorece a que dicho radical superóxido no reaccione con otros compuestos. El radical superóxido constituye una de las principales especies reactivas del oxígeno en la célula por lo que la SOD tiene un papel muy importante como antioxidante biológico en todos los organismos. Cuando el organismo se pone en contacto con agentes contaminantes o bien al estar bajo estrés, se producen especies reactivas del oxígeno como resultado de procesos metabólicos normales.

Los radicales libres pueden también ser controlados mediante agentes exógenos como lo son los antioxidantes provenientes de los alimentos con alto contenido de vitamina A, C, E y componentes fenólicos (Vélez-Marín *et al.*, 2012).

En la industria alimenticia, por ejemplo, se utilizan las vitaminas C y E en grandes cantidades y se ha visto una reducción en el estrés oxidativo en animales. Si bien esto pudiera ser efectivo, no siempre es accesible por el costo que conlleva el administrar estas cantidades de antioxidantes. Por lo que se recomienda el buscar

nuevas alternativas, ya sea como aditivos o consumiendo alimentos frescos que los contengan.

Existe la creencia de que el consumo excesivo de estas vitaminas o antioxidantes puede resultar contraproducente, convirtiéndose en agentes pro-oxidantes en lugar de agentes antioxidantes. (Browry y Stocker, 1993), aun cuando existe literatura que demuestra lo contrario (DSM, 2011)

El consumo de antioxidantes puede ayudar a reducir el estrés oxidativo en los organismos y ayudar a prevenir enfermedades y otras afecciones provocadas por la peroxidación de lípidos y proteínas. Estos pueden encontrarse naturalmente en alimentos frutas como la fresa, uva, ciruela, granada, y en verduras como el tomate, zanahoria y pimiento, y bebidas como el café, té y el jugo de uva (Pérez, 2009).

En este sentido, el vino de uva (producto de la fermentación alcohólica de la uva) y principalmente de su piel, tiene una alta concentración de antioxidantes naturales como el resveratrol que pueden ayudar a contrarrestar el daño celular ocasionado por los ROS.

El resveratrol pertenece al grupo de los polifenoles. Este componente, además de encontrarse en la piel de la fruta, se encuentra también en la semilla de la uva negra, y deja pasar parte de esta substancia (resveratrol) a los vinos durante la fermentación. Los polifenoles son un grupo heterogéneo de moléculas que comparten la característica de tener en su estructura varios grupos bencénicos substituidos por funciones hidroxílicas. Los compuestos fenólicos del vino incluyen ácidos fenólicos y flavonoides.

El resveratrol se encuentra tanto en la uva negra como en sus derivados (vino y mosto). Éste aparte de darse como una característica de la especie, se sintetiza como respuesta a las altas temperaturas, a la exposición a los rayos UV y a condiciones adversas para la planta, teniendo una función protectora en contra de microorganismos e insectos. Probablemente sea la uva la mayor fuente de resveratrol para el consumo humano aunque también se encuentra en pequeñas cantidades en los cacahuates y moras (Siemann y Creasy, 1992).

Se calcula que para el año del 2012, la zona de Baja California alcanzó una producción de 25,300 toneladas de uva, lo cual equivale a un 6.8% de la producción total nacional, generando ganancias de hasta 266.8 mdp que corresponde al 3.8% de la producción total en México (SHCP, 2014). Aun cuando aquí se produce el 6.8% de la uva a nivel nacional, la producción de vino constituye el 90% de lo que se produce en México y que da como resultado el mosto (también llamado bagazo) como subproducto. De acuerdo a un documento emitido por el XX legislatura del Gobierno de Baja California (IOCEES, 2010), en el 2009 se produjeron 13, 480,000 botellas de vino únicamente en el estado de Baja California, de las cuales el 94 % fueron destinadas para consumo nacional y el 6 % para consumo en el extranjero. (Congreso de BC, 2010).

Tomando en cuenta que para producir una botella de vino tinto (750ml) es necesario un volumen aproximado de 1kg de uva; en donde la pulpa equivale al 74.4% (0.98g), hollejo 19.8% (0.26g) y las semillas el 5.8% (0.076g), da por resultado un volumen de 1.1g de mosto por botella producida. Cantidad que da un resultado de

14,820 kg de mosto que son anualmente desechados (Urbinavinos, 2013).

En las uvas, el resveratrol es sintetizado casi en su totalidad en la piel, siendo justo antes de que la uva llegue a su total madurez los picos más altos de resveratrol.

La enzima terminal en la biosíntesis del resveratrol es la estibel sintetasa, la cual es activada en respuesta al estrés exógeno como lesiones por hongos y luz ultra violeta (Pervaiz, 2003; Soleas *et al.*, 1997a) dando lugar a que el contenido de resveratrol varíe de acuerdo al tipo de uva y condición de cultivo. El papel del resveratrol en las plantas como la uva, actúa como un citotóxico en contra de las afecciones con hongos que generalmente sufren las plantas como la uva (Favaron *et al.*, 2009). El mecanismo de acción del resveratrol en la uva no se conoce perfectamente, sin embargo, de acuerdo a Favaron *et al.*, (2009) se cree que la interacción entre el resveratrol y un gen oxidante del hongo producen un compuesto citotóxico con el cual paradójicamente los hongos se auto-intoxican.

Es así que se sabe que el resveratrol ayuda a mitigar el daño celular producido por los grupos de especies reactivas del oxígeno ROS.

Debido a que grandes cantidades de subproducto de uva se encuentran disponibles en la región, se piensa en el potencial de su uso en alimentación animal.

Ya que el antioxidante presente en la piel y semilla de la uva pueda ayudar a disminuir el efecto dañino de los radicales libres sobre las células sanas de la tilapia sometida a un estrés. Los cambios bruscos de temperatura es una condición a la que regularmente están expuestas las tilapias entre el día y la noche, proceso que de resultar en un estrés oxidativo, la harina de mosto de uva en el alimento podría llegar a resultar en un efecto mitigador.

Si bien el resveratrol contenido en la uva puede ser benéfico, existen compuestos antinutricionales en la pulpa los cuales pudieran ejercer un efecto negativo en el desarrollo de los peces. Los taninos son uno de éstos, los cuales presentan la característica de inhibir la tripsina digestiva y por ende disminuir la digestibilidad y afectar el crecimiento (Torres-Acosta *et al.*, 2008).

Se realizó un experimento en este mismo laboratorio de la UABC con distintos niveles de HU (0, 2, 4, 6, 8, 12, 18%) con trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), en donde se encontró que a un nivel mayor al 6% se disminuyó significativamente la digestibilidad al 50% (Peña *et al.*, 2010).

Es así que niveles iguales o menores al 6% de HU son seguros de ser utilizados en la dieta sin causar un efecto antinutricional pudiendo proporcionar un efecto positivo sobre el estrés oxidativo en la tilapia (*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) promoviendo un buen desarrollo y crecimiento.

II. Hipótesis

Tilapias alimentadas con harina de uva que contiene resveratrol, mostrarán un efecto en la disminución de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD) como respuesta a la actividad antioxidante del resveratrol para contrarrestar el estrés oxidativo causado por el choque térmico inducido.

II. Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación de dietas con harina de subproducto de uva (0, 2, 4 y 6%) sobre el estrés oxidativo en tilapia marina (*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) causado por un agente físico (choque térmico).

III.1 Objetivos específicos

1. Estimar el desempeño de las tilapias alimentadas con cuatro distintos niveles de inclusión de harina de subproducto de uva (0, 2, 4 y 6%) en el incremento de peso diario, tasa específica de crecimiento, tasa térmica de crecimiento, eficiencia alimenticia y supervivencia.
2. Estimar el nivel de resveratrol obtenido en los distintos niveles de harina incluida en las dietas.
3. Estimar el porcentaje de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en músculo e hígado de las tilapias alimentadas con distintos niveles de inclusión (0, 2, 4 y 6%) de HU después de haber sido sometidas a un estrés térmico.

IV. Metodología

IV.1 Obtención de Organismos

Se obtuvieron 1500 alevines de tilapia variedad cubana (*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) provenientes del Centro Acuícola Zacatepec ubicado en el Estado de Morelos dependiente de la CONAPESCA. La talla promedio de los organismos obtenidos fue de 1.5 ± 0.5 g. Los cuales fueron colocados en tres tanques de 500 l para su aclimatación hasta su posterior experimentación.

IV.1.1 Recepción y acondicionamiento de organismos

Los juveniles de tilapia se mantuvieron en un sistema cerrado con recirculación de agua, que consiste de cuatro estanques circulares de fibra de vidrio de 1000 litros de capacidad, provistos de un desagüe central con un tubo de nivel y una camisa de PVC. Ésta última para remover los sólidos generados por los organismos en cada estanque. Éstos a su vez conectados a una línea de desagüe central la que desemboca a un estanque de compensación de 700 L.

Una vez en el tanque de compensación, el agua es succionada e impulsada mediante una bomba de agua marca Sweetwater modelo SHE1.7, la cual envía un flujo de agua a través de un filtro biológico de tipo Polygeyser con 6Ft³ de capacidad marca "Aquaculture Systems Technologies". Después del biofiltro, el agua es distribuida a los estanques. Durante el acondicionamiento de los organismos la temperatura del agua se mantuvo a $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por medio de calentadores sumergibles de titanio ("Process Technologies" de 7,500 watts) en el tanque de compensación.

Los organismos estuvieron sometidos a un fotoperiodo natural de primavera en la ciudad de Ensenada Baja California, México (21 marzo – 21 septiembre).

IV.2 Proceso de aclimatación

Una vez que los organismos alcanzaron la talla de 10 g fueron aclimatados al agua de mar siguiendo el protocolo de aclimatación propuesto por la CONAPESCA.:

Día 1. La aclimatación de los organismos se inició a las 8 am para acondicionar los organismos de 0 a 10 ‰ de salinidad durante el transcurso del día aumentando una ‰/hora.

Día 2. Se continuó con la aclimatación de los juveniles partiendo de 10 ‰ para alcanzar al final del día 20 ‰, aumentado 1 ‰/hora, durante 10 horas. Durante los dos primeros días de adaptación a agua de mar, los organismos fueron alimentados de acuerdo al 15% de biomasa húmeda y con un alimento de iniciación de 1.5 mm, el cual contenía 52% proteína cruda y 8 % de grasa

Día 3. Se continuó con la aclimatación al agua de mar partiendo de 20 ‰ para alcanzar al final de día 25 ‰ aumentado 0.5 ‰/hora, durante 10 horas. A partir de aquí la ración alimenticia se redujo en un 50% para prevenir acumulación de materia orgánica en los estanques ya que no es posible efectuar recambios fuertes de agua.

Día 4. Se continuó con la aclimatación a agua salada partiendo de 25 ‰ para alcanzar al final de día 30 ‰ aumentado 0.5 ‰/hora, durante diez horas. La dieta se mantuvo al 50% de la ración original correspondiente al 10% de la biomasa. Se continuó con todos los procedimientos rutinarios de manejo.

Día 5. Se terminó la adaptación a agua marina de 30 a 35 ‰ siguiendo el mismo protocolo del día anterior aumentando 0.5 ‰/hora.

Durante la experimentación los juveniles de tilapia se mantuvieron en dos sistemas cerrados de recirculación independientes. Cada sistema contaba con 6 tanques de 500 L de capacidad de fibra de vidrio y de forma circular, provistos de un desagüe central con un tubo de nivel y una camisa de PVC. Ésta última sirvió para remover los sólidos generados por los organismos en cada estanque. Los estanques están conectados a una línea de desagüe central la que desemboca a un tanque de compensación de 1100 L.

La alimentación diaria consistió en cuatro raciones a saciedad distribuidas de la siguiente manera; 8:00, 11:00, 15:00 y 17:00 hrs. La alimentación a saciedad consistió en alimentar cada tanque poco a poco (varias rondas) hasta que los peces dejaran de consumir su alimento. Los tanques de experimentación fueron cubiertos con una malla de 0.05cm de luz para evitar que los organismos pudieran saltar fuera del tanque durante las doce semanas de experimentación (91 días).

IV.3 Diseño experimental:

Las biometrías se llevaron a cabo cada cuatro semanas pesando a todos los organismos de cada una de las unidades experimentales para evaluar el incremento de peso diario, tasa específica de crecimiento, tasa térmica de crecimiento, eficiencia alimenticia y supervivencia.

Después de haber sido alimentados durante tres meses, los organismos fueron sometidos a un estrés térmico, para medir el efecto que pudiera tener el resveratrol

sobre la actividad de la SOD, bajando la temperatura de 29 ± 1 a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 días.

Se sacrificaron dos peces de cada uno de los tanques antes y durante el estrés térmico mediante un proceso de hipotermia, en donde los organismos fueron sacados de los estanques con una red y sumergidos en una cubeta con agua y hielo hasta morir, al día 0 antes de iniciar el estrés térmico (D0), a los 7 días (D7) y a los 15 días (D15).

Se tomaron muestras de hígado y músculo, las cuales fueron almacenadas en un criocongelador a -80°C para su preservación y posterior análisis para determinar la actividad enzimática (SOD) en cada tratamiento a lo largo del tiempo.

IV.4Elaboración de la dieta experimental

Las dietas experimentales fueron elaboradas en el laboratorio de nutrición y fisiología del IIO (Instituto de Investigaciones Oceanológicas) de acuerdo a los requerimientos establecidos para la especie y descrita en el Cuadro I. Se agregó HU como fuente de resveratrol en cuatro niveles (0, 2, 4 y 6%).

Las características de las dietas pueden observarse en el Cuadro I. Todos los ingredientes fueron estimados para producir 3 kg de alimento para cada uno de los tratamientos y fueron mezclados mediante una mezcladora robot Coupe, colocando un 35 % de agua (peso/volumen) hasta tener una masa homogénea. Las dietas fueron peletizadas en una máquina de pasta comercial marca Rosito Bisani®, (Los Ángeles, USA) con un dado para formar pellets de 1.5 mm. Posteriormente y ya peletizada la dieta se secó en una estufa de convección True Heated Cabinet a 60°C por un intervalo de tiempo de 24 horas. Posteriormente las dietas se guardaron en

contenedores plásticos limpios y sellados en un congelador a -25°C hasta su posterior utilización para la alimentación de los organismos o sus posteriores análisis bioquímicos.

Cuadro I. Ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas (100g) conteniendo 4 niveles de harina de uva (0, 2, 4 y 6%) para alimentar tilapias marinas (*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*).

INGREDIENTES	TRATAMIENTOS			
	0%	2%	4%	6%
Soya	25	24.5	24.3	24.1
Harina de pescado	32	32	32	32
Harina de uva	0	2	4	6
Aceite de soya	2.5	2.3	2.1	1.9
Aceite de pescado	2.3	2.3	2.3	2.3
Gelatina	5.2	5.2	5.2	5.2
Fécula de maíz	16	16	16	16
Harina de trigo entero	15.7	14.4	12.8	11.2
Rovimix	1	1	1	1
Stay-c	0.07	0.07	0.07	0.07
Benzoato de Sodio	0.23	0.23	0.23	0.23
BHT	0.01	0.01	0.01	0.01
TOTAL	100.0	100.0	100.0	100.0

IV.4.1 Análisis proximales

La composición bioquímica de la dieta se realizó por triplicado siguiendo las metodologías propuestas por la "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 1995).

A manera de resumen:

El contenido de humedad fue calculado utilizando el método gravimétrico, donde se colocaron en navecillas de aluminio por triplicado, 2g de cada una de las dietas experimentales (previamente pulverizadas) y colocadas dentro de una estufa a

una temperatura constante de 100 °C por un período de 4 horas. Posteriormente las muestras se colocaron dentro de un desecador para su enfriamiento y su peso fue registrado hasta que fuera un peso constante. El cálculo del porcentaje de humedad se obtuvo por diferencia de pesos.

Para determinar el porcentaje de proteína cruda en cada una de las dietas se utilizó el método de Micro - Kjeldahl. Para ello en el proceso de digestión se utilizaron 2g de Sulfato de potasio, 40mg de sulfato cúprico con 50mg de muestra (dieta previamente pulverizada) y 3mL de ácido sulfúrico durante cuatro horas en un digestor. Una vez digeridas las muestras (mostrando un color azul cristalino) fueron diluidas en un volumen 1:5 en un matraz volumétrico de 25mL para su posterior destilación.

En la destilación, se utilizaron 10mL de hidróxido de sodio al 40%, 5mL de muestra previamente digerida y diluida y 10mL de agua destilada. El resultado fue capturado en un vaso de precipitado con 15mL de ácido bórico al 3% y 5 gotas del indicador shiro-toshiro (azul de metileno y naranja de metilo) hasta llegar a 50mL.

Obtenidos los 50mL del destilado, se procedió a la titulación con ácido clorhídrico al 0.2N colocando un magneto en el vaso de precipitado y agregando ácido por goteo hasta alcanzar un color morado. Conociendo los mililitros de ácido gastados, la normalidad del ácido y el peso sin humedad de las muestras es posible determinar el porcentaje de nitrógeno, y con él, el porcentaje de proteínas en las dietas mediante un factor establecido de 6.25 de acuerdo a la AOAC (1995) para las harinas de procedencia animal.

El valor promedio del contenido de cenizas se calculó por gravimetría calcinando las diferentes muestras de las dietas a 550°C por un periodo cinco horas. Al término de las cinco horas fueron colocadas en un desecador y nuevamente pesadas y con los nuevos valores se calculó el porcentaje de ceniza.

El contenido de lípidos totales fue calculado gravimétricamente de acuerdo a la técnica de Soxhlet (AOAC, 1995) utilizando éter de petróleo como arrastre. En donde se pesaron los matraces bola antes de iniciar, y se hicieron cartuchos con filtros wattman colocando dentro 2 g de cada una de las dietas a analizar por triplicado.

Una vez hechos los cartuchos se procedió a hacer el arrastre con éter de petróleo durante 4 horas. Al término de las 4 horas los cartuchos se removieron y el exceso de petróleo fue regresado a su envase. Los matraces se mantuvieron durante 24 horas en una estufa a 60°C para eliminar el resto de éter en el matraz y en los cartuchos. A las 24 horas los matraces y los cartuchos fueron pesados nuevamente y se determinó el porcentaje de lípidos en las dietas experimentales.

IV.5 Análisis de resveratrol en HPLC

Para la cuantificación del contenido de resveratrol de las dietas y la HU se pesaron 0.40g de cada una de las dietas (HU, 0, 2, 4 y 6%) por triplicado y se agregaron 3mL de metanol grado HPLC 99% de pureza. Se agitaron las muestras durante un minuto y se dejaron reposar durante 24 horas a 4°C. Al término de las 24 horas las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 4,400rpm (4°C) y posteriormente filtradas a través de acrodiscos con membrana de nylon 0.45µ y

preservadas en refrigeración (4°C) en viales de cristal hasta su posterior análisis en HPLC.

Para el análisis en HPLC se hizo una curva estándar de resveratrol puro en diferentes concentraciones partiendo de agregar 1.2mg de resveratrol puro y diluyéndolo en 240µL de metanol. De ahí se tomaron 10µL y se diluyeron en 990µL de metanol para hacer la primer dilución [0.05µg/mL]. De la primera dilución se tomaron 40µL y 60µL de metanol para hacer la segunda dilución [0.02µL/mL]. Por último, de la segunda dilución se tomaron 20µL y 80µL de metanol para hacer la tercer dilución hasta alcanzar una concentración de [0.004µL/mL]. Una vez preparadas las tres concentraciones, fueron inyectadas en el HPLC para obtener la curva estándar de resveratrol puro.

Con la curva estándar, se procedió al análisis en HPLC de las muestras previamente filtradas, inyectando 20µL de cada una por triplicado para conocer la concentración del antioxidante en cada una de las dietas y la HU.

IV.6 Análisis de la actividad de la SOD:

La actividad enzimática se determinó en muestras individuales de hígado y músculo por separado, mediante una extracción en frío con buffer de KCl al 50mM (1:2) y después se centrifugó a 15,000 g por 6 minutos. La actividad de la SOD fue estimada con el sobrenadante midiendo la auto-oxidación del pyrogallol.

En hígado, el sobrenadante del extracto (hígado-buffer KCl, 1:2) se analizó en una solución de buffer fosfato 50mM con pH 7.8 conteniendo pyrogallol 3mM

(disuelto en 10mM HCL) utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 325nm(Villa-Cruz *et al.*, 2009).

Como parte de la metodología para determinar las unidades de actividad SOD es necesario determinar la concentración de la proteína en las muestras crudas y así poder determinar la actividad por mg de proteína en el extracto. Para lo cual se siguió el método de Bradford utilizando albúmina de bovino como estándar (Bradford, 1976). En donde una unidad de actividad SOD es definida como la cantidad de enzima la cual da un 50% de inhibición de la tasa de oxidación y los resultados son expresados como Unidades/mg de proteína a 25°C de acuerdo a la técnica descrita por Dávila *et al.* (2010)

IV.7 Análisis de calidad de agua:

Los análisis de calidad de agua fueron determinados diariamente mediante kit's de medición rápida marca API ("*Aquarium Pharmaceutical*" de MARS ltd) para tener un mejor control de los parámetros físico-químicos en los sistemas de experimentación, y se midieron los siguientes parámetros:

- Amonio
- Nitritos
- Nitratos
- Temperatura
- Oxígeno disuelto
- Alcalinidad del sistema
- Salinidad
- pH

IV.8 Índices biológicos

IV.8.1 Crecimiento en Peso (g)

Los organismos fueron pesados y medidos en cada biometría (cada cuatro semanas) utilizando una balanza analítica (± 0.01 error).

IV.8.2 Ganancia de Peso (%)

Para determinar la ganancia en peso, los organismos fueron pesados al inicio y al final de cada fecha de muestreo y se calculó con la siguiente ecuación.

$$GP = [(PF - PI) / PI] \times 100 \quad (1)$$

En donde:

GP= Ganancia de peso

PF= Peso final

PI= Peso inicial

IV.8.3 Coeficiente Térmico de Crecimiento (TGC)

Se calculó de la siguiente manera:

$$(3\sqrt{Pf} - 3\sqrt{Pi} / T * D) * 1000 \quad (2)$$

En donde:

Pi= Peso inicial de los organismos dado en gramos (g)

Pf= Peso final de los organismos dado en gramos (g)

T= Temperatura promedio

D= Días de experimentación

IV.8.4 Tasa de crecimiento específico (SGR)

La tasa de crecimiento específica (TCE; % día) se calculó de la siguiente manera:

$$TCE = [(\ln PF - \ln PI) / T] \times 100 \dots\dots (3)$$

En donde:

TCE = Tasa de crecimiento específica,

Ln PF = Logaritmo natural de peso final,

Ln PI = Logaritmo natural del peso inicial,

T = Número de días

IV.8.5 Índice de Supervivencia.

Este nos permite conocer el porcentaje de organismos vivos que llegaron hasta el fin del experimento mediante la siguiente ecuación:

$$S = (Pf/Pi) \times 100 \quad (4)$$

En donde:

Pf= Peces al final de experimento

Pi= Peces al inicio del experimento

IV.9 Análisis estadístico

Para estimar las posibles diferencias en los índices biológicos (crecimiento, supervivencia, consumo de alimento), así como de la actividad enzimática de la SOD registrada en los diferentes tratamientos antes y durante el período de estrés térmico, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA, $P \leq 0.05$) o Kruskal-Wallis para los

no paramétricos. En todos los casos se utilizó el paquete de computo Sigma-Stat 3.5 para Windows.

V. Resultados

En los análisis proximales (Cuadro II) de cada una de las dietas experimentales se muestra que resultaron en un porcentaje de proteína cruda de 43.89 ± 2.36 , 46.68 ± 2.12 , 46.10 ± 1.79 , 46.58 ± 1.63 , mientras que para los análisis de lípidos, el porcentaje encontrado para cada una de las dietas fue de 7.70 ± 0.86 , 7.68 ± 0.57 , 8.16 ± 0.23 , 7.71 ± 0.30 , respectivamente. El contenido de resveratrol para cada dieta se calculó a partir de la concentración obtenida en la HU mediante HPLC. En donde la HU mostró un contenido de $273.14 \mu\text{g/g}$ de HU. De esta manera se estimó considerando la inclusión de 0, 2, 4 y 6% que se encontraba en la dieta en un 0, 0.6, 1.1 y $1.6 \text{ mg}/100\text{g}$ en la dieta.

Cuadro II. Composición proximal y contenido de resveratrol (media $\pm$ desviación estándar) de las dietas utilizadas para alimentar a juveniles de tilapia adaptadas a agua de mar (*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) y contenido de resveratrol en mg ($P \leq 0.05$).

	TRATAMIENTOS			
	0%	2%	4%	6%
Composición Proximal				
Humedad	3.27 $\pm$ 2.31	5.31 $\pm$ 0.84	2.78 $\pm$ 2.22	3.07 $\pm$ 0.37
Proteína cruda	43.89 $\pm$ 2.36	46.68 $\pm$ 2.12	46.10 $\pm$ 1.79	46.58 $\pm$ 1.63
Lípidos total	7.70 $\pm$ 0.86	7.68 $\pm$ 0.57	8.16 $\pm$ 0.23	7.71 $\pm$ 0.30
Ceniza	2.39 $\pm$ 0.05	1.60 $\pm$ 0.03	3.19 $\pm$ 0.06	4.78 $\pm$ 0.07
ELN	44.32 $\pm$ 1.73	39.52 $\pm$ 0.55	41.35 $\pm$ 2.89	40.24 $\pm$ 3.40
Contenido de resveratrol mg / 100 g de alimento				
	0.0	0.546	1.092	1.638

Cuadro III. Consumo promedio de alimento por día para cada uno de los tratamientos por organismo (g alimento/org/día).

Tratamiento	Alimento (g)
0%	4.174 $\pm$ 0.286
2%	4.184 $\pm$ 0.142
4%	4.841 $\pm$ 0.763
6%	4.027 $\pm$ 0.430

A lo largo de los 91 días de experimentación no se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento diario por organismo en los cuatro tratamientos $P \leq 0.05$ (Cuadro III).

Cuadro IV. Índices biológicos y tasa de supervivencia de juveniles de tilapia adaptadas a agua de mar (*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) alimentadas con cuatro niveles de resveratrol durante 91 días ($P \leq 0.05$)

	TRATAMIENTOS			
	0%	2%	4%	6%
<i>Índices biológicos</i>				
Peso inicial ind. (g)	87.60 ± 00	88.27 ± 0.80	88 ± 00	88.7 ± 0.60
Peso final ind. (g)	309.5 ± 13.60	324.0 ± 28.40	409.4 ± 142.60	311.4 ± 26.30
TGC	0.88 ± 0.04	0.914 ± 0.08	0.95 ± 0.04	0.877 ± 0.07
SGR % día ⁻¹	1.4 ± 0.04	1.4 ± 0.10	1.6 ± 0.40	1.4 ± 0.09
Ganancia de peso (g)	221.85 ± 13.64	235.71 ± 28.88	321.39 ± 16.44	222.75 ± 25.66
Ganancia de peso (%)	253.25 ± 15.60	248.97 ± 18.50	271.65 ± 2.60	265.82 ± 13.60
Conversión alimenticia (FCA)	2.25 ± 0.37	1.89 ± 0.13	2.05 ± 0.55	2.28 ± 0.07
Supervivencia (%)	82 ± 2.80	84 ± 00	84 ± 00	82.7 ± 2.30
<i>Consumo de Resveratrol mg / kg peso / día</i>				
	0.0	0.124 ± 0.02	0.237 ± ±0.06	0.375 ± 0.06

Al inicio del experimento, no hubo diferencias significativas en cuanto a peso individual se refiere entre los diferentes tratamientos, teniendo como promedio un peso de 88.14 ± 0.04 g/ org.

Al cabo de 91 días de experimentación, los organismos mostraron un peso final individual que va desde los 309.45 ± 13.6 g, hasta los 409.39 ± 142.6 g sin encontrar diferencias significativas, con una ganancia de 221.85g para el tratamiento de 0%, 235.71g para el de 2%, 248.49g y 222.75g para 4% y 6% respectivamente. De acuerdo al análisis de varianza de una vía (ANOVA) no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para cada uno de los parámetros, en donde se obtuvo una $P=0.522$.

Cuadro V. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD; U mg de proteína⁻¹) en muestras de hígado y músculo (media $\pm$ desviación estándar) de juveniles de tilapia adaptadas a agua de mar (*Oreochromis aureus* x *O. mosambicus*) alimentadas con cuatro niveles de resveratrol durante 91 días ($P \leq 0.05$) antes y después de sufrir estrés térmico.

Tratamiento	Hígado			Músculo		
	D0	D7	D15	D0	D7	D15
0%	17.46 ± 5.21	33.46 ± 17.73	44.28 ± 23.35	26.49 ± 14.21	46.74 ± 7.57	22.76 ± 1.71
2%	21.17 ± 4.79	26.63 ± 7.69	33.11 ± 7.05	27.02 ± 8.94	29.90 ± 0.93	24.18 ± 3.03
4%	15.60 ± 0.61	51.29 ± 4.62	27.75 ± 3.74	27.34 ± 10.55	32.25 ± 4.84	23.41 ± 0.55
6%	18.45 ± 1.90	32.63 ± 1.06	38.88 ± 5.57	20.96 ± 4.96	27.54 ± 5.57	28.99 ± 2.77
P=	0.324	0.073	0.458	0.826	0.295	0.758

D0.- Día anterior al inicio del estrés térmico.

D7.- Siete días después de haber iniciado el estrés térmico.

D15.- Quinceavo y último día de estrés térmico.

Al final del experimento se encontraron valores de la actividad de la SOD en hígado dada como $U \cdot mg \text{ de proteína}^{-1}$, para las muestras del D0 en la dieta de 2% de 21.17, mientras que para los tratamientos de 0%, 4%, y 6% se obtuvieron valores similares de 17.5, 15.6 y 18.5 respectivamente, sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.324$).

Para el D7 el aumento de la SOD es evidente, elevándose la dieta control de 17.46 a 33.46; mientras que el 2% se eleva de 21.17 a 26.63, y los tratamientos con 4 y 6% a 51.29 y 32.63 respectivamente, siendo el tratamiento de 4% el que registró un mayor aumento en la actividad enzimática. Después de analizar los resultados obtenidos mediante un análisis estadístico de una ANOVA, no se encontraron diferencias significativas ($P=0.073$).

Al término del estrés térmico, después de los 15 días, la actividad de la SOD ($U \cdot mg \text{ de proteína}^{-1}$) en los tratamientos (0, 2, y 6%) en hígado siguió en aumento al igual que la dieta control, pero en menor medida, a diferencia del tratamiento de 4% en donde se observó una disminución significativa. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P= 0.458$).

En el tejido del músculo se observó a los 7 días una mayor actividad en el control con relación a los tratamientos con resveratrol con una actividad de 46.74 en el tratamiento control contra 29.90, 32.25 y 27.54 para los tratamientos con 2, 4 y 6% respectivamente. Sin embargo, al día 15 la actividad de la SOD en los tratamientos de 0, 2 y 4% alcanzaron niveles por debajo a los encontrados para el D0, mientras que en el tratamiento de 6% la actividad aumentó con respecto al D7 (Cuadro V).

VI. Discusión

El presente experimento tuvo como propósito medir el efecto de la HU en la reducción del estrés oxidativo ocasionado por factores de estrés en la tilapia (*Tilapia mosambicus x aureus*), así como estimar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), además de conocer el desempeño, crecimiento y desarrollo de los organismos.

Los organismos se mantuvieron durante un período de 91 días en dos sistemas con seis tanques cada uno bajo condiciones estables, en donde la temperatura promedio en los dos sistemas se mantuvo entre $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$, los niveles de amonio y nitrito en un rango de 0.25 a 0.5, y de 1 a 2 respectivamente. Salinidad de 35‰ y un pH entre 8.5 y 7.8. Los niveles de dureza entre 161.1 y 179 ppm GH/KH y los niveles de oxígeno disuelto 5 ± 0.5 mg/L en promedio.

De acuerdo a los análisis proximales realizados en las dietas experimentales de 0, 2, 4 y 6% de inclusión de harina de uva, se encontró que el contenido de proteína fue mayor al valor teórico calculado en las formulaciones previas al experimento. Con valores de 43% a 46% a diferencia del 39 % de proteína cruda esperado.

Este error se puede atribuir a varios factores, entre ellos a que la composición de algunas de las harinas con las que se trabajó tuviera un valor proteico mayor con el que fueron calculadas las dietas experimentales. O bien, a que hubo un error al pesar los ingredientes; o que no se titularon correctamente las muestras de acuerdo a la técnica de Kjeldhal (AOAC, 1995). Vale la pena aclarar que durante la experimentación se hicieron dos lotes de alimentos. Razón por la cual se reportan promedios y desviaciones estándar. Si el error se debió a un mal pesaje es difícil pensar que se

hubiera tenido este mismo error dos veces. Si el contenido de proteína hubiera sido mayor al reportado implicaría que la harina de pescado tuviera un valor proteico de un 95% para poder alcanzar los valores registrados, lo que puede descartarse pues de ser así indicaría que estaba contaminada con alguna fuente de nitrógeno y esto hubiera sido detectado al hacer los análisis proximales cuando se adquirió la harina de pescado.

Por lo tanto queda abierta la posibilidad de que hubiera habido un error en el análisis proximal aun cuando éste se repitió varias veces.

La técnica de análisis de proteína se basa en la cuantificación del nitrógeno obtenido después de la digestión y destilación del ingrediente/alimento, cuantificación que se hace mediante la titulación con un ácido débil. Esta titulación es causante de muchos errores cuando no se tiene cuidado de valorar el ácido de titulación. Esta valoración se realiza con carbonato de sodio recién salido de la mufla y secado a peso seco constante teniendo mucho cuidado en el proceso de enfriamiento para que no absorba humedad y de un peso mayor al real.

No obstante, todas las dietas presentaron el mismo error por lo que el contenido proximal fue similar en todas las dietas. Aspecto que no pudo haber dado lugar a que interfiriera con el contenido y/o efecto del resveratrol proveniente de la HU.

Por otra parte, el consumo individual promedio de alimento para cada uno de los tratamientos fue similar entre 4 y 4.8 g por organismo por día, donde no se presentaron diferencias significativas por tratamiento ($P < 0.05$). Lo anterior nos lleva a pensar que el suministro de HU no tuvo ningún efecto negativo en el consumo de las dietas.

De acuerdo a los resultados, la estadística nos indica que no se encontraron diferencias significativas en el desempeño de las tilapias (crecimiento y supervivencia) para los cuatro tratamientos, reportando porcentajes de ganancia de peso similares entre ellos (Cuadro IV), así como en todos los índices biológicos reportados TGC y SGR. Lo que nos indica que el adicionar subproducto de uva hasta en un 6% no interfirió en su desarrollo. La tasa de crecimiento obtenida en el presente trabajo mostró un SGR entre 1.4 y 1.6% día⁻¹. Para organismos de esta talla (partiendo de 88 g promedio) este SGR resulta similar a lo reportado por Cerdá *et al.* (1998) quien obtuvo en un experimento con tilapia (*Oreochromis niloticus*) con dos cohortes de talla (6.6g y 12.2g) alimentados con pellets extruidos, un crecimiento de 1.5% y 1.3% día⁻¹ para cada uno de los cohortes. Ambas cohortes corresponden a organismos menores que los utilizados en este experimento, por lo que los crecimientos aquí obtenidos pueden ser considerados buenos. Lo anterior ya que cuando se considera la tasa específica de crecimiento (SGR), al ser una expresión logarítmica da lugar a valores mayores mientras menores sean los organismos y se encuentren la fase exponencial de crecimiento. Esto da por resultado que los organismos más jóvenes tengan una mayor tasa de crecimiento que los organismos con mayor tamaño.

Es difícil encontrar estudios de crecimiento con organismos de tallas mayores a los 30g aun tratándose de tilapia. Por ejemplo, Ahmad *et al.* (2011) en un estudio con tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) con organismos de 3.6 ± 0.3 g hasta alcanzar un peso final promedio de 28.88g obtuvo un SGR de entre 2.3 y 2.4% día⁻¹ dependiendo

de sus tratamientos. Estos resultados son mejores, pero de cualquier forma se trata de organismos mucho más pequeños. De igual manera Yue (2008) en un experimento con dietas para tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) con organismos de 6.3g alcanzaron tasas de crecimiento específico de 3.9% a 4.1 % día⁻¹. A diferencia de Mathia y Fotedar (2012) quienes en un experimento con tilapias de 35 g en un estudio sobre el uso de Taro (*Colacasia esculenta*) llegaron a obtener valores de SGR de 1.1% a 0.8 % día⁻¹ mostrando valores menores y con organismos de un tercio del tamaño de los nuestros.

Hanley (1991) con organismos de 41 g hasta los 190 g obtuvo una SGR de 1.6% día⁻¹ en los distintos tratamientos. Abdel-Tawwab *et al.* (2010) en un estudio con tilapia a diferentes niveles de proteína (25%, 35% y 45% de PC) con organismos de diferentes tallas entre 0.4g, 18g y 40g obtuvo valores de SGR para los organismos con dietas de 35% de PC similar al de este trabajo, de 4.3, 1.1 y 0.63, respectivamente, obteniendo resultados para sus organismos de 18g de un SGR menor al encontrado en este trabajo y con organismos mucho mayores. Y por último Chowdhury *et al.* (2013) en un estudio sobre modelos bioenergéticos en donde utilizan organismos con tallas de 1.6 a 30g; de 31 a 220g y mayores a 220g presentaron valores de SGR de 5.45, 3.01 y 0.96 % día⁻¹ respectivamente. Si bien aquí el último grupo de organismos pudiera tener una mayor talla que el del presente trabajo, las SGRs se acercan a los aquí obtenidas de 1.4 y 1.6% día⁻¹. Lo anterior nos hace pensar que el crecimiento aquí obtenido fue mejor o igual al reportado por distintos autores.

Por otra parte, la HU aparte de contener antioxidantes como el resveratrol, presenta algunos factores antinutricionales como los taninos, importantes para las

plantas como sistema de defensa en contra de depredadores, hongos, bacterias, insectos y virus, los cuales se ha demostrado que al ser consumidos en altas concentraciones pueden ocasionar una disminución en el consumo de alimento y de la digestibilidad, además de inhibir la actividad de la tripsina, una importante enzima digestiva (Torres-Acosta *et al.*, 2008). Ambos aspectos no se vieron reflejados en el presente trabajo al no encontrarse diferencias entre ingestión y desempeño.

En un estudio anterior en este laboratorio, pero utilizando trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), se determinó que niveles de HU en la dieta mayores al 6% eran capaces de disminuir hasta un 50% la digestibilidad. Por esta razón se decidió que estos tratamientos no deberían de incluir más de un 6% en la dieta (Peña *et al.*, en preparación). En el presente trabajo se demuestra que la HU suministrada no afectó el crecimiento en la tilapia a causa de los factores antinutricionales. Aunque por otro lado, la fisiología digestiva de la trucha y la tilapia son muy diferentes ya que el primero es un organismo carnívoro, y el segundo es un organismo herbívoro. El cual cuenta con un tracto digestivo de mayor longitud y enzimas especializadas para su dieta, lo que le da un mayor tiempo para poder asimilar los alimentos con fibra como el caso del subproducto de uva. Al contrario de lo que ocurrió con organismos carnívoros utilizados en experimentos anteriores (trucha arcoíris), los cuales tienen intestinos mucho más cortos, y por ende un tiempo más corto para la asimilación de los nutrientes contenidos en sus alimentos.

Al cabo de doce semanas los organismos fueron sometidos a un estrés térmico, en donde todos los estanques cambiaron de $29 \pm 1^\circ\text{C}$ a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y así se mantuvieron

durante quince días. La toma de muestras de hígado y músculo para determinar la actividad de la SOD se realizó al inicio (D0), a la semana (D7) y a los quince días (D15).

El objetivo principal del presente trabajo era medir la concentración de la SOD como respuesta a la utilización de la HU después de haber sido sometidas a un agente estresante. Si bien no se encontró una clara tendencia, si se observó en hígado una disminución en la actividad en el tratamiento con 2% de HU al día 7 con respecto a su control y los tratamientos con 2 y 4% para el día 15. En músculo, la tendencia a disminuir se observó en los tratamientos de 2 y 4% al día 7, mientras que para el tratamiento de 6% si bien el aumento no fue considerable al día 7, este se mantuvo sin diferencias antes y después del estrés térmico. Ya que no se observaron diferencias significativas no se puede establecer un efecto del resveratrol sobre la SOD. Esta falta de diferencias significativas pudiera estar relacionada con el coeficiente alto de variación entre las muestras control que para el día 7 fueron mayores al 50%.

El efecto del resveratrol en el presente trabajo no fue claro como se esperaba. Se piensa que podría deberse a que la velocidad de respuesta de la SOD es tan rápida a pesar de que el resveratrol estuviese presente en el alimento y actuara como antioxidante, que no alcance a verse una clara disminución. Si no consideramos la estadística por efecto de la variación mayor al 50% de la actividad en los grupos control, se puede establecer que en el hígado se alcanza a notar una disminución en algunos de los tratamientos lo cual nos da indicios de su efecto.

Quizás hubiera sido interesante aparte de medir la actividad de la SOD en músculo e hígado, el haber estimado el nivel de peroxidación en los tejidos de músculo e hígado como un método directo para evaluar el efecto de los ROS sobre los tejidos. El

medir el estado de oxidación en este tipo de estudios, no siempre da resultados sensibles para determinar el efecto antioxidante de ciertos compuestos. Por ejemplo, Cabrera (2013) no pudo detectar lipo-oxidación ni oxidación proteica en el ostión después de haber sido sometido a distintos factores de estrés.

La idea de este experimento surgió para aprovechar el antioxidante natural (resveratrol) contenido en el subproducto de la uva, o mosto como también se le conoce. Este mosto actualmente no se utiliza y constituye un volumen importante en la región de Baja California y principalmente en el municipio de Ensenada.

El resveratrol es un antioxidante presente en la semilla y principalmente en la piel de la uva, sobre todo en las uvas con piel más gruesa (Cavaller, 2008). La uva utilizada era del varietal Petit Sirah y se pensaba que se hubiera encontrado alguna diferencia en mitigar el estrés oxidativo sin alterar el crecimiento. Este mosto correspondía a un subproducto de la producción de vino en la región, en donde el varietal Petit Sirah es una de las especies más ricas en resveratrol (Nikfardjam *et al.*, 2006). Sin embargo la cantidad aquí reportada demostró contener la tercera parte de resveratrol que lo esperado de acuerdo al análisis realizado en el laboratorio ($273.14\mu\text{g}$ de resveratrol/g de HU) comparado con lo reportado por Vincenzi *et al.* (2012). En el presente trabajo la cantidad reportada fue estimada a partir del contenido de resveratrol en la harina; cantidad que fue utilizada para calcular teóricamente la concentración en el alimento cuando ésta se incluyó al 2, 4 y 6% en las dietas experimentales, correspondió a una dosis que iba desde 0 hasta 1.64 mg por cada 100 g de alimento. Es así como se obtuvieron esas bajas proporciones de

resveratrol en cada una de las dietas. Esta baja concentración en el alimento pudo haber contribuido a una respuesta menor en su suplementación.

En estudios anteriores, se ha visto que el resveratrol al ser incluida en la dieta humana tiene funciones antioxidantes, por lo que la producción de enzima antioxidante disminuye ya que estabiliza la acción de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Además de tener efectos benéficos sobre la prevención del cáncer de mama, cáncer de próstata, enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades inflamatorias, entre otras (Park *et al.*, 2014).

En ratones, se estudiaron diversos beneficios al ingerir Resveratrol en la dieta como control de obesidad, disminución de los riesgos a trastornos diabéticos, entre otros (Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2010). Sin embargo en ese estudio las ratas ingirieron dosis de resveratrol de 30 mg / kg de peso / día, cantidad muy superior a lo reportado en este trabajo (hasta el 0.375 mg / kg de peso / día, para el tratamiento con 6% de HU). De acuerdo a Sabater y Sabater (2010) el resveratrol presenta un posible efecto benéfico pero establecen que las dosis en humano aún no son conocidas existiendo incertidumbre al respecto. Mientras que Millán-Parrilla *et al.* (2008) establecen que el resveratrol no presenta efectos nocivos o tóxicos para la salud en el humano.

Para llegar a la dosis estudiadas en ratas de 30 mg / kg al día se debería integrar en la dieta una concentración de 100 veces más harina de uva (de 0.375 mg a 30 mg) cantidad que resulta imposible. Esto no implica que la dosis/respuesta de cualquier compuesto sea semejante en todos los organismos, y esto lo se menciona para obtener una visión comparativa.

Con los resultados aquí observados se puede decir que el resveratrol no tuvo un efecto antioxidante visible en las tilapias. Sin embargo quizás la cantidad de HU utilizada en los diferentes tratamientos no fue la suficiente para que este componente pudiera surtir un efecto notorio en los organismos. O bien, posiblemente el que los organismos aquí utilizados fueran herbívoros y no tuviera el mismo efecto que el observado en los organismos carnívoros (*Oncorhynchus mykiss*) utilizados en un estudio previo a este en el IIO, el cual sirvió como base para llevar a cabo el presente.

El contar con un antioxidante como aditivo alimenticio ayuda al organismo a defenderse contra el estrés oxidativo y evita un exceso de gasto energético destinado en la producción de enzima antioxidante, ahorrando dicha energía, y destinándola al crecimiento del organismo. Por lo anterior se recomienda hacer más estudios sobre dosis respuesta utilizando mayores cantidades de HU así como midiendo de forma directa el efecto oxidativo en lípidos y proteína corporales.

VII. Conclusiones

- El crecimiento en los organismos no se vio afectado por la inclusión de harina de uva en las cantidades suministradas en las dietas experimentales.
- Si bien se pudo constatar que la harina de uva contenía el compuesto con el que se deseaba trabajar (resveratrol), se observó que las cantidades adicionadas a las dietas probablemente no fueron suficientes, ya que no se observó una clara respuesta en la disminución de la actividad enzimática de la SOD en hígado y músculo.

VIII. Recomendaciones:

- Estudiar el efecto en organismos más jóvenes y con mayores porcentajes de inclusión de HU (resveratrol).
- Medir los efectos de los grupos reactivos del oxígeno en la oxidación de proteína y lípidos en tejidos de hígado y músculo

IX. Bibliografía

- Abdel-Fattah M., 2006. Tilapia culture in sal water: environmental requirements, nutritional implications and economic potentials. Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. ISBN 970-674-333-5.
- Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M., H., Khattab, Y., A., E., Shalaby, A., M, E., 2010. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Acuaculture* 298 (2010) 267 – 274.
- Ahmad, M., H., Abdel-Tawwab, M., 2011. The use of caraway seed meal as a feed additive in fish diets: Growth performance, feed utilization, and whole-body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Acuaculture*.2011.01.030.
- Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca 2011, Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 311.
- AOAC, 1995. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. Official Methods of Analysis of AOAC, 1. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA
- Aruoma OI. 1999. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Agric. Food Chem.* 47: 397-492.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Reproduction Research Laboratories, Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens, Georgia 30602. Analytical Biochemistry* 72, 248-254 .

- Browry, V., y W,Stocker, R., 1993. Tocopherol-mediated meroxidation-the prooxidant effect of vitamin-E on the radical-initiated oxidation of human low-density-lipoprotein. J. Am. Chem. Soc. 115, 6029-6044.
- Cabrera, V., P., 2013. Toxicidad de Nanotubos de Carbono en Ostión Japonés (*Crassostrea gigas*). Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología de la Universidad Autónoma de Baja California. pp 80.
- Castro, C. y Márquez, A., 2006. Uso de Antioxidantes en Animales Domésticos. Gaceta de Ciencias Veterinarias. Vol 12 N° 1 pp 5-12.
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A., 2012. Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegaleses ole juveniles (*Solea senegalensis*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 163 (2012) 372-378.
- Cavaller, V., 2008. Análisis de la producción científica y de patentes en el caso del tratamiento del resveratrol. Cuadernos de Inteligencia competitiva, vigilancia estratégica, científica y tecnológica QUIC&VECT 1 (2008), Edición1, 19 - 53.
- Cerdá, J., M., Pérez Igualada , L., Zaragoza, L., Fernández Carmona, J., 1998. Crecimiento de tiapias (*oreochromis niloticus*, L.) con piensos extrusionados de diferente nivel proteico. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica. Arch. Zootec. 47: 11-20. 1998.
- IOCEES. (En Línea) 2010. Congreso de Baja California.
www.Congresobc.gob.mx/iocees/BENEFICIOS%20PROD%20VINO%20BC.pdf

- Córdova-Izquierdo, A., Ruiz L., C. G., Córdova J., C. A., Córdova J., M. S., Guerra L., J. E., Rodríguez D., B. E. y Arancibia S., K., 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2009 3(1) : 01-38
- Chowdhury, M., A., K., Siddiqui, S., Hua, K., Bureau, D., P., 2013. Bioenergetics-Based Factorial Model to determine feed requirement and waste output of tilapia produced under commercial conditions. *Acuaculture* 410 – 411 (2013) 138 – 147.
- Dávila, J., Marcial-Martinez, L., M., Viana, M., T., Vazquez-Duhalt, R., 2010. The effect of broccoli in diet on the cytochrome P450 activities in liver of Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) during phenol exposure. *Aquaculture* (doi:10.1016/j.aquaculture.2010.03.020) 304:58-65.
- DSM. 2011. DSM Vitamin Supplementation Guidelines, 2011. https://www.dsm.com/.../dsm/anh/.../OVN_supplementation_guidelines.p...
- Favaron, F., Lucchetta, M., Odorizzi, S., A.T. Pais da Cunha and L. Sella, 2009. The Role Of Grape Polyphenols on Trans-Resveratrol Activity Against *Botrytis Cinerea* and of Fungal Laccase on the Solubility of Putative Grape Pr Proteins. *Journal of Plant Pathology*, 91 (3), 579-588.
- Finkel, T., y Holbrook, N. J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*. 408: 239-247
- Hanley, F., 1991. Effects of feeding supplementary diets containing varying levels of lipis on growth, food conversión, and body composition of Nile Tilapoa, *Oreochromis niloticus* (L.). *Acuaculture*, 93 (1991) 323 – 334.

- Mathia, W., y M., Fotedar, R., 2012. Evaluation of boiled taro leaves, *Colocasia esculenta* (L.) Schott, as a freshwater shrimp, *Caridina nilotica* Roux protein replacement, in diets of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). *Acuaculture* 356-357 (2012) 302 – 309.
- Millán-Parrilla, F., Serrano, G., Inmaculada, L., 2008. Nuevos retos en el tratamiento antienvjecimiento. Adjunto del servicio de dermatología. Hospital Arnau de Vilanova. Clínica dermatológica. Valencia. Dossier 66-70
- Nikfardjam, M., S., Márk, L., Avar, P., Figler, M., Ohmacht, R., 2006. Polyphenols, Anthocyanins, and Trans-Resveratrol in Red Wines From the Hungarian Villány Region. *Elsevier* Vol 98, Issue 3, 2006, 453-462
- Park E-J., Pezzuto, J., M., 2014. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Peña, E., Badillo-Zapata, D., Viana, M., T., Pares-Sierra, G., Correa-Reyes, J., G., EN PREPARACIÓN Utilización de sub-productos de la industria vinícola en dietas formuladas para alevines de trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Programa de licenciatura en oceanología, Facultad de ciencias marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, Baja California, México. 23pp (en proceso de publicación).
- Pérez A. M., 2009. (En línea) Los productos derivados de frutas: fuentes de antioxidantes. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos http://cita2.ucr.ac.cr/Alimentica/EdicionesAnteriores/Volumen%208,2010/Articulos/articulo%20-antioxidantes_y_bebidas_de_frutas-05nov09.pdf. Pg. 3

- Pervaiz, S., 2003. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. Pontificia Universidad Católica de Chile Centro de Nutrición Molecular y Enfermedades Crónicas, 2014. Harina de Bagazo de Uva. FASEB Journal, 17(14), 1975–1985.
- Sabater, G., y Sabater, J., 2010. Medicina Personalizada Posgenómica .Elsevier Masson. (8) Nutrigenética y Nutrigenómica. 203 – 246.
- SAGARPA-Propuesta para el desarrollo del cultivo de tilapia en México
- Sánchez-Fidalgo, S., Cárdeno, A., Villegas, I., Talero, E., De la Lastra, C., A., 2010. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. European Journal of Pharmacology 633 (2010) 78 – 84.
- Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP), 2014. Panorama de la Uva. <http://www.financiarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Uva%20%28abr%202014%29.pdf>
- Siemann, E. H., y Creasy, L. L., 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. American Journal of Enology and Viticulture, 43(1), 49–52.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997a). Resveratrol: a molecule whose time has come? And Gone? Clinical Biochemistry, 30, 91–113.
- Torres-Acosta, J., F., Alonso-Díaz, M., A., Hoste, H., Sandoval-Castro, C., A., Aguilar-Caballero, A., J., 2008. Efectos Negativos y Positivos del Consumo de Forrajes Ricos en Taninos en la Producción de Caprinos. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 9 (2008): 83-90.
- Urbinavinos.blogspot.mx/2013/05/cuantas-uvas-hacen-falta-para-elaborar.html.
- Vélez-Marín, M., L. F., Uribe-Velásquez y M. I., Lenz-Souza, 2012. Papel del Resveratrol de Uva como Antioxidante. Luna Azul. 34:240-256.

- Villa-Cruz V., Davila J., Viana M.T. and Vazquez-Duhalt R*. 2009. Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) and its phytochemical sulforaphane in balanced diets on the detoxification enzymes levels of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a carcinogenic and mutagenic pollutant. *Chemosphere*, 74(9):1145-1155.
- Vincenzi, S., Tomasi, D., Gaiotti, F., Lovat, L., Giacosa, S., Torchio, F., Río Segade, S., Rolle, L., 2012. Comparative Study of the Resveratrol Content of Twenty-One Italian Red Grape Varieties. Centro Interdipartimentale per la icerca in Viticoltura ed Enología, University of Padova, Legnaro (PD), Italy. CRA-VIT Centro di Ricerca per la Viticoltura, Conegliano (TV), Italy. DIVAPRA – Food Technology Sector, University of TURin, Grugliasco (TO), Italy. Vol 34 No. 1, 2013.
- Yue, Y., R., Zhou, Q., C., 2008. Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization, and hematological indexes for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. Aureus*. *Acuaculture* 284, 85-189