

ÍNDICE

1. OBJETIVOS.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE	6
2.1.1. HÁBITAT.....	6
2.1.2. ANATOMÍA Y MORFOLOGÍA.....	6
2.1.3. ALIMENTACIÓN.....	8
2.1.4. MERCADO	11
2.1.5. JUSTIFICACIÓN DEL EMPLEO DE TILAPIA.....	12
2.2. PROTEÍNA EN LA ALIMENTACIÓN DE LOS PECES.....	14
2.3. SITUACIÓN ACTUAL Y LIMITACIONES DE LA HARINA DE PESCADO.....	15
2.4. FUENTES ALTERNATIVAS A LA HARINA DE PESCADO.	16
2.5. USO DE LA HARINA DE INSECTOS	19
2.6. ESTRÉS OXIDATIVO.....	22
2.6.1. ÍNDICES FISIOLÓGICOS DE ESTRÉS.....	22
2.6.2. ESTRÉS OXIDATIVO.....	22
2.6.3. ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES).....	24
2.6.4. FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER).....	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26

3.2. ANIMALES Y MANTENIMIENTO.....	29
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	31
3.3.1. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PECES Y DIETA.....	31
3.3.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	32
3.3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. MARCADORES OXIDATIVOS. ANÁLISIS DE LAS DIETAS.....	44
4.2. MARCADORES OXIDATIVOS. DEFERENCIAS ENTRE TRATAMIENTOS.....	49
4.3. MARCADORES OXIDATIVOS. DIFERENCIAS ENTE ÓRGANOS.....	57
4.4. CORRELACIÓN ENTRE LOS DATOS DE LOS ANÁLISIS ROS Y FRAP.....	66
5. DISCUSIÓN.....	68
5.1. ESTRÉS OXIDATIVO.....	70
5.2 CORRELACIÓN ENTRE LOS DATOS DE LOS ANÁLISIS ROS Y FRAP.	76
6. CONCLUSIONES.....	77
7. BIBLIOGRAFÍA.....	79

1. OBJETIVOS DEL PROYECTO.

1. OBJETIVOS DEL PROYECTO

El aumento de la explotación intensiva de animales de carne y leche, el desarrollo de la producción piscícola, y la prohibición de incluir harinas de carne en los piensos de animales, han creado una fuerte demanda de harina de pescado, como fuente de proteínas de alto valor biológico. Por otra parte, la sobreexplotación de los caladeros y degradación del medio marino han provocado una disminución en la producción de esta materia prima.

La sustitución por fuentes proteicas de origen vegetal sólo es posible en parte debido a la baja proporción de proteína.

Diversos investigadores están tratando de solucionar el déficit proteico en la acuicultura, considerando que los insectos pueden jugar un papel fundamental en la nutrición de los peces.

El objetivo de este proyecto es intentar cuantificar las variaciones en el estrés oxidativo en el intestino y músculo de ejemplares de tilapia del Nilo (*Oreochromis nilotica*) por ingesta de diferentes dietas constituidas de harina de insectos, como análisis complementario a la búsqueda de un pienso alternativo para la alimentación piscícola.

Las dietas de los peces estarán repartidas en tres tratamientos diferentes para evaluar la diferencia que estas dietas producen en el estrés oxidativo, que son las siguientes:

- 1.- Control o dieta a base de harina de pescado.
- 2.- Pienso basado en harina de Tenebrio.
- 3.- Pienso basado en harina de Tenebrio y aceite de borraja.

Concretamente, el pienso control está constituido por harina de pescado, harina de soja y aceite de pescado, principalmente. En el pienso de insectos, se mantiene la misma cantidad de harina de soja, pero la harina de la larva de tenebrio queda sustituida completamente por harina y aceite de pescado. La última dieta se formula añadiendo aceite de borraja para equiparar el perfil de ácidos grasos a la harina de pescado.

A su vez y como alternativa a la harina de pescado se han elaborado otros tres tratamientos para comprobar el efecto de la sustitución parcial de harina de pescado por harina de soja. Las composiciones son las siguientes:

- 1.- Pienso basado en harina de pescado y harina de soja.
- 2.- Pienso basado en harina de pescado y harina de insecto.
- 3.- Pienso basado en harina de pescado, harina de soja y harina de insecto.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE

El grupo de peces conocido como “tilapia” (*Oreochromis sp.*) está formado por un total de 60 especies de las cuales sólo 10 son utilizadas en alimentación humana. Todas estas especies son originarias de los lagos y ríos de África tropical y Oriente Próximo. En concreto, la especie utilizada para este proyecto es la Tilapia del Nilo (*Oreochromis nilotica*).

2.1.1. Hábitat

Las tilapias, en sentido amplio, son peces eurihalinos, es decir, soportan un amplio rango de contenido en sal del agua, siendo capaces de vivir en medios dulces y salobres, aunque no toleran los cambios bruscos de salinidad. Por ello, dentro de sus áreas originales de distribución, las tilapias han colonizado hábitats muy diversos: arroyos permanentes y temporales, ríos anchos y profundos o con rápidos, lagos profundos, lagos pantanosos, lagunas de aguas dulces, salobres o saladas, alcalinas, estuarios, lagunas costeras e incluso hábitats marinos. En todos ellos las tilapias muestran preferencia, por lo general, hacia las aguas de corriente lenta, permaneciendo en zonas poco profundas y cercanas a las orillas donde desarrollan su ciclo vital.

El rango natural de temperatura en estas áreas oscila entre los 20-30°C, siendo de 24° a 29° C la temperatura óptima para la reproducción. Aunque pueden soportar temperaturas inferiores, el mero hecho de que se produzcan descensos y fluctuaciones en la misma origina disfunciones metabólicas que se traducen, por ejemplo, en un incremento de la vulnerabilidad de la especie ante las enfermedades, una reducción en el éxito reproductivo y la ralentización del crecimiento. De hecho, temperaturas inferiores a 15°C provocan la muerte de los ejemplares en corto plazo de tiempo y, a 8°C, la muerte resulta inmediata.

2.1.2. Anatomía y morfología

El cuerpo de la tilapia es compacto y discoidal, raramente alargado. Presenta un solo orificio nasal a cada lado de la cabeza, que sirve simultáneamente como entrada y salida de la cavidad nasal. La boca es protractil, generalmente ancha, a menudo bordeada por labios gruesos; las mandíbulas presentan dientes cónicos y en algunas ocasiones incisivos.

Para su locomoción poseen aletas pares e impares. Las aletas pares las constituyen las pectorales y las ventrales; las impares están compuestas por las aletas dorsales, la caudal y la anal. La parte anterior de la aleta dorsal y anal es corta, consta de varias espinas y la parte terminal de radios suaves, disponiendo sus aletas dorsales en forma de cresta.

La aleta caudal es redonda, trunca y raramente cortada. Como en todos los peces, esta aleta le sirve para mantener el equilibrio del cuerpo durante la natación y al lanzarse en el agua.

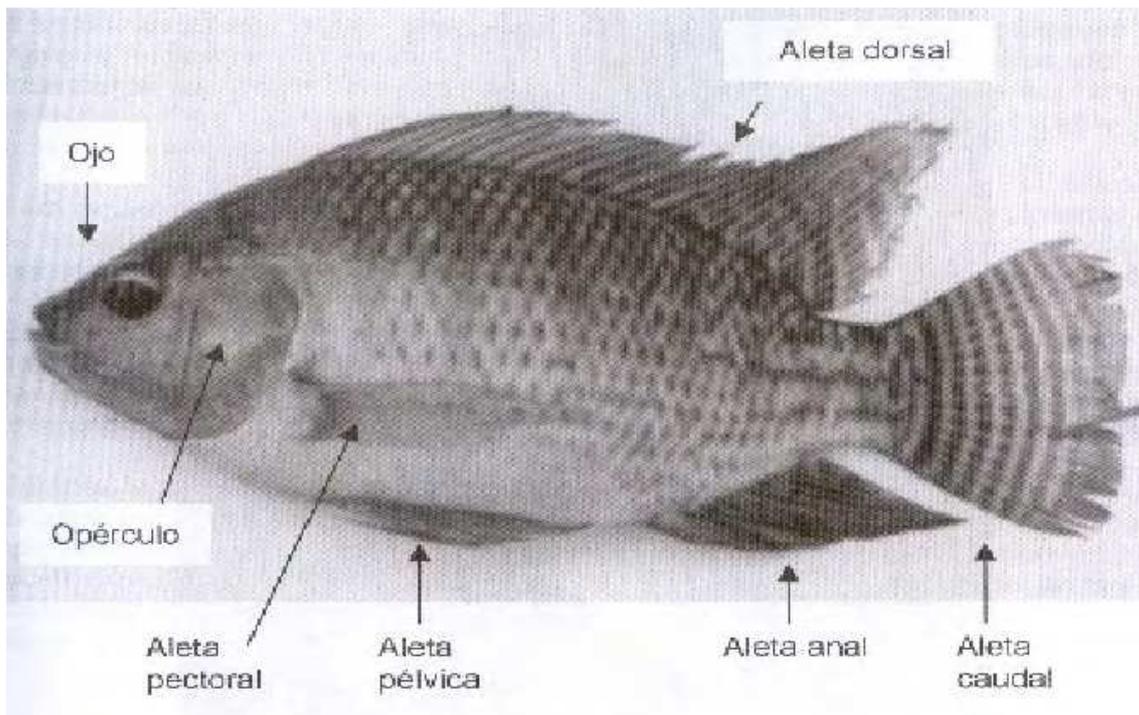


Figura 2.1.1. Anatomía de la tilapia (Saavedra Martínez, 2006).

En cuanto a su morfología interna, el sistema digestivo de la tilapia se inicia en la boca, presentando en su interior dientes mandibulares (que pueden ser unicúspides, bicúspides y tricúspides según las diferentes especies) y continúa con el esófago y el estómago.

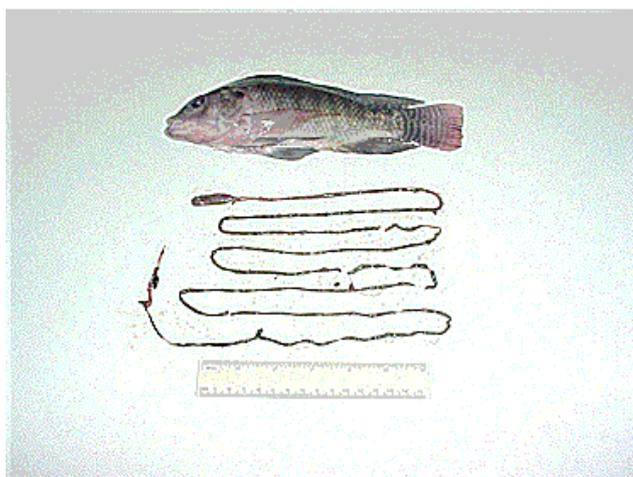


Figura 2.1.2.: Ejemplar de tilapia mostrando su intestino largo, característica de un pez herbívoro. Fuente: (S.M, 2006).

El intestino es en forma de tubo que se adelgaza después del píloro diferenciándose en dos partes; una anterior, corta, que corresponde al duodeno, y una posterior más larga aunque de menor diámetro. El intestino es siete veces más largo que la longitud total del cuerpo, característica que predomina en las especies herbívoras (Figura 2.1.2.).

Presenta dos glándulas importantes asociadas con el tracto digestivo: el hígado, que es un órgano grande y de estructura alargada, y el páncreas, en forma de pequeños fragmentos redondos y difíciles de observar por estar incluidos en la grasa que rodea a los ciegos pilóricos.

El sistema circulatorio está impulsado por un corazón generalmente bilocular y de forma redonda, compuesto por tejido muscular y localizado casi en la base de la garganta.

La respiración es branquial, estando estas estructuras constituidas por laminillas delgadas alojadas en la cavidad opercular.

Posee una vejiga natatoria que se localiza inmediatamente bajo la columna dorsal y que tiene forma de bolsa alargada, la cual funciona como un órgano hidrostático que ayuda al pez para flotar a diferentes profundidades.

El sistema excretor está constituido por un riñón de forma ovoide que presenta un solo glomérulo; unos uréteres secretan en la vejiga y ésta descarga a su vez en la cloaca.

2.1.3. Alimentación

El género *Oreochromis* se clasifica como Omnívoro, por presentar mayor diversidad en los alimentos que ingiere.

En su medio natural la tilapia se alimenta de plancton, larvas de insectos y plantas acuáticas y además se considera un filtrador, ya que al pasar el agua por las branquias, las partículas de plancton quedan atrapadas en un mucus que secreta las branquias formando un bolo que es deglutido. Esto, junto con el larguísimo digestivo, un pH estomacal cercano a 2 y las placas de dientes faríngeos que actúan como molinillos con las materias vegetales, hacen que la tilapia use de manera muy eficiente la alimentación natural pudiendo digerir entre el 30-60% de la proteína del alga.

Se cultivan numerosas especies e híbridos de tilapia con diferentes hábitos alimenticios, aunque todas aceptan el alimento artificial. Entre las especies cultivadas destacan: *Oreochromis aureus* que consumen zooplancton, fitoplancton y organismos del fondo; *Oreochromis mossambicus*, las cuales durante su fase larvaria se alimentan sólo de zooplancton y en su estado adulto se alimentan además de fitoplancton. Una de las especies más cultivadas de tilapia es *Oreochromis niloticus* que se alimenta de zooplancton durante la fase larvaria. Los adultos comen zooplancton, fitoplancton, insectos y otros organismos del fondo. Los adultos de *tilapia rendalli* comen plantas acuáticas, insectos, algas y alimento procesado mientras que las larvas sólo comen zooplancton. Las larvas de *tilapia zilli* se alimentan de zooplancton mientras que los adultos comen fitoplancton, hojas, tallos, plantas acuáticas con raíz y alimento artificial (Nicovita A.2007).

En cuanto a la alimentación artificial, hasta hace unos años, los piensos que se empleaban para alimentar tilapias contenían niveles de proteína del 40% o superiores, ya que se consideraba que era necesaria una alta concentración de proteínas para la alimentación de

los reproductores. Pero los últimos experimentos indican que los piensos de engorde que contienen 25-32% de proteína bruta son los adecuados para suplir las necesidades nutricionales de los reproductores, incluso se ha demostrado que niveles de proteína elevados (>40%) no otorgan ninguna ventaja específica en términos de crecimiento de los reproductores, y disminuyen la frecuencia de puesta. Niveles de contenido del 10% de proteína bruta aumentan el intervalo entre puestas y reducen el número de huevos por desove, mientras que reproductores alimentados con un 25-32% de proteína reacondicionan sus ovarios más rápidamente y permiten un mayor número de puestas.

De este modo se recomiendan los siguientes niveles de proteína recogidos en la tabla:

Peso promedio (g) (% biomasa/día)	Tasa de alimentación (% biomasa/día)	% Proteína en la dieta
< 1 a 5	30-7	50-35
5 a 20	6-4	40-32
20 a 100	4-3	35-28
100 a 200	3-2	32-25
200 a 800	2-1,0	32-25

Tabla 2.1.1.: Valores de proteína en dieta recomendados para el cultivo de la tilapia
Fuente: (Alicorp,S.A, 2006).

Al establecer el balance proteico hay que buscar el equilibrio entre las necesidades de crecimiento y el coste económico que supone su aporte. Este es un factor importante, sobre todo si se considera que los gastos de alimentación suponen un 50-60% de los gastos totales de producción. Las proteínas actúan como fuente de aminoácidos esenciales, los cuales deben guardar unas proporciones similares a las que se reflejan en la tabla 2.1.2.

Aminoácidos	Porcentajes en la dieta
Arginina	4,2
Histidina	1,7
Isoleucina	3,1
Leucina	3,4
Lisina	5,1
Cisteína	3,2
Tirosina	5,7
Treonina	3,6
Triptófano	1
Valina	2,8
Total PC en dieta	25-50

Tabla 2.1.2.: Porcentajes de los aminoácidos en la dieta.
Fuente: (Alicorp S.A, 2006).

Una dieta equilibrada para la tilapia debe contener un contenido en lípidos compensado con la concentración de proteínas suministradas en el alimento. Así, para unos niveles de proteínas propuestos (32-25%) se recomiendan niveles de 3-4% de grasas poliinsaturadas livianas y fácilmente asimilables obtenidas a partir de un 0,5 a 1% de omega 3 y un 1% de omega 6.

Por su parte, los carbohidratos deben alcanzar niveles del 40%. Existen otros compuestos que es necesario incluir en la dieta debido a que la tilapia no los sintetiza, o si lo hace, no alcanzan la proporción óptima para obtener el máximo rendimiento en cultivo. Dentro de estos compuestos destacan las vitaminas, que tienen una función en clave en el metabolismo. La tilapia en concreto requiere entre 12 y 15 vitaminas diferentes y aunque el nivel de las mismas depende en gran medida del tipo de cultivo, los valores generales se muestran en la tabla 2.1.3.

Vitamina	Nivel en la dieta (mg/Kg)
Tiamina	0,1
Riboflavina	3,5
Piredoxina	0,5
Ácido pantoténico	3-5
Niacina	6-10
Biotina	0-0,5
Ácido fólico	0-0,05
Cianocobalamina	0,01
Inositol	300
Colina	400
Ácido ascórbico	50
Retinol	500
Vitamina D	200
Vitamina E	10
Vitamina K	0-1

Tabla 2.1.3.: Requerimientos vitamínicos en la dieta de la tilapia.
Fuente: (Alicorp, S.A, 2006).

Otros compuestos necesarios en la dieta de la tilapia son los minerales que están implicados en los procesos de intercambio de sales y en los de formación de estructuras óseas y escamas. Su proporción genérica se recoge en la tabla 2.1.4.

Mineral	Requerimiento en la dieta (g/Kg)
Calcio	0
Fósforo	5-10
Magnesio	0,5-0,7
Potasio	2,0
Hierro	30
Manganeso	2,4
Cobre	5,0
Selenio	0,1
Cromo	1,0

Tabla 2.1.4.: Aporte recomendado de minerales en dieta para el cultivo de la tilapia
Fuente: Alicorp S.A, 2006.

Tomando en consideración los contenidos anteriormente enunciados, se recomienda utilizar un alimento peletizado y extruido ya que gracias al proceso de extrusión que consiste en la cocción parcial (a temperatura y presión controladas) de los ingredientes, se aumenta la digestibilidad de pienso y los pellets reducen el desperdicio por parte de los animales y mantienen el valor nutritivo del alimento en el agua durante más tiempo (ECONIMA, 2010).

En definitiva, la mayor capacidad de utilización digestiva de los alimentos de origen vegetal y la menor dependencia de la harina de pescado que tiene esta especie, abre un amplio espectro de subproductos que se pueden utilizar en la alimentación de este pez y que pueden suponer un abaratamiento sensible en la alimentación.

2.1.4. Mercado

La tilapia (*Oreochromis sp.*), antiguamente se producía y consumía en África y Asia, pero con el tiempo se fue extendiendo por otros países hasta ocupar un lugar importante en los primeros puestos de especies acuicultivadas en el mundo.

Haciendo un rápido repaso del mercado internacional de la tilapia, en la Conferencia sobre tilapia celebrada en Kuala Lumpur en agosto del 2007, se puso de manifiesto que la producción de esta especie es probable que alcance los 4 millones de toneladas en un futuro cercano, superando incluso la producción del salmón (Josupeit, 2007). La cantidad de tilapia que se comercializa mundialmente hoy es todavía pequeña, aproximadamente el 10%, siendo EE.UU. el mercado mundial principal.

Europa tuvo un significativo aumento de sus importaciones de tilapia de Taiwán (su principal abastecedor), Indonesia, Tailandia, China, Vietnam, Malasia, EEUU, Costa Rica, Jamaica, y recientemente, Zimbabwe (filetes frescos) y Uganda. Desde 1996, las importaciones europeas procedentes de Taiwán, crecieron de 889 TM a 3.711 TM. La mayor parte de estas importaciones consistieron en tilapia congelada (Vannuccini, 2007).

El precio de los filetes de tilapia fresca es casi el doble de los congelados. Los países Iberoamericanos dominan este mercado, su proximidad al mercado americano es una ventaja que reduce los costos de embarque. En los primeros siete meses de 2007, las importaciones aumentaron por encima del 16% del mismo periodo de 2006 (Josupeit, 2007).

A pesar de todo esto, en España se encuentra aun prácticamente sin explotar salvo en zonas como Málaga o Mallorca. Existen ciertos limitantes técnicos, de mercado y ecológicos para el cultivo de estas especies en nuestro país. Técnicamente, la cría de tilapia requiere de unas temperaturas muy altas, lo cual obliga a disponer de sistemas para calentar el agua en las instalaciones. Por otro lado, la falta de un pienso específico para ella hace que sea el propio productor el encargado de diseñarlo. Desde el punto de vista comercial, no existe realmente un mercado de la tilapia en España, tendría que competir con un gran número de especies y variedades autóctonas. Otro factor en contra de introducir esta especie en España es su carácter foráneo, pudiendo llegar a comportarse como una especie invasora si alcanzase un ecosistema nuevo.

2.1.5. Justificación del empleo de tilapia. Oportunidades de la tilapia en Almería

Son varios los motivos que sustentan la elección de la tilapia del Nilo como especie para llevar a cabo este estudio. En primer lugar, dado que se trata de una especie omnívora que ingiere plantas e insectos en su hábitat natural, permite probar la eficacia de diversas materias primas incorporadas en los piensos que le serán suministrados. Además de esto, se trata de una especie con una gran capacidad de adaptación a ambientes muy diversos, lo cual hace posible su cría en una extensa variedad de sistemas, es muy resistente a enfermedades y su supervivencia en jaulas es muy alta.

Centrándonos en el caso de Almería, al tratarse de una provincia con una gran actividad agrícola en sistemas intensivos, dispone de un importante número de balsas de riego para abastecer los cultivos, así como de un eficiente sistema de gestión de calidad del agua. Esta situación sirve de aliciente para que diversas líneas de investigación traten de combinar el cultivo bajo plástico con la cría de tilapias en las balsas de riego. Como ejemplo en Andalucía, la Fundación Tecnova (IPac, 2009) actualmente está trabajando en el diseño de estructuras que permitan la producción de tilapia en invernadero, ya que el calentamiento producido por el plástico permite mantener el agua a una temperatura superior a 20°C durante todo el año sin necesidad de emplear estufas (Tecnova, 2010). Otra forma de sacar partido de la tilapia en Almería sería producir peces en las mismas balsas de riego. Esto acarrearía muchas ventajas para los agricultores, ya que la tilapia se alimentaría de las algas que pudieran proliferar sobre la superficie del agua, impidiendo así que hongos fitopatógenos como *Phytium* y *Phytophthora* se asentasen sobre dicha cubierta. Otro argumento a favor de esta práctica es que los peces aportarían materia orgánica y amonio al agua de riego, lo que permitiría reducir la cantidad de fertilizantes incorporados al sustrato. Según estudios realizados en México sobre la cría de tilapia en sistemas rurales, el tiempo necesario para que los peces alcancen la talla comercial (180g) es de 36 días si se parte de organismos juveniles de 50g de peso (Vega-Villasante, F et al, 2010).

Los sistemas de policultivo de producción agrícola y acuícola se vienen practicando desde hace siglos en diversas partes del mundo: Asia (China, Indonesia, Malasia, Taiwlandia, Filipinas...), África (Egipto, Senegal, Zambia, Madagascar, Malawi...), Estado Unidos, Australia e, incluso, Europa (concretamente, en Italia). En la gran mayoría de los casos, las producciones eran arroz y carpas o tilapias, procediendo al engorde de los peces en pequeños estanques durante la época de barbecho o aprovechando inundaciones. Estos sistemas eran empleados principalmente por familias de agricultores que obtenían de los peces una fuente adicional de alimento y de ingresos (Halwart, M y Modadugu, V.G., 2006), aunque si se enfocase a una escala mayor, la cría de peces en campos de cultivo podría satisfacer la demanda de pescado a nivel local.

Aunque actualmente no existen estudios de mercado de la tilapia en Almería, se podría animar a su consumo mediante unas técnicas de mercado apropiadas, tales como la promoción de un pescado ecológico o de un producto fácil de cocinar, ya que sus filetes se pueden vender como congelados, en forma de varitas rebozadas o incluso en precocinados.

2.2. PROTEÍNA EN LA ALIMENTACIÓN DE LOS PECES

En la dieta para los peces, la proteína es el componente que más interés y problemática provoca. El dato más llamativo en la formulación de raciones, es que las necesidades proteicas de los peces para un máximo crecimiento son proporcionalmente mayores que las de los vertebrados terrestres, lo que puede llevar a pensar que los peces tienen un aprovechamiento deficiente de proteína. Sin embargo, si se sigue comparando ambos tipos de dieta, se puede apreciar que los peces requieren un menor aporte energético para mantenimiento y crecimiento. De este modo, lo que en un principio apuntaba a unas altas necesidades de proteína se corresponde en realidad con una baja necesidad de energía y por ello, en consecuencia, el contenido proteico relativo de la dieta es más alto en peces que en otros vertebrados de interés económico.

Así pues, podemos definir “necesidad proteica” como la mínima cantidad de proteína requerida para conseguir un máximo crecimiento. Dicha necesidad es en realidad la suma de las necesidades de aminoácidos esenciales y no esenciales que constituyen un patrón específico cualitativa y cuantitativamente adecuado a una síntesis proteica eficaz. De forma simultánea a intentar optimizar la síntesis de proteínas, se debe procurar minimizar el catabolismo de los aminoácidos para la obtención de energía. Para esto, hay que procurar que el balance proteína/energía (P/E) esté siempre en torno a un valor óptimo para cada especie aportando unas cantidades precisas de glúcidos y lípidos.

Según los estudios realizados por Tacon y Cowey (1985), los peces no aprovechan bien los glúcidos como fuente de energía. Este hecho es aún más patente en especies carnívoras (Furuichi y Yone, 1980) en comparación con el uso de lípidos y proteínas. No obstante, la demanda de glucosa de algunos tejidos hace aconsejable incluir un cierto nivel de glúcidos en la dieta como un mecanismo para ahorrar proteína. Por su lado, los lípidos en la dieta de los peces conllevan una mejora de las tasas de conversión de alimento y de las reservas de proteína para crecimiento (de la Higuera et al., 1977) y reducen, paralelamente, la excreción de amoníaco y el consumo de oxígeno (Atherton et Aitken, 1970).

Al igual que otros muchos monogástricos, los peces ingieren alimento hasta saciar sus necesidades calóricas, lo cual supone que una dieta con una baja relación P/E puede hacer que el pez deje de comer antes de que las necesidades de proteína del pez hayan sido cubiertas. El caso contrario tampoco es deseable, ya que una ración con un alto cociente P/E supone un derroche de proteína y de capital. Lo ideal, por tanto, es conseguir un equilibrio adecuado entre proteína y energía, procurando al mismo tiempo cubrir las necesidades de aminoácidos esenciales, glúcidos y ácidos grasos esenciales.

Metabolismo de las proteínas

Como ya se ha mencionado, los peces poseen una capacidad extraordinaria para obtener energía a partir de los aminoácidos en comparación con otros vertebrados. El catabolismo de una proteína supone romper el enlace peptídico que une el grupo amina con el resto del péptido. El amoníaco resultante, tras una serie de transformaciones, pasa a urea y ésta es excretada al exterior mediante la orina. En el caso de los peces, el proceso de expulsión del amoníaco es más sencillo: a través de las branquias, se libera al exterior rápida y continuamente del 60 al 80% de los residuos nitrogenados (Castelló, 1993), obteniendo mayor energía de esta forma al no producirse gasto en la formación de la urea.

2.3. SITUACIÓN ACTUAL Y LIMITACIONES DE LA HARINA DE PESCADO

Tradicionalmente, la materia prima que ha constituido el mayor aporte de proteína en los piensos ha sido la harina de pescado, ya que posee ciertas características que ponen de manifiesto su extraordinaria calidad nutritiva:

- Su contenido en proteína es superior al 60% en materia seca.
- Alta digestibilidad de la proteína.
- Su aporte de aminoácidos esenciales y no esenciales satisface las necesidades de los peces y garantiza una óptima síntesis proteica.
- Cubre las necesidades de ácidos grasos de los peces, especialmente, de los poliinsaturados.
- Alto contenido en proteínas del tipo B.
- Aporta gran cantidad de minerales, especialmente, fósforo asimilable.
- Tienen una buena palatabilidad para los peces, asegurando un adecuado nivel de ingesta.

Sin embargo, el proceso de elaboración de harina de pescado implica unos costes muy elevados, de manera que, hablando en términos energéticos, para producir 1kg de pez carnívoro o de crustáceo en piscifactoría son necesarios 3kg de otros tres peces si asumimos gastos por pesca, elaboración de harina, transporte, etc.

La crisis a nivel mundial de la harina de pescado no comenzó realmente hasta los años 70. Antes de ese momento, su situación en el mercado se había mantenido al alza, con una buena disponibilidad y precios competitivos. Sin embargo, la simultaneidad de una serie de factores en el contexto económico global provocó un aumento considerable del precio de la harina de pescado y, con ello, un coste desorbitado en piensos en las piscifactorías. Para empezar, la crisis del petróleo afectó a todos los transportes, incluidos los barcos de pesca, y a toda la cadena de procesado. El número de capturas en alta mar se vio mermado tras las restricciones de muchos países para pescar en sus aguas y el progresivo cambio en las corrientes oceánicas. Con el tiempo, los caladeros habituales se fueron agotando y paulatinamente se fueron introduciendo en el mercado especies hasta entonces extrañas para el consumidor y que tradicionalmente se habían empleado para la fabricación de harina de pescado. Este nuevo destino de la materia prima para elaborar la harina, junto con una mayor demanda del producto por parte de China, fue el último factor que provocó una subida tan acusada de los precios.

Aunque esta situación de crisis ya se ha aliviado bastante, los productores se alejan cada vez más del uso de harina de pescado, ya que depender de la pesca para producir pescado en piscifactorías continúa siendo un hecho paradójico y dudosamente rentable. Este cambio de mentalidad le abrió las puertas a la investigación para buscar nuevas materias primas que, cumpliendo con los requisitos nutritivos, no hiciesen fluctuar tanto el precio de los piensos.

2.4. FUENTES ALTERNATIVAS A LA HARINA DE PESCADO

A la hora de buscar una fuente de proteína alternativa a la harina de pescado, hay que tener en cuenta los siguientes criterios (Higuera y Cardenete, 1987):

- Debe contener suficiente proteína como para poder sustituir en gran medida la harina de pescado sin que ello suponga desequilibrios o problemas para ajustar la inclusión del resto de componentes de la ración: lípidos, glúcidos, vitaminas, etc.
- La calidad de la proteína, es decir, su aporte de aminoácidos esenciales y sus niveles de digestibilidad, debe ser la apropiada para cada especie.
- Es necesario controlar los procesos tecnológicos por los que deba pasar el alimento y la manera en que éstos pueden afectar a la disponibilidad de la proteína.
- Evaluar la posible presencia de factores anti-nutritivos, especialmente en las harinas de origen vegetal.

Proteínas de origen vegetal

Los vegetales suponen un grupo de materias primas muy competitivas para incluir en piensos. Su alta productividad, no necesariamente ligada al medio, y el aprovechamiento de vegetales subproductos de la agricultura, son dos factores que han permitido posicionar a determinadas especies vegetales como principales sustitutivos de la harina de pescado.

Sin embargo, las fuentes proteicas de origen vegetal presentan ciertos inconvenientes. En primer lugar, su contenido en proteína es significativamente inferior al de la harina de pescado y son deficientes en aminoácidos esenciales, especialmente, lisina y metionina. Además, su palatabilidad es inferior, lo que reduce el nivel de ingesta, y no son muy digestibles debido a la presencia de determinados factores anti-nutritivos. Por otro lado, con la aplicación de tratamientos a los componentes vegetales de los piensos se puede incrementar la palatabilidad y la digestibilidad, así como mejorar su balance aminoacídico adicionando aminoácidos esenciales y facilitando la disponibilidad de éstos.

Las materias vegetales con mayor aptitud para desplazar significativamente a la harina de pescado son las leguminosas, las oleaginosas y los concentrados proteicos procedentes de subproductos industriales. En cualquier caso, la inclusión de productos vegetales en piensos queda limitada al aporte energético y aporte de proteína secundario, esto es, que no suministre más 25% de proteína de la ración. En caso contrario, el crecimiento del pez queda restringido (Murai, 1992) debido, principalmente, a un mal balance de aminoácidos, baja palatabilidad y presencia de factores antinutritivos.

Cabe destacar en este apartado la importancia de la harina de soja, pues ha sido la materia más estudiada y empleada en alimentación piscícola. Posee un alto contenido en proteína y un buen perfil aminoacídico. Todo esto unido a un tratamiento adecuado de su semilla para eliminar factores antinutritivos garantiza una disponibilidad de aminoácidos suficiente para conseguir un desarrollo aceptable. Si además se suplementa la harina de soja con aminoácidos, ésta puede ser empleada como fuente proteica mayoritaria en piensos, llegando a sustituir hasta en un 50% la harina de pescado. Sin embargo, el precio al que se comercia actualmente la harina de soja se acerca peligrosamente al de la harina de pescado, lo cual supone un freno para su uso.

Otras materias vegetales probadas como fuentes de proteínas son la colza (Hilton y Slinger, 1986), la semilla de algodón (Anwar et al., 1982) y el gluten de maíz (Moyano et al., 1992). En todos estos casos, los principales inconvenientes derivan de lo ya citado anteriormente: mala digestibilidad por contener factores antinutritivos, baja palatabilidad y desbalance de aminoácidos.

Proteínas de organismos unicelulares

Aunque se han empleado muy poco en alimentación de peces (generalmente, sólo como aditivo probiótico), los microorganismos unicelulares presentan una serie de ventajas como fuente de proteínas (Kihlberg, 1972):

- En primer lugar, su contenido en proteína ronda en torno a un 40-70% medido en masa seca.
- Son capaces de crecer sobre sustratos pobres y de bajo costo como subproductos industriales.
- En condiciones óptimas, presentan una alta velocidad de reproducción.
- Son capaces de crecer en medios reducidos (colonias que aprovechan bien el espacio) y controlados.
- Su manipulación genética es relativamente sencilla, lo que permite modificar su valor nutritivo.
- Constituyen una fuente importante de vitamina C y ácidos grasos esenciales (Kaushik, 1990).

Las más empleadas hasta ahora han sido, por orden decreciente, las levaduras, las bacterias y las algas, especialmente importantes estas últimas en la alimentación de larvas de peces marinos. Sin embargo, se han observado una serie de problemas en su inclusión en dietas para peces. Por un lado, se ha observado que el aporte de nitrógeno procedente de ácidos nucleicos produce alteraciones a nivel hepático, hematológico y hasta acumulaciones anormales de ácido úrico (fenómenos descritos en truchas por Sánchez-Muñiz et al., 1983). Además de esto, muchas bacterias son deficientes en aminoácidos azufrados (Murray y Marchant, 1986) y la mayoría de ellas requieren de un tratamiento especial para romper su pared celular y poder mejorar su digestibilidad (Murray y Marchant, 1986).

Visto todo esto, no es de extrañar que no se comercialicen organismos unicelulares como aporte proteico en piensos.

Proteínas de origen animal

Se elaboran principalmente a base de subproductos de distintas industrias y no se emplean en alimentación humana, por lo que su precio es bastante competitivo. Los principales tipos estudiados hasta ahora son tres:

- Subproductos de matadero: Harinas de sangre, plumas hidrolizadas, huesos... Han sido incorporadas a distintos piensos con relativa asiduidad y, además, han sido sometidas a estrictos controles sanitarios durante todo su proceso de producción. Pese a su alto contenido en proteína, algunas de ellas presentan una baja digestibilidad y deficiencias en aminoácidos esenciales, principalmente, lisina, metionina y triptófano. Aun así, se han

obtenido buenos resultados al realizar sustituciones de más de un 50% de harina de pescado por subproductos avícolas y de matadero en algunas especies carnívoras de peces (Moshen y Lowell, 1990; Fowler, 1990).

- Harinas de invertebrados: Éstas son menos convencionales y las conclusiones derivadas de su inclusión en dietas son muy dispares según los casos. La abundante población de krill del Antártico y el Atlántico Norte y los resultados positivos obtenidos en alimentación de peces llevaron a muchos a considerar este crustáceo como sustituto perfecto para la harina de pescado (Shimizu et al., 1990), pero no constituye una fuente viable a largo plazo ya que presenta los mismos inconvenientes que la harina de pescado: alta dependencia de la producción natural y de la pesca extractiva.

Otro grupo de invertebrados con el que se ha experimentado mucho han sido los lumbrínicos procedentes de granjas de lombrices dedicadas a la producción de humus. Los datos resultantes de estos experimentos concluyen que para algunas especies (por ejemplo en salmón), la sustitución parcial de harina de pescado por lombriz promueve el crecimiento (Akiyama et al., 1984; Stafford y Tacon, 1985; Velasquez et al., 1991). Por el contrario, la harina de lombriz tiene muy baja palatabilidad y puede contener factores anti-nutritivos o contaminantes (Cardenete et al., 1991).

Otra harina de invertebrados que va cobrando importancia es la de insectos que, por ser la que atañe a este proyecto, será desarrollada en un apartado propio de la Revisión Bibliográfica.

2.5. USO DE HARINA DE INSECTOS

La entomofagia practicada por distintas culturas en diversas partes del mundo (Ramos-Elorduy, J. et al., 1998) llevó a muchos nutricionistas a evaluar sus aportes como alimento. De todos estos trabajos se concluye que la mayoría de los insectos analizados poseen, entre otros, un aporte proteico similar al de la carne. Esto, si bien no pareció aumentar su consumo para nutrición humana, arrojó nueva luz para la búsqueda de fuentes alternativas en acuicultura.

Aunque a nivel global son muy pocos los estudios que se han centrado en obtener proteína a partir de harina de insectos, es destacable el proyecto de investigación de la “Aquaculture and Technology Group Neptune Industrie” con la Universidad Estatal de Mississippi que se inició en abril de 2007. Los ensayos, llevados a cabo en lubina, son bastante positivos, ya que en este caso no se observó verdadera preferencia de los peces por la harina de pescado frente a la de insectos y no se aprecian diferencias en la apariencia, sabor o textura entre los peces alimentados con distintas dietas (Ratliff, 2007).

El estudio de la composición química y el valor nutritivo de algunos insectos indica que contiene una gran proporción de proteína (Landry et al., 1986; Phelps et al., 1975). En los países con un déficit proteico en la alimentación humana se ha estudiado su valor nutritivo como fuente de alimento y proteína para los humanos (DeFoliart, 1989; Conconi et al., 1984; Ramos-Elorduy et al., 1998).

Concretamente, Wang et al. (2007) han estudiado el valor nutritivo del saltamontes *Acrida cinerea*, encontrando que el adulto está constituido (en materia seca) principalmente por: 65,4% de proteína bruta (PB), 8,3% de grasa, 8,7% de quitina y 3,5% de cenizas. Otras especies de insectos analizadas han sido el grillo mormón *Anabrus simplex* (58% PB) (DeFoliart et al., 1982), el grillo doméstico *Acheta domesticus* (62% PB) (Nakagaki y DeFoliart, 1987), y seis especies de larvas de lepidópteros (de 49,4% a 58,1% PB) (Landry et al., 1986). Como puede observarse, aunque estos valores sean inferiores a los obtenidos por Wang et al. (2007) para el saltamontes *Acrida cinerea*, se puede decir que la proporción de proteína en estos insectos es similar a la harina de pescado (aproximadamente un 60% PB).

Por otra parte, Ramos-Elorduy et al. (1998), ha analizado 104 especies distintas de insectos tanto acuáticos como terrestres, pertenecientes a diez órdenes diferentes, pensando en su influencia sobre la nutrición humana. El contenido proteico variaba desde el 9,5% (*Myrmecosistus melliger*) al 77% (*Melanoplus mexicanus*). Más de 20 especies poseían niveles superiores al 60% de proteína, y sólo 30 especies menos del 50%. En general, las fases larvianas de los insectos se caracterizan por contener menor proporción de proteína y mayor de grasa que los adultos, y así por ejemplo, la larva del picudo de la palmera *Rhynchophorus phoenicis* presenta un nivel proteico únicamente del 20,3% (Cerdeira et al., 1999).

También se ha descrito que el contenido de aminoácidos más similar al de la harina de pescado (metionina 1,6%, lisina 0,5% y cisteína 1,6%) es el de la harina del saltamontes *Acrida cinerea* (metionina 1,7%, lisina 0,7% y cisteína 3,8%) (Wang et al., 2007). Sin embargo, el grillo mormón y común son deficientes en metionina (DeFoliart et al., 1982; Finke et al., 1985; Nakagaki y DeFoliart, 1987), y se ha descrito que seis especies de lepidópteros son deficientes en los aminoácidos esenciales metionina, cisteína y posiblemente lisina (Landry et al., 1986).

Según Ramos-Elorduy et al. (1998), la calidad de las proteínas de estos insectos, en términos de la cantidad de los aminoácidos esenciales que contienen, es muy prometedora. Destacan los contenidos en lisina, isoleucina, leucina, metionina, cisteína, fenil alanina, tirosina, treonina y valina, y que son ligeramente deficientes en triptófano (Conconi, 1993, Ladrón de G. et al, 1995). Estos estudios ponen de manifiesto la heterogeneidad en los perfiles de aminoácidos entre las distintas especies, y por tanto, es necesaria una evaluación particularizada para poder diseñar raciones equilibradas. No parece probable que las harinas de insectos procedentes de una sola especie puedan utilizarse como única fuente de nitrógeno en las raciones para peces, pero combinaciones de las mismas podrían superar los desequilibrios que la literatura apunta para las mismas, o en el peor de los casos, podrían complementar a otras fuentes de proteína. A nuestro juicio existe potencial suficiente en estas materias primas para que puedan ser estudiadas como fuente prometedora de proteína en las raciones para peces.

Atendiendo al contenido de grasa de los insectos, se ha descrito que éste varía ampliamente y, de esta manera, también su contribución energética (Cerda et al., 1999). Las termitas y orugas se encuentran entre los insectos con más alto contenido en grasa (Phelps et al., 1975). Cerda et al. (1999) observaron en la larva del picudo de la palmera *Rhynchophorus phoenicis* un alto contenido de grasa (41,7%), y por tanto, un elevado valor energético (562 Kcal/100 g). Ashiru (1988) midió que el valor calórico de la oruga *Anaphe venata* Butler (Nolodontidae) de Nigeria es de 611 Kcal/100 g de peso seco. Malaisse y Parent (1980) informaron un promedio de 457 Kcal/100 g de peso seco para 23 especies de orugas de Zaire, con un rango de 397 a 543 Kcal/100 g de peso seco.

En los insectos, el grado de instauración de la grasa es similar a las procedentes de aves de corral y a la del pescado, con algunas especies con contenidos más altos en ácido linoleico (DeFoliart 1992). Concretamente, Wang et al. (2007) en *Acrida cinerea* encontraron un alto contenido de ácidos grasos insaturados (siendo elevados los ácidos oleico, linoleico y linolénico, con un contenido del 31,4%, 40,8% y 12,2% de los ácidos grasos totales, respectivamente). Por tanto, el contenido total de éstos constituye el 84,4% de los ácidos grasos, lo que indica que, por ejemplo, el aceite de saltamontes podría ser una fuente potencial de calidad en la industria alimentaria. Ya que se sabe que estos ácidos grasos insaturados tienen importantes funciones biológicas al poseer efectos protectores frente a enfermedades coronarias, hipertensión y diabetes (Haglund, 1998).

Con relación al contenido en quitina, indicaremos que el contenido (8,7%) en el saltamontes *Acrida cinerea* (Wang et al, 2007) al contenido medio en cangrejos y camarones (Jiang, 2003). Sin embargo, en esos crustáceos la quitina presenta altos grados de mineralización, por lo que los insectos podrían ser utilizados como una mejor fuente comercial de quitina.

A escala comercial, son diversas las empresas que surten de insectos vivos para alimentación de mascotas (fundamentalmente reptiles). En este sentido, la empresa norteamericana "Grubco" vende varias especies de insectos con la siguiente composición: grillos (6,01% lípidos; 21,32 PB; 69,07 % humedad); larvas de la harina (12,72% lípidos; 20,27 PB; 62,44 % humedad); polilla de la cera (22% lípidos; 20,27 PB; 61,73 % humedad) y larvas de mosca (7,81% lípidos; 15,58 PB; 68,18 % humedad).

Aunque son limitados, existen algunos trabajos que han valorado la harina de insectos en la alimentación de diversas especies ganaderas. En un ensayo de alimentación de Broilers (una especie de pollo), Wang et al. (2007) observaron que su crecimiento no se vio afectado significativamente cuando se incluía un máximo de 150 g de harina de saltamontes por kg de

pienso. Estos resultados coinciden con investigaciones previas sobre broilers (Finke et al., 1985), que no mostraron diferencias significativas en el aumento de peso, entre pollos alimentados con una dieta mezcla de maíz-insecto y los alimentados con dietas control. Nakagaki y DeFoliart (1987) indicaron que la proporción “ganancia de peso/alimento” mejoraba significativamente cuando las dietas de insectos se complementaban con metionina y arginina, a igualdad en la energía metabolizable y proteína bruta.

2.6. ESTRÉS OXIDATIVO

2.6.1. Índices fisiológicos de estrés: estrés oxidativo.

Como parámetros fisiológicos indicativos de estrés, se utiliza la concentración plasmática de glucosa y cortisol. El aumento de cortisol se ha descrito como respuesta primaria al estrés, incrementándose los niveles plasmáticos bajo un estímulo estresante. Sin embargo, en situaciones de estrés crónico la respuesta varía según la especie y el factor estresante (Mormede et al. 2007; Rushen 1991), por lo que no resulta un indicativo muy exacto de bienestar. En cuanto a la glucosa plasmática como índice de estrés (Pickering, 1998), se usa en combinación con los niveles de cortisol y otros parámetros (Di Marco 2008; Turnbull et al, 2004).

Actualmente se utilizan indicadores de estrés oxidativo como indicadores de procesos de estrés. El estrés oxidativo aparece al romperse el equilibrio entre la formación de radicales libres y los antioxidantes celulares. Esta situación puede producir daño y envejecimiento celular, desencadenar trastornos fisiológicos y favorecer la presentación de procesos patológicos. La formación de radicales libres se ha asociado a determinados procesos como detoxificación, síntesis de mediadores inflamatorios (Chihuailaf et al. 2002), en bóvidos a afecciones asociadas al parto y lactancia, como fiebre de la leche o reducción de la inmunocompetencia (Miller et al., 1993) y en general situaciones de una gran demanda energética y plástica no satisfecha (Goff and Horst, 1997). En peces, los estudios del estrés oxidativo se centran fundamentalmente en el efecto que ejercen diferentes contaminantes sobre los procesos de detoxificación. Sin embargo, el hecho de estar implicado en procesos inflamatorios, de demanda energética y plástica hace suponer que el equilibrio oxidativo se pueda afectar bajo diversos estímulos estresantes por lo que podrían evaluarse como indicativos de bienestar.

Los lípidos son una de las principales fuentes de energía en peces y son utilizados como fuente de energía alternativa a la glucosa. Bajo condiciones de estrés, como respuesta secundaria, se produce un aumento de triglicéridos y ácidos grasos libres plasmáticos. Por otra parte, se ha descrito que la composición en ácidos grasos puede variar con estímulos que afectan al bienestar como la música y/o fotoperiodo (Papoutsoglou et al. 2006) por lo que la distribución de grasa y el perfil lipídico de animal podrían considerarse como otro parámetro indicativo de bienestar.

2.6.2. Estrés oxidativo.

Los radicales libres del oxígeno son continuamente generados en las diferentes vías metabólicas, son capaces de interactuar con diferentes biomoléculas y provocar daño celular. No obstante, los organismos poseen una poderosa red antioxidante que protege de los efectos nocivos de los radicales libres. El estrés oxidativo es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante de un organismo, al romperse este equilibrio se crea una situación llamada estrés oxidativo, que puede producir daño celular, desencadenar trastornos fisiológicos y favorecer la presentación de procesos patológicos (Yu 1994).

Los radicales libres (RL) cumplen una importante función en variados procesos homeostáticos como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción (redox) esenciales para la vida. La destrucción de microorganismos por fagocitosis, la síntesis de mediadores inflamatorios y la detoxificación constituyen algunos ejemplos relevantes. Las concentraciones bajas de RL son beneficiosas e incluso indispensables; sin embargo, en cantidades excesivas son tóxicos, ya que al oxidar moléculas biológicas las alteran y desencadenan trastornos en el metabolismo celular (Halliwell 1997; Larkins 1999; Chow 1979). Los organismos aeróbicos poseen un sistema antioxidante (AO) protector que limita la acción nociva de los RL. Este sistema protector se compone de enzimas y nutrientes esenciales cuya función es evitar la formación de RL, capturar aquellos que se han formado y remover o reparar las biomoléculas dañadas.

La mayoría de los estudios sobre estrés oxidativo se han hecho en mamíferos enfocados a evaluar las alteraciones que producen en este sistema determinados tóxicos, o como se altera con procesos de inflamación, angina o cáncer determinados tóxicos y la eficacia antioxidante de determinados compuestos. Sin embargo, poco estudios se han hecho en peces y casi todos enfocados al efecto que provocan contaminantes tales como pesticidas, herbicidas, etc.... muestran que la alteración del estrés oxidativo es una respuesta típica de la toxicidad inducida por xenobióticos (Lemaire and Livingstone, 1993; Di Giulio et al., 1995; Sheehan and Power, 1999; Hai et al., 1997; Peña- Llopis et al., 2003). Sin embargo la respuesta oxidativa frente a un estrés emocional no ha sido descrita en peces.

Los efectos negativos de la peroxidación de los lípidos son múltiples. Este fenómeno acarrea una destrucción de los elementos lábiles (vitamina A, E riboflavina, ácido fólico...) en los alimentos. En los peces puede provocar diarreas como consecuencia de una disminución de la actividad de enzimas como la amilasa, lipasa o tripsina. A nivel metabólico, también pueden aparecer trastornos que van desde la esteatosis hepática hasta la inhibición de ciertas enzimas del ciclo de los ATC. Sin embargo, los síntomas que se encuentran con mayor frecuencia son una carencia de vitamina E que se puede haberse empleado completamente en las reacciones de destrucción de los radicales libres. Se observa entonces, en particular, distrofia muscular y lisis de los hematíes (Guillaume J et al., 2004).

2.6.3. ROS (Reactive Oxygen Species).

La formación de radicales oxidantes queda reflejada en la determinación de los ROS (Reactive Oxygen Species). Estos compuestos son difíciles de medir ya que presentan una vida muy corta y baja concentración (Sun et al. 2006). No obstante, en todos se describe un aumento del nivel de éstos cuando se expone al pez al algún contaminante, bien sea aguas residuales (Sturve et al., 2008) o 2-Chlorophenol (Luo et al., 2006).

La actividad SOD se puede considerar una medida indirecta del contenido en ROS ya que la reducción de los radicales superóxido son reducidos por esta enzima, por lo que Palace et al. (1996) lo establecen como un indicador muy fiable de la exposición a contaminantes.

En general, contaminantes como 2-Chlorophenol (Luo et al., 2006) o HC Orange No. 1 (Sun et al. 2006) inducen niveles altos de ROS.

Las diferencias entre tejidos pueden ser causadas por las diferentes velocidades de generación de radicales libres, pues la actividad de los enzimas clave del metabolismo oxidativo en cerebro, riñón y branquias de *Cyprinus carpio* y *Oreochromis niloticus* expuesto a contaminantes tales como 2,4-D (2,4-dichlorofenoxy ácido acetico dimetil amina) y

zinfosmetil no muestran datos homogéneos, por ejemplo la actividad SOD sólo se afecta en branquias pero no en hígado ni riñón, mientras que la actividad CAT varía en hígado y branquias de la carpa pero no se afecta en ningún órgano en la tilapia, por el contrario la actividad GPx afecta al hígado de ambas especies y al cerebro de tilapia y la actividad GST solo se afecta en el riñón de ambas especies (Ozcan et al. 2004). Estos datos junto con los de otros autores (Radi and Matkovics, 1988; Winston and Di Giulio, 1991), muestran que la respuesta antioxidante varía según el tejido y la especie de pez. Ahmad et al., (2000) establece que tanto la respuesta oxidativa como el potencial antioxidante del pez difieren según especies, hábitat y comportamiento alimentario.

2.6.4. FRAP (Ferric reducing antioxidant power).

Como indicador del status antioxidante de la célula se han determinado los FRAP (Ferric reducing antioxidant power). En la mayoría de los trabajos realizados en peces la respuesta oxidativa se determina a través de los cambios de actividad de los enzimas implicados en el estrés oxidativo, por lo que poca información hemos hallado sobre la capacidad antioxidante total. Los estudios realizados por Bagni et al. (2007) muestran que bajo condiciones estresantes como es hacinamiento antes del sacrificio no produce un aumento significativo en el poder antioxidante y en los radicales oxidantes determinados en músculo de dorada y lubina pero que observan una correlación positiva entre la producción de radicales oxidativos y defensas oxidativas.

La mayoría de las macromoléculas biológicas pueden ser oxidadas por los RL (Kehrer, 1993; Bandyopadhyay et AL., 1999; Slater, 1984). Sin embargo, las biomoléculas más lábiles son los lípidos (Cheeseman y Slater, 1984; Halliwell y Chirico, 1993) ya que el proceso de peroxidación de un ácido graso provoca una cadena de peroxidaciones debido a que el ácido graso se transforma en un RL peroxilo que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros ácidos grasos e inicia nuevas reacciones de transición (Halliwell et al., 1992; Morrissey y O'Brien 1998), los dobles enlaces contenidos en la cadena AGP facilitan este proceso (Halliwell y Chirico, 1993). Los peces debido a su cantidad de ácidos grasos poli-insaturados son especialmente sensibles a la peroxidación lipídica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Mediante esta experiencia llevada a cabo en las instalaciones de la universidad, se busca una fuente proteica alternativa a la harina de pescado para una especie omnívora, y el efecto de la dieta sobre el estrés oxidativo comparándolo con un tratamiento control, sobre individuos inmaduros de Tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus*.

La alternativa a la harina de pescado usada fue harina de insectos, compuesta a partir de larvas de *Tenebrio molitor*, comúnmente denominado “gusano de la harina”.

Los motivos por los que se eligió el tenebrio para llevar a cabo esta experiencia fueron básicamente tres:

- Era fácil obtener una cantidad suficiente, ya que se comercializa en las tiendas de animales como alimento para aves y mascotas exóticas.
- Su alimentación, basada en salvados de cereales, hace que su producción sea asequible y susceptible de experimentar crecimientos.
- Es fácil aumentar su producción, pues se conoce su método de cría.

En este ensayo se analiza la capacidad oxidativa y antioxidativa total tanto de las dietas probadas como de los peces. Dichas dietas están formuladas en la tabla 3.1.1.

Analizaremos por tanto las dietas y animales de dos experimentos diferentes, cada uno con tres tratamientos. Las dietas del experimento 1 son una dieta control constituida 100% por harina de pescado, sustitución 100% de la proteína por harina de tenebrio, y una sustitución parcial de la harina de pescado por harina de tenebrio y borraja. Dichas dietas se encapsulan para evitar el rechazo de la comida por falta de palatabilidad.

A su vez y como alternativa a la harina de pescado se elaboraron otros tratamientos para comprobar el efecto de la sustitución parcial de harina de pescado por harina de soja, que constituyen el experimento número 2. La primera dieta de este experimento se elabora con un 50% de harina de pescado y un 50% de harina de soja. La segunda dieta se elabora con un 50% de harina de pescado y un 50% de harina de insecto (tenebrio). La tercera dieta es un conjunto de las dos anteriores y se elabora con un 25% de harina de soja, 25% de harina de pescado y 50% de harina de insecto.

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO
1	100% Harina de pescado + Cápsulas
	100% Harina de insecto + Cápsulas
	(100% Harina de insecto + Borraja) + Cápsulas
2	50% Harina de pescado 50% Harina de soja
	50% Harina de pescado 50% Harina de insecto
	50% Harina de soja 25% Harina de pescado 25% Harina de insecto

Tabla 3.1.1. Esquema del proyecto

Experimento 1: Cápsulas

- Pienso Control (PC): Elaborado principalmente a base de harinas de pescado y soja.
- Pienso Insecto (PI): En este pienso, la harina de pescado se ha sustituido en un 97,5% por harina de insecto fabricada con larvas de *Tenebrio molitor*.
- Pienso Borraja (PB): Como la inclusión de aceite de borraja desequilibraba el contenido proteico de este pienso, se añadió harina de sangre.

Experimento 2. Sustitución:

- 1.- Pienso basado en harina de pescado y harina de soja.
- 2.- Pienso basado en harina de pescado y harina de insecto.
- 3.- Pienso basado en harina de pescado, harina de soja y harina de insecto.

En la tabla siguiente se ha detallado la composición porcentual de los piensos del experimento de cápsulas:

	PC CONTROL	PI INSECTO	PB BORRAJA
Cereal	5	8	2
H. insectos	0	51	27
H. soja	35	35	49
H. sangre	0	0	6
H. pescado	40	1	0
A. pescado	15	0	0
A. borraja	0	0	11
Comp. Vitamínico	5	5	5

Tabla 3.1.2. Composición (en %) de los diferentes piensos del experimento de cápsulas.

El objetivo principal en la formulación de dietas era obtener piensos isoproteicos e isoenergéticos, basando los cálculos de datos obtenidos de bibliografía y del etiquetado de los productos.

Una vez preparados los piensos, se utilizaron 9 tilapias para cada tratamiento. En un ensayo anterior, se probó a suministrar a los peces estos piensos en forma peletizada. Sin embargo, el alimento fue rechazado por los peces debido a factores organolépticos. Para evitar esta situación, el pienso fue suministrado en cápsulas de aproximadamente 0,22g y los peces fueron colocados en compartimentos individuales para contabilizar la cantidad total de alimento ingerida por cada uno. El suministro de estas dietas tuvo lugar durante 1 mes, en dicho período se controló estrictamente la temperatura del agua y la hora en la que se alimentó a los peces.

Durante ese mes, a los peces se les ofrecían las cápsulas con los piensos durante 5 minutos, tras los cuales se procedía a retirar los rechazos. En estos rechazos se incluyeron tanto las cápsulas completas como las mordidas parcialmente. Como era imposible saber el porcentaje del pienso ingerido en las cápsulas mordidas parcialmente, se tomó como criterio considerar a las cápsulas mordidas como la mitad del peso de una cápsula completa. Aún siendo conscientes del error que esto genera, consideramos que se comete el mismo error con los tres piensos, y era necesario, porque también introduciríamos un error si consideráramos como “no consumidas” las cápsulas mordidas.

3.2. ANIMALES Y MANTENIMIENTO

Los animales empleados en esta experiencia han sido tilapias de la especie *Oreochromis nilotica*, suministradas por la empresa Valenciana Acuicultura. Estos peces fueron transportados desde la piscifactoría hasta el acuario emplazado en las instalaciones de la Universidad de Almería.

Una vez en las instalaciones de la universidad, los peces se mantuvieron durante toda la experiencia en cubas cilíndricas de fibra, de 250 litros de capacidad, con aireación constante, una renovación de agua de 300 litros/hora, y en condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo. Sin embargo, sí se modificó la concentración de oxígeno en el agua, que era insuficiente. Para modificar dicha concentración, se utilizó un motor que capta el aire y un sistema de distribución formado por unos tubos de plástico que circulan por encima de las cubas, y se ramifican introduciéndose en el interior de la cuba, con una terminación de corcho para distribuir mejor el aire y con un peso para introducirlo hasta el fondo de la misma. La concentración de oxígeno se mantuvo a un nivel de 7 ppm.

Las cubas que albergaban los peces estaban conectadas entre sí, y formaban un circuito cerrado por donde recirculaba el agua proveniente del mar. El agua llegaba a un depósito situado en la parte posterior de la instalación mediante una bomba directamente del mar, y luego era dirigida por el circuito.

Los tanques estaban conectados entre sí formando un circuito cerrado (figura 1) por donde recirculaba el agua, provisto de un completo sistema de depuración por filtro de arena, biológico y ultravioleta.

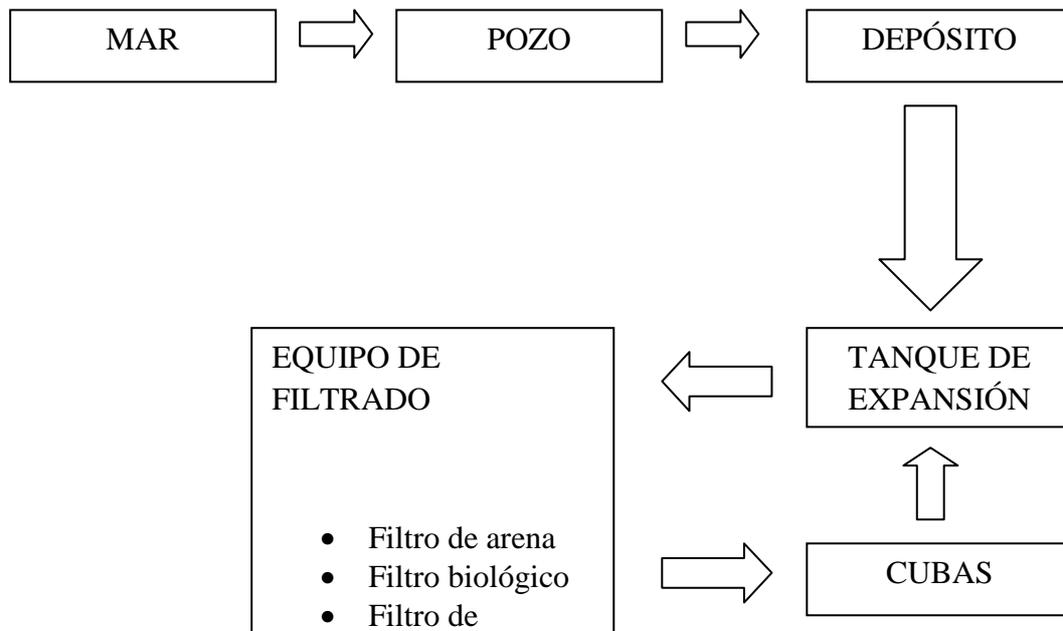


Figura 3.2.1. Esquema del movimiento del agua en el circuito.

Durante los primeros 30 días, se administró a los peces un pienso control en forma peletizada. Más tarde, se procedió a aportar este mismo pienso en cápsulas para que los peces se acostumbraran al consumo de éstas. Tras unos días de adaptación a las cápsulas, se seleccionaron 27 tilapias y se colocaron en compartimentos de 60L cada uno. Cada compartimento estaba dividido en tres alojamientos individuales con capacidad para 20L cada uno. El circuito de tuberías de estas cubas estaba conectado a un calentador que mantenía el agua a una temperatura próxima a los 20°C. Cada cuba individual fue etiquetada con la letra de la dieta correspondiente y un número del 1 al 10 para identificar a cada pez.

La aceptación del alimento por parte de los peces depende de varias características químicas, nutricionales y físicas. La aceptación de alimento depende de varias características químicas, nutricionales y físicas. Aparte de los criterios puramente físicos que permitan coger la partícula e ingerirla, tales como el tamaño, la apariencia y la disponibilidad, los principales criterios de aceptación del alimento por el pez están relacionados con las propiedades organolépticas del mismo, olor, sabor y textura (Jobling et al. 2001). En algunas fuentes de proteína de origen animal con buen potencial de inclusión en piensos para peces, como es la harina de lombriz, se han detectado sustancias que disminuyen la ingesta (Tacon et al. 1983, Mackie and Mitchell 1985), en concreto, compuestos como la cafeína y la quinina se ha comprobado que disminuyen la ingesta en varias especies de peces (Mackie and Mitchell 1985; Lamb and Finger 1995). La sustitución total de la harina y aceite de pescado tiene por fuerza que afectar a las propiedades organolépticas del pienso y, por consiguiente, en la ingesta de alimento. La encapsulación de la dieta evita que el pez aprecie las diferentes propiedades organolépticas y nos permite estudiar el efecto nutritivo de esta harina evitando esta variable.

La estancia de las tilapias en las cubas pequeñas se prolongó hasta los 32 días durante los cuales se llevaron a cabo las siguientes labores diarias:

- a) Alimentación de forma manual con una sola toma al día.
- b) Medida de temperatura.
- c) Medida del nivel de amonio en el agua.
- d) Recogida de cápsulas rechazadas y toma de datos.

Como ya se ha indicado, se realizaron además dos muestreos para estimar la masa y la talla de cada tilapia antes y después del tratamiento con cápsulas, tomándose el peso y la longitud iniciales como referencia para evaluar el desarrollo.

En todo momento, los animales han sido tratados según dispone el Real Decreto de 10 de octubre de 2005.

Cada día se tomaba la temperatura del agua y se medía la cantidad de comida ingerida por cada cuba mediante una balanza digital.

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1. Determinación de la composición de peces y dieta.

Para la obtención de los componentes tanto del pienso como de las muestras, se tomó como referencia el método WENDEE.

En laboratorio se analizó su composición corporal (AOAC 2000) y se obtuvieron aminogramas y perfiles de ácidos grasos.

Para preparar las muestras (ya sean piensos o peces) para sus correspondientes análisis, primero se desecaron, los piensos en estufa a 50°C y el material animal (tenebrios y peces) liofilizándolos. A continuación se homogeneizaron en un molino de malla de 1mm.

A continuación se explica brevemente los métodos empleados para la medición de los distintos macronutrientes de las muestras:

- **Humedad:** Las muestras se secaron a estufa a una temperatura de 105±0,5 °C hasta peso constante (aproximadamente 24 horas). Además, los músculos de los peces se sometieron a un proceso de liofilización, tal y como hemos comentado. Dicho proceso consiste en congelar la muestra y extraer el agua por sublimación en una cámara de vacío. Este método, aunque más caro y lento que la estufa, permite que se conserven ciertas características nutricionales y organolépticas de la muestra.
- **Cenizas:** Se obtuvieron incinerando las muestras en un horno mufla a 500°C hasta peso constante.
- **Proteínas:** Se determinaron por el método Kjeldahl. La muestra se mineralizó en ácido sulfúrico utilizando un mineralizador-digestor Büchi, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco. Este gas es recogido en una disolución trampa elaborada con ácido bórico, formándose borato de amonio. Finalmente, este compuesto se valora con ácido clorhídrico para determinar la cantidad total de nitrógeno recogido. A dicha cantidad se le aplica el factor 6,25 para calcular la proteína bruta de la muestra.
- **Aminograma:** El contenido de los distintos aminoácidos en las muestras se determinará mediante HPLC. Básicamente, las muestras se someterán a hidrólisis ácida en HCl 6M (20 mg tejido/ml), y tras sucesivos filtrados y la posterior derivatización, serán separadas en un cromatógrafo. Los resultados se expresarán como % en peso de cada aminoácido.
- **Extracto etéreo:** Se determinó mediante una extracción continua con éter etílico siguiendo el método Soxhlet, con un aparato Büchi.
- **Ácidos grasos:** Los distintos ácidos grasos presentes en las muestras se determinarán mediante cromatografía de gases, empleando el método de Folch para la extracción y el de Rodríguez-Ruiz para la mutilación.

3.3.2. Preparación de la muestra.

Para el desarrollo de los análisis en el laboratorio una vez sacrificadas las tilapias, se separan por órganos y se guardan en pequeñas bolsas individuales con un código que designa al pez y el tratamiento al que ha sido sometido en refrigeración a -80°C . Para la preparación de la muestra para el análisis, sacamos la muestra del congelador conservándola en frío, apuntamos el órgano, el número de pez y experimento, y posteriormente tomamos una muestra del órgano a analizar de entre 0,1 y 0,9 gramos. Añadimos nueve veces el peso de la muestra (en proporción peso/volumen) de tampón de homogenización, que en este caso es el Tris-HCl, 100 mM, pH 7.8 con Tritón X-100 0.1% y EDTA (ácido etilen diamino tetracético) 0.1 mM.

A continuación homogeneizamos la muestra, y se centrifuga durante 40 minutos a 16.000 rpm y 4°C . Pasados los 40 minutos, la sacamos y pipeteamos el sobrenadante.

De este modo, las muestras quedarán preparadas para su posterior análisis.

Si no se analiza la muestra en el momento, es preciso mantenerla en frío y congelarla a -80°C hasta el momento de su utilización.

Durante la homogenización asignamos a cada muestra un número (del 1 al 231), las pesamos apuntando su peso y el volumen de tampón utilizado.

Cómo podemos ver en la tabla de la leyenda, los órganos están clasificados por colores, y ordenados con sus correspondientes números, que no son consecutivos porque las muestras se iban homogeneizando sin orden, debido al delicado tratamiento de las mismas fuera del congelador.

Órgano	Muestras
Hígado	1-52
Estómago	98, 144-170, 173-192, 194-200
Músculo	118-143, 201-231
Intestino	60-97, 99-117, 171,172,193

Tabla 3.3.1. Leyenda. Cada órgano queda representado en las gráficas por un color, y separados por su número correspondiente.

En las siguientes tablas vemos las muestras representadas con su código de muestra, número de identificación para el análisis, peso y volumen del tampón usado.

Nº	Muestra	Peso órgano (gr)	V Tampón (ml)	Nº	Muestra	Peso órgano (gr)	V Tampón (ml)
1	C1	0,47	4,23	51	1/17	0,5	4,5
2	C3	0,39	3,51	52	3/17	0,53	4,77
3	C4	0,25	2,25	53	--	--	--
4	C5	0,17	1,53	54	--	--	--
5	C6	0,43	3,87	55	--	--	--
6	C7	0,32	2,88	56	--	--	--
7	C8	0,51	4,59	57	--	--	--
8	C9	0,74	6,66	58	--	--	--
9	C10	0,29	2,61	59	--	--	--
10	I1	0,21	1,89	60	C1	0,2922	2,6298
11	I3	0,15	1,35	61	C3	0,3847	3,4623
12	I5	0,67	6,03	62	C4	0,5947	5,3523
13	I6	0,41	3,69	63	C5	0,9252	8,3268
14	I7	0,38	3,42	64	C6	0,5414	4,8726
15	I8	0,2	1,8	65	C7	0,3323	2,9907
16	I9	0,12	1,08	66	C8	0,9821	8,8389
17	I10	0,47	4,23	67	C9	0,4661	4,1949
18	B1	0,28	2,52	68	C10	0,4521	4,0689
19	B3	0,42	3,78	69	B1	0,4845	4,3605
20	B4	0,14	1,26	70	B3	0,794	7,146
21	B5	0,27	2,43	71	B4	0,3775	3,3975
22	B6	0,22	1,98	72	B6	0,3428	3,0852
23	B7	0,26	2,34	73	B7	0,5093	4,5837
24	B8	0,27	2,43	74	B8	0,5841	5,2569
25	B9	0,15	1,35	75	B9	0,6916	6,2244
26	2/18	0,36	3,24	76	B10	0,7231	6,5079
27	2/16	0,6	5,4	77	I1	0,481	4,329
28	3/7	0,28	2,52	78	I3	0,5831	5,2479
29	2/12	0,39	3,51	79	I4	0,8648	7,7832
30	1/7	0,21	1,89	80	I5	0,6742	6,0678
31	2/7	0,48	4,32	81	I6	0,7542	6,7878
32	3/18	0,57	5,13	82	I7	0,545	4,905
33	1/15	0,52	4,68	83	I8	0,4582	4,1238
34	3/14	0,87	7,83	84	I9	0,6078	5,4702
35	1/18	0,41	3,69	85	I10	0,7943	7,1487
36	3/11	0,79	7,11	86	--	--	--
37	2/17	0,71	6,39	87	--	--	--
38	3/15	0,5	4,5	88	--	--	--
39	3/3	0,4	3,6	89	--	--	--
40	2/11	0,52	4,68	90	1/14	0,4456	4,0104
41	3/16	0,43	3,87	91	1/18	0,4816	4,3344
42	1/14	0,21	1,89	92	1/16	0,4075	3,6675
43	1/3	0,34	3,06	93	2/3	0,3078	2,7702
44	1/15	0,81	7,29	94	3/18	0,6825	6,1425
45	2/12	0,45	4,05	95	2/12	0,714	6,426
46	3/13	0,35	3,15	96	3/11	0,6486	5,8374
47	1/11	0,84	7,56	97	2/7	0,8502	7,6518
48	1/16	0,54	4,86	98	2/3	1,7547	15,7923
49	2/14	0,44	3,96	99	3/14	0,9538	8,5842
50	1/12	0,59	5,31	100	1/15	0,6393	5,7537

Tabla 3.3.2. Muestras del 1 al 100.

Nº	Muestra	Peso órgano (gr)	V Tampón (ml)
101	2/16	0,9787	8,8083
102	2/18	0,5118	4,6062
103	2/12	1,419	12,771
104	3/17	0,4954	4,4586
105	3/16	0,3937	3,5433
106	1/3	0,8565	7,7085
107	1/17	0,2766	2,4894
108	2/14	1,3568	12,2112
109	3/15	0,3059	2,7531
110	1/12	1,3545	12,1905
111	3/3	1,1999	10,7991
112	2/17	0,737	6,633
113	1/7	0,3294	2,9646
114	1/11	0,8095	7,2855
115	3/7	0,8808	7,9272
116	2/11	0,8601	7,7409
117	2/15	1,1582	10,4238
118	3/7	0,6858	6,1722
119	2/7	0,9777	8,7993
120	2/11	0,5506	4,9554
121	1/11	0,8295	7,4655
122	2/12	0,8079	7,2711
123	2/14	0,7286	6,5574
124	3/16	0,4132	3,7188
125	2/16	0,8848	7,9632
126	1/18	0,4482	4,0338
127	1/17	0,3568	3,2112
128	3/14	1,1501	10,3509
129	1/15	0,4696	4,2264
130	2/17	0,5938	5,3442
131	3/12	0,4533	4,0797
132	1/12	0,6878	6,1902
133	3/3	0,3034	2,7306
134	3/17	0,8075	7,2675
135	1/13	0,6649	5,9841
136	2/15	0,3908	3,5172
137	1/7	0,338	3,042
138	1/16	0,4844	4,3596
139	2/18	0,9498	8,5482
140	2/13	0,674	6,066
141	3/18	0,8336	7,5024
142	3/11	1,4301	12,8709
143	3/15	0,514	4,626
144	2/15	0,2501	2,2509
145	3/16	0,1581	1,4229
146	1/16	0,2116	1,9044
147	1/11	0,2562	2,3058
148	3/17	0,1794	1,6146
149	1/7	0,0695	0,6255
150	3/14	0,2246	2,0214

Nº	Muestra	Peso órgano (gr)	V Tampón (ml)
151	2/16	0,172	1,548
152	3/11	0,055	0,495
153	3/15	0,1175	1,0575
154	1/17	0,1156	1,0404
155	3/7	0,08	0,72
156	1/18	0,1993	1,7937
157	2/11	0,1219	1,0971
158	3/18	0,1521	1,3689
159	2/12	0,4132	3,7188
160	3/12	0,303	2,727
161	2/14	0,1024	0,9216
162	1/12	0,2375	2,1375
163	2/17	0,0837	0,7533
164	2/18	0,063	0,567
165	1/3	0,1367	1,2303
166	2/7	0,1241	1,1169
167	3/13	0,3468	3,1212
168	1/14	0,0654	0,5886
169	1/15	0,437	3,933
170	1/14	0,4009	3,6081
171	B5	0,7873	7,0857
172	I2	0,5536	4,9824
173	I1	0,0745	0,6705
174	I7	0,1848	1,6632
175	C1	0,1234	1,1106
176	B6	0,0935	0,8415
177	C10	0,0733	0,6597
178	C7	0,1095	0,9855
179	I3	0,0713	0,6417
180	I5	0,12	1,08
181	B5	0,1091	0,9819
182	B3	0,0726	0,6534
183	I8	0,0654	0,5886
184	B10	0,0601	0,5409
185	I4	0,0796	0,7164
186	C4	0,0731	0,6579
187	B8	0,0502	0,4518
188	B1	0,0899	0,8091
189	C3	0,0784	0,7056
190	C9	0,0581	0,5229
191	B9	0,0735	0,6615
192	B2	0,1321	1,1889
193	B10	0,3254	2,9286
194	C6	0,1109	0,9981
195	I9	0,0969	0,8721
196	I6	0,1299	1,1691
197	C8	0,0773	0,6957
198	B7	0,0993	0,8937
199	C5	0,1105	0,9945
200	I2	0,0997	0,8973

Tabla 3.3.3. Muestras del 101 al 200.

Nº	Muestra	Peso órgano (gr)	V Tampón (ml)
201	B4	0,4395	3,9555
202	C5	0,6519	5,8671
203	I5	0,2086	1,8774
204	I1	0,2616	2,3544
205	C10	0,395	3,555
206	C9	0,2347	2,1123
207	I6	0,3709	3,3381
208	I3	0,3143	2,8287
209	I7	0,224	2,016
210	I2	0,2595	2,3355
211	C4	0,524	4,716
212	C3	0,3383	3,0447
213	C3	0,2385	2,1465
214	B3	0,5301	4,7709
215	I8	0,3205	2,8845
216	I4	0,5999	5,3991
217	I10	0,4948	4,4532
218	B2	0,3486	3,1374
219	I9	0,3678	3,3102
220	C6	0,4603	4,1427
221	B10	0,4253	3,8277
222	B8	0,351	3,159
223	B5	0,3484	3,1356
224	B9	0,2784	2,5056
225	B7	0,4593	4,1337
226	C8	0,3471	3,1239
227	C7	0,2862	2,5758
228	B1	0,3618	3,2562
229	C2	0,3174	2,8566
230	B6	0,4324	3,8916
231	C1	0,3124	2,8116

Tabla 3.3.4. Muestras del 201 al 231.

Las muestras correspondientes a los números 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 86, 87, 88 y 89 no se registraron porque presentaban un peso insignificante para su posterior análisis.

3.3.3. Marcadores oxidativos:

1.- Método ROS:

Especies reactivas de oxígeno. Se basa en la unión de radicales libres peróxidos a una sustancia cromógena, y se determina la absorbancia a 505 nm, siguiendo el método de Ikue Hayashi et al., 2007.

Para la realización del método ROS usamos los siguientes reactivos, y a partir de ellos prepararemos las soluciones siguientes:

Reactivos:

- N1N-diethy-para-phenylendiamine (DEPPD).
- Sulfato ferroso.
- Peróxido de hidrogeno.
- Tampón acetato de sodio, pH = 4,8 y 0,1 M.

Soluciones:

- R1 (Solución cromógena): el DEPPD se disuelve en 0,1 M tampón acetato de sodium (pH = 4,8) para llegar a una concentración final de 100 µg/ml.
- R2 (Solución transiteonmetal ion) el sulfato ferroso se disuelve en 0,1 M tampón acetato sodium (pH = 4.8) para lograr una concentración final de 4,37 µM.
- Peróxido de hidrógeno: curva patrón (25, 50, 75, 100, 125 y 150 mg/l).
- Solución mixta: R1:R2, proporción 1:25.

Cabe destacar que las soluciones R1 y la solución mixta son percederas con el tiempo, por lo que cada vez que vayamos a realizar un análisis ROS hay que preparar estas soluciones nuevamente, no se pueden conservar los reactivos.

Para determinar las unidades de ROS de una muestra seguimos el siguiente proceso:

1. Tomamos la muestra homogeneizada según el método descrito anteriormente.
2. Diluimos la muestra con el tampón Tris-HCl, 100 mM, pH 7.8 con Tritón X-100 0.1% y EDTA (ácido etilen diamino tetracético) 0.1 mM, en proporción 1/9.
3. Introducimos en el microplaca 5µl de la muestra diluida y 140 µl de tampón acetato de sodio.
4. Preincubamos durante 5 minutos manteniendo una temperatura de 37° C.
5. Añadimos 100µl de Tampón ROS.
6. Preincubamos 1 minuto manteniendo la temperatura a 37° C.
7. Leemos la placa con una longitud de onda de 505 nm, con un periodo de 60 a 180 segundos midiendo las variaciones cada 15 segundos.

Para calcular las unidades ROS tomamos los datos de la absorbancia obtenidos a 505 nm con un análisis cinético. Dichos datos los transformamos en unidades ROS utilizando la ecuación de la curva patrón, la cual preparamos con peróxido de hidrógeno con las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 mg/l (ver tabla 3.3.5.).

En el análisis ROS no tomaremos datos de absorbancia, ya que es un análisis cinético, y lo que medimos es el cambio de absorbancia con el tiempo, tomando como resultado la pendiente de la línea resultante de unir los puntos de las distintas absorbancias con el tiempo. En concreto hacemos 10 medidas de absorbancia, con una diferencia entre cada una de ellas de 49 segundos.

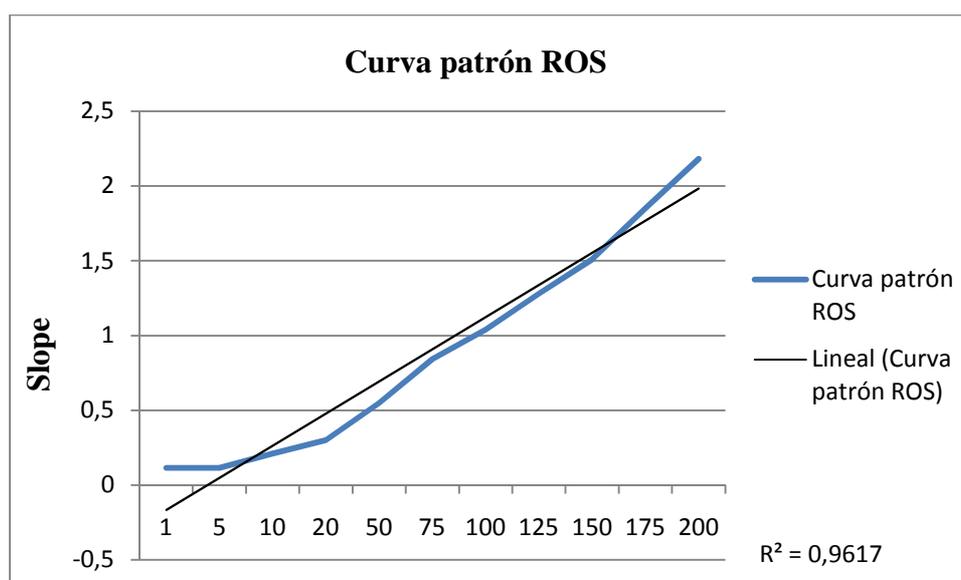
Concentración (mg/l)	1	5	10	20	50	75	100	125	150	175	200
Max. Slope	0,115 0278 3	0,115 0278 3	0,211 5027 8	0,300 5565 9	0,549 1651 2	0,842 3005 6	1,038 9610 4	1,280 1484 2	1,510 2040 8	1,851 5769 9	2,181 8181 8

Tabla 3.3.5. Concentraciones de peróxido de hidrógeno en mg/l y el valor obtenido en el análisis de la pendiente máxima.

El resultado de superponer todos estos datos en un gráfico es la curva patrón, representada en la gráfica 3.3.1. Como podemos ver en este gráfico, la línea de tendencia tiene un R cuadrado de 0.9617, lo que significa que la línea se ajusta bastante bien a los puntos de la curva y el análisis es muy bueno.

Para transformar los datos de máxima pendiente que nos darán los posteriores análisis de las muestras en unidades ROS utilizamos la ecuación de la curva:

$$Y = 0,0117254176 X - 0,03710576$$



Gráfica 3.3.1. Curva patrón ROS

2.- Método FRAP:

Se determinará el poder antioxidante total, FRAP, que se calcula por el cambio de absorbancia a 593 nm que produce la reducción de las formas ferrosas provocado por el Fe₃-TPTZ.

Para la realización del método FRAP usamos los siguientes reactivos, y a partir de ellos preparamos las soluciones siguientes:

Reactivos:

- TPTZ: 2,4,6-tri-pyridil-s-triacine.
- ClH.
- Tampón Acetato pH 3.6.
- FeCl₃ · 6 H₂O.

Soluciones:

- 300 mmolar/l Tampón Acetato pH 3.6.
- 10 mmolar/l TPTZ: 2,4,6-tri-pyridil-s-triacine en 40 mmolar ClH.
- 20 mmolar/l FeCl₃ · 6 H₂O.
- Frap: 10:1:1 de los reactivos anteriores.

Cabe destacar que la solución de 10 mmolar/l TPTZ: 2,4,6-tri-pyridil-s-triacine en 40 mmolar ClH es perecedera con el tiempo, por lo que cada vez que vayamos a realizar un análisis FRAP hay que preparar esta solución nuevamente, no se puede conservar el reactivo.

Para determinar las unidades FRAP de una determinada muestra usamos el siguiente procedimiento:

1. Tomamos la muestra homogeneizada según el método descrito anteriormente.
2. Introducimos en el microplaca 250 µl de FRAP y 5µl de suero (muestra).
3. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Medimos en el microplacas a 593 nm.

Para calcular las unidades FRAP tomamos los datos de la absorbancia obtenidos a 593 nm con un análisis normal. Dichos datos los transformamos en unidades FRAP utilizando la ecuación de la curva patrón, la cual preparamos con FeSO₄ · 7 H₂O, con las siguientes concentraciones: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 y 1900 µmol/l (ver tabla 3.3.6.).

Concentración (µmol/l)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Absorbancia	0,234	0,2715	0,3	0,3305	0,3485	0,3935	0,4215	0,486	0,5105	0,5465
Concentración (µmol/l)		1100	1200	1300	1400	1500	1600	1700	1800	1900
Absorbancia		0,5625	0,7105	0,7255	0,705	0,742	0,7545	0,838	0,842	0,9175

Tabla 3.3.6. Concentraciones de FeSO₄ · 7 H₂O µmol/l y el valor obtenido en el análisis de la absorbancia.

El resultado se superponer todos estos datos en un gráfico es la curva patrón, representada en la gráfica 3.3.2. Como podemos ver en este gráfico, la línea de tendencia tiene un R cuadrado de 0.9836, lo que significa que la línea se ajusta bastante bien a los puntos de la curva y el análisis es muy bueno.

Para transformar los datos de absorbancia que nos darán los posteriores análisis de las muestras en unidades FRAP utilizamos la ecuación de la curva:

$$Y = 0,038 X + 0,1801$$

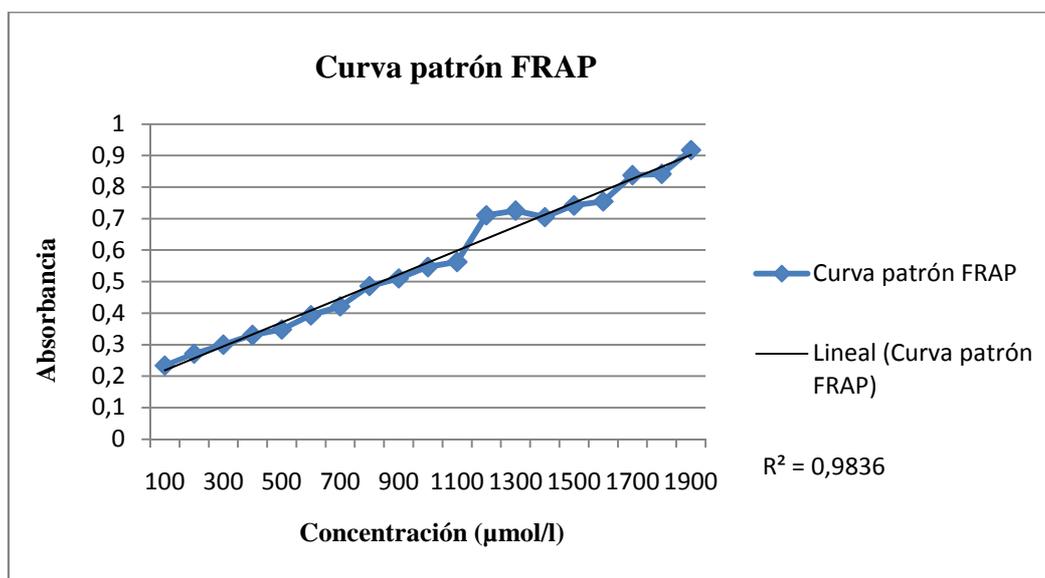


Gráfico 4.2.2. Curva patrón FRAP.

3.- Correlación entre los datos de los análisis ROS y FRAP.

La correlación entre los datos obtenidos de los análisis ROS y FRAP se propone como un indicador de bienestar, que nos permite distinguir entre estrés y bienestar, de forma que si la respuesta antioxidante es proporcional y positiva con la liberación de ROS, se puede considerar que el animal goza de un buen estado de salud y bienestar. Si la respuesta es proporcional e intermedia, es decir, ni positiva ni negativa, el bienestar del animal no sería el más idóneo, debiéndose a un prolongado estado de estrés oxidativo. Por último, si la respuesta es negativa, el animal se encuentra en malas condiciones y sometido a una situación estresante continuada (Brambilla et al., 2002 a, b; Ballerini et al., 2003).

El análisis de correlación entre los datos de los análisis ROS y FRAP consiste en elaborar tablas de doble entradas con los datos obtenidos de los análisis, en las que pondremos en abscisas los datos correspondientes a los análisis de ROS y en ordenadas los datos correspondientes a los análisis de FRAP. Las correlaciones entre ambos análisis formarán puntos en la gráfica, y esos puntos generarán a su vez una línea de tendencia. Lo que interesa para esta prueba es ver la dirección que toma la línea de tendencia. Puede ser hacia arriba (positiva), horizontal (neutra o intermedia) y hacia abajo (negativa). Si la línea de tendencia toma la dirección ascendente es un caso favorable de salud; una dirección horizontal sería un caso de estado intermedio de estrés, y una línea descendente un caso en el que el estado del animal está más perjudicado.

En este análisis los puntos de la gráfica no suponen una gran proximidad y ajuste a la curva, pero lo que nos interesa es sólo la inclinación que tome la curva, que es lo que nos dará la información.

3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de (n) datos.

La valoración estadística de los resultados obtenidos se ha realizado con ayuda del programa JMP 702.

El tratamiento estadístico aplicado para comparar dos grupos de datos, se ha realizado mediante estadísticas básicas, aplicando el análisis de la varianza de una vía ANOVA. El valor del límite significativo para las diferencias es de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS.

4. RESULTADOS

Para los resultados de la estadística de los análisis de ROS y FRAP hemos utilizado unas claves que identifican a cada tratamiento y experimento, para representarlas en cada figura de los resultados, y que se irán repitiendo a lo largo de este apartado. Dichas claves quedan recogidas en la siguiente tabla:

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	CLAVE
1	100% Harina de pescado + Cápsulas	100HP
	100% Harina de insecto + Cápsulas	100HI
	(100% Harina de insecto + Borraja) + Cápsulas	HI + Borraja
2	50% Harina de Pescado 50% Harina de soja	50HP-50S
	50% Harina de Pescado 50% Harina de insecto	50HP-50HI
	50% Harina de soja 25% Harina de Pescado 25% Harina de insecto	25HI-25HP-50S

Tabla 4.1. Claves del análisis correspondientes a cada tratamiento.

En los marcadores oxidativos se han analizado tanto los piensos como las muestras de pescado (sólo intestino y músculo). Las muestras se han analizado comparando el mismo órgano para los tres tratamientos de cada experimento y posteriormente para el mismo tratamiento se han comparado los dos órganos analizados.

4.1. MARCADORES OXIDATIVOS. ANÁLISIS DE LAS DIETAS.

4.1.1. Método ROS.

En este apartado se muestran los resultados del análisis ROS realizados a cada una de las dietas correspondientes a cada tratamiento en unidades ROS (mg/l). Como podemos ver en la figura 4.1.1. que corresponde al análisis de los piensos del primer experimento y en los resultados expuestos en la tabla 4.1.1., el pienso de HI+Borraja es el de mayor valor en unidades ROS, posteriormente el pienso 100HI y por último el pienso 100HP.

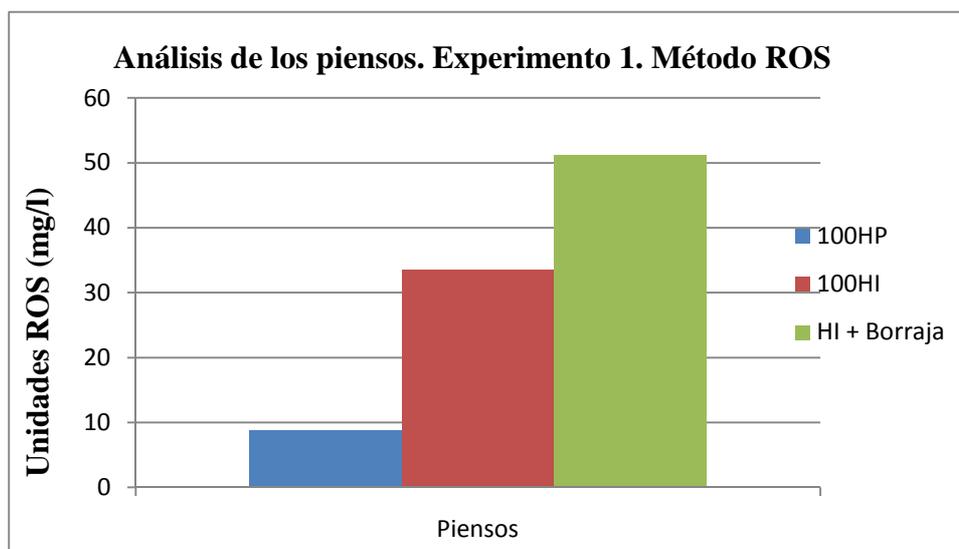


Figura 4.1.1. Análisis ROS de las tres dietas del experimento 1.

Como podemos ver en la figura 4.1.2. correspondiente al análisis de los piensos del segundo experimento y en los resultados expuestos en la tabla 4.1.1, el pienso 25HI-25HP-50S es el de mayor valor en unidades ROS, seguido del pienso 50HI-50HP y por último el pienso 50HP-50S.

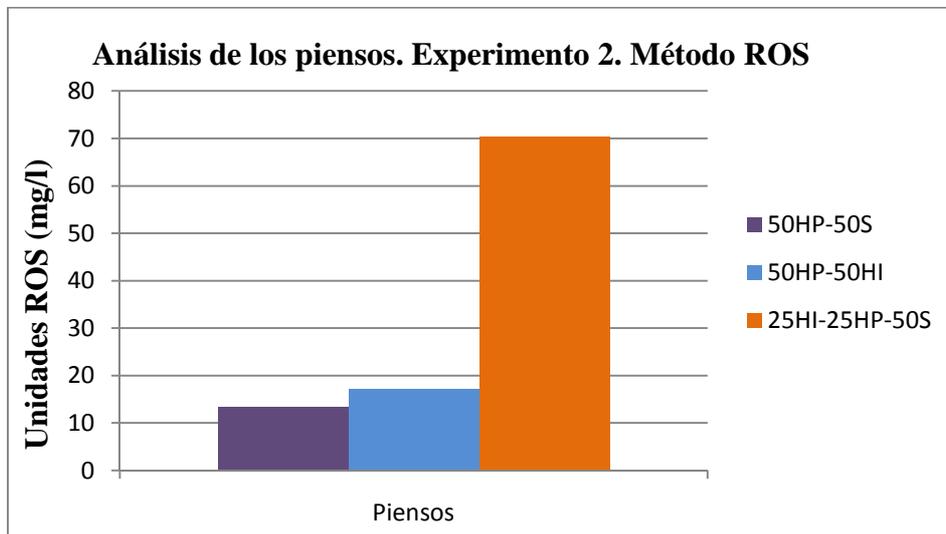


Figura 4.1.2. Análisis ROS de las tres dietas del experimento 2.

La siguiente figura muestra los resultados de los piensos de los dos experimentos en conjunto. Podemos ver que los resultados del pienso 25HI-25H-50S son mucho mayores en comparación con los demás piensos, aunque no tan grande comparándolos con el pienso HI+Boraja. El pienso con menos unidades ROS es el pienso 100HP, con poca diferencia con el pienso 50HP-50S y 50HP-50HI.

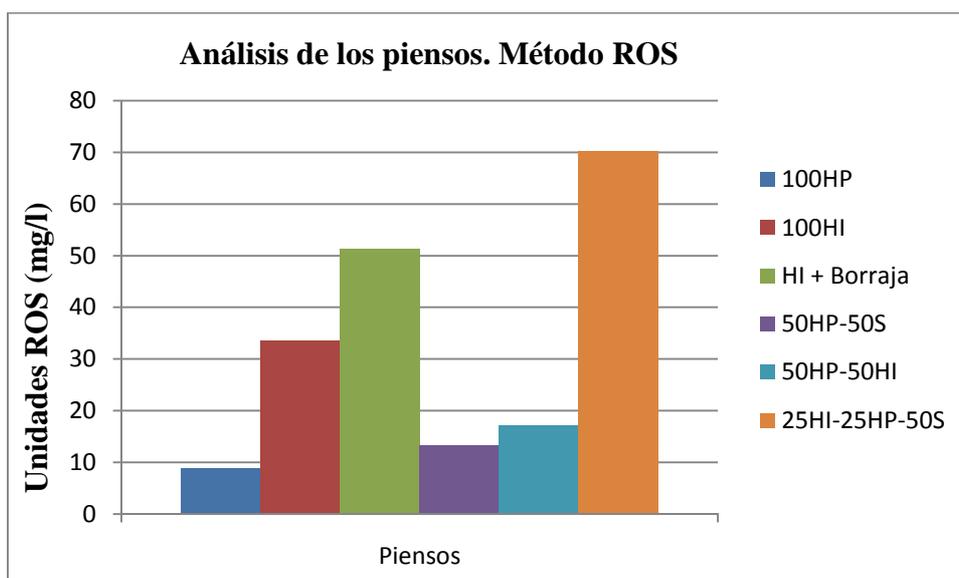


Figura 4.1.3. Análisis ROS de las dietas del experimento 1 y 2.

	Tratamiento	Unidades ROS (mg/l)
Experimento 1	100HP	8,861
	100HI	33,544
	HI + Borraja	51,265
Experimento 2	50HP-50S	13,291
	50HP-50HI	17,088
	25HI-25HP-50S	70,253

Tabla 4.1.1. Análisis ROS de las dietas del experimento 1 y 2.

4.1.2. Método FRAP

En este apartado se muestran los resultados del análisis FRAP realizados a cada una de las dietas correspondientes a cada tratamiento en unidades FRAP ($\mu\text{mol/l}$). Como podemos ver en la figura 4.1.1. correspondiente al análisis de los piensos del primer experimento y en los resultados expuestos en la tabla 4.1.2., el pienso de HI+Borraja es el de mayor valor en unidades FRAP, posteriormente el pienso 100HI y por último el pienso 100HP.

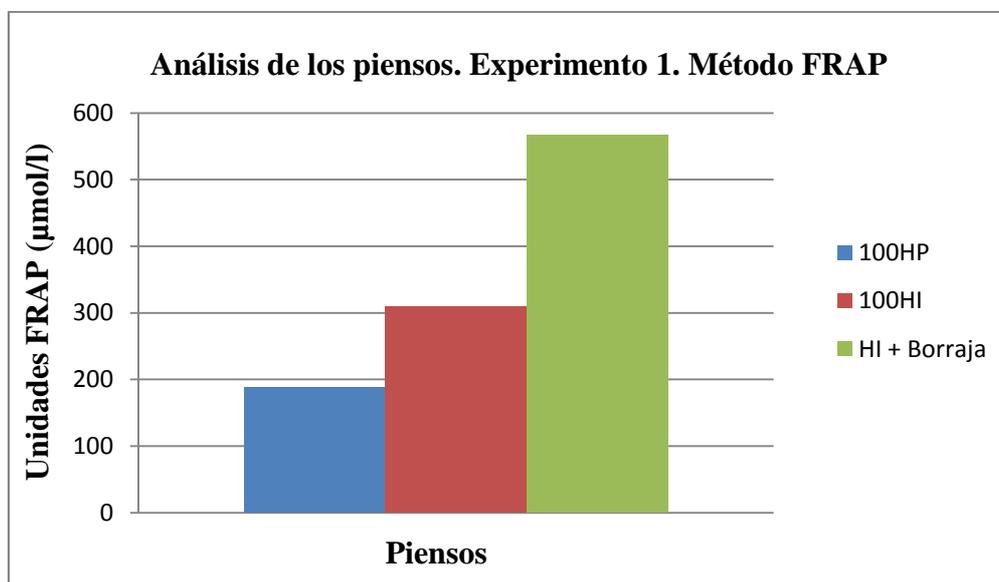


Figura 4.1.4. Análisis FRAP de las tres dietas del experimento 1.

Como podemos ver en la figura 4.1.5. correspondiente al análisis de los piensos del segundo experimento y en los resultados expuestos en la tabla 4.1.1, el pienso 50HP-50HI es el de mayor valor en unidades FRAP, posteriormente el pienso 25HI-25HP-50S y por último el pienso 50HP-50S.

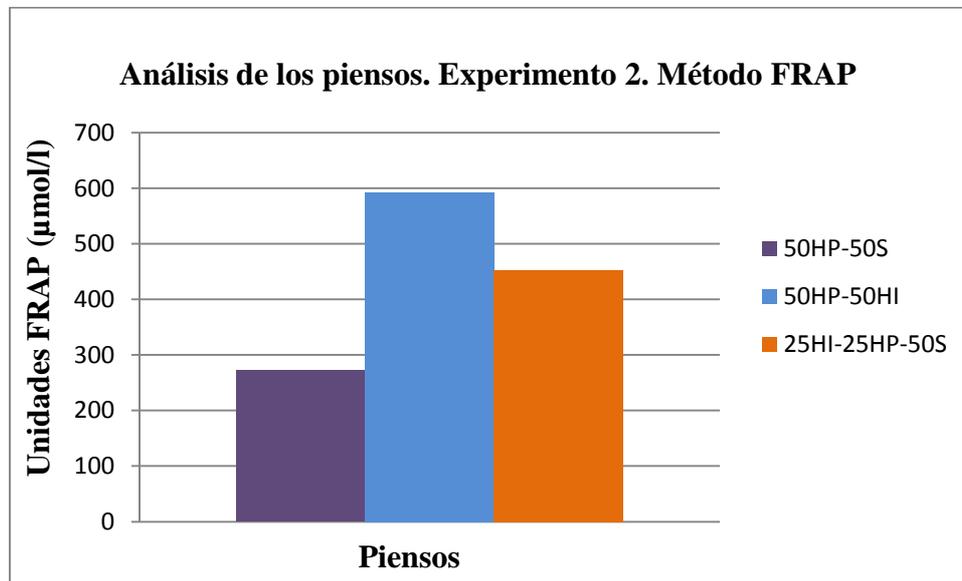


Figura 4.1.5. Análisis FRAP de las tres dietas del experimento 2.

La siguiente figura muestra los resultados de los piensos de los dos experimentos en conjunto. Podemos ver que los resultados de los piensos 50HP-50HI, HI+Borraja y 25HI-25H-50S son mayores en comparación con los demás piensos. El pienso con menos unidades FRAP es el pienso 100HP, con poca diferencia con el pienso 50HP-50S y 100HI.

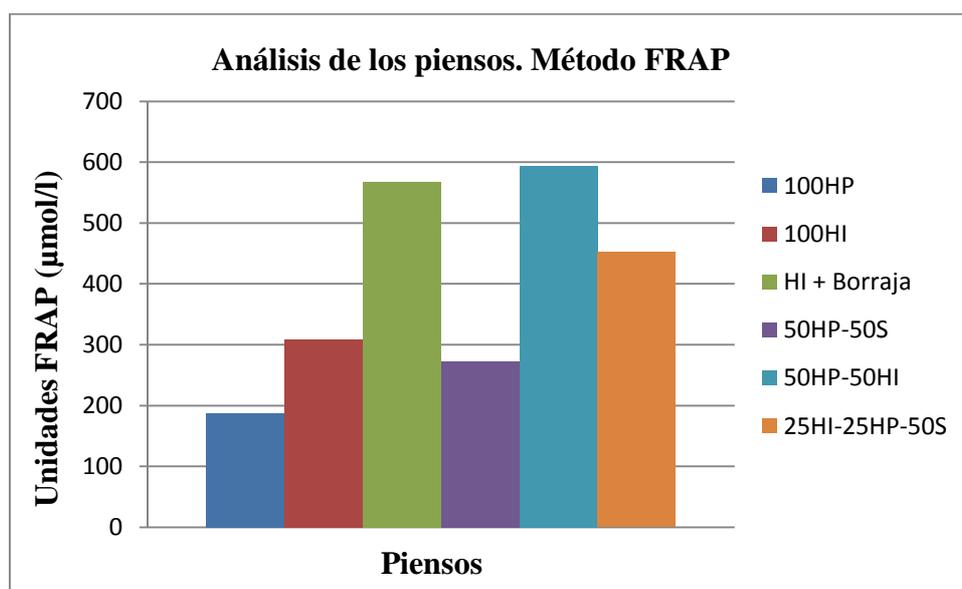


Figura 4.1.6. Análisis FRAP de las dietas del experimento 1y 2.

	Tratamiento	Unidades FRAP (μmol/l)
Experimento 1	100HP	187,894
	100HI	308,947
	HI + Borraja	566,842
Experimento 2	50HP-50S	272,105
	50HP-50HI	593,157
	25HI-25HP-50S	452,368

Tabla 4.1.2. Análisis FRAP de las dietas del experimento 1 y 2.

4.2. MARCADORES OXIDATIVOS. DIFERENCIAS ENTRE TRATAMIENTOS.

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de realizar los análisis de los marcadores oxidativos en los distintos tratamientos de cada experimento, comparando los resultados del mismo órgano (músculo o intestino) entre los tres tratamientos de cada experimento.

4.2.1. Método ROS. Experimento de cápsulas.

Los resultados ROS obtenidos en el músculo y en el intestino se reflejan en las figuras 4.2.1. y 4.2.2 respectivamente, y quedan representados en la tabla 4.2.1.

Los datos están expresados como la media \pm desviación estándar de $n = 5$ datos.

Como podemos ver en la figura 4.2.1. y en los datos reflejados en la tabla 4.2.1. los resultados son estadísticamente significativos, teniendo un mayor valor de unidades ROS el tratamiento 100HP que los otros dos tratamientos (100HI y HI+Borraja), con un $p < 0,05$ ($p = 0,0079$). Entre los tratamientos 100HI y HI+Borraja no se encuentran diferencias significativas.

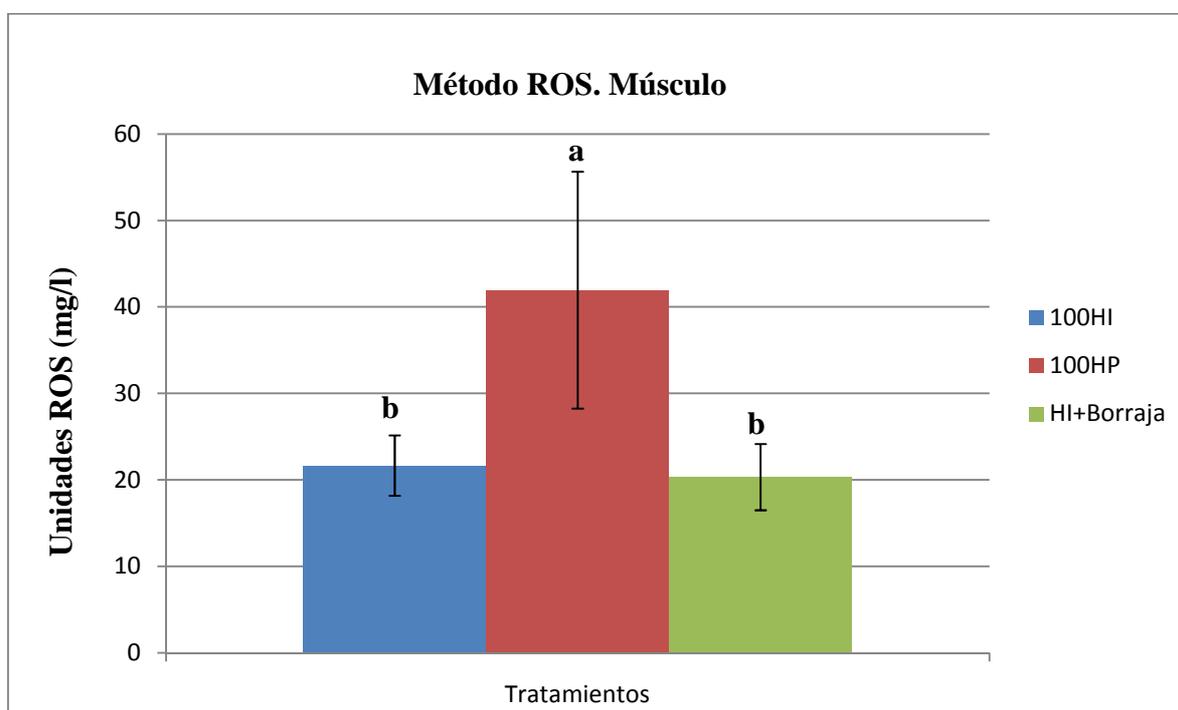


Figura 4.2.1. Unidades ROS en el músculo en los 3 tratamientos del experimento de cápsulas.

Como podemos ver en la figura 4.2.2. y en los datos reflejados en la tabla 4.2.1. los resultados no son estadísticamente significativos. Tienen mayor valor en unidades ROS el lote HI+Borraja, le sigue el tratamiento 100HP y por último el tratamiento 100HI.

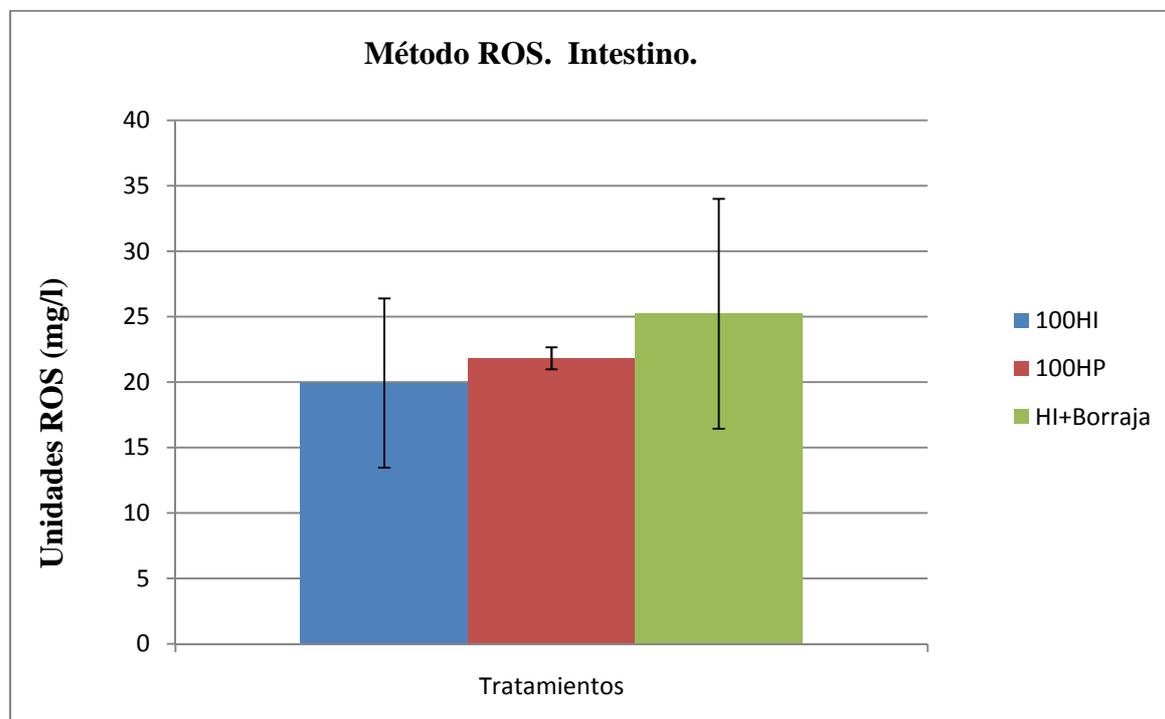


Figura 4.2.2. Unidades ROS en el intestino en los 3 tratamientos del experimento de cápsulas.

Tratamiento	Unidades ROS \pm Desviación estándar	
	Músculo	Intestino
100HI	21,6772b \pm 3,4906	19,9367 \pm 6,46221
100HP	41,962a \pm 13,6931	21,8354 \pm 0,83726
HI+Borraja	20,3323b \pm 3,827	25,2373 \pm 8,77891
P	0,0079	0,5933

Tabla 4.2.1. Unidades ROS, desviación estándar y valor de la p de los tres tratamientos en músculo e intestino.

4.2.2. Método ROS. Experimento de sustitución.

Los resultados ROS obtenidos en el músculo y en el intestino se reflejan en las figuras 4.2.3. y 4.2.4 respectivamente, y quedan representados en la tabla 4.2.2.

Los datos están expresados como la media \pm desviación estándar de $n = 5$ datos.

Como podemos ver en la figura 4.2.3. y en los datos reflejados en la tabla 4.2.2. los resultados son estadísticamente significativos, siendo mayor el tratamiento 50HP-50S que los otros dos tratamientos, con un $p < 0,05$ ($p = 0,0324$). Entre los tratamientos 50HP-50HI y 25HI-25HP-50S no hay diferencias significativas, aunque el primer lote nombrado tiene un valor menor que el segundo.

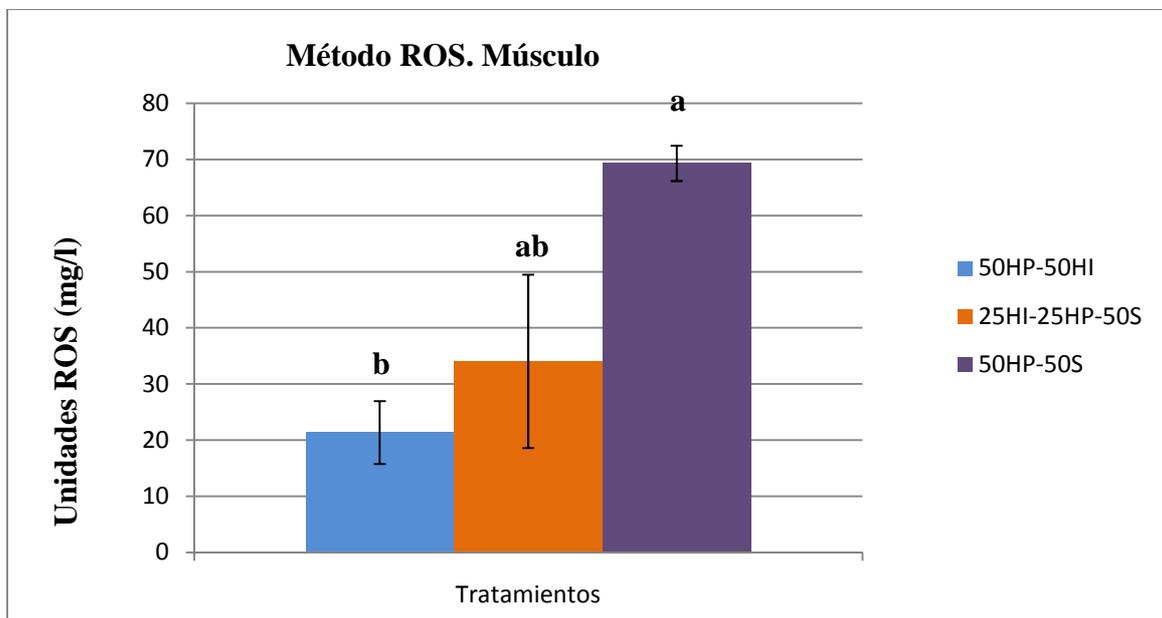


Figura 4.2.3. Unidades ROS en el músculo en los 3 tratamientos del experimento de sustitución.

Como podemos ver en la figura 4.2.4. y en los datos reflejados en la tabla 4.2.2. los resultados no son estadísticamente significativos. Tiene un mayor valor en unidades ROS el tratamiento 50HP-50, le sigue el tratamiento 25HI-25HP-50S y por último el tratamiento 50HP-50HI, sin que entre ellos se muestren diferencias significativas.

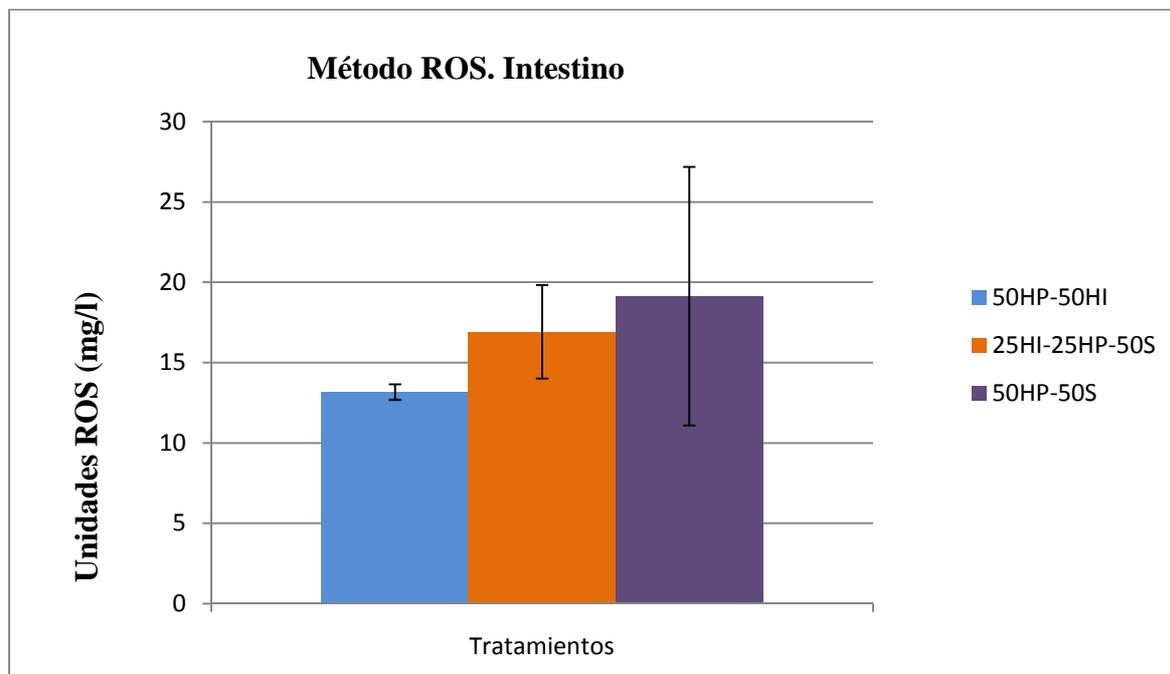


Figura 4.2.4. Unidades ROS en el intestino en los 3 tratamientos del experimento de sustitución.

Tratamiento	Unidades ROS ± Desviación estándar	
	Músculo	Intestino
50HP-50HI	21,3608b ± 5,5942	13,1857 ± 0,48339
25HI-25HP-50S	34,019ab ± 15,44	16,9304 ± 2,90898
50HP-50S	69,3038a ± 3,1328	19,1456 ± 8,04787
P	0,0324	0,4381

Tabla 4.2.2. Unidades ROS, desviación estándar y valor de la p de los tres tratamientos en músculo e intestino.

4.2.3. Método FRAP. Experimento de cápsulas.

Los resultados FRAP obtenidos en el músculo y en el intestino se reflejan en las figuras 4.2.5. y 4.2.6. respectivamente, y quedan representados en la tabla 4.2.3.

Los datos están expresados como la media \pm desviación estándar de $n = 5$ datos.

Como podemos ver en la figura 4.2.5. y en los datos reflejados en la tabla 4.2.3. los resultados son estadísticamente significativos entre el tratamiento 100HI, con un valor menor, y el tratamiento HI + Borraja, con un $p < 0,05$ ($p = 0,0099$). No se presentan diferencias significativas entre el tratamiento 100HP y los demás tratamientos, aunque este primero tiene un mayor valor en unidades FRAP.

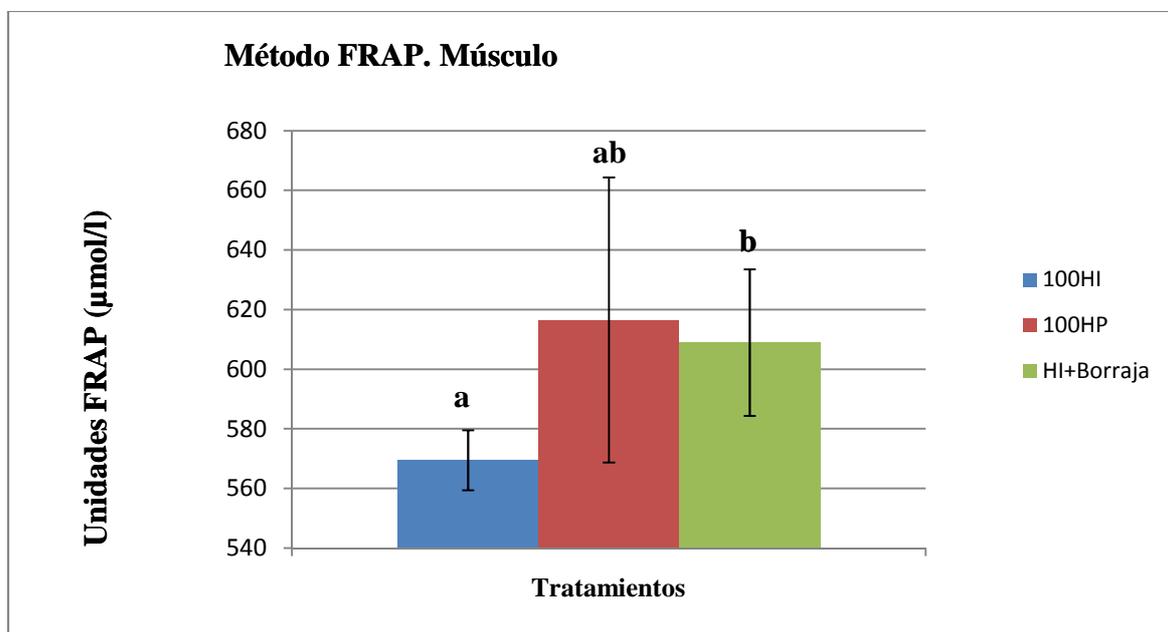


Figura 4.2.5. Unidades FRAP en el músculo en los 3 tratamientos del experimento de cápsulas.

Como podemos ver en la figura 4.2.6. y en los datos reflejados en la tabla 4.2.3. los resultados son estadísticamente significativos entre el tratamiento 100HI, con un valor mayor, y el tratamiento HI + Borraja , con un $p < 0,05$ ($p = 0,0017$). No se presentan diferencias significativas entre el tratamiento 100HP y el tratamiento 100HI.

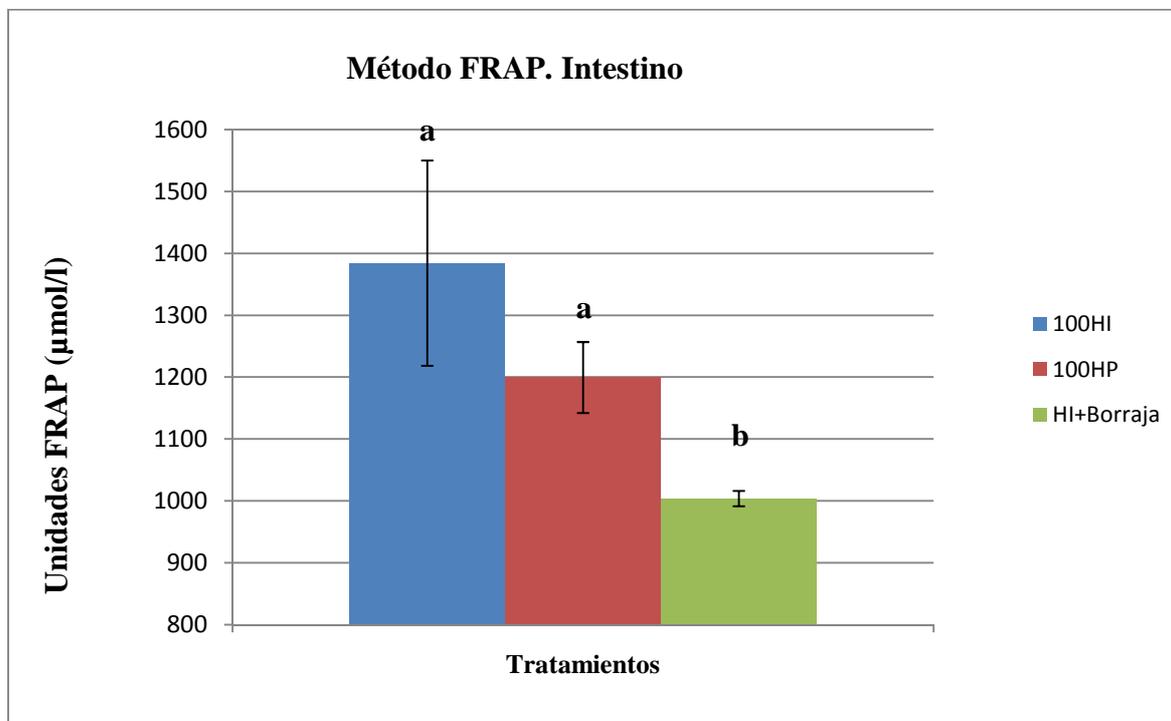


Figura 4.2.6. Unidades FRAP en el intestino en los 3 tratamientos del experimento de cápsulas.

Tratamiento	Unidades FRAP ± Desviación estándar	
	Músculo	Intestino
100HI	569,474a ± 10,0639	1384,61a ± 166,038
100HP	616,513ab ± 47,8216	1199,74a ± 57,434
HI+Borraja	608,947b ± 24,581	1004,01b ± 12,407
P	0,0099	0,0017

Tabla 4.2.3. Unidades FRAP, desviación estándar y valor de la p de los tres tratamientos en músculo e intestino.

4.2.4. Método FRAP. Experimento de sustitución.

Los resultados FRAP obtenidos en el músculo y en el intestino se reflejan en las figuras 4.2.7. y 4.2.8. respectivamente, y quedan representados en la tabla 4.2.4.

Los datos están expresados como la media \pm desviación estándar de $n = 5$ datos.

Como podemos ver en la figura 4.2.7. y en los datos reflejados en la tabla 4.2.4. los resultados no son estadísticamente significativos. Tiene un mayor valor de unidades FRAP el pienso 25HI-25HP-50S, y los piensos 50HP-50HI y 50HP-50S son menores y similares, sin que entre ellos existan diferencias significativas.

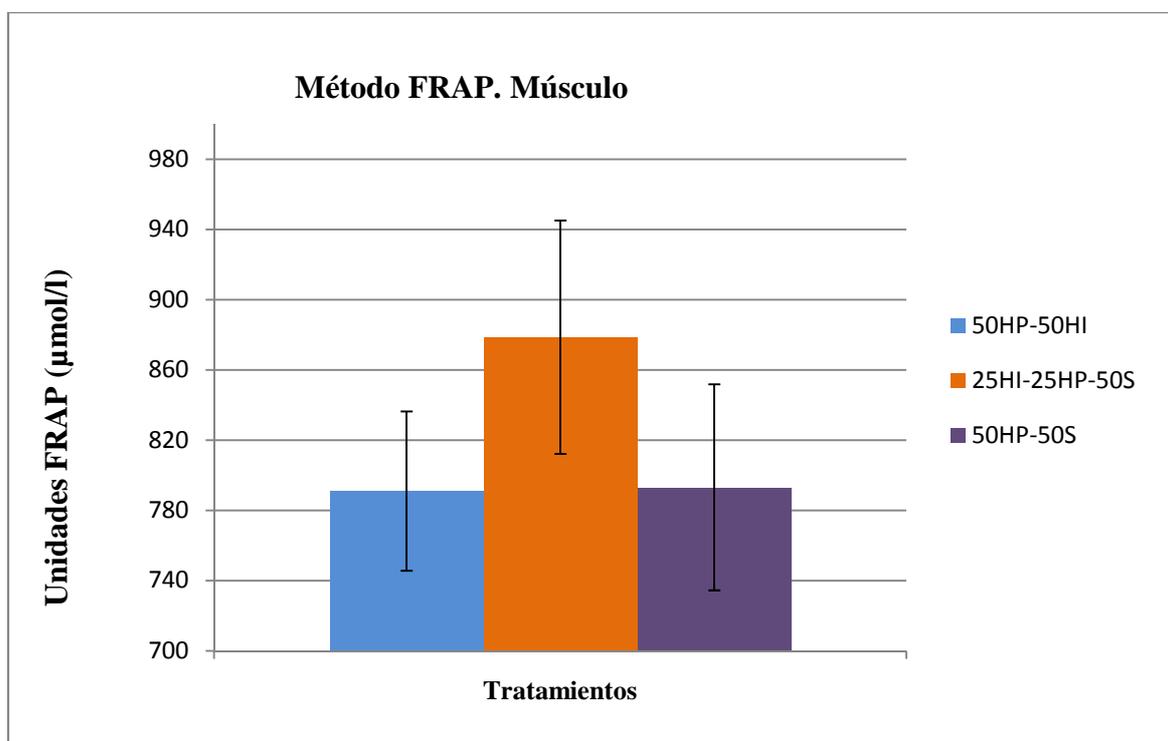


Figura 4.2.7. Unidades FRAP en el músculo en los 3 tratamientos del experimento de sustitución.

Como podemos ver en la figura 4.2.8 y en los datos reflejados en la tabla 4.2.4. los resultados son estadísticamente significativos entre el tratamiento 50 HP-50 HI, con un valor menor, y el tratamiento 50 HP-50S , con un $p < 0,05$ ($p = 0,0069$).

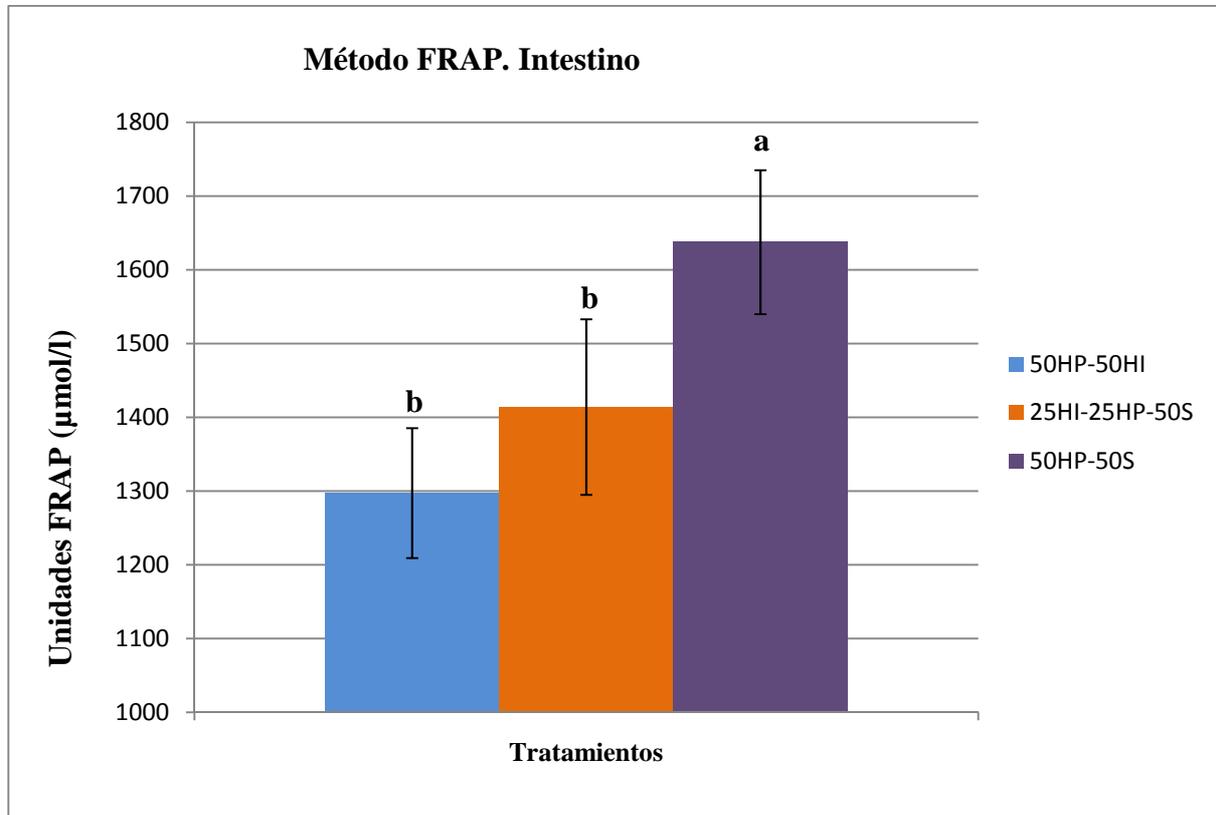


Figura 4.2.8. Unidades FRAP en el intestino en los 3 tratamientos del experimento de sustitución.

Tratamiento	Unidades FRAP ± Desviación estándar	
	Músculo	Intestino
50HP-50HI	790,965 ± 45,3569	1297,54b ± 88,132
25HI-25HP-50S	878,684 ± 66,4571	1414,21b ± 119,097
50HP-50S	793,158 ± 58,6671	1637,89a ± 97,67
P	0,098	0,0069

Tabla 4.2.4. Unidades FRAP, desviación estándar y valor de la p de los tres tratamientos en músculo e intestino.

4.3. MARCADORES OXIDATIVOS. DIFERENCIAS ENTRE ÓRGANOS.

En este apartado se muestran los resultados obtenidos al realizar los análisis de los marcadores oxidativos, comparando para cada tratamiento en particular la diferencia existente en unidades ROS o FRAP entre los dos órganos analizados (músculo e intestino).

4.3.1. Comparación entre órganos. Experimento 1. Método ROS

Los resultados del análisis ROS obtenidos para cada tratamiento del experimento 1 que expresan la diferencia entre el músculo y el intestino se reflejan en las figuras 4.3.1., 4.3.2 y 4.3.3., y en la tabla 4.3.1.

Los datos están expresados como la media \pm desviación estándar de $n = 5$ datos.

Como podemos ver en la figura 4.3.1. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.1. no hay diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 100HI del experimento 1, siendo ambos resultados similares.

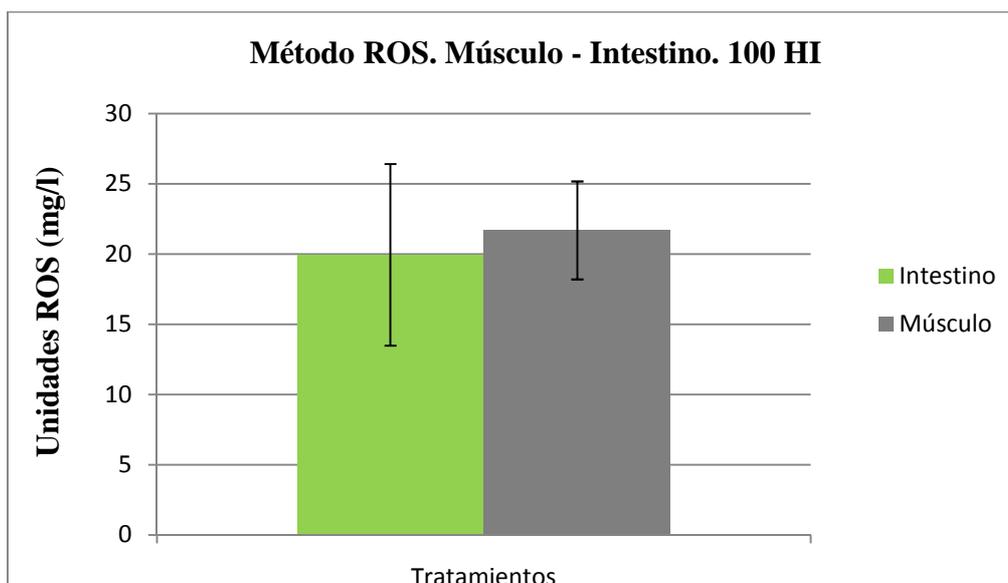


Figura 4.3.1. Diferencia en unidades ROS entre el intestino y el músculo en el tratamiento 100HI.

Como podemos ver en la figura 4.3.2. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.1. hay diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 100HP del experimento 1, teniendo un valor mayor el músculo que el intestino.

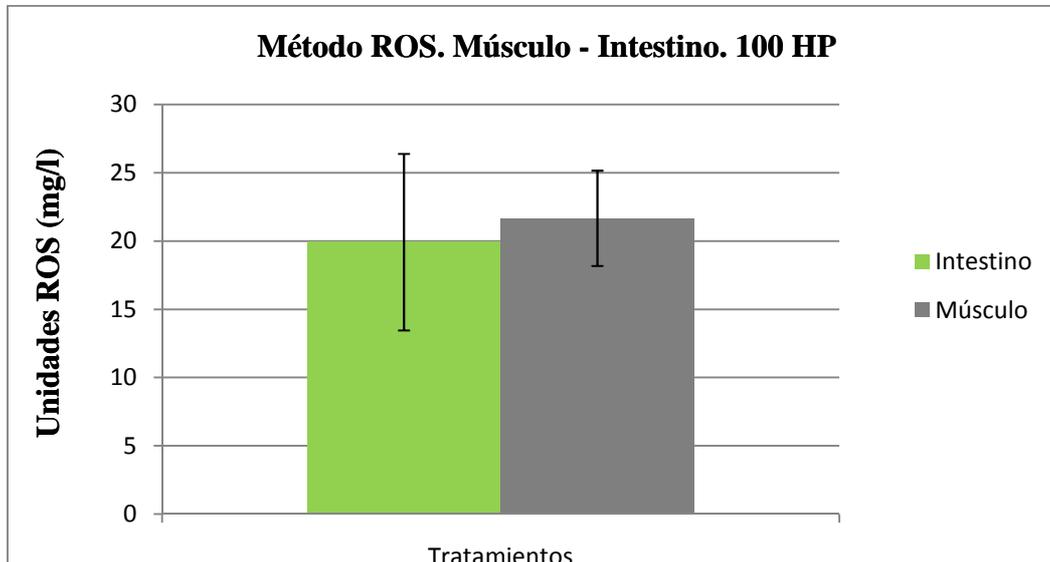


Figura 4.3.2. Diferencia en unidades ROS entre el intestino y el músculo en el tratamiento 100HP.

Podemos ver en la figura 4.3.3. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.1. que no hay diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento HI+Borraja del experimento 1.

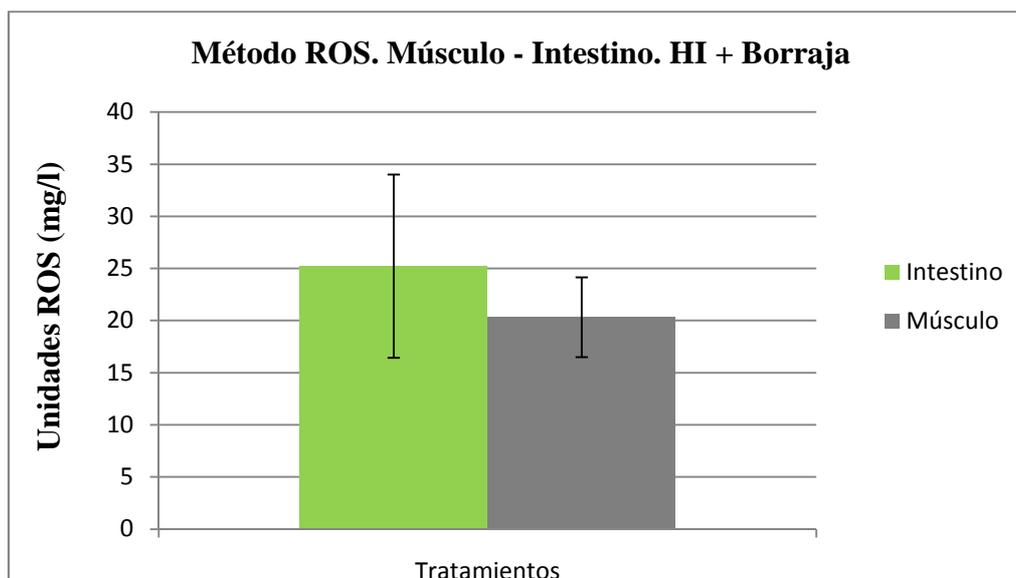


Figura 4.3.3. Diferencia en unidades ROS entre el intestino y el músculo en el tratamiento HI + Borraja.

Experimento de cápsulas. Método ROS (mg/l)				
Tratamiento		100HI	100HP	HI + Borraja
Tejido	Intestino	19,9367 ± 6,4622	21,8354 ± 0,8372	25,2373 ± 8,7789
	Músculo	21,6772 ± 3,4906	41,962 ± 13,6931	20,3323 ± 3,827

Tabla 4.3.1. Diferencias en unidades ROS entre el intestino y el músculo en los tres tratamientos del experimento 1.

4.3.2. Comparación entre órganos. Experimento 2. Método ROS

Los resultados del análisis ROS obtenidos para cada tratamiento del experimento 2 que expresan la diferencia entre el músculo y el intestino se reflejan en las figuras 4.3.4., 4.3.5 y 4.3.6., y en la tabla 4.3.2.

Los datos están expresados como la media ± desviación estándar de n = 5 datos.

Como podemos ver en la figura 4.3.4. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.2. sí encontramos diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 50HP-50HI del experimento 2, siendo mayor en el valor del músculo.

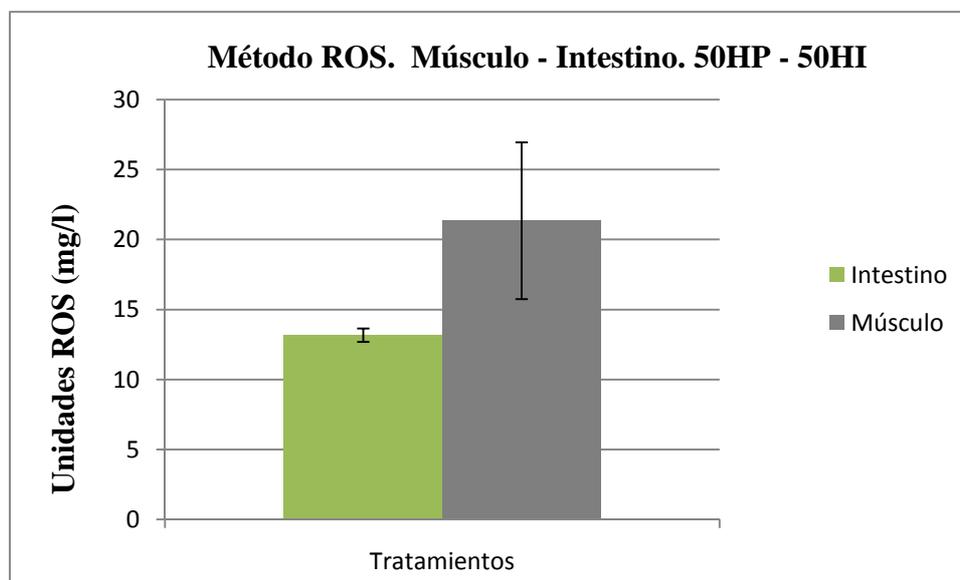


Figura 4.3.4. Diferencia en unidades ROS entre el intestino y el músculo en el tratamiento 50HP-50HI.

Como se observa en la figura 4.3.5. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.2. no encontramos diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 25HI-25HP-50S del experimento 2, siendo mayor en el valor del músculo, aunque sin mostrar diferencias significativas.

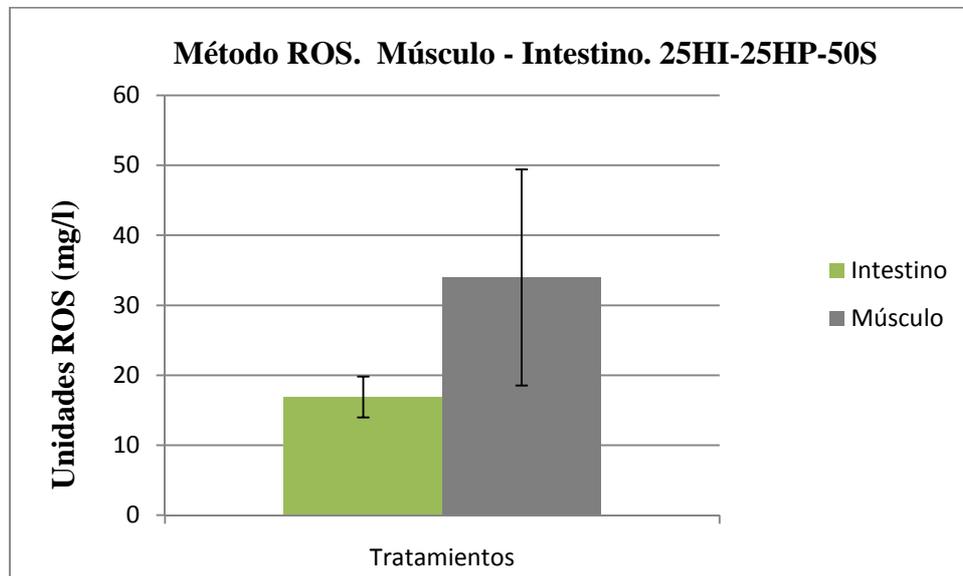


Figura 4.3.5. Diferencia en unidades ROS entre el intestino y el músculo en el tratamiento 25HI-25HP-50S

Como podemos ver en la figura 4.3.6. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.2. sí encontramos diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 50HP-50S del experimento 2, siendo mayor en el valor del músculo.

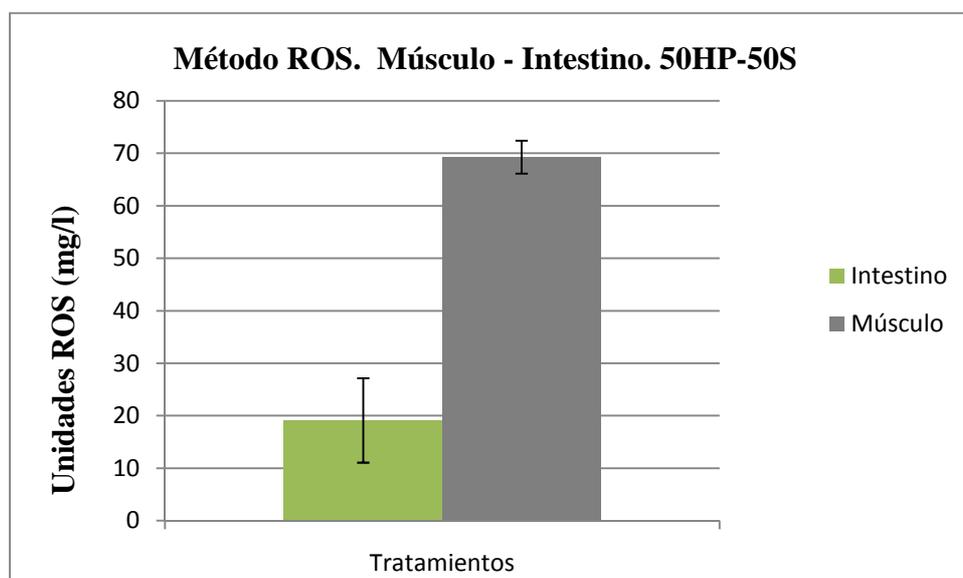


Figura 4.3.6. Diferencia en unidades ROS entre el intestino y el músculo en el tratamiento 50HP-50S.

Experimento de sustitución. Método ROS (mg/l)				
Tratamiento	50HP-50HI	25HI-25HP-50S	50HP-50S	
Tejido	Intestino	13,1857 ± 0,4833	16,9304 ± 2,9089	19,1456 ± 8,0478
	Músculo	21,3608 ± 5,5942	34,019 ± 15,44	69,3038 ± 3,1328

Tabla 4.3.2. Diferencias en unidades ROS entre el intestino y el músculo en los tres tratamientos del experimento 2.

4.3.3. Comparación entre órganos. Experimento 1. Método FRAP

Los resultados del análisis FRAP obtenidos para cada tratamiento del experimento 1 que expresan la diferencia entre el músculo y el intestino se reflejan en las figuras 4.3.7., 4.3.8 y 4.3.9., y en la tabla 4.3.3.

Los datos están expresados como la media ± desviación estándar de n = 5 datos.

Como podemos ver en la figura 4.3.7. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.3. sí encontramos diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 100HI del experimento 1, siendo mayor en el valor del intestino.

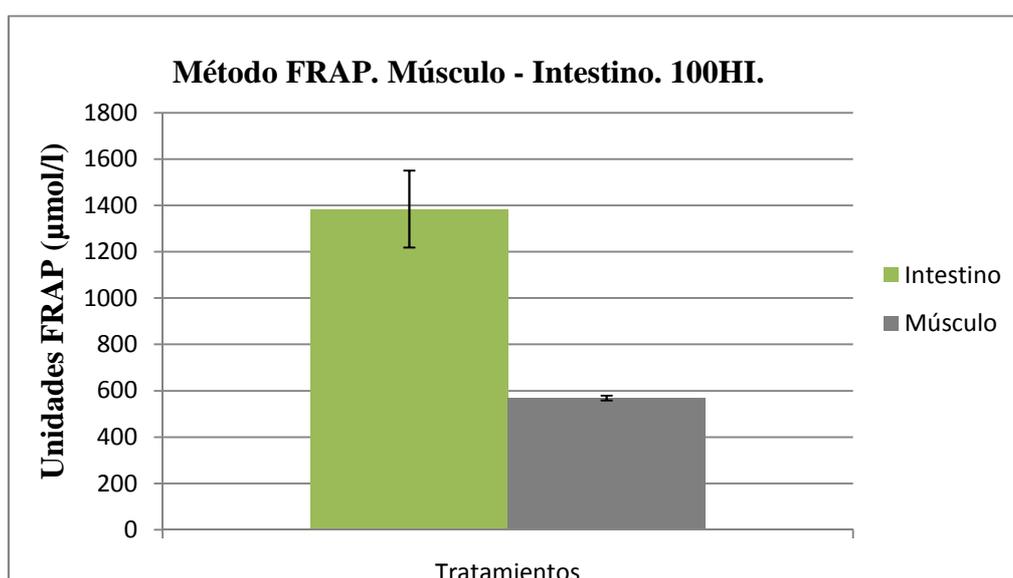


Figura 4.3.7. Diferencia en unidades FRAP entre el intestino y el músculo en el tratamiento 100HI.

Podemos ver en la figura 4.3.8. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.3. que sí encontramos diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 100HP del experimento 1, siendo mayor en el valor del intestino.

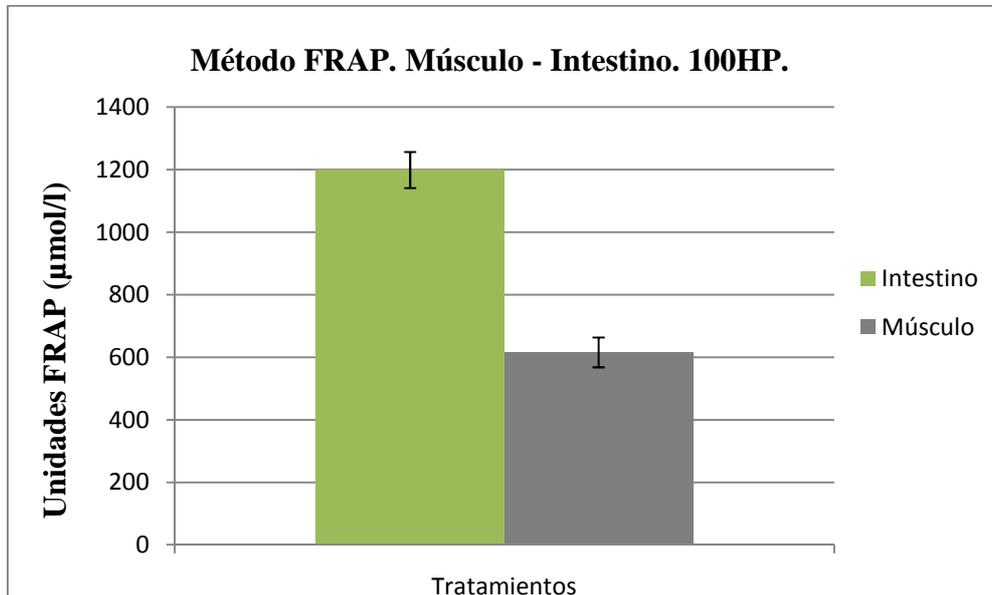


Figura 4.3.8. Diferencia en unidades FRAP entre el intestino y el músculo en el tratamiento 100HP.

Podemos ver en la figura 4.3.9. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.3. que sí encontramos diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento HI+Borraja del experimento 1, siendo mayor en el valor del intestino.

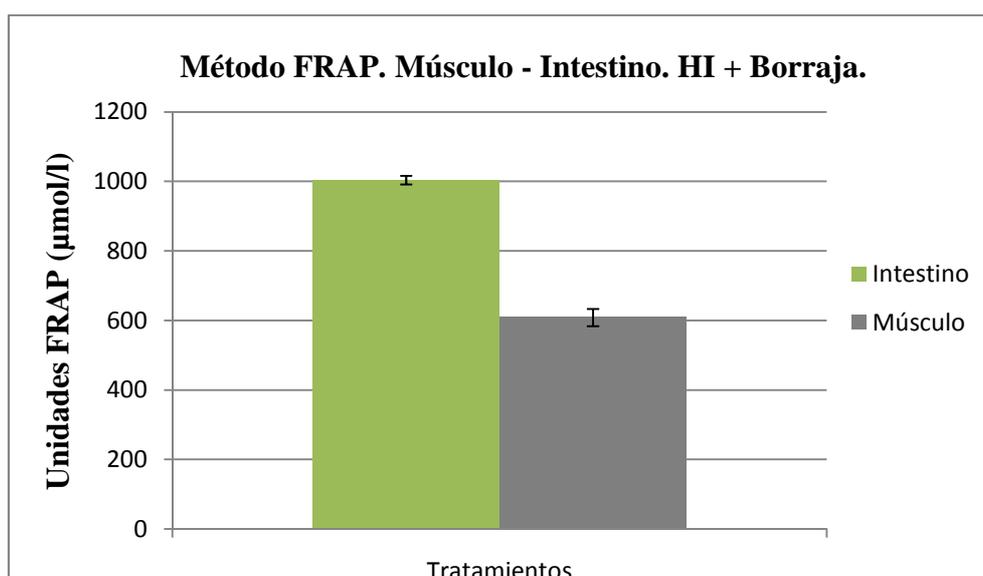


Figura 4.3.9. Diferencia en unidades FRAP entre el intestino y el músculo en el tratamiento HI+Borraja.

Experimento de cápsulas. Método FRAP ($\mu\text{mol/l}$)				
Tratamiento	100HI	100HP	HI + Borraja	
Tejido	Intestino	1384,61 \pm 166,038	1199,74 \pm 57,434	1004,01 \pm 12,407
	Músculo	569,474 \pm 10,0639	616,513 \pm 47,8216	608,947 \pm 24,581

Tabla 4.3.3. Diferencias en unidades FRAP entre el intestino y el músculo en los tres tratamientos del experimento 1.

4.3.4. Comparación entre órganos. Experimento 2. Método FRAP

Los resultados del análisis FRAP obtenidos para cada tratamiento del experimento 2 que expresan la diferencia entre el músculo y el intestino se reflejan en las figuras 4.3.10., 4.3.11 y 4.3.12., y en la tabla 4.3.4.

Los datos están expresados como la media \pm desviación estándar de $n = 5$ datos.

Como podemos ver en la figura 4.3.10. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.4. sí encontramos diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 50HP-50S del experimento 2, siendo mayor en el valor del intestino.

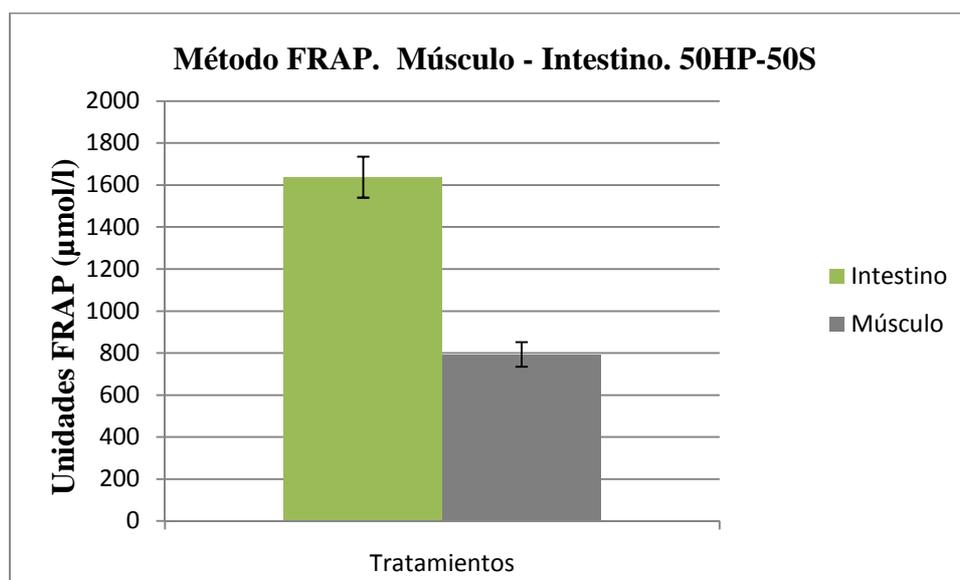


Figura 4.3.10. Diferencia en unidades FRAP entre el intestino y el músculo en el tratamiento 50HP-50S.

Podemos ver en la figura 4.3.11. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.4. que sí encontramos diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 25HP-25HI-50S del experimento 2, siendo mayor en el valor del intestino.

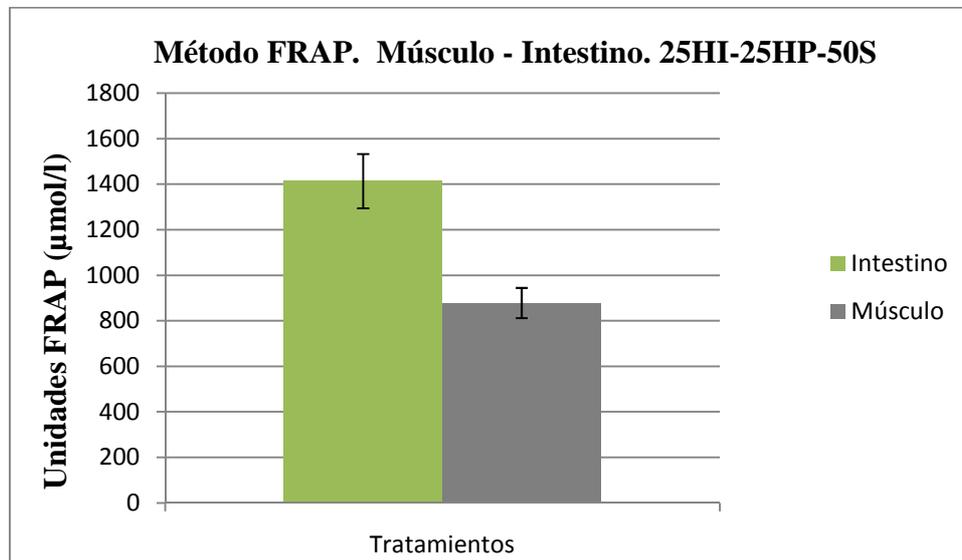


Figura 4.3.11. Diferencia en unidades FRAP entre el intestino y el músculo en el tratamiento 25HI-25HP-50S.

Como observamos en la figura 4.3.12. y en los resultados expresados en la tabla 4.3.4. sí encontramos diferencias significativas entre el análisis realizado en el músculo y en el intestino en el tratamiento 50HP-50HI del experimento 2, siendo mayor en el valor del intestino.

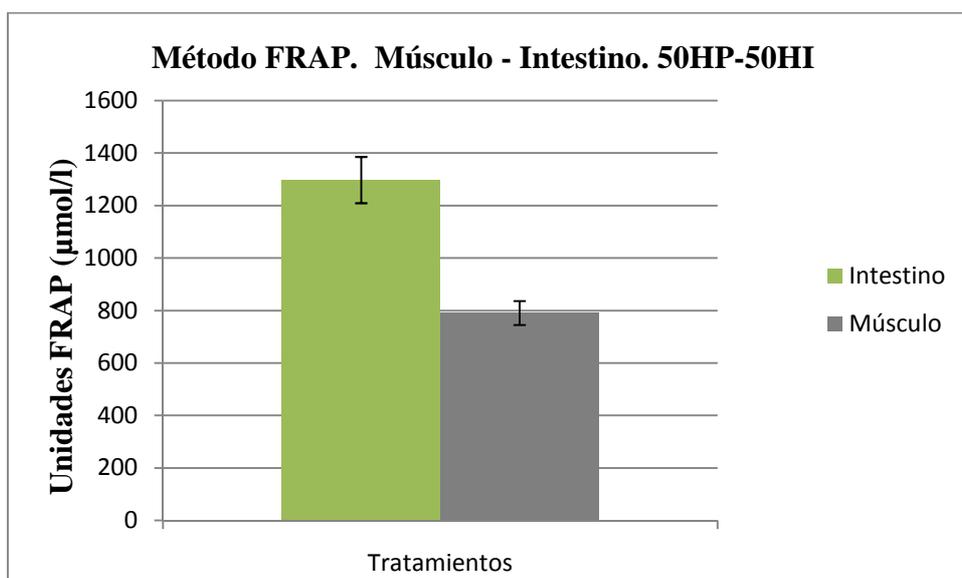


Figura 4.3.12. Diferencia en unidades FRAP entre el intestino y el músculo en el tratamiento 50HP-50HI.

Experimento de sustitución. Método FRAP ($\mu\text{mol/l}$)				
Tratamiento		50HP-50HI	25HI-25HP-50S	50HP-50S
Tejido	Intestino	1297,54 \pm 88,132	1414,21 \pm 119,097	1637,89 \pm 97,67
	Músculo	790,965 \pm 45,3569	878,684 \pm 66,4571	793,158 \pm 58,6671

Tabla 4.3.4. Diferencias en unidades FRAP entre el intestino y el músculo en los tres tratamientos del experimento 2.

4.4. CORRELACIÓN ENTRE LOS DATOS DE LOS ANÁLISIS ROS Y FRAP.

La correlación entre los datos de los análisis ROS y FRAP se propone como un indicador de bienestar, que nos permite distinguir entre estrés y bienestar.

Para realizar la correlación entre los datos de los análisis ROS y FRAP es necesario obtener los datos de la misma muestra en los dos análisis. Debido a la pérdida de gran cantidad de muestra durante los ensayos de los análisis, las muestras para los dos análisis no suelen coincidir dentro del mismo tratamiento, por lo que este análisis sólo se ha podido realizar en dos tratamientos del experimento de cápsulas, el tratamiento alimentado con pienso 100% de insecto y el tratamiento alimentado con pienso de insecto y borraja al 50% de cada componente. Los resultados se muestran en la figuras 4.4.1. y 4.4.2. respectivamente.

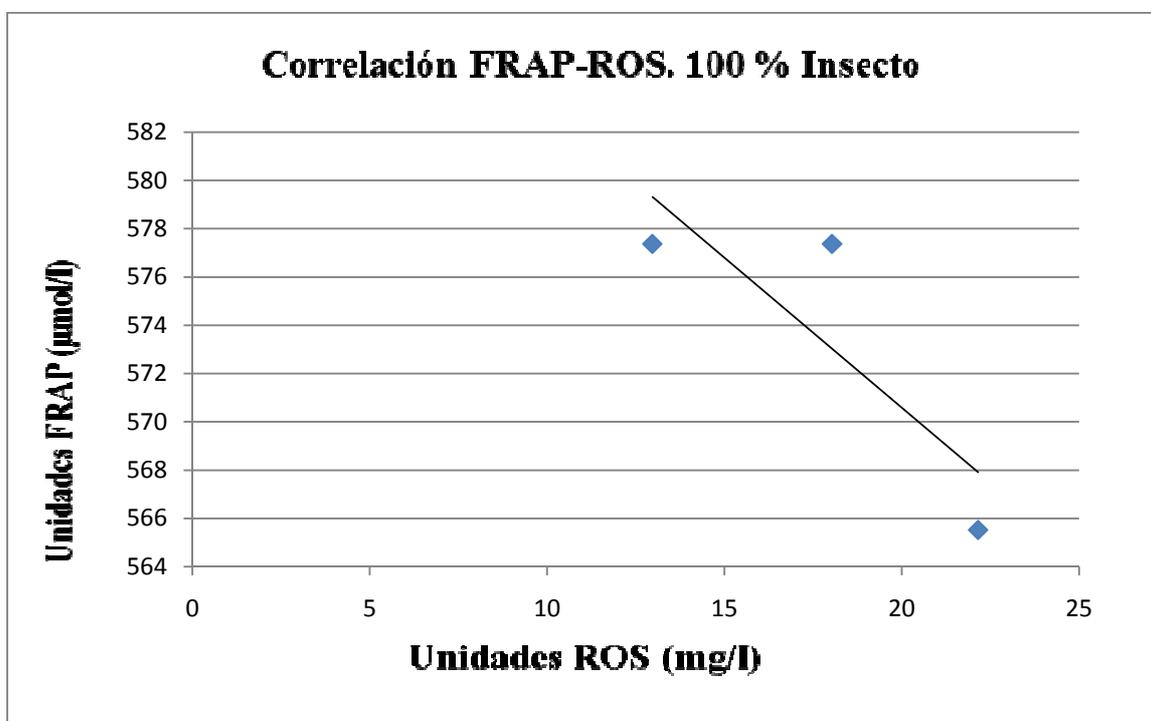


Figura 4.4.1. Correlación entre los análisis FRAP y ROS en el experimento de cápsulas, tratamiento 100% insecto.

Cómo podemos ver en la figura 4.4.1., la respuesta antioxidante es proporcional y de correlación negativa.

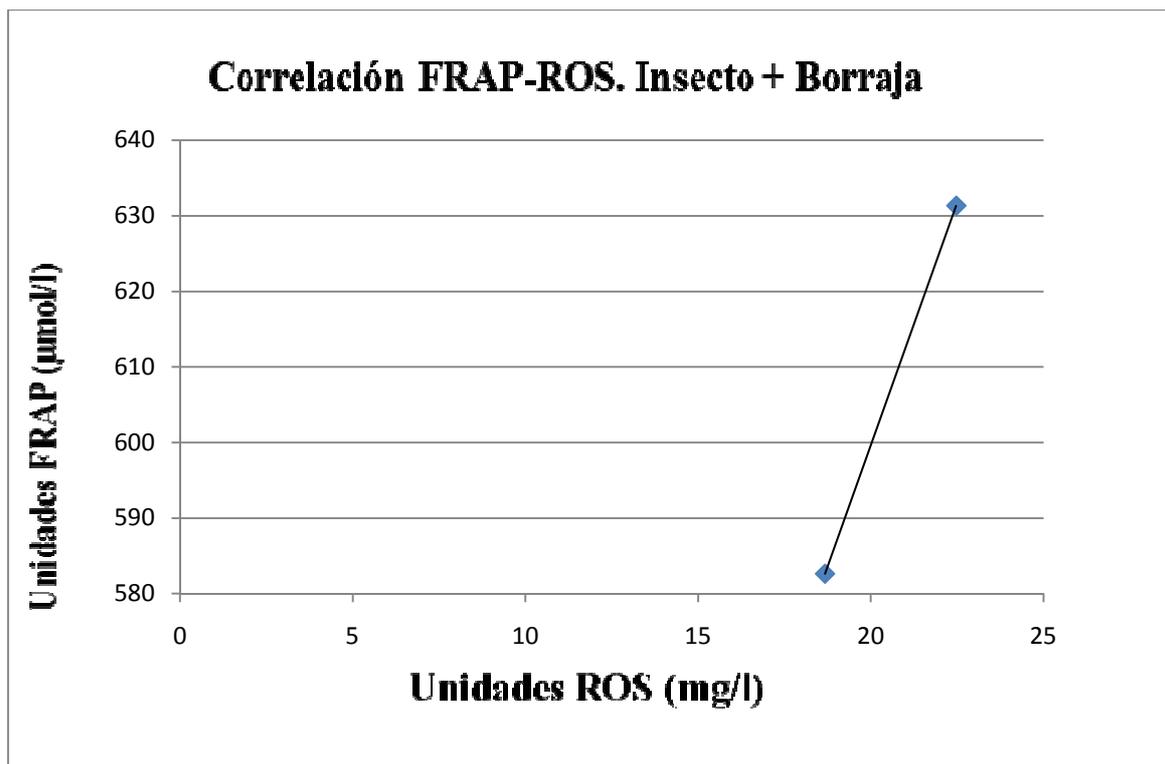


Figura 4.4.2. Correlación entre los análisis FRAP y ROS en el experimento de cápsulas, tratamiento Insecto + Borraja.

Cómo podemos ver en la figura 4.4.2., la respuesta antioxidante es proporcional de correlación positiva.

5. DISCUSIÓN.

5. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo se centra en cuantificar las posibles variaciones del estrés oxidativo en un cultivo de tilapia del Nilo (*Oreochromis nilotica*) causadas por la ingesta de diferentes dietas, buscando en la harina de insectos un sustituto a la harina de pescado.

La sustitución de la harina de pescado por la harina de insectos ha sido poco estudiada, y concretamente para la harina de tenebrio no hemos encontrado ninguna información sobre su uso como alimento para peces, ya que este insecto se usa exclusivamente para la alimentación de reptiles o mascotas exóticas.

Dada la diferencia en la composición de los piensos y la complejidad de su formulación y contenido, se han analizado los piensos, midiendo su composición y el estrés oxidativo, y las muestras de intestino y músculo de tilapia, midiendo el estrés oxidativo, y en el caso del músculo también su composición.

Los resultados de este trabajo indican que los diferentes tipos de piensos inducen cambios en el estrés oxidativo, como se verán ampliados en el siguiente apartado. Estos datos corresponden con los de varios autores que han relacionado el tipo de dieta de los peces con su efecto en el estrés oxidativo (Kiron et al., 2004; Morales et al., 2004; Puangkaew et al., 2005).

5.1. ESTRÉS OXIDATIVO:

Entendemos el estrés oxidativo como una alteración formada por el desequilibrio entre la producción de radicales libres o agentes prooxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante de un organismo. Dicho desequilibrio puede producir un daño en los componentes celulares y tejidos que favorecen la presentación de procesos patológicos. Una condición de estrés oxidativo puede ser causada por un aumento en la producción de factores prooxidantes debido a una exposición a agentes generadores de radicales libres que exceden la capacidad antioxidante del organismo o a una deficiencia en los mecanismos de defensa.

Los radicales libres (RL) cumplen una importante función en varios procesos homeostáticos como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción (redox) esenciales para la vida. De hecho, se estima que entre el 1-3 % del oxígeno consumido en la respiración celular en organismos acuáticos es convertido en especies reactivas (Livingstone, 2003). La destrucción de microorganismos por fagocitosis, la síntesis de mediadores inflamatorios y la detoxificación constituyen algunos ejemplos relevantes de la acción de los RL. Las concentraciones bajas de RL son beneficiosas e incluso indispensables, sin embargo, en cantidades excesivas son tóxicos, ya que al oxidar moléculas biológicas las alteran y desencadenan trastornos en el metabolismo celular (Halliwell 1997; Larkins 1999; Chow 1979).

Los radicales libres son difíciles de medir ya que presentan una vida muy corta y baja concentración (Sun et al. 2006). Las células sanas producen agentes prooxidantes (EROS) que son detoxificados por defensas antioxidantes procedentes de mecanismos que el organismo produce, incluyendo atrapadores (no enzimáticos) de radicales libres y enzimas antioxidantes específicas (Di Giulio et al., 1995). Así se produce un balance entre la producción de prooxidantes y el sistema antioxidante de defensa; sin embargo cuando hay una marcada producción de dichas especies reactivas el sistema de defensa puede resultar insuficiente, lo que lleva a un incremento en el daño a macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando diversos procesos celulares (Van der Oost et al., 2003).

En el primer mecanismo de defensa, la primera enzima implicada es la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (Palace et al., 1996). Este compuesto, altamente tóxico para la célula, debe ser reducido por la catalasa, que los transforma en agua y en oxígeno, o por la glutatión peroxidasa. Estos diferentes mecanismos de defensa, conocidos de forma imperfecta en peces, pueden ser igualmente activos contra los peróxidos y radicales libres exógenos, es decir, alimentarios. Es posible prevenir la peroxidación de los ácidos grasos (AG) en los alimentos y economizar los antioxidantes naturales adjuntando antioxidantes de síntesis autorizados. Por el contrario, estos antioxidantes de síntesis son inactivos in vivo.

El segundo mecanismo de defensa lo constituyen las trampas de radicales libres, que son antioxidantes como la vitamina A y sobre todo los tocoferoles (vitamina E). El ácido ascórbico (vitamina C) suele estar unido a este grupo, de hecho es un secuestrador hidrosoluble del oxígeno mientras que el tocoferol es un donador de protones particularmente activo en medio liposoluble.

El glutatión, el ácido úrico y la bilirrubina son compuestos de bajo peso molecular sintetizados endógenamente; mientras que la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina A (β -caroteno) y los flavonoides no son sintetizados en los peces y consecuentemente su presencia está directamente ligada con la dieta, lo cual supone que individuos herbívoros posean una mayor cantidad de vitamina E y β -caroteno (Marcon and Filho, 1999; Avilez et al., 2008).

Tanto mamíferos como peces exhiben respuestas celulares muy similares ante el estrés oxidativo (Fraga et al., 1996; Dias Bainy et al., 1996; Kelly et al., 1998); no obstante, el grado de variación en los niveles basales de dichas actividades entre especies de peces y entre diferentes tejidos es evidente (Pedrejas et al., 1995). Esto nos podría dar lugar a entender las diferencias entre los órganos que dan nuestros análisis.

Los organismos acuáticos, adicionalmente a la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, pueden experimentar otras fuentes de producción de radicales libres, por ejemplo síntesis de prostaglandinas y reacción de la xantina oxidasa con la hipoxantina o xantina; y durante la fagocitosis en que intermediarios reactivos, principalmente el O_2 ., son liberados con propósitos bactericidas como se ha demostrado en la especie *Heteropneustes fossilis* y en macrófagos de *Oncorhynchus mykiss* (Van der Oost et al., 2003). De las causas externas se ha mencionado la contaminación en cuerpos de agua como la principal contribuyente a la presentación de estrés oxidativo en peces (Ahmad et al., 2000).

La mayoría de los estudios sobre estrés oxidativo se han hecho en mamíferos enfocados a evaluar las alteraciones que producen en este sistema determinados tóxicos, o cómo se altera con procesos de inflamación, anginas o cáncer determinados tóxicos y la eficacia antioxidante de determinados compuestos. Sin embargo, poco estudios se han hecho en peces y casi todos enfocados al efecto que provocan contaminantes tales como pesticidas, herbicidas ect... muestran que la alteración del estrés oxidativo es una respuesta típica de la toxicidad inducida por xenobióticos (Lemaire and Livingstone, 1993; Di Giulio et al., 1995; Sheehan and Power, 1999; Hai et al., 1997; Peña- Llopis et al., 2003).

Los estudios antes analizados no señalan ninguna relación con la dieta, pero algunos autores, como Olsen et al. (2003 y 2008) describen que la alimentación eleva la peroxidación lipídica, y los niveles de TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances) en suero de peces alimentados son mayores que en peces ayunados debido a la mayor concentración de lípidos oxidables de las lipoproteínas sanguíneas, provenientes de la dieta. Además, en bacalao, Olsen et al. (2008) encuentran que la respuesta frente un estímulo estresante varía según el estado de alimentación del pez, en concreto los peces que se han mantenido en ayuno durante los tres días antes de aplicarles el estímulo estresante presentan un nivel de TBARS menor que los peces que en los peces alimentados.

La mayoría de las macromoléculas biológicas pueden ser oxidadas por los RL (Kehrer, 1993; Bandyopadhyay et AL., 1999; Slater, 1984). Sin embargo, las biomoléculas más lábiles son los lípidos (Cheeseman y Slater, 1984; Halliwell y Chirico, 1993) ya que el proceso de peroxidación de un ácido graso provoca una cadena de peroxidaciones debido a que el ácido graso se transforma en un RL peroxilo que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros ácidos grasos e inicia nuevas reacciones de transición (Halliwell et al., 1992; Morrissey y O'Brien 1998), los dobles enlaces contenidos en la cadena AGP facilitan este proceso (Halliwell y Chirico, 1993). Los peces debido a su cantidad de ácidos grasos poli-insaturados son especialmente sensibles a la peroxidación lipídica, y por ello centraremos la discusión en el contenido en ácidos grasos de las muestras como mediadores de estrés oxidativo.

La formación de radicales oxidantes queda reflejada en la determinación de los ROS (Reactive Oxygen Species). El conjunto de los procesos de peroxidación forman tres fases: iniciación (extracción de un electrón a nivel de un doble enlace y formación de un radical inestable), propagación con formación en cadena de una serie de radicales libres que se comportan tanto como reductores como oxidantes, y finalmente detención de la reacción con formación de compuestos terminales del tipo aldehído y cetonas.

Los resultados procedentes de los análisis de las dietas muestran que los que tienen menores unidades ROS son los piensos que contienen harina de pescado en mayor proporción. En un principio, según Guillaume J. et al. (2004), estos piensos basados en harina de pescado, que contienen un mayor contenido en PUFAs y HUFAs son los que tendrían un mayor nivel de unidades ROS porque producen una mayor oxidación lipídica y por tanto más formas reactivas de oxígeno que es lo que medimos con este análisis. La explicación podría estar en la degradación del pienso, y en la facilidad que tienen los ácidos grasos insaturados para su oxidación, al reaccionar muy rápidamente cuando se exponen a condiciones o agentes oxidantes como el oxígeno del aire (Carrero et al, 2005).

En cuanto al análisis FRAP, las dietas con mayor contenido en harina de insecto, HI+Borraja en el primer experimento, y 50HP-50HI y 25HI-25HP-50S en el segundo experimento, son las que presentan mayor unidades FRAP, es decir, mayor poder oxidante, debido posiblemente al alto contenido en estas dietas de ácidos grasos insaturados, PUFAs y HUFAs, que producen una mayor peroxidación lipídica (Guillaume J. et al., 2004), por lo que su contenido en antioxidantes en este caso es menor.

Nuestros resultados pertenecientes a los análisis ROS en los tres tratamientos del experimento 1 y 2 muestran un mayor nivel de peroxidación en el músculo en los tratamientos con mayor nivel de harina de pescado. En el primer experimento, el tratamiento 100HP constituido 100% por harina de pescado tiene un mayor valor significativo que los tratamientos 100HI y HI+Borraja, lo que supone que los piensos con contenido en harina de insectos presentan una menor peroxidación. Esto es justificable debido al mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) que tienen los piensos de harina de pescado, debido a que un mayor contenido en PUFA facilita la peroxidación lipídica (Guillaume J et al., 2004). Bajo condiciones de estrés se aumenta el

nivel de ácidos grasos y triglicéridos siendo utilizados como fuente de energía alternativa (Papoutsoglou et al. 2006) aumentando con ello el nivel de peroxidación, por lo que un mayor aporte en dieta (como en el caso del harina de pescado) o por estrés de lípidos supondría mayores niveles de ROS. Se conoce que los ácidos grasos en los tejidos de los peces están relacionados con el contenido en lípidos de la dieta (Olsen et al, 1999; Mourente et al, 2000). Los HUFAs son ácidos grasos propensos a la oxidación, por ello en animales alimentados con dietas más ricas en HUFA aparecen niveles significativamente más altos de actividad de las enzimas SOD y G6PDH, siendo indicativo de un aumento de las necesidades de los mecanismos antioxidantes en el individuo. De hecho, Puangkaew et al, (2005) reportó una mayor actividad de la enzima antioxidante cuando los individuos fueron alimentados con dietas con mayores niveles de HUFA y vitamina E.

En el segundo experimento, el pienso con un menor valor significativo es el pienso 50HP-50HI, probablemente debido a que el contenido del pienso de insectos (cuyo porcentaje en este pienso es del 50%) apenas contiene PUFAs o HUFAs. Significativamente el pienso 50HP-50S es el de mayor valor de unidades ROS, correspondiendo este pienso al que mayor contenido de PUFAs y HUFAs contiene de los tres.

Las muestras en el intestino para el segundo experimento arrojan valores similares, aunque no significativos, y más dudosos en el caso del primer experimento. Se ha analizado el contenido de ácidos grasos en el músculo y este se muestran bastante alto para PUFAs y HUFAs, lo que también aportaría que en el músculo fueran más acusados los resultados, si bien es cierto que en el intestino no se han realizado los mismos análisis por lo que no se puede comparar con su contenido en ácidos grasos.

Como indicador del status antioxidante de la célula se han determinado los FRAP (Ferric reducing antioxidant power). En la mayoría de los trabajos realizados en peces la respuesta oxidativa se determina a través de los cambios de actividad de las enzimas implicadas en el estrés oxidativo, por lo que poca información hemos hallado sobre la capacidad antioxidante total. Los estudios realizados por Bagni et al. (2007) muestran que bajo condiciones estresantes como es hacinamiento antes del sacrificio no produce un aumento significativo en el poder antioxidante y en los radicales oxidantes determinados en músculo de dorada y lubina pero que observan si una correlación positiva entre la producción de radicales oxidativos y defensas oxidativas.

Los niveles de de FRAP obtenidos en los tratamientos del experimento 1 y 2 para el músculo muestran un nivel significativamente mayor de poder antioxidante en el tratamiento con harina de insecto y borraja para el experimento 1 y mayor sin ser significativo para el tratamiento que mezcla harina de insecto, de pescado y soja en el experimento 2. Por tanto los resultados arrojan para el primer experimento que el tratamiento con harina de insecto tiene un menor poder antioxidante, sin embargo, el de mayor poder antioxidante es el tratamiento que mezcla dicha harina con la borraja. En el análisis de ROS para el músculo del primer experimento el análisis mostraba un menor valor para la harina de insecto, significando que si el análisis ROS mostraba menor peroxidación en la harina insectos, el análisis FRAP debería presentar mayor poder antioxidante en el mismo. Sin embargo, en ratones, se ha descrito un

efecto beneficioso de la ingesta de HUFAs sobre el estrés oxidativo. En concreto la ingesta de EPA y DHA contrarresta el efecto de los radicales libres (Casós et al 2010) aunque en otros caso la ingesta de aceite de pescado (rico en estos dos ácidos grasos) aumenta el estrés oxidativo (Tsuduki et al., 2011). En cualquier caso, para el experimento 1 en el que podemos ver resultados significativos, los peces alimentados con el tratamiento de HI+Borraja tiene mayor unidades FRAP o poder antioxidante, coincidiendo estos resultados con el análisis realizado al pienso.

Los valores para el intestino en el experimento 1 presentan que el tratamiento de mayor poder antioxidante es el constituido 100% por harina de insecto y menor el que mezcla dicha harina con borraja. Dado que la harina de insecto apenas presenta contenido en PUFAs, el antioxidante debería ser mayor en los peces que han consumido este tratamiento por no suponer una adición de estos ácidos grasos a la dieta, y con ello un aumento de la peroxidación. Sin embargo en el experimento 2 el mayor valor en unidades FRAP lo presenta el tratamiento constituido por harina de pescado y soja al 50%. Sabemos la cantidad de ácidos grasos insaturados que aporta de harina de pescado y de insecto, siendo menor esta última y más lógicamente el de mayor poder antioxidante. Sin embargo el efecto de la soja en el intestino parece ejercer un poder antioxidante mayor que el insecto, que se puede relacionar con su mayor contenido en HUFAs y PUFAs, ejerciendo un efecto beneficioso por la ingesta de EPA y DHA sobre el estrés oxidativo (Casos et al, 2010).

En cuanto a los resultados obtenidos de comparar en cada tratamiento la diferencia existente en unidades ROS y FRAP entre los órganos analizados, los resultados son similares, teniendo en cuenta la relación inversa entre el análisis ROS y FRAP, pero mucho más contundentes en el caso del método FRAP.

En el caso del análisis ROS, en todos los casos el valor en unidades ROS del músculo es mayor que del intestino, salvo en el caso del lote HI+Borraja perteneciente al primer experimento, aunque en este caso los resultados no son significativos. Sí lo son en el tratamiento 100HP del experimento 1 y 50HP-50HI y 50HP-50S del experimento 2.

Centrándonos en el análisis FRAP, los resultados son totalmente concluyentes, en todos los tratamientos de los dos experimentos, el órgano con mayor cantidad de unidades FRAP es el intestino, mostrando en todos los casos diferencias significativas.

La relación inversa se fundamenta en que el análisis ROS mide el poder “oxidante” y el análisis FRAP en poder antioxidante, por lo que es lógico pensar en un principio que los resultados salgan inversos para ambos parámetros.

En cuanto a las diferencias entre tejidos pueden ser causadas por las diferentes velocidades de generación de radicales libres, pues la actividad de los enzimas clave del metabolismo oxidativo en cerebro, riñón y branquias de *Cyprinus carpio* y *Oreochromis niloticus* expuesto a contaminantes tales como 2,4-D (2,4-dichlorofenoxy ácido acetico dimetil amina) y zinfosmetil no muestran datos homogéneos. Por ejemplo la actividad SOD sólo se afecta en branquias pero no en hígado ni riñón, mientras que la actividad CAT varia en hígado y branquias de la carpa pero no se afecta en ningún órgano en la tilapia, por el

contrario la actividad GPx afecta al hígado de ambas especies y al cerebro de tilapia y la actividad GST solo se afecta en el riñón de ambas especies (Ozcan et al. 2004). Estos datos junto con los de otros autores (Radi and Matkovics, 1988; Winston and Di Giulio, 1991), muestran que la respuesta antioxidante varía según el tejido y la especie de pez. Ahmad et al., (2000) establece que tanto la respuesta oxidativa como el potencial antioxidante del pez difieren según especies, hábitat y comportamiento alimentario.

5.2. CORRELACIÓN ENTRE LOS DATOS DE LOS ANÁLISIS ROS Y FRAP.

La correlación entre los datos de los análisis ROS y FRAP se propone como un indicador de bienestar, que nos permite distinguir entre estrés y bienestar, de forma que si la respuesta antioxidante es proporcional y positiva en la liberación de ROS, se puede considerar que el animal goza de buen estado de salud y bienestar. Si la respuesta es proporcional e intermedia, ni positiva ni negativa, el bienestar del animal no será el más idóneo, debiéndose a un prolongado estado de estrés oxidativo. Por último, si la respuesta es negativa, el animal se encuentra en malas condiciones y sometido a una situación estresante continuada (Brambilla et al., 2002a, b; Ballerini et al., 2003). En dorada y lubina se han obtenido resultados similares a estos al establecer la correlación entre las especies oxidantes y la capacidad antioxidante de sueros de animales hacinados ($70\text{kg}/\text{m}^3$) o mantenidos a una densidad normal ($30\text{ kg}/\text{m}^3$) durante las tres horas previas al sacrificio (Bagni et al., 2007).

Para realizar la correlación entre los datos de los análisis ROS y FRAP es necesario obtener los datos de la misma muestra en los dos análisis. Debido a la pérdida de gran cantidad de muestra durante los ensayos de los análisis, las muestras para los dos análisis no suelen coincidir dentro del mismo tratamiento, por lo que este análisis sólo se ha podido realizar en dos tratamientos del experimentos de cápsulas, el tratamiento alimentado con pienso 100% de insecto y el tratamiento alimentado con pienso de insecto y borraja al 50% cada componente.

Según este criterio, las correlaciones obtenidas entre los niveles de ROS y FRAP en el tratamiento 100HI la respuesta antioxidante es proporcional y de correlación negativa, es decir el animal no es capaz de generar el poder antioxidante adecuado a la formación de radicales oxidantes. Sin embargo en el tratamiento HI+Borraja, la respuesta antioxidante es proporcional y de correlación positiva.

Hay que apuntar también que los resultados no son del todo concluyentes debido al insuficiente número de datos con el que se ha realizado el análisis, a causa de la falta de datos para el mismo pez de los dos análisis realizados.

6. CONCLUSIONES.

6. CONCLUSIONES

- 1.- Bajo nuestras condiciones experimentales, la dieta afecta al estrés oxidativo, especialmente el nivel de AG altamente insaturados.
- 2.- Las dietas con mayor contenido en harina de insecto presentan un mayor nivel de unidades FRAP.
- 3- Bajo nuestras condiciones experimentales los peces alimentados con harina de pescado presentan en el músculo mayor nivel de especies reactivas de oxígeno, expresando por tanto un mayor estrés oxidativo.
- 4- Los peces alimentados con harina de insecto tienen mayor nivel de unidades FRAP, o capacidad antioxidante.
- 5- En el intestino el poder antioxidante es mayor que en el músculo. En el músculo el poder oxidante es mayor que en el intestino.

Conclusión final:

Según todo lo expuesto podemos decir que, bajo nuestras condiciones experimentales, la dieta influye en el estrés oxidativo, siendo mayor en dietas con alto contenido en ácidos grasos insaturados debido a su facilidad de oxidación. Los resultados exponen diferencias entre tejidos, teniendo el intestino una mayor capacidad antioxidante y el músculo una mayor capacidad oxidante de los radicales libres. Por tanto, podemos decir que la dieta basada en harina de insectos induce en menor medida el estrés oxidativo en los peces alimentados con esta dieta.

7. BIBLIOGRAFÍA.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., et al., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1519, 37–48.

Alicorp, S.A. (2006). Manual de Crianza de la Tilapia.
[ONLINE]: <http://www.alicorp.com.pe>

Akiyama T., Murray I., Hirasawa Y., Nose, T., (1984). *Aquaculture. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción.* Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477.

Anwar, A., Ishak, M., El Zeiny, M. Hassanen, G.D.I. (1982). *Aquaculture. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción.* Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477.

Ashiru, M.O. (1988). The food value of the larvae of *Anaphe venata* Butler (Lepidoptera; *Notodontidae*). *Ecology and Food Nutrition*, 22: 313-320.

Atherton, W.D. y Aitken, A., (1970). *Comp. Bioch. Physiol. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción.* Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Avilez I.M., Fernandes T.S., de Almeida L.C., Hackbarth A., da Cunha J., Neto, Freire V.L., Moraes G., 2008. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). *Comparative Biochemistry and Physiology; Part C* (148):136-42.

Bagni M., Civitareale C., Priori A., Ballerini A., Finoia M., Brambilla G. y Marino G. 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263: 52–60.

Ballerini, A., Civitareale, C., Fiori, M., Regini, M., Betti, M., Brambilla, G., 2003. Traceability of inbred and crossbred cinta senese pigs by evaluating the oxidative stress. *J. Vet. Med., Ser. A* 50, 113–116.

Bandyopadhyay U, Das D y Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis (review). *Curr Sci* 1999; 77: 658-666.

Brambilla, G., Civitareale, C., Ballerini, A., 2002a. Evaluation of oxidative stress in SPF pigs intended for xenotransplantation: a matter of animal welfare, human health or both? *I Quad. Moretta* 2, 60–62.

Brambilla, G., Civitareale, C., Ballerini, A., Fiori, M., Amadori, M., Archetti, L.I., Regini, M., Betti, M., 2002b. Response to oxidative stress as a welfare parameter in swine. *Redox Rep.* 7 (3), 159–163.

Cardenete, G., Garzón, A., Moyano, F., De la Higuera, M., (1991). Abstracts of IV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. En *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Carrero, J.J., Martín Bautista, E., Baró, L., Folloná, J., Jiménez, J., Boza, J.J. y López-Huertas, E. 2005. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Puleva biotech, S.A. Nutr. Hosp.* v. 20 n°1 ;Madrid.

Casós, K.; Zaragoza, M.C.; Zarkovic, N.; Zarkovic, K.; Andrisic, L.; Portero-Otín, M.; Cacabelos, D.; Mitjavila, M.T. Source: Free Radical Research, A fish oil-rich diet reduces vascular oxidative stress in apoE^{-/-} mice. Volumen 44, Number 7. pp. 821-829 (9).

Castelló Orvay, F, (1993). *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Cerda, H.; Martínez, R.; Briceño, N.; Pizzoferrato, L.; Hermoso, D.; Paoletti, M. (1999) Cría, análisis nutricional y sensorial del picudo del cocotero *Rhynchophorus palmarum* (coleóptera: *curculionidae*), insecto de la dieta tradicional indígena amazónica. *Ecotrópicos*, 12(1): 25-32.

Cheeseman K.H. and Slater T.F., 1993 An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman KH, Slater TF, editors. *Free radicals in medicine*. London (UK): Churchill Livingstone. Pag. 481-493.

Chihuailaf, R.H., Contreras, P.A. y Wittwer F.G., 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Méx.* 33 (3): 264-283.

Chow C.K., 1979. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *Am J Clin Nutr*; 32:1066-1081.

Conconi, J.R.E., Pino Moreno, J.M., Mayaudon, C.M., Valdez, F.R., Perez, M.A., Prado, E.E., Rodriguez, H.B. (1984) Protein content of some edible insect in Mexico. *J. Ethnobiol.* 4: 61–72.

Conconi, M. (1993) Estudio comparativo de 42 especies de insectos comestibles con alimentos convencionales en sus valores nutritivo, calórico, proteínico y de aminoácidos haciendo énfasis en la aportación de los aminoácidos esenciales y su papel en el metabolismo humano. Tesis Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F: 71p.

De la Higuera, M. Murillo, A., Valera, G. Zamora, S., (1977). Comp. Bioch, Physiol. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

De la Higuera, M. Cardenete, G. (1987). Alimentación en Acuicultura. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

DeFoliart, G.R., Finke, M.D., Sunde, M.L. (1982) Potential value of the Mormon cricket (Orthoptera: *Tettigoniidae*) harvested as a high protein feed for poultry. J. Econ. Ent. 75: 848–85.

DeFoliart, G. R., Ed. (1989) Food Insects Newslett. 1-4 DeFoliart, G. R. (1989). The human use of insects as food and as animal feed. Bull. Entomol. Soc. Am. 35, 22-35

DeFoliart, G.R. (1992). Insect as human food. Crop Protection, 11: 395-399.

Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G.M. (Ed.), Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Taylor and Francis, London, pp. 523–561.

Di Marco P., Priori A., Finoia M.G., Massari A., Mandich A., Marino G. 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* o different stocking densities and acute stress challenge. Aquaculture in press.

Dias Bainy A.C., 1996. Oxidative stress as a biomarker of polluted aquatic sites. In: Physiology and biochemistry of fishes of the amazon. Edited by AL Val, MF Almeida-Val and DJ Randall. 1996; 331-34.

ECONIMA, (2010). Factibilidad del cultivo de Tilapia en Mallorca.

Finke, M.D., DeFoliart, G.R., Sunda, M.L. (1985). An evaluation of the protein quality of mormon cricket (*Anabrus simplex* H.) when used as a high protein feedstuff for poultry. Poultry Sci. 64: 708–712.

Fowler, L.G., (1990). Aquaculture. Acuicultura marina: Fundamentoss biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477 8.

Fraga C.G., Cavanagh E., Carrasquedo F., Lotiti, Lucesoli F., Oteiza P., 1996. Antioxidants defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals In: Physiology and biochemistry of fishes of the amazon. Edited by AL Val, MF Almeida-Val and DJ Randall; p. 323-30.

Furichi, M., Yone, Y. (1980). Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish en Acuicultura marina: Fundamentoss biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477 8.

Goff JP, Horst RL. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. J Dairy Sci; 80:1260-1268.

Guillaume J., Kaushik S., Bergot P., Metailler R.; 2004. Nutrición Y alimentación de peces y crustáceos. Editorial Mundi prensa libros S.L. Pag: 166, 167.

Hai, D.Q., Varga, S.I., Matkovics, B., 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). Comp. Biochem. Physiol. C 117, 83-88.

Haglund, O. (1998) Effects of fish oil alone and combined with long chain (n-6) fatty acid on some coronary risk factors in male subjects. Nutr. Biochem. 9: 629-635.

Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. Nutr. Rev. 1997; 55:S44-S52.

Halliwell B y Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57(Suppl):715s-725s.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. y Cross C.E., 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? Lab Clin Med; 119:598-620.

Halwart M., Gupta, M.V. (2006) Cultivo de peces en campos de arroz. World fish Center-FAO. [ONLINE]: <http://www.fao.org/docrep/010/a0823s/a0823s00.htm>

Hayashi I, Morishita Y., Imai K., Nakamura M., Nakachi K and Hayashi T,2007. High-throughput spectrophotometric assay of reactiveoxygen species in serum. Mutation Research 631 55-61.

Hilton, J.W., Slinger, S.J. (1981). Aquatic Sciences, Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

IPAC (2009). La Fundación Tecnova trabaja en el diseño de una estructura invernadero para tilapia. [ONLINE]: <http://www.ipacuicultura.com/ipac/noticia.php?idNoticia=2980>

Jiang, T.D. (2003) Chitin. Chemical Industry Press, Beijing, p. 6.

Jobling M., Gomes E., Dias J. 2001. Feed types, manufacture and ingredients. In Food intake in fish .Ed Houlihan D., Boujard T., Jobling M. Blackwell sciences Ltd. Oxfor UK. 978-

0632055760

Josupeit, H. (2007) Tilapia Market Report - October 2007. Aquahoy. [ONLINE] <http://www.aquahoy.com>, último acceso 18 de octubre de 2007.

Kaushik, S.J. (1990). Mediterranean Aquaculture. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84 475 0477 8

Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol 1993; 23:21-48.

Kelly S.A., Havrilla C.M., Brady T.C., Abramo K.H., Levin E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems environmental health perspectives; p. 106-7.

Kihlberg, R. (1972). Ann. Rev. Microbiology. Acuicultura marina: Fundamentoss biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477 8.

Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S., Watanabe, T., 2004. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. Aquaculture 234, 361–379.

Ladrón De G., Padilla, P., García, L.; Pino, J.M., Ramos-Elordy, J. (1995) Aminoacid determination in some edible Mexican insects. Aminoacids. 9: 161-173.

Lamb, C.F. & Finger, T.E. (1995). Gustatory control of feeding behaviour in goldfish. In Food intake in fish .Ed Houlihan D., Boujard T., Jobling M. Blackwell sciences Ltd. Oxfor UK. 978-0632055760.

Landry, S.V., DeFoliart, G.R., Sundae, M.L. (1986). Larval protein quality of six species of Lepidoptera (Saturniidae, Sphingidae, Noctuidae). J. Econ. Ent. 79: 600–604.

Larkins, N.J. Free radical biology and pathology. J Equine Vet Sci 1999; 19:84-89.

Lemaire, P., Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder. *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. Trends in Comparative Physiology 1, 1119–1150.

Livingstone, D.R., 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. Revue Méd. Vét; 154(6):427-30.

Luo Y., Su Y., Lin R-Z., ShiH-H. and Wang X-R. 2006. 2-Chlorophenol induced ROS generation in fish *Carassius auratus* based on the EPR method Chemosphere 65: 1064–1073.

Mackie, A.M. & Mitchell, A.I. (1985) Identification of gustatory feeding stimulants for fish – applications in aquaculture. In Food intake in fish .Ed Houlihan D., Boujard T., Jobling M. Blackwell sciences Ltd. Oxfor UK. 978-0632055760.

Malaisse, F.; Parent, G. (1980) Les chenilles comestibles du Shaba meridional (Zaire). Naturalistes Belges, 61: 2-24.

Marcon JL, Filho DW., 1999. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, serrasalmidae) from the Amazon. Comparative Biochemistry and Physiology; Part C(123):257-63.

Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska E., Madsen FC. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. J Dairy Sci 1993; 76:2812-2823.

Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. Comp. Biochem. Physiol. C 139, 153–161.

Morrissey, P.A. y O'Brien N.M. 1998. Dietary antioxidants in health and disease. Int Dairy J 1998; 8: 463-472.

Moyano, F.J., De la Higuera, M., Cardenete, G. (1992). Anim. Prod. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Mohsen, A.A., Lovell, R.T., (1990). Aquaculture. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S, Veissier I. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare.

Murai, T. (1992). Aquaculture. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Murray, A, y Marchant, R. (1986). Aquaculture. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Nakagaki, B.J., DeFoliart, G.R. (1987) Protein quality of the house cricket *Acheta domesticus* when fed to rooster chicks. Poultry Sci. 66: 1367–1371.

Nicovita, A. (2007). Introducción al cultivo de la Tilapia. Red Internacional de Acuicultura de la Universidad de Auburn. [ONLINE].

Olsen R.E., Sundell K., Ringø F., Myklebust R., Hemre G.I., Hansen T. y Karlsen O. 2008. The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture* 280: 232–241

Olsen, R.E., Sundell, K., Hansen, T., Hemre, G.-I., Myklebust, R., Mayhew, T.M., Ringø, E., 2003. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. An electron microscopical study. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 211–221.

Ozcan Oruc, E., Y. Sevgiler Y. y Uner N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl *Comparative Biochemistry and Physiology* 137: 43–51.

Palace, V.P., Dick, T.A., Brown, S.B., Baron, C.L., Klaverkamp, J.F., 1996. Oxidative stress in Lake Sturgeon (*Acipenser fulvescens*) orally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran. *Aquat. Toxicol.* 35, 79–92.

Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Louizos E., Chadio, S., Kalogiannis, D. Dalla, C., Polissidis, A. and Papadopoulou-Daifoti, Z. 2006. Effect of Mozart's music (Romanze-Andante of “Eine Kleine Nacht Musik”, sol major, K525) stimulus on common carp (*Cyprinus carpio* L.) physiology under different light conditions. **Aquacultural Engineering** 36, 61-72.

Pedrajas J., Peinado J., López-Barea J., 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu-Zn superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chemic-biological interactions*; 98:267-282.

Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat. Toxicol.* 65, 337-360.

Phelps, R.J., Struthers, J.K., Moyo, J.L. (1975) Investigations into the nutritive value of *Macrotermes falciger* (*Isoptera-Termitidae*). *Zool. Afric.* 10: 123–132.

Pickering, A.D., 1998. Stress responses in farmed fish. In: Black, K.D., Pickering, A.D. (Eds.), *Biology of Farmed Fish*. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 222–255.

Puangkaew, J., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T., 2005. Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n–3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140, 187–196.

Radi, A.A.R., Matkovics, B., 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comp. Biochem. Physiol. C* 90, 69–72.

Ratliff, B. (2007) Producers may put fish on insect diet Forestry, Wildlife & Fisheries News of Mississippi State University.

[ONLINE]:<http://msucare.com/news/print/fwnews/fw07/071129.html>

Ramos-Elorduy, J., Pino M., J. M., Cuevas Correa, S., (1998). Insectos comestibles del estado de México y determinación de su valor nutritivo. Universidad Autónoma de México.

[ONLINE]: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=45869106>

Ramos-Elorduy, J.; Pino, J.M.; Cuevas, S. (1998) Insectos comestibles del estado de México y determinación de su valor nutritivo. Anales Inst. Biol. Univ. Autón. México, Ser. Zool., 69(1): 65-104.

Rushen, J. 1991. Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. Appl. Anim. Behav. Sci. 28:381-386.

Saavedra Martínez, M. A. (2006), Manejo del cultivo de tilapia. Universidad de Hawai.

[ONLINE]: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADK649.pdf

Sánchez-Muñiz, F.J., De la Higuera, M., Muñoz-Martínez, E. y Valera G., (1983). Comp. Biochem. Physiol. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84 475 0477 8

Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusc. Comparative Biochemistry and Physiology C 123, 193–199.

Shimizu, C., Allahpichay, I., Tokoro, T., Shirakawa, Y., (1990). Aquaculture. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Slater TF. Free-radical mechanism in tissue injury. Biochem J 1984; 222:1-15.

Stafford, E.A., Tacon, A.G.J. (1990). Aquaculture and Fisheries Management. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Sun Y., Yin Y., Zhang J., Yu H. y Wang X .2006. Bioaccumulation and ROS generation in liver of freshwater fish, goldfish *Carassius auratus* under HC Orange No. 1 exposure. Environmental Toxicology, 22, 3: 256-263

Sturve, J., Almroth, B. C. y Förlin, L. 2008. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluents. Ecotoxicology and Environmental Safety 70: 446–452.

Tacon, A.G.J. & Jackson, A.J. (1985) Utilisation of conventional and unconventional protein sources in practical fish feed. In Food intake in fish .Ed Houlihan D., Boujard T., Jobling M. Blackwell sciences Ltd. Oxfor UK. 978-0632055760.

Tacon, A.G. y Cowey, C.B., (1985). Fish energetics en Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona. 84: 475-477, 8.

Tecnova (2010).Fundación Tecnova. Tecnova concluye el proyecto sobre cultivo de tilapia en invernadero.

[ONLINE]: <http://www.fundaciontecnova.com/noticias/detalle.asp?noticias=181>

Turnbull, J. F., Bell, A., Adams, C. E., Bron, J. & Huntingford, F. A. (2005). Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. *Aquaculture* 243, 121–132.

Tsuyoshi Tsuduki, Taro Honma, Kiyotaka Nakagawa , Ikuo Ikeda and Teruo Miyazawa, 2011. Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice *Nutrition* Volume 27, Issue 3. Pages 334-337

Vannuccini, S. (2003). Mercados mundiales para la Tilapia. Infopesca Internacional, 13 (enero/marzo).

[ONLINE]:http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/32Mercados_Mundiales_para_la_Tilapia.pdf

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Assessment Environmental Toxicology and Pharmacology*; 13:57-149.

Vega-Villasante, F., Cortés, L.M.C., Zúñiga-Medina, L.M., Jaime-Ceballos, B., Basto-Rosales, M.E.R., Nolasco-Soria, H., (2010). Cultivo de peces en campos de arroz. *RedVet*. [ONLINE]: <http://revista.veterinaria.org/index.php/redvet/article/view/264/256>

Velásquez, L. Ibáñez, I. Herrera, C., Oyarzun, M., (1991). Anim. Prod. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló Orvay, F. Universitat de Barcelona.

Wang, D., Zhai, S.W., Zhang, C.X., Zhang, Q., Chen, H. (2007) Nutrition value of the Chinese grasshopper *Acrida cinerea* (Thunberg) for broilers. *Animal Feed Science and Technology*, (1-2): 66-74.135

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Pro-oxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74: 139-162.