



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y SALUD ANIMAL**

**Compuestos nutricionales y bioactivos de las plantas acuáticas *Lemna gibba* y *Ulva lactuca* y su evaluación en el crecimiento y la salud de tilapia (*Oreochromis niloticus*) como alimento funcional.**

**TESIS**

Que para optar por el grado de:

**Doctor en Ciencias de la Producción y Salud Animal**

**P R E S E N T A**

Martha Elena Aguilera Morales

**Tutor Principal**

**Dr. César Mateo Flores Ortiz**

(UIPRO- L.N.S. FESI-UNAM)

**Miembros del Comité Tutor**

Dr. Ernesto Ávila González (FMVZ-UNAM)

Dra. María Margarita Canales Martínez (Fitoquim-FESI-UNAM)

**Cuautitlán, Estado de México**

**Febrero 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

A todos mis alumnos y estudiantes soñadores, guerreros y con ganas de ser y hacer algo en la vida.

Con mucho cariño, respeto y admiración a todos mis profesores, productores, colegas y demás personas que contribuyeron en mi formación con sus enseñanzas.

A mi querida madre, quien con su amor, ternura, paciencia, alegría y fortaleza me enseñó a caminar y luchar ante cualquier adversidad; a mi padre quien me enseñó el orden y la disciplina.

A mi amado hijo Cuauhtémoc que transformó mi vida y cuya retroalimentación hace que valga la pena cualquier esfuerzo. A mis amados ahijados Eduardo y Carlos, quienes día a día se esfuerzan también en alcanzar sus metas, y que junto con Cuauhtémoc son mi alegría, mi motor y mi energía.

A mis amados hermanos Pedro, Armando, Gerardo, José Luis y Maribel cuyo apoyo y experiencias han contribuido en mi formación y crecimiento humano.

A José Manuel que con su calidez y paciencia me enseñó a ver la vida de un modo diferente.

A mi querida y adorada tía Magos quien siempre me ha dado muestras de gran cariño, amabilidad y apoyo a lo largo de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mis padres y a la vida, por todas las experiencias que me han dejado conocimiento.

A todos los que de alguna forma, fuera y dentro de las instituciones me han aportado un granito de arena y son parte de este logro.

Al CONACYT por su confianza y las becas proporcionadas durante mi formación.

A la UNAM y a todos los académicos, técnicos e intendentes por las facilidades otorgadas para la realización de las actividades de investigación en la FES Iztacala y la FES Cuautitlán; especialmente al Dr. J. Guillermo Penieres C. y la Dra. Adriana Llorente Busquets por su paciencia y sus excelentes aportaciones.

Al Dr. César Flores (tutor principal), Dra. Margarita Canales, Dr. Ernesto Avila (Comité tutor) por su confianza, sus excelentes y pertinentes recomendaciones y sugerencias, que me permitieron alcanzar la meta y desarrollar mis habilidades, capacidades y conocimientos.

A la Secretaría de Posgrado del Programa de Maestría y Doctorado en Producción y Salud Animal junto con todo su equipo, por el apoyo, facilidades y trato amable otorgado durante todo el proceso de formación.

A la Universidad del Papaloapan y personal académico, técnicos e intendentes por las facilidades otorgadas; especialmente al MC. Héctor López Arjona (vice-rector académico), la Dra. Cinhtya Magaly Antonio Cisneros por amistad, recomendaciones y acompañamiento en parte de este trabajo, así como a la técnico Christian.

Un agradecimiento muy especial a Pilar Zárata, mi querida tía, quien a sus 83 años con su espíritu joven y capacidad de servicio, me ayudó a coleccionar el material biológico sin importar la hora o el Sol.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización química, de compuestos bioactivos y microbiológica de las plantas acuáticas *L. gibba* y *U. lactuca*, así como evaluar su efecto en dietas funcionales (35% proteína) sobre el crecimiento (ganancia de peso diario, GPD; tasa de eficiencia alimenticia, TEA; sobrevivencia, S y factor de conversión alimenticia, FCA) y la salud (estudio hematológico, actividad del complemento C3 y actividad de la lisozima) en tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) utilizando un diseño de bloques completamente al azar y dietas suplementadas con distintos porcentajes (0, 10, 15, 20) de *L. gibba* y *U. lactuca* comparadas con dietas testigo suplementadas con mananoligosacáridos (MOS) comerciales. El análisis con "t" de student (95%) mostró diferencias significativas en el contenido de nutrientes y compuestos bioactivos entre las plantas; ambas presentaron 8 aminoácidos esenciales para el crecimiento de tilapia con aportes significativos de lisina y metionina. *U. lactuca* presentó una mayor variedad y contenido de ácidos grasos poliinsaturados, inulina, compuestos fenólicos totales y flavonoides. La ANOVA (dos vías, 95%) y el análisis post hoc Tukey denotaron un mayor efecto con la suplementación *U. lactuca* 20 % en los parámetros de salud. En crecimiento *L. gibba* presentó mayor GPD, TEA y FCA. Microbiológicamente las plantas acuáticas no presentaron riesgo alguno para ser utilizadas como ingredientes funcionales. Se recomienda identificar y validar biomarcadores que evalúen el alimento funcional y determinar los efectos del procesamiento tecnológico del alimento y verificar los efectos benéficos en la salud mediante técnicas moleculares.

**Palabras clave:** Plantas acuáticas, caracterización química, alimento funcional acuícola

## **ABSTRACT**

The aim of this study was a chemical characterization, of bioactive compounds and microbiological of aquatic plants *L. gibba* and *U. lactuca*, as well as evaluate its effect on functional diets (35% protein) on growth (daily weight gain, DWG ; feed efficiency rate, FER; Survival, S and feed conversion factor, FCF) and health (hematological study, activity of the complement C3 and activity of lysozyme) in tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) through a completely random block design and supplemented diets with different percentages (0, 10, 15, 20) of *L. gibba* and *U. lactuca* compared with control supplemented diets with commercial mananoligosacáridos (MOS). The analysis "t" of Student (95%) showed significant differences in the content of nutrients and bioactive compounds between plants; both aquatic plant presented 8 amino acids essential for the growth of tilapia and they provide significant amount of lysine and methionine. *U. lactuca* showed a major polyunsaturated fatty acids variety and content of inulin, phenolic compounds totals and flavonoids. ANOVA (two ways, 95%) and the post-hoc Tukey analysis showed that the supplementation *U. lactuca* 20 % had the best effect in the health parameters. In the growth performance tilapia, *L. gibba* presented higher DWG, FER and FCF. Microbiologically aquatic plants did not present any risk to be used as functional ingredients. It is recommended to identify and to validate biomarkers that evaluate the functional food and to determine the effects of the technological processing of the functional food and to verify the effects on health by means of molecular techniques that guarantee its effectiveness.

**Key words:** Aquatic plants, chemical characterization, functional food aquatic.

## ÍNDICE

	Página
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>ABREVIATURAS Y SIGLAS</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	3
Aspectos biológicos de <i>Lemna gibba</i> (L.) Moech	3
Composición química y nutricional	6
Compuestos bioactivos (CB ) y mecanismos de acción	8
Compuestos con actividad biológica de <i>L. gibba</i>	21
Usos de las lemnáceas en la alimentación animal y en peces	22
Aspectos biológicos de <i>Ulva lactuca</i>	24
Composición química	26
Compuestos con actividad biológica de <i>Ulva spp.</i>	27
Usos de las ulváceas en la alimentación animal	33
Biología de la Tilapia	35
Producción y costos de la Tilapia	39
Cultivo de Tilapia	44
Enfermedades	48
Evaluación del estado de salud en peces	51
Alimentos funcionales en la prevención de la salud	59
<b>HIPÓTESIS</b>	62
<b>OBJETIVOS</b>	62
<b>LUGAR DE TRABAJO</b>	63

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	65
Colecta de plantas acuáticas y su procesamiento	66
Caracterización química y nutricional	66
Análisis microbiológicos en las plantas acuáticas	67
Prueba biológica	68
Parámetros de crecimiento	71
Evaluación de la salud	71
Análisis estadístico	73
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	74
Composición química y nutricional de las plantas acuáticas	74
Análisis microbiológicos de las plantas acuáticas	80
Sustancias antinutricias	81
Cuantificación y tipo de polisacáridos	83
Fenoles, flavonoides y carotenos	86
Efecto del alimento funcional sobre el crecimiento de tilapia	94
Efecto del alimento funcional sobre la salud de la tilapia	98
Hemograma	98
Actividad de la lisozima	105
Actividad del complemento	106
<b>CONCLUSIONES</b>	109
<b>RECOMENDACIONES</b>	110
<b>REFERENCIAS</b>	111



## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Taxonomía de la macrofita de agua dulce <i>Lemna gibba</i> .	3
Cuadro 2. Composición química proximal de diferentes especies de <i>Lemna</i> determinada por diversos investigadores.	6
Cuadro 3. Contenido de aminoácidos esenciales y no esenciales de distintas especies de <i>Lemna</i> , reportados por diversos autores comparado con otras fuentes vegetales alimenticias utilizadas en la alimentación animal.	7
Cuadro 4. Clasificación de compuestos bioactivos.	11
Cuadro 5. Familias de compuestos fenólicos.	19
Cuadro 6. Clasificación de flavonoides según sus espectros UV (Andersen <i>et al.</i> , 2006; Samprieto <i>et al.</i> , 2009).	20
Cuadro 7. Taxonomía de la alga marina <i>Ulva lactuca</i> , Linneaeus.	24
Cuadro 8. Composición bromatológica de <i>Ulva lactuca</i> del medio natural.	26
Cuadro 9. Contenido de tocoles (mg/kg) en <i>U. lactuca</i> .	29
Cuadro 10. . Contenido de ácidos grasos esenciales encontrados en las algas <i>Ulva</i> por distintos investigadores.	31
Cuadro 11. Parámetros reproductivos de la Tilapia.	37
Cuadro 12. Los 10 principales países latinoamericanos productores de Tilapia (FAO, 2009, Fishtat Plus versión 2.32.).	40
Cuadro 13. Costo de producción de tilapia en 2003 en distintos países.	43
Cuadro 14. Crecimiento promedio y costo de producción de tilapia en China y Tailandia.	43
Cuadro 15. Costo de producción de tilapia en los últimos años en distintos países.	44
Cuadro 16. Algunas enfermedades comunes en tilapia, sus causas, sintomatología y tratamiento.	49
Cuadro 17. Componentes de los mecanismos del sistema inmunológico de peces	55
Cuadro 18. Dieta base de juveniles de tilapia 35% proteína.	70
Cuadro 19. Porcentaje de suplementación de los ingredientes funcionales en las dietas experimentales funcionales.	70
Cuadro 20. Composición química proximal (g 100g-1 muestra) en base seca de las plantas acuáticas analizadas.	75

Cuadro 21. Perfil de aminoácidos encontrado en <i>L. gibba</i> y <i>U. lactuca</i> comparado con los requerimientos de aminoácidos reportados para tilapia ( <i>O. niloticus</i> ).	77
Cuadro 22. Perfil de ácidos grasos de las plantas acuáticas estudiadas	79
Cuadro 23. Microorganismos detectados en las harinas de <i>L. gibba</i> y <i>U. lactuca</i> .	80
Cuadro 24. Concentración y tipo de polisacáridos en los extractos las plantas acuáticas de estudio.	84
Cuadro 25. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides determinados en <i>L. gibba</i> y <i>U. lactuca</i> .	87
Cuadro 26. Concentración de los flavonoides identificados en <i>L. gibba</i> con HPLC DAD utilizando el coeficiente de extinción de algunas referencias.	89
Cuadro 27. Concentración de los flavonoides identificados en <i>U. lactuca</i> con HPLC DAD utilizando el coeficiente de extinción de algunas referencias.	90
Cuadro 28. Concentración de xantofilas (g xantofilas/kg) en las plantas acuáticas estudiadas.	91
Cuadro 29. Carotenoides identificados en <i>L. gibba</i> .	93
Cuadro 30. Concentración de carotenoides identificados en <i>U. lactuca</i> .	94
Cuadro 31. Composición proximal de las dietas experimentales suplementadas con <i>L. gibba</i> y <i>U. lactuca</i> (0,10, 15 y 20 %) comparado con el testigo suplementado con mananoligosacáridos (MOS) (0, 1, 1.5 y 2%).	96
Cuadro 32. Comparación del efecto de las dietas experimentales sobre los parámetros de crecimiento en juveniles de tilapia.	32
Cuadro 33. Parámetros físico-químicos de calidad de agua en el sistema del recirculación.	99
Cuadro 34. Rangos de referencia del hemograma obtenido de juveniles de tilapia sanos ( N=50).	100
Cuadro 35. Media y desviación estándar de la composición hematológica de juveniles de tilapias alimentados con dietas suplementadas con <i>U. lactuca</i> y <i>L. gibba</i> en distintos porcentajes comparadas con el testigo MOS y el intervalo de referencia.	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Diferenciación de sexos de la Tilapia en estado adulto (Saavedra, 2006).	37
Figura 2. Incubación de huevos en la boca por la Tilapia.	37
Figura 3. Producción de tilapia por captura y acuicultura mundial (FAO, 2015).	39
Figura 4. Estresores que afectan la salud de los peces (Awad, 2010).	49
Figura 5. Lugar de trabajo. Arriba Facultad de Estudios Superiores Iztacala y abajo, Universidad del Papaloapan Campus Loma Bonita.	63
Figura 6. Carta hidrológica de Loma Bonita, Oaxaca (INEGI, 2006).	64
Figura 7. Esquema general de trabajo.	65
Figura 8. HPLC DAD del contenido de flavonoides en <i>L. gibba</i> . Los picos identificados se muestran en el Cuadro 23.	88
Figura 9. HPLC DAD del contenido de flavonoides en <i>U. lactuca</i> . Los picos identificados se muestran en el Cuadro 24.	89
Figura 10. Cromatograma de los carotenoides de <i>L. gibba</i> seca y fresca. Los picos identificados se muestran en los Cuadro 29.	91
Figura 11. Cromatograma de carotenoides en muestras de <i>U. lactuca</i> seca y fresca. Los picos identificados se muestran en el Cuadro 30.	92
Figura 12. Concentración de la lisozima en los días 1, 30 y 60 de experimentación en los juveniles de tilapia alimentados con las distintas dietas.	106
Figura 13. Concentración de C3 encontradas a los días 1, 30 y 60 en los juveniles de tilapia alimentados con distintas dietas funcionales experimentales.	108

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

gr.L Gramos por litro  
AA. Ácido araquidónico.  
AGn-6. Ácidos grasos omega 6.  
AGP. Ácidos grasos poliinsaturados.  
ALA. Ácido alfa linolénico.  
C3. Fragmento 3 del sistema complemento.  
CAT. Catalasa.  
CCG. Cambio climático global.  
CDAAA. Coeficientes de digestibilidad aparente de aminoácidos en algas.  
CDAE. Coeficientes de digestibilidad aparente de energía.  
CDAMS. Coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca.  
CDAPC. Coeficientes de digestibilidad aparente de proteína cruda.  
DHA. Ácido docohexaenoico.  
ED. Energía digestible.  
EM. Energía metabolizable.  
EPA. Ácido eicosapentaenoico.  
EUA. Estados Unidos de América.  
FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.  
g/pez. Gramos por pez.  
FCA. Factor de conversión alimenticia.  
GPF. Ganancia de peso final.  
GPx. Glutation peroxidasa.  
HDL-colesterol. Lipoproteínas de colesterol de alta densidad.  
HDTA. Ácido hexadecatetraenoico.  
HPLC DAD. Cromatografía de alta resolución diodos.  
Kcal/100 g. Kilocalorías por 100 gramo de muestra.  
LA. Ácido linoleico.  
LDL-colesterol. Lipoproteínas de colesterol de baja densidad.  
MJ kg<sup>-1</sup>. Milijoules por kilogramo.  
PC. Proteína cruda.  
POD. Peroxidasa.  
PS. Polisacáridos sulfatados.  
PUFAs. Ácidos grasos poliinsaturados.  
RL. Radical libre.  
ROS. Especies reactivas de oxígeno.

S. Supervivencia.

SOD. Superóxido dismutasa.

TEP. Tasa de eficiencia proteica.

t/ha/año. Tonelada por hectárea por año.

$\mu\text{m.kg}^{-1}$ . Microgramos por kilogramos

$\mu\text{g mg}^{-1}$ . Microgramos por miligramo.

USD\$. Dólares.

USD/kg. Dólares por kilogramo.

w3. Omega 3.

w6. Omega 6.

## INTRODUCCIÓN

La explotación intensiva y practicas incorrectas de manejo y alimentación hacen vulnerable a las especies de cultivo a enfermedades (Mateo *et al.*, 2011; Nermeen *et al.*, 2015). Los tratamientos con antibióticos no son una opción, ya que generan resistencia bacteriana en los organismos de cultivo y en sus consumidores (Stamm, 1989; Aguila, 2000, Nermeen *et al.*, 2015). La tilapia es una de las especies afectadas. Una alternativa viable para ellas son los alimentos funcionales. Es decir, aquél alimento que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, que mejoran la salud y el bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedades. Un alimento funcional resulta de la adición, sustitución o eliminación de algún componente (nutrientes o compuestos bioactivos o fitoquímicos los cuales se encuentran en diversas especies vegetales y animales (Chasquibol *et al.*, 2003; Kiron, 2012). Diversas plantas acuáticas contienen altas concentraciones de nutrientes y compuestos bioactivos en función de su distribución geográfica, época estacional, condiciones ambientales (corrientes, nutrientes y depredadores) (Kalita *et al.*, 2007; Jha, 2010; Zheng *et al.*, 2011). Modulan varias funciones del cuerpo de un organismo los cuales se manifiestan positivamente en su salud (Kumar *et al.*, 2012; Kiron, 2012). La evidencia científica indica que *Lemna gibba*, macrofita de agua dulce, y *Ulva lactuca*, alga marina verde, contienen proteínas, vitaminas, minerales, ácidos grasos esenciales (omega 3 y 6) y polifenoles (Lovstad y Kraan, 2010; Zhao *et al.*, 2014). A algunos de estos compuestos se les atribuyen propiedades antibacterianas, antifungicas y antivirales entre otras (Cofrades *et al.*, 2010; Jiménez-Escrig, Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). *L. gibba* se encuentra en charcas de agua dulce, lagos y ríos; en algunos lugares son consideradas plagas dado su alta tasa de reproducción, principalmente en zonas con alto contenido de nitrógeno y fosfatos (Carranco *et al.*, 2002; Amstrong, 2003; Peters *et al.*, 2009). *U. lactuca* son arrojadas por el oleaje en los márgenes de las playas; en las turísticas son consideradas fuente de contaminación por su mal aspecto al descomponerse.

Ambas plantas tienen una alta palatabilidad y se han probado en la alimentación de ganado, aves y peces, obteniéndose resultados productivos y con una eficiencia económica satisfactoria (Cheng y Stomp, 2009; Witkoska *et al.*, 2012; Zetina-Córdoba, 2013) pero no se han evaluado como ingrediente o alimento funcional. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la composición química y de algunos compuestos bioactivos, así como realizar un análisis microbiológico de cada una de las plantas acuáticas e inferir su efecto a través de parámetros de crecimiento y salud (hemograma, actividad de la lisozima y actividad del complemento C3) en un alimento funcional formulado, incluidas de forma individual y combinada.

Este estudio es una contribución a las alternativas nutricionales que mejoran la condición de salud de las tilapias a través de fortalecer el primer mecanismo de defensa y también es una contribución a la producción acuícola sustentable, al promover el aprovechamiento de forma natural de las plantas acuáticas, *L. gibba* y *U. lactuca*, que no tienen uso alguno. El uso de estas plantas en la producción acuícola podría considerarse una estrategia de prevención de enfermedades.


## REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### Aspectos biológicos de *Lemna gibba* (L.) Moench

#### Taxonomía

La ubicación taxonómica de la especie *Lemna gibba* se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Taxonomía de la macrofita de agua dulce *Lemna gibba*.

Nombre común	Lenteja de agua o chichicastle	
Reino	Plantae	
División	Magnoliophyta	
Clase	Liliopsida	
Orden	Alismatales	
Familia	Araceae	
Subfamilia	Lemnoidade	
Tribu	Lemneae	
Género	<i>Lemna</i>	

#### Descripción general

*Lemna gibba* pertenece a las plantas acuáticas libres flotadoras sobre la superficie que generalmente cubren grandes extensiones en presas o bordes debido a su gran capacidad de reproducción vegetativa. Es una planta angiosperma (plantas con flores), monocotiledónea. Su cuerpo vegetativo tiene forma taloide, es decir, no se diferencian el tallo y las hojas.



Es una estructura plana y verde y una sola raíz delgada de color blanco. El talo ha sido interpretado de diversas maneras: un tallo modificado, una hoja o como parcialmente tallo y hoja (Cook y Gut, 1974).

### **Hábitat y distribución**

Se encuentra en charcas de agua dulce, ciénagas, lagos y ríos. Su distribución es amplia, en las zonas subtropicales y tropicales (Amstrong, 2003). Su distribución y biomasa depende de varios factores ambientales como la transparencia y profundidad del agua, la luz y la disponibilidad de nutrientes (Carranco *et al.*, 2002). Las macrofitas o plantas acuáticas tienen un papel muy importante en los ecosistemas acuáticos; son fuente directa o indirecta de alimento, protección y hábitats para muchos peces, invertebrados y epífitas entre muchos otros organismos acuáticos más (Wychera *et al.*, 1993).

### **Reproducción**

La lenteja de agua es una planta monoica, con flores unisexuales. Las flores masculinas están constituidas por un solo estambre y las flores femeninas consisten en un pistilo formado por un solo carpelo. El periantio está ausente. Las flores nacen de una hendidura ubicada en el borde de la hoja, dentro de una bráctea denominada espata. El fruto contiene de 1 a 4 semillas. La forma de reproducción es asexual por gemación. En los bordes basales se desarrolla una yema pequeña que origina una planta nueva que se separa de la planta progenitora. Sin embargo, es común encontrar las plantas agregadas formando grupos de 2 a 4 individuos. Toleran un rango de pH amplio, siendo el óptimo entre 4,5 y 7,5. Con frecuencia el hierro es un elemento limitante para su adecuado desarrollo. La planta puede desarrollarse en un rango amplio de temperaturas, que varía entre 5° y 30°C, con un crecimiento óptimo entre los 15° y 18°C. (Cook y Gut, 1974; Rook, 2002).

## Producción

Actualmente el crecimiento y producción de *L. gibba* se encuentra tecnificado tanto en el laboratorio como en el medio natural. Siendo importante el pH, la temperatura y la fuente de nitrógeno (Kalita *et al.*, 2007).

El crecimiento de la lenteja de agua puede ser hasta 21 días en sistemas de laboratorio. Para su desarrollo *L. gibba* requiere temperatura de 18 a 25°C, salinidad 20 a 24, pH de 5.6 a 7.5, aunque lo óptimo es ligeramente ácido; pero también puede crecer en condiciones adversas (Mkandawire *et al.*, 2005). Morales *et al.* (2006) reportan que el crecimiento óptimo dependen del pH y la fuente nitrogenada. Espejo *et al.* (2006) reportan que *Lemna minor* triplica su biomasa en 7 días con la aplicación de 20 g/kg de fertilizante orgánico. Canales (2010) reportó una producción de biomasa de la lenteja de agua (*L. gibba*) de 6.94 kg/m<sup>2</sup> con un pH promedio de 6.3.

Andrade *et al.* (2013) evaluaron el crecimiento de *Lemna obscura* del lago de Maracaibo, Venezuela, en función de las fuentes nitrogenadas (NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>, CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) a 1mM, cada una a pH (3.5; 4. 5; 6; 7 y 9). Además evaluaron el efecto de la urea en concentraciones de 0.1; 1; 5 y 10mM a pH 5. *L. obscura* creció a pH entre 4-9 en todas las fuentes nitrogenadas. A pH 3.5 fue letal en los 15 primeros días. El mejor crecimiento de la planta se alcanzó a pH 5 (1839.67 ± 75.45 frondes). La urea fue la mejor fuente nitrogenada pues obtuvieron el máximo crecimiento (2923.00 ± 130.8 frondes).

Sierra Cuello (2016) refieren que las macrofitas o lentejas de agua son altamente productivas y se caracterizan por su amplia distribución y hábitat y por presentar un crecimiento acelerado. Determinaron una tasa de crecimiento relativo de 0.159 y establecen que el crecimiento está determinado por la adaptación de estas al medio y son favorecidas por la disponibilidad de nutrientes.

## Composición química y nutricional

La composición química de las lemnáceas (lentejas de agua o “duckweeds” en inglés) varía considerablemente de acuerdo con la edad de la planta, la temperatura ambiental, el lugar de distribución y la edad fisiológica (Rusoff *et al.*, 1980). El Cuadro 2 hace referencia a las diferencias en composición proximal de diferentes especies de lemnáceas estudiadas por distintos investigadores.

Las lemnáceas son una rica fuente en proteína y pigmentos, y con ellas se obtienen concentrados de proteína foliar (Haustein *et al.* 1994 en Carranco *et al.*, 2002). Contienen 10 aminoácidos esenciales para animales en cantidades mayores a algunas fuentes vegetales utilizadas en la formulación de alimentos (Cuadro 3). Kalita *et al.* (2007) y Canales (2010) refieren que el contenido de aminoácidos esenciales de *L. gibba* es comparable a la pasta de soya y la harina de pescado. Nguyen Duc *et al.* (1997) reportan una digestibilidad para *Lemna* de 84 a 87.

Cuadro 2. Composición química proximal de diferentes especies de *Lemna* determinada por diversos investigadores.

Composición proximal % en base seca	<i>Lemna perpusilla</i>	<i>L. minor</i>	<i>L. minor</i>	<i>L. gibba</i>	L. sp
Humedad		11.3	-	8	11
Cenizas	9 - 11	15.9	25	17.31	14.1
Proteína cruda	19 -25	33.8	28	30.28	13.1
Extracto etéreo		3.2	5	4.28	2.3
Fibra	8-9	-	10	48	-
Extracto libre de nitrógeno	-	-	32	-	16.9
Energía	-	4.3	3.8	-	-
Referencia	Reyes <i>et al.</i> (2011)	Schneider <i>et al.</i> (2004)	Kalita <i>et al.</i> (2007)	Carranco <i>et al.</i> , (2002)	Brown <i>et al.</i> (1990)

Cuadro 3. Contenido de aminoácidos esenciales y no esenciales de distintas especies de *Lemna*, reportados por diversos autores comparado con otras fuentes vegetales alimenticias utilizadas en la alimentación animal.

	<i>L. spp.</i>	<i>L. spp</i>	<i>L.gibba</i>	<i>L. oscura</i>	Pasta soya	Amaranto
Aminoácidos esenciales (g/100 g de proteína)						
Arginina	0,95	6.7	4.48	5.71	3.53	8.1
Histidina	0,33	2.2	1.2	2.28	-	3
Isoleucina	0,80	4.0	3.68	4.36	2.08	3.9
Fenilalanina	0,93	5.3	4.18	8.25	2.31	4.3
Leucina	1,35	7.6	6.85	9.1	3.46	6
Lisina	0,96	4.2	4.18	6.01	2.70	6
Metionina	0,33	1.9	1.52	2	0.72	2.2
Treonina	1,18	4.2	3.89	4.88	1.96	3.7
Triptófano	0,13			0.96	0.57	-
Valina	1,06	5.6	5.07	6	2.47	4.4
Aminoácidos no esenciales (g/100 g de proteína)						
Alanina	1,04	5.9	5.54	5.99		
Acido aspártico	1,71	9.4	9.21	9.47		
Acido glutámico	1,71	9.9	9.34		-	11.1
Glicina	1,00	4.1	4.61	5.36		
Prolina	0,65	4.0	3.72	4.3	-	4.8
Serina	0,64	4.5	3.93	4.63		
Tirosina	0,50	3.9		3.09		
Referencia	Castillo <i>et al.</i> (1983)	Bui Huy (2000)	Gutiérrez (2000)	Carranco <i>et al.</i> (2002)	Cuevas <i>et al.</i> (2002)	Juan <i>et al.</i> (2007)

## **Compuestos bioactivos (CB) y mecanismos de acción**

Los compuestos bioactivos o biológicamente activos son metabolitos secundarios que las plantas producen para distintos fines, entre ellos protegerse de la luz ultravioleta o de sus depredadores, para atraer a sus polinizadores, entre otras funciones biológicas. Estos compuestos están asociados a la inhibición o prevención de patologías en humanos y animales, y también asociadas al estrés oxidativo, ya que ayudan a disminuir los niveles de azúcar o colesterol al suministrar antioxidantes (Mehrabi *et al.*, 2012; Vásquez-Piñeros *et al.*, 2012).

Es importante caracterizar los compuestos bioactivos así como las cantidades en las que se encuentran en los distintos alimentos para determinar el grado de protección contra enfermedades. En el Cuadro 4 se agrupan algunos utilizados en las producciones acuícolas y los clasificamos en “nutritivos” (referidos a sustancias esenciales en la alimentación) y “no nutritivos” (sustancias no son esenciales, capaces de interactuar con el sistema inmune para regularlo con su forma de acción) junto con su modo de acción y beneficios.

### Mecanismos de acción de los compuestos bioactivos

Los mecanismos de acción de los CB son diversos; desde la estimulación del crecimiento, promoción de la salud y fortalecimiento del sistema inmune, estimulando las células de defensa para formar trampas, promover la síntesis de compuestos y proteínas anticoagulantes, reducir infecciones mediante la acción sobre agentes extraños en el organismo. Los compuestos más estudiados son los compuestos fenólicos (isoflavonas, antocianinas, ácidos fenólicos), tocoferoles, carotenoides entre otros. Estos compuestos han demostrado capacidad antioxidante, antiproliferativa, antiinflamatoria y detoxificante contra la acción nociva de algunas sustancias provenientes de la dieta o del entorno (Kumar *et al.*, 2012; Ercisli *et al.*, 2012; Nile y Park, 2014).

A continuación se describe la capacidad antibacteriana y antioxidante.

## **Capacidad antibacteriana**

Algunos CB actúan sobre las estructuras bacterianas; principalmente la cápsula, pared celular y la membrana plasmática afectando los componentes celulares externos y la interacción con componentes citoplasmáticos (Neidhardt *et al.*, 1990).

Las bacterias Gram positivas son generalmente sensibles a CB tales como fenoles, alcoholes y bisbiguanidas, hidrofóbicos por naturaleza y son activos contra membranas de bacterias y levaduras produciéndoles una pérdida en el control quimiosmótico y por lo tanto la muerte celular (Lambert *et al.*, 2001). Al desestabilizar la membrana citoplasmática se altera la barrera permeable dando lugar a la liberación de componentes intracelulares, potasio, fosfatos inorgánicos, proteínas y ácidos nucleicos (efecto bacteriostático). También puede haber disipación de protones, lo cual altera el transporte activo, fosforilación oxidativa y síntesis de ATP en bacterias (Walsh *et al.*, 2003). La mayoría de los extractos vegetales poseen una mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas que contra bacterias Gram negativas (Herrera y García, 2006). Estas últimas son menos susceptibles a la acción de antibacterianos debido a la membrana externa que rodean y restringe la pared celular a la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de los lipopolisacárido que la cubren. La permeabilidad de la membrana citoplasmática es afectada por taninos que precipitan las proteínas, afectando el intercambio de sustancias nutritivas y de desecho provocando la muerte celular. Los compuestos esteroideos y los triterpenos pueden afectar determinados procesos de síntesis en la célula bacteriana o mecanismos, dependiendo de su naturaleza química. Por ejemplo, los hidrocarburos afectan la tensión superficial del entorno de la bacteria modificando la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias; y los triterpenos de naturaleza alcohólica alteran la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte (Abad, 2009).

Los aceites esenciales debido a que son de naturaleza hidrofóbica se pueden incorporar con lípidos de las membranas bacterianas modificando su estructura y permeabilidad, lo cual da lugar a fugas de iones y contenido celular provocando la muerte celular. Otra forma de acción es sobre las proteínas de membrana alterando la interacción lípido-proteína y afectando la actividad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de energía, importante para el funcionamiento celular (Ultee *et al.*, 2002).

**Cuadro 4. Clasificación de compuestos bioactivos.**

Compuesto	Derivados	Forma de acción	Beneficios	Fuente
<b>NUTRITIVOS</b>				
Proteínas y péptidos	Proteínas de fuentes no convencionales. Hidrolizados y péptidos derivados de proteínas lácticas. Decapéptido A233	A233 induce síntesis HC asociada a crecimiento de peces, síntesis de proteínas anticoagulantes, regulación de madurez sexual y de funciones inmunológicas.	Nutricionales, funcionales, biológicos. Antivirales. Regulación procesos fisiológicos.	Acevedo <i>et al.</i> , 2013; Martínez <i>et al.</i> , 2013. Junco y Villaño, 2010.
Ácidos grasos esenciales	Omegas 3 y 6	Tienen efecto nutritivo y promueven la salud fortaleciendo sistema inmune.	Crecimiento Deposición de lípidos.	Cengiz, Unlu y Bashan, 2003; Mukherjee <i>et al.</i> , 2010; Valenzuela y Sanhueza, 2009.
<b>NO NUTRITIVOS</b>				
Prebióticos: carbohidratos, oligómeros y polímeros	B glucanos	Es probable que estimula neutrófilos para formar trampas.	Modulación del sistema inmunológico. Evita translocación bacteriana (paso de gérmenes de origen gastrointestinal hacia órganos hígado, bazo y pulmón). Mantiene el equilibrio de la flora intestinal, mediante la fermentación y la producción bacteriana de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).	Balakrishna, 2013; Balakrishna y Keerthi 2012; Balakrishna y Kumar, 2012.
Probióticos	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Reduce efectos infecciones. Modula sistema inmune.	Beneficia crecimiento, la sobrevivencia, refuerza sistema inmune.	Irianto y Austin, 2002. Aly <i>et al.</i> , 2008 a y 2008 b.
Simbióticos	Prebiótico más probiótico	Participa en la flora intestinal y metabolismo de la síntesis de compuestos	Beneficia crecimiento y uso del alimento, aumenta supervivencia, mejora el sistema inmune.	Rodríguez-Estrada <i>et al.</i> , 2009; Mehrabi <i>et al.</i> , 2012.
Orujo de oliva	OP Alpechin fuentes de lípidos	Participación en procesos celulares	Propiedades cardioprotectoras	Nasopoulou <i>et al.</i> , 2011 y Nasopoulou <i>et al.</i> , 2013.
Antioxidantes	B carotenos de fuentes vegetales tanto acuáticos como terrestres. Flavonoides	Contrarrestan peroxidación de radicales libres que causan daño estructural a las células normales.	Protegen contra daños oxidativos.	Vásquez-Piñeros <i>et al.</i> , 2012.
<b>MINERALES</b>				
Selenio		Participa en importantes procesos metabólicos	Mejora variables zootécnicas productivas como ganancia de peso, conversión alimenticia, consumo de alimento y mortalidad. Combate estrés oxidativo.	Juniper <i>et al.</i> , 2006; Rayman, 2008; Küçükbay <i>et al.</i> , 2009; Pedrero y Madrid, 2009.

Elaboración propia.



## Capacidad antibacteriana

Almahy (2015) determinaron actividad antimicrobiana con extractos metanólicos de *Lemna minor* en 8 especies de microorganismos patógenos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Shigella flexneri*, *Bacillus megaterium* y *Salmonella typhi*) utilizando las técnicas de concentración mínima inhibitoria y el método de reducción de colorante con resazurina descrito por Kruppusamy y Rajasekaran (2009). La actividad mínima inhibitoria fue de 12 µg/ml de extracto metanólico.

Gulcin *et al.* (2010) demostraron que el extracto liofilizado y etanólico de la lenteja de agua (*L. minor*) tiene efecto antibacteriano contra *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *freun Citrobacterdii*, *Citrobacter koseri*, lactámicos *Neisseriaauna*, *Neisseria sicca*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacilluses* y *Streptococcus pneumoniae*. Así también actividad antioxidante y antifúngica contra *Candida parapsilosis* y *C. glabrata*. Por otra parte, *Lemna pauciscostata* ha demostrado capacidad antifúngica contra *Fusarium oxysporium*, *Penicillium digitatum*, *Aspegillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Rhizopus oryzae* and *P. stolonifer* (Effiong y Sanni, 2009).

Jani *et al.* (2012) reportaron un halo de inhibición menor a 7mm de la actividad antibacteriana de *L. gibba* para las bacterias *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (Gram positivas) y *Proteus vulgaris* (Gram negativa) con una CMI de 0.5 mg/ml con extracto de hexano. Mientras que Ghobrial *et al.* (2007) reportaron una inhibición de 6 mm con extracto metanólico refiriendo que los extractos metanólicos tienen mayor campo de inhibición bacteriano.

Los compuestos asociados a la actividad antibacteriana en las lemnáceas tiene que ver con la fase no cristalina de la pared celular de las lemnáceas que contienen una gran variedad de polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos. Los ácidos fenólicos son los principales componentes de bajo peso molecular de las ligninas (Waldron, 2010) además de ser ricos en ácidos cumárico y ferúlico (Merali *et al.*, 2013).

## **Capacidad antioxidante**

Los antioxidantes se utilizan para impedir o retardar las oxidaciones catalíticas y enranciamientos naturales o provocados con la colaboración de la luz, altas temperaturas, aire, residuos metálicos, etc. Se incluyen en la alimentación animal para prevenir las alteraciones oxidativas de las grasas, vitaminas liposolubles y pigmentos. Se pueden adicionar directamente a las propias grasas, harinas de pescado, etc. Su uso intenta evitar o retardar las reacciones oxidativas y prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales (Yao *et al.*, 2004).

Asociado a la función antioxidante se encuentra el proceso óxido-reducción con dos momentos: a) la oxidación que implica pérdida de electrones de hidrógeno con la ganancia de oxígeno en la molécula, b) reducción que significa ganancia de electrones de hidrógeno con la pérdida de oxígeno. Así el oxidante se reduce al reaccionar con aquella molécula que oxida. Este proceso es conocido como par óxido-reductor o balance redox. Cabe mencionar que el término oxidación a veces hace referencia a ciertas sustancias aisladas (oxidación de grasa) sin considerar que también se refiere a procesos celulares internos que conllevan la aparición de enfermedades. Por lo anterior es necesario conocer los mecanismos de defensa del organismo y las especies involucradas (*ídem*).

## **Especies involucradas en los mecanismos de defensa antioxidante**

### **Radicales libres**

Un radical libre (RL) es aquella figura química que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactiva, capaz de iniciar la peroxidación de lípidos, inactivar proteínas, o causar daño molecular de ADN o ARN. A partir de los RL se forman otros RL o especies reactivas (EROs o ROS, Reactive Oxygen Species en inglés) los cuales tienen vida media de microsegundos, razón por lo que pueden tener una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial (Coronado *et al.*, 2015).

Los EROs son productos del metabolismo celular se forman por reacciones químicas, enzimáticas o efecto de radiaciones ionizantes (ultravioleta, gamma,

hertziana), contaminantes ambientales, (atmosféricos, acuáticos, de suelos), dietas hipercalóricas, procesos inflamatorios y traumatismos, entre otros. Son sustancias nocivas debido a que están parcialmente reducidos y tienen una alta reactividad. El O es birradical libre ( $2 e^-$  NO apareados). Al producirse en grandes cantidades dañan los constituyentes celulares y provocan muerte celular (Barrera, 2015).

Los RL se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa (Venero, 2002).

### **Estrés oxidativo**

Cuando los radicales libres superan los antioxidantes naturales producen daño celular llamado estrés oxidativo. Esto ocurre durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía, especialmente en situaciones de gasto energético alto e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, entre otros (Mittler, 2002). De los radicales libres de oxígeno (RLO) inorgánicos los más importantes son el oxígeno molecular ( $O_2$ ), el radical-anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $HO^\cdot$ ) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). De los secundarios u orgánicos son el radical peróxido ( $ROO^\cdot$ ), el hidroperóxido orgánico (ROOH) y los lípidos peroxidados (Nimptsch y Pflugmacher, 2007; Gulcin *et al.*, 2010; Frikha *et al.*, 2011).

Los RLO se forman mediante procesos celulares aeróbicos de las células, como la oxidación del glicolato en el proceso de fotorrespiración, en la cadena de transporte electrónico en cloroplasto y mitocondria y por transformaciones metabólicas de determinados compuestos como la xantina y la glucosa; aunque las ERO estimuladas por contaminación del agua y estrés oxidativo es un mecanismo de toxicidad en los organismos acuáticos (Barrera, 2015).

### **Sistemas antioxidantes de defensa natos**

Los seres vivos en general cuentan con sistemas enzimáticos y compuestos antioxidantes de naturaleza no proteica para contrarrestar el efecto nocivo del estrés oxidativo y mantener la concentración de los radicales libres y ERO en niveles no tóxicos. El sistema enzimático consta de tres principales enzimas: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la peroxidasa (POD) y las del ciclo ascorbatoglutación (Arora *et al.*, 2002; Barrera, 2015).

Catalasa (CAT). Es una enzima que contiene hierro en su estructura, es de las más abundantes en la naturaleza y forma parte de los sistemas de detoxificación de las células animales, vegetales, bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Cataliza la ruptura del  $H_2O_2$  para formar  $H_2O$  y  $O_2$ . El  $H_2O_2$  es generado en el transporte de electrones de la cadena respiratoria y en ciertas reacciones de hidroxilación y oxigenación. La CAT tiene alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato, por lo que la reacción sólo se lleva a cabo cuando la concentración de peróxido es elevada (Arora *et al.*, 2002). En plantas, durante situaciones de estrés la CAT neutraliza las ERO, protege las membranas celulares y organelos del daño oxidativo. La CAT se localiza predominantemente en los peroxisomas, pero también se puede encontrar en citosol, mitocondria y glicosoma (Quintanar y Calderón, 2009).

Glutación peroxidasa (GPx). Es una enzima selenio-dependiente, cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutatión reducido (GSH) y se localiza en: citosol (eritrocitos), lisosomas (neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune). Existen 3 formas de GPx. La GPx-c o forma celular, la cual tiene mayor afinidad por el peróxido de

hidrógeno que por el lipoperóxido; la GPx –p o forma extracelular, la cual presenta afinidad semejante para ambos sustratos y la GPx-PH que tiene afinidad específica para los lipoperóxidos. Las formas GPx-c y GPx-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos (Venereo, 2002).

Superóxido dismutasa (SOD). Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu-SOD y Zn-SOD que contienen cobre y zinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio intermembranoso mitocondrial; Mn-SOD que contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial; Fe-SOD que contiene hierro y se localiza en el espacio periplasmático de la *E. Coli*. Estas enzimas dismutan el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y su principal función es la protección contra el anión superóxido (ídem).

### **Antioxidantes exógenos no proteicos**

#### **Carotenoides**

Los carotenoides son pigmentos tales como los betacarotenos, presentes en verduras y frutas amarillas y anaranjadas, y en verduras verdes oscuras, los alfacarotenos en la zanahoria, los licopenos en el tomate, las luteínas y xantinas en verduras de hojas verdes como el brócoli, y las beta criptoxantinas en frutas cítricas (Cartaya y Reynaldo, 2001). Son solubles en grasas (lipocromos); en la naturaleza los carotenoides son producidos vía isoprenoide compartida con diversos compuestos químicos como ácidos grasos esenciales, esteroides, y vitaminas A, D, E y K. Se les considera agentes pigmentadores, se encuentran bacterias, algas, plantas con flores y mamíferos.

Los carotenoides se dividen en dos grupos. Los carotenos hidrocarbonados altamente insaturados y las xantofilas. Los últimos son derivados oxigenados de carotenos y contienen uno o más grupos oxigenados substituyendo sitios particulares en el anillo terminal. Tienen una muy alta afinidad secuestradora de

radicales tóxicos de oxígeno los cuales resultan, principalmente, de la peroxidación de lípidos, pero también son generados durante el gasto respiratorio de los fagocitos (Miki, 1991; Meyers, 2000).

Thompson *et al.* (1995) mostraron que la ingestión de vitamina A dietaria afecta aspectos de inmunidad humoral o mediada por células en el salmón del Atlántico. Dado que los peces, como todos los animales, carecen de la capacidad de síntesis de novo de vitamina A, todo el requerimiento de vitamina A debe ser suministrado en la dieta. Esto puede ocurrir directamente por la adición de vitamina A a la dieta o indirectamente a través del metabolismo de carotenoides precursores tal como la astaxantina. Las propiedades antioxidantes de la astaxantina también pueden ser importantes para el metabolismo. Christiansen *et al.* (1995) mostraron que los niveles de vitaminas antioxidantes A, E, y C se incrementaron en el salmón del atlántico alimentado con una dieta suplementada con astaxantina en comparación con peces alimentados con una dieta libre de astaxantina.

El papel de los antioxidantes en especies acuáticas es de importancia considerable en vista de los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados presentes en muchos peces. La actividad antioxidante de la astaxantina ha recibido considerable atención, especialmente su correlación con la presencia de vitamina E. El alpha-tocoferol ha sido largamente reconocido como un importante antioxidante lípido-soluble. El  $\beta$ -caroteno es extremadamente eficiente secuestrador de oxígeno simple (singlet) y es clasificado como un antioxidante preventivo. Las evidencias sugieren que el papel de carotenoides en la captura de especies oxígeno activo es tan importante como el papel que esos compuestos juegan como moléculas de provitamina A (Meyers, 2000).

### **Vitaminas C y E**

Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina

E es el antioxidante lipofílico mayoritario. La vitamina E pertenece al grupo de los tocoferoles, habiendo cuatro isómeros, de los cuales el  $\alpha$  tiene mayor capacidad antioxidante. Su principal función es interrumpir la reacción en cadena de la peroxidación lipídica frente a daños fotooxidativos y reparar radicales oxidados de forma directa. Se encuentra presente en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, maní, carnes, pollo, pescados y algunas verduras y frutas, en tanto la vitamina C se puede encontrar en frutas y verduras (Avello y Suwalsky, 2006).

### **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son estructuras químicas formadas por un anillo aromático de benceno unido a uno o más grupos hidroxilo. Se clasifican en función de su estructura química básica como se puede ver en la Cuadro 5. Algunas veces, pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y otros compuestos fenólicos. Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos de antioxidantes más abundantes y ampliamente distribuidos, con más de 8000 estructuras polifenólicas conocidas (ídem). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres (scavengers), quelatante de iones metálicos y donadora de electrones. Su estructura química reacciona con los radicales libres y forman un radical intermedio más estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo permite que se deslocalicen los electrones (Avalos y Pérez, 2009).

Cuadro 5. Familias de compuestos fenólicos.

No. de Carbonos	Estructura	Clase
6	C6	Fenoles simples
7	C6-C1	Ácidos fenólicos
8	C6-C2	Acetofenonas, ácido fenol acético
9	C6-C3	Ácido hidroxicinámico, coumarinas, isocoumarinas, poliprenos
10	C6-C4	Naftoquinonas
11	C6-C1-C6	Xantonas
12	C6-C2-C6	Estilbenos, antroquinonas
13	C6-C3-C6	Flavonoides, isoflavonoides
14	(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanós, neolignanós
15	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Biflavonoides
18	(C6-C3) <sub>n</sub>	Ligninas
30	(C6) <sub>n</sub>	Catecolamina
N	(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Taninos condensados

### Flavonoides

Están representados por una gran familia de compuestos polifenólicos; se conocen más de 5000 estructuras diferentes. Tienen bajo peso molecular formados por la combinación de derivados de fenilalanina y el ácido acético (Cartaya y Reynaldo, 2001). Las diferencias entre los diversos grupos de flavonoides se establecen por el grado de aromaticidad (dobles enlaces conjugados), el patrón de hidroxilación (orden y número) o el tipo de sustituciones (glicosilación, metilación entre otros).



Las moléculas de flavonoides no unidas a un glúcido se conocen como agliconas, mientras que las formas glicosiladas se llaman glicósidos. Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a los flavonoides en 6 subclases: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanoles y antocianidinas (Cuadro 6) (Andersen *et al.*, 2006; Samprieto *et al.*, 2009; Avalos y Pérez, 2009). La estructura se caracteriza por un esqueleto difenilpropano (C6-C3-C6) formado por 3 anillos conocidos como A, B y C. El sistema benzoilo del anillo A y el sistema cinamoilo del anillo B facilita el análisis de flavonoides, ya que el anillo de benceno tiene una buena interacción vibracional y electrónica de sus niveles de energía permitiendo la absorción de luz ultravioleta en tres bandas de absorción a 184, 202 y 255 nm (Carocho y Ferreira, 2013). Cuando el anillo presenta sustituciones, puede haber conjugaciones, las cuales van a presentar desplazamiento batocrómicos en el espectro UV y proporcionar información estructural que permita identificar sus patrones de oxidación y tipo de flavonoide (Andersen *et al.*, 2006).

Cuadro 6. Clasificación de flavonoides según sus espectros UV (Andersen *et al.*, 2006; Samprieto *et al.*, 2009).

Tipo de compuesto	Banda I (nm)	Banda II (nm)
Flavonas y flavonoles	320-370	240-290
Flavonononas y flavononoles	270-295	236
Isoflavonas	300-330	240-270
Auronas	430	370
Cumarinas	311	274

## **Taninos**

Los taninos son una variedad de compuestos formados por fenoles unidos mediante enlaces C-C para formar polímeros. Estos se encuentran en un gran número de alimentos como el vino tinto, chocolate, frutas, legumbres, cereales y plantas terrestres y acuáticas. Los taninos se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados. Los primeros son polímeros heterogéneos formados por ácido gálico y azúcares simples, mientras que los segundos (proantocianidinas) son polímeros de flavonoides (Aguila-Ramírez, 2012; Carocho y Ferreira, 2013; Almahy, 2015).

## **Factores que afectan la actividad antioxidante**

La actividad de los distintos compuestos antioxidantes está muy relacionada con diversos factores como su estructura, el medio en el que se encuentran o sus propiedades químicas. La oxidación es una reacción que ocurre en la superficie de contacto entre dos fases (acuosa y lipídica) y depende de diversos factores como la velocidad de difusión del O<sub>2</sub> y su interacción con lípidos insaturados, la presencia de catalizadores, generadores de radicales, la presencia de antioxidantes y su distribución en el sistema en el que se presentan (Maestre del Cura, 2012).

## **Compuestos con actividad biológica de *L. gibba***

Las macrofitas de agua dulce *L. gibba* son fuentes importantes de celulosa, hemicelulosa y pectina, ácidos grasos esenciales (omegas 3 y 6) y polifenoles. Presentan una alta proporción de azúcares fermentables (33.1 % en masa seca) y baja cantidad de lignina (3% base seca). Los carbohidratos son el componente predominante (51.2 %) de los cuales el 19 % contribuye en la formación de almidón. Contiene del 12 a 14 % de proteína y pequeñas cantidades de lípidos (3.1 %) que varían dependiendo del medio donde se encuentre. Los ácidos fenólicos son los componentes principales de bajo peso molecular de la lignina y juegan un papel crucial en la vinculación con la hemicelulosa y la pectina.

El ácido cumárico está en mayor proporción ( $15\mu\text{m}\cdot\text{kg}^{-1}$  de materia seca), seguido del ácido truxílico ( $0.04\ \mu\text{m}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y ácido ferúlico ( $0.02\ \mu\text{m}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (Lovstad y Kraan, 2011; Zhao *et al.*, 2014).

Los metabolitos secundarios en las lemnáceas generalmente cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos o actúan como agentes alelopáticos (con efectos sobre otras plantas) (Khan *et al.*, 2008 y Zubia *et al.*, 2008). Han demostrado actividad inmunomoduladora asociada a su capacidad fagocítica, y se han utilizado como materia prima para la producción de remedios analgésicos y antipiréticos (Kiosev, 2001). Son considerados fuentes de antioxidantes para alimentos, medicamentos y farmacéuticos. Contienen polisacáridos llamados lemnanos que son parte de un complejo de pectina denominados apiogalacturonos. Se han encontrado 22 a  $16.7\ \mu\text{g}\ \text{mg}^{-1}$  de compuestos fenólicos totales y 4.5 a  $17.4\ \mu\text{g}\ \text{mg}^{-1}$  flavonoides totales (en extracto con agua y extracto etanólico, respectivamente). 45 $\mu\text{m}$  tuvieron efecto sobre la peroxidación de lípidos al 100 y 98 % así como actividad antibacteriana y antifúngica de microorganismos patógenos para el humano (Gulcin *et al.*, 2010).

### **Usos de las lemnáceas en la alimentación animal y en peces**

De acuerdo a los estudios disponibles, las macrofitas acuáticas se han utilizado como forraje e ingrediente en las dietas de diversos animales debido al alto porcentaje de proteína (por arriba de 30%), alta palatabilidad y fácil suministro, en la alimentación de cerdos, ganado, aves y peces, obteniéndose resultados productivos y una eficiencia económica satisfactoria (Arrivallaga y Arredondo, 1987; Bui *et al.*, 2002; Akter *et al.*, 2011; Witkoska *et al.*, 2012; Zetina-Córdoba, 2013). Se ha utilizado en forma fresca en aves y peces, y en forma de harina hasta 15% en dietas de pollos de ceba y hasta 40 % en gallinas ponedoras. En Bangladesh se ha utilizado en fresco en la alimentación de tilapias. El rendimiento en biomasa fresca es de 4 t/ha/día, equivalente en base seca a 80 t / ha / año. Un estanque de 0.6 ha, produce en un año 4,5 t de tilapia y se ha calculado que puede duplicar su rendimiento a 10 t/ha/año (Arrivallaga y Arredondo, 1987).

En México, la lenteja de agua se ha utilizado en la alimentación de cerdas gestantes y lechones, reemplazando la proteína de la pasta de soya en un 80%, con muy buenos resultados en producción. En Venezuela se usa conjuntamente harina de pescado con lemna y *Azolla filiculoides* en raciones para cerdos (Gülçin *et al.*, 2010).

*Lemna* en estado fresco se ha demostrado ser adecuada para el crecimiento de *Oreochromis niloticus*, tanto a nivel de laboratorio como de estanques rústicos en Taiwán. Al utilizar la lemna fresca como único ingrediente en la alimentación de la tilapia (monocultivo), carpa india y china (en policultivo), se obtuvieron buenos resultados debido a que disminuye la manipulación y el costo de la crianza, lo que ha demostrado que los peces cubren sus requerimientos en los estanques sólo con este alimento, a pesar de que las concentraciones de nutrientes en este estado se diluyen en las plantas frescas (González, 2004). De acuerdo a El-Sayed (2004) en la producción de la tilapia se puede sustituir hasta el 50% de la ración de alimento balanceado con lenteja de agua (*Lemna* sp.) y obtener resultados similares a los de la ración completa. González *et al.* (2013) alimentaron alevines de tilapia aurea (*Oreochromis aureus*) con 20 % harina de *Lemna trinervis* cuyo contenido de proteína y fibra bruta fue de 27.5 y 7.2%, respectivamente, logrando alcanzar niveles de peso vivo, ganancia, consumo, conversión alimenticia y supervivencia similares a los obtenidos con harina de pescado. González *et al.* (2014) reportan con *L. gibba* un crecimiento en el híbrido de tilapia de 1g/pez cuando se suministró en fresco, y cuando se incorporó al alimento balanceado en un 25 %, la tasa de crecimiento fue de 2 g/pez y la ganancia diaria se triplicó.

## Aspectos biológicos de *Ulva lactuca*

### Taxonomía.

Esta especie es una clorofita que pertenece al orden de los Ulotrichales, familia Ulvaceae y género *Ulva* (Cuadro 7). El nombre de esta clase es por la gran cantidad de pigmentos verdes (clorofila a y b) que presentan que se manifiesta en una coloración “verde pasto”. Además, contienen otros tipos de pigmentos como son carotenos, luteína, sinfonoxantina, una xantofila especial (Dawes, 1986) característica de las *Ulvas* de aguas profundas. A nivel mundial se registran 313 especies de *Ulva*, de las cuales 104 son las más comunes (Darley, 1987).

### Descripción general

Alga foliosa de color verde claro a intenso, de hoja redondeada, delgada, con bordes lisos y suaves al tacto. Estos folios llamados talos pueden ser laminares o tubulares de formas muy diversas (irregulares, cuneados, alineados, lanceolados, o profundamente divididos dentro de una línea lanceolada) (Steffensen, 1976; Santelices, 1991).

Cuadro 7. Taxonomía de la alga marina *Ulva lactuca*, Linnaeus.

Reino: Plantae	
Filo: Chlorophyta	
Clase: Chlorophyceae	
Orden: Ulotrichales	
Familia: Ulvaceae	
Género: <i>Ulva</i>	
Especie: <i>Ulva lactuca</i>	

Las láminas son anuales, mayoritariamente sin estipe; los procesos rizoidales son originados en células basales multi-nucleadas y se extienden hacia abajo entre los márgenes de la lámina, formando un ramillete generalmente perenne (Santelices, 1991). Presentan una gran plasticidad morfológica en respuesta a los factores ambientales (Steffensen, 1976) y pueden vivir fijas o flotando libremente (Hayden y Waaland, 2004).

### **Hábitat y distribución**

Se distribuyen desde la zona supralitoral hasta una profundidad de 8 m a 10 m, aunque se han observado talos de *U. lactuca* fijos a 23 m de profundidad (Steffesen, 1976). Muchas especies de este género son cosmopolitas y se encuentran en una gran diversidad de hábitats con grandes diferencias de salinidad, temperatura, turbidez y composición química (Hayden *et al.*, 2004).

### **Reproducción**

La reproducción en *Ulva* sigue un ciclo de luna llena o cambios de luna. La mayoría de las especies tienen un ciclo de vida digenético isomórfico. La reproducción asexual es por zoosporas bi o cuatriflageladas y la sexual generalmente es por anisogamia u oogamia. Es común la alternancia de generaciones isomórficas, aunque con sus excepciones. Estos organismos marinos mantienen una elevada tasa de crecimiento cuando la disponibilidad de nutrientes es alta (Dawes, 1986; El-Baky *et al.*, 2009).

Diferentes autores (Van den Hoek *et al.*, 1995) han verificado que con buenas condiciones ambientales los talos jóvenes crecen entre 3 mm y 5 mm en menos de un mes y se tornan adultas entre 3 y 4 meses. Su ciclo de vida es corto, de 5 a 8 meses. Los talos maduran en algunas semanas en ambientes de salinidades bajas y temperaturas altas.

## Composición química

La composición nutritiva de las algas depende de la especie, hábitat, madurez y condiciones ambientales (Ito y Hori, 1989; Benjama y Masniyom, 2011). Generalmente las algas verdes contienen de 10-30% de proteína bruta (peso seco), estas proteínas tienen varios aminoácidos de calidad nutricional (Wong and Cheung, 2000; Marinho-Soriano *et al.*, 2006; Cruz-Suárez *et al.*, 2010; Matanjun *et al.*, 2009). La composición bromatológica de *Ulva lactuca* obtenida del medio natural por distintos investigadores se muestra en el Cuadro 8. El contenido proteico de otras especies de *Ulva* son similares: *U. rigida* 29.5% y *U. pertusa* 20-26% en base seca. En condiciones de cultivo se ha determinado que *U. clathrata* contiene 20.7 – 27.2 % de proteína cruda, lípidos totales 1.1-1.5 %, fibra cruda 5.4-5.6 % y cenizas 16.6-38.4% en materia seca y el contenido de lípidos varía entre 0.6 y 1.7 (Cruz-Suarez *et al.*, 2008; Cruz-Suárez *et al.*, 2010; Ortíz, 2011).

Cuadro 8. Composición bromatológica de *Ulva lactuca* del medio natural.

*Proteína cruda	*Lípidos totales	*Fibra cruda	*Cenizas	Energía MJ kg <sup>-1</sup>	Referencia
27.2	0.3		20.9	323.9 *	Ortíz (2011).
29	0.5	2.8	17.8	15.7	Marsham <i>et al.</i> (2007)
17.44	2.5	-	32.85	-	Yildirim <i>et al.</i> (2009)
11.40	0.54	5.11	46.62	124.1	Carrillo <i>et al.</i> ,(2002).
21.1	1.7	-	17.5	14.1	Ventura y Castañón (1998).
15- 25	0.7	-	13-22	-	Indeergard y Minsaas (1991).

\* Porcentaje de materia seca en g/100 g.

\*\* En Kcal/100g.

Los lípidos contenidos en las algas varían de 1-6 % (peso seco). Contienen ácidos grasos poli-insaturados como el C18 y C20, ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido decahexaenoico (DHA), respectivamente (Dawczynski *et al.*, 2007; Kumari *et al.*, 2010).

### **Compuestos con actividad biológica de *Ulva spp.***

Existen varios compuestos reportados en las algas verdes marinas: polisacáridos sulfatados, terpenos, polifenoles y esteroides. La composición química depende de la distribución geográfica y estacional así como de los factores ambientales como temperatura del agua, salinidad, luz, nutrientes y disponibilidad de minerales (Silva *et al.*, 2013).

### **Polisacáridos sulfatados (PS)**

Son muchos los polisacáridos sulfatados obtenidos de varias especies de algas marinas especialmente de las divisiones Phaeophyta, Rodophyta y Chlorophyta. Estos son constituyentes importantes de las paredes celulares que se pueden extraer mediante una extracción adecuada o un método de precipitación, seguida de una purificación, caracterización y estudios biológicos. Dentro de las propiedades terapéuticas de los PS se encuentra reportada hasta ahora, capacidad antioxidante, antitumoral, inmunomodulador, anticoagulante, antiviral, antiprotozoaria, antibacteriano, antihiperlipidémicos (Patel, 2012).

Existen tres grupos de PS de algas: a) los provenientes de algas cafés, llamados fucanos; b) los carragenanos que son PS lineales extraídos de las algas rojas y c) los ulvanos que son los PS más solubles extraídos de la pared de las algas verdes, por ejemplo; de los géneros *Ulva*, *Enteromorpha*, *Monostroma*, *Caulerpa*, *Codium* y *Gayralia*. Los ulvanos están compuestos de repeticiones de disacáridos formados por ramnosa sulfatada ligada a ácido idurónico o xilosa; son los que se encuentran mayormente en la paredes celulares de las algas verdes, compuestos principalmente de ramnosa, ácido glucorónico, ácido idurónico, xilosa y trazas de galactosa, representando del 8-29% del peso seco de las algas (Lahaye y Robic 2007; Wijsekara *et al.*, 2011).

El mayor componente del ulvano es la ramnosa, un azúcar raro utilizado como precursor para la síntesis de compuestos aromáticos. Esta demostrado que los ulvanos y sus oligosacáridos son capaces de modificar la adhesión y proliferación



de células colónicas normales y tumorales así como la expresión de los factores de transformación del crecimiento y marcadores de superficie glucosilados relacionados con la diferenciación celular. Los polisacáridos de algas verdes no son degradados por las enzimas digestivas humanas ni por las bacterias del colon. El ulvano es un estabilizador y promotor, ya que se une a los factores de crecimiento involucrados en el crecimiento y reparación de la mucosa intestinal (Lahaye y Robic, 2007).

Los carotenoides, tocoferoles y polifenoles son antioxidantes de las algas marinas que tienen aplicación en la industria farmacéutica, alimenticia y biotecnológica (Abirami y Kowsalya, 2011). La presencia de los grupos sulfato, la composición química inusual y la estructura de los ulvanos es lo que confiere las propiedades biológicas diferentes (Lahaye y Robic, 2007; Wijesekara *et al.*, 2011). La composición y estructura de los polisacáridos sulfatados representan una fuente potencial de nuevos biopolímeros funcionales con aplicación biomaterial para la ingeniería de tejidos en medicina regenerativa. Aunque también tienen actividad biológica como anticoagulante, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa y antihiperlipidémica reduciendo triglicéridos del suero sanguíneo así como lipoproteínas de colesterol de baja densidad (LDL) y alta densidad (HDL) en micelas. La actividad antihiperlipidémica depende del peso molecular de las fracciones de ulvano, fracciones de alto peso molecular han sido más efectivas sobre el suero total y las LDL (Pengzhan *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2013).

### **Compuestos fenólicos**

Yildiz *et al.* (2014) encontraron en *Ulva rígida* un contenido total de fenólicos 0.73 (mg de ácido gálico g<sup>-1</sup>) y un alto contenido de  $\beta$ -carotenos importante como provitamina A, efectivo en la prevención y formación del oxígeno libre. Ortiz (2011) encontró en *U. lactuca* cantidades considerables de polifenoles ácido gálico en extracto etanólico (138 mg/L), en el alga fresca (29.22 mg/100g) y en el alga seca (146.11 mg/100g). De acuerdo a Sameemahmood *et al.* (2010) el ácido gálico posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y citoprotectoras.

### Tocoles y carotenoides en algas verdes

De acuerdo a Barrera-Arellano *et al.* (2002) las algas clorofíceas presentan cantidades significativas de tocoles. En el Cuadro 9 se observa el contenido de ellos en *U. lactuca* reportados por Ortíz (2011). Los carotenoides reportados en *Ulva* son luteína (1.9 µg/g en peso seco) y β-caroteno *trans* (12.8 µg/g en peso seco), éstos últimos en cantidades no muy significativas respecto a otras algas verdes como *Codium fragile* (198.6 µg/g en peso seco) que supera el promedio encontrado en zanahorias frescas (80.33 µg/g en peso seco) (Gayathri *et al.*, 2004). Se reporta que 15 mg/día beneficia la salud de humanos y animales (Krinsky, 1998). Ortíz (2011) refiere que a pesar de la mínima cantidad de lípidos presentes en las algas, los valores de vitamina E son muy relevantes y, contribuyen a la estabilidad de los ácidos grasos poliinsaturados presentes, previniendo la formación de radicales libres.

Cuadro 9. Contenido de tocoles (mg/kg) en *U. lactuca*.

	α-tocoferol	β-tocoferol	γ-tocoferol	γ-tocoferol	δ-tocoferol	Tocoles totales
<i>U. lactuca</i>	5.4	9.2	25.8	963.5	25.3	1029.2

Fuente: Ortíz (2011).

### Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Las macroalgas son fuente de ácidos grasos poliinsaturados de gran valor nutricional y efectos benéficos (Papadopoulos *et al.*, 2002; Selvin *et al.*, 2009; Margret *et al.*, 2009).

Participan en el metabolismo y como componentes estructurales. Son los principales componentes de los fosfolípidos de las membranas celulares y aceites de almacenamiento de las células. Se utilizan en la biosíntesis de eicosanoides como las hormonas e incluyen tromboxanos, prostaglandinas y leucotrienos. Tienen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidante (Burdge *et al.*, 2003; Calder, 2010; Huang y Ebersole, 2010; Pereira *et al.*, 2011).

Wahbeh (1997) reporta en *U. lactuca* 66.3% de PUFAs y Pereira *et al.*, (2011) en *Ulva sp.* una dominancia de ácido linoleico (AL, C18:2n-6) pero con mayores porcentajes de ALA (16%) respecto a AL (7%). En el Cuadro 10 se muestran los ácidos grasos encontrados por Ortíz (2011) y Pereira *et al.*, (2011) en *U. lactuca* y *Ulva sp.* Alamsjah *et al.* (2005) encontraron que los ácidos hexadeca 4-7,10,13 tetraenoico (HDTA), Octadeca-6,9,12,15 tetraenoico y ALA del extracto metanólico de *U. fasciata* extraídos mediante un bioensayo fraccionado, mostró una potente actividad algicida contra fitoplancton como marea roja demostrando ser un control biológico de florecimientos algales (Alamsjah *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2013).

Cuadro 10. Contenido de ácidos grasos esenciales encontrados en las algas *Ulva* por distintos investigadores.

Ácido graso	<i>Ulva lactuca</i> (%)	<i>Ulva sp.</i>
Saturados		
C12:0	0.15	-
C14:0	1.22	2.28
C15:0	0.22	0.49
C16:0	15.01	50.11
C17:0	---	--
C18:0	9.53	1.14
C20:0	0.20	--
C22:0	0.29	5.01
C24:0	10.12	--
Monoinsaturados		
C15:1	1.20	--
C16:1 isómero	0.74	--
C16:1	2.01	11.81
C16:isómero	-	--
C17:1	0.19	--
C18:1 isómero	-	5.51
C18:1 $\omega$ 9 trans	0.39	
C18:1 $\omega$ 9 cis	29.40	
C18:1 $\omega$ 7 cis	3.65	
C20:1	4.51	
C22:1	0.81	
Poli insaturados		
C16:2	1.10	--
C18:2	1.83	--
C18:2 $\omega$ 6	8.91	5.65
C18:3 isómero	-	--
C18:3 $\omega$ 3	4.69	16.51
C18:4 $\omega$ 3	0.44	--
C20:2	0.26	--
C20:4 $\omega$ 6	0.36	--
C20:5 $\omega$ 3	1.08	1.50
C22:6 $\omega$ 3	0.85	--
Referencia	Ortiz (2011)	Pereira <i>et al.</i> (2012)

## Capacidad antibacteriana de ulváceas

En los últimos años se han estudiado algunas plantas tanto de agua dulce como de agua marina debido a sus propiedades para combatir y prevenir las enfermedades en la producción acuícola. Extractos de algas marinas que han demostrado efecto sobre el crecimiento y sobrevivencia bacteriana son *Sphaerococcus coronopifolus*, *Enteromorpha linza*, *Cladophora coelothrix*, *Oodium tomesitosum*; algas cafés *Colopomenia sinuosa*, *Padina pavonica*; algas rojas: *Gelidium sp*, *Laurencia obtusa*, *Polisiphonia sp*, *Hyphenia museiformis*. *Sargassum wightii* y *Ulva lactuca* tienen actividad antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus* en camarón; *Galaxuara rugosa* contra *Staphylococcus aureus*; y de las algas verdes, dulceacuícolas *Spirogyra sp.*, *Chara* y *Cladosphora* contra *Escherichia coli* (Immanuel *et al.*, 2004; López *et al.*, 2007).

El primer compuesto reportado en *Ulva fasciata* fue el ácido acrílico, que actualmente se utiliza también para cicatrizar heridas. En esta especie también se ha identificado y posee actividad antimicrobiana debida principalmente a la presencia de Npalmitoil-2-amino-1,3,4,5-tetrahidroxiocetadecano compuesto que ha demostrado actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* (López, 2015).

Águila-Ramírez *et al.* (2012) encontraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con extracto etanólico de *U. lactuca* del Golfo de California. Abd El-Baky *et al.* (2008) sugieren que la actividad antibacteriana de *U. lactuca* está relacionada directamente con el contenido lipófilo de los extractos, particularmente con la presencia de esteroides y altos niveles de ácido acrílico. Mientras que Troncoso *et al.* (2015) atribuyen la fuerte actividad inhibitoria frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae* y *E. coli* de los extractos obtenidos con diclorometano y etanol a partir de una mezcla de *Ulva rigida* y *U. lactuca* a la presencia de fitol (3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno-1-ol), un diterpeno acíclico monohidroxilado reconocido por su propiedades antibacterianas, antimicóticas y antivirales (Santoyo *et al.*, 2011).

López (2015) registró actividad de extractos etanólicos de *U. lactuca* de Baja California contra *Vibrio parahaemolyticus* la cual relaciona con la presencia de diterpenos oxigenados del tipo labdano. Existen distintas tasas de inhibición de extractos algales contra microorganismos patogénicos, lo cual depende del tipo de disolvente utilizado en la extracción (agua, metanol, n-hexano, acetato de etilo, cloroformo, benceno, etc.) (Lima *et al.*, 2002; Taskin *et al.*, 2007). Las variaciones en las tasas de inhibición se atribuyen a varios factores (variaciones estacionales, periodo y localización de muestreo, y protocolo para la preparación y extracción de algas: algas frescas o secas, solvente, etc.) (Lima *et al.*, 2002; Tüney *et al.*, 2006; Frikha *et al.*, 2011). Por otra parte, la tasa de las actividades biológicas generalmente depende de la naturaleza y cantidad de los compuestos activos en los extractos de algas (Frikha *et al.*, 2011).

En *Ulva spp.* las moléculas antibacterianas con propiedades antimicóticas y/o antivirales son fitol 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno-1-ol (Plaza *et al.*, 2010; Santoyo *et al.*, 2011). En extractos crudos de acetato de etilo se identificó a la 6-Metil-2-fenilquinolina como molécula antimicrobiana por Meléndez *et al.* (2008). Y en extractos de acetato de etilo y diclorometano se detectó un compuesto llamado neofitadieno el cual tiene propiedades antimicrobianas y antivirales (Santoyo *et al.*, 2011). Además se han identificado cadenas alifáticas insaturadas de 16 a 43 carbonos a las que se les atribuyen propiedades antimicrobianas; hexadecano (C16), heptadecano (C17), octadecano (C18), nonadecano (C19), eicosano (C20), ácido palmítico y ácido  $\alpha$ -linolénico metil ester Plaza *et al.* (2010).

### **Usos de las ulváceas en la alimentación animal**

Está bien documentado la alimentación con algas marinas en vacas y ovejas mejora la composición de la leche (Papadopoulos *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2004). Y la suplementación alimenticia con algas en cerdos, mejora las condiciones de salud (Gardiner *et al.*, 2008; Dierick *et al.*, 2010). La aplicación de *U. lactuca* para fines de alimentación en comparación con la producción de energía puede ser ventajosa y representan un valor económico más alto en un futuro con una mayor presión sobre la tierra agrícola (Moller *et al.*, 2011).

Nakagawa (2004) menciona que las algas verdes como *Ulva* o lechuga del mar están disponibles como suplemento alimenticio de peces. Hamauzu y Yamanaka (1997) reportan que al incluir macroalgas en la alimentación de peces mejora la vitalidad, resistencia a enfermedades y calidad de la canal. Nakagawa y Montgomery (2007) reportan que después de adicionar 5% de *Ulva* en la dieta del pez “dorada negra” se elevó la fagocitosis. El Tawil (2010) reporta que la inclusión de 15 % de *Ulva sp.* como suplemento para tilapia roja es el óptimo para un buen crecimiento y desarrollo sin efectos adversos sobre la eficiencia alimenticia o la tasa de sobrevivencia.

## **Biología de la tilapia**

### **Hábitos y especies en México**

De acuerdo a Manual de Buenas Prácticas de Producción de Tilapia con Inocuidad Alimentaria (SAGARPA, 2009), la Tilapia es un pez de hábitos omnívoros, fitófagos y con tendencia a carnívoros. Se considera un pez exótico (por ser una especie introducida), es originaria de África, pertenece a la familia de los cíclidos y está representada por cerca de 100 especies pertenecientes a seis géneros diferentes, se distribuye en todo el mundo.

Las especies de Tilapia más conocidas e introducidas en México son:

1. *Oreochromis mosambicus* (mojarra negra)
2. *Oreochromis niloticus* (mojarra plateada)
3. *Oreochromis urolepis* (hornorum)
4. *Oreochromis aureus* (mojarra azul)
5. *Tilapia rendalli* (mojarra herbívora)
6. *Oreochromis sp.* (tilapia roja o mojarra roja)

### **Morfología**

Presenta cuerpo comprimido y discoidal, raramente alargado; boca protáctil, generalmente ancha, con frecuencia con labios gruesos; mandíbulas con dientes cónicos y ocasionalmente algunos incisivos; solo un orificio nasal a cada lado de la cabeza, cuya función es la entrada y salida simultánea de la cavidad nasal; aletas pares (pectorales y ventrales) e impares (aletas dorsales, caudal y 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, cuya función es mantener el equilibrio del cuerpo durante la natación y al lanzarse en el agua (Saavedra, 2006; Rodríguez y García, 2010).



## **Reproducción**

Presenta diferenciación sexual externa; el macho presenta dos orificios bajo el vientre (el ano y el orificio urogenital) y la hembra tiene tres (el ano, el poro genital y el orificio urinario). El ano muy visible en forma de agujero redondo. El orificio urogenital del macho es un pequeño punto y el de la hembra es microscópico, apenas visible a simple vista. Generalmente se reproduce entre 20-25 °C (trópico). La madurez sexual, en función de la edad y la talla, es por lo general temprana, a tamaño pequeño y edad juvenil, se alcanza a los 2 ó 3 meses. En áreas subtropicales, la temperatura de reproducción es menor de 20 - 23 °C. La reproducción se ve afectada por la luz, el aumento de la iluminación o disminución de 8 horas dificultan la reproducción (Saavedra, 2006; CONAPESCA-SAGARPA, MICHOACAN, 2012).

Antes del cortejo las tilapias construyen nidos haciendo hoyos en el sedimento de los cuerpos de agua. Los machos establecen y defienden agresivamente los territorios de sus nidos. Luego de aparearse los utilizan para desovar. Una vez que desova la hembra sus huevos y son fertilizados recogen los huevos del nido y los incuban en su boca (Figura 1). Después los huevos eclosionan en dos o cuatro días, dependiendo de la temperatura del agua. Los embriones de nado libre absorben su saco vitelino de tres a cuatro días. Después los alevines se alimentan activamente de una dieta que puede ser de plancton y desechos (Rodríguez y García, 2010).

Para la reproducción de tilapia se consideran los parámetros ideales de crecimiento; así la talla óptima varía entre 250 a 500 g y de 12 a 15 cm de longitud. El éxito de la reproducción y sobrevivencia de los alevines y crías depende en gran parte de la selección de los reproductores. El Cuadro 11 resume los parámetros reproductivos de la Tilapia.



Figura 1. Diferenciación de sexos de la Tilapia en estado adulto (Saavedra, 2006).



Figura 2. Incubación de huevos en la boca por la Tilapia.

Cuadro 11. Parámetros reproductivos de la Tilapia.

Peso de reproductores	1- 3 Kg
Madurez sexual	Machos (4-6 meses), hembras (3-5 meses)
No. de desoves	5 a 8 veces /año
Temperatura de desove	25 a 31 °C
No. huevos/hembra/desove	Condiciones óptimas > 100
Vida útil de reproductores	2 a 3 años
Tipo de incubación	Bucal
Tiempo de incubación	3 a 6 días
Proporción de siembra de reproductores	3 hembras x 1 macho
Tiempo de cultivo	6 a 7 meses (talla comercial 600 a 700g)

Fuente: SAGARPA-CONAPESCA, 2009.

## **Crecimiento**

El crecimiento de la tilapia es longitudinal para todas las etapas de su desarrollo a partir del alevín. El crecimiento dependerá de varios factores como la temperatura, densidad, línea o variedad, y tipo de alimentación principalmente. La mayor tasa de crecimiento la presentan los machos de 6 a 8 meses, el crecimiento promedio de estos es de 18 a 25 cm, con un peso de 150 a 300 gr (SAGARPA-CONAPESCA, 2009; Rodríguez y García, 2010).

## **Hábitos alimenticios**

Las tilapias poseen branquiespinas las cuales, les permiten filtrar el agua para obtener su alimentación, microalgas y otros organismos acuáticos microscópicos. Los alimentos ingeridos pasan a la faringe donde son mecánicamente desintegrados por los dientes faríngeos. Esto ayuda en el proceso de absorción en el intestino, el cual mide de 7 a 10 veces más que la longitud del cuerpo del pez (Rodríguez-García, 2010).

En base a los hábitos alimenticios de la tilapia, existen tres grupos:

- a) Especies Omnívoras (su alimentación es a base tanto de plantas como de animales: *O. mossambicus* (especie que presenta mayor diversidad en los alimentos que ingiere), *O. nilóticos*, *O. spilurus* y *O. aureus*).
  
- b) Especies Fitoplanctófagas (se alimentan de las algas y organismos microscópicos conocidos como fitoplancton) *O. macrochir*, *O. alcalicus*, *O. galilaeus* y *S. melanotheron*.
  
- c) Especies Herbívoras (se alimentan exclusivamente de plantas): *T. rendalli*, *T. zillii*, *T. sparmanni*.

Los dos usos más importantes del alimento absorbido son mantenimiento y crecimiento. El exceso de alimento es almacenado en forma de grasa una vez satisfechos los requerimientos (SAGARPA-CONAPESCA, 2009).

### Producción y costos de la Tilapia

La tilapia es el tercer producto acuícola de producción después del camarón y la carpa. Según la FAO (2015) la producción mundial de tilapia en 2013 fue de 97.2 millones de toneladas en peso vivo correspondientes a la tilapia del Nilo (71.75%), tilapia mosámbica (2.39%), tilapia azul (0.12%) y otras especies (25.63%). En México la producción fue de 170 toneladas (Figura 3).

Los principales 10 países productores de tilapia son China, Egipto, Indonesia, Filipinas, Tailandia, Brasil, Blangadesh, México, Vietnam y Colombia. Los principales productores latinoamericanos en sistemas controlados por acuicultura son: Honduras, Colombia, Ecuador, Costa Rica, Estados Unidos, Jamaica, El Salvador, México y Guatemala (Cuadro 12).



Figura 3. Producción de tilapia por captura y acuicultura mundial (FAO, 2015).



## **Producción en México**

La producción de tilapia en México constituye una fuente importante de alimentos así como apoyo en la generación de empleos, recreación, comercio y bienestar económico para el país. Tiene gran potencial debido a la gran variedad de sistemas costeros y marinos (12,500 km<sup>2</sup> de superficie de lagunas costeras y esteros y 6,500 km<sup>2</sup> de aguas interiores como lagos, lagunas, represas y ríos) y litorales (629,925 Ha en el Pacífico y 647,979 Ha en el Golfo de México y el Mar Caribe) con los que cuenta el país (CONAPESCA, 2003).

De acuerdo al Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura (2014), la acuicultura ha permitido al hombre, la posibilidad de cultivar especies acuáticas mediante diversas técnicas, factores y actividades, ayudando así al desarrollo económico y comercial del país. En los últimos diez años, esta actividad presenta una tasa de crecimiento promedio de 1.44%. Dentro del país, la producción de tilapia ocupa el quinto lugar de la producción pesquera. Sin embargo por su valor comercial, se ubica en el tercer lugar. El 91 % de la producción de tilapia es por acuicultura; la cual se cultiva en 31 estados de la República Mexicana, siendo los mayores productores: Chiapas, Tabasco, Guerrero, Estado de México y Veracruz.

## **Costos de producción de tilapia**

La producción de tilapia ofrece una mayor rentabilidad respecto a la cría de otras especies, debido a su menor requerimiento de alimento; por ejemplo, la tilapia sólo necesita 1.2 kg de comida para producir 1 kg de carne de alto valor nutritivo. Por otro lado destaca su característica de especie poiquiloterma que le permite obtener mayor cantidad de carne al no necesitar mayor energía (MINCETUR, 2011). Sin embargo, Tacon (2006) menciona que los alimentos balanceados para la acuicultura son mucho más costosos que los de otras especies de animales de producción debido a la amplia composición nutritiva con la que se formula. El costo típico de los alimentos acuícolas varía de \$300 a \$1,500 dólares por tonelada. Parte del alto costo de los alimentos acuícolas formulados se debe a una alta cantidad de nutrientes costosos (harina de pescado, aceite de pescado,

pigmentos, eufasiáceos (krill), harina de calamar y lecitina) y a su fabricación mediante procesos costosos (extrusión, peletización con vapor). La harina y aceite de pescado son ingredientes clave en la formulación de alimentos balanceados para especies acuícolas como las tilapias (GLOBALFISH, 2015) por lo que los costos de producción supera el 60 % de los costos de producción total. Así la producción de tilapia enfrenta los desafíos de mejorar la rentabilidad y la sustentabilidad económica. Estudios científicos claramente han mostrado que se pueden formular alimentos para peces con niveles bajos de harina y aceite de pescado mediante el uso de fuentes de proteína y lípidos más económicas. Una de las alternativas es el uso de subproductos de la industria pesquera y productos agropecuarios económicos. Sin embargo, fuentes económicas de proteína y lípidos (harina de soya, harina de gluten de maíz, harina de canola, harina de carne y hueso, harina de plumas y grasas animales) han mostrado tener limitaciones importantes, de tal manera que no se pueden usar niveles muy altos en la dieta de la mayoría de las especies acuícolas (El-Sayed 1999 y 2004).

Fitzsimmons (2003) afirma que la acuicultura tiene oportunidades de reducir sus costos de producción a través de la investigación genética y la sustitución de alimentos aunque varían de acuerdo al país en donde se produzca (Cuadro 13). Según Zimmermann (2014, Cap. 16), China es el número uno en la producción de tilapia a nivel mundial. En este país, un alimento para engorda tiene 30% de proteína cruda (PC) y cuesta USD \$0.66 - 0.70/kg; en Tailandia, 32% con un precio de USD \$0.60-0.64/kg. El FCA promedio de ambos productos es de 1.30:1. En 2012, en China el costo de producción fue de USD\$1.33/kg, debido a los altos precios en alimentos y mano de obra. La industria pagó el mismo costo de producción, es decir, los productores mantuvieron los stocks en las granjas provocando el cierre de granjas por falta de ventas y de producto. De esta manera el pescado se vendió directamente en el mercado local (tilapia viva a USD\$1.36-1.6/kg). En ese entonces, los precios del alimento, mano de obra y alevines chinos fueron muy similares a los de Latinoamérica, cuando históricamente eran casi 50% menores.

Una estrategia que utiliza China para mantenerse como líder en la producción de tilapia es que utiliza subproductos para bajar los FCA's y los costos durante su invierno de 4 meses donde no se puede cultivar tilapia y producir pescado en 6, 7, 8, 9 ó 10 meses es básicamente lo mismo. Tailandia presenta costos 30-40% más bajos que China debido en parte a su extensión territorial, más pequeña y por lo cual, su logística es eficiente (Cuadro 14) (ídem).

Cuadro 13. Costo de producción de tilapia en 2003 en distintos países.

País	Precio USD/kg
China	0.70
Filipinas e Indonesia	0.80
Brasil, Ecuador, Tailandia	0.85
Honduras, Costa Rica	0.90
México	1.00
Taiwan	1.05
USA	2.00
Canadá	2.10

Fuente: Lango (2011).

Cuadro 14. Crecimiento promedio y costo de producción de tilapia en China y Tailandia.

	PC %	Costo (Dls/kg)	FCA	Crecimiento Promedio (g/meses)
China	30	0.66 a 0.70	1.3 : 1	500/5-6
Tailandia	32	0.60 a 0.64	1.3 : 1	1.2-1.5/7-8

En México, el costo de producción es 25-30% superior a China y de acuerdo al Sistema Producto Nacional de Tilapia México 2020 la rentabilidad de la inversión en la producción de tilapia es del 25% independientemente del tamaño de la granja (Cuadro 15) (Zimmermann, 2013).



Cuadro 15. Costo de producción de tilapia en los últimos años en distintos países.

Lugar	Costo producción/kg USD/kg		PC %
	2012	2013	
China	1.33	1.43	28-30
Latinoamérica	1.32	NR	30
Colombia	0.75 – 0.80	NR	30
Brasil	0.72 -0.80	0.84	28-30
USA	NR	0.60 – 0.64	32-36
México	0.88 – 0.95	1.10 – 1.20	32-36

NR= No reportado

### **Cultivo de Tilapia**

CONAPESCA-SAGARPA (2012) refiere que el cultivo de la Tilapia es rentable debido principalmente a:

- Su curva de crecimiento es rápida.
- Sus hábitos alimenticios que pueden ser adaptados a dietas suplementadas, obteniendo un incremento en el rendimiento.
- Poseen tolerancia a altas densidades de siembra.
- Poseen alta tolerancia a condiciones y factores extremos, como baja concentración de oxígeno, de pH, manejo, transferencias, cosecha entre otros.
- Relativamente fácil de producir.

## **Parámetros de calidad de agua para el cultivo de tilapia**

Cualquier sistema de cultivo debe contar con un flujo corriente y continuo de agua; si es posible, contar con un sistema de recirculación y cumplir con ciertos parámetros físico-químicos y microbiológicos. Uno de los condicionantes para el cultivo de tilapia es la calidad de agua; definida como el conjunto de variables físicas, químicas, biológicas y tecnológicas que determinan el estado óptimo para el crecimiento y desarrollo de los peces en cultivo (Ingle de la Mora *et al.*, 2003; Shoko *et al.*, 2014). Los parámetros físico químicos que determinan la calidad de agua para el cultivo en base al manual de buenas practicas de producción de tilapia (SAGARPA, 2009) se detallan a continuación.

### **Oxígeno**

Es un parámetro crítico. El grado de saturación del oxígeno disuelto es inversamente proporcional a la altitud y directamente proporcional a la temperatura y pH. El requerimiento mínimo es de 4.5 mg/L y el ideal es 8-10 mg/L. A concentraciones de 0 a 0.3 ppm los peces pequeños sobreviven a períodos de tiempo corto; de 0.3 a 2 ppm es letal las exposiciones largas y a concentraciones de 3 a 4 ppm en períodos cortos llegan a sobrevivir los peces pero se afecta el crecimiento. Algunos factores que disminuyen el oxígeno disuelto son la descomposición de la materia orgánica, alimento no consumido, heces fecales, animales muertos, aumento de la tasa metabólica por el incremento de la temperatura, respiración del plancton, desgasificación, nubosidad ya que en días nublados las microalgas no producen suficiente oxígeno, y la densidad de siembra.

### **Temperatura**

Los peces son poiquilotermos (la temperatura corporal depende de la temperatura del agua) y altamente termófilos (dependientes y sensibles a los cambios de la temperatura). El rango óptimo para el cultivo varía entre 23°C y 32°C. Los cambios de temperatura afectan directamente la tasa metabólica; entre mayor sea la temperatura, mayor tasa metabólica y, por ende, mayor consumo de oxígeno.

El crecimiento de los peces es afectado negativamente con las variaciones de temperatura entre el día y la noche, pero puede subsanarse con el suministro de alimentos con altos porcentajes de proteína (30% hasta 35 y 40%).

### **pH**

Es la concentración de iones hidrógeno en el agua. El rango óptimo es entre 6.5 a 9.0. Valores por arriba o por debajo, causan cambios de comportamiento en los peces como letargia, inapetencia, retardan el crecimiento y retrasan la reproducción. Valores de pH cercanos a 5 producen mortalidad en un período de 3 a 5 horas, por fallas respiratorias; además, causan pérdidas de pigmentación e incremento en la secreción de mucus de la piel. Cuando se presentan niveles de pH ácidos, el ion  $Fe^{++}$  se vuelve soluble afectando las células de los arcos branquiales y por ende, disminuyendo los procesos de respiración, causando la muerte por anoxia (asfixia por falta de oxígeno). El pH en el agua fluctúa en un ciclo diurno, principalmente influenciada por la concentración de  $CO_2$ , por la densidad del fitoplancton, la alcalinidad total y la dureza del agua. El pH para tilapia debe de ser neutro o muy cercano a él, con una dureza normalmente alta para proporcionar una segregación adecuada del mucus en la piel.

### **Amonio**

Se produce de la degradación de la materia vegetal, proteínas del alimento no consumido y materia en descomposición. La forma gaseosa es conocida como amonio no ionizado; es el primer producto de excreción de los peces y es tóxico. La toxicidad del amonio en forma no ionizada ( $NH_3$ ), aumenta cuando la concentración de oxígeno disuelto es bajo, el pH indica valores altos (alcalino) y la temperatura es alta. Cuando los valores de pH son bajos (ácidos), el amonio no causa mortalidades. El rango de la concentración de amonio es entre 0.001 a 1 ppm (valores cercanos a 2 ppm son críticos).

El rango de tolerancia para la tilapia se encuentra entre 0.6 a 2.0 ppm. Altas concentraciones de amonio puede ocasionar un bloqueo del metabolismo en los peces, daño en las branquias, afectación del balance de sales, producir lesiones en órganos internos, causar inmuno supresión y susceptibilidad a las enfermedades, reducir el crecimiento y sobrevivencia así como causar exoftalmia (ojos brotados) y ascitis (acumulación de líquidos en el abdomen).

### **Nitritos**

Son compuestos altamente tóxicos que se generan durante el proceso de transformación del amoníaco a nitratos. La toxicidad de los nitritos depende de la cantidad de cloruros, temperatura y concentración de oxígeno en el agua. La concentración debe mantenerse debajo de 0.1 ppm, ayudando con recambios altos (60-70%), haciendo buen manejo de alimentación.

Existen procesos naturales que dañan la calidad del agua como la erosión, el estancamiento, los insectos, los desechos animales; sin embargo los mayores contaminantes son el uso de fertilizantes y agroquímicos que por escurrimiento llegan hasta la fuente más cercana, cambiando su estado y afectando la flora y fauna que la rodea (SAGARPA-2009). Por lo anterior, una granja acuícola debe situarse en zonas donde no se ha practicado y sea libre de prácticas agrícolas y debe apegarse a la Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002 de vigilancia de la calidad del agua para reducir los riesgos de transmisión de enfermedades a la población.

## Enfermedades

Una acuicultura sana requiere medidas profilácticas. La sanidad piscícola atiende todas aquellas enfermedades de origen infeccioso (virus, bacterias, hongos, parásitos, etc.) (Cuadro 16) y enfermedades no infecciosas como son las de tipo genético, nutricional o funcional. Su objetivo primordial es mantener y mejorar la salud de los peces para obtener el óptimo desarrollo y reproducción en el tiempo mínimo recomendable, lo cual es importante para conseguir la tasa de crecimiento señalada para cada especie (Conroy, 2006). Las enfermedades son una limitante en la producción piscícola, se hacen presentes en forma esporádica o periódica y pueden manifestarse en forma asintomática sin ocasionar daños visibles, o bien, desarrollar un cuadro clínico específico de una enfermedad que podría terminar hasta en la muerte (Romano y Mejía, 2003). Generalmente los problemas de salud de los peces en cultivo están relacionados directamente con diversos factores (estresores) y alteraciones de su fisiología (Awad, 2010). El estrés es considerado el principal factor que afecta la salud de los peces, y puede conducir a enfermedades infecciosas. Los estresores pueden ser agudos o crónicos, y su impacto sobre los peces son aditivos y acumulativos, por lo menos por un corto período (Schmittou *et al.*, 2004). Los estresores pueden ser químicos, biológicos, físicos o de procedimientos (Awad, 2010) (Figura 4).

La tilapia ha sido considerada una especie acuícola muy resistente a enfermedades; sin embargo, en la actualidad este atributo ha sido desacreditado por las numerosas referencias sobre casos de epizootias, algunas muy devastadoras, que se presentan en diferentes partes del mundo (Li y Shuang-Hu 2011; Keawcharoen *et al.*, 2015). Las bacterias patógenas más frecuentes en ambientes dulceacuícolas que producen los mayores perjuicios económicos son *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S.iniae*, *S. milleri* y *Francisella* entre otras (Mateo *et al.*, 2011).

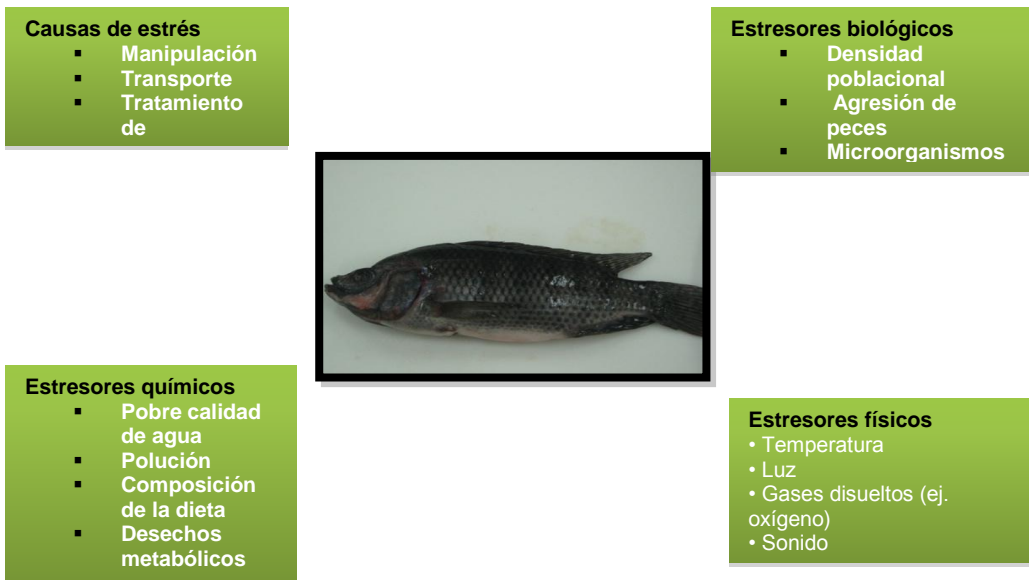


Figura 4. Estresores que afectan la salud de los peces (Awad, 2010).

Cuadro 16. Algunas enfermedades comunes en tilapia, sus causas, sintomatología y tratamiento.

ENFERMEDAD	CAUSA	SINTOMATOLOGIA	TRATAMIENTO
Argulosis	Varias especies de <i>Argulos spp.</i>	El pez se aísla del cardume. Piojode speco blanquecino de 3 a 4 mm de diámetro (disco) se fija en el cuerpo del pez principalmente en lacabeza donde chupa la sangre.	Dipterex o Masoten (Polvo) dosis de 0.5 mg por litro de agua en el estanque por semana, hasta su erradicación.
Lerneasis levantadas	Varios Estadios de Lerneas: adulta y nuaplio	Parásitos visibles sobre el cuerpodel pez escamas	Dipterex o Masoten(Polvo) dosis de 0.5 mgpor litro de agua en el estanque por semana
Ergasilosis	Varias especies Ergasilus	Los peces se aíslan, dejan de comer, los parásitos se alojan en las branquias, miden de 1 a 3 mm	Dipterex o Masoten (Polvo) dosis de 0.5 mg por litro de agua en el estanque por semana, hasta su erradicación
Exoftalmia	En los peces	Ojos saltones, aislamiento, no comen, hasta la muerte	No existe tratamiento. Sacar los peces, cuando presentan los síntomas antes descritos y quemar y enterrar
Triconidiasis	Parásito Protozooario <i>Trichodinna spp.</i>	Exceso de mucosidad en cuerpo de branquias. Desprendimiento de escamas y enrojecimiento en zonas afectadas.	Exceso de mucosidad en cuerpo de branquias. Desprendimiento de escamas y enrojecimiento en zonas afectadas
Saprolegniasis o micosis	Hongo saprolegnia	Manchas blancas algodonosas,sobre el cuerpo, aletas y cabeza.Aislamiento del pez, no come y s	Permanganato de potasio en cristales, en concentraciones de 2 mg por litro de agua en el estanque, semanalmente hasta su erradicación
Ascitis infecciosa	Bacterias <i>Aeromonas Pseudomonas</i>	Abultamiento del vientre, aislamiento. Forma crónica, lesiones ulcerosas en la piel y músculos, deshilachamiento de aletas. Forma aguda: líquido sanguinolento en el vientre, ojos hundidos, inflamación de órganos interiores	Oxitetraciclina (Polvo) terramicina mezclar de 3a 8 en un kg de alimento en proporción al 3% del peso total del pez durante 7 días.

SAGARPA (2009).

## **Enfermedades nutricionales**

Dentro de las enfermedades no infecciosas son comunes las enfermedades nutricionales y difíciles de definir, ya que por lo general la causa no es solo la carencia de algún nutriente en la dieta. La inapetencia y mal desarrollo son los principales síntomas de una inadecuada nutrición (Silveira *et al.*, 2005). En inanición por falta total de alimentos, raciones mal equilibradas en la proporción de nutrientes o manejo incorrecto del alimento, los peces adquieren generalmente un color más oscuro y su carne es más blanda de lo normal. En los alevines el crecimiento deja de ser homogéneo y el cuerpo se vuelve desproporcionado en relación a la cabeza, de ahí que se le da el nombre de "cabeza de alfiler". Mediante la necropsia se ha observado que las branquias son pálidas, la vejiga natatoria distendida, la grasa abdominal es escasa o nula y las vísceras mal desarrolladas (Centeno *et al.*, 2007). Debido a una carencia de proteínas, ocurre un retraso en el crecimiento. Los peces tienen una baja capacidad de metabolizar los carbohidratos, una alta proporción de estos provoca degeneración de la grasa del hígado. En cuanto a lípidos son esenciales el ácido linoleico y el linolénico, ya que las tilapias no pueden sintetizarlos, su deficiencia provoca despigmentación, erosión de las aletas e infiltración grasa del hígado (SAGARPA, 2009).

## **Evaluación del estado de salud en peces**

### **Parámetros hematológicos**

Hahn-Von-Hessberg *et al.* y Gultepe *et al.* (2014) señalan que los estudios de sangre en peces son un instrumento para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades infecciosas, deficiencias y cambios ambientales; cabe señalar que permiten un adecuado monitoreo y control sanitario de las poblaciones de peces en cultivo permitiendo prevenir grandes pérdidas económicas en el sector acuícola. Algunos de los factores que pueden influir sobre los parámetros sanguíneos son la especie, estadio, sexo, estrés, temperatura, fotoperiodo, estado nutricional, calidad de agua (Silveira *et al.*, 2005; Salazar-Lugo *et al.*, 2012).



El estudio sanguíneo es denominado hemograma e incluye la determinación de los índices eritrocitarios que indican con precisión cuánto mide un eritrocito promedio, en volumen, peso y concentración de hemoglobina, así como la revisión de un frotis de sangre periférica al microscopio para detectar alteraciones morfológicas de tres poblaciones celulares, leucocitos, eritrocitos y plaquetas. La mayor parte de las alteraciones que se identifican en el hemograma son consecuencia de modificaciones patológicas. Las cantidades de hematíes en los peces varían según la especie. Los teleósteos en promedio presentan una concentración entre  $1.0$  y  $3.0 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup> en la sangre. El tamaño varía entre  $10$  y  $15\mu\text{m}$  en su eje largo y entre  $8$  y  $10\mu\text{m}$  en su eje corto; la proporción de eritrocitos maduros también depende de cada especie y del ambiente. De acuerdo a Centeno *et al.* (2007) y Hahn-Von-Hessberg *et al.* (2011) los índices eritrocitarios son los siguientes.

El Volumen Corpuscular Medio (VCM). Se refiere al promedio del volumen de cada eritrocito. Permite identificar anomalías como macrocitosis, microcitosis o normocitosis en la muestra. El VCM es un parámetro estable en el tiempo. Su unidad de medición son los femtolitros. Se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Hematocrito} \times 10 / \text{Recuento eritrocitos}$$

Hemoglobina Corpuscular Media (HCM). Representa la carga media de hemoglobina de cada eritrocito. Permite identificar anomalías como normo e hipocromía. Su unidad de medición son los picogramos. Se obtiene mediante la siguiente fórmula: Hemoglobina  $\times 10$  / Recuento eritrocitos

Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM). Representa la concentración media de hemoglobina de cada eritrocito. Se expresa en porcentaje y se calcula con la siguiente fórmula: Hemoglobina  $\times 100$  / Hematocrito

Los recuentos celulares y hemoglobina pueden ser medidos en forma directa por los autoanalizadores utilizando diferentes métodos como impedancia, difracción de luz, láser y otros, y sus sistemas de cálculo integrado permiten obtener los índices eritrocitarios en forma automática (Torrens, 2015).

La alteración más frecuente que se encuentra al interpretar un hemograma es la anemia. El uso de los índices eritrocitarios VCM (tamaño) y CHCM (cromía), combinado con el recuento reticulocitario, permite orientar la búsqueda etiológica, clasificando la anemia como: normocítica-normocrómica, microcítica e hipocrómica, macrocítica, regenerativa o arregenerativa. La anemia se define por la concentración de hemoglobina, que debe ser menor a la establecida como normal para la edad y sexo del organismo. El hematocrito es un parámetro calculado por los equipos automatizados por lo que no se utiliza en la definición de anemia. El recuento eritrocitario no se correlaciona con la cantidad de hemoglobina, pues depende del tamaño eritrocitario (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011; Torrens, 2015). A continuación se describen los tipos de anemia en base a Torrens (2015).

#### Anemia Microcítica

Presenta eritrocitos de tamaño inferior a lo normal (VCM disminuido), generalmente asociada a hipocromía (HCM, CHCM disminuidas). La causa más frecuente es la ferropenia, cuya confirmación la entregará la historia clínica del paciente y el estudio de Fe (cinética de Fe y ferritina).

#### Anemia Normocítica Normocrómica

Se observa disminución de la hemoglobina y hematocrito, sin alteración de los índices eritrocitarios. Las causas pueden ser diversas; causas hematológicas p.e., hipoplasia y aplasia medular o etapas iniciales de anemia por sangrado (previo a la producción de ferropenia). Causas no hematológicas, la anemia de insuficiencia renal crónica por déficit de eritropoyetina.

El estudio de sangre en tilapia en nuestro país tiene sus dificultades por lo que deben hacerse las consideraciones pertinentes o adaptaciones para su interpretación. Una de las dificultades es que los peces carecen de cavidad medular dentro de sus huesos, y por ello, las células precursoras y las maduras no están separadas. Entonces las técnicas de frotis y tinción sanguíneos en peces deben ser adaptadas (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Por otra parte, a pesar de que la tilapia es cultivada en todo el mundo, en Latinoamérica son pocos los reportes acerca de sus parámetros hematológicos normales (*ídem*), por lo que no existen tablas de referencia por etapa de cultivo que permitan identificar las variaciones causadas por cambios ambientales, calidad de agua o tratamientos. Por lo anterior, sería deseable establecer los rangos de referencia por edades los cuales deben ser establecidos por las granjas de cultivo refiriendo su sistema de producción, fuente de agua, especie de cultivo, sexo, edad, calidad de alimento y condiciones ambientales.

### **Parámetros del sistema inmunológico**

Otra forma de evaluar la salud de los peces es mediante el estudio de algunos componentes de los mecanismos del sistema inmunológico, el sistema de defensa innato o inespecífico y el sistema adquirido o específico (Cuadro 17). La importancia relativa de ambos puede variar con la edad del pez y están influenciados por distintos factores. Este trabajo hace énfasis en el estudio del componentes del sistema inespecífico.

### **Sistema de defensa innato o inespecífico**

Filogenéticamente es el sistema más antiguo. Protege a los organismos contra el ataque de un amplio espectro de microorganismos invasores. Utiliza órganos especializados diseñados para filtrar hacia fuera y para responder a los microorganismos que entran al tejido tisular del cuerpo y a través de la corriente sanguínea mueve moléculas y células para responder rápidamente al ataque (Saurabh y Sahoo, 2008).

Cuando los peces entran en contacto con un agente patógeno, el sistema innato es la primera línea de defensa que se activa contra el huésped, y puede evitar varios ataques de microorganismos o mantenerlos bajo control hasta que se desarrolle una respuesta adquirida. Una característica importante de este sistema es que existe antes o apenas después de la eclosión mientras que la inmunidad específica tarda algunas semanas o meses para desarrollarse durante la ontogenia. Sus moléculas importantes son la lisozima, mieloperoxidasas, superóxidos, proteínas de fase aguda, interferones, complemento, properdin, lisinas y aglutininas; la medición de algunos de ellos son parámetros inmunes innatos importantes que se han utilizado como indicadores de la respuesta al estrés y resistencia a las enfermedades (idem).

Cuadro 17. Componentes de los mecanismos del sistema inmunológico de peces

<b>Sistema de defensa innato, natural o inespecífico</b>	<b>Sistema Inmune adquirido o específico</b>
Componentes celulares receptores de membrana: Leucocitos B y T Granulocitos Trombocitos Macrófagos y Células citotóxicas inespecíficas y humorales (corticoesteroides: cortisol, corticotrofina (CRF))  Sustancias solubles Hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Sistema complemento (proteínas y glucoproteínas)	Produce anticuerpos (Ab) con memoria a través de un reconocimiento específico del antígeno.

El sistema inmune innato puede ser estudiado mediante el tegumento constituido por escamas, espinas y secreciones tóxicas que contribuyen a la defensa del organismo y el moco (presente en la piel, el intestino y las branquias), contiene diversas sustancias de defensa que incluyen péptidos antimicrobianos, factores

del complemento e inmunoglobulinas (Bonilla-Morales y Rondón-Barragán, 2011).

### **Sistema complemento**

El componente que frecuentemente se mide es el sistema complemento, el cual es uno de los factores más importantes que se refiere a la “actividad del suero de la sangre que complementa la acción de los anticuerpos”. Se trata de una cascada enzimática de glicoproteínas, más de 35 moléculas que circulan en el plasma sanguíneo, distribuidas en las membranas celulares que regulan la respuesta innata y específica, entre ellas se encuentran proteasas, inhibidores, inactivadores y receptores (Bayne y Gerwick, 2001). Se encarga de señalar la presencia de patógenos además de degradarlos por quimiotaxis u opsonización. Otras funciones del sistema complejo son: lisis celular y subcelular (virus, bacterias, etc), opsonización de agentes no propios del huésped que promueven la fagocitosis, quimioatracción celular, respuesta inflamatoria, limpieza de inmunocomplejos. Además de hematopoyesis temprana en el tejido óseo y vascularización, regeneración de tejidos y órganos, desarrollo de sistema nervioso central, sobrevivencia de neuronas e inmunocitos. Los componentes del complemento son designados por número (C1-C9), por letras (factor D) o nombre trivial (factor de restricción homólogo). En la sangre, sus componentes se encuentran en forma inactiva como proenzima (zimógeno) o clivaje proteolítico (exponiendo el sitio activo). Las subunidades interactúan con otras formando complejos funcionales con propiedades enzimáticas (Bonilla-Morales y Rondón-Barragán, 2011).

### **Activación del complemento**

Presenta tres vías de activación la clásica (mediante inmunocomplejos), la alterna (independiente de anticuerpos) y por lecitinas todos con la finalidad de formar un complejo de ataque de membrana (CAM) capaz de lisar la célula blanco (microorganismo patógeno o cuerpo extraño) a través de la formación de múltiples poros en la membrana, ocasionando una pérdida del líquido electrolítico celular y mediar la respuesta de opsonización (ídem).

La vía clásica se activa cuando los anticuerpos de Inmunoglobulina M (IgM) o IgG se unen a un antígeno (inmunocomplejo); la molécula adquiere nuevas propiedades. La vía de las lectinas se activa mediante los patrones de receptores de reconocimiento (PRR) que reconocen patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) específicamente de carbohidratos asociados a glicoproteínas y glicolípidos (e.g. N-acetil- glucosamina) aunque los vertebrados presentan lectinas tipo-C (dependientes de calcio) (ídem).

Cuando los monocitos/ macrófagos en peces ingieren componentes bacterianos u agentes extraños producen citocinas proinflamatorias como la interlequina-1 (IL-1), Interlequina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que estimulan la producción de proteínas de fase aguda (APP) en los hepatocitos, liberando componentes del complemento, proteína reactiva-C (CRP) y lectinas de unión a manosa (MBL) (Swain *et al.*, 2008).

La vía alterna es independiente de anticuerpos, corresponde a la inmunidad innata humoral teniendo como componente central el C3 (familia de proteínas  $\alpha$ 2-macroglobulina -  $\alpha$ 2 M, incluye C4 y C5). Se activa espontáneamente cuando se une a agentes patógenos siendo capaz de interactuar con proteasas formando una convertasa que formará enlaces covalentes en la fracción C3 (Fredslund *et al.*, 2006). En la destrucción de agentes patógenos el sistema complemento es capaz de regularse para prevenir la destrucción de tejidos o células propias del hospedador, lo hace mediante controladores solubles unidos a la membrana y que son básicamente complejos proteicos específicos (Bonilla-Morales y Rondón-Barragán, 2011).

## Actividad de la lisozima

La lisozima es una de las enzimas más estudiadas de la respuesta innata en peces. Está presente en el mucus, tejido linfoide, plasma, suero y otros fluidos del cuerpo de muchos peces (Magnadóttir, 2010). Es secretada por leucocitos polimorfonucleares y actúa sobre el peptidoglicano de las paredes de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Niyonsaba y Ogawa, 2005). La lisozima es uno de los principales componentes de los gránulos primarios y secundarios de los neutrófilos y el principal producto secretado por los macrófagos, por ello puede actuar en la activación de estas células frente a los procesos de inflamación por la presencia de bacterias (Carrillo, 2013).

Se han identificado tres tipos de lisozimas el tipo c (pollo o convencional), el tipo g (tipo ganso) y el tipo i (tipo invertebrado). Los peces presentan lisozima tipo g cuya característica es una cantidad variable de residuos de cisteína. A través de estudios en lubina se ha producido una lisozima recombinante con *Escherichia coli* que se utiliza para investigar la actividad de la enzima a diferentes pH y temperaturas y para realizar ensayos antibacterianos contra patógenos de peces típicos (Buonocore *et al.*, 2014).

La desnaturalización por calor da lugar a dímeros que conserva dos puentes disulfuro que tienen actividad lítica frente a las paredes bacterianas Gram positivas y negativas. El dímero de la lisozima simula la síntesis de algunas interleucinas e interferones alfa y gamma; modula la generación de TNF alfa (factor de necrosis tumoral), previniendo los efectos negativos por cantidades excesivas e induce la actividad de células fagocíticas y también previene la producción de radicales libres. Se ha sugerido que la lisozima en las células del sistema inmunológico se encuentra en forma dimérica, parece ser que esta estructura es menos tóxica que el monómero, y además ejerce un efecto inmunomodulador (Malinowski, 2001).

En los peces la lisozima es un frecuente indicador de las funciones inmunes inespecíficas. Además funciona como una opsonina y activador del sistema de

complemento y la fagocitosis La actividad de la lisozima se ha demostrado que varía dependiendo del sexo, edad y tamaño, estación, temperatura del agua, pH, sustancias tóxicas, infecciones y grado de exposición a sustancias que generan estrés (Saurabh y Sahoo, 2009; Esteban, 2012).

### **Sistema inmune específico**

Representado por los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Igs) que son glicoproteínas localizadas en el suero sanguíneo (40-50%). La única Ig presente en los peces óseos y cartilagosos es de la clase "IgM like", en teleósteos se presenta en forma de tetrámero o formas monoméricas en el suero. Las paredes de los vasos sanguíneos son permeables a las Igs del suero y por ello se las encuentra en la mayoría de los fluidos tisulares, en el plasma, la linfa y el mucus epitelial. En los peces óseos se encuentra la IgM dimérica en el mucus y se supone que es sintetizada localmente. Las células productoras de anticuerpo derivan de linfocitos B, los cuales por interacción con el antígeno se transforman en células plasmáticas. Los factores que influyen notoriamente la producción de anticuerpos y la respuesta inmune son los cambios estacionales y la temperatura (Pulendran y Ahmed, 2011; Bonilla-Morales y Rondón-Barragán, 2011; Esteban, 2012).

### **Alimentos funcionales en la prevención de la salud**

El concepto de alimento funcional surgió en Japón en los 80's para mantener y mejorar la salud de su población por el incremento de ciertas enfermedades relacionadas con el estilo de vida. En 1991, el Ministerio de Salud y Bienestar japonés publicó la reglamentación de la comercialización de algunos alimentos funcionales considerados como "alimentos para uso específico en la salud" (Foods for specified health uses o FOSHU) y definidos como aquellos alimentos con componentes que desempeñan una función favorable y específica en las funciones fisiológicas del organismo humano más allá de su aporte nutricional (Gormley, 2006; Herrera *et al.*, 2014).



De acuerdo a Durán y Valenzuela (2010) un alimento FOSHU debe de cumplir tres requisitos:

- 1) Contar con evidencia científica de su eficacia, incluyendo estudios clínicos.
- 2) Contar con estudios adicionales en humanos orientados a un consumo seguro.
- 3) Determinar analíticamente sus compuestos bioactivos.

De acuerdo a Chasquibol *et al.* (2003), Gormley (2006) y Herrera *et al.* (2014), el alimento que se proporciona a una especie determinada es funcional, si además de su valor nutritivo, aporta algún efecto añadido y beneficioso sobre las funciones orgánicas, es decir, mejora la salud y el bienestar, reduce el riesgo de enfermedad o ambas cosas y puede consumirse como parte de una dieta normal.

De acuerdo a Hasler y Brown (2009) el International Lyfe Sciences Institute de Europa (ILSIE) considera que un alimento funcional es:

- Un alimento natural.
- Un alimento al que se le ha agregado o eliminado un componente por alguna tecnología o biotecnología.
- Un alimento donde la naturaleza de uno o más componentes ha sido variada.
- Un alimento en el cual la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido modificada.
- Cualquier combinación de las anteriores posibilidades.

Un compuesto funcional es una sustancia que contiene la unión de dos o más elementos que generan una “actividad biológica” y se encuentran en los alimentos comunes o en alimentos funcionales.

El compuesto funcional debe diferenciar tres aspectos importantes: las funciones (papel esencial), las acciones (respuestas, beneficiosas o adversas, fisiológicas o farmacológicas) y las asociaciones (correlaciones de los componentes de los alimentos con algún aspecto o finalidad fisiológica o clínica que puede o no mostrar una relación causal) (Olmedilla *et al.*, 2008).

La ciencia de los alimentos funcionales tiene como objetivo identificar las interacciones beneficiosas entre un alimento determinado y una o más funciones del organismo así como obtener evidencias sobre los mecanismos implicados en la interacción. De tal manera que el desarrollo de alimentos funcionales está asociado con 1) la identificación y caracterización de compuestos activos, de su biodisponibilidad y los efectos del procesamiento tecnológico; 2) el entendimiento científico de cómo se modulan procesos biológicos involucrados en la salud y 3) el descubrimiento y validación de biomarcadores para ser utilizados en la evaluación de estos nuevos productos en pruebas biológicas y para determinar tanto su seguridad como sus posibles efectos beneficiosos a la salud (Hasler y Brown, 2009; Herrera *et al.*, 2014).

Un alimento funcional no constituye un grupo de alimentos como tal, sino que resulta de la adición, sustitución o eliminación de ciertos componentes a los alimentos habituales. Sus efectos pueden ser el mantenimiento de la salud y bienestar, la disminución de riesgos de enfermedades, la promoción de crecimiento óptimo, entre otros. De hecho, los alimentos funcionales pueden suplir las carencias de las sustancias necesarias para una alimentación, crecimiento y prevención de las enfermedades (Chasquibol *et al.*, 2003).

Una propuesta para la acuicultura moderna es evolucionar de alimentos enriquecidos a alimentos funcionales mediante la exploración de plantas acuáticas y terrestres de las regiones de producción y utilizarlas como ingredientes funcionales, ya que contienen una alta concentración de compuestos con actividad biológica producidos por la influencia del medio acuático hostil (corrientes, mareas, nutrientes, radiación solar, entre otras) donde crecen estas plantas. El uso de

plantas acuáticas naturales como ingredientes funcionales promoverá una acuicultura sostenible manejando ingredientes funcionales capaces de modular la micro flora intestinal o incorporar fácilmente material sin necesidad de grandes adaptaciones en los protocolos de producción que sean eficaces para la producción, prevención y tratamiento de enfermedades.

## **HIPÓTESIS**

Las plantas acuáticas *Lemna gibba* y *Ulva lactuca* pueden funcionar como ingredientes funcionales en la suplementación de dietas para juveniles de tilapia debido al contenido de algunos compuestos con actividad biológica y producir un efecto positivo sobre el crecimiento y la salud de las tilapias, similar o mejor al de los mananoligosacáridos (inmunoestimulantes) disminuyendo el riesgo de contraer enfermedades.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar los compuestos nutricionales y bioactivos de las plantas acuáticas *L. gibba* y *U. lactuca* y evaluar su efecto sobre el crecimiento y la salud de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) a través de un alimento funcional.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Colectar *L.gibba* y *U. lactuca* del medio natural en la época de primavera y realizar un estudio de su composición química nutricional, microbiológica y de algunos compuestos bioactivos.
2. Evaluar el crecimiento y el estado de salud en juveniles de tilapia alimentados con un alimento funcional formulado utilizando las plantas acuáticas como ingrediente funcional.

## LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se realizó dentro de dos Campus: Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI) perteneciente a la UNAM y la Universidad del Papaloapan (UNPA) Campus Loma Bonita, Oaxaca (Figura 5).

La mayoría de los análisis químicos se realizaron en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Ubicada en el municipio de Tlalnepantla Estado de México, situada geográficamente al noroeste del Estado de México, sobre el Valle de México en su porción septentrional y al norte del Distrito Federal. La cabecera del municipio, Tlalnepantla de Baz, se ubica en los 19°32' de latitud norte y a los 99°11' de longitud oeste. Tlalnepantla limita al norte con los estados de Querétaro e Hidalgo; al sur, Morelos y Guerrero; al este, Tlaxcala y Puebla; al oeste Michoacán (INAFED.gob.mx).

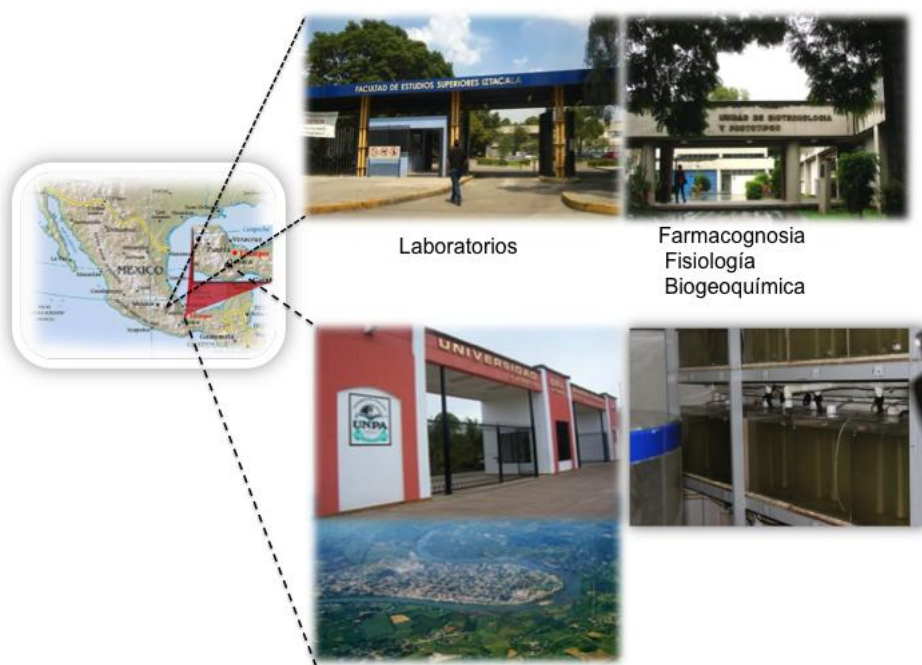


Figura 5. Lugar de trabajo. Arriba Facultad de Estudios Superiores Iztacala y abajo, Universidad del Papaloapan Campus Loma Bonita.

La UNPA Campus Loma Bonita se encuentra en el Estado de Oaxaca en la región de la cuenca del Papaloapan en la parte media en las coordenadas 95°53' longitud oeste y 18°06' latitud norte, a una altura de 30 msnm (metros sobre el nivel del mar). Limita al norte con el estado de Veracruz, al sur con el municipio de Santiago Jocotepec y San Juan Lalana, al poniente con los municipios de san Juan Bautista Tuxtepec y Santiago Jocotepec, al oriente con el estado de Veracruz. El municipio cuenta con una superficie de 507.02 km<sup>2</sup> y la cabecera municipal se encuentra en la margen derecha del Río Obispo. En el municipio y sus alrededores se forman una gran cantidad de cuerpos acuáticos (arroyo agua clarita, laguna cujuliapan, agua fría, el mangle entre otras) que aunados las condiciones climáticas de la región forman condiciones ideales para la actividad acuícola (Figura 6).

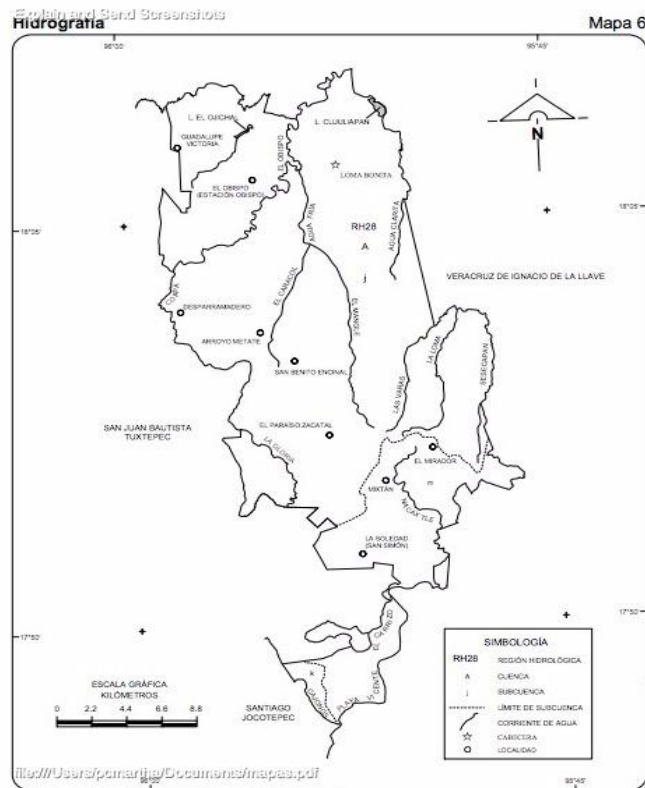


Figura 6. Carta hidrológica de Loma Bonita, Oaxaca (INEGI, 2006).

## MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se muestra el esquema general de trabajo.

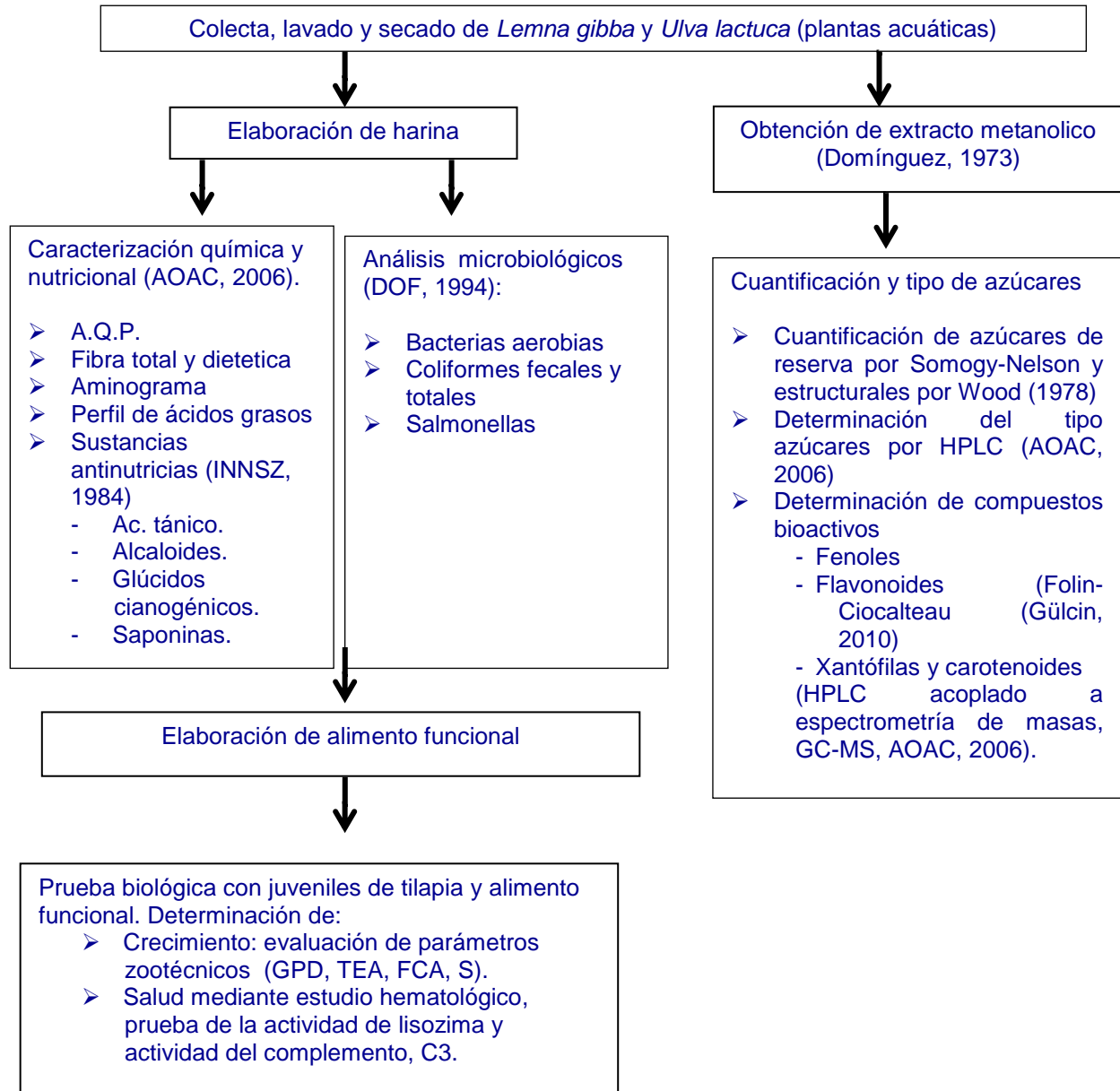


Figura 7. Esquema general de trabajo

## **Colecta de las plantas acuáticas y su procesamiento**

Se colectó *Ulva lactuca* en “playa Norte” y playa “Gaviotas” en Veracruz Puerto y *Lemna gibba* fue colectada en los cuerpos acuáticos del municipio de Loma Bonita, Oaxaca durante los meses de Julio - Agosto. Las plantas acuáticas se lavaron con agua de pozo a chorro de agua corriente. Posteriormente, se pusieron a secar al Sol con volteos constantes. Posteriormente se tomó una muestra al cuarteo de cada una de las plantas acuáticas para luego terminarla de secar en horno a 45°C durante 2 horas. Finalmente, fueron molidas cada una de las plantas utilizando una licuadora convencional y en el caso de *L. gibba* con ayuda de un mortero pasando la molienda por un tamiz de 0.01 micras de diámetro para obtener la harina.

## **Caracterización química y nutricional de las plantas acuáticas**

### **Análisis químico proximal (A.Q.P.)**

A la harina de cada planta se le practicó un análisis químico proximal (A.Q.P.) de acuerdo a la A.O.A.C. (2006), que consistió de la cuantificación de nitrógeno total ó proteína cruda, por Kjeldahl, utilizando el factor de conversión de 6.25 para calcular el contenido de proteína (Método oficial 984.13, A-D); lípidos totales por Soxhlet (Método oficial 954.02); fibra cruda, ceniza por ignición a 550 °C (Método oficial 942.05); humedad (Método Oficial 945.16), extracto libre de nitrógeno por el método de Wendee.

### **Fibra total, fibra dietética insoluble y fibra dietética soluble**

La cuantificación se realizó con el kit enzimático Megazyme (K-TDFR) basado en los Official Methods of Analysis of AOAC International (Methods: 985.29, 991.43) y la Association of Analyses Chemist, AACC (Methods: 32-07,32-21,32-05,32-06 of 1985-1987 in Megazyme, 2011).

## **Aminograma**

El perfil de aminoácidos se realizó utilizando el Método Oficial 982.30 E (a,b,c), chp. 45.3.05) (A.O.A.C., 2006) mediante cromatografía de alta resolución (HPLC)

## **Perfil de ácidos grasos**

Se realizó mediante la técnica estandarizada de la concentración de metil esteres de los ácidos grasos (FAME's) utilizando cromatografía de gas (GC) de acuerdo a la (A.O.A.C., 2006).

## **Sustancias antinutricionales**

Las sustancias antinutricias fueron determinadas en base al manual de análisis químicos del Instituto Nacional de Ciencias y Alimentos Salvador Zubirán (INNSZ, 1984) fueron:

- Sustancias antifisiológicas: ácido tánico por el método cuantitativo de Pearson (1975) y ácido fítico por el Método de Haug y Lantzsch (1983).
  
- Sustancias tóxicas: alcaloides por el método cualitativo de Bentley (1957) y glúcidos cianogénicos mediante método cualitativo.
  
- Factores que afectan la digestión: saponinas por el método cualitativo de monroe, modificado por Wall y Rolland (1952).

## **Análisis microbiológicos**

Se practicaron los siguientes análisis a las harinas de las plantas acuáticas: Cuenta de bacterias aerobias. Mediante la técnica cuenta en placa descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994.

Coliformes fecales y totales por técnica del número más probable (NMP) descrita en la Norma Oficial Mexicana -112-SSA1-1994.

Determinación de Salmonellas en base a la NOM-114-SSA1-1994.



### **Obtención del extracto metanólico**

Se obtuvo el extracto metanólico de cada planta acuática para la cuantificación y tipo de azúcares y la determinación de compuestos bioactivos. Se obtuvo por el método de maceración (Domínguez, 1973) pesando 50 gr de cada planta, la cual fue colocada en un matraz con metanol grado analítico y fue tapada. Después de una semana de reposo se colectó el extracto metanólico crudo, filtrando y destilando a presión reducida en un rotavapor. Esta actividad se repitió varias veces hasta que ya no coloreara el metanol, posteriormente se dejaron reposar 4 a 5 días en un recipiente de vidrio hasta completar la evaporación del solvente.

### **Cuantificación y tipo de azúcares**

Con los extractos se determinó el tipo de azúcares en cada planta mediante cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, siglas en inglés) de acuerdo a la AOAC (2006). Posteriormente, se cuantificaron los azúcares reductores mediante la técnica de Somogyi-Nelson (González y Peñalosa, 2000) y los polisacáridos estructurales mediante la técnica de hidrólisis de Wood *et al.* (1978 en Din *et al.*, 2011).

### **Metabolitos con actividad biológica**

Se determinaron los fenoles y flavonoides mediante el método Folin – Ciocalteu utilizado por Gülcin *et al.*, (2010) y las xantófilas y carotenoides mediante método de la AOAC (43.018-43.023) utilizando HPLC DAD.

### **Prueba biológica *in vivo***

#### **Obtención de los peces de experimentación**

Se adquirieron 360 crías ( $9.3 \text{ g} \pm 0.28$ ) más 50 juveniles ( $10 - 120 \text{ g} \pm 6.1$ ) de Tilapia var GIFT en la granja acuícola TECNOPEZ S.A., ubicada en el Estado de Veracruz Llave. Fueron transportados y manejados siguiendo la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NRC, 2011) y las normas del Código Sanitario para los Animales Acuáticos (Código Acuático) (2014) de la Organización

Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés) disponibles en <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/>

### **Diseño experimental, aclimatación y distribución de los peces en las unidades de muestreo**

Al llegar los peces de la granja al laboratorio, fueron aclimatados en un acuario circular de 1.5 m de diámetro dentro de la bolsa de transportación durante 2 horas. Mientras tanto, se midieron con sonda multiparamétrica YSI 5500 y kit de agua dulce LaMotte los parámetros físicoquímicos (temperatura, pH, oxígeno disuelto y amonio) del agua de los acuarios donde posteriormente se distribuirían.

Se utilizó un diseño completamente al azar y un sistema de recirculación (acuarios de 80 L.) con 10 peces ( $9.3 \text{ g} \pm 0.28$ ) por acuario distribuidos en forma aleatoria. Se probaron como ingredientes funcionales las plantas acuáticas (*L. gibba* y *U. lactuca*) suplementando la dieta base 35% de proteína (Cuadro 18) en 4 porcentajes (0, 10, 15, 20) comparada con dietas testigos suplementadas con mananoologosacáridos (MOS) (proporción 1:10 respecto a las plantas acuáticas por ser un compuesto purificado; 0, 1, 1.5 y 2 respectivamente) (Cuadro 19). La dieta con nivel cero fue el control y cada dieta contó con 3 réplicas.

Siguiendo la metodología de Zhou *et al.* (2010) y después de 5 días de aclimatación se suministraron las dietas experimentales al 10 y 8 % de la biomasa de los peces, 30 días cada porcentaje. Diariamente se monitorearon los parámetros de calidad de agua 2 veces al día (9:00 y 18:00 horas).

Cuadro 18. Dieta base de juveniles de tilapia 35% proteína.

Ingrediente	%
Harina de pescado	44
Harina de maíz	50
Aceite de pescado	5
+Mezcla de vitaminas y minerales	1
Total	100

+Composición de la premezcla de vitaminas (g/kg premezcla): Vitamina A Acetato (20,000 UI/g) 5; Vitamina D3 (850,000 UI/g) 0.001; dl-alfa-tocoferil acetato (250 UI/g) 12; Menadiona 2.4; Tiamina-HCl 2.5; Riboflavina (B2) 5; Piridoxina-HCl (B6) 4; DL CaPantotenato 0.012; Ácido nicotínico 0.024; Biotina 0.048; Inositol 0.4; Vitamina B12 4.8; Ácido fólico 1.2; Celulosa 962.62. f Composición de la premezcla de minerales (g/kg premezcla): Cloruro de cobalto 0.04; Sulfato cúprico pentahidratado 2.5; Sulfato ferroso 40; Sulfato de magnesio heptahidratado 283.98; Sulfato de magnesio monohidratado 6.5; Ioduro de potasio 0.67; Selenito de sodio 0.1; Sulfato de Zinc heptahidratado 131.93; Celulosa 534.28.

Cuadro 19. Porcentaje de suplementación de los ingredientes funcionales en las dietas experimentales funcionales.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
<i>U. lactuca</i>	0	10	15	20	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gibba</i>	-	-	-	-	0	10	15	20	-	-	-	-
<i>Glucomananos</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	1.5	2

Una semana fueron mantenidas las tilapias con alimento comercial y posteriormente se alimentaron *ad libitum* 3 días con la dieta experimental para determinar su aceptación. El experimento inició con ayuno de 12 horas, biometría (medición de longitud y peso) y la obtención de una muestra de sangre (Cheng *et al.*, 2014; Gültepe *et al.*, 2014). Después de 30 minutos se inició el suministro de las dietas experimentales.

## Parámetros de crecimiento

A través del registro de biometrías quincenales y del consumo de alimento se determinaron, como se muestra más adelante, la ganancia de peso diario (GPD), tasa de eficiencia alimenticia (TEA), sobrevivencia (S) y factor de conversión alimenticia (FCA) de acuerdo a Kalita *et al.* (2008).

a. Ganancia en peso diaria

$$\text{GPD} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial} / \text{Días de cultivo}$$

b. Tasa de eficiencia proteica

$$\text{TEA} = \text{Ganancia en peso húmedo} / \text{Alimento suministrado}$$

c. Supervivencia

$$\text{S} = \text{Animales cosechados} \times 100 / \text{Animales sembrados}$$

d. Factor de conversión del alimento

$$\text{FCA} = \text{Alimento suministrado} / \text{Ganancia de peso vivo}$$

## Evaluación de la salud

Se realizó a través de un estudio hematológico, determinación de los intervalos de referencia, medición de la actividad de la lisozima y de la actividad del complemento.

### Estudio hematológico

A los días 1, 30 y 60 de experimentación, siguiendo la metodología de Gültepe *et al.*, (2014) se extrajo de la vena caudal 1ml de sangre de 9 peces/dieta experimental con jeringa de 3ml y ajuga 21G para determinar los parámetros recuento de glóbulos rojos (E), hemoglobina (Hb g/100ml), hematocrito (Hto %), índices eritrocitarios volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de media corpuscular de hemoglobina (CMHgC), proteínas totales (PT), albúmina (Alb), recuento de leucocitos (L) y glucosa (G).

#### Determinación intervalos de referencia

Para analizar los estudios hematológicos se determinaron los intervalos de referencia de cada parámetro en base a lo descrito por Díaz *et al.* (2012) mediante el método no-paramétrico de Tukey y método recomendado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, guía C28-A3) (Horowitz, 2010) utilizando la muestra de sangre de 50 juveniles de tilapia sanos (10 - 120 g  $\pm$  6.1).

#### Medición de la actividad de la lisozima

El efecto fisiológico de las dietas se evaluó en ensayos de la actividad de la lisozima mediante el kit Sigma-Aldrich (LY0100), siguiendo la metodología de Ogier de Baulny *et al.* (1996) y Zhou *et al.*, (2010).

La actividad de lisozima en muestras del suero (90  $\mu$ L) de los juveniles de tilapia lisando células de *Micrococcus lysodeikticus* (células liofilizadas, Sigma-Aldrich Chemical, MO, EUA), 0.01 % p/v en buffer de reacción, incubadas a 25 °C y pH 6.24. El decremento en la absorbancia a 450 nm se expresó en unidades de actividad de la lisozima (U). Entendiendo como la unidad, aquélla que produjo un cambio a una absorbancia de 450 nm de 0.001 por mg de proteína. Las U/mL enzima se calcularon con la siguiente fórmula.

$$\text{U/mg sólido} = \frac{\text{unidades/ mL de enzima}}{\text{mg sólido/ml enzima}}$$

#### Medición de la actividad del complemento (C3)

Se realizó por turbimetría utilizando Kit C3 1102094 (SPINREACT) de acuerdo a Pesce y Kaplan (1987) y Lambris *et al.* (1993). Se combinaron anticuerpos (anti-C3), solución anticuerpo (R2) del kit (Suero de cabra, anti-C3 humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L), con muestras de suero de los juveniles de tilapia dando lugar a compuestos insolubles que fueron detectados en un cambio de absorbancia (340 nm) proporcional a la concentración de C3 en la muestra, y que fue cuantificada con una proteína de C3 de concentración conocida a través de

una curva de calibración (CINa 9 g/L como diluyente para las diluciones 0.1, 0.25, 0.50, 0.75 y 1) construida por diferencia de las absorbancias (A2-A1). La concentración de C3 de la muestra se obtuvo mediante la interpolación de las diferencias de las absorbancias en la curva de calibración.

### **Análisis estadístico**

Se obtuvo la media aritmética y desviación estándar de todos los análisis. Los resultados de la composición química, microbiológica y compuestos bioactivos fueron analizados mediante "t" de student. Los resultados de la prueba biológica fueron analizados mediante ANOVA de dos factores con un factor de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) y análisis post hoc Tukey para determinar las diferencias significativas entre los grupos utilizando el software SPSS versión 17.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición química y nutricional de las plantas acuáticas

El análisis químico proximal (Cuadro 20) manifestó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de todos los componentes analizados en *L. gibba* respecto y *U. lactuca*. El componente en mayor proporción en ambas plantas fue el extracto libre de nitrógeno. En *Lemna* le siguió la proteína cruda (PC), la fibra dietética total (FDT), cenizas (CE) y el extracto etéreo (EE). En *Ulva* le siguieron las CE, la PC, la FDT y el EE. La variación en el contenido de nutrientes y otros compuestos encontrados en *L. gibba* y *U. lactuca* se debe a los factores físico químicos asociados al hábitat de cada especie de planta acuática tales como medio dulceacuícola o marino, distribución, temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, la transparencia, profundidad, luz, y estado fisiológico de las plantas (Sánchez–Machado, 2004; Murakami *et al.*, 2011, Benjama y Masniyom, 2011). *L. gibba* fue colectada de cuerpos de agua dulce de temporal mientras que *U. lactuca* fue colectada de las arribazones en playas tropicales. El porcentaje de cenizas representa el contenido de minerales totales o material inorgánico que junto con el agua, son los únicos componentes de los alimentos que no se pueden oxidar en el organismo para producir energía. La literatura reporta para las lemnáceas un rango de 9 a 26 % y para *U. lactuca* se reportan desde 13 % (Indeerengard y Minsaas, 1991) hasta 46.62 % (Carrillo *et al.*, 2002).

De acuerdo a Polat y Ozogul (2008) y Murakami *et al.* (2011) el alto contenido de cenizas de las plantas acuáticas está relacionado con la capacidad de cada una de almacenar minerales según su medio acuático, aunque también puede deberse a la asociación entre cationes y polisacáridos algales (Lahaye 1991).

Cuadro 20. Composición química proximal (g 100g-1 muestra) en base seca de las plantas acuáticas analizadas.

	<i>Lemna gibba</i>	<i>Ulva lactuca</i>
Cenizas	<sup>a</sup> 20.10 ± 0.33	<sup>b</sup> 33.07 ± 0.45
Proteína cruda	<sup>a</sup> 21.5 ± 0.38	<sup>b</sup> 17.2 ± 0.60
Lípidos	<sup>a</sup> 4.45 ± 0.65	<sup>b</sup> 1.7 ± 0.37
Fibra dietética total (FDT)	<sup>a</sup> 21.5 ± 0.49	<sup>b</sup> 9.2 ± 0.71
Fibra dietética soluble (FDS)	<sup>a</sup> 16.7 ± 0.47	<sup>b</sup> 6.5 ± 0.34
Fibra dietética insoluble (FDI)	<sup>a</sup> 4.8 ± 0.82	<sup>b</sup> 2.7 ± 0.65
Extracto libre de nitrógeno	<sup>a</sup> 32.4 ± 0.36	<sup>b</sup> 38.34 ± 0.41
Polisacáridos estructurales (mg g-1)	<sup>a</sup> 329 ± 0.031	<sup>b</sup> 274 ± 0.047
Polisacáridos de reserva (mg g-1)	<sup>a</sup> 319 ± 0.026	<sup>b</sup> 422 ± 0.007
Inulina (mg g-1)	<sup>a</sup> 133.45 ± 19.84	<sup>b</sup> 272.18 ± 9.43
Maltosa (mg g-1)	NR	18.326 ± 3.69

Media de tres réplicas ± desviación estándar.

Literales a,b indican diferencia significativa (p<0.05).

El ELN es una medida indirecta de la estimación de carbohidratos solubles; ahora bien, tanto la fracción soluble como insoluble son consideradas “fibra dietética”. La fracción soluble se compone principalmente de azúcares libres y otros carbohidratos digeribles (FAO, 1989; Lehninger *et al.*, 2002; Mjoun y Rosentrater, 2010).



Al igual que los demás componentes químicos en las plantas acuáticas, la composición de ELN también varía con la edad, época del año y condiciones ambientales donde se encuentren distribuidas (Gutiérrez *et al.*, 2001; Kalita *et al.*, 2007). En este estudio la fibra soluble fue la fracción mayor en ambas plantas acuáticas.

El contenido de proteína estuvo dentro del rango obtenido en otros estudios (Yildirim *et al.*, 2009; Ortíz, 2011; Benjama y Masniyom, 2011) y las cantidades fueron similares a otras fuentes proteicas que son utilizadas tradicionalmente en la alimentación animal como la pasta de soya y el amaranto (CYTED, 2007). *L. gibba* resultó una fuente proteica con 21.5% de PC y *U. lactuca* una fuente energética con 17.2% de PC, ya que de acuerdo a la NRC (1993) y Cozzolino (2000) son fuentes proteicas aquéllos ingredientes con más de 20% de proteína cruda (PC) y menores a este porcentaje y por debajo de 18% de fibra cruda (FC) son considerados fuentes energéticas. El mayor porcentaje de PC y aminoácidos lo tuvo *L. gibba*; aunque ambas plantas acuáticas presentaron los 8 aminoácidos esenciales recomendados para el crecimiento de tilapia (NRC, 1993; Furuya, 2010; Halver-Hardy, 2011). Chará (1998) explica que la lemna o lenteja de agua alcanza niveles de proteína hasta un 38% de su biomasa. Schneider *et al.* (2004) y Carranco *et al.* (2002) explican que el contenido proteico dependen de la especie, lugar de distribución, edad fisiológica de la planta y condiciones ambientales.

Los aminoácidos de *U. lactuca*, a excepción de la arginina e histidina, sobrepasaron en más de dos veces las recomendaciones, y los aminoácidos isoleucina, leucina, treonina y valina fueron más altos que los de *L. gibba*, cuyos aminoácidos esenciales mayoritarios fueron lisina y metionina (Cuadro 21), y los demás aminoácidos estuvieron en cantidades apreciables. El requerimiento proteico para tilapia en etapa de cría hasta 100 g es 40% posteriormente en la etapa adulta disminuye hasta 25% (Furuya, 2010), por lo que *L. gibba* podría utilizarse como complemento proteico y aprovechar el buen aporte de lisina y metionina determinados en ambas plantas, y necesarios para esta especie

(NRC,1993; Furuya, 2010; Halver-Hardy, 2011); la importancia de la metionina se debe a que todo proceso de transcripción comienza con este aminoácido y su requerimiento disminuye con el aumento en peso de la tilapia (Furuya, 2010).

Cuadro 21. Perfil de aminoácidos encontrado en *L. gibba* y *U. lactuca* comparado con los requerimientos de aminoácidos reportados para tilapia (*O. niloticus*).

Aminoácido	<i>L. gibba</i> (%)	<i>U. lactuca</i> (%)	Halver-Hardy (2011) (%)	Furuya, 2010 (hasta 100 g) (%)	NRC (1993) (%)
Arginina	<sup>a</sup> 0.003 ± 0.29	<sup>a</sup> 0.004 ± 0.21	1.2	1.26	1.18
Histidina	<sup>a</sup> 0.001 ± 0.24	<sup>a</sup> 0.001 ± 0.27	1.0	0.52	0.48
Isoleucina	<sup>a</sup> 1.569 ± 0.11	<sup>b</sup> 4.57 ± 0.17	1.0	0.93	0.87
Leucina	<sup>a</sup> 0.003 ± 0.12	<sup>b</sup> 9.33 ± 0.14	1.9	1.01	0.95
Lisina	<sup>a</sup> 22.33 ± 0.09	<sup>b</sup> 9.24 ± 0.12	1.6	1.53	1.43
Metionina	<sup>a</sup> 8.57 ± 0.10	<sup>b</sup> 5.92 ± 0.14	0.7	0.52	-
Treonina	<sup>a</sup> 0.21 ± 0.09	<sup>b</sup> 4.76 ± 0.13	1.1	1.18	1.05
Valina	<sup>a</sup> 2.23 ± 0.11	<sup>b</sup> 4.01 ± 0.12	1.5	0.83	0.78
Alanina	<sup>a</sup> 27.80 ± 0.13	<sup>b</sup> 9.77 ± 0.15	-	-	-
Acido aspártico	<sup>a</sup> 8.77 ± 0.12	<sup>b</sup> 10.48 ± 0.14	-	-	-
Acido glutámico	<sup>a</sup> 23.13 ± 0.12	<sup>b</sup> 15.40 ± 0.15	-	-	-
Glicina	<sup>a</sup> 1.76 ± 0.11	<sup>b</sup> 6.11 ± 0.12	-	-	-
Prolina	<sup>a</sup> 0.01 ± 0.10	<sup>b</sup> 0.007 ± 0.12	-	-	-
Serina	<sup>a</sup> 2.03 ± 0.11	<sup>b</sup> 7.64 ± 10.14	-	-	-
Tirosina	<sup>a</sup> 1.69 ± 0.11	<sup>b</sup> 3.64 ± 0.11	-	-	-

Media de 2 valores ± desviación estándar.

Literales a,b indican diferencia significativa (p<0.05).

El contenido de extracto etéreo o grasa bruta que estima el contenido en triglicéridos del alimento (grasas, vitaminas y pigmentos) en general, estuvo dentro de lo reportado en otras investigaciones tanto para *L. gibba* (2.3 – 5%) (Brown *et al.*, 1990; Kalita *et al.*, 2007) como para *U. lactuca* (0.3-2.5 g/100 g materia seca) (Ortíz, 2011; Yildirim *et al.*, 2009).

La variación en el contenido del extracto etéreo con respecto a otros trabajos (Marsham *et al.*, 2007; Hanne *et al.*, 2014) se debió a la temporada del año en que se cosecharon las plantas, su origen y la influencia del medio acuático (Aguilera-Morales *et al.*, 2005; Shanmugan y Palpandi, 2008; Kumar *et al.*, 2010) aunque Pohl y Zurheide (1979) y Kumar *et al.* (2010) refieren que también se puede deber a la genética de las especies. Los lípidos como fuente de energía hasta 5% en la dieta de tilapia estimulan el consumo de alimento, mejoran la conversión alimenticia y la digestibilidad de alimentos vegetales (Lee *et al.*, 2002; Meurer *et al.*, 2002; Boscolo *et al.*, 2005).

Respecto al perfil de ácidos grasos, *L. gibba* presentó una cantidad significativamente mayor que *U. lactuca*, sin embargo esta última presentó la mayor variedad de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (AGPI) estos últimos de gran interés para la formulación de dietas para peces como la tilapia, principalmente AL y AA. Los AGPI de *U. lactuca* fueron  $\omega$ 3 AL (3.93 mg/g de grasa),  $\omega$ 6 L (6.73 mg/g de grasa) y AA (0.41 mg/g de grasa) y *L. gibba* solo tuvo  $\omega$ 3 AL (30.31 mg/g de grasa) (Cuadro 22). Cabe señalar que las plantas secas contienen menos AGPI debido a la oxidación y este a su vez depende de varios factores (especie, textura, tiempo de exposición al aire, Sol o temperaturas altas, y condiciones y tiempo de almacenamiento) (Xu *et al.* 1998). Ahora bien, los AGPI tienen un papel crucial como componentes de fosfolípidos y como precursores de prostaglandinas (Akiyama, 1991).

Por otra parte, la fibra dietética total fue significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor en *L. gibba* (21.5 mg/g) que en *U. lactuca* (9.2 mg/g), predominando en ellas la fracción soluble (Cuadro 20). En varios grupos de algas la fibra es el componente principal, llegan a contener entre 50-55 % (base seca) (Wong y Cheung, 2000; Yaich *et al.* 2011; Quitral *et al.*, 2012). Ortiz *et al.* (2006) cuantificaron 60.5 % de fibra cruda, 33.3% de fibra insoluble y 27.2% de fibra soluble (base seca) en *U. lactuca* del Norte de Chile.

Cuadro 22. Perfil de ácidos grasos de las plantas acuáticas estudiadas.

	<i>U. lactuca</i> (mg g <sup>-1</sup> of lipids)	<i>L. gibba</i> (mg g <sup>-1</sup> of lipids)
<b>Saturados</b>		
C12:0, Laurico	3.4283	0.0599
C14:0, Mirístico	21.3033	2.5249
C16:0, Palmítico	---	32.8270
C18:0, Estearico	2.5318	---
C20:0, Araquico	0.0856	---
C21:0, Nonadecanoico	---	1.0505
C22:0, Docosanoico	---	1.7315
C23:0, Tricosanoico	---	0.5386
<b>Monoinsaturados</b>		
C16:1, Palmitoleico	2.0856	---
C20:1, Gadoleico	4.7358	---
<b>Poliinsaturados</b>		
C18:3(9,12,15), $\alpha$ -Linolenico (AL)	3.9375	30.3135
C18:2 $\omega$ 6, Linoleico (L)	6.7319	---
C20:4 $\omega$ 6, Araquidónico (AA)	0.4113	---

Media de 2 valores  $\pm$  desviación estándar.

En la elaboración de alimento formulado para tilapia se debe considerar la proporción de fibra, ya que altos niveles en peces reduce su crecimiento (Leary y Lovell, 1975). Según Anderson *et al.* (1984), un nivel de 5 % de fibra reduce la utilización del alimento y la digestibilidad de la proteína además de aumentar la capacidad de retención de agua, es una propiedad tecnológica altamente aprovechable para darle estabilidad al alimento de los peces en el agua.

## Análisis microbiológicos en las plantas acuáticas

Los resultados de los análisis microbiológicos que nos indican la inocuidad de la materia prima se muestran en el Cuadro 23. Se puede apreciar, diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los mesófilos aerobios y en los coliformes totales entre las distintas harinas analizadas. Debido a que en México no existe una norma del contenido de microorganismos permisible en las algas con potencial para la alimentación animal y humana, se consideró los límites permisibles por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) referentes para ensaladas verdes o crudas (Félix-Fuentes *et al.*, 2005). Tanto *L. gibba* como *U. lactuca* no rebasaron los límites máximos permitidos por la ICMSF ni por la norma oficial mexicana. No se detectó Salmonella en ninguna de las muestras estudiadas.

Cuadro 23. Microorganismos detectados en las harinas de *L. gibba* y *U. lactuca*.

Harina	Mesófilos aeróbios (UFC/g ó ml)	Coliformes totales (NMP/100 ml)	Coliformes fecales (NMP/100 ml)	Salmonellas (UFC/ g)
<i>L. gibba</i>	<sup>a</sup> 95,000 x 10 <sup>-3</sup>	> 80 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0
<i>U. lactuca</i>	<sup>c</sup> 98,000 x 10 <sup>-3</sup>	> 92 <sup>c</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0
Límite máximo permisible*	150 x 10 <sup>3</sup>	100	-	Ausente en 25 g
NOM's	100 x 10 <sup>3</sup>	NR	10	Ausentes en 25 g

a,b,c. Literales que indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

\*Límites microbiológicos de la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) para ensaladas verdes o crudas (Félix-Fuentes *et al.*, 2005). NR: No reportado

## **Sustancias antinutricias**

Cualitativamente las plantas acuáticas estudiadas no presentaron alcaloides ni glúcidos cianogénicos y las saponinas se detectaron escasas en *U. lactuca*. Sólo se encontró 0.438 y 0.563 mg/g de ácido tánico en *L. gibba* y *U. lactuca*, respectivamente. Pérez (2011) reporta que una sustancia antinutricional es una sustancia presente en un alimento con la capacidad de reaccionar o interferir con un nutrimento, disminuyendo su biodisponibilidad, además de ser capaz de producir una anormalidad fisiológica y/o anatómica a largo plazo (toxicidad crónica) que en la mayoría de los casos es irreversible.

Las sustancias antinutricias pueden actuar como antienzimas, las cuales son sustancias que inhiben la acción de enzimas digestivas endógenas (Inhibidores de proteasas, amilasas, etc.); antivitaminas, sustancias que inactivan o aumentan los requerimientos de vitaminas (Anti-tiaminasas, ascorbicooxidasa, avidina, etc.); y como secuestrantes de minerales (sustancias que interfieren con la asimilación de los minerales (fitatos, ácido oxálico, ovotransferrina, etc.) (Kaur y Kapoor, 1992). Los taninos son sustancias amorfas que con el agua forman coloides de reacción ácida, suelen ser solubles en alcohol y en acetona. Se definen como compuestos polifenólicos de estructura química variada, ampliamente distribuidos en el mundo vegetal. Se localizan en vacuolas combinados con alcaloides y proteínas, y son considerados potentes inhibidores de enzimas debido a la formación de complejos con proteínas y carbohidratos, por lo que se asocia a una baja digestibilidad de las proteínas en las plantas (Tacón *et al.*, 2006). Tienen un efecto inhibitor sobre muchas enzimas debido a que las precipitan Evans (1989).

Las algas marinas, según Lidner (1978), Domínguez (1979), Manzano y Rosales (1989), sintetizan ácido tánico como un medio de protección contra sus depredadores. Por lo anterior, es posible que las algas en un estadio juvenil contengan mayores cantidades que las maduras para alcanzar tasas de sobrevivencia altas, y esto es posible que ocurra también en plantas acuáticas como *Lemna*.

Carranco *et al.* (2002) luego de examinar varias especies de plantas entre ellas, *L. gibba*, no detectaron saponinas ni glúcidos cianogénicos pero si una abundancia de alcaloides con las pruebas de Meyer, Warner, Dragendorf y Sommerschein, además de detectar 0.90 g/100g de ácido tánico. Castro *et al.* (1996) reportan haber encontrado en *Ulva lactuca* 0.564 mg/g ácido tánico. Peters *et al.* (2009) señala que la mayoría de los animales no metabolizan los complejos que se forman entre las proteínas y los taninos, lo que hace que se reduzca el valor nutritivo del alimento.

Considerando las referencias de que el consumo de 1500 a 2500 mg/día de taninos no causa efectos tóxicos a los humanos (manzano y Rosales, 1989), que a los pollos de 7 semanas de edad la inclusión del 2% en su dieta retrasa el crecimiento (Carrillo *et al.*, 1992; Meza 1998) y que en ratas 3.5g/kg de peso de ácido tánico causa toxicidad (Aguilera, 1999) podemos suponer que las cantidades encontradas en las algas no tendrán efecto sobre el crecimiento y salud de los peces.

No se detectaron glúcidos cianogénicos, cuya importancia radica en que esta sustancia tóxica bloquea la citocromo oxidasa en el sitio II de producción de ATP, impidiendo con ellos la respiración celular y produciendo muerte por anoxia (Lidner, 1978).

Tampoco se encontraron saponinas, en ninguna de las harinas analizadas, lo cual es muy importante; ya que las saponinas tienen acción hemolítica. Esto es, reaccionan con los lipoides (como colesterol) de la membrana de los eritrocitos haciéndolos permeables y permitiendo la salida del pigmento sanguíneo (Lidner, 1978).

### **Cuantificación y tipo de polisacáridos**

Los azúcares reductores fueron cuantificados por el método de Somogyi-Nelson, debido a que llega a detectar concentraciones muy bajas (20-180 mg/ml) y el método es altamente reproducible. Los polisacáridos estructurales de la pared celular que son de alto peso molecular, siendo los más abundantes pentosas y hexosas, principalmente glucosa seguida de xilosa, arabinosa, ramnosa, galactosa, manosa, fucosa, entre otros, que se unen a cadenas de celulosa y hemicelulosa; se extrajeron mediante hidrólisis con etanol mediante el método de Wood *et al.* (1978) y HPLC.

En las plantas acuáticas de estudio se encontró una cantidad considerable de polisacáridos estructurales y de reserva con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en su contenido, siendo los primeros, mayor en *L. gibba* (329 mg/g) que los de *U. lactuca* (274 mg/g), y visceversa, los segundos, 319 y 422 mg/g, respectivamente. En *U. lactuca* destacó la presencia de inulina, dos veces más la cantidad de *L. gibba* (272.18 mg/g vs 133.45 mg/g) además de 18.32 mg/g de maltosa (Cuadro 24). Los carbohidratos se forman mediante el proceso de la fotosíntesis en los productores primarios que incluye plantas terrestres y acuáticas (algas y macrofitas incluidas) y se manifiestan como la materia orgánica (Navarrete, 2008). Cada célula del tejido vegetal está constituida por azúcares de la pared celular, azúcares del citoplasma y azúcares en la membrana celular como glucoproteínas que son biomoléculas de reconocimiento celular (Buchanan *et al.*, 2002). Dentro de estos azúcares se encuentran polisacáridos de almacenamiento o reserva (glucosa, almidón, inulina entre otros) y polisacáridos estructurales (celulosa, hemicelulosa) (Azcón-Bieto y Talón 1993 y 2008; Hopkins y Hüner, 2009).

Castro *et al.* (2006) y Govind *et al.* (2012) reportan que los hidratos de carbono de las algas verdes están sulfatados, lo que permite la formación de moléculas con diferentes estructuras y les confiere sus propiedades beneficiosas.



Cuadro 24. Concentración y tipo de polisacáridos en los extractos las plantas acuáticas de estudio.

	<i>L. gibba</i>	<i>U. lactuca</i>
Polisacáridos estructurales totales (mg/g)	<sup>a</sup> 329 ± 0.031	<sup>b</sup> 274 ± 0.047
Polisacáridos de reserva (mg/g)	<sup>a</sup> 319 ± 0.026	<sup>b</sup> 422 ± 0.007
Inulina (mg/g)	<sup>a</sup> 133.45 ± 19.84	<sup>b</sup> 272.18 ± 9.43
Maltosa (mg/g)	NR	18.326 ± 3.69

Media de dos réplicas ± desviación estándar.

Literales a,b indican diferencia significativa (p<0.05).

Las diferencias significativas en los polisacáridos identificados para ambas especies de plantas acuáticas se explican de acuerdo a los reportes de Lahaye, (1991), Lahaye *et al.* (1995), Ray (2006) y Peña *et al.* (2011), referentes a que la composición del tipo de polisacáridos depende de las variaciones del medio, tales como época estacional, pH, temperatura, distribución geográfica, estado fisiológico de las algas entre otros.

Lahaye *et al.* (1995) reporta que la biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular (estructurales), proteínas y pigmentos está relacionada con el contenido de nitrógeno del medio. Benjama y Masniyom (2011) encontraron en *U. pertusa* y *U. intestinalis* 25.3 – 39.6 % de fibra dietética soluble, 21.8 – 33.5 % de fibra insoluble y 51.3 – 62.2% en base seca (BS). Mientras que Peña *et al.* (2011) reporta para *U. clathrata* cultivada 15.6 – 16.6 % de fibra soluble, 8.7 – 10.7 de fibra insoluble, y una proporción soluble-insoluble de 1.5-1.9 (BS). Estos contenidos varían con la época estacional y se encuentran en mayor proporción los polisacáridos solubles que los insolubles. Lo anterior, concuerda con lo detectado en este estudio y lo reportado también por Gómez-Pinchetti *et al.* (1998) y Ortiz *et al.* (2006).

En *U. lactuca* se ha comprobado la presencia de glucosa, xylosa, glucitol y un trisacárido identificado como  $\beta$ -D-xylopiranósico-(1-4)-D-glucopiranososa (Lahaye *et al.*, 1994) y en *U. rigida* se verificó que la pared celular está compuesta por glucuronanos y glucoxilanos, glucosa, xilosa y manosa (Lahaye y Jegou, 1993; Rupérez. y Saura-Calixto, 2001).

En el extracto de *U. lactuca* se encontró inulina; es un carbohidrato no digerible de reserva en las plantas que se utiliza ampliamente como ingrediente en alimentos funcionales, generalmente son llamados fructanos. El grado de polimerización es variable y este determina las características fisicoquímicas y sus aplicaciones como ingrediente en las formulaciones alimenticias (Madrigal, 2007).

La propiedad de la inulina más estudiada ha sido su comportamiento como prebiótico Roberfroid (2005), definido por su capacidad selectiva de estimular el crecimiento de un grupo de bacterias en el colon (bifidobacterias y lactobacilos), con la consecuente disminución de otras especies que pueden ser perjudiciales (ejemplo: *E. coli* y bacterias de la especie *Clostridium spp.*) Flickinger (2003).

En alimentación animal, para disminuir malos olores en las heces fecales de animales domésticos como perros y gatos). También se ha ensayado utilizar los oligosacáridos inulina y oligofructosa en la sustitución del uso de antibióticos profilácticos en pollos, conejos y cochinos (ídem).

Entre otras propiedades beneficiosas de la inulina para la salud, se mencionan: el refuerzo de las funciones inmunológicas (anti cáncer o tumores), el aumento de la biodisponibilidad de minerales, la mejora del metabolismo de las grasas y de la respuesta glicémica (Franck, 2006). En la industria farmacéutica se utiliza como material excipiente en tabletas, coadyuvante en vacunas y también como ingrediente estructurante en detergentes (Kim *et al.*, 2009).

La inulina y derivados han sido calificados como materiales bioactivos que pueden ser incorporadas en los alimentos y dar lugar a alimentos funcionales con la capacidad de modificar positivamente la funcionalidad de procesos fisiológicos del organismo, tales como los prebióticos, los fotoquímicos y las vitaminas (López-Rubio *et al.*, 2006).

La maltosa es un azúcar que se forma por la acción de la amilasa sobre el almidón; por lo que es un azúcar de reserva energética de carácter reductor. Es soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y cristaliza en finas agujas. Gira el plano de polarización de la luz a la derecha (dextrógira). Por hidrólisis forma glucosa. Es un azúcar de fácil digestión que se utiliza en alimentos infantiles y en bebidas como la leche malteada y la cerveza. La maltosa cuantificada en *U. lactuca* podría añadirse a la lista de los edulcorantes naturales los usos que recomiendan algunos expertos (Schorin *et al.*, 2012) como:

- Proporcionar sabor dulce en alimentos.
- Conservación de la frescura y calidad del producto.
- Actuar como conservantes de mermeladas y gelatinas.
- Mejorar el sabor en las carnes procesadas.
- Utilizarse para la fermentación de panes y salsas agridulces. Proporcionar volumen a cremas heladas y cuerpo a bebidas carbonatadas.

### **Fenoles, flavonoides y carotenos**

El contenido de fenólico total (CFT) y flavonoides (CF) de los extractos de las plantas acuáticas estudiadas se observa en la Cuadro 25. Fueron significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) los contenidos en *U. lactuca* que en *L. gibba*, lo cual concuerda con los trabajos de (El-Baky *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2005).

Cuadro 25. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides determinados en *L. gibba* y *U. lactuca*.

Compuesto	Contenido	
	<i>L. gibba</i>	<i>U. lactuca</i>
Compuestos fenólicos totales (CFT)(mg/g-1)	4.16 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.34 ± 0.02 <sup>b</sup>
Contenido de flavonoides (CF)	8.52 ± 0.04 <sup>a</sup>	12.25 ± 0.04 <sup>b</sup>

Media de dos réplicas ± su desviación estándar.

Las literales a,b. Indican diferencias significativas (p<0.05)

Las cantidades encontradas de CFT y CF estuvieron dentro de los reportados para otras especies del mismo género (Castillo *et al.*, 1983; Ortíz, 2011). Sin embargo, es común que entre las especies de *Ulva* varíen los contenidos debido a los cambios estacionales y condiciones ambientales como la salinidad y otros parámetros fisicoquímicos, o la exposición prolongada a las radiaciones UV del Sol durante la marea baja (Manivannan *et al.*, 2009; Farasat *et al.*, 2014). Así también la mayor síntesis en en mayor o menor proporción depende de su genérica y los factores ambientales y biológicos con los que interactuen las plantas acuáticas (Lovstad y Kraan, 2010; Zaho, 2014).

Además se ha comprobado una fuerte correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y capacidad antioxidante (Chai y Wong, 2012; Farasat *et al.*, 2014). Las cantidades determinadas en las plantas acuáticas son consideradas como proporción adecuada para utilizarse como aditivos antioxidantes o antibacterianos por lo que las plantas pueden categorizarse en los llamados ingredientes funcionales.

Como se observa en el cromatograma de la Figura 8 y Cuadro 26 se identificaron cinco flavonoides en *L. gibba* y en *U. lactuca*, cuatro (Figura 9 y Cuadro 27). La concentración corresponde a cada pico, respectivamente.

Los flavonoides identificados de acuerdo a Cartaya y Reynaldo (2001) están formados por la combinación de derivados de fenilalanina y el ácido acético. Las diferencias entre los diversos grupos de flavonoides se establecen por el grado de aromaticidad (dobles enlaces conjugados), el patrón de hidroxilación (orden y número) o el tipo de sustituciones (glicosilación, metilación entre otros).

Estos compuestos fenólicos juegan dos roles; uno en la actividad antibacteriana por ser hidrofóbicos por naturaleza y activos contra membranas de bacterias y levaduras produciéndoles una pérdida en el control quimiosmótico, y por lo tanto, la muerte celular (Vaara, 1992; Lambert *et al.*, 2001) ya que penetran con facilidad las células. El segundo rol es la actividad antioxidante, basada en sus capacidades: secuestradora de radicales libres (scavengers), quelatante de iones metálicos y donadora de electrones. Su estructura química es la ideal para reaccionar con los radicales libres y formar un radical intermedio más estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo permite que se deslocalicen los electrones.

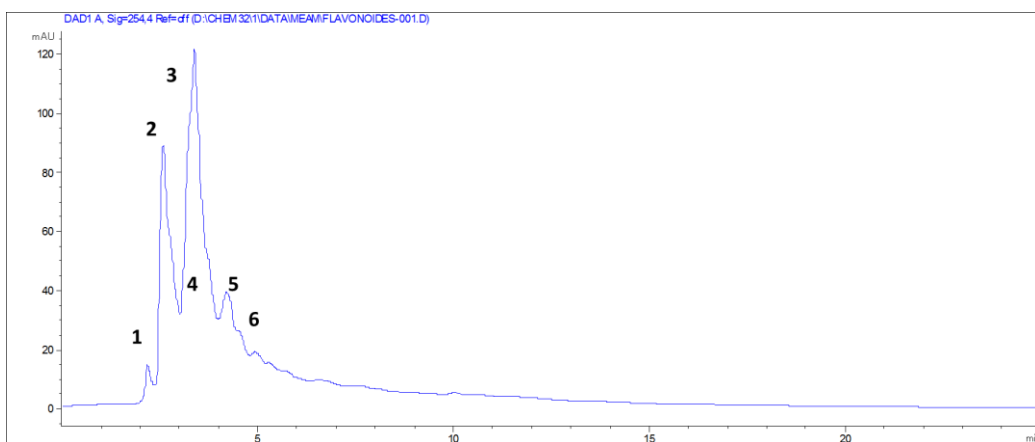


Figura 8. HPLC DAD del contenido de flavonoides en *L. gibba*. Los picos identificados se muestran en el Cuadro 23.

Cuadro 26. Concentración de los flavonoides identificados en *L. gibba* con HPLC DAD utilizando el coeficiente de extinción de algunas referencias

# Pico	Identificado	( $\epsilon$ )	Referencia	Altura de estándares	Concentración mg/g
1	Catequina	2484	Pelillo <i>et al</i> (2004)	63.72	12.4
2	Catecol	1350	Waite (1976 en Franke, 2004)	343.74	46.68
3	Luteolina	14791	Franke (2004)	230.5	7.41
4	Acacetina	16955	Franke (2004)	335	9.35
5	Naringina	19056	Jurd (1962 en Franke, 2004)	95.98	487

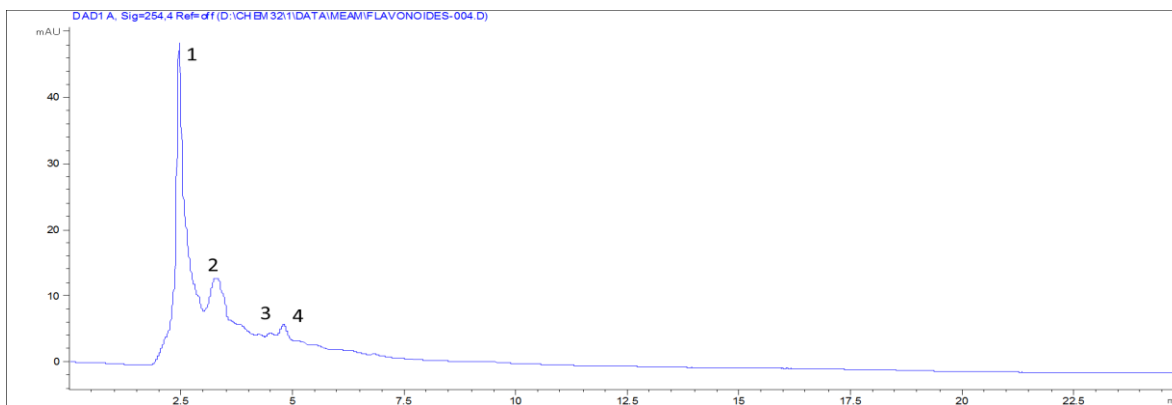


Figura 9. HPLC DAD del contenido de de flavonoides en *U. lactuca*. Los picos identificados se muestran en el Cuadro 24.

Cuadro 27. Concentración de los flavonoides identificados en *U. lactuca* con HPLC DAD utilizando el coeficiente de extinción de algunas referencias.

# Pico	Identificado	( $\epsilon$ )	Referencia	Altura de estándares	Concentración mg/g
1	Catequina 1	2484	Pelillo <i>et al</i> (2004)	48.5	9.43
2	Catequina 2	2484	Pelillo <i>et al</i> (2004)	13	2.53
3	Naringina	19056	Jurd (1962 en Franke, 2004)	4.6	2.46
4	Naringenina	17600	Merk index (1966)	2.7	8.85

Respecto al contenido de xantofilas se encontró diferencia significativa entre las plantas acuáticas estudiadas en muestras en fresco y seco (Cuadro 28). Las diferencias entre las muestras secas y en fresco pudieron deberse al proceso de secado ya que los carotenoides son susceptibles a la degradación de luz solar y cambio estructural por calor (Meléndez *et al.*, 2007).

Las xantófilas son compuestos tetraterpenoides, formados por 8 unidades de isoprenos, proveniente del ácido mevalónico. Su estructura presenta muchos dobles enlaces conjugados y varias ramificaciones con grupos metilo que les confieren capacidad antioxidante (Maestre de la Cura, 2012).

La evidencia experimental sugiere que los carotenoides neutralizan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas como parte del metabolismo celular. Los carotenoides, están implicados en disminuir la incidencia de algunas enfermedades, además de ser una fuente de provitamina A (Islam y Gracia, 2013).

Por otra parte, Burns *et al.* (2003), han reportado que los vegetales verdes y frescos, contienen en una cantidad moderadamente alta  $\beta$ -caroteno (0,5-14,6 mg/100 g) y en cantidades mayores xantofilas, principalmente luteína, aunque también mencionan que la cocción reduce diferencialmente el contenido de los mismos. Macrofitas de agua dulce y algas verdes han demostrado una alta proporción de carotenoides por lo que son consideradas fuentes de antioxidantes (Castillo *et al.*, 1983; Ortiz, 2011; Zhao *et al.*, 2014).

Cuadro 28. Concentración de xantofilas (g xantofilas/kg) en las plantas acuáticas estudiadas.

<i>L.gibba</i>		<i>U. lactuca</i>	
Fresca	Seca	Fresca	Seca
<sup>a</sup> 8.45 ± 0.2347	<sup>b</sup> 16.48 ± 0.6121	<sup>c</sup> 2.86 ± 0.5782	<sup>d</sup> 1.70 ± 0.4591

Media de dos réplicas ± desviación estándar .

a, b,c,d. Literales que indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Los carotenoides identificados en las muestras de *L. gibba* seca fueron  $\alpha$ -Caroteno, luteína, licopeno, neoxantina. En muestras frescas además se encontró  $\beta$ -caroteno, Critoflavina y Violaxantina, en total fueron 7 tipos de carotenoides (Figura 10). En las muestras secas de *U. lactuca* se encontró  $\beta$ -Caroteno, luteína, licopeno y en muestras frescas, además Neoxantina, en total 4 tipos (Figura 11).

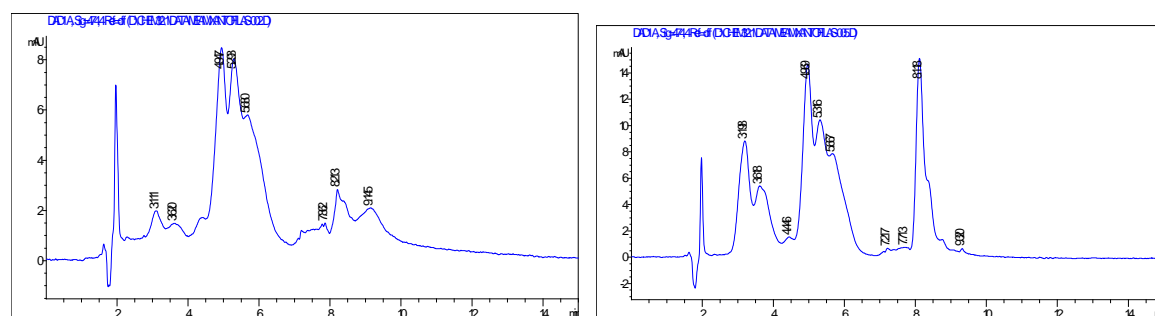


Figura 10. Cromatograma de los carotenoides de *L. gibba* seca y fresca. Los picos identificados se muestran en los Cuadro 29.



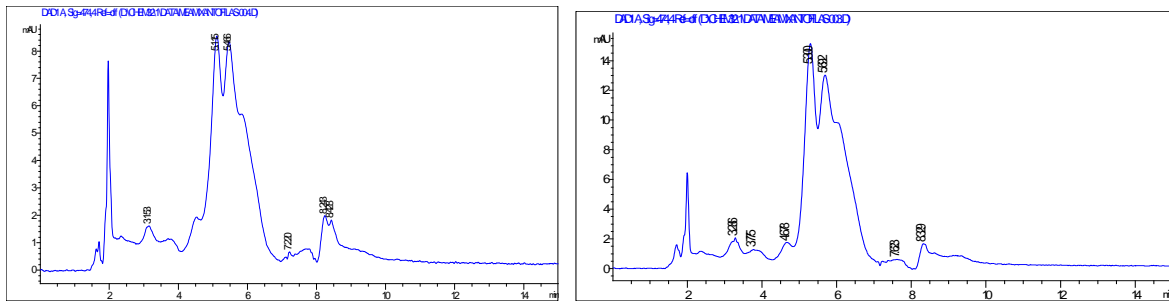


Figura 11. Cromatograma de carotenoides en muestras de *U. lactuca* seca y fresca. Los picos identificados se muestran en el Cuadro 30.

Meléndez *et al.* (2007) explican que los carotenoides intervienen en la respuesta inmune y en la comunicación celular *in vivo*, ya que regulan la expresión de algunos genes, como es el caso de los genes que producen el  $\gamma$ -interferon, el cual es el responsable de regular las respuestas inflamatorias e inmunes. Sólo algunos carotenoides precursores de la vitamina A, como los  $\beta$ -carotenos, entre otros, poseen un anillo  $\beta$  no substituido, dicha proteína es importante en el proceso de la visión, mantenimiento epitelial, secreción de la mucosa y reproducción (Selvan *et al.*, 2011 y Abdel-Aal, 2013).

Cuadro 29. Carotenoides identificados en *L. gibba*.

Planta acuática	Muestra	# Pico	$\lambda$ (nm)	Identificado	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )
<i>L. gibba</i>	Fresca	1	416	Neoxantina	91.26
		2	422, 448	$\beta$ -caroteno	119.31
		3	424	Critoflavina	102.63
		4	440, 472	Luteína	116.21
		5	446, 474	Licopeno	107.92
		6	470	Violaxantina	86.37
		7	416	Neoxantina	75.42
	Seca	A	418	$\alpha$ -Caroteno	89.51
		B	440	Luteína	93.11
		C	446, 474	Licopeno	81.50
		D	466	Neoxantina	63.46

Cuadro 30. Concentración de carotenoides identificados en *U. lactuca*.

Planta acuática	Muestra	# Pico	$\lambda$ (nm)	Identificado	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )
<i>U. lactuca</i>	Fresca	1	422, 438, 448	$\beta$ -Caroteno	171.46
		2	433	Clorofila b	83.22
		3	466	Neoxantina	103.57
		4	474	Licopeno	123.16
	Seca	A	422, 424, 426	$\beta$ -Caroteno	116.37
		B	440	Luteína	105.11
		C	446	Licopeno	96.42

### Efecto del alimento funcional sobre el crecimiento de tilapia

De acuerdo a Hasler y Brown (2009) un alimento funcional puede ser un alimento natural al que se le ha agregado o eliminado un componente por alguna tecnología o biotecnología o un alimento donde la naturaleza de uno o más componentes ha sido variada. En base a esta definición, las dietas experimentales suplementadas con harina de *L. gibba* o *U. lactuca* fueron llamadas alimento funcional. Aunque los anteriores investigadores refieren también que para que sea funcional, el alimento debe demostrarse un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales, que mejoren la salud y el bienestar y/o reduzcan el riesgo de alguna patología en los organismos de estudio.

La dieta base 35 % de proteína se formuló de acuerdo a las recomendaciones de Bacconi *et al.*, (2007) para peces omnívoros confinados.

La suplementación con las plantas acuáticas incrementó el porcentaje de proteína en función de la suplementación (Cuadro 31), lo cual se explica por la cantidad de proteína de cada planta (21.5 g/100 g muestra en *L. gibba* y 17.2 g/100 g muestra en *U. lactuca*).

Por otra parte, las dietas experimentales fueron altamente aceptadas por los peces, tal como se esperaba ya que la bibliografía refiere en varios estudios que la incorporación de plantas acuáticas macrofitas de agua dulce y algas marinas verdes son bien aceptadas por una gran variedad de peces, incluyendo las tilapias debido al olor característico de peces y el cuerpo acuático (Hassan y Edwards, 1992; Naegel, 1997).

En el Cuadro 32 se comparan los parámetros de crecimiento en los juveniles de tilapia con el testigo suplementado con MOS. Como se aprecia, la sobrevivencia no fue afectada por ninguna dieta. Se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dietas suplementadas con de *L.gibba* y *U. lactuca* entre los distintos porcentajes de suplementación y con las dietas testigo, aunque en estas últimas no hubo efecto en el crecimiento de los peces. Este resultado coincide con lo reportado por Genc *et al.* (2007b) y Djordjevic *et al.* (2009) explican que el efecto de los MOS sobre el crecimiento en peces depende de la especie a la que se suministre, el tiempo de aplicación y la temperatura del ambiente.

No obstante, se reporta que los MOS (azúcares complejos derivados de la pared externa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) en salmónidos como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el pez gato (*Ictalurus punctatus*) han contribuido al crecimiento (Torrecillas *et al.*, 2007) lo mismo que en los peces doradas juveniles (*Saprus aurata*) y en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Barrandica, 2010) debido a que son capaces de aumentar la densidad y longitud de las microvellosidades aumentando así su superficie de absorción de nutrientes (Dimitroglou *et al.*, 2009) o a que determinadas dosis promueven una mejor digestión de las proteínas (Waché *et al.*, 2006).

Cuadro 31. Composición proximal de las dietas experimentales suplementadas con *L. gibba* y *U. lactuca* (0,10, 15 y 20 %) comparado con el testigo suplementado con mananoligosacáridos (MOS) (0, 1, 1.5 y 2%).

	Con <i>U. lactuca</i>				Con <i>L. gibba</i>				Con MOS			
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
HU	12.3 <sup>a</sup> ± 0.11	11.8 <sup>a</sup> ± 0.12	12.1 <sup>a</sup> ± 0.06	11.9 <sup>a</sup> ± 0.00	12 <sup>a</sup> ± 0.09	11.9 <sup>a</sup> ± 0.10	12 <sup>a</sup> ± 0.09	12 <sup>a</sup> ± 0.09	11.8 <sup>a</sup> ± 0.11	12 <sup>a</sup> ± 0.06	12 <sup>a</sup> ± 0.11	11.8 <sup>a</sup> ± 0.12
PC	35 <sup>a</sup> ± 1.5	37 <sup>b</sup> ± 0.9	38 <sup>b</sup> ± 1.1	39 <sup>c</sup> ± 1.4	35 <sup>a</sup> ± 1.7	38 <sup>b</sup> ± 1.2	39 <sup>b</sup> ± 0.9	40 <sup>c</sup> ± 0.72	35 <sup>a</sup> ± 0.98	35 <sup>a</sup> ± 0.89	35 <sup>a</sup> ± 0.78	35 <sup>a</sup> ± 0.79
FC	5.5 <sup>a</sup> ± 0.11	5.8 <sup>b</sup> ± 0.12	6.3 <sup>c</sup> ± 0.11	6.8 <sup>d</sup> ± 0.10	5.6 <sup>a</sup> ± 0.11	6.6 <sup>a</sup> ± 0.10	7.2 <sup>b</sup> ± 0.09	7.5 <sup>c</sup> ± 0.11	5.6 <sup>a</sup> ± 0.09	7.2 <sup>b</sup> ± 0.10	7.6 <sup>c</sup> ± 0.10	8.0 <sup>d</sup> ± 0.09
EE	6.2 <sup>a</sup> ± 0.09	6.7 <sup>b</sup> ± 0.13	7.2 <sup>c</sup> ± 0.12	7.5 <sup>d</sup> ± 0.11	6.4 <sup>a</sup> ± 0.09	8.3 <sup>b</sup> ± 0.13	8.9 <sup>c</sup> ± 0.11	9.3 <sup>d</sup> ± 0.09	6.2 <sup>a</sup> ± 0.13	6.3 <sup>a</sup> ± 0.11	6.2 <sup>a</sup> ± 0.12	6.4 <sup>a</sup> ± 0.13
ELN	41 <sup>a</sup> ± 0.13	38.7 <sup>b</sup> ± 0.10	36.4 <sup>c</sup> ± 0.13	35.8 <sup>d</sup> ± 0.12	41 <sup>a</sup> ± 0.12	35.2 <sup>b</sup> ± 0.11	32.9 <sup>c</sup> ± 0.13	31.2 <sup>d</sup> ± 0.11	41.4 <sup>a</sup> ± 0.12	42.5 <sup>b</sup> ± 0.12	43.2 <sup>c</sup> ± 0.10	44.5 <sup>d</sup> ± 0.11

HU= humedad; PC= proteína cruda como nitrógeno; FC= fibra cruda; EE= extracto etéreo; ELN= extracto libre de nitrógeno. a,b,c muestran diferencias significativas.

El peso final (PF) resultó significativamente mayor en las dietas con *L. gibba* siendo el valor más alto el de la dieta D7 (128 g) seguido de la D8 (116 g) y D6 (109 g). En el caso de *U. lactuca*, la dieta que tuvo mayor efecto sobre el crecimiento fue la D3 (124 g) seguida de la D4 (110 g) y la D2. En ambos tratamientos el mejor nivel de suplementación fue 15%.

Lo anterior se debe a que la harina de *L. gibba* tenía mayor cantidad de proteína y aminoácidos requeridos para el crecimiento (metionina y lisina) que *U. lactuca*, aunque ambas plantas son fuente de aminoácidos esenciales importante. Lo anterior, también se reflejó en la TEP y el FCA.

Castillo *et al.* (2003), El-Sayed (2004) y Costa *et al.* (2009) explican que los peces usan fácilmente la proteína como fuente de energía para el crecimiento por la capacidad de eliminar su subproducto (amonio soluble) a través de las branquias. *L. gibba* al igual que *U. lactuca* han demostrado contribuir al crecimiento de varias especies de peces cuando se sustituye parte de la harina de pescado. Por ejemplo, González *et al.* (2013) reportaron haber obtenido el mayor crecimiento de alevines de tilapia al incluir en la dieta 18% de *Lemna trinervis*. Hasan *et al.* (2005) alimentaron carpa común (*Cyprinus carpio*) con harina de azolla (*Azolla sp.*) y harina de espinaca (*Ipomoea aquatica*) sin obtener diferencias con respecto al alimento comercial. El-Shafai *et al.*, (2004), reemplazó 20 a 40% de la harina de pescado por harina de *Lemna minor* en forma fresca y deshidratada, ambas favorecieron el crecimiento de la tilapia, siendo altos los valores de los parámetros de crecimiento y demostraron que el cuerpo de la tilapia tuvo altos contenidos de fósforo y proteína y bajo contenido de lípidos. El-Sayed (2006) reporta para la producción de la tilapia se puede sustituir hasta el 50% de la ración de alimento balanceado con lenteja de agua (*Lemna sp.*) y obtener resultados similares a los de la ración completa de alimento comercial.

El factor de conversión alimenticia (FCA) representa la mejor manera de evaluar la calidad del alimento para peces y entre más cercano el valor a 1 es más eficiente el alimento (Bautista *et al.*, 1999). El FCA es afectado por el tamaño de los peces, la densidad de siembra y calidad del alimento (Abou *et al.*, 2007). Aunque también es posible considerar que el aporte de ácidos grasos esenciales encontrados en *L. gibba* y en *U. lactuca* pudo haber contribuido al máximo crecimiento de acuerdo a lo que menciona Castagnioli (1979), Lopera-Barrero y Poveda-Parra (2009), respecto a que los lípidos son fuentes de energía de

aprovechamiento inmediato a través del metabolismo energético del músculo de los peces, y está asociada a la mejora de la conversión alimenticia.

Cuadro 32. Comparación del efecto de las dietas experimentales sobre los parámetros de crecimiento en juveniles de tilapia.

	Con <i>U. lactuca</i>				Con <i>L. gibba</i>				Con MOS			
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
Peso inicial (g)	9.3 ± 0.28	9.0 ± 0.31	9.2 ± 0.23	8.9 ± 0.33	9.0 ± 0.29	9.3 ± 0.30	9.1 ± 0.29	9.4 ± 0.29	9.2 ± 0.25	9.0 ± 0.26	9.2 ± 0.28	9.3 ± 0.31
Peso final (PF) (g)	102 <sup>a</sup> ± 1.5	106 <sup>a</sup> ± 0.9	124 <sup>b</sup> ± 1.1	110 <sup>c</sup> ± 1.4	105 <sup>a</sup> ± 1.7	109 <sup>b</sup> ± 1.2	128 <sup>c</sup> ± 0.9	116 <sup>b</sup> ± 0.72	106 <sup>a</sup> ± 0.98	109 <sup>a</sup> ± 0.89	105 <sup>a</sup> ± 1.0	107 <sup>a</sup> ± 1.1
GPD (g)	1.5 <sup>a</sup> ± 0.36	1.6 <sup>a</sup> ± 0.41	1.9 <sup>b</sup> ± 0.32	1.7 ± 0.37	1.6 <sup>a</sup> ± 0.38	1.6 <sup>a</sup> ± 0.31	1.9 <sup>b</sup> ± 0.39	1.7 ± 0.32	1.6 <sup>a</sup> ± 0.41	1.6 <sup>a</sup> ± 0.37	1.6 <sup>a</sup> ± 0.39	1.6 <sup>a</sup> ± 0.33
S (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TEA	0.19 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.23 <sup>b</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sub>a</sub>	0.24 <sub>b</sub>	0.21 <sup>b</sup>	0.20 <sub>a</sub>	0.20 <sub>a</sub>	0.19 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
FCA	5.3 <sup>a</sup>	5.1 <sup>a</sup>	4.4 <sup>b</sup>	4.9 <sup>c</sup>	5.1 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	4.2 <sup>b</sup>	4.7 <sup>c</sup>	5.1 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	5.1 <sup>a</sup>	5.1 <sup>a</sup>

GPD= ganancia de peso diario, S= sobrevivencia, TEA= tasa de eficiencia alimentaria, FCA= factor de conversión alimenticia.

a, b, c. Literales que indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## Efecto de la dieta funcional sobre la salud de la tilapia

### Hemograma

Los cambios en la composición de la sangre se utilizan para evaluar las condiciones clínicas y los cambios fisiológicas en los organismos. Los indicadores sanguíneos varían de una especie a otra y dentro de una especie pueden variar por factores ambientales o tratamientos (Silveira, 2005, Mohapatra *et al.*, 2014).

En este trabajo, se mantuvieron constantes los parámetros de calidad de agua durante los 60 días de experimentación (Cuadro 33) y estuvieron dentro de los rangos que sugiere la bibliografía especializada para la producción de tilapia (Ingle de la Mora *et al.*, 2003; SAGARPA, 2010; Shoko *et al.*, 2014).

Cuadro 33. Parámetros físico-químicos de la calidad de agua del sistema de recirculación.

Parámetro	Rango
Temperatura (°C)	25 - 28
pH	6.5 – 7.5
DO (mg/mL)	6 - 8
Amonio (ppm)	< 0.3

A pesar de que la tilapia es cultivada en todo el mundo, en Latinoamérica son escasos los reportes acerca de sus parámetros hematológicos sobre la sangre sana en tilapias (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011), por lo que en este estudio se obtuvieron los intervalos de referencia de juveniles de tilapia sanos (Cuadro 34) en base a lo descrito por Díaz *et al.* (2012). Los trabajos similares a este estudio son los de Nilza *et al.*, (2003), Silveira (2005) y Bittencourt *et al.*, (2003) (Cuadro 33), aunque nuestros parámetros difirieron con los de ellos debido a que se trata de distintos tratamientos, condiciones ambientales, especie y etapas fisiológicas diferentes.

Se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.5$ ) entre las dietas testigo con MOS y las dietas con plantas acuáticas, aunque el comportamiento fue similar y todos los valores del hemograma se mantuvieron dentro de los rangos de referencia. Los valores más altos los tuvieron las dietas D10-D12 seguidas de las D3 y D7. No hubo diferencias significativas entre las dietas con plantas acuáticas pero sí con respecto a las de glucomananos y sus controles.



Tampoco hubo diferencias significativas entre los valores a los 30 y 60 días, sólo con respecto al inicio (Cuadro 35).

Cuadro 34. Rangos de referencia del hemograma obtenido de juveniles de tilapia sanos ( N=50).

	Valores referencia	Mediana
<b>Fórmula roja</b>		
Eritrocitos E (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	1.1 - 1.8	1.6
Hemoglobina (Hg) (g/dl)	3.3 – 7.7	4.9
Hematocrito (Hto) (%)	11 - 19	14
VCM (fL)	76.5 - 104	93.3
HCM (pg)	22.5 – 37.5	30.6
CMHgC (g/dl)	27.1 - 33	32.6
<b>Fórmula blanca</b>		
Leucocitos (L) (mm <sup>3</sup> )	4000 - 6900	5200
PROTEINAS TOTALES (PT)(g/L)	3.4 – 7.9	5.6
ALBUMINAS (ALB) (g/L)	2.2 – 5	2.6
GLUCOSA (mg/L)	47 - 59	53

Comparando el control en cada tratamiento con el testigo de MOS se observa que el tamaño de los eritrocitos (E) disminuyeron ligeramente (de 1.5-1.6 a 1.3-1.1 mm<sup>3</sup>), la hemoglobina (Hg) se incrementó en todos los tratamientos excepto en las dietas D4 y D8 (20% de suplementación) donde fue menor. De acuerdo con Verdegem *et al.* (1997), Hrubec *et al.* (2000), Marino *et al.* (2001) y Mohapatra *et al.* (2014) las variaciones sanguíneas pueden deberse a las técnicas utilizadas en el muestreo, la procedencia de los peces, factores de calidad de agua, condición fisiológica del pez y la presencia de alguna enfermedad. Niveles altos de eritrocitos son indicadores de bajo nivel de oxígeno en lo sangre, lo cual se relaciona con un un valor deficiente de oxígeno disuelto en el agua. Si el oxígeno es bajo los peces responden incrementando el número de eritrocitos (Valenzuela *et al.*, 2002). Aunque también está relacionado con la interacción de algunos fármacos (Verdegem *et al.*,1997). Niveles por debajo de lo normal hubiesen indicado una deficiencia nutricional.

Cuadro 35. Media y desviación estándar de la composición hematológica de juveniles de tilapias alimentados con dietas suplementadas con *U. lactuca* y *L. gibba* en distintos porcentajes comparadas con el testigo MOS y el intervalo de referencia.

<i>U. lactuca</i>	<b>D1 (0 %)</b>	<b>D2 (10%)</b>	<b>D3 (15 %)</b>	<b>D4 (20 %)</b>	<b>Intervalo de referencia</b>	<b>Mediana</b>
E (mm3)	1.5 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.1 -1.8	1.6
Hg (g/dl)	4.6 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.05 <sup>b</sup>	5.6 ± 0.05 <sup>c</sup>	6.9 ± 0.02 <sup>d</sup>	3.3 – 7.7	4.9
Hto (%)	12.9 ± 0.03 <sup>a</sup>	13.6 ± 0.02 <sup>b</sup>	14.6 ± 0.04 <sup>b</sup>	17.1 ± 0.03 <sup>c</sup>	11 - 19	14
VCM (Fl)	91.3 ± 0.04 <sup>a</sup>	86.5 ± 0.05 <sup>b</sup>	87.2 ± 0.05 <sup>b</sup>	90.4 ± 0.07 <sup>c</sup>	76.5 - 104	93.3
HCM (pg)	29.4 ± 0.03 <sup>a</sup>	28.3 ± 0.04 <sup>b</sup>	30.3 ± 0.04 <sup>c</sup>	32.8 ± 0.04 <sup>d</sup>	22.5 – 37.5	30.6
CMHgC (g/dl)	29.1 ± 0.9 <sup>a</sup>	29.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	31.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	33.7 ± 0.8 <sup>c</sup>	27.1 - 33	32.6
L (mm3)	5200±0.07 <sup>a</sup>	5850 ± 0.04 <sup>b</sup>	6100 ± 0.06 <sup>c</sup>	6300 ± 0.06 <sup>d</sup>	4000 - 6900	5200
PT (g/L)	4.4 ± 0.03 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.03 <sup>b</sup>	5.6 ± 0.05 <sup>c</sup>	6.4 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.4 – 7.9	5.6
ALB (g/L)	2.4 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.1 ± 0.04 <sup>c</sup>	2.2 – 5	2.6
G (mg/L)	49 ± 0.04 <sup>a</sup>	57 ± 0.04 <sup>b</sup>	53 ± 0.03 <sup>c</sup>	56 ± 0.03 <sup>d</sup>	47 - 59	53
<i>L. gibba</i>	<b>D5</b>	<b>D6</b>	<b>D7</b>	<b>D8</b>		
E (mm3)	1.5 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.1-1.8	1.6
Hg (g/dl)	4.5 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.02 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.05 <sup>b</sup>	5.8 ± 0.02 <sup>c</sup>	3.3 – 7.7	4.9
Hto (%)	12 ± 0.03 <sup>a</sup>	14.6 ± 0.06 <sup>b</sup>	15.1 ± 0.04 <sup>c</sup>	16.5 ± 0.02 <sup>d</sup>	11 - 19	14
VCM (Fl)	78 ± 0.03 <sup>a</sup>	83.2 ± 0.05 <sup>b</sup>	86.5 ± 0.05 <sup>c</sup>	88.2 ± 0.08 <sup>d</sup>	76.5 - 104	93.3
HCM (pg)	28.1 ± 0.06 <sup>a</sup>	27.9 ± 0.03 <sup>a</sup>	29.6 ± 0.04 <sup>b</sup>	31.7 ± 0.06 <sup>c</sup>	22.5 – 37.5	30.6
CMHgC (g/dl)	28.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	29.1 ± 0.06 <sup>b</sup>	28.9 ± 0.05 <sup>a</sup>	31.3 ± 0.05 <sup>c</sup>	27.1 - 33	32.6
L (mm3)	4975 ± 0.06 <sup>a</sup>	5100 ± 0.05 <sup>b</sup>	5800 ± 0.05 <sup>c</sup>	5900 ± 0.07 <sup>d</sup>	4000 - 6900	5200
PT (g/L)	4.6 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.7 ± 0.06 <sup>b</sup>	7.1 ± 0.05 <sup>c</sup>	3.4 – 7.9	5.6
ALB (g/L)	2.1 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.05 <sup>c</sup>	2.2 – 5	2.6
G (mg/L)	52 ± 0.03 <sup>a</sup>	55 ± 0.03 <sup>b</sup>	51 ± 0.03 <sup>a</sup>	58 ± 0.03 <sup>c</sup>	47 - 59	53
<b>MOS</b>	<b>D9 (0 %)</b>	<b>D10 (1 %)</b>	<b>D11 (1.5 %)</b>	<b>D12 (2.0 %)</b>		
E (mm3)	1.5 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.1-1.8	1.6
Hg (g/dl)	4.6 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.7 ± 0.05 <sup>b</sup>	6.8 ± 0.02 <sup>c</sup>	4.9 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.3 – 7.7	4.9
Hto (%)	12.7 ± 0.03 <sup>a</sup>	14.6 ± 0.03 <sup>b</sup>	17.3 ± 0.03 <sup>c</sup>	18.4 ± 0.04 <sup>d</sup>	11 - 19	14
VCM (Fl)	81 ± 0.05 <sup>a</sup>	87 ± 0.07 <sup>b</sup>	96 ± 0.04 <sup>c</sup>	99 ± 0.05 <sup>d</sup>	76.5 - 104	93.3
HCM (pg)	28.5 ± 0.05 <sup>a</sup>	31.2 ± 0.07 <sup>b</sup>	30.3 ± 0.05 <sup>b</sup>	32.1 ± 0.05 <sup>c</sup>	22.5 – 37.5	30.6
CMHgC (g/dl)	28.2 ± 0.08 <sup>a</sup>	30.2 ± 0.05 <sup>b</sup>	31.7 ± 0.08 <sup>c</sup>	32.3 ± 0.07 <sup>d</sup>	27.1 - 33	32.6
L (mm3)	5150 ± 0.05 <sup>a</sup>	6200 ± 0.05 <sup>b</sup>	6700 ± 0.02 <sup>c</sup>	6750 ± 0.04 <sup>d</sup>	4000-6900	5200
PT (g/L)	4.5 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.05 <sup>b</sup>	6.3 ± 0.05 <sup>b</sup>	6.6 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.4 – 7.9	5.6
ALB (g/L)	2.4 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.06 <sup>c</sup>	2.2 – 5	2.6
G (mg/L)	50 ± 0.03 <sup>a</sup>	54 ± 0.02 <sup>b</sup>	53 ± 0.03 <sup>c</sup>	50 ± 0.02 <sup>a</sup>	47 - 59	53

Cuadro 33. Parámetros hematológicos de referencia de tilapia bajo diferentes condiciones de cultivo.

	Silveira (2005) <i>O. niloticus</i>		Nilza de Lucas <i>et al.</i> (2003)	
	Media	Rango	Media	Rango
FORMULA ROJA				
Eritrocitos (E) (mm <sup>3</sup> )	1.3	1.2 -1.3	6.93	0.7-28
Hemoglobina (Hg) (g/dl)	2.69	2.5 -2.8	10.5	6.58-15.98
Hematocrito (Hto) (%)	21.8	20.2 - 23	31.8	15-45
VCM (fI)	170.8	169 -172	148.8	12.36-528.57
HCM (pg)	20.4	18.5 – 22.9	40.74	5.07-120.86
CMHgC (g/dl)	13.2	12.4 -14	35.2	19.84-87.73
FORMULA BLANCA				
Leucocitos (L) (mm <sup>3</sup> )			93,250	18,750 -151,750
PROTEINAS TOTALES (PT)(g/L)			3.5	2.7 – 5.0
ALBUMINAS (ALB) (g/L)			3.06	1.81 – 3.98
GLUCOSA (mg/L)			60.32	22.7 - 107

Badawi y Said (1971) reportaron para *O. aureus*  $1.29 \times 10^6$  mm<sup>3</sup> de eritrocitos, 27 % el Hto y 8.2 mg/L de Hg, valores similares encontró Silveira (1987); las variaciones se debieron a las distintas poblaciones bajo diferentes condiciones. Estudios que han comparado los parámetros hematológicos de fórmula roja en cuatro especies de tilapia (*O. ureus*, *O. mossambicus*, *O. niloticus* roja y *O. niloticus*) han encontrado variación en todos los parámetros (Cnaani, 2002; Silveira, 2005).

En los índices eritrocitarios VCM (tamaño), HCM (carga media de hemoglobina) y CHCM (cromía o color de la hemoglobina), el hematocrito (Hto) y los de hemoglobina (Hg) los valores más homogéneos y cercanos a la mediana los tuvieron las dietas con *U. lactuca* y glucomananos. De acuerdo a Fagbuaro *et al.* (2016) el valor del Hto depende del tamaño del glóbulo rojo, por lo que no siempre refleja el número de hematíes, aunque sí es expresión de su concentración. Lo anterior permitió inferir que la cantidad de oxígeno en la sangre fue la adecuada para una asimilación eficiente de nutrientes, con lo que se descartó la presencia de algún tipo de anemia.

Ahora bien, el valor del hematocrito, al igual que en humanos y otros vertebrados, fue equivalente a 3 veces la concentración de hemoglobina tal como lo refieren para individuos "normales" Carmona-Fonseca (2003), Tavares-Díaz y Morales (2004). Aunque los valores obtenidos fueron más altos que los reportados por Bittencourt *et al.* (2003) para *O. niloticus* (10,5 g/dl), Tavares-Díaz y Morales (2004) en *Cyprinus carpio* (10,5 g/dl) y Correa *et al.* (2009) para *Sorubim cuspicaudus* (10.5 g/dl), quienes explican al igual que Hawarry (2012) que las diferencias se deben al estado fisiológico de los peces y tratamientos de estudio y que además existe una correlación entre la Hg y el Hto relacionados con la actividad y el hábitat de los peces.

La hemoglobina es la proteína transportadora del oxígeno en la sangre; sus valores estuvieron dentro del rango de referencia en todos los tratamientos. Valores debajo de lo normal hubiesen indicado alguna deficiencia nutricional (bajo nivel de hierro, folato, vitamina B12 y vitamina B6). Niveles altos hubiesen indicado deficiencia de oxígeno en la sangre, lo cual se relaciona con una deficiencia de oxígeno en el agua y por tanto, problemas para la asimilación de los nutrientes del alimento (Randelli *et al.*, 2008; Alvarez-Pellitero, 2008).

Los linfocitos son las células que responden frente a estímulos inmunológicos, se encuentran maduros en mayor abundancia en organismos sanos. Un conteo bajo de leucocitos se denomina leucopenia debido a una deficiencia o insuficiencia de los tejidos linfoides (timo, bazo, riñón) debido a una cicatrización o infección muy severas. Una cantidad alta es nombrada leucocitosis debido a una anemia aplásica (cuando tejidos linfoides no producen suficientes células sanguíneas), infecciones por bacterias, inflamación, daño tisular, estrés o antibióticos (Baker *et al.*, 2002; Randelli *et al.*, 2008; Alvarez-Pellitero, 2008; Adenkola *et al.*, 2009).

La albúmina y la glucosa en las diferentes dietas de este estudio estuvo dentro del rango reportado por Nilza de Lucas *et al.* (2003).

La glucosa en nuestro control fue similar (63 mg/dl, algo) al obtenido por ellos pero muy diferentes a los resultados obtenidos por Fagbuaro *et al.* (2016) cuyas concentración de glucosa que reportaron fue de 0.90 mg/dl. Y en cuanto albúmina sus resultados fueron superiores a los de este estudio.

La albúmina es el mayor componente y ayuda a transportar muchas moléculas pequeñas a través de la sangre, entre ellas calcio, hormonas y medicamentos (Baker *et al.*, 2000; Buckham-Sporer *et al.*, 2008). Juega un papel importante para impedir que el líquido de la sangre se filtre hacia los tejidos. La disminución de albúmina en la sangre puede ocurrir cuando el organismo no obtiene ni absorbe suficientes nutrientes o por que la dieta tenga una cantidad baja de proteína. Un aumento en la albúmina puede deberse a una alta cantidad de proteína en la dieta (Hawarry, 2012). En los peces la albúmina participa en la regulación osmótica coloidal de la sangre y transporta algunos metabolitos en forma exógena y endógena (Baker, 2002). Sin embargo Bittencourt *et al.*, (2003) menciona que las variaciones están influenciadas por las condiciones ambientales, el género, la edad, el sistema, la alimentación y la genética, factores posible de interferencia en los resultados.

Las proteínas totales miden la cantidad total de las proteínas de la porción líquida en la sangre: albúmina (proteína del hígado) y globulina (Wiegertjes, 1996). Estas son indicadoras de problemas nutricionales ocasionadas por mal absorción de nutrientes o enfermedades hepáticas (Fagbuaro *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos de estas proteínas estuvieron dentro de los valores de referencia, no denotando evidencia de deficiencias nutricionales o problemas hepáticos. En base a nuestros resultados, no existe evidencia de que las dietas fueran deficientes ya que los valores estuvieron dentro del rango.

### **Actividad de la lisozima**

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración de la lisozima (Figura 12), entre las dietas con los diferentes suplementos y los días de suministro (1, 30 y 60). A mayor tiempo de suministro la actividad de la lisozima se fue incrementando en función del crecimiento de las tilapias y el porcentaje de suplementación. La mayor actividad la presentaron las dietas D4 y D3 de *U. lactuca*, y las D8 y D7 de *L. gibba*, lo cual representó un efecto de las dietas sobre la actividad de la lisozima de 66 y 60 % respectivamente con cada planta acuática, respecto al testigo. Con lo anterior, se confirma lo referido por (Carrillo, 2013) respecto a que la activación de la lisozima es un indicador de la respuesta inmune inespecífica. Watts *et al.* (2001) y Jian y Wu (2003) refieren que funciona como una opsonina y activador del sistema de complemento y la fagocitosis. Los resultados fueron similares a los reportados por Demers y Bayne (1997) para trucha arcoiris. Balcázar *et al.* (2007), Saurabh y Sahoo (2008) indicaron que en salmones y truchas la actividad de lisozima se incrementó en el suero tras la inoculación de bacterias y la suplementación con glucanos o probióticos entre otros.

Saurabh y Sahoo (2008) y Jian y Wu (2003) explican que la actividad de la lisozima varía según la edad y tamaño de los peces, calidad de agua y tiempo de exposición a un tratamiento. Tort *et al.* (2003) refiere que la potencia de la actividad de lisozima varía dependiendo de la especie y su localización tisular.

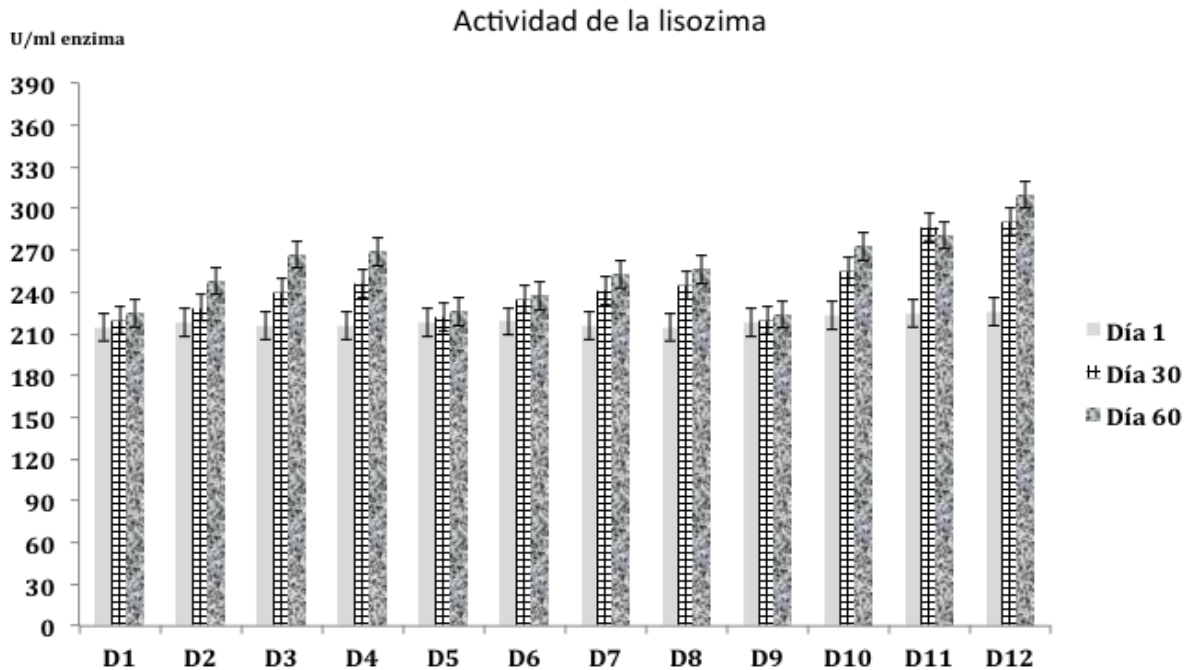


Figura 12. Concentración de la lisozima en los días 1, 30 y 60 de experimentación en los juveniles de tilapia alimentados con las distintas dietas.

### Actividad del complemento (C3)

El sistema del complemento fue estudiado en el suero sanguíneo, debido a que la literatura refiere que de los componentes del sistema inmunológico es el que se encuentra en mayor proporción en la sangre formado por numerosas proteínas y todas las vías generan el factor C3, que ha sido aislado y descrito en varias especies de peces teleósteos (Nakao *et al.*, 2003; Berrón-Pérez *et al.*, 2003).

Como se observa en la Figura 13, la concentración de C3 fue mayor en las muestras del suero del testigo MOS, habiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los días 30 al 60, al igual que en las dietas con los diferentes suplementos (*L. gibba* y *U. lactuca*) y los porcentajes distintos de suplementación. Hubo una relación directamente proporcional de la concentración C3 con la concentración de lisozima y los leucocitos. La concentración de C3 en las muestras de suero de las tilapias alimentadas con las dietas suplementadas con *U. lactuca* (D2, D3 y D4) fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores a las suplementadas con *L. gibba* (D6, D7 y D8). La suplementación con *U. lactuca* 20% (D4) y con *L. gibba* (D8) mostraron un efecto respecto al testigo MOS de 73 y 66%, respectivamente. En este estudio el aumento de la concentración C3 fue un indicador de la activación fisiológica de la respuesta inmune innata que fue sensible al estímulo de los componentes químicos contenidos en las plantas acuáticas de forma similar, aunque no con la misma potencia, al testigo con MOS. Rodríguez *et al.* (2002) y Pylkkö *et al.* (2002), refieren que la actividad del complemento aumenta o disminuye de acuerdo a la dosis, tiempo de administración y diferencias de activación del inmunoestimulante aplicado.

Los MOS han sido relacionados con roles inmunológicos, se ha observado que promueven la activación de la lisozima y distintos mecanismos de defensa previniendo así la adherencia de bacterias a los carbohidratos de la superficie de las células intestinales y por ende infecciones (Rodríguez-Estrada *et al.*, 2013). Barandica (2010), demostró la activación del complemento con 4g.kg<sup>-1</sup> de MOS y con 2.5g.kg<sup>-1</sup> de glucanos en lubinas (*Dicentrarchus labrax*) y en los peces doradas juveniles (*Saprus aurata*).



### Actividad del complemento C3

Conc. de C3  
(mg/dL e)

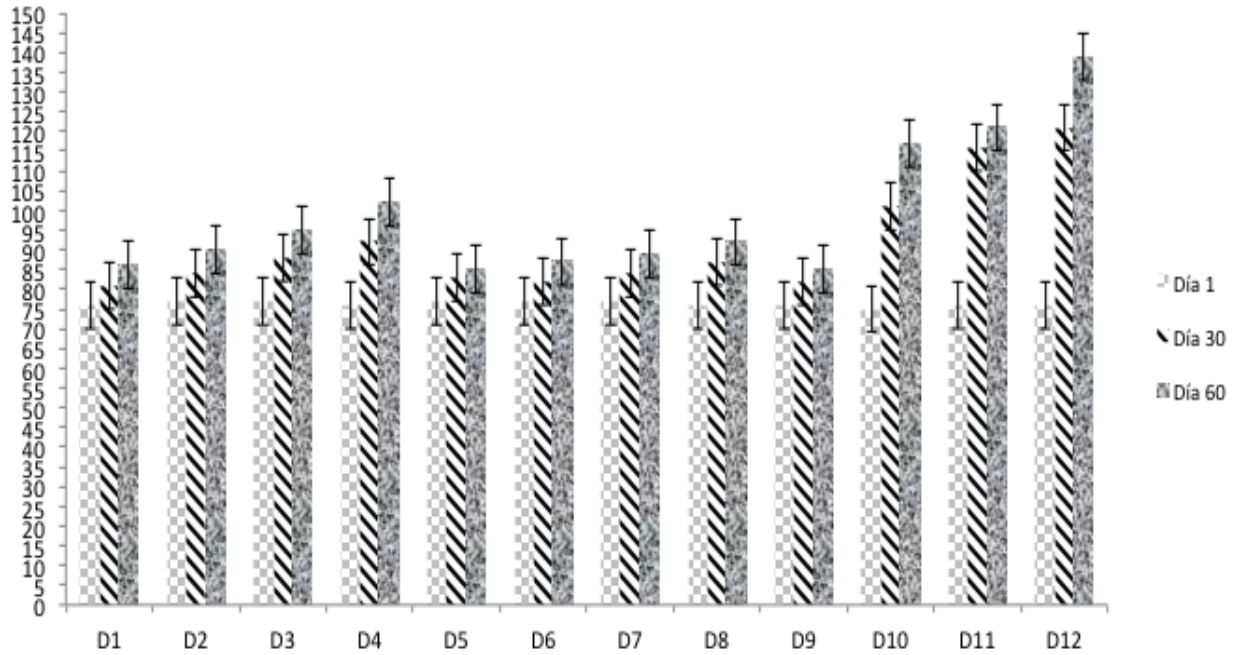


Figura 13. Concentración de C3 encontradas a los días 1, 30 y 60 en los juveniles de tilapia alimentados con distintas dietas funcionales experimentales.

## CONCLUSIONES

Las plantas acuáticas *Lemna gibba* y *Ulva lactuca* colectadas en la Cuenca Media Baja del Papaloapan son susceptibles de aprovechamiento para la elaboración de dietas funcionales para tilapia y otras especies ya que en ellas se determinaron nutrientes y compuestos bioactivos en cantidades considerables.

En base al porcentaje de proteína cruda cuantificada, *L. gibba* resultó una fuente proteica y *U. lactuca* una fuente energética. Ambas plantas acuáticas tuvieron 8 aminoácidos esenciales para el crecimiento de tilapia con aportes significativos de lisina y metionina.

*U. lactuca* presentó una mayor variedad y contenido de ácidos grasos poliinsaturados con un aporte importante de  $\omega$ 3, AL (3.93 mg/g de grasa);  $\omega$ 6, L (6.73 mg/g de grasa) y AA (0.41 mg/g de grasa) importantes para el reforzamiento del sistema inmunológico y la estimulación del consumo de alimento en tilapia que se refleja en un mejor crecimiento y conversión alimenticia. Por otra parte, presentó un mayor contenido de. *L. gibba* fue una fuente importante de xantofilas en muestras secas y en fresco, confiriéndoles un efecto antioxidante e inmunoestimulante.

Microbiológicamente, las plantas acuáticas estudiadas, no presentaron riesgo alguno para utilizarse en la alimentación de peces. Toxicológicamente no presentaron sustancias que afectaran la digestión o comprometieran su salud.

Las dietas con *L. gibba* y *U. lactuca* como ingredientes funcionales demostraron un efecto fisiológico sobre los parámetros de crecimiento y los indicadores de la salud (parámetros hematológicos, actividad de la lisozima y del complemento C3) Los parámetros hematológicos indicaron un mejor transporte de oxígeno en la sangre, un incremento de las células de defensa y una mejor absorción de nutrientes.

El mejor efecto sobre el crecimiento resultó con la suplementación 15% tanto con *U. lactuca* como con *L. gibba*, obteniéndose con ésta última los mejores resultados en peso final (128 g), tasa de eficiencia alimenticia (24) y factor de conversión alimenticia (4.2). No obstante lo anterior, en los parámetros de salud referentes a la actividad del complemento y la lisozima, el mejor efecto fue con las dietas suplementadas al 20% con *U. lactuca* y *L. gibba*, que representaron un efecto respecto al testigo MOS de 73% y 66%, respectivamente.

## **RECOMENDACIONES**

Para complementar este estudio se recomienda lo siguiente:

1. Identificar y caracterizar el mayor número de compuestos con actividad biológica de las plantas acuáticas.
2. Realizar el estudio por épocas estacionales ya que el contenido de la composición química está en función de las características ambientales.
3. Determinar los efectos del procesamiento tecnológico en el alimento funcional.
4. Identificar y validar biomarcadores que evalúen el alimento funcional.
5. Realizar pruebas de desafío.
6. Verificar los efectos en la salud mediante técnicas moleculares que garanticen su efectividad.

## REFERENCIAS

1. Abirami R.G. y S. Kowsalya. 2011. Nutrient and nutraceutical potentials of seaweeds biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphyscus alvarezii*. *J of Agri Sci and Tech.*, 5(1): 109-115.
2. Águila-Ramírez R.N., A. Arenas-González, C.J. Hernández-Guerrero, B. GonzálezAcosta, J.M. Borges-Souza, B. Véron, J. Pope y C. Hellio. 2012. Antimicrobial and antifouling activities achieved by extracts of seaweeds from Gulf of California, Mexico. *Hidrobiológica* 22(1): 8-15.
3. Akter M., Chowdhury S.D., Akter Y., Khatun M.A., 2011. Effect of duckweed (*Lemna minor*) meal in the diet of laying hen and their performance. *Bangladesh Research Publications Journal* 5 (3), 252–261.
4. Alamsjah M.A., Hirao S., Ishibashi F. y Fujita Y. 2005. Isolation and structure determination of algicidal compounds from *Ulva fasciata*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 2186-2192.
5. Almahy D. H. A. 2015. Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of *Lemna minor* against eight different bacterial species. *International Journal of Pharmacy*, 5 (1), 2015, 46-50.
6. Andersen Q.M., Markhan K.R. 2006. Flavonoids-chemistry, biochemistry and applications. Taylor and Francis Group, Boca raton.
7. Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura 2014. SAGARPA-CONAPESCA. México. 311 p.
8. A.O.A.C. Official methods of analysis International. 2006. 18th Edition. Revision of 2005.
9. Arora A., Sairam, R. and Srivastava, G. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10): 1227.
10. Arrivallaga, C. A. Arredondo, J. L. 1987. Una revisión sobre el potencial de las macrófitas acuáticas en la acuicultura. *Universidad ciencia*, 4(8).55-67.
11. Ávalos G. A. y Pérez U.G.E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
12. Avello Marcia y Suwalsky, Mario. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepc.)*. 494:161-172. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-04622006000200010&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010&lng=es&nrm=iso).
13. Awad E.S. 2010. Studies on plant based dietary supplements for control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Disponible: [http://www.ros.hw.ac.uk/bitstream/10399/2342/1/AwadES\\_0810\\_sls.pdf](http://www.ros.hw.ac.uk/bitstream/10399/2342/1/AwadES_0810_sls.pdf)

14. Barrera O. M. 2015. Uso de biomarcadores enzimáticos en organismo acuáticos (*Lemna valdiviana*) para evaluar la toxicidad de efluentes de pisciculturas en sistemas fluviales. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 138 p.
15. Barrera-Arellano D; Ruiz-Méndez V; Velasco J; Marquez-Ruiz G. y Dobarganes, C. 2002. Loss of tocopherols and formations of degradation compounds at frying temperature in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *Journal Science of Food Agricultural* 82, 1696-1702.
16. Barsanti L, Gualtieri P. 2006. *Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Taylor and Francis. Florida US, pp. 251-289
17. Bayne CJ y Gerwick L. 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 725-743.
18. Benjama O. y Masniyom P. 2011. Nutritional composition and physicochemical properties of two green seaweeds (*Ulva pertusa* and *U. intestinalis*) from the Pattani Bay in Southern Thailand. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 33 (5), 575-583 pp.
19. Bonilla M.M. y Rondón-Barragán I.S. 2011. Biología comparada del sistema de complemento en peces. *Rev CES Med Vet Zootec.* Vol 6 (2): 74-90
20. Bui X.M., B. Ogle and J.E. Lindberg. 2002. Use of duckweed as a protein supplement for breeding ducks. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences.* 15 (6): 866-871.
21. Buonocore F., Randelli E., Trisolino P., Facchiano A., de Pascale D. and G. 2014. Caracterización molecular, estructura génica y actividad antibacteriana de una lisozima tipo g de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mol Immunol.* 62 (1): 10-8.
22. Burdge G.C.; Finnegan Y.E.; Minihane A.M.; Williams C.M.; Wootton S.A. 2003. Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [<sup>13</sup>C]  $\alpha$ -linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards  $\beta$ -oxidation in older men. *Br. J. Nutr.* 90: 311–321.
23. Calder P.C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients* 2010, 2, 355–374.
24. Carranco M.E., Castillo R.M., Escamilla A., Martínez M., Pérez-Gil F. y E. Stephan. 2002. Composición química, extracción de proteína foliar y perfil de aminoácidos de siete plantas acuática. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36 (3) 247-258 pp.
25. Carrillo W. 2013. Lisozima actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actualización en nutrición.* 14(4):314-326.

26. Carrillo Domínguez S., Casas Valdez M., Ramos Ramos F., Pérez-Gil F. y Sánchez Rodríguez I. 2002. Algas marinas de Baja California Sur, México: Valor nutrimental. ALAN 5(4) Caracas. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222002000400012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222002000400012&script=sci_arttext)
27. Caroch M. y Ferreira I. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology; 51: 15–25.
28. Cartaya O. y Reynaldo I. 2001. Reseña bibliográfica Flavonoides: características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales. 22(2): 5-14.
29. Centeno, L., Silva-Acuña, R., Barrios, R., Salazar-Lugo, R., Matute, C. y Pérez, J.L., 2007. Características hematológicas de la cachama (*Colossoma macropomum*) en tres etapas de crecimiento cultivadas en el estado Delta Amacuro, Venezuela. Revista Zootecnia Tropical. Venezuela, 25 (4): 237-243
30. Chasquibol N.S., Lengua L.C., Delmás I., Rivera D.C., Bazán D., Aguirre, M.R., Bravo, A.M. 2003. Alimentos Funcionales o Fitoquímicos, Clasificación e Importancia. Rev.Per. Quim. Ing. Quim. 5(2): 9-21 p.
31. Christiansen R., J. Glette O. Lie, O.J. Torrissen and R. Waagbo. 1995. Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed semi-purified diets with and without astaxanthin supplementation. J. Fish Diseases 18: 317-328
32. CONAPESCA (2003) Anuario Estadístico de Pesca 2002.
33. CONAPESCA-SAGARPA, MICHOACÁN. 2012. Plan Rector del Sistema Producto Tilapia Michoacán. Siprotmich. 85p.
34. Conroy G. and Conroy D.A. 2006. Bacterial haemorrhagic septicaemia in tilapias. Aquacult Health Int 7: 7-8.
35. Coronado H. M.; Vega y León S., Gutiérrez R., Vázquez M., Radilla C. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Rev. chil. nutr. [online]. 42(2): 206-212. Disponible en: <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182015000200014&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000200014&lng=es&nrm=iso)>.
36. Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Guajardo-Barbosa C, Ricque-Marie D. 2008. Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. Aquaculture Nutrition 15:421-430.
37. Cruz-Suárez L. E., León A., Peña-Rodríguez A., Rodríguez-Peña G., Moll B., Ricque-Marie D. 2010. Shrimp/*Ulva* co-culture: a sustainable alternative to

- diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301(1-4):64-68.
38. Darley M. W. 1987 *Biología de las algas. Enfoque fisiológico*. Departamento de botánica. Universidad de Georgia. Edición Limusa S.A. (México).
  39. Dawczynski C., Schubert R. and Jahreis, G. 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*. 103, 891–899.
  40. Dawes C. 1986 *Botánica Marina*. Ed. Linnusa S.S de C., 673 p.
  41. Díaz P.P., Olay F. G., Hernández G. R., Cervantes-V. D., Presno-B. J.M., Alcántara G. L.E. 2012. Determinación de los intervalos de referencia de biometría hemática en población mexicana. *Rev Latinoamer Patol Clin*, 59(4): 243-250.
  42. Dierick N.; Obyn A. y De Smet S. 2010. In vitro assessment of the effect of intact marine brown macro-algae *Ascophyllum nodosum* on the gut flora of piglets. *Livest Sci* 133:154–156
  43. Din A., Muhammad Anjum F., Zahoor T. y Nawaz H†. 2011. Extracción y utilización de  $\beta$ -glucano de Cebada para la Preparación de Bebidas Funcionales. *Rev. Mundo Alimentario* 16-20 pp.
  44. Dominguez, A. X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Primera edición. Editorial Limusa. México. 3-17 pp.
  45. Durán C. R. y Valenzuela B. A. 2010. La experiencia japonesa con los alimentos FOSHU ¿Los verdaderos alimentos funcionales? *Rev Chil Nutr.*, 37 (2):224-233.
  46. Effiong B.N.y Sanni A. 2009. Antifungal Properties and Phytochemical Screening of Crude Extract of *Lemna pauciscostata* (Helgelm) Against Fish Feed Spoilage Fungi. *Life Science Journal* 6(3):19-22.
  47. El-Baky H.H.A., El-Baz F.K., El-Baroty G.S. 2008. Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. *Int J Food Sci Technol* 44: 1688-1695.
  48. El-Sayed A.F.M. 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp*. *Aquaculture* 179: 149-168
  49. El Sayed A. 2004. Protein nutrition of farmed tilapia: searching for unconventional sources. The 6th International Symposium of Tilapia. Arizona – USA.
  50. El-Tawil, N.E. y Amer, T.N. 2010. Effect of different dietary oil sources on fish performance, feed utilization and body composition of red tilapia (*Oreochromis sp.*) fry. The third scientific conference. Al Azhar Univ. Cairo 17-18 Oct. 2010, Abbassa Int. Jou. Aqua. 163-177.
  51. Esteban M.A. 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunol*; 2012-2029 p.

52. FAO. 2009. FishStat Plus - Programa informático universal para series cronológicas de estadísticas pesqueras.
53. FAO. 2015. The State of World Fisheries and Aquaculture. United Nations, Rome, Italy, pp. 1–150.
54. Fitzsimmons K. 2003. Producción y mercado internacional de tilapia. Memorias de la Reunión Nacional de Tilapia. Instituto de la Pesca. Guadalajara, México. 134-150 pp.
55. Frikha F., Kammoun M., Hammami N., Mchirgui R.A., Belbahri L., Gargouri Y., Miled N. and Ben-Rebah F. 2011. Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. *Ciencias Marinas* 37(2): 113-124.
56. Fredslund F., Jenner L., Husted L., Nyborg J., Andersen G. 2006. The structure of bovine complement component 3 reveals the basis for thioester function. *J Mol Biol*; 361:115-127
57. Gardiner G.E.; Campbell A.J.; O'Doherty J.V.; Pierce E.; Lynch P.B.; Leonard F.C.; Stanton C.; Ross R.P. y Lawlor P.G. 2008. Effect of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance, digestibility, carcass characteristics and selected intestinal microflora populations of grower/finisher pigs. *Anim Feed Sci Technol* 141:259–273
58. Gayathri G.N; Platel K; Prakash J. and Srinivasan K. 2004. "Influence of antioxidant spices on the retention of b-carotene in vegetables during domestic cooking processes". *Food Chemistry* 84, 35-43.
59. Ghobrial M.G., S. Omar and T. Adan. 2007. Potential for finding new bioactive agents from selected aquatic plant extracts against enteric bacteria. *Egyptian Journal of Natural Toxins*, 4(2): 12-25.
60. Gómez-Pinchetti J. L., Del Campo Fernández E., Moreno-Díez P., y García-Reina G. 1998. Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 10, 383–389.
61. González, S. R. 2004. Alimento natural para peces factor relevante en la acuicultura. REDVET No. 2, Vol. V. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
62. González, M. S. y Peñalosa, C. I. 2000. *Biología Molecular (Métodos de Análisis)*. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Izatacala, Edo. de México. 256 pp.
63. González S.R., Fonseca E. M., Rico- G. R., Romero C. O. y Ponce P. 2013. Utilización de *Lemna trinevris* en la alimentación de la tilapia aurea. *Revista Granma Ciencia*. 17 (2): 1-8.
64. González Salas R., Romero Cruz O., Valdivié Navarro M., Ponce-Palafox. 2014. Los productos y subproductos vegetales, animales y agroindustriales:



- una alternativa para la alimentación de la tilapia. *Revista Bio Ciencias* 2(4): 240-251.
65. GLOBALFISH. 2015. Market report: tilapia. Febrary 2015. FAO Fisheries Department. Disponible en: <http://www.globefish.org/market-reports.html>
  66. Gormley T.R. 2006. Fish as a functional food. *Food Science and Technology*. 20 (3): 25-28.
  67. Guitiérrez K., Sanginés L., Pérez F. y L. Martínez. 2001. Estudios del potencial de la planta acuática *Lemna gibba* en la alimentación de cerdos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 35(4, 2): 367-372 pp.
  68. Gülçin I., Kircci E., Akkemik E., Topal F., Hisar O. 2010. Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L., *Lemnaceae*). *Turk J Biol*. 34:175-188.
  69. Gültepe N., Acar U., Kesbic OS, Yilmaz S., Yildirim O. and Turker A. 2014. Effects of dietary *Tribulus terrestris* extract supplementation on growth, feed utilization, haematological and biochemical variables of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Isr J Aquac.*, IJA. 1024.
  70. Hamazu, K. and Yamanaka, H. 1997. Usefulness of the meal of a sterile mutant of *Ulva pertusa* as a feed supplement for cultured yellowtail. *Suisanzoshoku*, 45, 357–363.
  71. Hahn-von-Hessberg C., Grajales-Quintero A. y Gutiérrez, A.V., 2011. Parámetros hematológicos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linneaus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas, *Vet. Zootec.*, 5(1): 47-61
  72. Hasler C.M. y Brown A.C. 2009. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *J. Am Diet Assoc*. 109(4): 735- 746.
  73. Hayden, H. S. y J.R. Waaland, 2004. A molecular systematic study of WIY/ (Ulvaceae. Ulvales) from the northeast Pacific. *Phycologia* 43: 364-382 pp.
  74. Herrera C., Betancur A. D. y Segura C.M. 2014. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutr. Hosp*. 2014; 29(1):10-20.
  75. Huang C.B.; Ebersole J.L. 2010. A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. *Mol. Oral Microbiol.*, 25, 75–80.
  76. Horowitz G.L. 2010. EP28-A3C: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory, 3rd Edition. Beth Israel Deaconess Medical Center. ISBN 1-56238-682-4
  77. Immanuel G., Vincybai V. C., Sivaram V., Palavesam A., Marian M .P. 2004. Effect butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival,

- growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*; 236: 553-556.
78. INAFED. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal del Gobierno de México, Enciclopedia en línea consultada en Marzo de 2016.
  79. Indergaard, M. and Minsaas, J. 1991. Animal and human nutrition. In *Seaweed resources in Europe: uses and potential*, M.D. Guiry and G. Blunden, editors., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, U.K., 21–64 pp.
  80. INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2006. Cuaderno estadístico municipal de Loma Bonita, Oaxaca.
  81. Ingle de la Mora G., Villareal-Delgado E., Arredondo Figueroa J., Ponce-Palafox J. Barriga-Sosa I. 2003. Evaluation of some water quality parameters in recirculation system for aquaculture, submitted to different charges of biomass of fish. *Hidrobiological*, 13 (4): 247-253
  82. INNSZ. 1984. Manual de técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Dpto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México D.F.
  83. Jani M., Shah S. y Sujit P. 2012. Antibacterial Screening and Qualitative Phytochemical Estimation of Selected Aquatic Plants. *Advances in Biological Research* 6(1):19-23.
  84. Kalita P., Mukhopadhyay P. K. and Mukherjee, A. K. 2008. Supplementation of four non-conventional aquatic weeds to the basal diet of *Catla catla* (Ham.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham.) fingerlings: Effect on growth, protein utilization and body composition of fish. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 38, 21–27.
  85. Karuppusamy S. y Rajasekaran KM. 2009. Cribado antibacteriano de alto rendimiento de extractos de plantas mediante redox de resazurina. Referencia especial a las plantas medicinales de Ghats Occidentales. *Global J Pharmacol*, 3 (2), 63 – 68.
  86. Keawcharoen J., Techangamsuwan S., Ponpornpisi, A., Lombardini E.D, Patchimasiri, T. y Pirarat, N. 2015. Caracterización genética de un betanodavirus aislado de un brote de enfermedad clínica en tilapia cultivada en granja *Oreochromis niloticus* (L.) en Tailandia. *J Fish Dis*, 38: 49-54.
  87. Khan M.N.A, Suk-Choi J., Lee M.C, Kim E, Nam T.J, Fujii H., Hong Y.K. 2008. Anti-inflammatory activities of methanol extracts from various seaweed species. *J Environ Biol* 29:465–469.
  88. Krinsky N.I. 1998. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Ann NY Acad Science*; 854: 443-7.

89. Kumari P., Kumar M., Gupta V., Reddy C. R. K. and Jha B. 2010. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chemistry*, 120(3), 749–757.
90. Lahaye M. and Robic A. 2007. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 8:1765–1774
91. Lambris J.D., Cruse J.M., Lewis R.E. Jr (eds) 1993. *Complement Today. Complement Profiles*. Basel, Karger; 1 (4): 16-45.
92. Lango R.V. 2011. Caracterización del sistema de abasto al menudeo de tilapia viva (*Oreochromis* spp.) en la región Sotavento del Estado de Veracruz, México. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. 129 p.
93. Li Y. y Shuang-Hu C. 2011. Identification and Pathogenicity of *Aeromonas sobria* on Tail-rot Disease in Juvenile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Curr Microbiol*, 62:623–627.
94. Lima F J, Carvalho A F, Freitas S M. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. *Braz J Microbiol*; 33 : 311-31.
95. López G. E. 2015. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Ulva lactuca*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Baja California. Ciencias del Mar. Biología Marina. 40 p.
96. Lopez-Rubio A, Gavara R, Lagaron J. 2007. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends Food Sci Technol*; 17: 567-575.
97. Lovstad H.S. and Kraan S. 2011. VBioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J Appl Phycol* 23:543-597.
98. Magnáðottir B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol (NY)*, 12 (4): 361-379.
99. Malinowski, E. 2001. Properties and activity of lysozyme in: *Lysozyme dimer in therapy and prophylaxis of animal diseases* (edited by T. Tatcher) Nika Health Products Vaduz, Lischtestein, Poznan-Poland. 7-13 pp.
100. Margret R.J.; Kumaresan S.; Ravikumar S. 2009. A preliminary study on the anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ulva lactuca* in rat. *J Environ Biol* 30: 899-902.
101. Marinho-Soriano E., Fonseca P.C., Carneiro M.A., Moreira W.S. 2006. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour Technol*. 18:2402-6.
102. Matanjun P., Mohamed S., Mustapha N.M. and Muham M.K. 2009. Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Euclima cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. *Journal of Applied Phycology*. 21, 75–80.
103. Mateo E., Castro T. y Sierralta V. 2011. Enfermedad bacteriana de tipo granulomatosa en tilapia cultivada en jaulas flotantes. Disponible en:

- [http://70www.lamolina.edu.pe/eventos/pesqueria/acuicultura/2011/descargas/25\\_Auxiliar2/G2.p](http://70www.lamolina.edu.pe/eventos/pesqueria/acuicultura/2011/descargas/25_Auxiliar2/G2.p).
104. Medeiros J.; Macedo M.; Constancia J.; LoDuca J.; Cunningham G. 1999. Potential anticancer activity for plants and marine organisms collected in the Azores. *Açoreana* 9: 55-61.
  105. Maier H. 1978. Métodos cromatográficos incluyendo el intercambio iónico., Métodos modernos de análisis de alimentos, tomo II, Zaragoza, 97-99 pp.
  106. Megazyme. (2011). Total starch assay procedure (amyloglucosidase/-amylase method). Megazyme Ltd. Available at: [http://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/K-TSTA\\_1107\\_DATA.pdf](http://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/K-TSTA_1107_DATA.pdf) Accessed 19.02.14
  107. Meléndez C.M., V.V. Kouznetsov, M.A. Sortino, S.L. Álvarez y S.A. Zacchino. 2008. In vitro antifungal activity of polyfunctionalized 2-(hetero) arylquinolines prepared through imino Diels-Alder reactions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16: 7908-7920.
  108. Merali, Z., Ho, J. D., Collins, S. R. A., Le Gall, G., Elliston, A., Käsper, A. 2013. Characterization of cell wall components of wheat straw following hydrothermal pretreatment and fractionation. *Bioresource Technology*, 131, 226–234.
  109. Meyers S. P. .2000. Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas. pp 473-491 pp. En: CiveraCerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México
  110. Miki W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 63: 141-146.
  111. Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9): 405-410.
  112. Mjoun K. y Rosentrater K.A. 2010. Tilapia: Environmental Biology and Nutritional Requirements. North Central Agricultural Research Laboratory, USDA-Agricultural Research Service. 7 p. Disponible en: [http://pubstorage.sdstate.edu/AgBio\\_Publications/articles/FS963-02.pdf](http://pubstorage.sdstate.edu/AgBio_Publications/articles/FS963-02.pdf).
  113. Moller N. M.; Bruhn A.; Bo R. M.; Olesen B.; Larsen M.M. y Møller H.B. 2011. Cultivation of *Ulva lactuca* with manure for simultaneous bioremediation and biomass production. *J Appl Phycol.* 1-10 pp.
  114. Mukherjee K., P. Kalita, G. Unni, B. Wann, D. Saikia and K. Mukhopadhyay. 2010. Fatty acid composition of four potential aquatic weeds and their possible use as fish-feed neutraceuticals. *Food Chemistry* 123: 1252–1254.

115. Nakagawa, H. 2004. Usefulness of waste algae as feed additive for fish culture. In: Sakaguchi, M. (ed.) Proceedings of the International Commemorative Symposium 'More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products'. Elsevier, Tokyo, 243–252 pp.
116. Nakagawa, H. and Montgomery, W.L. 2007. Algae in: Dietary supplements for the health and quality of cultured fish. Edited by Nakagawa, H., Sato, S. and Gatlin III. D. CABI North American Office Cambridge, MA 02139 USA, 133-168.
117. Nakao M, J Mutsuro, M Nakahara, Y Kato, T Yano. 2003. Expansion of genes encoding complement components in bony fish: biological implications of the complement diversity. Dev Comp Immunol 27, 749 - 762.
118. National Research Council (NRC). 1993. Nutrient Requirements of fish and Shrimp. Washington: National Academy Press. Nutrient Requerements of Domestic Animals. Academy Press, Washington, D.C. 392 p.
119. Nermeen M. A. , Samah H. M., Manal M. Z., Alaa E. E. 2015. Assessment of the immune-modulatory and antimicrobial effects of dietary chitosan on Nile tilapia (*Oreochrmis niloticus*) with special emphasis to its bio-remediating impacts. Fish & Shellfish Immunology 46 (2): 678-685.
120. Nguyen T., D. Allen y P. Saoud. 2009. Evaluation of alternative protein sources to replace fish meal in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis* spp. Journal of the World Aquaculture Society 40(1): 113-122.
121. Nimptsch J. and Pflugmacher S. 2007. Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Myriophyllum mattogrossense*. Chemosphere, 66(4): 708-714.
122. Niyonsaba F. and Ogawa H. 2005. Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents b-defensins, cathelicidin LL- 37 and lysozyme. J. Dermatol. Sci., 40: 157-168.
123. Noel G.W. 2003. Formulación y elaboración de dietas para peces y crustáceos. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ingeniería Pesquera.
124. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Cuenta de bacterias aerobias mediante la técnica cuenta en placa. Diario Oficial de la Federación. 1994.
125. Norma Oficial Mexicana -112-SSA1-1994.Determinación de coliformes fecales y totales por técnica del número más probable (NMP). Diario Oficial de la Federación. 1994.
126. NOM-114-SSA1-1994. Determinación de Salmonella. Diario Oficial de la Federación. 1994.

127. Ogier de Baulnyl M., Quentell C., Fournier V., Lamour F., Le Gouvello R. 2010. Effect of long-term oral administration of  $\beta$ -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis. Aquat. Org., 26: 139-147.
128. Olmedilla, B. y F. Granada. 2008. Componentes bioactivos. en Alimentos Funcionales. Aproximación a una Nueva Alimentación. Dirección general de salud pública y alimentación 170-93.
129. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2009 FishStat Plus - Programa informático universal para series cronológicas de estadísticas pesqueras. Disponible en <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/es>
130. Ortiz V. J. 2011. Composición nutricional y funcional de las algas clorofíceas chilenas: *Codium fragile* y *Ulva lactuca*. Monografía. Laboratorio de Química y Análisis de Alimentos, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Universidad de Chile. 25 p.
131. Papadopoulos G.; Goulas C.; Apostolaki E. y Abril R. 2002. Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes. J Dairy Res 69:357–365
132. Patel S. 2012. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. Biotech. 2:171–185
133. Pengzhan Y.; Quanbin Z. ; Ning L.; Zuhong X.; Yanmei W. 2003. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. J Appl Phycol 15: 21-27.
134. Pereira H., Barreira L., Figueiredo F., Custódio L., Vizetto-Duarte C., Polo C., Rešek E., Engelen A. y Varela J. 2011. Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Macroalgae: Potential for Nutritional and Pharmaceutical Applications. Mar. Drugs 10: 1920-1935 pp.
135. Pesce A.J. and Kaplan, L.A. 1987. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO.
136. Plaza M., Ibáñez E., Santoyo S., Jaime L., García-Blairsy G.R., Herrero M. and Señoráns F.J. 2010. Screening for bioactive compounds from algae. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51: 450-455.
137. Priyadharshini S., Bragadeeswaran S., Prabhu K. y Rani S. 2012. Antimicrobial and hemolytic activity of seaweed extracts *Ulva fasciata* (Delile 1813) from Mandapam, Southeast coast of India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine S37-S39 pp.
138. Pulendran B. y Ahmed R. 2011. Immunological mechanisms of vaccination. Nat Immunol;12:509-517.

139. Quintanar M., Calderón J. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y Aplicaciones. Rev Educación Bioq. 28 (3):89-101.
- 140.
141. Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. 2008. Cell markers and determinants in fish immunology. Fish Shellfish Immunol. 25:326-340.
142. Ray, B. 2006. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: isolation, purification and structural features. Carbohydrate Polymers, 66(3), 408–416.
143. Roberfroid M. 2005. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. Boca Raton, USA: CRC Press. 370 p.
144. Ribeiro FB, Teixeira LEA, Delmondes BMA, Donzele JL, De Freitas AS, De Sousa MP, Quadros M. 2006. Níveis de fósforo total em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo R Bras Zootec, 35(4): 1588-1593
145. Robinson, E.H., Rawles, S.D., Oldenburg, P.W. y Stickney, R.R. 1984. Effects of feeding glandless and glanded cottonseed products and gossypol to *Tilapia aurea*. Aquaculture 38: 145-154.
146. Rodríguez G.H. y García U.M. 2010. Producción de tilapia en invierno en el norte de Sinaloa. Fundación Produce SAGARPA-Sinaloa. 19 p.
147. Romano L.A. y Mejía J. 2003. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. Revista AquaTIC, 18: 25-32.
148. Rook E. 2002. Flora, fauna, earth and sky. The natural history of the northwoods. Disponible en: [www.rook.org/earl/bwca/nature/aquatics/lemna.html](http://www.rook.org/earl/bwca/nature/aquatics/lemna.html)
149. Rupérez, P. y Saura-Calixto, F. 2001. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. European Food Research Technology. 212, 349–354.
150. Saavedra Martínez M.A. 2006. Manejo del cultivo de tilapia. Coastal Resources Center, University of Hawaii Hilo, United States International Development. 25p.
151. SAGARPA-CONAPESCA. 2009. Manual de Buenas Prácticas de Producción de Tilapia con Inocuidad Alimenticia. 210 p.
152. SAGARPA, CSPTM, CONAPESCA, INCA Rural. 2012. Criterios Técnicos y Económicos para la Producción Sustentable de Tilapia en México. Comité Sistema Producto Tilapia de México AC. 184 p.
153. Salazar-Lugo R., Romero Z. y Centeno L. 2012. Caracterización morfológica y citoquímica de leucocitos del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum* (Characiformes: Characidae). Saber Universidad de Oriente, Venezuela, 24(1):49-55

154. Sameermahmood Z.; Raji L.; Saravanan T.; Vaidya A.;, Mohan V. y Balasubramanyam M. 2010. Gallic acid protects RINm5F beta-cells from glucolipototoxicity by its antiapoptotic and insulin-secretagogue actions. *Phytotherapy Research*. 1:S83-94 pp.
155. Samprieto D.A., Catalan C., Valtuone M. 2009. Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. Science publishers.
156. Santelices, Bernabé. 1991. Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica. Ed. Universidad Católica de Chile; 1º Edición; Chile.
157. Santoyo S, L Jaime, M Plaza, M Herrero, I Rodriguez-Meizoso, E Ibáñez and G Reglero. 2011. Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. *Journal of Applied Phycology* 24: 731-741.
158. Saurabh, S.y Sahoo, P.K. 2008. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*; 39: 223-239.
159. Selvin J. y Lipton A.P. 2009. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. *J Mar Sci Technol* 12: 1-6.
160. Schmittou HR, Cremer MC, Zhang J. 2004. Principles and practices of high density fish culture in low volume cages. VI. Fish Stress, Health and Disease. 1-11 pp.
161. Shoko, AP, Limbu, SM, Mrosso, HDJ et al.2014. A comparison of diurnal dynamics of water quality parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) monoculture and polyculture with African sharp tooth catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) in earthen ponds. *Int Aquat Res.*, 6: 56.
162. Silva M., Vieira .L, Almeida A.P., Kijjoa A. 2013. The Marine Macroalgae of the Genus *Ulva*: Chemistry, Biological Activities and Potential Applications. *Oceanography* 1: 101. doi:10.4172/ocn.1000101; 6 p.
163. Silveira C.R. 2005. Hematological indicators and cellular as bioindicators of a cultivate in stress of *Oreochromis aureus* Steindachner (tilapia). Tesis de Doctorado. CIBNOR. B.C.S. 132p.
164. Singh A.P.; Avramis C.A.; Kramer J.K.G. y Marangoni A.G. 2004. Algal meal supplementation of the cows´ diet alters the physical properties of the milk fat. *J Dairy Res* 71:66–73
165. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. Consultado el 25 de Enero de 2013 en <http://www.economia-sniim.gob.mx/nuevo/>



166. Spavieri J., Kaiser M., Casey R., Wilson A.H., Lalvani A. 2010. Antiprotozoal Antimycobacterial and Cytotoxic Potential of Some British Green Algae. *Phytother Res* 24: 1095-1098.
167. Stamm, J. M. 1989. In Vitro Resistance by Fish Pathogens to Aquacultural Antibacterials, Including the Quinolones Difloxacin (A-56619) and Sarafloxacin (A56620) *J.Aq. Animal. Health* 1: 135-141
168. Steffesen, D. A. 1976. Morphological variation of *Ulva lactuca* in the Avon- Heathcote. Estuary, Christchurch. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 10: 329-341 pp.
169. Swain P, Nayak S, Nanda P, Dash S. 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. *Fish & Shellfish Immunol*; 25(3):191-201.
170. Tacon, A.G.J.; Hasan, M.R. y Subasinghe, R.P. 2006. Use of fishery resources as feed inputs for aquaculture development: trends and policy implications. *FAO Fisheries Circular No. 1018*, Rome, FAO. 99 pp.
171. Takishita S.S.; Lanna E.A.T. y Donzele, J.L. 2009. Niveles de lisina digestiva en raciones para alevinos de tilapia del nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38: 11: 2099-2105 p.
172. TaokaY., MaedaH., JoJ.Y., KimS.M., ParkS.I., Yoshikawa T. and Sakata T. 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, 72:755-766.
173. Taskin E, Ozturk M, Taskin E, Kurt O. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *Afr. J. Biotechnol.* 6: 2746–2751.
174. TECNOPEZ SPR de R.L. 2009. Resultados del experimento de engorda de tilapia variedad GIF con alimento de la marca Purina en la Granja TECNOPEZ. Aguilar M.D. y Deldadillo S. *Rev. Desarrollo Acuícola* 2(2):34-35.
175. Thompson, I., G. Choubert, D.F. Houlihan, and C.J. Secombes. 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. *Aquaculture* 133: 91-102.
176. Torrens P.M. 2015. Interpretación clínica del hemograma. *Rev Med Clin CONDES*, 26(6):713-725.
177. Troncoso, N., Olivares, A., Farías, J., San Martín, S., Urrutia, H., y Agurto, C. 2015. Identification of antibacterial compounds obtained from seaweeds present in the Biobío Región, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50(S1), 199-204.
178. Tüney I.; Çadirci B.H.; Unal D.; Sukatar A. 2006. Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turk J Biol.* 30: 171-175.

179. Valdez C.C. 2008. Evaluación de dos niveles de inclusión de un promotor de crecimiento elaborado a base de probióticos, prebióticos y enzimas en el comportamiento del lechón. Universidad de San Carlos, Guatemala. FMVZ.
180. Van den Hoek C., D.G. Mann, H.M. Jahns 1995 *Algae: An introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge.
181. Vásquez-Piñeros M, Rondón-Barragán I, Restrepo-Betancur L, Eslava-Mocha P. 2010. Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis spp.* Orinoquia. 14(1): 33-44.
182. Venereo Gutiérrez Justo R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cub Med Mil. 31(2):126-133. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-)
183. Wahbeh M.I. 1997. Amino acid and fatty acid profiles of four species of macroalgae from Aqaba and their suitability for use in fish diets. Aquaculture 159:101-109.
184. Waldron, K. W. 2010. Bioalcohol production: Biochemical conversion of lignocel- lulosic biomass (Woodhead Publishing Series in Energy). Cambridge: Woodhead Publishing.
185. Wijesekara I.; Pangestuti R. y Kim S.K. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydr Polym 84: 14-21.
186. Witkowska Z., Saeid A., Chojnacka K., Dobrzanski Gorecki H., Michalak I., Korczynski M., Opalinski S. 2012. New biological dietary feed supplement for laying hens with microelements based on duckweed (*Lemna minor*). American journal of Agricultural and Biological Sciences 7 (4), 482–493
187. Wong K. and Cheung P.C. 2000. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part 1-proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. Food Chemistry. 7, 475– 482.
188. Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomás-Barberán, F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S., 2004. Flavonoids in food and their health benefits, Plant Foods Hum. Nutr., 59, 113-122.
189. Yildiz G., Celikler S., Vatan O and S. Dere. 2012. Determination of the anti-oxidative capacity and bioactive compounds in green seaweed *Ulva rigida* c. Agardh. International Journal of Food Properties, 15:1182–1189.
190. Yildirim Ö., S. Ergün, S. Yaman and A. Türker. 2009. Effects of Two Seaweeds (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha linza*) as a feed additive in diets

- on growth performance, feed utilization, and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Kafas Univ Vet Fak Derg, 15 (3):455-460.
191. Zhao X., Moates G.K., Wellner N., Collins S.R.A., Coleman M.J., Waldron K.W. 2014. Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). Carbohydrate Polymers 111: 410-418.
192. Zhou QC, JA Buentello and DM Gatlin III. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 309, 253–257.
193. Zetina-Córdoba P., Ortega-Cerrilla M.E., Ortega-Jiménez E., Herrera-Haro J.G., Sánchez-Torres-Esqueda M.T., Reta-Mendiola J.L., Vilaboa-Arroniz J., Munguía-Ameca G. 2013. Effect of cutting interval of Taiwan grass (*Pennisetum purpureum*) and partial substitution with duckweed (*Lemna* sp. and *Spirodela* sp.) on intake, digestibility and ruminal fermentation of Pelibuey lambs. Livestock Science 157: 471–477.
194. Zimmermann S. 2013. Capítulo 15. Cae poco a poco la misteriosa competitividad asiática. Rev. Panorama Acuícola. Disponible en: [http://www.panoramaacuicola.com/columnas/2011/06/30/el\\_fenomenal\\_mundo\\_de\\_las\\_tilapias/2013/11/27/capitulo\\_15\\_cae\\_poco\\_a\\_poco\\_la\\_misteriosa\\_competitividad\\_asiatICA.html](http://www.panoramaacuicola.com/columnas/2011/06/30/el_fenomenal_mundo_de_las_tilapias/2013/11/27/capitulo_15_cae_poco_a_poco_la_misteriosa_competitividad_asiatICA.html)
195. Zimmermann S. 2014. Capítulo 16. Los Costos de producción de tilapia en América Latina. Rev. Panorama Acuícola. Disponible en: [http://www.panoramaacuicola.com/columnas/2011/06/30/el\\_fenomenal\\_mundo\\_de\\_las\\_tilapias/2014/01/28/capitulo\\_16\\_los\\_costos\\_de\\_produccion\\_de\\_tilapia\\_en\\_america\\_latina.html](http://www.panoramaacuicola.com/columnas/2011/06/30/el_fenomenal_mundo_de_las_tilapias/2014/01/28/capitulo_16_los_costos_de_produccion_de_tilapia_en_america_latina.html)
196. Zubia M., Payri C., Deslandes E. 2008. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). J Appl Phycol 20:1033–1043.