



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO CITOTÓXICO Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS
HIDROFÍLICOS DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN UN
CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE CEREBRO DE
ROBALO (*Centropomus viridis*) SOMETIDO A ESTRÉS
OXIDATIVO**

Por

Melissa Peraza Arias

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ACUACULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Melissa Peraza Arias, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Nayely Leyva López
Directora de tesis



Dra. Crisantema Hernández González
Integrante del comité de tesis



Dr. José Basilio Heredia
Integrante del comité de tesis



Dr. Anaguiven Ávalos Soriano
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Efecto Citotóxico y Antioxidante de Extractos Hidrofilicos de Residuos Agroindustriales en el Cultivo Primario de Células de Cerebro de Robalo (*Centropomus viridis*) Sometido a Estrés Oxidativo” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Melissa Peraza Arias, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Pablo Wong González', is written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante el posgrado, que hizo posible que me dedicara exclusivamente a la investigación durante estos dos años.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por abrirme las puertas para estudiar el posgrado en esta gran institución de excelencia.

Este trabajo forma parte del proyecto de Cátedras CONACYT #729: Biotecnologías aplicadas para el desarrollo de alimentos funcionales para acuicultura.

A las doctoras Nayely Leyva López, por suplir como mi directora de tesis. A Crisantema Hernández González, por ser integrante de mi comité de tesis. Apoyarme en todo este trayecto y encaminarme en este proyecto con grandes expectativas para el desarrollo de la sustentabilidad acuícola.

A los doctores Anaguiven Ávalos Soriano y José Basilio Heredia. Por ser integrantes de mi comité de tesis. Encaminarme con el desarrollo de mi trabajo de tesis cada uno desde su experiencia (desarrollo de cultivos celulares *in vitro* y alimentos funcionales y nutraceuticos).

A mis compañeros del laboratorio de nutrición acuícola (MC. Yazmin, Dra. Esmeralda, Aldo, Alondra, Elizabeth, Daniela, Baldomero) por siempre apoyarme con mis ensayos y animarme a sacar adelante mi posgrado, y estar siempre presentes en mis presentaciones.

A mis amigos de maestría (Santa, Martha, Guillermo y Claudia) por todas las vivencias durante el posgrado y gran apoyo moral para el desarrollo de mi investigación.

A los docentes del CIAD, por ser parte fundamental de mi formación como Maestra en Ciencias. No menos importante, a mi familia y pareja, por el apoyo incondicional y las porras durante todo mi posgrado.

DEDICATORIA

A mis padres (Silvia y Humberto), por ser los pilares fundamentales en mi vida y desarrollo profesional. Les agradezco su amor y apoyo incondicional.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCION	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Características Generales del Género <i>Centropomus</i> sp.....	17
2.1.1 Morfología y Fisiología del Robalo.....	17
2.1.2 Situación Actual del Cultivo de Robalo.....	29
2.2 Estrés Oxidativo en Peces.....	20
2.2.1 Peroxidación Lipídica.....	21
2.2.2 Defensa Antioxidante Enzimática Endógena.....	22
2.2.2.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	22
2.2.2.2 Glutathion peroxidasa (GPx).....	23
2.2.2.3 Catalasa (CAT).....	24
2.2.3 Antioxidantes Exógenos.....	25
2.2.3.1 Mecanismo de acción de los compuestos bioactivos desempeñando el papel antioxidante.....	25
2.3 Metabolitos Secundarios de Plantas.....	26
2.3.1 Generalidades de los Compuestos Fenólicos.....	28
2.3.1.1 Clasificación y propiedades de compuestos fenólicos.....	29
2.3.1.2 Actividad biológica de compuestos fenólicos.....	31
2.4 Residuos Derivados del Sector Agroindustrial.....	33
2.4.1 Residuos del Bagazo de Café.....	34
2.4.1.1 Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos provenientes del bagazo de café.....	35
2.4.2 Residuos del Procesamiento de la Naranja.....	35
2.4.2.1 Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos provenientes de la cáscara de naranja.....	36
2.4.3 Residuos de la Industria del Tomate.....	37
2.4.3.1 Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos provenientes del tomate ---de rezaga.....	37
2.4.4 Residuos de la Industria del Plátano.....	38

CONTENIDO (continuación)

2.4.4.1 Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos provenientes de la cáscara de plátano.....	38
2.5 Alternativa <i>In Vivo</i> a través de Modelos Celulares <i>In Vitro</i> de Peces para Determinar el Efecto Citotóxico.....	39
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVOS	42
4.1 Objetivo General.....	42
4.2 Objetivos Específicos	42
5. MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1 Obtención de la Materia Prima.....	43
5.2 Obtención de Extractos.....	44
5.3 Determinación del Contenido de Compuestos Fenólicos Totales (CFT).....	44
5.4 Determinación de la Capacidad Antioxidante <i>In Vitro</i>	45
5.4.1 Capacidad de Secuestro del Radical DPPH.....	45
5.4.2 Capacidad Antioxidante de Reducción del Ion Férrico (FRAP).....	45
5.5 Cultivo Celular Primario de Cerebro de Robalo.....	47
5.6 Ensayo de Citotoxicidad Celular (MTT).....	47
5.7 Reto de Estrés Oxidativo con Peróxido de Hidrógeno.....	49
5.8 Cuantificación de Proteína por el Método de Bradford.....	50
5.9 Análisis de la Actividad Enzimática Antioxidante.....	51
5.9.1 Ensayo de Superóxido Dismutasa Sérica (SOD).....	51
5.9.2 Ensayo de Catalasa (CAT).....	51
5.10 Ensayo de Peroxidación Lipídica Celular.....	52
5.11 Análisis Estadístico.....	52
6. RESULTADOS Y DISCUSION	53
6.1 Contenido Total de Compuestos Fenólicos (CFT) en Extractos Hidrofílicos de Bagazo de Café, Tomate de Rezaga, Cáscara de Naranja y Plátano.....	53
6.2 Ensayos de Capacidad Antioxidante <i>In Vitro</i>	54
6.2.1 Capacidad de Secuestro del Radical DPPH.....	55
6.2.2 Capacidad de Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP).....	55
6.3 Citotoxicidad Celular por Ensayo de MTT.....	56
6.4 Ensayos de la Actividad Enzimática Antioxidante.....	58
6.4.1 Actividad de la Enzima Superóxido Dismutasa (SOD).....	58
6.4.2 Actividad de la Enzima Catalasa (CAT).....	60
6.5 Peroxidación Lipídica Celular por Ensayo TBARS.....	61
7. CONCLUSIONES	63
8. RECOMENDACIONES	64
9. REFERENCIAS	65
10. ANEXOS	77

CONTENIDO (continuación)

10.1 Resultados del Análisis Estadístico para los Diferentes Ensayos Realizados en RStudio.....	77
-------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfología externa del robalo: aleta dorsal; aleta ventral; aleta anal; aleta caudal; línea lateral. Tomada de Rivas (1986).	18
2	Reacciones de peroxidación lipídica. Tomada de Fraga <i>et al.</i> , (1996).	22
3	Defensa antioxidante exógena ante la presencia de EROs. Modificado de Hermes-Lima (2004)	23
4	Representación gráfica del mecanismo de acción de compuestos bioactivos en la activación de la respuesta antioxidante y la inhibición de los canales de reacción de la peroxidación lipídica. (a) ácidos fenólicos, (b) flavonoides.	26
5	Rutas metabólicas y precursores para la síntesis de los diferentes metabolitos secundarios de plantas derivados. TCA: Ciclo de Krebs. Tomada de Wink (2008)	27
6	Estructura básica del fenol	29
7	Estructura básica del fenilpropanol	29
8	Clasificación de los flavonoides. Tomada de Mierziak <i>et al.</i> , (2014)	30
9	Residuos agroindustriales de bagazo de café, cáscaras de naranja, tomate de rezaga y cáscaras de plátano. a) Muestras frescas y b) muestras previamente deshidratadas (harina fina).	43
10	Diagrama propuesto para el ensayo de viabilidad celular por MTT.	49
11	Diagrama propuesto para el reto de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno.	50
12	Diagrama propuesto para la cuantificación de proteína por el método Bradford.	51
13	Porcentaje (%) de la viabilidad celular por las diferentes concentraciones expresadas en $\mu\text{g/mL}$ del extracto hidrofílico de bagazo de café.	57
14	Actividad antioxidante enzimática SOD en U/mg proteína por diferentes pre-tratamientos de café (115+, 230+, 460+), AG+, C- y C+.	59
15	Actividad antioxidante enzimática CAT en U/mg proteína por diferentes pre-tratamientos de café (115+, 230+, 460+), AG+, C- y C+.	60
16	Indicador de la peroxidación lipídica por conc. μM MDA/g pellet celular, por diferentes pre-tratamientos de café (115+, 230+, 460+), AG+, C- y C+.	62

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Compartimentos de almacenamiento según la naturaleza de los metabolitos secundarios (MS) en plantas. Modificada de wink (2010).	28
2	Efecto antioxidante de extractos fenólicos derivados de origen vegetal en modelo <i>in vivo</i> de peces dulce acuícolas y marinos.	32
3	Contenido total de compuestos fenólicos (mg GAE/100g de muestra) presentes en extractos hidrofílicos de residuos agroindustriales.	53
4	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de extractos hidrofílicos de residuos agroindustriales.	54
5	Viabilidad de células de cerebro de robalo expresada en términos de concentración letal media (IC ₅₀) y concentración mínima no toxical (IC ₈₀) del extraco hidrofílico de bagazo de café en (µg/mL).	57

RESUMEN

La intensificación de los cultivos en acuicultura puede ocasionar estrés oxidativo en los organismos, así como detrimento en su salud. Una manera de prevenir el estrés oxidativo en el cultivo de especies acuáticas es a través del uso de antioxidantes de origen natural. Una fuente son los residuos agroindustriales. Estos residuos poseen compuestos fenólicos a los que se le atribuye potencial antioxidante, son biodisponibles y de fácil extracción. Debido a esto, el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antioxidante y efecto citotóxico de extractos hidrofílicos provenientes de residuos agroindustriales en un modelo celular de cerebro de robalo (*Centropomus viridis*) sometido a estrés oxidativo. Se realizaron cuatro extractos hidrofílicos (agua ultrapura) de residuos agroindustriales; bagazo de café, tomate de rezaga, cáscaras de naranja y plátano, por agitación constante a 57 °C por 71 minutos, obteniendo el sobrenadante por filtración. El contenido total de compuestos fenólicos (TPC) de los extractos se determinó por Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante mediante los ensayos de radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH) y de reducción del ion férrico (FRAP). El extracto con mayor TPC y capacidad antioxidante se eligió para determinar su citotoxicidad (MTT, bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) en un cultivo primario de células de robalo (*C. viridis*). Posteriormente las células de cerebro de robalo fueron tratadas con concentraciones seguras del extracto acuoso de bagazo de café (24 h) y se sometieron a un reto de estrés oxidativo con H₂O₂ (100 µM) por una hora. Se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), así como la peroxidación lipídica. El extracto obtenido de bagazo de café presentó el mayor TPC (892.673±59.12 mg GAE/100 g de muestra) y la mejor capacidad antioxidante, con 21.23 y 77% de inhibición de radicales DPPH y FRAP, respectivamente; por lo que se eligió este material para continuar el estudio. Se determinó, con el ensayo MTT, que la concentración segura no tóxica (viabilidad del 80%) es 467.31 µg/ml. Después del reto de estrés oxidativo, la actividad de SOD y CAT se incrementó significativamente a partir de 230 µg/ml, mientras que los niveles de MDA fueron significativamente menores a 230 y 460 µg/ml. Estos resultados sugieren que el extracto hidrofílico de bagazo de café presenta un efecto potencial protector contra la peroxidación lipídica y ejerce un efecto modulador sobre la actividad de SOD y CAT por estrés oxidativo celular inducido.

Palabras clave: superóxido dismutasa, catalasa, peroxidación lipídica.

ABSTRACT

The intensification of cultives in aquaculture can cause oxidative stress in organisms, as well as detriment to their health. One way to prevent oxidative stress in the cultivation of aquatic species is through the use of naturally occurring antioxidants. One source is agro-industrial waste. These residues have phenolic compounds to which antioxidant potential is attributed, they are bioavailable and easy to extract. Due to this, the objective of this study was to evaluate the antioxidant potential and cytotoxic effect of hydrophilic extracts from agro-industrial residues in a snook (*Centropomus viridis*) brain cell model subjected to oxidative stress. Four hydrophilic extracts (ultrapure water) of agro-industrial waste were made, from spent coffee, tomato residues, orange and banana peels, by stirring constant at 57 °C for 71 minutes, obtaining the supernatant by filtration. The total content of phenolic compounds (TPC) of the extracts was determined by Folin-Ciocalteu and the antioxidant capacity by means of the 2,2'-diphenyl-1-picrilhydrazil radical (DPPH) and by the ion reduction antioxidant capacity test ferric (FRAP) assays. The extract with the highest TPC and antioxidant capacity was chosen to determine its cytotoxicity (MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole bromide assay) in a primary culture of snook cells (*C. viridis*). Subsequently, the snook brain cells were treated with safe concentrations of the aqueous extract of spent coffee (24 h) and were subjected to an oxidative stress challenge with H₂O₂ (100 µM) for one hour. The activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) was determined, as well as lipid peroxidation. The extract obtained from spent coffee presented the highest TPC (892.673 ± 59.12 mg GAE / 100 g of sample) and the best antioxidant capacity, with 21.23 and 77% inhibition of DPPH and FRAP radicals, respectively; so, this material was chosen to continue the study. The non-toxic safe concentration (80% viability) was determined by the MTT assay to be 467.31 µg/ml. After the oxidative stress challenge, SOD and CAT activity increased significantly at 230 µg/ml, while MDA levels were significantly lower at 230 and 460 µg/ml. These results suggest that the hydrophyllic extract of spent coffee has a protective potential effect against lipid peroxidation and exerts a modulatory effect on the activity of SOD and CAT by induced cellular oxidative stress.

Key words: superoxide dismutase, catalase, lipid peroxidation

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura representa una de las principales alternativas para poder suplir la demanda alimentaria de productos pesqueros en México y en el mundo, debido a que la población mundial va en constante aumento. En una proyección del “Instituto de Recursos Mundiales” se prevé al 2050 un aumento por arriba de los 200 millones de toneladas de producción anual pesquera que solo podrán abastecerse a través de la acuicultura, ya que las pesquerías por captura se encuentran altamente limitadas y en decadencia al agotar la disponibilidad de las especies silvestres, debido a la explotación desmedida de los últimos 50 años (FAO, 2018).

Uno de los retos que enfrenta la acuicultura hoy en día son las condiciones de cultivo; que incluye la intensificación de la producción. Esto provoca grandes densidades de siembra, y en ocasiones el uso de alimentos mal balanceados, lo que detona en estrés oxidativo en los peces (Gullian-Klanian & Arámburu-Adame, 2013). A su vez esto puede dar origen a la supresión del sistema inmunológico y la presencia de enfermedades infecciosas por virus, bacterias y parásitos (Pan *et al.*, 2017; Soler *et al.*, 2016). Se entiende por estrés oxidativo a un desbalance del estado redox celular, entre el sistema antioxidante endógeno y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's), lo que ocasiona un daño oxidativo al organismo (Ansaldó, 2001; Lazo-Javalera, 2013). Entre los principales órganos susceptibles que se ven asociados al daño por estrés oxidativo en peces se encuentra el hígado, cerebro, riñón cefálico y branquias (Oehlers *et al.*, 2007; Dolci *et al.*, 2013). El principal sistema antioxidante de defensa en peces es el sistema endógeno, que puede ser enzimático (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión s-transferasa (GST) y catalasa (CAT)) y no enzimático, como glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG). Adicionalmente se puede contar con antioxidantes exógenos, como la vitamina E, C, carotenoides (licopenos, α y β carotenos) y fenoles (flavonoides), los cuales son proporcionados a los organismos a través de los alimentos (Barrera-García, 2013; Velez-Alavez, 2009; Chávez-Infante, 2016).

Una forma de estimular y modular la respuesta antioxidante enzimática endógena (Königsberg-Fainstein, 2007) en peces, es a través de antioxidantes exógenos (Reverter *et al.*, 2014), como lo son los compuestos bioactivos de origen natural, los bien llamados “fitoquímicos”, donde destacan principalmente los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) (Wink, 2008-2015).

Entre los mecanismos de acción antioxidante de ácidos fenólicos y flavonoides destaca principalmente su estructura química base, la cual cuenta con la presencia de grupos hidroxilos unidos a uno o más anillos aromáticos y que le brindan la capacidad de reducir o neutralizar distintos radicales libres (Mierziak *et al.*, 2014). Los compuestos fenólicos de origen natural se caracterizan por ser inocuos, biodegradables y amigables con el medio ambiente, además de poseer distintas aplicaciones para el desarrollo de alimentos funcionales, productos farmacéuticos y cosméticos (Dorsey & Jones, 2017; Vazquez-Olivo *et al.*, 2018; Melo-Sabogal *et al.*, 2015; Savatovic *et al.*, 2012). Por lo que se han buscado diversas fuentes para su obtención.

Una fuente potencial para la obtención de compuestos fenólicos son los subproductos o residuos de la industria agroalimentaria, por ejemplo, residuos de café, tomate, naranja y plátano (Vazquez-Olivo *et al.*, 2018; Mahato *et al.*, 2018; Vu *et al.*, 2016; Gharbi *et al.*, 2016). Se habla de que alrededor del 20-50 % de la producción total agrícola se convierte en desperdicio. Estas grandes cantidades de materia orgánica que es considerada desecho, se vuelve una pérdida económica para el productor, así como una fuente enorme de contaminación (Nasrin y Matin, 2017).

En México, las industrias procesadoras de frutas, cereales, y hortalizas, genera alrededor de 76 millones de toneladas de residuos al año. Los tallos, las semillas, y cáscaras representan la mayor proporción de estos (González-Sánchez *et al.*, 2015). Los desperdicios agroindustriales, pueden representar una fuente muy importante de azúcares, minerales, ácidos orgánicos y fibra dietaria que pueden tener un amplio rango de beneficios a la salud. Además, diferentes partes de los productos agrícolas, tales como cáscaras, semillas, tallos, hojas, entre otros, contienen altos niveles de compuestos promotores de la salud, tales como vitaminas, compuestos fenólicos y carotenoides, entre otros. Las partes no comestibles de estos productos pueden inclusive presentar mayor cantidad de compuestos bioactivos, por ejemplo, que el producto final o terminado, los cuales puede ser tanto perjudicial (según el tipo de compuesto y dosis se trate) como benéfico para la salud (inmunoestimulantes y antioxidantes) (Ayala-Zavala *et al.* 2010).

Está ampliamente documentado que extractos de estos residuos agroindustriales poseen una gran diversidad de compuestos fenólicos que pueden ser de interés. Además del aprovechamiento que estos residuos podrían presentar por ser un foco de contaminación ambiental que se desea mitigar. Por lo tanto, en este estudio se plantea revalorizar desperdicios agroindustriales a través de su uso y aplicación como antioxidantes en acuicultura siendo una medida eficaz de prevención ante el estrés oxidativo. Por lo cual, surge como objetivo principal de este estudio evaluar el posible efecto

citotóxico y potencial antioxidante de extractos hidrofílicos provenientes de residuos agroindustriales en un modelo celular de cerebro de robalo (*C. viridis*) sometido a estrés oxidativo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características Generales del Género *Centropomus* sp.

El género *Centropomus* agrupa especies tropicales y subtropicales carnívoros y eurihalinas que se alimentan y crecen en cuerpos de agua de baja salinidad (Barreno-Coba, 2015). Las especies de este género mantienen su metabolismo óptimo a temperaturas de 25 a 29 °C, que son las más adecuadas para que aprovechen su alimento y presenten un crecimiento apropiado (Ramos & Palas, 2003).

El robalo (*C. viridis*) habita en ambientes acuáticos continentales y en zonas estuarinas no muy profundas con presencia de manglares y sustrato pedregoso o arenoso, llegando incluso a encontrarse en zonas de agua dulce como lagos y ríos durante el invierno (Chávez, 1961; Barreno-Coba, 2015), mostrando gran tolerancia a las fluctuaciones de salinidad debido a su capacidad de osmoregulación (Fischer *et al.*, 1995; Labastida *et al.*, 2013). Los robalos adultos migran durante el verano (mayo a septiembre) al mar donde llevan a cabo los desoves a temperaturas entre 25 y 31 °C (Tucker & Yodi., 1991; Álvarez *et al.*, 2010), ya que el esperma se activa sólo en aguas salinas. La temperatura y la salinidad son variables ambientales cuya interacción podría limitar la distribución y el crecimiento de los robalos, ya que no toleran temperaturas muy bajas (Labastida *et al.*, 2013).

2.1.1 Morfología y Fisiología del Robalo

Los robalos (*Centropomus* sp.), son peces óseos del orden perciformes y de la familia Centropomidae, en cuya región dorsal se encuentran dos aletas separadas (Fig. 1). La aleta dorsal anterior es triangular y está formada por rígidas espinas conectadas entre sí por una membrana, la aleta dorsal posterior, con forma trapezoidal, está compuesta por una espina y radios ramificados de número variable (Ruiz, 1993). La aleta anal está compuesta por tres espinas y radios presentes

en número variable (Rivas, 1986). Del mismo modo de las características anteriores, los robalos presentan cuatro nostrilos en la cabeza, cuya función es olfativa, son dos en cada lado del eje longitudinal de la cabeza (Barreno-Coba, 2015).

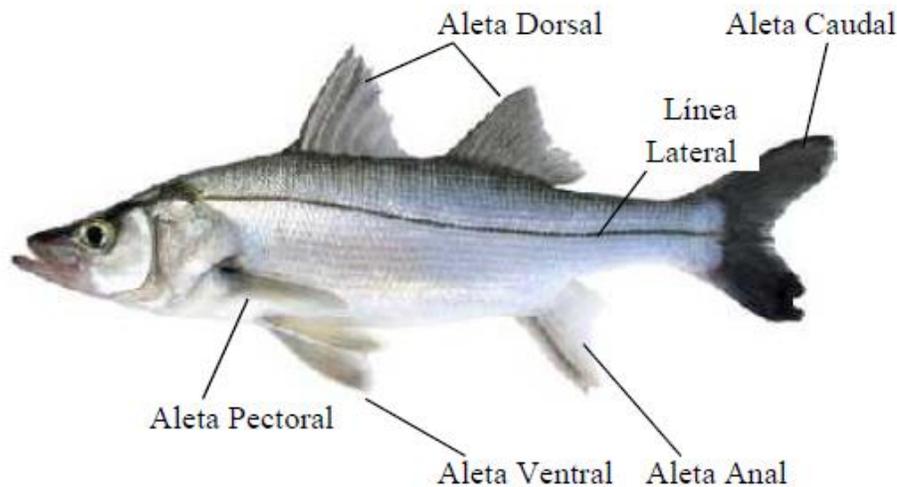


Figura 1. Morfología externa del robalo: aleta dorsal; aleta ventral; aleta anal; aleta caudal; línea lateral. Tomada de Rivas (1986).

Robalo plateado (*Centropomus viridis*) es una especie demersal que habita en aguas costeras de la plataforma continental y estuarios. Esta especie presenta un peso máximo de 21.5 kg y talla media de 68 cm y máxima de 112 cm, y su dieta está basada principalmente de peces y camarones (Martínez, 2004). Por ser una especie carnívora con una alta actividad enzimática demanda un contenido del 60-70% de proteína en alimentos para acuicultura (Álvarez *et al.*, 2010), debido a su alta capacidad para digerir este tipo de dietas. Mientras que para juvenilesde robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) (3.16 ± 0.28 g) cultivados en aguas marinas y salobres, se ha reportado un requerimiento del 55 y 60% de proteína para su optimico crecimiento y supervivencia (Concha-Frías *et al.*, 2018). Arriaga-Hernández *et al.* (2020) determinaron que 15-45% de harina de soya puede ser empleado para elaborar alimentos para juveniles de *C. viridis* sin alterar su crecimiento y capacidad digestiva. Estos estudios han contribuido a desarrollar alimentos comerciales más adecuados y eficientes para el crecimiento de estas especies, que se cultivan en diferentes países de América y Asia.

2.1.2 Situación Actual del Cultivo de Robalo

La importancia del cultivo de robalo va en incremento debido a su alto valor comercial e importancia económica, ya que representa una de las especies de producción pesquera y acuícola de mayor crecimiento en México. La gran demanda de este producto alimenticio entre los consumidores registró en 2017 un volumen de 16 mil 482 toneladas, con valor de 755 millones de pesos (CONAPESCA, 2018). Entre los atributos de este pez marino se encuentra su calidad, sabor y alto valor proteínico.

El crecimiento del robalo en cautiverio es posible por varias virtudes que posee: es relativamente inactivo (Tucker, 1987), puede sobrevivir en estanque o jaulas con concentraciones de hasta 0.4 mL O₂/g/h, además se pueden encontrar en salinidades que varían entre 0 a 54 ups (Barreno-Coba, 2015) y resiste a los cambios de temperatura. Se adapta fácilmente a ambientes controlados.

Una de las desventajas en los cultivos de peces marinos y/o dulceacuícolas por acuicultura es la intensificación en los sistemas de producción así como la alta densidad y reducción de los espacios de cautiverio (Gullian-Klanian & Arámburu-Adame, 2013). Esto, sumando a una nutrición escasamente balanceada desemboca en estrés oxidativo, lo cual conlleva a la supresión del sistema inmune de los peces (Pan *et al.*, 2017). Como consecuencia, da origen a brotes epidemiológicos de origen infeccioso (virus, bacterias, y/o parásitos) (Soler *et al.*, 2016) que pueden ser altamente mortales. Mancilla & Bustos en (2014) realizaron un análisis de brotes por piscirickettsiosis cuyo agente patógeno es *Piscirickettsia salmonis* manifestada en salmonidos chilenos, el cual reportan fue responsable de casi un 80% de las mortalidades ocurridas por enfermedades infecciosas en el primer semestre del 2014. Las pérdidas económicas asociadas con esta enfermedad se tradujeron en los \$100 millones de dólares de pérdidas directas.

Dado a la problemática anteriormente planteada, surge la necesidad de la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas que fortalezcan el sistema antioxidante e inmunológico de los peces, a través del uso de compuestos bioactivos de origen natural (subproductos de plantas) (Vaseeharan & Thaya, 2013; Reverter *et al.*, 2014; Stratev *et al.*, 2018); los cuales suelen ser compuestos inocuos, biodegradables y amigables con el medio ambiente (Vanhai, 2015, Awad & Awaad, 2017). Lo anterior se puede lograr a través del desarrollo de alimentos funcionales. Encarnação (2016) reporta que ingredientes bioactivos de origen fenólico, como flavonoides y terpenoides (carvacrol y timol),

mejoran el rendimiento y salud del pez a través de múltiples efectos biológicos. Tales como la estimulación del apetito (promotor de crecimiento), acción antimicrobiana, fortalecimiento del sistema inmune, propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Reverter *et al.*; Dotta *et al.*, 2014; Wink, 2015), Mismos que contribuyen como agentes de protección contra estrés oxidativo y tratamientos preventivos de enfermedades infecciosas en acuicultura (Cho & Lee, 2012; Talpur, 2014; Reverter *et al.*, 2014).

2.2 Estrés Oxidativo en Peces

En los sistemas biológicos, el estrés oxidativo está asociado con un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y una disminución de la capacidad antioxidante endógena para eliminar EROs. Lo anterior da como resultado un desbalance en el estado redox celular que puede ocasionar daño oxidativo en moléculas de interés biológico, como ADN, proteínas y lípidos (Ansaldo, 2001; Barrera-García, 2013). Adicionalmente, se puede ocasionar daño en diversos órganos, como en hígado, riñón cefálico, cerebro y branquias (Nayak *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2002; Oehlers *et al.*, 2007; Dolci *et al.*, 2013) provocando neurodegeneración, mutagénesis y carcinogénesis (Ekambaram *et al.*, 2012; Ochoa & González 2008). En los procesos fisiológicos normales de la célula, se genera un equilibrio crítico entre la generación de EROs y los sistemas de defensa antioxidante contra la toxicidad generada por los radicales libres con el fin de mantener la homeostasis celular (Valderrama-Díaz, 2014).

Las EROs son moléculas de existencia independiente e inestables con uno o más electrones desapareados en su último nivel de energía. La primera reducción del oxígeno molecular produce al radical superóxido (O_2^-), anión que puede difundirse ampliamente por las células y que es precursor del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que a su vez, da lugar al radical hidroxilo (OH^-). Este último es considerado como el radical más dañino para los sistemas biológicos ya que puede reaccionar y dañar los componentes celulares; lípidos, proteínas y ácidos nucleicos provocando la muerte celular (Halliwell y Guteridge, 2001; Dolci *et al.*, 2013; Ansaldo, 2001; Vázquez-Medina, 2014). Estresores en peces tales como fluctuaciones de temperatura, estrés osmótico (en el caso de especies anádromas), alteraciones en la disponibilidad de oxígeno, contaminación y otros impactos

antropogénicos, pueden afectar directamente la química de los radicales libres y provocar considerables cambios metabólicos en la aceleración de la tasa metabólica que desencadena en mayor producción de EROs (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017).

Las EROs se forman constantemente en el organismo a partir de fuentes endógenas y exógenas. Las fuentes endógenas incluyen a los subproductos de las reacciones metabólicas esenciales, como la generación de energía por la mitocondria en la cadena de transporte de electrones a través del ATP (Chávez-Infante, 2016) por (i) complejo I (NADH deshidrogenasa) y (ii) entre ubiquinona y complejo III (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017), y del metabolismo de compuestos tóxicos a través del sistema enzimático del citocromo P₄₅₀ (Velez-Alavez, 2009). Las fuentes exógenas que generan radicales libres son los contaminantes químicos (nanopartículas de plata) o metales pesados (mercurio, manganeso, cobre, cadmio y zinc) por pesticidas dispersos en el medio acuático (Velez-Alavez, 2009; Birnie-Gauvin *et al.*, 2017). Así como, una disponibilidad limitada de O₂ (<4 mg/L), fluctuaciones de temperatura (<20 y >30°C) y salinidad (>36 ppt) (Dolci *et al.*, 2013).

Durante el estrés oxidativo se puede dar paso a un incremento en la peroxidación lipídica, así como a una reducción en la actividad de la defensa enzimática antioxidante. A continuación, se mencionan estos procesos.

2.2.1 Peroxidación Lipídica

Una de las consecuencias del daño ocasionado por el estrés oxidativo que generan los radicales libres es la oxidación de las membranas lipídicas celulares o peroxidación lipídica. Debido a que la membrana celular está compuesta de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), es el objetivo principal para el ataque del oxígeno reactivo que conduce al daño de la membrana celular (Repetto *et al.*, 2012). Lo anterior provoca una alteración en la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica de las membranas, conduciendo a su inestabilidad y consecuente muerte celular (Del Rio *et al.*, 2005; Repetto *et al.*, 2012). La peroxidación lipídica proviene de una reacción en cadena cuyos productos secundarios de degradación (alcoholes, cetonas, alcanos, aldehídos y éteres) son capaces de inactivar enzimas, reaccionar con proteínas e interactuar con el ADN celular (Repetto *et al.*, 2012). La peroxidación lipídica se inicia por la sustracción de un átomo de hidrógeno de un

grupo metileno (-CH₂-) en el ácido graso poliinsaturado (LH) generando el radical lipídico (L.). Posteriormente se genera un dieno conjugado que reacciona rápidamente con el O₂ para dar origen a un radical peroxilo (LOO.) y se forma un hidroperóxido lipídico (LOOH) y un nuevo L. (Zaman & Pardini, 1996; Ochoa & Gonzáles, 2008). El LOOH pueden reaccionar con algunos complejos de metales de transición (Fe²⁺) para dar origen a los radicales alcoxilo (LO.) (Fraga *et al*, 1996; Ochoa & Gonzáles, 2008). Los radicales peroxilo pueden reaccionar con compuestos de hierro y sustraer átomos de hidrógeno de otras fuentes como ADN y proteínas para formar nuevamente el producto primario de la oxidación y de esta manera perpetuar la reacción (Fig. 2) (Zaman & Pardini, 1996; Ochoa & Gonzáles, 2008).

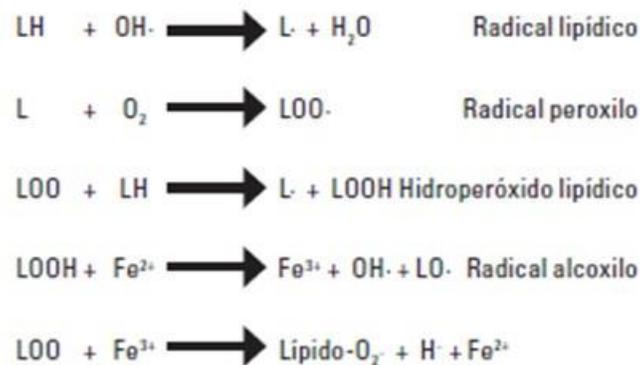


Figura 2. Reacciones de peroxidación lipídica. Tomada de Fraga *et al.* (1996).

2.2.2 Defensa Antioxidante Enzimática Endógena

En la célula existen sistemas de defensa específicos encargados de metabolizar las EROs y se clasifican según su origen, en antioxidantes endógenos, que pueden ser, enzimáticos (SOD, CAT, GPx y GST) y no enzimáticos (GSH, GSSG y coenzima Q) (Fig. 3), así como antioxidantes exógenos como vitaminas, carotenoides, y compuestos fenólicos, como los flavonoides o ácidos fenólicos (Venereo, 2002; Velez-Alavez, 2009; Chávez-Infante, 2016).

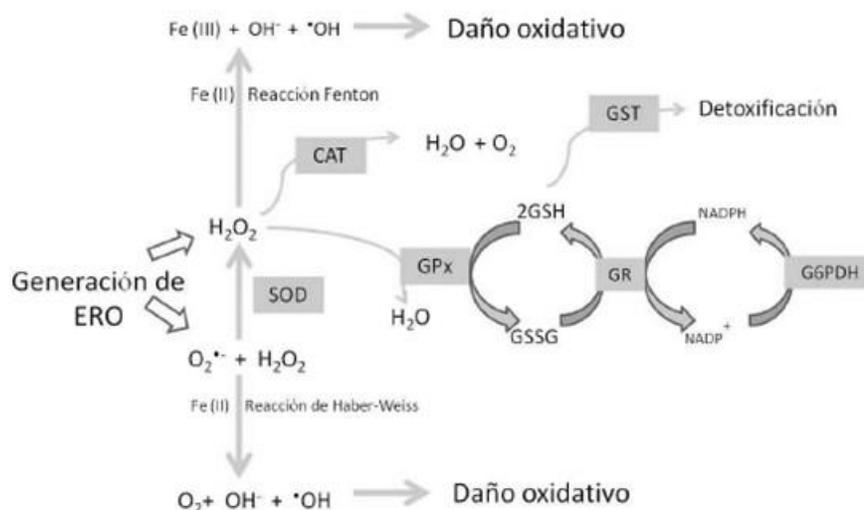


Figura 3. Defensa antioxidante endógena ante la presencia de EROs. Modificado de Hermes-Lima (2004)

2.2.2.1 Superóxido dismutasa (SOD). La familia de las SOD está constituida por metaloenzimas de la cual existen tres isoformas: SOD-Cu, SOD-Zn (citosólicas) y SOD-Mn que se encuentra en la matriz mitocondrial. Estas enzimas catalizan la conversión de $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (McCord y Fridovich, 1969), son consideradas la defensa primaria contra los radicales libres de oxígeno (Bannister *et al.*, 1987) y se encuentran presentes en todos los organismos aerobios. Su medida contra el estrés oxidativo está mediada por el ensayo de la actividad de SOD. Se ha demostrado que la actividad de esta enzima se reduce en la presencia de agentes oxidantes, como H_2O_2 y, por lo tanto, puede ser utilizada como indicador de estrés oxidativo. Por ejemplo, Quincozes-Santos *et al.* (2013) determinaron que la actividad enzimática de SOD se redujo, de 2.7 ± 0.1 a 1.9 ± 0.1 U/mg de proteína, en astrocitos C6 sometidos a estrés oxidativo por presencia de H_2O_2 (1 mM) por 30 minutos. Adicionalmente, Zheng *et al.* (2014) reportaron una disminución en la actividad de SOD (50 ± 1.4 a 37 ± 0.8 U/ml de proteína) en una línea celular de feocromocitoma de rata (PC-12) provocada por el daño oxidativo inducido con H_2O_2 (400 μM) por 12 horas.

2.2.2.2 Glutation peroxidasa (GPx). La GPx es una enzima citosólica que reacciona con el H_2O_2 para reducirlo a H_2O y alcohol usando el glutatión reducido (GSH) como sustrato (Ochoa & González, 2008). La glutatión reductasa (GR) cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG)

usando el $\text{NADPH}+\text{H}^+$ como donador de hidrógenos; por esta razón la GR es la responsable del mantenimiento de las concentraciones intracelulares del glutatión reducido (GSH) (Peña-Llopis et al., 2003). La GPx y la glutatión-s-transferasa (GST) participan en la detoxificación de xenobióticos como herbicidas y reducción de hidroperóxidos (Trute *et al.*, 2007). El GSH actúa como cofactor de las GPx para detoxificar H_2O_2 (Velez-Alavez, 2009). Su medida contra el estrés oxidativo esta mediada por el ensayo de la actividad de GPx.

2.2.2.3 Catalasa (CAT). La CAT está asociada primariamente con peroxisomas con actividad peroxidasa actuando como un eficiente neutralizador del peróxido de hidrógeno ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) (Aebi, 1987) y está ampliamente distribuidas en bacterias aerobias y animales. Su medida contra el estrés oxidativo esta mediada por el ensayo de la actividad de CAT. La actividad de CAT también puede ser empleada como indicador de daño oxidativo, ya que se ha reportado que ésta disminuye en presencia de estrés oxidativo. En este contexto, Quincozes-Santos *et al.* (2013) evaluaron la actividad enzimática de CAT en una línea celular de astrocitos C6 sometida a estrés oxidativo inducido. Se demostró que la actividad de CAT se redujo significativamente cuando las células fueron tratadas con H_2O_2 (1 mM) por 30 minutos (12.8 ± 1.1 U/mg de proteína), en comparación con la actividad enzimática de las células control sin estrés (14.2 ± 1.3 U/mg de proteína).

Tanto GPx como CAT actúan como principales enzimas antioxidantes, debido a que neutralizan a las EROs de mayor incidencia en los tejidos bajo estrés, permitiéndole a la célula sobrevivir a altas condiciones de estrés (Lazo-Javalera, 2013).

Diversos estudios han reportado que, cuando las reservas enzimáticas de la defensa antioxidante endógena se encuentran agotadas (rebasadas por estrés oxidativo inducido en los peces), mecanismos secundarios exógenos como las vitaminas, compuestos fenólicos o carotenoides, puede ayudar a prevenir la reacción en cadena de oxidación en las células (Ahmad *et al.*, 2000). Por lo que surge la necesidad de la búsqueda de antioxidantes de origen natural capaces de contrarrestar los efectos del estrés oxidativo como una manera de potenciar los antioxidantes endógenos existentes.

2.2.3 Antioxidantes Exógenos

Antioxidantes exógenos como lo son; la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina A (β -caroteno) y compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) no son sintetizados de manera endógena en los peces y consecuentemente su presencia está directamente ligada con la dieta (Avilez *et al.*, 2008; Ochoa & Gonzalez 2008). Por ejemplo, Pohl & Kong, en (2018) realizaron un exhaustivo estudio sobre el potencial uso de extractos acuosos de raíz de golondrina (*Decalepis Hamiltonii*), semilla de uva, té verde y soya negra coreana ricos en compuestos bioactivos, como polifenoles y flavonoides (flavona, apigenina, luteolina, kaempferol y quercetina), como parte de la dieta, donde exhibieron propiedades antioxidantes para la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

2.2.3.1 Mecanismo de acción de los compuestos bioactivos desempeñando el papel de antioxidantes. Los radicales libres que se encuentra de manera normal y continúa son los principales subproductos de las reacciones vitales, como la respiración aerobia celular, y como tal necesitan ser continuamente neutralizados por la maquinaria antioxidante del organismo vivo. Cuando existe un desbalance entre dicha maquinaria con la producción en exceso de radicales libres ocurre la peroxidación lipídica celular, y como consecuencia la formación de aldehídos como el malondialdehído (MDA), lo cual es tóxico para la célula (Pizzino *et al.*, 2017; Leyva-López *et al.*, 2020). Una manera que tienen los antioxidantes endógenos para neutralizar radicales libres es a través de la regulación de los factores de transcripción como el factor respiratorio nuclear 1 (Nrf1) y el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Königsberg-Fainstein, 2007). El segundo regula la expresión de proteínas antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo celular (Itoh *et al.*, 1997), tales como las enzimas antioxidantes SOD, GPx y CAT.

Los compuestos bioactivos, debido a la naturaleza de su estructura química (presencia de grupos hidroxilos y carbonilos unidos a anillos aromáticos) pueden actuar ya sea de manera directa donando electrones a los radicales libres para estabilizarlos, o indirecta regulando la activación de Nrf2 por el gen de Keap-1 fosforilándolo por proteínas kinasas (ERK) en condiciones de estrés (Zhou *et al.*, 2019); translocándola al núcleo celular donde crea un enlace con elementos de

respuesta antioxidante, dando origen a la transcripción de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx (Kim & Ki, 2017). Diversos autores han reportado una intensificación en la activación de Nrf2 por ácidos fénolicos (Fig 4a) (Zhou *et al.*, 2019; Hoseinifar *et al.*, 2020) y flavonoides (Fig 4b) (Egglar & Savinov, 2013; Parhiz *et al.*, 2015; Vicente *et al.*, 2019).

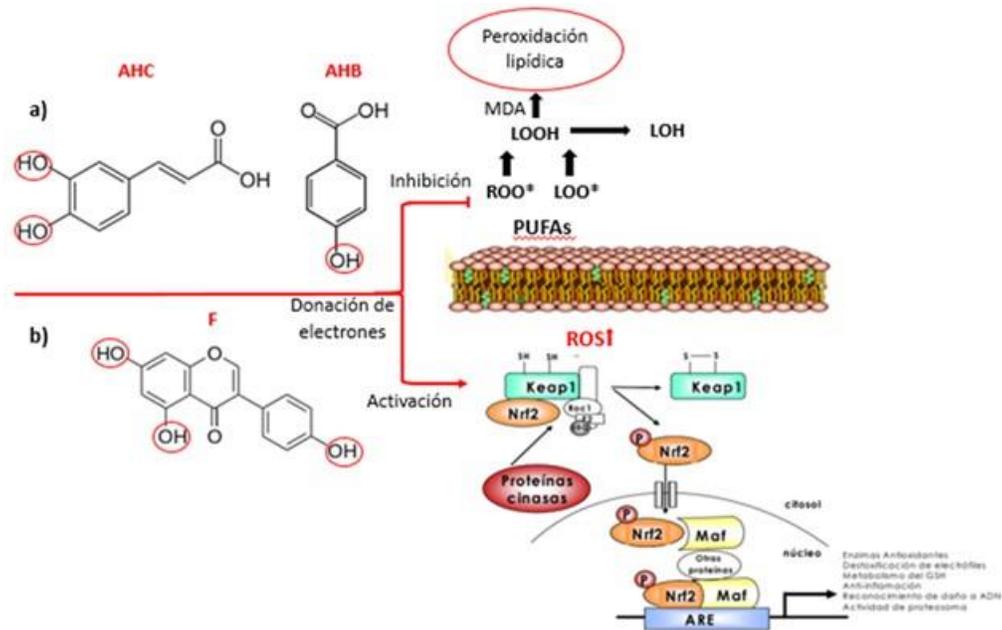


Figura 4. Representación gráfica del mecanismo de acción de compuestos bioactivos en la activación de la respuesta antioxidante y la inhibición de los canales de reacción de la peroxidación lipídica. (a) Ácidos fénolicos, (b) flavonoides. Abreviaciones: AHC-Ácidos hidroxicinámicos; AHB-Ácidos hidroxibenzoicos; F-Flavonoides; ARE-Elementos de respuesta antioxidante; PUFA- Ácidos grasos poliinsaturados; ROO*-Radical peroxilo; LOO*- radical hidroperoxilo lipídico; LOOH- Hidroperóxido lipídico; LOH- Hidroxi lípidos; MDA- Malondialdehido. Modificada de Königsberg-Fainstein, 2007.

2.3 Metabolitos Secundarios de Plantas

Las plantas son una fuente rica de un amplio número de compuestos naturales que pertenecen al grupo de los denominados fito-químicos o sustancias bioactivas (Martínez *et al.*, 2008), cuyos principios activos inducen a un sin número de propiedades farmacológicas que afectan directamente al organismo de quien las consume obteniendo un efecto biológico, el cual puede ser tanto perjudicial como benéfico para la salud (Wink, 2012).

Las plantas forman una parte importante de nuestra dieta diaria, siendo los constituyentes químicos de las plantas, su aporte nutricional y beneficio un tema de estudio de interés para la comunidad científica durante décadas. Además de los metabolitos primarios esenciales (por ejemplo, carbohidratos, lípidos y aminoácidos), las plantas también sintetizan una amplia variedad de compuestos de bajo peso molecular denominados metabolitos secundarios (Wink, 2008; Namdeo, 2007). En la Figura 5 se puede apreciar las diferentes rutas metabólicas y de síntesis de una gran cantidad de metabolitos secundarios, procedentes de la síntesis de metabolitos primarios.

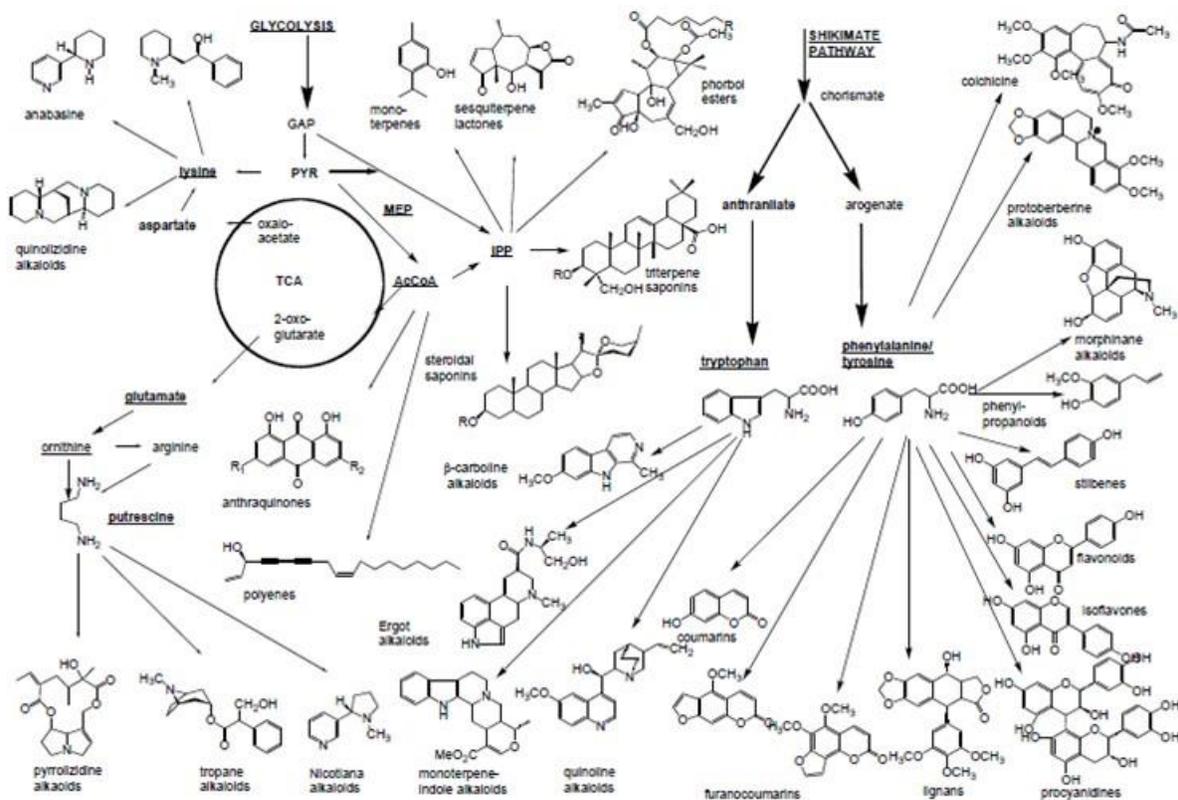


Figura 5. Rutas metabólicas y precursores para la síntesis de los diferentes metabolitos secundarios de plantas derivados. TCA: Ciclo de Krebs. Tomada de Wink (2008)

Dichos compuestos son el resultado de factores medioambientales y de estrés al que se somete la planta y para el cual desata una respuesta de autodefensa como estrategia que la protege contra cualquier factor externo (Wink, 2015).

Los metabolitos secundarios de las plantas se pueden definir como compuestos que no tienen un papel reconocido en el mantenimiento de procesos vitales fundamentales en las plantas que los sintetizan, pero sí tienen un papel importante en la interacción de la planta con su entorno (Namdeo, 2007; Wink, 2008).

Desde un punto de vista práctico, los metabolitos secundarios se pueden clasificar en aquellos que contienen nitrógeno en sus estructuras, representado por alcaloides (Wink, 2007) y los que no lo contienen, donde destacan terpenoides y fenoles (Wink, 2015). Además, dependiendo de la naturaleza del grupo de compuesto que se trate, hay un compartimiento de almacenaje específico para el en la planta (Cuadro 1) (Wink, 2008; Wink, 2010). Dentro de los metabolitos secundarios de las plantas se encuentran algunos compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos, terpenos, saponinas, entre otros (Wink, 2008).

Cuadro 1. Compartimentos de almacenamiento según la naturaleza de los metabolitos secundarios (MS) en plantas. Modificada de wink (2010).

	Compartimento celular	Tipos de MS
MS hidrofílicos	Vacuola	Alcaloides, NPAAAs, saponinas, glicósidos, flavonoides, antocianinas, taninos, cianógenos, glucosinolatos.
	Laticífero	Alcaloides, cianógenos, NPAAAs, glicósidos.
	Apoplasto/pared celular	Taninos
	Cutícula	Flavonoides y terpenoides
MS Lipofílicos	Tricoma	Monoterpenos, sesquiterpenos, quinonas.
	Canal de resina	Terpenoides y flavonoides
	Laticífero	Politerpenos, diterpenos, flavonoides, quinonas.
	Celdas de aceite	Antraquinona, naftoiantiantona y terpenoides.
	Membranas plastídicas	Ubiquinona y tetraterpenos

2.3.1 Generalidades de Compuestos Fenólicos

El término “compuestos fenólicos” engloba a todos aquellos compuestos químicos que poseen varias funciones a partir de una o varias unidades del grupo fenol (hidroxibenceno) (Fig. 6), unidos a estructuras aromáticas o alifáticas (Gimeno, 2004).

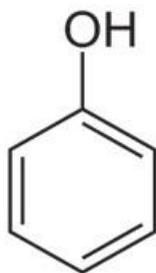


Figura 6. Estructura básica del fenol

Los polifenoles, los cuales hacen referencia a múltiples anillos fenólicos y grupos hidroxilo (OH) están presentes en la mayoría de medicamentos empleados de origen natural por poseer un amplio conjunto de propiedades farmacológicas, que incluyen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, sedantes, curativas, antimicrobianas y antivirales (Van Wyk & Wink, 2015).

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal, son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas (Gimeno, 2004).

2.3.1.1 Clasificación y propiedades de compuestos fenólicos. Fenilpropanoides: Los fenilpropanoides comprende en su mayoría de compuestos aromáticos y lipofílicos, los cuales incluyen gran porcentaje de componentes de aceites esenciales y compuestos derivados de ácidos hidroxicinámicos (ácido cafeico, ferúlico sinápico y p-cumárico, estilbenoides (resveratrol y piceatanol) y del ácido hidroxibenzoico (ácidos gálico y elágico) (Fig. 7) (Martínez *et al.*, 2008).

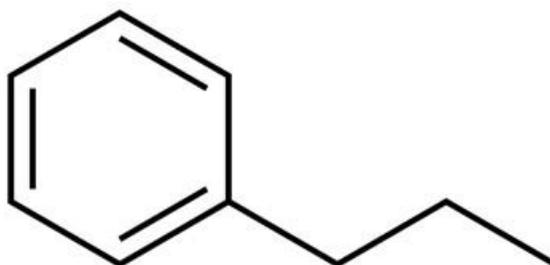


Figura 7. Estructura básica del fenilpropanol

Entre los fenilpropanoides de importancia médica se encuentran los que poseen una cadena lateral acortada (ácido salicílico, saligenina y salicina glucósida). Debido a que inhiben una enzima clave de la biosíntesis de prostaglandinas, llamada ciclooxigenasa (COX). Estos compuestos se han utilizado ampliamente en el tratamiento de la inflamación, la fiebre y el dolor crónico (Van Wyk & Wink, 2015; Wink, 2015).

Flavonoides y antocianinas: Los flavonoides comprenden de múltiples compuestos como lo son; antocianinas, flavonoles y flavonas, flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, isoflavonas (estas se encuentran casi exclusivamente en legumbres) y flavanoles (Fig. 8) (Martínez *et al.*, 2008). Estos compuestos se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos que llevan varios grupos hidroxilo o metoxilo fenólicos, en su estado normal suelen presentarse como glucósidos y se almacenan en vacuolas.

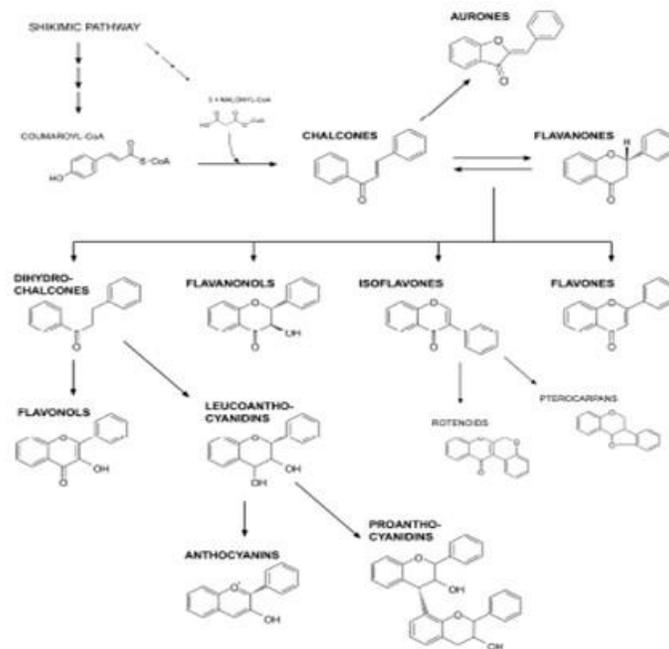


Figura 8. Clasificación de los flavonoides. Tomada de Mierziak *et al.*, (2014)

Entre los compuestos que comprende al extenso grupo de los flavonoides se encuentran sustancias que transmiten pigmentación como las antocianinas (encargados de los tonos rojizos-azulados) o los flavonoles (tonos amarillentos) dependiendo el grado de glicosilación, astringencia de algunos

cítricos (la naringina en los pomelos o la neohesperidina en naranjas amargas) o aroma intenso (el eugenol en los plátanos) (Martínez *et al.*, 2008; Wink, 2015).

Los flavonoides son compuestos activos de muchas medicinas tradicionales herbarias, las antocianinas por ser antioxidantes activos, se utilizan en fitomedicina como nutraceuticos para prevenir trastornos de la salud relacionados con las EROs. Entre las propiedades de las chalconas se encuentra la inhibición del transporte de glucosa en las biomembranas. Las isoflavonas por poseer una homología con la hormona sexual femenina estradiol; se denominan "fitoestrógenos". Estos compuestos exhiben propiedades estrogénicas y antioxidantes al inhibir las tirosina quinasas (Wink & Van Wyk, 2010; Van Wyk & Wink, 2015).

2.3.1.2 Actividad biológica de compuestos fenólicos. Los flavonoides y fenilpropanoides exhiben una amplia gama de actividades biológicas. Dentro de las cuales, actúan como análogos de compuestos de señalización celular o sustratos de manera agonista o antagonista según sea el caso (Wink & Van Wyk, 2010; Van Wyk & Wink, 2015). Los mecanismos afectados varían desde la formación de prostaglandinas y leucotrienos, la inhibición de enzimas, las propiedades estrogénicas (cumarinas, isoflavonas, estilbenos) hasta la alquilación de ADN (furocumarinas) (Wink & Schimmer, 1999).

Las características estructurales que presentan estos tipos de compuestos en particular son; varios grupos hidroxifenólicos en común, con los cuales pueden formar enlaces de hidrógeno con proteínas y péptidos a lo que se le atribuye su bioactividad. Cuanto mayor sea el número de grupos hidroxilo, más fuerte será el efecto astringente y desnaturalizante del compuesto (Wink & Van Wyk, 2010).

En cuanto a las propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos; las EROs se originan a través de la respuesta del sistema inmunológico y por el metabolismo oxidativo mitocondrial (respiración aeróbica). El estrés oxidativo cuyo origen se vincula tras la generación masiva de EROs puede dañar los lípidos, las proteínas y el ADN celular (Sobeh *et al.*, 2018).

Las EROs deben ser neutralizadas por el mecanismo antioxidante natural del cuerpo el cual regula y controla los niveles de EROs por moléculas antioxidantes o enzimas (SOD, CAT, GPx) para mantener las funciones normales de la célula. Además del mecanismo endógeno, se ha reconocido que los niveles de EROs pueden ser regulados por antioxidantes exógenos de metabolitos

secundarios con estructura fenólica (Van Wyk & Wink, 2017). Además, se ha estudiado el papel que juegan los compuestos fenólicos en la neuromodulación, así como los diferentes mecanismos de neuroprotección celular neutralizando los efectos provocados por el estrés oxidativo (Di Meo *et al.*, 2020).

Gonçalves *et al.*, (2015) evaluó extracto de té verde (*Camellia sinensis* L.) en cerebro de ratas wistar *in vivo* (250 mg/kg de peso) rico en catequinas un flavonol reconocido por su potente actividad antioxidante al eliminar radicales libres (disminución de GSH y GSSG) e inhibir la peroxidación lipídica (disminución en niveles de TBAR-ácido 2- tiobarbitúrico) por estimulación de 0.1 ml de adyuvante completo de Freund durante 23 días.

Oboh & Henle (2009) describieron las propiedades antioxidantes de fenoles y flavonoides contenidos en extracto Salvia (*Salvia officinalis*) en cerebro de ratas wistar *in vitro* (10.5 mg/ml) dicha actividad se debió a la reducción de los niveles de malondialdehído (MDA) en la peroxidación lipídica ocasionada por FeSO₄ (25 µM) y nitroprusiato de sodio (7 µM).

Diversos estudios realizados usando a los peces como modelos de estudio han demostrado la actividad antioxidante de compuestos de naturaleza fenólica proveniente por lo general de dietas enriquecidas con distintas fuentes vegetales que los contienen, donde para estimular la respuesta del organismo han incurrido a inducir al pez a un reto por lo general con bacterias (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto antioxidante de extractos fenólicos derivados de origen vegetal en modelo *in vivo* de peces dulce acuícolas y marinos.

Especie de pez	Fuente (Extracto)	Compuesto fenólico	Dosis de administración	Tiempo de tratamiento	Enzima / respuesta antioxidante	Factor de estrés	Referencia
Trucha arcoíris	Té verde (<i>Camellia sinensis</i> L.)	Catequinas, flavonoles, flavanononas, ácidos fénolicos	100 mg/kg de dieta	35 días	>SOD	-	Nootash et al., (2013)
Dorada	Palmera datilera (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Antocianinas, flavonoides, procianidinas, taninos	100 g /kg de dieta	2 y 4 semanas	>SOD, CAT y GR	-	Esteban et al., (2014)
Tilapia del Nilo	Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	Antocianinas	2 g/kg dieta	-	>SOD (Disminución de O ²⁻)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Catap et al., (2015)
Carpa herbívora	Té verde (<i>Camellia sinensis</i> L.)	Catequinas	5% (5 g/100 g de dieta)	66 días	>GSH-Px	-	Zhou et al., (2016)

Carpa común	Ferula (<i>Ferula assafoetida</i>)	Ácido ferúlico	0.5, 1 y 2%	8 semanas	>GSR y GSTA	-	Safari et al., (2016)
Rohu	Plátano (<i>Musa acuminata</i>)	Flavonoides	3, 5 y 7%	60 días	> SOD, CAT y GPx	-	Giri et al., (2016)
Bagre africano	Clavo de albahaca (<i>Ocimum gratissimum</i>)	Fenoles y flavonoides	10, 12 g/kg dieta	12 semanas	>SOD (% de NBT 0.2% reducido) y >CAT	<i>Listeria monocytogenes</i>	Abdel-Tawwab et al., (2018)
Pez cebra	Gracilaria (<i>Gracilaria gracilis</i>)	Polifenoles	1%	8 semanas	> CAT	-	Hoseinifar et al., (2018)
Jurel de Peña	Diete de león (<i>Taraxacum officinale</i>)	Flavonoides y ácidos fenólicos	1, 2, 4 y 10g/kg de dieta	8 semanas	>SOD y CAT	-	Tan et al., (2018)
Tialpia del Nilo	Cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Hesperidina	0.66, 0.63 y 0.68%	70 días	>SOD, CAT y GPx	32°C y 2.3 mg/L O ₂ por 3 días	Vicente et al., (2019)
Pez Cebra	Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Ácido gálico, 2-hidroxicinámico, quercetina	100, 150 y 200 mg/kg de dieta	8 semanas	>CAT	-	Lizárraga-Velázquez et al., (2019)
Carpa común	Castaño-Alpechín	Catequina y epicatequina	0.2%	8 semanas	>CAT	-	Jahazi et al., (2020)
Trucha arcoiris	Residuo de la oliva	Ácido cafeico, p-coumárico y vanílico	2.5 y 5 g/kg de dieta	6 semanas	>SOD, GPx y GST	-	Hoseinifar et al., (2020)

Derivado de la importancia del uso de aditivos con compuestos de naturaleza fenólica como antioxidantes en peces, surge la necesidad de buscar fuentes de las cuales se puedan obtener estos compuestos de interés. Diversos autores sugieren el aprovechamiento o la revalorización de subproductos vegetales como una buena opción, debido a la gran disponibilidad que estos presentan.

2.4 Residuos Derivados del Sector Agroindustrial.

Debido a las diferentes actividades biológicas que se les han atribuido a los compuestos fenólicos contenidos en plantas, su obtención se ha vuelto de gran interés. En este contexto, el uso de residuos

derivados del sector agroalimentario representa una oportunidad ya que se ha demostrado que pueden ser fuente idónea de estos compuestos (Padmapriya *et al.*, 2013).

Los residuos agroindustriales presentan un foco de contaminación a nivel nacional actualmente (Mejías-Brizuela *et al.*, 2016). Como alternativa se busca darle un segundo uso y aprovechamiento a estos residuos orgánicos ricos en metabolitos secundarios, entre los cuales destacan la presencia de compuestos de naturaleza fenólica, de los cuales diversos estudios ya han comprobado presentar actividad biológica y antioxidante (Esquivel & Jiménez, 2012; Farah & Donangelo, 2006; Okino & Fleuri, 2015; Lizárraga-Velázquez, 2018). De esta manera se podrían aprovechar y reducir el impacto ambiental que ocasionan los residuos, además de darles un segundo uso como valor agregado (Mejías-Brizuela *et al.*, 2016).

2.4.1 Residuos del Bagazo de Café

Una de las principales fuentes de residuos en el mundo es la producción agroindustrial de café, la cual oscila entre la variedad arábica en un 64% y robusta en un 35% (Rattan *et al.*, 2015). El café se caracteriza por ser una bebida estimulante con un aroma y sabor distinto, elaborada a partir de las semillas tostadas de la planta *Coffea* (Esquivel & Jimenez, 2012), a la cual se le atribuye su gran popularidad como una de las bebidas mayormente tomadas mundialmente (Padmapriya *et al.*, 2013). Los desechos de bagazo de café (90% del fruto) presentan una alta disponibilidad con una producción mundial del 22.5 millones de toneladas de residuos anualmente (Del Castillo *et al.*, 2017).

Entre los principales subproductos generados por los residuos de café destacan principalmente la piel, la pulpa, el mucílago, y el pergamino. Dichos subproductos comprenden en su conjunto a la cáscara del café (Esquivel & Jimenez, 2012), caracterizados por ser ricos en compuestos fenólicos en su mayoría ácidos hidroxicinámicos como lo son el ácido clorogénico, cafeico, ferúlico y p-cumarínico (Mullen *et al.*, 2013; Farah & Donangelo, 2006), flavonoides, taninos, lignina, celulosa, ácidos grasos, polisacaridos, proteína y pectinas (Pujol *et al.*, 2013; Rattan *et al.*, 2015). Vega *et al.* (2017) determinaron el TPC de extractos hidrofílicos de bagazo de café variedad arábica (1,117 mg GAE/100 g de muestra). Adicionalmente, los extractos mostraron una capacidad antioxidante

(CA) de 2,500 μM TE/100 g de muestra mediante el ensayo de DPPH. Mientras que, Fonseca *et al.* (2014) determinaron la CA de subproductos (pergamino) de café con concentraciones de 1000.72 μM TE/100 g mediante el ensayo FRAP.

2.4.1.1 Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos provenientes del bagazo de café. Las propiedades funcionales de los subproductos del café (50% del fruto no comestible), se le atribuyen principalmente a su contenido de ácidos clorogénicos, cafeico y p-catéquino, donde se ha demostrado una fuerte capacidad antioxidante por eliminación de radicales libres, así como gran actividad antitumoral y antibacteriana (Ballesteros *et al.*, 2014). En menor proporción presentan actividad antiinflamatoria y antialérgica de manera limitada (Esquivel & Jiménez, 2012). Jung *et al.* (2017) evaluaron la capacidad antioxidante *in vitro* de un pre-tratamiento con extractos de bagazo de café sobre células de la línea celular RAW 264.7 y posteriormente tratadas con lipopolisacárido, incrementando el nivel de concentración de GSH intracelular a la concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$. Abdel-tawwab *et al.* (2017) evaluaron la actividad antioxidante *in vivo* en carpa común inmersa en agua con concentraciones de zinc (5 mg/L) y dietada con suplementos de harina de café tostado variedad arábica (1 g/kg de dieta) por 6 semanas. La suplementación de la dieta incrementó significativamente la actividad de SOD, CAT y GPx presentando un efecto protector contra la toxicidad del zinc, en comparación con la dieta control. Estos estudios demuestran el potencial antioxidante de los componentes fenólicos de residuos del café, y su potencial aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales con capacidad antioxidante para organismos acuáticos de interés en acuicultura.

2.4.2 Residuos del Procesamiento de Naranja

Los desechos cítricos de la naranja contienen azúcar soluble, vitaminas, minerales, almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, cenizas, grasas, proteínas y muchos compuestos bioactivos (Mahato *et al.*, 2018), entre los cuales destacan los polifenoles (especialmente taninos), carotenoides, terpenos y flavonoides [antocianinas, flavanonas (hesperidina y naringenina),

flavonoles, flavonas] (Barrales *et al.*, 2018; Martínez-Navarrete *et al.*, 2008). La producción de cítricos como la naranja, generan desechos como lo son la cáscara (flavedo + albedo) y semillas (Mahato *et al.*, 2018), subproductos de las industrias de procesamiento de jugo y representan el 55-60% del peso de la fruta fresca (Okino & Fleuri, 2015). Se estima que la producción de desechos durante el procesamiento industrial de la naranja es de 15 millones de toneladas anuales a nivel mundial (Mahato *et al.*, 2018). González-Gómez *et al.* (2014) determinaron el TPC para extractos hidrofílicos de cáscara de naranja con un rendimiento de 751 mg GAE/100 g de muestra. Mientras que Yi *et al.* (2018) evaluaron la CA de extractos acuosos de corteza seca de cítricos maduros, los cuales mostraron 20% de inhibición de secuestro del radical DPPH. Además, Barros *et al.* (2012) determinaron la CA de cáscara de naranja variedad lima con concentraciones de 3,500 µM TE/100 g mediante el ensayo de FRAP. Por lo que las cáscaras de cítricos podrían ser una buena fuente de compuestos fenólicos.

2.4.2.1 Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos provenientes de la cáscara de naranja. En cuanto a las propiedades funcionales de los subproductos derivados de la naranja, destacan principalmente su alto contenido en flavonoides y fenilpropanoides, caracterizados por poseer propiedades antioxidantes, donde se ha demostrado sus efectos protectores contra los procesos degenerativos causados por el estrés oxidativo (Martínez-Navarrete *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2012; Okino & Fleuri, 2015), asociados con menores riesgos de contraer enfermedades degenerativas en humano. Vicente *et al.* (2019) evaluaron el uso de compuestos fenólicos (flavonoides-hesperidina) de harina de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) como antioxidantes en aditivos de dietas (0.66, 0.63 y 0.68%) por 70 días en un modelo *in vivo* de tilapia del Nilo. Previo a un reto de temperatura (32°C) y oxígeno disuelto (2.3 mg/L) por 3 días para inducir estrés oxidativo. Los resultados reportaron un incremento de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx comparadas a la dieta control. Lo anterior demuestra que los compuestos fenólicos de la cáscara de naranja muestran potencial para ser empleados como agentes antioxidantes en acuicultura.

2.4.3 Residuos de la Industria del Tomate

El tomate de rezaga representa una fuente de contaminación con gran disponibilidad, es un subproducto del cultivo de tomate que no cumplió con las características físico-químicas idóneas de los estándares de calidad, por lo cual se queda como un producto rezagado que se va pudriendo, proceso por el cual participan distintas bacterias y hongos. El producto de rezaga del tomate representa el 100% del fruto no comestible, con una producción anual de 86,500 toneladas a nivel mundial (Gharbi *et al.*, 2016). En cuanto al contenido nutrimental del tomate contiene valiosos nutrientes compuestos (en peso seco): principalmente fibras (59.03%), azúcares totales (25.73%), proteínas (19.27%), pectinas (7.55%), grasas totales (5.85%), minerales (3.92%) (Savatovic *et al.*, 2012). El tomate en su conjunto (pulpa, semillas y cáscara) es rico en carotenoides como licopenos y compuestos fenólicos como ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, p-coumárico y ferúlico) (Cétkovic *et al.*, 2012) y flavonoides (quercetina, kaempferol, e isorhamnetina) (Ferrerres *et al.*, 2010). Por ejemplo, Ghosh *et al.* (2018) determinaron el TPC para extractos hidrofílicos de tomate de rezaga cultivar “Pusa ruby” con un rendimiento de 453 mg GAE/100 g de muestra. Adicionalmente, Ferreres *et al.* (2010) determinaron la CA de extractos acuosos de tomate, donde reportaron el 5% de inhibición de secuestro contra el radical DPPH. Mientras que, Ilahy *et al.*, (2010) obtuvieron una CA de 540 μ M TE/100 g de muestra en extractos de tomate mediante el ensayo FRAP.

2.4.3.1 Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos provenientes del tomate de rezaga. Entre las propiedades antioxidantes que exhiben los componentes funcionales del fruto del tomate se encuentra el efecto neuroprotector (Ferrerres *et al.*, 2010), debido a que retrasa el efecto deteriorante de enfermedades crónicas degenerativas como el Parkinson y Alzheimer. Además, diversos estudios han demostrado el efecto en la reducción en enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cánceres, demostrando ser una potencial fuente en aplicaciones nutraceuticas (Gharbi *et al.*, 2016; Cétkovic *et al.*, 2012). Peschel *et al.* (2006) determinaron el efecto antioxidante de extractos de tomate (0.1-1.0%) mediante los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica (ácido linoleico) estimulada por FeCl_2 y H_2O_2 por ensayo TBAR.

2.4.4 Residuos de la Industria del Plátano

La cáscara de plátano, como principal desecho del plátano, representa de un 30-40% del peso total de la fruta (Hernández-Carranza *et al.*, 2015; Babbar *et al.*, 2011). La producción de los desechos del plátano es de 36 millones de toneladas anuales a nivel mundial, presentando gran disponibilidad de los residuos que se generan. Está ampliamente documentado que la pulpa y cáscara de plátano se contienen varios antioxidantes, por ejemplo, vitaminas (A, B, C y E), β -caroteno y compuestos fenólicos como catequina, epicatequina, lignina, taninos y antocianinas (Lim *et al.*, 2007; Sulaiman *et al.*, 2011). En este contexto, Sulaiman *et al.* (2011) determinaron el TPC para extractos hidrofílicos de cáscara de plátano (*Musa sp.*) cultivar “kapas” con un rendimiento de 398 mg GAE/100 g de muestra seca y una capacidad antioxidante de 2000 y 4000 $\mu\text{g TE/ 100 g}$ medida por DPPH y FRAP, respectivamente. Entre las aplicaciones prácticas de los residuos que se generan se encuentra la obtención de bioactivos como antioxidantes naturales que vengán a sustituir los antioxidantes sintéticos a través de su extracción por la cascara de plátano (Hernández-Carranza *et al.*, 2015).

2.4.4.1 Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos provenientes de la cáscara de plátano. Es bien conocido que el consumo de grandes cantidades de frutas como el plátano reduce la incidencia de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer, obesidad, y otras (Hernández-Carranza *et al.*, 2015). Además, diversos estudios reportan la presencia de flavonoides, taninos, flobataninos, alcaloides, glucósidos, antocianinas y terpenoides en las cáscaras de plátano, y se ha informado que estos compuestos ejercen diversos efectos biológicos y farmacológicos (actividades antibacterianas, antihipertensivas, antidiabéticas y antiinflamatorias) (Pereira & Maraschin, 2015; Giri *et al.*, 2016). Por ejemplo, Giri *et al.* (2016) evaluaron el uso de compuestos fenólicos (flavonoides) de harina de cáscara de plátano como antioxidantes en aditivos de dietas (10 y 12 g/kg de dieta) en acuicultura, donde el modelo de estudio fue el rohu. Los resultados reportaron que al término de las 12 semanas de alimentación hubo un incremento de las enzimas antioxidantes SOD y CAT.

2.5 Alternativa *In Vivo* a través de Modelos Celulares *In Vitro* de Peces para Determinar el Efecto Citotóxico

Una de las principales limitantes del estudio de compuestos bioactivos en aditivos a través de dietas en peces, son las concentraciones óptimas efectivas para generar una respuesta antioxidante esperada, así como el posible efecto tóxico que dichas dosis puedan acarrear en la implementación de compuestos bioactivos de interés como una forma contraproducente (acelere el estrés oxidativo). Diversos autores han reportado que a altas concentraciones (>1 g/kg de peso) de compuestos bioactivos como los terpenoides y saponinas, son sumamente tóxicos, debido a que provocan anoxia, la cual impide e inhibe la respiración en los peces (Wink, 2015). Una opción para evaluar el posible efecto tóxico de un compuesto bioactivo, previo a ser usado como aditivo en alimentos, es el uso de modelos celulares *in vitro*, a través de los cuales se pueden detectar efectos citotóxicos que ocasionen daño celular y de esta manera establecer las concentraciones efectivas y no tóxicas o seguras. Además, los modelos celulares *in vitro* son muy utilizados actualmente, en especial en el campo de la acuicultura (Coelho-Ribas *et al.*, 2014), como modelos experimentales debido a menor costo de implementación y ambientes controlados en comparación con los modelos *in vivo* convencionales, donde se utilizan un gran número de organismos vivos y es bastante difícil mantener el ambiente totalmente controlado (Wang *et al.*, 2014).

Entre los principales modelos celulares implementados en acuicultura se encuentran los cultivos primarios de macrófagos del riñón cefálico (modelos celulares *ex vivo*). Esto es debido a que representan de manera *in vitro* el principal órgano linfoide (productor de citoquinas) y endocrino efector del sistema inmune innato en peces (Geven & Klaren, 2016; Coelho-Ribas *et al.*, 2014) y cultivos primarios de cerebro e hígado (principal órgano de desintoxicación); los cuales funcionan como órganos indicadores de daño oxidativo en peces (Papoutsoglou, 2012; Torres *et al.*, 2010).

El cerebro se caracteriza por ser un órgano con alta tasa metabólica de degradación oxidativa (ej. dopamina por la monoaminoxidasa mitocondrial) (Dani *et al.*, 2008) que contribuye al daño oxidativo en las biomoléculas (proteínas, lípidos y ADN), Esto resulta sumamente vulnerable por su limitada capacidad antioxidante y alta susceptibilidad al ataque de radicales libres, ya que consume el 20% del oxígeno metabólico total (Oboh & Ogunraku, 2010; Ekambaram *et al.*, 2012).

Siendo un buen modelo celular para detectar toxicidad química *in vitro*, ya que es utilizado para

evaluar mecanismos de efectos citotóxicos a través del daño oxidativo celular (Pietsch *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015).

Peng *et al.* (2012) evaluaron el efecto citotóxico por viabilidad celular (ensayo de MTT) en células de ratón PC12 estimuladas con H₂O₂ (IC₅₀<10 μM), y el efecto antioxidante por peroxidación lipídica (ensayo de TBA) en cerebro de ratón *in vitro* de compuestos fenólicos aislados de ginger fresco. El 6-shogaol, 10-gingerol y un enona-diarilheptanoide fueron los principales compuestos a los que se les atribuyó dicha bioactividad. A su vez, Zheng *et al.* (2014) evaluaron el efecto citotóxico de H₂O₂ (400 μM) por 12 horas, mediante un pre-tratamiento con baicalina (un flavonoide aislado la raíz seca de *Scutellaria baicalensis Georgi*) mediante ensayo MTT. Exhibiendo una viabilidad celular superior al 90% a concentraciones de 2 y 5 μM de baicalina vs el 60% del control celular con H₂O₂.

Debido a lo anteriormente planteado surge la necesidad de estimular la defensa antioxidante endógena de los organismos a través de moléculas bioactivas, como los compuestos fenolicos. Estos compuestos pueden ser obtenidos mediante el aprovechamiento de residuos agroindustriales como fuente, y así potenciar enzimas antioxidantes y disminuir el daño oxidativo celular bajo condiciones de estrés oxidativo, teniendo como modelo idóneo preliminar; un cultivo celular de cerebro de robalo, y generar conocimiento de base para poderlo escalar al organismo completo *in vivo* en estudios futuros.

3. HIPÓTESIS

Los extractos hidrofílicos provenientes de residuos agroindustriales presentan TPC en un rango de 398-1,117 mg GAE/100 g de muestra.

Los extractos hidrofílicos provenientes de residuos agroindustriales presentan una capacidad antioxidante *in vitro* FRAP y DPPH entre 540 y 2000 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ de muestra.

Los extractos hidrofílicos de residuos agroindustriales a concentraciones $\leq 200\ \mu\text{g/mL}$ no presentan efecto citotóxico en células de cerebro de robalo.

Los extractos hidrofílicos del residuo agroindustrial con mayor capacidad antioxidante reducen la peroxidación lipídica (< formación de malondialdehído (MDA)) e incrementan la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en un modelo celular de cerebro de robalo sometido a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto citotóxico y potencial antioxidante de extractos hidrofílicos provenientes de residuos agroindustriales en un modelo celular de cerebro de robalo (*Centropomus viridis*) sometido a estrés oxidativo.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar el contenido total de compuestos fenólicos (CFT) de extractos hidrofílicos de residuos agroindustriales.
- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos hidrofílicos de residuos agroindustriales.
- Evaluar el efecto citotóxico de extractos hidrofílicos del residuo agroindustrial con mayor capacidad antioxidante sobre un modelo celular de cerebro de robalo (*C. viridis*).
- Evaluar el efecto de extractos hidrofílicos del residuo agroindustrial con mayor capacidad antioxidante sobre la peroxidación lipídica y la actividad enzimática antioxidante (SOD, CAT y GPx) en células de cerebro de robalo (*C. viridis*) sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de la Materia Prima

La recolección de muestras se realizó en el período de junio-septiembre de 2019. El bagazo de café se obtuvo de una cafetería comercial conocida (Starbucks), el tomate de rezaga se obtuvo de una central de abastos local, la cáscara de plátano se obtuvo del mercado local, mientras que la cáscara de naranja se obtuvo en un puesto local de venta de jugos, todos provenientes de la ciudad de Mazatlán, Sinaloa.

Las cáscaras de plátano y naranja se lavaron para retirar partículas sólidas y residuos de otro origen. El bagazo de café, el tomate de rezaga y las cáscaras de naranja y plátano se secaron en un horno de secado por convección con aire caliente a 35-37 °C por un periodo de 18-24 h. Posteriormente, el material seco se redujo de tamaño mediante el uso de molino de café GX4100 (KRUPS, Solingen, Alemania), hasta obtener una harina fina, con un contenido de humedad final (%H) de 5.74, 21.00, 10.44 y 9.51, respectivamente. Las harinas fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso (Fig 9).



Figura 9. Residuos agroindustriales de bagazo de café, cáscaras de naranja, tomate de rezaga y cáscaras de plátano. a) Muestras frescas y b) muestras previamente deshidratadas (harina fina).

5.2 Obtención de Extractos

Para la obtención del extracto hidrofílico se siguió la metodología descrita por González-Gómez *et al.*, (2014) con ligeras modificaciones. Para el bagazo de café se utilizó un factor de dilución 1:4 (un gramo de harina se homogenizó con 4 mL de agua ultrapura), mientras que el resto de los residuos (tomate de rezaga, cáscara de naranja y plátano) se utilizó un factor de dilución 1:8 (un gramo de harina se homogenizó con 8 mL de agua ultrapura). Este factor de dilución se tomó en cuenta para los cálculos y asegurar que los resultados sean comparables entre sí. Posteriormente, la mezcla se mantuvo en agitación (~100 rpm) en un termobañero por 72 min a 55-57 °C. La muestra se colocó en un baño ultrasónico modelo 3510 (Branson, Wethersfield, CT, USA) por 15 min antes y después de la agitación. Posteriormente la muestra se filtró con papel filtro Whatman No. 1 y se centrifugó a 6500 rpm por 15 min en una centrifuga Allegra X-30R modelo A99470 (Beckman Coulter, Germany). Se recuperó el sobrenadante el cual es el extracto de interés. El procedimiento se realizó por triplicado para cada matriz.

5.3 Determinación del Contenido de Compuestos Fenólicos Totales (CFT)

El ensayo se llevó a cabo según el método de Folin-Ciocalteu (Swain y Hills, 1959). Del sobrenadante obtenido (extracto) se tomó una alícuota de 10 µL, la cual se diluyó con 230 µL de agua destilada y se homogenizó. Posteriormente se le adicionaron 10 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma, No. Cat. F9252-100ML) y se incubó por 3 min en la oscuridad. Concluido este tiempo se le añadieron 25 µL de Na₂CO₃ 4N (Sigma, No. Cat. S2127-500G) y se incubó por 2 horas, en oscuridad y a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro lector de microplacas EPOCH2N (BioTek, Inc, Vermont, EEUU). La concentración de compuestos fenólicos de cada muestra se determinó mediante el uso de una curva estándar de ácido gálico (GA) 0-400 mg/mL. El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (GAE/g de muestra). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

5.4 Determinación de la Capacidad Antioxidante *In Vitro*

5.4.1 Capacidad de Secuestro del Radical DPPH

La capacidad antioxidante del extracto de los subproductos vegetales se evaluó midiendo la disminución de la absorbancia del radical libre estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). La metodología utilizada en esta prueba fue la técnica propuesta por Brand-Williams (1995) con ligeras modificaciones. Para la realización de este análisis se tomó una alícuota de 20 μL del mismo sobrenadante empleado en la determinación de TPC. Esta se diluyó en 230 μL de DPPH 100 mM preparado con etanol. Una vez adicionado el DPPH se dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Posteriormente, se tomó la lectura de absorbancia a 520 nm en un lector de microplacas EPOCH2N (BioTek, Inc, Vermont, EEUU). La capacidad antioxidante se calculó como micromoles equivalentes de trolox usando una curva estándar de trolox (0-500 μM). Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de trolox por 100 gramos de muestra seca ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ de muestra).

Además se calculó el porcentaje de inhibición del DPPH mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición del radical DPPH (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Donde A_0 corresponde a la absorbancia del blanco y A_1 es la absorbancia de la muestra. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

5.4.2 Capacidad Antioxidante de Reducción del Ion Férrico (FRAP)

El ensayo de FRAP se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Benzie & Strain (1996) con ligeras modificaciones.

El reactivo FRAP se preparó mezclando 50 mL de buffer de acetato de sodio 300 mM (pH 3.6), 5 mL de una solución de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en ácido clorhídrico 40 mM y 5 mL de cloruro férrico hexahidratado 20 mM en agua destilada (relación 10:1:1 (v/v/v)). Para llevar a cabo la reacción se tomó una alícuota de 20 μ L del extracto y se adicionaron 225 μ L del radical FRAP (previamente atemperado a 37 °C). Posteriormente las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se realizaron las lecturas de absorbancia en un lector de microplacas EPOCH2N (BioTek, Inc, Vermont, EEUU) a una longitud de onda de 593 nm. Se empleó una curva de trolox como estándar (0-500 μ M). Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de trolox por 100 gramos de muestra (μ mol TE/100 g de muestra).

Además, el porcentaje de inhibición de FRAP se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción del complejo TPTZ-Fe}^{+3} \text{ a Fe}^{+2} = \left[1 - \left(\frac{A_0}{A_1} \right) \right] \times 100$$

Donde A0 corresponde a la absorbancia del blanco y A1 es la absorbancia de la muestra. Las evaluaciones se realizaron por triplicado.

Una vez determinados el TPC y la capacidad antioxidante *in vitro* de los diferentes extractos hidrofílicos (bagazo de café, tomate de rezaga, cáscaras de naranja y plátano), se eligió el extracto con mejores rendimientos en cuanto a TPC y capacidad antioxidante para la siguiente fase experimental, que fue la evaluación a nivel celular de la actividad antioxidante mediante un reto con estrés oxidativo.

5.5 Cultivo Celular Primario de Cerebro de Robalo

La línea celular pre-establecida de cerebro de róbalo fue proporcionada por el Laboratorio de

biología molecular de CIAD, Mazatlán. Para llevar a cabo el desarrollo celular se realizó según lo descrito por Freshney en (2010).

Las células se descongelaron en baño maría a 37 °C. Posteriormente fueron colocadas en medio de cultivo L15 (Leibovitz's) (L1518, Sigma-Aldrich) suplementado con 1% de antibióticos, antifúngicos (estreptomocina-penicilina 50 U/mL (15140-122, gibco)), se cultivaron en una placa de 6 pozos a una densidad de 1×10^6 células/por pozo y se incubaron a 25 °C en una incubadora sin CO₂.

Una vez que la confluencia celular alcanzó el 90% se realizó transferencia a botellas de cultivo de 75mm, se sembraron a una densidad de 2×10^6 en DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) (D5796, Sigma-Aldrich), suplementado con SFB (16000-044, gibco) al 10%, y anti-anti (A5955, Sigma-Aldrich) al 1%, esterilizado por filtración en acrodiscos de 0.20 micras.

Para el crecimiento óptimo y completo, las células fueron sembradas en DMEM suplementado con 1% anti-anti y 10% de SFB en una incubadora (Shel lab) con atmósfera humidificada con CO₂ al 5%.

5.6 Ensayo de Citotoxicidad Celular (MTT)

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio] descrito por Castro (2006). En una placa de 96 pozos con células de cerebro de roballo (12,500 células/pozo) previamente adheridas (por 24 h) se le realizó un pre-tratamiento con los extractos hidrofílicos de café a concentraciones de 0[control], 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 y 2000 µg/ml y se incubaron a 26°C, 80% HR y CO₂ al 5% por 24 horas. Pasado el tiempo se llevó a cabo un lavado con PBS + 1% de antibiótico y se colocó 50 µL de medio DMEM sin rojo fenol y 30 µL de MTT preparado en PBS por pozo, se incubaron por 4 horas a 26 °C para permitir la formación de cristales de formazán. Posteriormente se retiró el medio y el reactivo MTT y se añadieron 200 µL de isopropanol para disolver los cristales. La cuantificación de la absorbancia se llevó a cabo en un lector de microplacas EPOCH2N (Biotek, Inc., Vermont, EEUU) a una longitud de onda de 540 nm, donde una coloración morada indica viabilidad celular (Fig 10).

La viabilidad celular (%VC) se expresa como porcentaje de células viables

$$\%VC = [(A1 \times 100)/A0]$$

Donde A1 es la absorbancia de la concentración en presencia del extracto y A0 es la absorbancia del control sin tratamiento. El tratamiento se realizó por cuatuplicado. (Denizot & Lang, 1986). Para la determinación de la concentración máxima no tóxica (IC₈₀) y la concentración inhibitoria media (IC₅₀) se utilizó la ecuación de la recta.

$$\text{Ecuación de la recta: } y = mx + b$$

Donde y es igual a la respuesta, m equivale a la pendiente y b es el intercepto de la recta. Como resultado de la curva por la serie de concentraciones evaluadas para la viabilidad celular, mediante las fórmulas:

$$IC_{80} = \left(\frac{80-b}{m} \right)$$

$$IC_{50} = \left(\frac{50-b}{m} \right)$$



Figura 10. Diagrama propuesto para el ensayo de viabilidad celular por MTT

Una vez determinada estas concentraciones se eligió el IC₈₀ como la concentración máxima a implementar para los ensayos celulares de estrés oxidativo, la cual se refiere a la concentración máxima no tóxica, ya que mantiene, al menos, al 80% de las células viables.

5.7 Reto de Estrés Oxidativo con Peróxido de Hidrógeno

Para este ensayo se usaron 1×10^6 células de cerebro/por pozo adheridas en microplacas de 6 pozos. Se les realizó un pretratamiento con los extractos hidrofílicos y el estándar de ácido gálico por 24 hr. Una vez pasado el tiempo se les retiró el medio con el extracto y se les aplicó el reto 100 μM de H_2O_2 por 1 hr. Posteriormente, se les retiró el tratamiento con H_2O_2 y las células se recuperaron con 1000 μL de buffer (PBS con EDTA 2%). La suspensión celular se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C, se recuperó el pellet y se resuspendió en 300 μL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.4), se sonicó por 10 min y posteriormente se volvió a centrifugar a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante. El sobrenadante se utilizó inmediatamente para los siguientes análisis de actividad antioxidante enzimática y peroxidación lipídica (Fig 11).

A continuación, se presentan los diferentes tratamientos para los ensayos de estrés oxidativo a evaluar:

C-: Control negativo, células sin pretratamiento y sin H_2O_2 (100 μM).

C+: Control positivo, células sin pretratamiento y con H_2O_2 (100 μM).

AG+: Pretratamiento de células con ácido gálico (50 mg/ml) y con H_2O_2 (100 μM).

115+: Pretratamiento de células con extracto de café (115 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con H_2O_2 (100 μM).

230+: Pretratamiento de células con extracto de café (230 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con H_2O_2 (100 μM).

460+: Pretratamiento de células con extracto de café (460 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con H_2O_2 (100 μM).



Figura 11. Diagrama propuesto para el reto de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno.

5.8 Cuantificación de Proteína por el Método Bradford

Para la cuantificación de la proteína se empleó el método propuesto por Bradford (1976), empleando como estándar la albumina de suero bovino (BSA, P0834, Sigma-Aldrich) (0.1 a 1.4 mg/ml). Brevemente, se añadió 5 µL de muestra, estándar o blanco, y se adicionó 250 µL del reactivo Bradford (B6916, Sigma-Aldrich). Las muestras se agitaron por 30 s y posteriormente se incubaron por 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez pasado el tiempo, se midió la absorbancia a 595 nm. Los resultados se reportaron mg de proteína por ml de extracto enzimático (Fig 12). Este dato es necesario para el cálculo de la actividad enzimática (U/mg proteína).



Figura 12. Diagrama propuesto para la cuantificación de proteína por el método Bradford.

5.9 Análisis de la Actividad Enzimática Antioxidante

5.9.1 Ensayo de Superóxido Dismutasa Sérica (SOD)

Para determinar la actividad enzimática de SOD se empleó el kit SOD-WST (19160 Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, se añadió 20 μl de la solución muestra SOD y 20 μl de agua bidestilada (ddH_2O), 200 μl de la solución WST y se mezcló con pipeteo ligero. Además, se le añadió 20 μl de dilución tampón y 20 μl de solución enzimática, y se mezcló nuevamente. Posteriormente se incubó la placa a 37 °C por 20 min para leer la abs a 450 nm en un lector de microplacas EPOCHN2. La actividad de la enzima se expresó como unidades de actividad de SOD/mg de proteína. Una unidad de actividad de SOD se definió como la cantidad de enzima que inhibe la formación de formazan en 50 %.

5.9.2 Ensayo de Catalasa (CAT)

La actividad de catalasa se determinó según lo propuesto por Aebi (1974) con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción del ensayo consistió en 200 μl de H_2O_2 15 mM disuelto en buffer de fosfato 100 mM, pH 6.5. Posteriormente se añadió 10 μl del sobrenadante y de inmediato se procedió a realizar una cinética de reacción durante dos minutos con lecturas cada 10 segundos. Las lecturas se realizaron a 240 nm en un lector de microplacas EPOCHN2. Los resultados se expresaron en unidades de actividad de catalasa por miligramo de proteína (U CAT mg/proteína), donde una unidad de catalasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μmoles de H_2O_2 / minuto.

5.10 Ensayo de Peroxidación Lipídica Celular

Esta técnica se siguió bajo lo descrito por Lizárraga-Velázquez *et al.* (2019) y Solé *et al.* (2004) con moderadas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 50 μL del sobrenadante obtenido previamente con 163 μL de 1 metil-2 fenilindol (10,3 mM) en metanol: acetonitrilo (1: 3; v / v), 50 μL de agua y 75 μL de HCl al 37%. Esta mezcla se incubó a 45 °C durante 40 min, se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min a 4 ° C. Se leyó la absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro EPOCHN2 y se calculó la cantidad de lípidos peroxidados (μmol MDA/ g de pellet) usando una solución estándar de 1, 1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich 108383-100ML).

5.11 Análisis Estadístico

Las variables continuas se presentaron como media \pm SD (n=3). Los resultados de los diferentes ensayos fueron evaluados por un análisis de varianza de una vía (ANOVA), por pruebas post-hoc de Tukey para determinar diferencias entre los grupos experimentales y los controles positivos y negativos mediante un análisis estadístico por RStudio versión 1.1.456. Se consideró el valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo (Ver sección de Anexos).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Contenido Total de Compuestos Fenólicos (CFT) en Extractos Hidrofílicos de Bagazo de Café, Tomate de Rezaga, Cáscara de Naranja y de Plátano.

El extracto hidrofílico de bagazo de café presentó el mayor CFT con 892.673 mg GAE/100 g de muestra (cuadro 3), con diferencias significativas al resto de los extractos evaluados ($P < 0.05$), seguido por el extracto de cáscara de naranja con 670.68 mg GAE/100 g de muestra. Los extractos hidrofílicos de tomate de rezaga y cáscara de plátano presentaron el menor CFT con 359.10 y 476.26 mg GAE/100 g de muestra, respectivamente ($P > 0.05$).

Cuadro 3. Contenido total de compuestos fenólicos (mg GAE/100g de muestra) presentes en extractos hidrofílicos de residuos agroindustriales.

Extractos hidrofílicos	CFT (mg GAE/100 g)
Bagazo de café	892.673±59.12 ^c
Tomate de rezaga	359.10±39.13 ^a
Cáscara de naranja	670.68±117.56 ^b
Cáscara de plátano	476.26±13.94 ^a

Cada dato representa la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con ANOVA, prueba de Tukey ($P < 0.05$). CFT es expresado como miligramos de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra seca.

Estos resultados son similares con lo reportado por Vega *et al.*, (2017) quienes determinaron que el CFT de extractos hidrofílicos de bagazo de café variedad arábica presenta un rendimiento de 1,117 mg GAE/100 g de muestra. Por su parte, González-Gómez *et al.* (2014) determinaron el CFT para extractos hidrofílicos de cáscara de naranja con un rendimiento de 751 mg GAE/100 g de muestra. Cabe mencionar que para nuestro estudio se replicaron las condiciones (temperatura y agitación constante) y solvente (agua ultrapura) para la obtención de mejores rendimientos de

extracción que los autores recomiendan. Adicionalmente, Ghosh *et al.* (2018) determinaron que el CFT para extractos hidrofílicos de tomate de rezaga cultivar “Pusa ruby” presentó un rendimiento de 453 mg GAE/100 g de muestra, y Sulaiman *et al.* (2011) determinaron que el CFT para extractos hidrofílicos de cáscara de plátano (*Musa sp.*) cultivar “kapas” presentó un rendimiento de 398 mg GAE/100 g de muestra seca, rendimientos parecidos en cuanto a la cantidad contenida de CFT por naturaleza del extracto evaluado.

6.2 Ensayos de Capacidad Antioxidante *In Vitro*

Para los siguientes ensayos de la capacidad antioxidante *in vitro* para los diferentes extractos hidrofílicos de bagazo de café, tomate de rezaga, cáscaras de naranja y plátano, se evaluaron dos técnicas antioxidantes, DPPH y FRAP, los resultados se reportaron en términos de $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ y porcentaje (%) de inhibición del radical empleado (Cuadro 4).

Cuadro 4. Capacidad antioxidante *in vitro* de extractos hidrofílicos de residuos agroindustriales.

Residuo	DPPH		FRAP	
	$\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$	% inhibición	$\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$	% inhibición
Bagazo de café	3554.26 \pm 517.80 ^d	21.23 \pm 0.92 % ^d	428.29 \pm 17.53 ^c	77 \pm 0.40 ^c
Tomate de rezaga	389.42 \pm 33.70 ^a	0.90 \pm 0.34% ^a	191.73 \pm 4.73 ^a	32.82 \pm 0.51% ^a
Cáscara de naranja	1800.52 \pm 115.33 ^b	9.38 \pm 0.27% ^b	366.93 \pm 4.03 ^b	59.49 \pm 1.22% ^b
Cáscara de plátano	3132.39 \pm 169.80 ^c	15.09 \pm 0.89% ^c	389.76 \pm 7.40 ^b	57.14 \pm 0.52% ^b

Cada dato representa la media \pm desviación estándar (n = 3). Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas de acuerdo con ANOVA, prueba de Tukey (P < 0.05). $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ es expresado micromoles equivalentes de trolox como referencia antioxidante por cien gramos de muestra seca.

6.2.1 Capacidad de Secuestro del Radical DPPH

El porcentaje de inhibición de la muestra de bagazo de café vs el radical DPPH fue del 21.23% y el de la cáscara de plátano fue de 15.09%, mientras que el de la cáscara de naranja fue de 9.38%. El tomate de rezaga presentó el porcentaje de inhibición más bajo con el 0.90%. El extracto de bagazo de café presentó mayor capacidad antioxidante ($p \leq 0.05$) $n=3$ comparado con el resto de las muestras evaluadas (Cuadro 4).

En cuanto a lo reportado para la capacidad antioxidante DPPH, nuestros resultados contrastan a lo reportado por diversos autores. Por ejemplo, Jung *et al.* (2017) determinaron la capacidad antioxidante de extractos hidrofílicos de café tostado variedad arábica, ricos en ácidos cafeicos, clorogénicos, ferúlicos y vanílico, exhibiendo cerca del 14% de inhibición vs el radical DPPH. Por su parte, Babbar *et al.* (2011) determinaron la capacidad antioxidante vs radical DPPH *in vitro* de extractos acuosos de cáscara de plátano (*Musa sapientum*) ricos en delfinidina, cianidina y epicatequina exhibiendo el 43% de inhibición, en comparación con antioxidante sintético (BHT) con el 83% de inhibición. Yi *et al.* (2008) evaluaron el efecto de extractos acuosos de corteza seca de cítricos maduros ricos en hesperidina, nobiletina y tangeretina, previamente caracterizados, los cuales exhibieron al menos el 20% de inhibición vs el radical DPPH, y Ferreres *et al.*, en (2010) determinaron la capacidad antioxidante de extractos acuosos de tomate de rezaga (*Lycopersicon esculentum*) ricos en glicósidos de quercetina, kaempferol y isorhamnetina, con un efecto sinérgico entre ellos, exhibiendo al menos el 5 % de inhibición vs radical DPPH *in vitro*.

6.2.2 Capacidad de Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP)

La capacidad antioxidante de la muestra de bagazo de café vs el poder reductor de Fe^{+3} a Fe^{+2} fue del 428.29 ± 17.53 $\mu\text{mol TE}/100$ g, mientras que los extractos hidrofílicos de la cáscara de naranja y plátano mostraron una capacidad antioxidante de 366.93 ± 4.03 $\mu\text{mol TE}/100$ g y 389.76 ± 7 $\mu\text{mol TE}/100$ g, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Los extractos de tomate de rezaga presentaron la capacidad antioxidante menor con 191.73 ± 4.73 $\mu\text{mol TE}/100$ g.

El extracto de bagazo de café presentó mayor capacidad antioxidante ($p \leq 0.05$) comparado con el resto de las muestras evaluadas (Cuadro 4). Estos resultados contrastan con los reportados por; Fonseca *et al.* (2014) que evaluaron la capacidad antioxidante (CA) de FRAP para subproductos de café de muestras comerciales, donde destacó el pergamino del café con una CA de 1000.72 $\mu\text{M TE}/100 \text{ g}$. Barros *et al.* (2012) donde evaluaron la CA de FRAP para cáscara de naranja variedad lima con una concentración de 3,500 $\mu\text{M TE}/100 \text{ g}$. Rebello *et al.* (2014) evaluó la CA de FRAP de harina de cáscara de plátano (*Musa AAA*) con una concentración de 1,400 $\mu\text{M TE}/100 \text{ g}$, mientras que Ilahy *et al.* (2011) obtuvieron una CA de FRAP de 540 $\mu\text{M TE}/100 \text{ g}$, para tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

Los resultados reportados para la capacidad antioxidante de FRAP, en terminos de % de inhibición del ion Fe^{+3} obtenidos, presentaron mayores rendimientos a los reportados para DPPH, esto esta directamente relacionado al fundamento de cada técnica empleada y la relación de la naturaleza de los compuestos fenolicos contenidos para cada tipo de extracto hidrofílico. Debido a que el modo de acción del radical DPPH, se basa en la donación de un electrón y/o hidrogeno por parte del antioxidante empleado para neutralizarlo, mientras que el modo de acción de FRAP, se basa en la quelación del ion Fe^{+3} a Fe^{+2} . Según lo reportado para ambas técnicas los compuestos fenólicos podrían ser mas afines al ion Fe^{+3} que a la donación de electrones (Barros *et al.*, 2012).

Para continuar con la siguiente fase experimental; en la cual se planteó demostrar el potencial antioxidante de los extractos hidrofílicos en un modelo celular de cerebro de robalo sometido a estrés oxidativo, se decidió emplear el extracto hidrofílico de bagazo de café, ya que fue el que presentó mejores rendimientos de TPC y capacidad antioxidante *in vitro* mediante los ensayos DPPH y FRAP.

6.3 Citotoxicidad Celular por Ensayo de MTT

El porcentaje de la viabilidad de las células tratadas con extractos hidrofílicos de bagazo de café se reportó mediante una curva donde cada concentración del extracto presentó su respectivo porcentaje de viabilidad celular (Fig. 13). La concentración letal media (IC_{50}) y la concentración mínima no tóxica (IC_{80}) se obtuvieron mediante curva de concentraciones evaluadas (Cuadro 5).

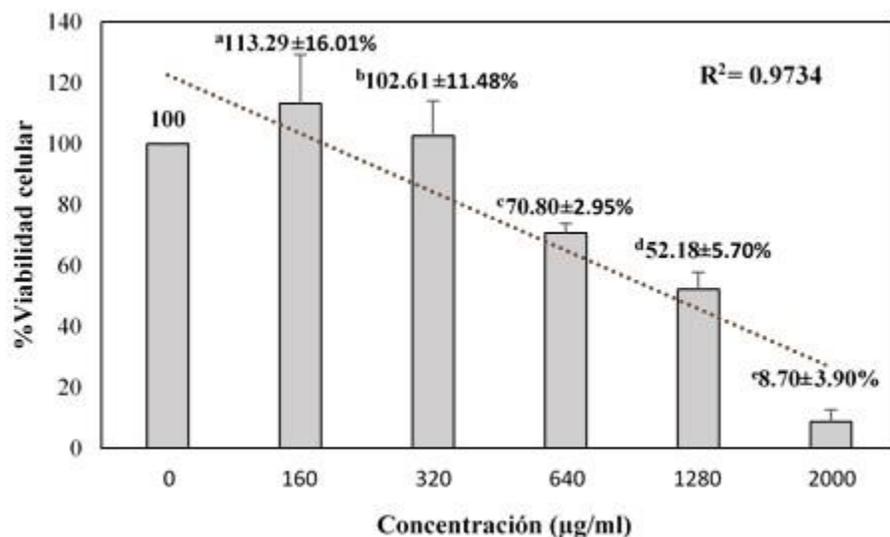


Figura 13. Porcentaje (%) de la viabilidad celular por las diferentes concentraciones expresadas en µg/mL del extracto hidrofílico de bagazo de café. Cada barra representa la media ± DE (n = 4). Letras diferentes significa diferencia significativa de acuerdo con ANOVA, prueba de Tukey (P ≤ 0.05).

Cuadro 5. Viabilidad de células de cerebro de robalo expresada en términos de concentración letal media (IC₅₀) y concentración mínima no tóxica (IC₈₀) del extracto hidrofílico de bagazo de café en (µg/mL).

Viabilidad celular	Conc. (µg/mL)
IC ₅₀	997.52 ± 87.65 ^b
IC ₈₀	467.31 ± 54.33 ^a

Cada concentración representa la media ± DE (n = 3). Letras diferentes significa diferencia significativa de acuerdo con ANOVA, prueba de Tukey (P ≤ 0.05).

Como objetivo principal de este ensayo fue obtener de una curva de citotoxicidad celular de un amplio rango de concentraciones de extractos hidrofílicos de bagazo de café, que anteriormente no se había reportado en la literatura, en cuanto a su uso en acuicultura. De esta manera según los resultados reportados para este estudio la concentración letal media (IC₅₀) concentración que mata al 50% de células de cerebro de robalo, se obtuvo a la concentración de 997.52 µg/ml de extracto hidrofílico de bagazo de café. Mientras que la concentración máxima no tóxica (IC₈₀), la cual es la concentración necesaria para mantener viables al 80% del total de células, se obtuvo a la concentración de 467.31 µg/mL de extracto hidrofílico de bagazo de café. Esto indicó que las concentraciones efectivas para llevar a cabo los análisis posteriores (ensayos antioxidantes) fueron menores a 467.31 µg/mL, las cuales son seguras para este tipo de células en específico.

Nzekoue *et al.* (2020) evaluaron la posible citotoxicidad de extractos acuosos de desecho de la piel del café sobre células SH-SY5Y (línea celular de neuroblastoma humano) a concentraciones de 1-200 µg/mL por 24 h. En sus resultados, ellos reportaron una viabilidad celular (MTT ensayo) del 100%, al igual que nuestros resultados a las mismas concentraciones evaluadas. Dicho resultado fue atribuido a un mejoramiento de la actividad mitocondrial celular debido al contenido de ácidos fenólicos (cafeoilquínicos) y flavonoides (rutina, quercetina, kaempferol y quercitrina) caracterizados en este estudio, los cuales está documentado que modulan la expresión del factor nuclear respiratorio gen Nrf1/2.

6.4 Ensayos de la Actividad Enzimática Antioxidante

6.4.1 Actividad de la Enzima Superóxido Dismutasa (SOD)

La actividad enzimática de SOD del tratamiento control sometido a estrés oxidativo (C+) se redujo significativamente ($P < 0.05$), comparada con la actividad del control sin estrés (C-). Lo que es un indicativo de presencia de estrés oxidativo ocasionado por el peróxido de hidrógeno. Los tratamientos AG y 115+ presentaron una actividad de SOD similar a la del C+. Sin embargo, los tratamientos 230+ y 460+, los cuales representan las concentraciones más altas del extracto hidrófilico de bagazo de café, mostraron una mayor actividad de la enzima SOD, la cual fue similar a la del control sin estrés (C-). Esto podría indicar que a las concentraciones más altas de los extractos se muestran un restablecimiento de la actividad normal de SOD en células de cerebro de roballo (Fig 14).

Actividad de SOD

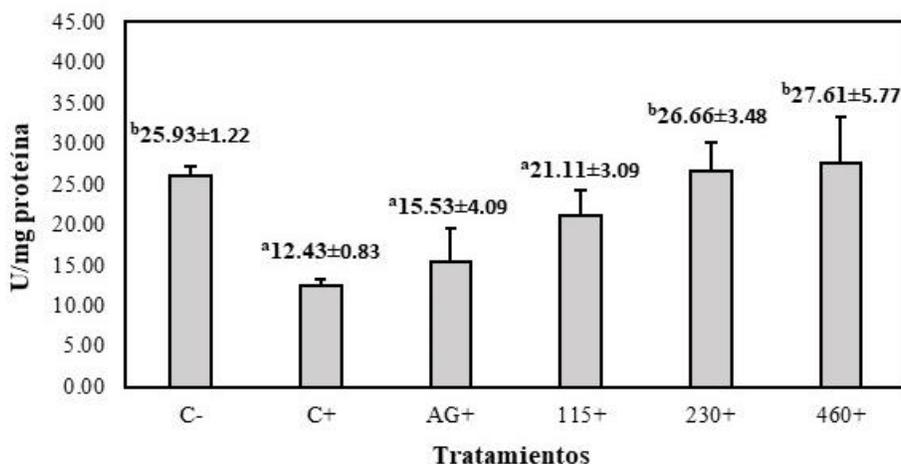


Figura 14. Actividad antioxidante enzimática de SOD en U/mg proteína por diferentes pre-tratamientos de café (115+, 230+, 460+), AG+, C- y C+. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). Letras diferentes significa diferencia significativa de acuerdo con ANOVA, prueba de Tukey (P < 0.05).

*Control negativo(C-), control positivo(C+), ácido gálico(AG+), 115, 230 y 460 μ g/ml (115+, 230+ y 460+), (+) Tratamiento retado con H₂O₂.

Vicente *et al.* (2019) reportaron el efecto de fragmentos de cáscara de naranja (0.66, 0.63 y 0.68%) como aditivos en la dieta de tilapia del Nilo, con el objetivo de mejorar la actividad enzimática antioxidante. Posteriormente se sometió a la tilapia a condiciones de estrés oxidativo (32°C/ 2.3 mg/l O₂ disuelto). Ellos encontraron que a dichas condiciones de estrés y alimentando con las dietas suplementadas se incrementó la actividad de SOD en el hígado de la tilapia, en comparación con la dieta control sin aditivo. Lo cual coincide por lo reportado en este estudio. Los autores atribuyen la modulación enzimática de SOD principalmente a la hesperidina, un flavonoide contenido en la cáscara de naranja. Dicha naturaleza química es muy parecida a los flavonoides contenidos en el bagazo de café, el cual se encargan de regular la expresión del gen Nrf2 que estimula la expresión de genes y la actividad enzimática antioxidante (Parhiz *et al.*, 2015; Königsberg-Fainstein, 2007). Además, Hoseinifar *et al.* (2020) obtuvieron un incremento de la actividad de SOD en el hígado de la trucha arcoíris al añadir un aditivo de residuos de la oliva (2.5 y 5 g/kg) a la dieta. Dicha bioactividad se les atribuye principalmente a los ácidos fenólicos, de los cuales destacan el ácido cafeico, *p*-coumarico y vanílico. Por otra parte, está ampliamente descrito que el bagazo de café, presenta ácidos fenólicos similares a los contenidos en los residuos de oliva. Lo cual podría indicar un mejoramiento en el estado bajo estrés oxidativo por la estimulación de la respuesta antioxidante.

6.4.2 Actividad de la Enzima Catalasa (CAT)

La actividad enzimática de CAT fue significativamente mayor a las concentraciones más altas del extracto hidrofílico de bagazo de café, es decir en los tratamientos 230+ y 460+ (sin diferencias significativas entre ellos), en comparación con la actividad de los tratamientos 115+, AG+, C+ y C- (sin diferencias significativas entre ellos) (Fig. 15).

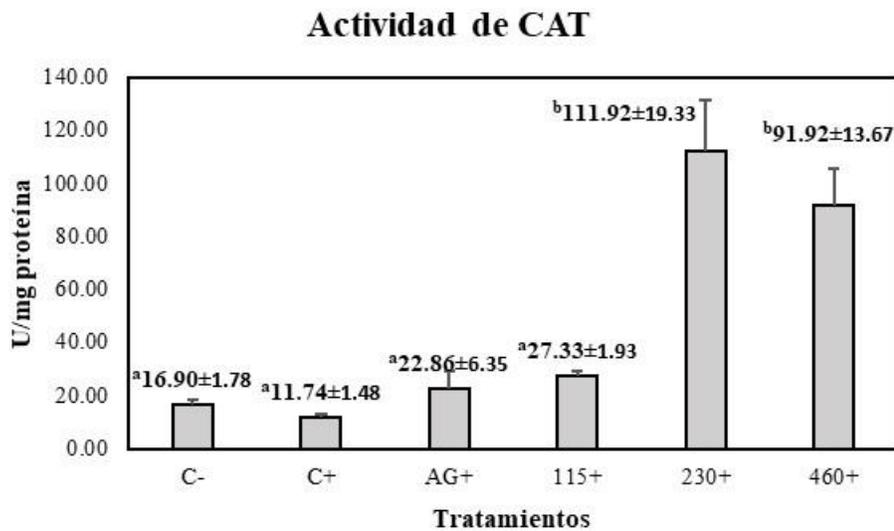


Figura 15. Actividad antioxidante enzimática CAT en U/mg proteína por diferentes pre-tratamientos de café (115+, 230+, 460+), AG+, C- y C+. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). Letras diferentes significa diferencia significativa de acuerdo con ANOVA, prueba de Tukey (P < 0.05).

*Control negativo(C-), control positivo(C+), ácido gálico(AG+), 115, 230 y 460 μ g/ml (115+, 230+ y 460+), (+) Tratamiento retado con H₂O₂.

Los resultados reportados indican que al aplicar los pre-tratamientos con extractos hidrofílicos de bagazo de café a la concentración de 230+, se detona la actividad antioxidante de CAT (dicha tendencia permanece sin diferencia significativa a la concentración de 460+). El resto de los tratamientos evaluados (115+, AG+ y C+), no mostraron diferencias significativas con el control celular sin retar (C-), exhibiendo una concentración mínima de la enzima CAT. Por lo tanto, es necesario un estímulo de naturaleza antioxidante para lograr modular la actividad enzimática de CAT. Lo cual coincide con lo descrito por Lizarraga-Velazquez *et al.* (2019), quienes reportaron

un incremento en la actividad hepática de CAT en pez cebra, alimentado con extractos de cáscara de mango como aditivo (150 y 200 mg/kg dieta). Dicho efecto se le atribuye al contenido de ácidos fenólicos como el gálico, 2-hidroxicinámico y flavonoides como la quercetina. Los cuales son capaces de activar de manera directa el gen Nrf2 y por ende la respuesta enzimática de CAT. Además, Jahazi *et al*, en (2020) evaluaron flavonoides (0.2%) (catequinas y epicatequinas) extraídos de residuos de Castaño-alpechín (adicionados a la dieta de la carpa común), incrementando la actividad antioxidante sérica expresada por CAT, con respecto a la dieta control. Así como esta ampliamente descrita la naturaleza de los ácidos fenólicos contenidos en el bagazo de café, cabe destacar que es rico en flavonoides, con estructuras químicas similares a las reportadas anteriormente.

6.5 Peroxidación Lipídica Celular

La peroxidación lipídica del tratamiento control sometido a estrés oxidativo (C+) se incrementó significativamente ($P < 0.05$), comparada con el control sin estrés (C-) (Fig. 16). Lo que indica claramente, que el proceso de oxidación se potencia cuando las células están sometidas a estrés oxidativo, ocasionado en este caso por la presencia del peróxido de hidrógeno. Los tratamientos 230+ y 460+, redujeron significativamente la peroxidación lipídica. Sin embargo, solamente el tratamiento 460+ alcanzó valores similares a los del C- (sin estrés). Esto muestra que solamente al usar 460 $\mu\text{g/ml}$ de extracto hidrofílico se podría revertir el efecto del estrés oxidativo ocasionado por H_2O_2 en células de cerebro de robalo bajo las condiciones de este experimento. Adicionalmente, muestra el efecto antioxidante que ejercen los compuestos fenólicos contenidos en el extracto, inhibiendo directamente los productos de reacción de la oxidación de lípidos.

Peroxidación lipídica celular

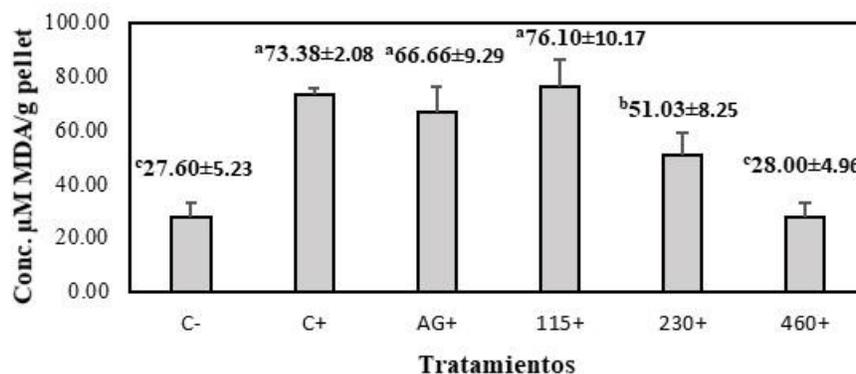


Figura 16. Indicador de la peroxidación lipídica por conc. μM MDA/g pellet celular, por diferentes pre-tratamientos de café (115+, 230+, 460+), AG+, C- y C+. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). Letras diferentes significa diferencia significativa de acuerdo con ANOVA, prueba de Tukey (P < 0.05).

*Control negativo(C-), control positivo(C+), ácido gálico(AG+), 115, 230 y 460 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (115+, 230+ y 460+), (+) Tratamiento retado con H_2O_2 .

Lizárraga-Velázquez *et al.* (2019) evaluaron el efecto de compuestos fenólicos (ácido gálico, 2-hidroxicinámico y quercetina) de extractos de cáscara de mango (*Mangifera indica*) en dietas enriquecidas en pez cebra. Esto, como potencial para prevenir la peroxidación lipídica, debido a que concentraciones de 50 y 100 mg del extracto/kg dieta, mostraron niveles significativamente menores de MDA en el músculo del pez cebra. Estos resultados contrastan con las concentraciones efectivas superiores (460 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de extracto) implementadas en nuestro estudio. Cabe destacar que nuestro estudio fue retado con H_2O_2 100 μM , ejerciendo un estallido de los productos de reacción que generan la oxidación de los PUFAs. Cabe mencionar que de manera *in vitro* los ácidos fenólicos y flavonoides contenidos en el extracto de café actúan directamente inhibiendo el MDA subproducto principal producido como indicador de peroxidación lipídica (Ochoa & Gonzáles, 2008). En comparación con lo descrito por Lizárraga-Velázquez *et al.* (2019), donde no se realizó ningún reto de estrés. Lo que indicaría una reducción de la oxidación lipídica por parte de estos compuestos en condiciones normales a concentraciones más bajas. Por su parte, Peschel *et al.* (2006) evaluaron el efecto antioxidante *in vitro* de extractos de residuos de manzana y alcachofa (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ricos en compuestos fenólicos, por inhibición de la peroxidación del ácido linoleico por ensayo TBAR, estimulada con $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ (2.0 mM). Los resultados fueron muy eficientes en comparación con un antioxidante sintético BHT (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con 76.72, 64.11 y 100.02% de inhibición, respectivamente.

7. CONCLUSIONES

Los extractos hidrofílicos de bagazo de café, tomate de rezaga, cáscara de naranja y de plátano presentan un contenido total de compuestos fenólicos en un rango de 389.42 ± 33.70 - 3554.26 ± 517.80 . Los extractos obtenidos de bagazo de café mostraron el mayor contenido de compuestos fenólicos.

Los extractos hidrofílicos provenientes de residuos agroindustriales presentan una capacidad antioxidante *in vitro* mediante la inhibición de radicales DPPH 0.9 ± 0.34 - $21.23 \pm 0.92\%$ y del TPTZ de 32.82 ± 0.51 - $77.00 \pm 0.40\%$. En ambos casos el extracto hidrofílico de bagazo de café fue el que mostró mayor capacidad antioxidante, siendo directamente proporcional al mayor contenido de compuestos fenólicos presentado. Por lo que representó ser el de mejor potencial para el resto de la investigación.

La concentración máxima no tóxica de los extractos hidrofílicos de bagazo de café en células de cerebro de robalo es de $467.31 \mu\text{g/ml}$, mientras que la concentración letal media capaz de matar al 50% de las células fue de $997.52 \mu\text{g/ml}$. En base a estas concentraciones, se tomaron dosis de 460 como la más alta, 230 y $115 \mu\text{g/ml}$, para análisis posteriores.

Los niveles más bajos de peroxidación lipídica producidos en células de cerebro de robalo estimuladas con H_2O_2 se obtienen con un pre-tratamiento con $460 \mu\text{g/ml}$ de extractos hidrofílicos de bagazo de café. Mientras que la actividad de SOD y CAT se incrementó al emplear $230 \mu\text{g/ml}$ y $460 \mu\text{g/ml}$ de extractos hidrofílicos de bagazo de café, respectivamente. Presentando el café un efecto potencial protector contra la peroxidación lipídica y un efecto modulador sobre la actividad de SOD y CAT por estrés oxidativo celular inducido.

8. RECOMENDACIONES

Es muy recomendable para fortalecer nuestros hallazgos encontrados, en estudios posteriores a este, realizar un perfil para identificar y caracterizar los compuestos fenólicos contenidos en los extractos hidrofílicos de bagazo de café a emplear. Debido que a pesar de que esta ampliamente documentado por diversos autores que previamente los han caracterizado principalmente por HPLC, es importante conocer a que compuestos específicos se le atribuye dicha bioactividad. Es bien sabido que la naturaleza química de los compuestos fenólicos puede variar según las condiciones de estrés a los que se somete la planta, como factores medioambientales, plagas, fuente, tiempo de cosecha y maduración del fruto, entre otros.

Partiendo de las concentraciones seguras y efectivas de extractos hidrofílicos de café, establecidas a nivel celular en este estudio. Se podrían escalar, evaluándolas de manera *in vivo*, en sistemas de cultivo acuícola, a través de aditivos en los alimentos. Acompañadas de un reto de estrés oxidativo con H₂O₂ disuelto en el agua, como se implementó en este estudio.

9. REFERENCIAS

- Abdo de la Parra, M., Rodríguez, E., Hernández, C., Hernández, K., González, B., Martínez, I., & García, A. (2010). Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*). *Biología Marina y Oceanografía*, 45(3), 433-439.
- Abdel-Tawwab, M., Sharafeldin, K.M. & Ismaiel, N.E.M. (2017). Interactive effects of coffee bean supplementation and waterborne zinc toxicity on growth performance, biochemical variables, antioxidant activity and zinc bioaccumulation in whole body of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Nutrition*, 1-8, doi: 10.1111/anu.12540.
- Abdel-Tawwab, M., Adeshina, I., Jenyo-Oni, A., Ajani, EK. & Emikpe, BO. (2018). Growth, physiological, antioxidants, and immune response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), to dietary clove basil, *Ocimum gratissimum*, leaf extract and its susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection, *Fish and Shellfish Immunology*, doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.057.
- Aebi H. (1987). Catalase of enzymatic analysis. Bergmeyer HU (ed): *Methods in Enzymology*, Weinheim VCH Verlagsgesellschaft. *Enzymes 1: Oxidoreductase, transferases*. 3(3), 273–285.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M., & Raisuddin, S. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1523(1), 37–48.
- Akrami, R., Gharaei, A., Mansour, M. R., & Galeshi, A. (2015). Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hemato–biochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 828–834. doi:10.1016/j.fsi.2015.06.005.
- Álvarez, C., Gaxiola, G., Jiménez, L., Sánchez, A., Arena, L., Martínez, T., Tovar, D., Concha, B., Márquez, G., Perales, N., Asencio, G., & Ramírez, F. (2010). Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. *Avances en Nutrición Acuícola*, 10, 98-231.
- Ansaldo, M. (2001) Niveles de antioxidantes en peces Antárticos pertenecientes a las familias *nototheniidae* y *channichthyidae*. (TESIS DE DOCTORADO). Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Arriaga-Hernández, D., Hernández, C., Martínez-Montaña, E., Ibarra-Castro, L., Lizárraga-Velázquez, E., Leyva-López, N., & Chávez-Sánchez, C. (2021) Fish meal replacement by soybean products in aquaculture feeds for White snook, *Centropomus viridis*: Effect on growth, diet digestibility, and digestive capacity. *Aquaculture*, 530: 1-9.
- Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G., & Strasburg, G.M. (2000) Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 373: 102–109.
- Ashour, M.; Wink, M. (2010) Genus *Bupleurum*: a review of its phytochemistry, pharmacology

and modes of action. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63: 305–321.

- Avilez, I. M., Hori, T. S. F., de Almeida, L. C., Hackbarth, A., Neto, J. da C. B., Bastos, V. L. F. da C., & Moraes, G. (2008). Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(2), 136–142
- Avilés, S.; Vázquez, M. (2006) Fortalezas y debilidades de la acuicultura en México. Pesca, Acuicultura e Investigación en México. CEDRSSA, 67-86.
- Awad, E., & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 40–54. doi:10.1016/j.fsi.2017.05.034.
- Ayala-Zavala, J.F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V. and González-Aguilar, G.A. (2010) Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own by products: Looking for integral exploitation. *Journal of Food Science*. 75(8), 175–181.
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., & Patil, R. T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44(1), 391-396.
- Barreno-Coba, J. (2015). Crecimiento de robalo (*Centropomus viridis*) en jaulas a diferentes densidades de siembra alimentados con dieta artificial y alimento vivo mediante tres tratamientos en la camaronera CAMCOMARCA S.A. comuna Palmar. [Tesis de Licenciatura] Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Ecuador.
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493–3503. doi:10.1007/s11947-014-1349-z.
- Bannister J. V., Bannister W. H., Rotilio G. (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry* 22:111–180.
- Barrales, F. M., Silveira, P., Barbosa, P. de P. M., Ruviano, A. R., Paulino, B. N., Pastore, G. M., Martínez, J. (2018). Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids - an application to orange peel. *Food and Bioprocess Technology*. doi:10.1016/j.fbp.2018.08.006
- Barrera-García, A. M. (2013) Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en el tiburón azul (*Prionace glauca*) de la costa occidental de Baja California Sur, México. (TESIS DE DOCTORADO). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B. C. S.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E., Hall, R., Bovy, A., Jie Luo, J., & Martin, C. (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature biotechnology*, 26(11): 1301-1308.
- Chang, Y-H., Seo, J., Song, E., Choi, H-J., Shim, E., Lee, O., & Hwang, J. (2016) Bioconverted Jeju Hallabong tangor (*Citrus kiyomi* × *ponkan*) peel extracts by cytolase enhance

antioxidant and anti-inflammatory capacity in RAW 264.7 cells. *Nutrition Research and Practice*, 10(2):131-138.

- Chavéz-Infante, H. (1961). Estudio de una nueva especie de robalo del Golfo de México y redescrición de *Centropomus undecimalis* (Bloch) (Pisces, Centropomidae) *Ciencia*. 21(2): 75-83.
- Chávez-Infante, L. A. (2016) Efecto del alga *Sargassum* spp. En la dieta sobre la respuesta immune y antioxidante de caprinos. (TESIS DE MAESTRIA) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S.
- Coelho-Ribas, J. L., Silva, C. A. da, Andrade, L. de, Galvan, G. L., Cestari, M. M., Trindade, E. S., Silva de Assis, H. C. (2014). Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 296–303. doi:10.1016/j.fsi.2014.07.009.
- Concha-Frías, B., González, C.A.A., Gaxiola, G., Chiappa, X., Sánchez-Zamora, A., Martínez-García, R., De la Cruz-Alvarado, F.J. (2018). Dietary protein requirement in common Snook (*Centropomus undecimalis*) juveniles reared in marine and brackish water. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 13, 45–54. <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1393>.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., & West, T.L. (2002) Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279: 1– 20.
- Costa-Pierce, B.A. & Rakocy, J.E. (2000). Tilapia Aquaculture in the Americas 2. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. Pp 264.
- Cho, S. H., & Lee, S.-M. (2012). Onion Powder in the Diet of the Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*: Effects on the Growth, Body Composition, and Lysozyme Activity. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(1), 30–38. doi:10.1111/j.1749-7345.2011.00489.x.
- Dani, C., Pasquali, M. A. B., Oliveira, M. R., Umezu, F. M., Salvador, M., Henriques, J. A. P., & Moreira, J. C. F. (2008). Protective Effects of Purple Grape Juice on Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Stress in Brains of Adult Wistar Rats. *Journal of Medicinal Food*, 11(1): 55-61.
- De Moraes Crizel, T., Hermes, V. S., de Oliveira Rios, A., & Flôres, S. H. (2016). Evaluation of bioactive compounds, chemical and technological properties of fruits byproducts powder. *Journal of Food Science and Technology*, 53(11), 4067–4075. doi:10.1007/s13197-016-2413-7.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 15: 316-28.
- Deng, G., shen, C., Xu, X., Kuang, R., Guo, Y., Zeng, L., Gao, L., Lin, X., Xie, J., Xia, E., Li, S., Wu, S., Chen, F., Ling, W., & Li, H. (2012) Potential of Fruit Wastes as Natural Resources of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 8308-8323, doi: 10.3390/ijms13078308.
- Di Meo, F., Valentino, A., Petillo, O., Peluso, G., Filosa, S., & Crispi, S. (2020). Bioactive Polyphenols and Neuromodulation: Molecular Mechanisms in Neurodegeneration.

International Journal of Molecular Sciences, 21(7): 1-21.

- Dolci, G. S., Dias, V. T., Roversi, K., Roversi, K., Pase, C. S., Segat, H. J., & Bürger, M. E. (2013). Moderate hypoxia is able to minimize the manganese-induced toxicity in tissues of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 103–109.
- Dotta, G., de Andrade, J. I. A., Tavares Gonçalves, E. L., Brum, A., Mattos, J. J., Maraschin, M., & Martins, M. L. (2014). Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(2), 280–284. doi:10.1016/j.fsi.2014.05.020.
- Eggler, A.L.; Savinov, S.N. (2013) Chemical and biological mechanisms of phytochemical activation of Nrf2 and importance in disease prevention. *Recent Advances in Phytochemistry*. 43, 121–155.
- Ekambaram, P., Narayanan, M., & Jayachandran, T. (2012) Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Status in Stressed Fish Brain. *International Journal of Science and Research*, 3(5): 164-170.
- Encarnação, P. (2016). Functional feed additives in aquaculture feeds. *Aquafeed Formulation*, 5: 217–237. doi:10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1.
- Esquivel, P; Jiménez, V. (2012) Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46: 488–495.
- FAO. 2018. El futuro de la alimentación y la agricultura: Vías alternativas hacia el 2050. Rome. <http://www.fao.org/global-perspectives-studies/food-agriculture-projections-to-2050/es/>.
- Farah, A.; Donangelo, C. (2006) Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18(1): 23-36.
- Ferreeres, F., Taveira, M., Pereira, D. M., Valentão, P., & B. Andrade, P. (2010). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Seeds: New Flavonols and Cytotoxic Effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2854–2861. doi:10.1021/jf904015f.
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E., & Niem, V.H. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. *Pacífico centro-oriental*. 2(1).
- Fonseca, L., Calderón, L., & Rivera, M. (2014) Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de santander (colombia). *Facultad de química farmacéutica*, 21(3): 228-236.
- Fraga CG, Cavanagh E, Carrasquedo F, Lotiti, Lucesoli F, Oteiza P. (1996) Antioxidants defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. *In: Physiology and biochemistry of fishes of the amazon*. Edited by AL Val, MF Almeida-Val and DJ Randall: 323-30.
- Franco, M. E., Sutherland, G. E., & Lavado, R. (2018). Xenobiotic metabolism in the fish hepatic cell lines Hepa-E1 and RTH-149, and the gill cell lines RTgill-W1 and G1B: Biomarkers of CYP450 activity and oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 206-207, 32–40. doi:10.1016/j.cbpc.2018.02.006.
- Freshney, R. I. (2010) Culture of animal cells. A manual of basics technique and specialized applications. New Jersey, United States of America. Wiley-Blackwell.

- Frenkel, N., Sudji, I.R., Wink, M., Tanaka, M. (2014) Mechanistic Investigation of Interactions between the Steroidal Saponin Digitonin and Cell Membrane Models. *Journal of Physical Chemistry B*, 118: 14632–14639.
- Gimeno-Creus, E. (2004) Compuestos fenólicos; Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*, 23(6): 80-84.
- Giri, S. S., Jun, J. W., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2016). Dietary Administration of Banana (*Musa acuminata*) Peel Flour Affects the Growth, Antioxidant Status, Cytokine Responses, and Disease Susceptibility of Rohu, *Labeo rohita*. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1-11.
- Geven, E. J. W., & Klaren, P. H. M. (2017). The teleost head kidney: Integrating thyroid and immune signalling. *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 73–83. doi:10.1016/j.dci.2016.06.025.
- Gharbi, S., Renda, G., La Barbera, L., Amri, M., Messina, C. M., & Santulli, A. (2016). Tunisian tomato by-products, as a potential source of natural bioactive compounds. *Natural Product Research*, 31(6), 626–631.
- Ghosh, S., Chatterjee, J.K., Hazra, A.K., & Chakraborty, B. (2018). Total phenolic, flavonoid, β -carotene and in-vitro anti-oxidant activity of vegetable wastes collected from hotels and food processing centre. *Food Science Research Journal*. 9(1): 169-174, DOI: 10.15740/HAS/FSRJ/9.1/169-174.
- González-Gómez, D., Cardoso, V., Bohoyo, D., Ayuso, M. C., & Delgado-Adamez, J. (2014). Application of experimental design and response surface methodology to optimize the procedure to obtain a bactericide and highly antioxidant aqueous extract from orange peels. *Food Control*, 35(1), 252–259.
- González-Sánchez, M.E.; Pérez-Fabiél, S.; Wong-Villarreal, A.; Bello-Mendoza, R.; Yañez-Ocampo, G. (2015). Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia. *Revista Argentina de Microbiología*. 47, 229–235, doi:10.1016/j.ram.2015.05.003
- Gullian-Klanian, M. & Arámburu-Adame. (2013) Performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings in a hyper-intensive recirculating aquaculture system with low water exchange. *Latin American Journal Aquatic Research*. 41(1): 150-162.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2001) *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Oxford, R. U. 936 pp.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., and Heo, M. S. (2011). Influence of diet enriched with green tea on innate humoral and cellular immune response of kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) to *Vibrio carchariae* infection. *Fish Shellfish Immunology*. 30(3): 972-979.
- Harikrishnan, R., Kim, J. S., Kim, M. C., Balasundaram, C., and Heo, M. S. (2012). Pomegranate enriched diet enhances the hematology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Philasterides dicentrarchi*. *Veterinary Parasitology*. 187(1): 147-156.
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Capillo, G., Paknejad, H., Khalili, M., Tabarraei, A., Faggio, C. (2018). Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defence related genes expression and growth performance of zebrafish (*Danio rerio*) fed on *Gracilaria gracilis*

powder. *Fish & Shellfish Immunology*. 83: 232-237. doi:10.1016/j.fsi.2018.09.046.

- Hoseinifar, S.H.; Shakouri, M.; Yousefi, S.; Van Doan, H.; Shafiei, S.; Yousefi, M.; Mazandarani, M.; Torfi Mozanzadeh, M.; Tulino, M.G.; Faggio, C. (2020) Humoral and skin mucosal immune parameters, intestinal immune related genes expression and antioxidant defense in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed olive (*Olea europea L.*) waste. *Fish & Shellfish Immunology* 100, 171–178.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y. (1997). "Un heterodímero Nrf2 / small Maf media la inducción de genes de enzimas desintoxicantes de fase II a través de elementos de respuesta antioxidante". *Comunicaciones de investigación bioquímica y biofísica*. 236 (2): 313-22. doi : 10.1006 / bbrc.1997.6943
- Jahazi, A., Hoseinifar, S.H., Jafari, V., Hajimoradloo, A., Van Doan, H., Paolucci, M. (2020) Dietary supplementation of polyphenols positively affects the innate immune response, oxidative status, and growth performance of common carp, *Cyprinus carpio L.* *Aquaculture*, 517, 1-8. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734709
- Janssens, J. B., Childress, J. J., Baguet, F., & Rees, J. F. (2000) Reduced enzymatic antioxidative defense in deep-sea fish. *The Journal of Experimental Biology*, 203, 3717–3725.
- Jung, S., Kim, M. H., Park, J. H., Jeong, Y., & Ko, K. S. (2017). Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coffee Extracts with Different Roasting Levels. *Journal of Medicinal Food*, 20(6), 1-10.
- Kim, K.M.; Ki, S.H. (2017) Chapter 28—Nrf2: A key regulator of redox signaling in liver diseases. In *Liver Pathophysiology*; Muriel, P., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA, pp. 355–374.
- Königsberg-Fainstein, M. (2007) Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*. 26(1): 18-25.
- Kumar, S., Raman, R. P., Pandey, P. K., Mohanty, S., Kumar, A., & Kumar, K. (2013). Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(2), 564–573. doi:10.1016/j.fsi.2012.11.038.
- Labastida, A., Núñez, A., & Oviedo, J. (2013) Aspectos biológicos del robalo hocicudo *Centropomus viridis*, en el sistema lagunar Chantuto-Panzacola, Chiapas, México. *Ciencia Pesquera*, 21(2), pp. 21-28.
- Lazo-Javalera, M. F. (2013) Crioconservación y su efecto sobre el genoma y el estrés oxidativo en vid (*vitis vinifera l.*) cv. Flame. (TESIS DE MAESTRÍA) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora.
- Leyva-López, N., Lizárraga-Velázquez, C. E., Hernández, C., & Sánchez-Gutiérrez, E. Y. (2020). Exploitation of Agro-Industrial Waste as Potential Source of Bioactive Compounds for Aquaculture. *Foods*, 9(7), 843. doi:10.3390/foods9070843
- Liu, B., Cui, Y., Brown, P. B., Ge, X., Xie, J., & Xu, P. (2015). Cytotoxic effects and apoptosis induction of enrofloxacin in hepatic cell line of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 47(2), 639–644. doi:10.1016/j.fsi.2015.10.007.
- Lizárraga-Velázquez, C.E.; Hernández, C.; González-Aguilar, G.A.; Heredia, J.B. (2019) Effect of dietary intake of phenolic compounds from mango peel extract on growth, lipid

- peroxidation and antioxidant enzyme activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Latin American Journal Aquatic Research*. 47, 602–611.
- Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M & Cho, M. (2018) Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. *Journal of Functional Foods*, 40: 307–316.
- Mancilla, M & Bustos, P. (2014) Desafíos para avanzar a un control efectivo de la Piscirickettsiosis. ¿Por qué podríamos llegar a estar optimistas a mediano plazo? *Salmon expert*, 4: 61-64.
- Manthey, J. A., Guthrie, N., & Grohmann, K. (2001). Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicine Chemistry*. 8: 135–153.
- Martínez, O.J., (2004). Manual de la Pesca Blanca, White Fish, HANDBOOK, 45 especies de interés comercial. ASO EXPEBLA (Asociación de Exportadores de Pesca Blanca del Ecuador). 2: 115–120.
- Martínez-Navarrete, N., Camacho-Vidala, M., & Martínez-Lahuerta, J. (2008) Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 2: 64-8.
- McCord J. M, y Fridovich I. (1969). Superoxide Dismutase, an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. 244: 6049-6055.
- Meletis, C. (2006) Coffee–Functional Food and Medicinal Herb. *Alternative & complementary therapies*, 7-13.
- Mejías, N., Orozco, E., & Galáan, N. (2016) Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2(6): 27-41.
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014) Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, 19: 16240-16265 doi: 10.3390/molecules191016240.
- Mullen, W., Nemzer, B., Stalmach, A., Ali, S., & Combet, E. (2013). Polyphenolic and Hydroxycinnamate Contents of Whole Coffee Fruits from China, India, and Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5298–5309. doi:10.1021/jf4003126.
- Mussatto, S., Machado, E., Martins, S., & Teixeira, J. (2011) Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technology*. 4: 661–672.
- Nasrin, T.A.A.; Matin, M.A. (2017). Valorization of vegetable wastes. En *Food Processing By-Products and Their Utilization*; Anal, A.K., Ed.; John Wiley & Sons Ltd: Hoboken, NJ, USA, pp. 53–88
- Nayak, S.B., Jena, B.S., & Patnaik, B.K. (1999) Effects of age and manganese (II) chloride on peroxidase activity of brain and liver of the teleost, *Channa punctatus*. *Experimental Gerontology*, 34: 365–374.
- Namdeo, A. (2007) Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 69-79.
- Nzekoue, F. K., Angeloni, S., Navarini, L., Angeloni, C., Freschi, M., Hrelia, S., & Caprioli, G. (2020). Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new

- HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Research International*, 133, 109128.
- Oboh, G., & Henle, T. (2009). Antioxidant and Inhibitory Effects of Aqueous Extracts of *Salvia officinalis* Leaves on Pro-Oxidant-Induced Lipid Peroxidation in Brain and Liver In Vitro. *Journal of Medicinal Food*, 12(1), 77–84.
- Oboh, G., & Ogunruku, O. O. (2010). Cyclophosphamide-induced oxidative stress in brain: Protective effect of hot short pepper (*Capsicum frutescens* L. var. abbreviatum). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(3), 227–233.
- Ochoa, D.M., & González, J.F. (2008) Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 55(2): 115-126
- Oehlers, L. P., Perez, A. N., & Walter, R. B. (2007). Detection of hypoxia-related proteins in medaka (*Oryzias latipes*) brain tissue by difference gel electrophoresis and de novo sequencing of 4-sulfophenyl isothiocyanate-derivatized peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(1), 120–133. doi:10.1016/j.cbpc.2006.06.005.
- Okino, C. H. & Fleuri L. F. (2014) Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. *Food Chemistry*, 163:103-107.
- Okino, C. & Fleuri, L. (2015) Orange and mango byproducts: agroindustrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description – A review. *Food Reviews International*. doi: 10.1080/87559129.2015.1041183.
- Padmapriya, R., Tharian, J. A., & Thirunalasundari, T. (2013) Coffee waste management-An overview. *Journal of Current Science*. 9: 83-91.
- Pan, J.H., Feng, L., Jiang, W.D., Wu, P., Kuang, S.Y., Tang, L., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., & Liu, Y. (2016) Vitamin E deficiency depressed fish growth, disease resistance, and the immunity and structural integrity of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Referring to NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling. *Fish and Shellfish Immunology*, doi: 10.1016/j.fsi.2016.11.044.
- Papoutsoglou, S. E. (2012). The role of the brain in farmed fish. *Reviews in Aquaculture*, 4(1), 1–10.
- Parhiz, H.; Roohbakhsh, A.; Soltani, F.; Rezaee, R.; Iranshahi, M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: An updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy Research*. 29, 323–331.
- Parrilla-Taylor, D. P. (2011) Actividad enzimática y estrés oxidativo en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) infectado con el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB). (TESIS DE MAESTRÍA). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S.
- Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A. (2017) Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid. Medicine Cellular Longevity*. 8416763.

- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137–150.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M. D., & Peña, J. B. (2003). Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65(4), 337–360. doi:10.1016/s0166.Peng, F., Tao, Q., Wu, X., Dou, H., Spencer, S., Mang, C., & Hao, X. (2012). Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. *Fitoterapia*, 83(3), 568-585.
- Pereira, A., & Maraschin, M. (2015) “Banana (*Musa* spp) from peel to pulp: ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health”. *Journal of Ethnopharmacology*, 160: 149–163.
- Petruk, G., Raiola, A., Del Giudice, R., Barone, A., Frusciante, L., Rigano, M. M., & Monti, D. M. (2016). An ascorbic acid-enriched tomato genotype to fight UVA-induced oxidative stress in normal human keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163, 284–289. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.08.047.
- Pohl, F., & Kong Thoo Lin, P. (2018). The Potential Use of Plant Natural Products and Plant Extracts with Antioxidant Properties for the Prevention/Treatment of Neurodegenerative Diseases: In Vitro, In Vivo and Clinical Trials. *Molecules*, 23(12): 1-30.
- Pujol, D., Liu, C., Gominho, J., Olivella, M., Fiol, N., Villaescusa, I., & Pereira, H. (2013) The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops and Products*, 50: 423–429.
- Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Latini A, Wajner M, Souza DO, Gonçalves C-A. (2013) Resveratrol Protects C6 Astrocyte Cell Line against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress through Heme Oxygenase 1. *PLoS ONE* 8(5): e64372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064372>
- Rattan, S., Parande, A. K., Nagaraju, V. D., & Ghiwari, G. K. (2015). A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(9), 6461–6472. doi:10.1007/s11356-015-4079-5.
- Ramos, C., & Palas, L. (2013) Crecimiento, supervivencia y porcentaje de linfocitos en *Centropomus* sp. (Robalo) alimentado con tres dietas. [Tesis de Ingeniería] Universidad Nacional de Tumbes, Perú.
- Ravindran, R.; Jaiswal, A. (2016) Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *TIBTEC*, 1313: 1-12.
- Repetto, M., Semprine, J., & Boveris, A. (2012) Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. Capítulo 1. Intech (Ed.) (pp 3-30) Argentina.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.05.048
- Rivas, L.R. (1986). Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*:

576-611.

- Rocha, R.; Schieber, A. (2010) Bioactive Compounds in Mango (*Mangifera indica* L.). *Actions of individual fruits in disease and cancer prevention and treatment*, Chapter 34: 507-523.
- Ruiz, M.F. (1993). Recursos pesqueros de las costas de México, su conservación y manejo socio-económico. 3° Edición. México, Limusa, 229-234.
- Sae-leaw, T., O'Callaghan, Y. C., Benjakul, S., & O'Brien, N. M. (2016). Antioxidant, immunomodulatory and antiproliferative effects of gelatin hydrolysates from seabass (*Lates calcarifer*) skins. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(7), 1545–1551. doi:10.1111/ijfs.13123.
- Safari, R., Hoseinifar, S. H., Nejadmoghadam, S., & Jafar, A. (2016). Transcriptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary *Ferula* (*Ferula assafoetida*). *Fish & Shellfish Immunology*, 55, 242–248. doi:10.1016/j.fsi.2016.05.038.
- Sanchez, D., Noe, C., Nevarez, G., & Contreras, J. (2013) Comparative extraction of pectic and polyphenols from Mexican lime pomace and bagasse. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 8(4): 309-322.
- Savatovic, S., Cetkovic, G., Canadanovic-Brunet, J., & Djilas, S. (2012). Kinetic behaviour of DPPH radical scavenging activity of tomato waste extracts. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(10)
- Singh, B., Bhat, T., & Singh, B. (2003) Potential Therapeutic Applications of Some Antinutritional Plant Secondary Metabolites. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 51: 5579-5597.
- Sobeh, M., Mahmoud, M., Petruk, G., Rezaq, S., Ashour, M., Youssef, F., El-Shazly, A., Monti, D., Abdel-Naim, A., & Wink, M. (2018) *Syzygium aqueum*: A Polyphenol- Rich Leaf Extract Exhibits Antioxidant, Hepatoprotective, Pain-Killing and Anti-inflammatory Activities in Animal Models. *Frontiers in Pharmacology*, 9(566): 1-14.
- Solé, M., Potrykus, J., Fernández-Díaz, C. & Blasco, J. 2004. Variations on stress defences and metallo-thionein levels in the Senegal sole, *Solea senegalensis*, during early larval stages. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(1): 57-66. doi: 10.1007/s10695-004-6786-6.
- Soler-Jiménez, L. C., Paredes-Trujillo, A. I., & Vidal-Martínez, V. M. (2016). Helminth parasites of finfish commercial aquaculture in Latin America. *Journal of Helminthology*. 91(02), 110–136. doi:10.1017/s0022149x16000833.
- Stratev, D., Zhelyazkov, G., Noundou, X. S., & Krause, R. W. M. (2017). Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. *Aquaculture International*, 26(1), 289–308. doi:10.1007/s10499-017-0219-x.
- Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., Supriatno, & Ooi, K. L. (2011). Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1): 1-10.
- Talpur, A. D. (2014). *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 420-421, 71–78.

doi:10.1016/j.aquaculture.2013.10.039.

- Tucker, J.W. 1987. "Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for commercial farming". *The progressive fish culturist*. 49(1), 49-57.
- Tucker Jr., & Yory Ed. (1991). Marine fish culture in the Caribbean region. *World Aquaculture*; 22; 10-27.
- TRUTE, M., GALLIS, B., DONEANU, C., SHAFFER, S., GOODLETT, D., & GALLAGHER, E. (2007). Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*, 81(2), 126–136.
- Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A., & Pifferi, G. (1994). A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology and Medicine*. 16(5), 547–553. doi:10.1016/0891-5849(94)90054-x.
- Valderrama-Díaz, J. A. (2014) Determinación de la actividad Catalasa (CAT) Y Superóxido dismutasa (SOD) en embriones de yamú (*Brycon amazonicus*) conservados a -14 °C. (TESIS DE PREGRADO) Universidad de la Salle. Bogotá.
- Van Hai, N. (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*, 446, 88–96. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.03.014.
- Van Wyk, B.; Wink, M. (2015) *Phytomedicines, Herbal drugs and Poisons*; Briza, Kew Publishing, Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- Van Wyk, B.; Wink, M. (2017). *Medicinal Plants of the World*, 2nd Edn. Portland: Timber Press Inc.
- Vaseeharan, B., & Thaya, R. (2013). Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*, 22(3), 1079–1091. doi:10.1007/s10499-013-9729-3.
- Vázquez-Medina, J. P. (2014) Actividad enzimática antioxidante en tejidos de foca anillada (*phoca hispida*) y de cerdo común (*sus scrofa*). (TESIS DE PREGRADO) Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B. C. S.
- Velez-Alavez, M. (2009) Indicadores de estrés oxidativo relacionados con la presencia de elementos traza (plomo, cadmio, mercurio y arsénico), en diferentes tejidos de tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*). (TESIS DE MAESTRÍA). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B. C. S.
- Vega, A., De León, J. A., & Reyes, S. M. (2017). Determinación del Contenido de Polifenoles Totales, Flavonoides y Actividad Antioxidante de 34 Cafés Comerciales de Panamá. *Información Tecnológica*, 28(4), 29–38.
- Venereo, G.J.R. (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres Y Antioxidantes. *Revista Cubana Medica Militar*. 31(2), 126-133.
- Vicente, I.S.T.; Fleuri, L.F.; Carvalho, P.L.P.F.; Guimarães, M.G.; Naliato, R.F.; Müller, H.d.C.; Sartori, M.M.P.; Pezzato, L.E.; Barros, M.M. (2019). Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress. *Aquaculture Research*. 50, 80–92.
- Wang, X. H., Wang, K. R., Nie, P., Chen, X. H., & Ao, J. Q. (2014). Establishment and

- characterization of a head kidney cell line from large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Fish Biology*, 84(5), 1551–1561. doi:10.1111/jfb.12386.
- Wink, M. (2007) Molecular modes of action of cytotoxic alkaloids—From DNA intercalation, spindle poisoning, topoisomerase inhibition to apoptosis and multiple drug resistance. *In The Alkaloids; Cordell, G., Ed.*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 64: 1–48.
- Wink, M. (2008) Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi Component Mixtures Used in Phytomedicine. *Current Drug Metabolism*, 9: 996-1009
- Wink, M. (2010) Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. Chapter 1; *Annual Plant Reviews*, 40: 1–19.
- Wink, M. (2012) Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. Review; *Molecules*, 17: 12771-12791.
- Wink, M. (2015) Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. Review; *Medicines*, 2: 251-286.
- Wink, M.; Schimmer, O. (1999) Modes of action of defensive secondary metabolites; Chapter 2. *Annual Plant Reviews*, 3: 18–137.
- Wink, M.; Van Wyk, B. (2010) Mind-Altering and Poisonous Plants of the World; *Timber Press*: Portland, OR, USA.
- Wolde, T., Bizuayehu, B., Hailemariam, T., & Tiruha, K. (2016) Phytochemical analysis and Antimicrobial activity of *HAGENIA ABYSSINICA*. *Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(3): 127-134.
- Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y., & Zeng, B. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT - Food Science and Technology*, 41(4), 597–603. doi:10.1016/j.lwt.2007.04.008
- Zaman K, Pardini R. (1996). An overview of the relationship between oxidative stress and mercury and arsenic. *Toxic Substance Mechanisms*. 15: 151-81.
- Zheng, W., Wang, F., Cao, X., Pan, H., Liu, X., Hu, X., & Sun, Y. (2014). Baicalin protects PC-12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide via anti-apoptotic effects. *Brain Injury*, 28(2), 227–234. doi:10.3109/02699052.2013.860469
- Zhou, J., Lin, Y., Ji, H., & Yu, H. (2016). The Effect of Green Tea Waste on Growth and Health of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(3): 679-689, doi:10.4194/1303-2712-v16_3_22
- Zhou, Y.; Jiang, Z.; Lu, H.; Xu, Z.; Tong, R.; Shi, J.; Jia, G. (2019) Recent advances of natural polyphenols activators for Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Chemistry Biodiversity*. 16, e1900400.

10. ANEXOS

10.1 Resultados del Análisis Estadístico para los Diferentes Ensayos Realizados en RStudio

R-FENOLES

```
> library(readxl)
> R_Fenoles <- read_excel("Análisis estadístico/R Fenoles.xlsx")
> View(R_Fenoles)
> library(readxl)
> R_Fenoles <- read_excel("Análisis estadístico/R Fenoles.xlsx")
> View(R_Fenoles)
> R_Fenoles
# A tibble: 12 x 2
  Muestra `Conc. final`
  <chr>      <dbl>
1 Café      905.
2 Café      945.
3 Café      829.
4 Tomate    403.
5 Tomate    348.
6 Tomate    327.
7 Naranja   549.
8 Naranja   678.
9 Naranja   784.
10 Platano  460.
11 Platano  482.
12 Platano  486.
> attach(R_Fenoles)
> names(R_Fenoles)
[1] "Muestra" "Conc. final"
> class(Muestra)
[1] "character"
> class(`Conc. final`)
[1] "numeric"
> factor(Muestra)
[1] Café Café Café Tomate Tomate Tomate Naranja Naranja Naranja
[10] Platano Platano Platano
Levels: Café Naranja Platano Tomate
> summary(R_Fenoles)
  Muestra      Conc. final
Length:12      Min.   :326.6
Class :character 1st Qu.:445.9
```

```

Mode :character Median :517.9
Mean :599.7
3rd Qu.:795.3
Max. :945.0

```

```

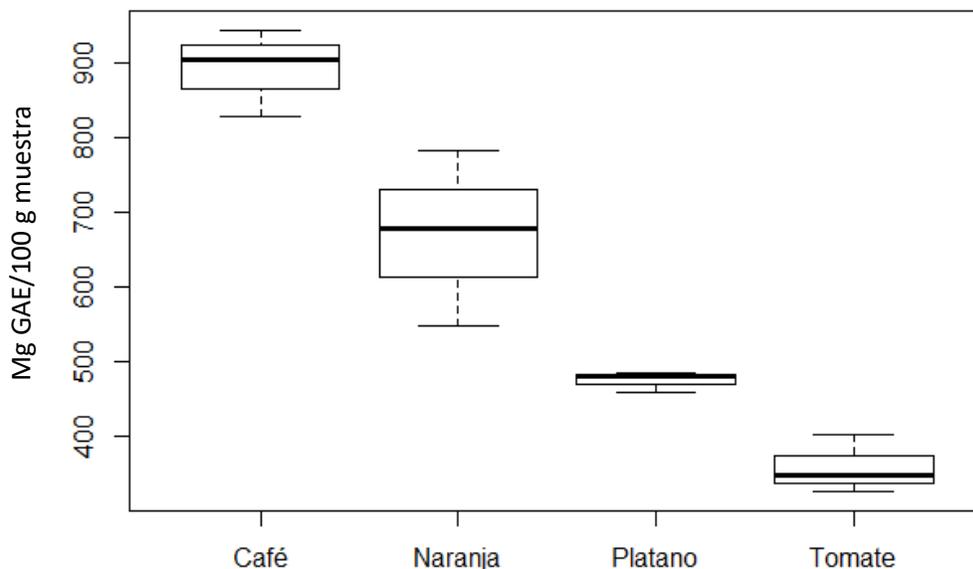
> library(rapportools)
> boxplot(`Conc. final`~Muestra)

```

```

> aov(`Conc. final`~Muestra)

```



```

Call:
aov(formula = `Conc. final` ~ Muestra)

```

Terms:

```

Muestra Residuals
Sum of Squares 491992.1 38085.5
Deg. of Freedom 3 8

```

```

Residual standard error: 68.99775
Estimated effects may be unbalanced
> anova1 = aov(`Conc. final`~Muestra)
> summary(anova1)

```

```

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Muestra 3 491992 163997 34.45 6.37e-05 ***
Residuals 8 38086 4761

```

```

---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

> TukeyHSD(anova1)
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

```

```

Fit: aov(formula = `Conc. final` ~ Muestra)

```

Muestra`	diff	lwr	upr	p adj
Naranja-Café	-221.9895	-402.3985	-41.58040	0.0180419
Platano-Café	-416.4134	-596.8225	-236.00438	0.0003520
Tomate-Café	-533.5722	-713.9813	-353.16318	0.0000591
Platano-Naranja	-194.4240	-374.8330	-14.01492	0.0352924
Tomate-Naranja	-311.5828	-491.9918	-131.17372	0.0024647
Tomate-Platano	-117.1588	-297.5679	63.25026	0.2380007

R-FRAP %

```

> library(readxl)
> R_FRAP_ <- read_excel("Análisis estadístico/R FRAP %.xlsx")
> View(R_FRAP_)
> R_FRAP_
# A tibble: 12 x 2
  Muestra `grado de inhibición`
  <chr>      <dbl>
1 Café      76.9
2 Café      76.7
3 Café      77.4
4 Tomate    33.3
5 Tomate    32.3
6 Tomate    32.8
7 Naranja   58.1
8 Naranja   60.
9 Naranja   60.4
10 Platano  57.1
11 Platano  56.7
12 Platano  57.7
> attach(R_FRAP_)

> names(R_FRAP_)
[1] "Muestra"      "grado de inhibición"
> class(Muestra)
[1] "character"
> class(`grado de inhibición`)
[1] "numeric"
> factor(Muestra)
[1] Café  Café  Café  Tomate Tomate Tomate Naranja Naranja Naranja
[10] Platano Platano Platano
Levels: Café Naranja Platano Tomate
> summary(R_FRAP_)
  Muestra      grado de inhibición
Length:12      Min. :32.31
Class :character 1st Qu.:50.82

```

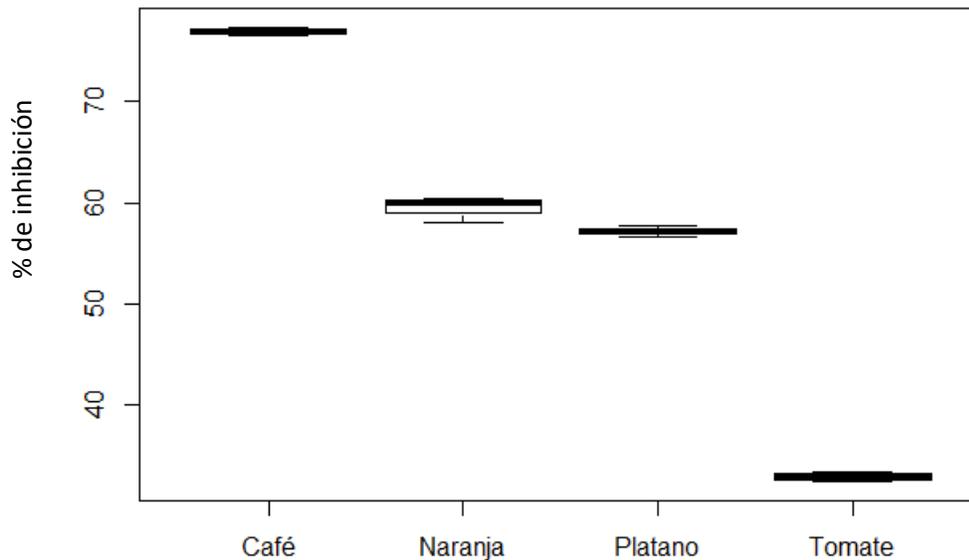
Mode :character Median :57.89

Mean :56.61

3rd Qu.:64.43

Max. :77.44

> boxplot(`grado de inhibición`~Muestra)



> aov(`grado de inhibición`~Muestra)

Call:

aov(formula = `grado de inhibición` ~ Muestra)

Terms:

Muestra Residuals

Sum of Squares 2970.3894 4.3548

Deg. of Freedom 3 8

Residual standard error: 0.737799

Estimated effects may be unbalanced

> anova1 = aov(`grado de inhibición`~Muestra)

> summary(anova1)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	3	2970.4	990.1	1819	1.13e-11 ***
Residuals	8	4.4	0.5		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> TukeyHSD(anova1)

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = `grado de inhibición` ~ Muestra)

```

$`Muestra`
              diff      lwr      upr      p adj
Naranja-Café -17.513670 -19.442800 -15.5845404 0.0000000
Platano-Café  -19.860295 -21.789425 -17.9311649 0.0000000
Tomate-Café   -44.177052 -46.106182 -42.2479221 0.0000000
Platano-Naranja -2.346625 -4.275755 -0.4174946 0.0191726
Tomate-Naranja -26.663382 -28.592512 -24.7342518 0.0000000
Tomate-Platano -24.316757 -26.245887 -22.3876272 0.0000000

```

R_DPPH %

```

> library(readxl)
> R_DPPH_ <- read_excel("Análisis estadístico/R DPPH %.xlsx")
> View(R_DPPH_)
> R_DPPH_ <- read_excel("Análisis estadístico/R DPPH %.xlsx")
> View(R_DPPH_)
> R_DPPH_
# A tibble: 12 x 2
  Muestra `Grado de inhibición`
  <chr>      <dbl>
1 Café      21.0
2 Café      20.5
3 Café      22.3
4 Tomate     1.28
5 Tomate     0.639
6 Tomate     0.767
7 Naranja    9.46
8 Naranja    9.59
9 Naranja    9.08
10 Platano   14.6
11 Platano   14.6
12 Platano   16.1
> attach(R_DPPH_)

> names(R_DPPH_)
[1] "Muestra"      "Grado de inhibición"
> class(Muestra)
[1] "character"
> class(`Grado de inhibición`)
[1] "numeric"
> factor(Muestra)
[1] Café  Café  Café  Tomate Tomate Tomate Naranja Naranja Naranja
[10] Platano Platano Platano
Levels: Café Naranja Platano Tomate
> summary(R_DPPH_)
  Muestra      Grado de inhibición
Length:12      Min.   : 0.6394

```

```

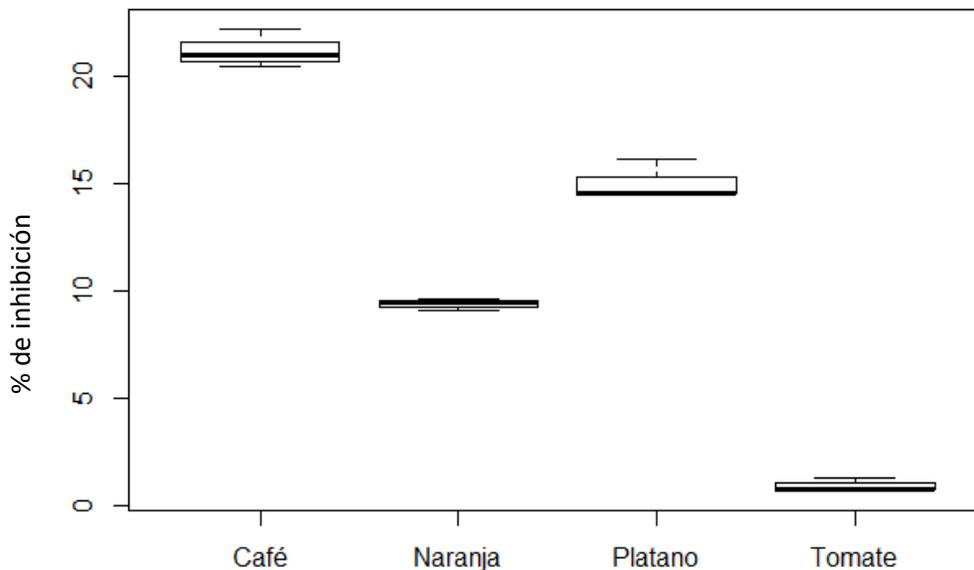
Class :character 1st Qu.: 7.1292
Mode :character Median :12.0844
Mean :11.6475
3rd Qu.:17.1995
Max. :22.2506

```

```

> library(rapportools)
> boxplot(`Grado de inhibición`~Muestra)

```



```

> aov(`Grado de inhibición`~Muestra)
Call:
aov(formula = `Grado de inhibición` ~ Muestra)

```

Terms:

```

Muestra Residuals
Sum of Squares 673.1747 3.6412
Deg. of Freedom 3 8

```

Residual standard error: 0.6746459

Estimated effects may be unbalanced

```

> anova1 = aov(`Grado de inhibición`~Muestra)
> summary(anova1)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	3	673.2	224.39	493	2.06e-09 ***
Residuals	8	3.6	0.46		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

> TukeyHSD(anova1)

```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = `Grado de inhibición` ~ Muestra)

\$`Muestra`

	diff	lwr	upr	p adj
Naranja-Café	-11.849957	-13.613960	-10.085954	1.00e-07
Platano-Café	-6.138107	-7.902110	-4.374105	1.76e-05
Tomate-Café	-20.332481	-22.096484	-18.568478	0.00e+00
Platano-Naranja	5.711850	3.947847	7.475853	3.02e-05
Tomate-Naranja	-8.482523	-10.246526	-6.718521	1.50e-06
Tomate-Platano	-14.194373	-15.958376	-12.430370	0.00e+00

R-PEROXIDACIÓN L

```
> library(readxl)
```

```
> R_PEROXIDACION_L <- read_excel("Análisis estadístico/R PEROXIDACION L.xlsx")
```

```
> View(R_PEROXIDACION_L)
```

```
> library(readxl)
```

```
> R_PEROXIDACION_L <- read_excel("Análisis estadístico/R PEROXIDACION L.xlsx")
```

```
> View(R_PEROXIDACION_L)
```

```
> R_PEROXIDACION_L
```

```
# A tibble: 18 x 2
```

```
  Tratamiento `Conc. final`
```

```
  <chr>         <dbl>
```

```
1 C-           27.6
```

```
2 C-           32.8
```

```
3 C-           22.4
```

```
4 C+           75.5
```

```
5 C+           73.4
```

```
6 C+           71.3
```

```
7 AG+          57.4
```

```
8 AG+          75.9
```

```
9 AG+          66.7
```

```
10 115+        77.2
```

```
11 115+        65.4
```

```
12 115+        85.7
```

```
13 230+        59.3
```

```
14 230+        51.0
```

```
15 230+        42.8
```

```
16 460+        23.0
```

```
17 460+        33.0
```

```
18 460+        28.0
```

```
> attach(R_PEROXIDACION_L)
```

```
> names(R_PEROXIDACION_L)
```

```
[1] "Tratamiento" "Conc. final"
```

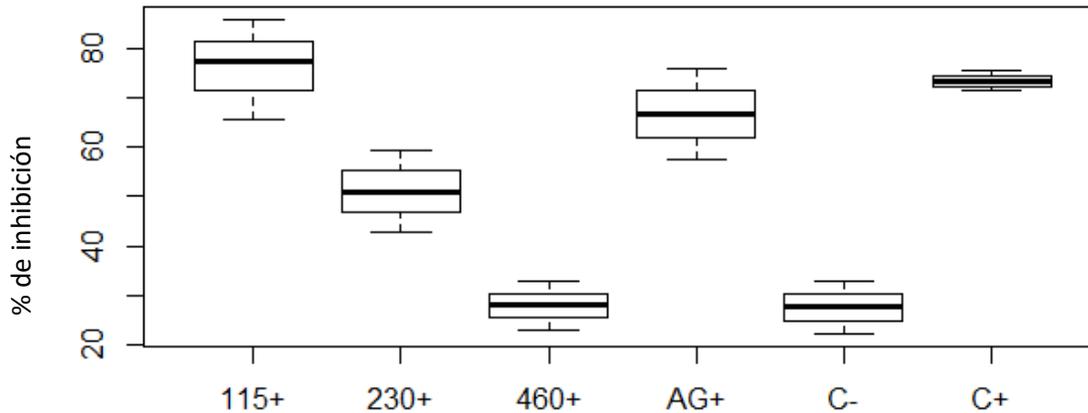
```
> class(Tratamiento)
```

```
[1] "character"
```

```

> class(`Conc. final`)
[1] "numeric"
> factor(Tratamiento)
[1] C- C- C- C+ C+ C+ AG+ AG+ AG+ 115+ 115+ 115+ 230+ 230+ 230+
[16] 460+ 460+ 460+
Levels: 115+ 230+ 460+ AG+ C- C+
> summary(R_PEROXIDACION_L)
Tratamiento    Conc. final
Length:18      Min.   :22.37
Class :character 1st Qu.:32.86
Mode  :character Median :58.33
                Mean  :53.79
                3rd Qu.:72.86
                Max.  :85.69
> library(rapportools)
> boxplot(`Conc. final`~Tratamiento)

```



> a
ov(`

```

Conc. final`~Tratamiento)
Call:
  aov(formula = `Conc. final` ~ Tratamiento)

```

```

Terms:
      Tratamiento Residuals
Sum of Squares  7217.727  627.626
Deg. of Freedom    5      12

```

```

Residual standard error: 7.232026
Estimated effects may be unbalanced
> anova1 = aov(`Conc. final`~Tratamiento)
> summary(anova1)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tratamiento  5  7218  1443.5   27.6 3.46e-06 ***
Residuals  12   628    52.3
---

```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> TukeyHSD(anova1)

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = `Conc. final` ~ Tratamiento)

\$`Tratamiento`

	diff	lwr	upr	p adj
230+-115+	-25.0669917	-44.901166	-5.232817	0.0112258
460+-115+	-48.1032459	-67.937420	-28.269072	0.0000360
AG+-115+	-9.4407048	-29.274879	10.393470	0.6141376
C--115+	-48.4990398	-68.333214	-28.664865	0.0000331
C+-115+	-2.7192891	-22.553463	17.114885	0.9967336
460+-230+	-23.0362542	-42.870429	-3.202080	0.0200344
AG+-230+	15.6262870	-4.207887	35.460461	0.1589111
C--230+	-23.4320480	-43.266222	-3.597874	0.0178900
C+-230+	22.3477027	2.513528	42.181877	0.0243993
AG+-460+	38.6625412	18.828367	58.496716	0.0003056
C--460+	-0.3957938	-20.229968	19.438381	0.9999997
C+-460+	45.3839569	25.549783	65.218131	0.0000647
C--AG+	-39.0583350	-58.892509	-19.224161	0.0002777
C+-AG+	6.7214157	-13.112759	26.555590	0.8563860
C+-C-	45.7797507	25.945576	65.613925	0.0000593

R-SOD

> library(readxl)

> R_SOD <- read_excel("Análisis estadístico/R SOD.xlsx")

> View(R_SOD)

> R_SOD

A tibble: 18 x 2

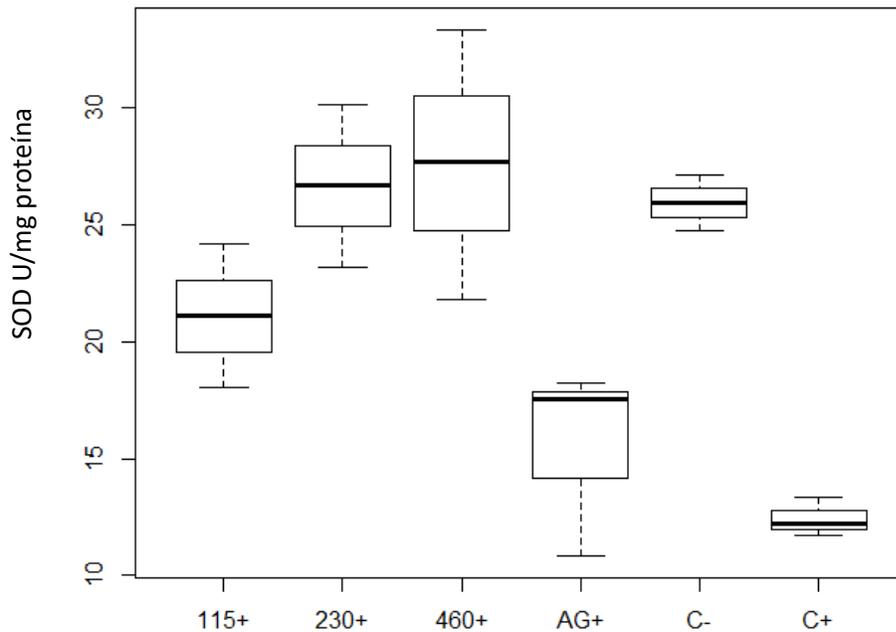
Tratamiento Conc.

<chr>	<dbl>
1 C-	25.9
2 C-	27.1
3 C-	24.7
4 C+	12.2
5 C+	11.7
6 C+	13.3
7 AG+	10.8
8 AG+	17.5
9 AG+	18.2
10 115+	21.1
11 115+	24.2
12 115+	18.0
13 230+	26.7
14 230+	23.2

```

15 230+      30.1
16 460+      21.8
17 460+      27.7
18 460+      33.4
> attach(R_SOD)
> names(R_SOD)
[1] "Tratamiento" "Conc."
> class(Tratamiento)
[1] "character"
> class(Conc.)
[1] "numeric"
> factor(Tratamiento)
 [1] C-  C-  C-  C+  C+  C+  AG+ AG+ AG+ 115+ 115+ 115+ 230+ 230+ 230+
[16] 460+ 460+ 460+
Levels: 115+ 230+ 460+ AG+ C- C+
> summary(R_SOD)
Tratamiento      Conc.
Length:18      Min.   :10.83
Class :character 1st Qu.:17.65
Mode  :character Median :22.50
          Mean  :21.54
          3rd Qu.:26.48
          Max.  :33.35
> library(rapportools)
> boxplot(Conc.~Tratamiento)

```



```

> anova1 = aov(Conc
.~Tratamiento)
> summary(anova1)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	5	605.2	121.04	9.865	0.000625 ***

Residuals 12 147.2 12.27

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> TukeyHSD(anova1)

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Conc. ~ Tratamiento)

\$`Tratamiento`

	diff	lwr	upr	p adj
230+-115+	5.5532790	-4.0532986	15.1598565	0.4247137
460+-115+	6.5016457	-3.1049319	16.1082232	0.2755352
AG+-115+	-5.5792972	-15.1858748	4.0272803	0.4200782
C--115+	4.8279011	-4.7786765	14.4344786	0.5629461
C+-115+	-8.6795280	-18.2861055	0.9270495	0.0855566
460+-230+	0.9483667	-8.6582108	10.5549442	0.9993166
AG+-230+	-11.1325762	-20.7391537	-1.5259987	0.0203315
C--230+	-0.7253779	-10.3319554	8.8811996	0.9998147
C+-230+	-14.2328070	-23.8393845	-4.6262294	0.0033604
AG+-460+	-12.0809429	-21.6875204	-2.4743654	0.0116287
C--460+	-1.6737446	-11.2803221	7.9328329	0.9901766
C+-460+	-15.1811737	-24.7877512	-5.5745961	0.0019779
C--AG+	10.4071983	0.8006208	20.0137758	0.0312136
C+-AG+	-3.1002308	-12.7068083	6.5063468	0.8786685
C+-C-	-13.5074291	-23.1140066	-3.9008516	0.0050791

R-CAT

> library(readxl)

> R_CAT <- read_excel("Análisis estadístico/R CAT.xlsx")

> View(R_CAT)

> R_CAT

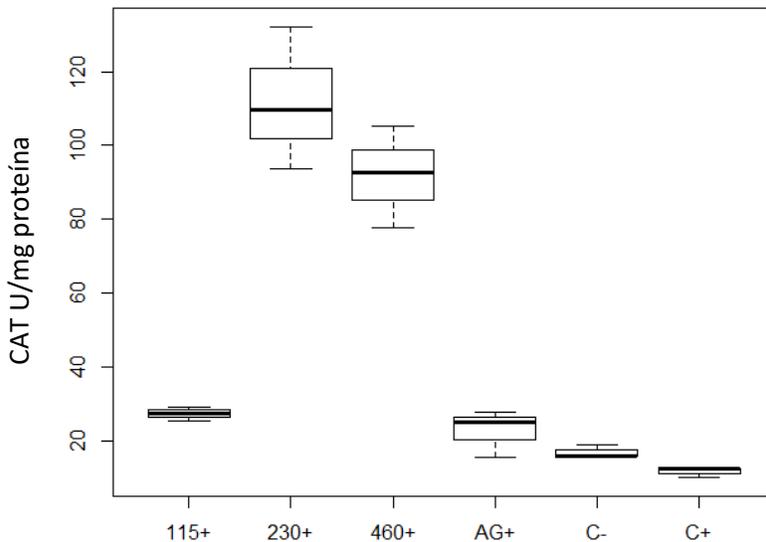
A tibble: 18 x 2

Tratamiento	Conc.
<chr>	<dbl>
1 C-	15.8
2 C-	19.0
3 C-	16.0
4 C+	12.8
5 C+	10.0
6 C+	12.4
7 AG+	15.7
8 AG+	27.8
9 AG+	25.1
10 115+	29.3
11 115+	25.4
12 115+	27.3

```

13 230+    93.7
14 230+    132.
15 230+    110.
16 460+    92.7
17 460+    77.9
18 460+    105.
> attach(R_CAT)
> names(R_CAT)
[1] "Tratamiento" "Conc."
> class(Tratamiento)
[1] "character"
> class(Conc.)
[1] "numeric"
> factor(Tratamiento)
[1] C- C- C- C+ C+ C+ AG+ AG+ AG+ 115+ 115+ 115+ 230+ 230+ 230+
[16] 460+ 460+ 460+
Levels: 115+ 230+ 460+ AG+ C- C+
> summary(R_CAT)
Tratamiento      Conc.
Length:18      Min.   : 10.05
Class :character 1st Qu.: 15.82
Mode  :character Median : 26.36
              Mean  : 47.11
              3rd Qu.: 89.00
              Max.  :132.22
> library(rapportools)
> boxplot(Conc.~Tratamiento)

```



```

> aov(Conc.~Tratamiento)
Call:
aov(formula = Conc. ~ Tratamiento)

```

Terms:

```
      Tratamiento Residuals
Sum of Squares 28055.423 1219.889
Deg. of Freedom      5      12
```

Residual standard error: 10.08253

Estimated effects may be unbalanced

```
> anova1 = aov(Conc.~Tratamiento)
```

```
> summary(anova1)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tratamiento 5 28055  5611  55.2 7.27e-08 ***
Residuals 12 1220   102
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> TukeyHSD(anova1)
```

```
  Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level
```

```
Fit: aov(formula = Conc. ~ Tratamiento)
```

```
$`Tratamiento`
```

```
      diff      lwr      upr      p adj
230+-115+ 84.593719 56.94190 112.245541 0.0000031
460+-115+ 64.595976 36.94415 92.247798 0.0000526
AG+-115+ -4.470508 -32.12233 23.181314 0.9929999
C--115+ -10.426235 -38.07806 17.225587 0.7968414
C+-115+ -15.586166 -43.23799 12.065656 0.4498257
460+-230+ -19.997744 -47.64957 7.654078 0.2204109
AG+-230+ -89.064227 -116.71605 -61.412405 0.0000018
C--230+ -95.019954 -122.67178 -67.368132 0.0000009
C+-230+ -100.179885 -127.83171 -72.528063 0.0000005
AG+-460+ -69.066484 -96.71831 -41.414662 0.0000266
C--460+ -75.022210 -102.67403 -47.370388 0.0000113
C+-460+ -80.182142 -107.83396 -52.530320 0.0000056
C--AG+ -5.955727 -33.60755 21.696096 0.9751182
C+-AG+ -11.115658 -38.76748 16.536164 0.7536295
C+-C- -5.159931 -32.81175 22.491891 0.9866574
```