

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE PESQUERÍA



**“EFECTO DEL HIDROLIZADO DE SUBPRODUCTOS DEL
LANGOSTINO (*Litopenaeus vannamei*) SOBRE EL ESTRÉS DE
JUVENILES DE TILAPIA DE NILO (*Oreochromis niloticus*)”**

TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO PESQUERO

ROXANA PILLACA LLAMOCCA

LIMA –PERÚ











2023

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente
investigación (ART. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

Document Information

Analyzed document	Tesis Roxana Pillaca 23-05-23.pdf.docx (D168662103)
Submitted	5/26/2023 9:42:00 PM
Submitted by	jessie marina vargas cárdenas
Submitter email	jesvargas@lamolina.edu.pe
Similarity	9%
Analysis address	jesvargas.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	1A_Chate_Benites_Zarela_Jemina_Titulo_Profesional_2023-1.docx Document 1A_Chate_Benites_Zarela_Jemina_Titulo_Profesional_2023-1.docx (D156474846)	 2
SA	Libro Morfofisiología Peces y Camarones mtv.doc Document Libro Morfofisiología Peces y Camarones mtv.doc (D154403836)	 4
SA	TESIS VISTIN ADRIAN LISTA.docx Document TESIS VISTIN ADRIAN LISTA.docx (D113722406)	 3
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / INFORME CORREGIDO -Alejandra Miranda Yancce.docx Document INFORME CORREGIDO -Alejandra Miranda Yancce.docx (D142718867) Submitted by: evegalarza@lamolina.edu.pe Receiver: evegalarza.unalm@analysis.arkund.com	 2
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS MAESTRIA JULIO OROSCO FINAL FIRMADO (1).docx Document TESIS MAESTRIA JULIO OROSCO FINAL FIRMADO (1).docx (D154086790) Submitted by: vjvergara@lamolina.edu.pe Receiver: victor.jesus.vergara.rubin.unalm@analysis.arkund.com	 1
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / Tesis Pregrado - Carla Fabiola Espinoza Ortiz FINAL PARA SUSTENTACIÓN (1).docx Document Tesis Pregrado - Carla Fabiola Espinoza Ortiz FINAL PARA SUSTENTACIÓN (1).docx (D143023668) Submitted by: jugofe@lamolina.edu.pe Receiver: jugofe.unalm@analysis.arkund.com	 6
SA	TESIS FINAL ABEL_18.10.21.pdf Document TESIS FINAL ABEL_18.10.21.pdf (D115991754)	 1
W	URL: https://www.hindawi.com/journals/ijz/2020/9395268/ Fetched: 12/2/2021 7:27:04 AM	 4
W	URL: https://www.nature.com/articles/s41598-021-90505-y Fetched: 8/19/2021 4:14:04 PM	 1
SA	TESIS VISTIN ADRIAN.docx Document TESIS VISTIN ADRIAN.docx (D113177785)	 1

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE PESQUERÍA

**“EFECTO DEL HIDROLIZADO DE SUBPRODUCTOS DEL
LANGOSTINO (*Litopenaeus vannamei*) SOBRE EL ESTRÉS DE
JUVENILES DE TILAPIA DE NILO (*Oreochromis niloticus*)”**

Presentado por:

Roxana Pillaca Llamocca

Tesis para optar el título de:

INGENIERO PESQUERO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dr Julio Gregorio Gonzales Fernández
Presidente

M. Sc. David Julián Roldán
Acero
Miembro

M. Sc. Elsa Victoria Vega
Galarza
Miembro

Dra. Jessie M. Vargas
Cárdenas
Asesora

Dra. Verónica A. Sierralta
Chichizola
Co-Asesora

Lima, 2023

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN LITERARIA	3
2.1.	Tilapia de Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	3
2.2.	Estrés.....	6
2.2.1.	Nivel de respuestas de los peces frente al estrés.....	7
2.2.2.	Densidad de carga como factor de estrés en peces	9
2.3.	Parámetros de evaluación del estrés	9
2.3.1.	Evaluación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de la hormona Cortisol	9
2.3.2.	Parámetros hematológicos	11
2.4.	Hidrolizado de subproductos de langostino	11
2.4.1.	La Astaxantina como aditivo funcional.....	13
2.4.2.	Usos de hidrolizado de camarón en acuicultura	14
III.	METODOLOGÍA.....	15
3.1.	Lugar experimental y duración	15
3.2.	Etapa pre-experimental.....	15
3.2.1.	Maduración del Sistema de Recirculación (RAS)	15
3.2.2.	Obtención de las unidades biológicas e implementación de unidades experimentales	16
3.2.3.	Caracterización del hidrolizado de subproductos de langostino	16
3.2.4.	Elaboración de las dietas experimentales.....	18
3.3.	Manejo Experimental	20
3.3.1.	Calidad y monitoreo de la calidad de agua del sistema RAS	20
3.3.2.	Evaluación de la inclusión de hidrolizado de subproductos de langostino (<i>Litopenaeus vannamei</i>) sobre el estrés de juveniles de tilapia de Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).	23

a.	Evaluación de parámetros zootécnicos	23
b.	Evaluación de la condición fisiológica.....	24
c.	Evaluación de la actividad antioxidante del hidrolizado mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD).....	25
3.3.3.	Diseño experimental	26
3.3.4.	Análisis estadístico	26
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
4.1.	Calidad y monitoreo de la calidad de agua del sistema RAS.....	27
4.2.	Evaluación de los parámetros zootécnicos.....	28
4.3.	Evaluación de la condición fisiológica.....	31
a)	Evaluación de los niveles de cortisol en suero	31
b)	Determinación de parámetros hematológicos	34
4.4.	Evaluación de la actividad antioxidante del hidrolizado (HSL) mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD)	36
V.	CONCLUSIONES	39
V.	RECOMENDACIONES	40
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
VII.	ANEXOS.....	54

INDICE TABLAS

Tabla 1: Fases del cultivo de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	4
Tabla 2: Densidades trabajadas con juveniles de tilapia en sistemas intensivos	5
Tabla 3:Requerimientos nutricionales para juveniles de tilapia de Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	5
Tabla 4: Parámetros fisicoquímicos del agua recomendados para el cultivo de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	6
Tabla 5: Condiciones de autólisis para obtener el máximo grado de hidrólisis de subproducto de langostino (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	12
Tabla 6:Valores de astaxantina para diferentes subproductos de langostino (<i>Litopenaeus. vannamei</i>)	13
Tabla 7: Análisis proximal de Hidrolizado de Subproductos de Langostino (<i>Litopenaeus vannamei</i>) (HSL).	17
Tabla 8: Aminograma del Hidrolizado de Subproductos de Langostino (<i>Litopenaeus vannamei</i>) (HSL) y Harina de Pescado (HP).....	17
Tabla 9: Fórmula de la dieta control (TC) y dieta prueba (T-HSL) para juveniles de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	19
Tabla 10: Parámetros de calidad de agua en el RAS - métodos y periodicidad	21
Tabla 11: Parámetros de calidad de agua del RAS para juveniles de tilapia de Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) cultivadas en alta densidad.....	27
Tabla 12: Parámetros productivos de los juveniles de tilapia de Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados con dietas experimentales y cultivadas en alta densidad	29
Tabla 13: Parámetros hematológicos e índices hematimétricos de los juveniles de tilapia de Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados con dieta control y HSL en cultivo de alta densidad	34

INDICE FIGURAS

Figura 1: Tilapia de Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	3
Figura 2: Representación esquemática de la respuesta al estrés en peces	8
Figura 3: Conversión del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno.....	10
Figura 4: Flujograma de la obtención del hidrolizado de subproductos de langostino (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	18
Figura 5: Niveles de la hormona cortisol en el suero de juveniles de tilapia de Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados con las dietas experimentales.....	32
Figura 6: Actividad de la enzima SOD (μ/ml) en plasma de juveniles de tilapia de Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados con las dietas experimentales.....	36

INDICE DE ANEXOS

ANEXO I. Galería de fotos	54
ANEXO II. Análisis de varianza de los parámetros de calidad de agua	57
ANEXO III. Análisis de varianza de los parámetros productivos	59
ANEXO IV. Análisis de varianza - Niveles de cortisol.....	61
ANEXO V. Análisis de varianza de los parámetros hematológicos.....	61
ANEXO VI. Análisis de varianza – Actividad de la enzima SOD.....	62
ANEXO VII. Datos registrados de los parámetros de calidad de agua.....	62
ANEXO VIII. Parámetros productivos	63
ANEXO IX. Análisis proximal de las dietas experimentales.....	64
ANEXO X. Análisis proximal de los peces al inicio y final del experimento	64
ANEXO XI. Datos obtenidos para determinar el nivel de cortisol	65
ANEXO XII. Parámetros hematológicos e índices hematimétricos	65
ANEXO XIII. Datos para determinar la actividad de la enzima SOD.....	66

RESUMEN

El trabajo evaluó el efecto del consumo de un hidrolizado proveniente de subproductos del langostino sobre el estrés por densidad en juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*). Se evaluaron parámetros productivos, la condición fisiológica mediante los parámetros hematológicos y niveles de cortisol, y la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Se utilizaron 120 juveniles de tilapia (peso individual promedio 18,74 g \pm 0.11) distribuidos en 6 acuarios de 50 litros dentro de un sistema RAS (Recirculating Aquaculture System) con una carga inicial de 7.2 kg/m³. Se aplicaron dos tratamientos: TC, control con harina de pescado y T-HSL, con inclusión del hidrolizado de subproductos de langostino (HSL). El experimento tuvo una duración de 30 días. Los resultados de los parámetros productivos mostraron un menor rendimiento en el T-HSL comparado con TC a excepción de la sobrevivencia. Los resultados obtenidos en los niveles de cortisol presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, siendo menor en TC (5,40 ng/ml) en comparación con T-HSL (10,28 ng/ml). Los parámetros hematológicos no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$), siendo los valores de conteo de eritrocitos (1.7×10^6 ; 1.8×10^6 células/ μ l), hematocrito (27,89; 32,94%), hemoglobina (6,03; 6,88 g/dl), Volumen Corpuscular Medio (VCM) (190,86; 248,49 fl), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) (40,52; 46,17 pg) y Concentración de la Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) (22,04; 21,16 g/dl) para TC y T-HSL respectivamente. Finalmente, la actividad del SOD reportó diferencias significativas ($p < 0,05$), registrando un mayor valor en T-HSL (218,69 μ /ml) frente a TC (120,71 μ /ml). Podemos concluir que el HSL tiene un efecto positivo sobre el estrés por densidad en juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) reflejados en la disminución de la mortalidad y en el bienestar de los peces.

PALABRAS CLAVE: Hidrolizado de subproducto de langostino, tilapia, cortisol, SOD, parámetros hematológicos, estrés.

ABSTRACT

The increase of stocking densities in intensive culture is considered as one of the main factors that elevate stress levels in fish affecting their growth. The study was conducted to evaluate the intake effect of the inclusion of shrimp by-products hydrolyzed (HSL) as a replacement of fishmeal in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over density stress. Productive parameters, physiological condition through hematological parameters and serum cortisol, and superoxide dismutase (SOD) enzyme activity were evaluated. 120 tilapia juveniles $18.74 \text{ g} \pm 0.11$ were distributed in six aquaria (50-L) in a recirculation aquaculture system (RAS) with an initial density stocking of 7.2 kg/m^3 . Two treatments were applied: TC, with fishmeal inclusion and T-HSL, with 100% fishmeal replacement by HSL. The feeding trial was performing for 30 days. The results showed that T-HSL had lower performance ($P < 0.05$) regarding productive parameters compared to TC, however a lower survival rate was observed in this treatment. The serum cortisol in TC was lower ($P < 0.05$) than T-HSL, 5.40 and 10.28 ng/ml, respectively. No significant differences ($P > 0.05$) were observed in hematological parameters between treatments, being the values for erythrocyte count (1.7×10^6 ; 1.8×10^6 cells/ μl), haematocrit (27.89; 32.94%), haemoglobin (6.03; 6.88 g/dl), Mean Corpuscular Volume (MCV) (190.86; 248.49 fl), Mean Corpuscular Haemoglobin (MCH) (40.52; 46.17 pg) and Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (MCHC) (22.04; 21.16 g/dl) for TC and T-HSL respectively. Finally, SOD activity was significantly ($P < 0.05$) increased in T-HSL (218.69 $\mu\text{g/ml}$) than TC (120.71 $\mu\text{g/ml}$). In conclusion, HSL shows a positive effect on stress caused by high stocking density on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reflected in decreased mortality and fish welfare.

KEY WORDS: shrimp by-product, tilapia, cortisol, SOD, hematological parameters, stress.

I. INTRODUCCIÓN

La tilapia es una de las grandes especies producidas en la acuicultura mundial llegándose a registrar más de 4 407 miles de toneladas para el año 2020 (FAO, 2022b). Dentro de sus sistemas de cultivo, el cultivo intensivo de tilapia en sistemas de recirculación se viene realizando con cargas de siembra máximas entre 80-150 peces/m³ en los tanques de cría, alcanzando una producción de hasta 500 t/ha/año (Ramírez-Gastón *et al.*, 2018). En nuestro país el cultivo de tilapia se desarrolla en 11 departamentos, siendo la región de San Martín uno de los principales productores. En los últimos años la DIREPRO San Martín viene impulsando proyectos para la implementación de sistemas de cultivo intensivo, con lo cual se podría llegar a trabajar con una densidad de 15 – 25 kg/m³ en comparación con el sistema tradicional de 0.8-0.5 kg/m³, la acuicultura es una actividad en constante crecimiento.

Se conoce que el hacinamiento acarrea un incremento en los niveles de estrés, lo que conlleva al deterioro en el bienestar de los peces (Ochoa y González, 2008; Yarahmadi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019; Odhiambo *et al.*, 2020, Shourbela *et al.*, 2021). Debido al estrés se presenta una alteración en el flujo energético en los peces para restaurar la homeostasis, desencadenado por la activación de ejes endocrinos y la liberación de hormonas de estrés en la circulación que influyen en la reducción tanto de la ingesta como en la absorción intestinal; de este modo, la respuesta ante una situación de emergencia provoca un gasto metabólico elevado que obliga a la movilización de las fuentes de energía para preparar y proteger al animal ocasionando una reducción en el crecimiento (Martínez-Porchas *et al.*, 2009; Schreck *et al.*, 2016; Battisti *et al.*, 2020), a su vez se origina una mayor susceptibilidad en el pez al ataque de agentes patógenos (Dawood *et al.*, 2019) lo que finalmente se traducirá en altas mortalidades y pérdidas económicas para el cultivo. En nuestro país se tiene registrado a través del SANIPES la presencia del Virus de la Tilapia del Lago (TiLV) desde el 2017 en la región de Piura y desde el 2018 en San Martín, así como brotes de infecciones causados por *Aeromonas sp* y *Streptococcus sp*, los cuales en condiciones de estrés pueden ocasionar mortalidades del 80 – 90 % de la población.

Actualmente muchas investigaciones están enfocadas en la búsqueda de ingredientes que provean compuestos funcionales que ayuden a reforzar la respuesta inmune y la performance de peces bajo situaciones de estrés (Hevroy *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2017; Gisbert *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2019; Bae *et al.*, 2021 y Gunathilaka *et al.*, 2021). Una opción de interés son aquellos ingredientes que presentan una alta actividad antioxidante. Un claro ejemplo son los subproductos de la industria langostinera, los cuales siendo reprocessados a través de la hidrólisis son considerados como una fuente natural de carotenoides (Cretton, 2019). Dichos subproductos tienen como principal componente a la astaxantina, un agente inmunoestimulante con alta capacidad antioxidante, cuyo uso en la acuicultura ha originado buenos resultados con respecto al crecimiento, protección y reforzamiento del sistema inmune, así como en la tasa de sobrevivencia en el cultivo de una variedad de peces (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2017; Aracati *et al.*, 2021; Messina *et al.*, 2021).

En nuestro país el cultivo de tilapia se encuentra en crecimiento dirigiendo sus esfuerzos a la intensificación de los sistemas; por ello es de suma importancia contar con un producto que pueda ayudar a manejar el estrés y aumentar la eficiencia en la producción a través de una estrategia sostenible con el uso de subproductos provenientes de la carcinicultura, aprovechando sus compuestos bioactivos, los cuales pueden reforzar la respuesta de los peces ante las condiciones adversas y la presencia de patógenos.

Por lo expuesto, el objetivo general del presente trabajo es determinar el efecto de la inclusión del hidrolizado de subproductos de langostino (*Litopenaeus vannamei*) sobre el estrés por densidad en juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*), y como objetivos específicos: a) Evaluar la performance productiva de los juveniles de tilapia, b) Evaluar la condición fisiológica de los peces mediante el análisis de parámetros hematológicos y los niveles de cortisol y c) Determinar la actividad antioxidante del hidrolizado mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD).

II. REVISIÓN LITERARIA

2.1. Tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Figura 1

Tilapia de Nilo (Oreochromis niloticus).



Fuente: Ueberschaer (1999)

La tilapia de Nilo (Figura 1) es una especie considerada como una de las más importantes en el comercio mundial (FAO, 2020). Según FAO (2022b) señaló que en el 2020 la producción mundial de tilapia reportó un total de 4 407 miles de toneladas lo que representó aproximadamente el 9 % de la producción de peces provenientes de la acuicultura. En nuestro país, según reporta el PRODUCE (2022) la producción acuícola nacional de tilapia para el año 2021 fue de 3 462 t (2,3%) ocupando el cuarto lugar después de la trucha, concha de abanico y langostino. Los principales departamentos donde se cultiva son: Piura 1680.39 t, San Martín 1646.42 t, Cajamarca 95.49 t, Amazonas 25.97 t y Lambayeque 7.35 t.

La tilapia es una especie tropical omnívora que habita aguas someras cuya temperatura varía entre 20 y 35 °C, se alimenta de fitoplancton, pequeños invertebrados, fauna béntica, desechos y capas bacterianas asociadas al detritus (El-Sayed, 2006; FAO, 2022).

Para la producción comercial generalmente se requiere de poblaciones macho monosexo, debido a la ventaja en cuanto a la velocidad de crecimiento lo que genera una gran disparidad con las hembras en una población mixta. Debido a ello, es necesario la reversión en las crías suministrando una hormona masculina (17 α -metil testosterona MT) a través del alimento

en una concentración de 60 mg de MT/kg de alimento, alrededor de cuatro semanas hasta alcanzar un peso promedio 0.4g (FAO, 2022).

El cultivo de tilapia monosexo puede alcanzar pesos finales entre 400 y 500g en un periodo de 5 a 8 meses dependiendo de las condiciones ambientales. Las fases de cultivo se detallan en la siguiente Tabla.

Tabla 1

Fases del cultivo de tilapia (Oreochromis niloticus).

Etapa	Peso (g)	Densidad de siembra (peces/m²)	Proteína en el alimento (%)
Pre-cría	1 a 50	100 – 150	45
crecimiento	50 - 150	20 – 50	40
Engorde	150 hasta la cosecha	1 – 40	28 -32

Fuente: FONDEPES (2004)

Durante su cultivo la tilapia presenta una buena tolerancia a altas densidades (Tabla 2), es una especie resistente al manipuleo realizado durante el manejo productivo. Además, presenta un crecimiento rápido y buena conversión alimenticia, pueden aprovechar eficientemente alimentos cuyo nivel de proteína se encuentran por debajo de su requerimiento o provengan de una fuente vegetal, debido a su carácter omnívoro poseen fácil adaptación a diferentes sistemas de cultivo y su resistencia a enfermedades la convierten en una especie ideal para su desarrollo acuícola (Popma y Lovshin, 1996; FONDEPES, 2004 y FAO, 2022c). En la Tabla 3 se muestran los requerimientos nutricionales para juveniles de tilapia de Nilo.

Tabla 2*Densidades trabajadas con juveniles de tilapia en sistemas intensivos.*

Sistema de cultivo intensivo	Densidad	Referencia
Raceways	1,21 kg/m ³	Siddiqui <i>et al.</i> (1991) *
	0,28; 0,57; 0,85 kg/m ³	Wang <i>et al.</i> (2019)
RAS	15 kg/m ³	Muir <i>et al.</i> (2000)*
	3 -6 kg/m ³	Odhiambo <i>et al.</i> (2020)
	2,68; 5,37 y 8,05 kg/m ³	Ani <i>et al.</i> (2021)
	8,67 – 9,76 kg/m ³	Félix-Cuencas <i>et al.</i> (2021)
	1,15; 2,3; 4,6 kg/m ³	Shourbela <i>et al.</i> (2021)
	3,14 kg/m ³	Cipriani <i>et al.</i> (2021)
	2,84; 4,26; 5,68kg/m ³	Zafar <i>et al.</i> (2022)

*Citados en El-Sayed (2006)

Tabla 3*Requerimientos nutricionales para juveniles de tilapia de Nilo (Oreochromis niloticus).*

Nutrientes	(%)	Referencia
Proteínas	34	NRC (2011)
	30 - 35	Nicovita (2003); FAO (2022)
Lípidos	4,5 - 6	Nicovita (2002)
	5 - 12	Lim <i>et al.</i> (2009)
	10 -15	FAO (2022)
Carbohidratos	35 - 40	FAO (2022)

En cuanto a los requerimientos de calidad de agua, la tilapia es una de las especies más resistentes que se cultivan, ya que pueden soportar condiciones de calidad de agua que podrían crear serios problemas en otras especies, son relativamente resistente a bajas concentraciones de oxígeno disuelto y niveles altos de amonio, en la tabla 4 se detallan los requerimientos de calidad de agua para la tilapia según algunas investigaciones realizadas.

Tabla 4

Parámetros fisicoquímicos del agua recomendados para el cultivo de tilapia (Oreochromis niloticus).

Parámetros Fisicoquímicos						
Temp (°C)	OD (ppm)	pH	NH₃ (mg NH₃/L)	NO₂⁻ (mg NO₂/L)	NO₃ (mg NO₃/L)	Referencia
29 – 31	> 2	> 5 -10	< 2	-	-	Popma y Lovshin (1996)
20 - 30	> 4,5	6,5 - 9	< 2	-	-	Fondepes (2004)
25 - 32	5 – 7,5	6 - 9	< 1	< 5	< 300 - 400	Delong <i>et al.</i> (2009)
24 – 26	> 6	7 – 7.05	-	< 0,97	70 - 100	Luo <i>et al.</i> (2013)
22 – 28,8	6,58 -7,06	7,06 – 7,57	1,6	-	11,2 – 30,7	Cisneros (2021)

2.2. Estrés

Auró y Ocampo (1999) y Shreck (2000) definen al estrés como la sumatoria total de eventos que se presentan como una cascada de respuestas fisiológicas resultantes de la adaptación de un organismo que intenta sobrevivir o mantener la homeostasis interna frente al estresor, existiendo dos tipos de estrés:

- a) Estrés agudo o letal ocurre rápidamente en respuesta a perturbaciones ambientales en un corto plazo, como pueden ser cambios en los parámetros de calidad de agua, tales como: temperatura, oxígeno disuelto, etc.
- b) Estrés crónico o subletal, resulta de exposiciones continuas de los individuos a la acción de agentes estresantes en periodos de semanas o años; puede subdividirse en componentes directos e indirectos. Los directos son aquellos efectos que actúan sobre el metabolismo alterando la actividad de las enzimas, las membranas, modificando funciones como la respiración, circulación, respuesta inmune, regulación hormonal, entre otros. Por otra parte, los efectos indirectos, se reflejan en la alteración de la conducta, viéndose afectadas las actividades de alimentación, competencia, reproducción, etc (Auró de Ocampo y Ocampo, 1999).

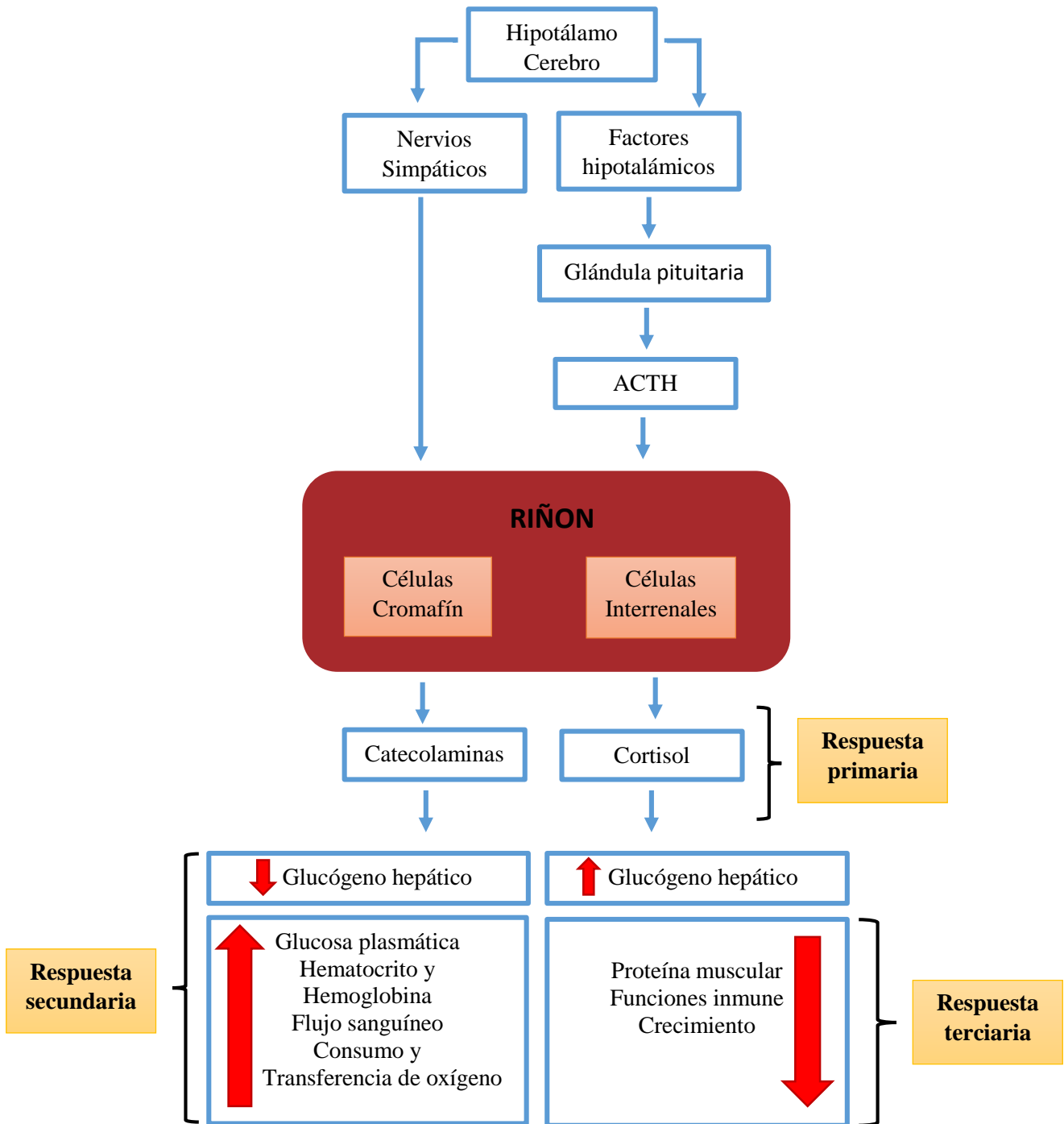
2.2.1. Nivel de respuestas de los peces frente al estrés

La respuesta de los peces frente al estrés puede ser categorizado en primaria, secundaria y terciaria (Figura 2),

- a) La respuesta primaria, es referida a un nivel endocrino con una rápida liberación de hormonas de estrés en la circulación, tales como: catecolaminas y corticoesteroides, activándose los ejes endocrinos Cerebro-Simpático-Cromafin (BSC) y el Hipotálamo-Hipofisis-Interrenal (HPI). La activación del eje HPI implica la liberación del factor liberador de Corticotropina (CFR) desde el hipotálamo quien estimula la secreción de la hormona adenocorticotrópica (ACTH) desde la pituitaria, lo que conlleva a que las células interrenales del riñón anterior sintetizen y liberen la hormona cortisol en el sistema circulatorio. (Kalamarz, 2017). El cortisol modifica el flujo energético influyendo en la reducción de la ingesta y de la absorción intestinal. Como resultado la reserva energética limitada será dirigida prioritariamente a suplir la alta demanda requerida para los procesos de mantenimiento (osmoregulación, respiración y recambio de proteínas) sobre los de estructura inhibiendo los promotores de crecimiento (Schreck *et al.*, 2016).
- b) La respuesta secundaria, implica diversos efectos bioquímicos y respuestas fisiológicas como cambios metabólicos en el incremento de glucosa y lactato en la sangre, así como alteraciones osmoregulatorias, cambios en las características hematológicas reflejados en el hematocrito, hemoglobina y leucocitos, cambios celulares y en la respuesta inmune, cuya activación requiere una alta demanda energética (Wendelaar Bonga, 1997; Schreck *et al.*, 2016; Kalamarz, 2017).
- c) La respuesta terciaria, extiende cambios en la performance general del individuo y de la población, inhibiendo el crecimiento, reproducción, la respuesta inmune y la capacidad de tolerancia a subsecuentes factores estresantes (Wendelaar Bonga, 1997; Kalamarz, 2017).

Figura 2

Representación esquemática de la respuesta al estrés en peces.



Nota: modificado de (Ostrander y Barnes, 2000)

2.2.2. Densidad de carga como factor de estrés en peces

La densidad de carga se define como el número de animales o biomasa por unidad de volumen, y comúnmente se expresa en kg por m³ (Ellis *et al.*, 2002).

El confinamiento de peces en altas densidades propios de un cultivo intensivo puede ser considerado como un factor de estrés crónico (Barton y Iwana, 1991; Schreck *et al.*, 2016; Shourbela *et al.*, 2017; Odhiambo *et al.*, 2020). Lo que conlleva a un aumento en los cambios fisiológicos en los peces como respuesta a las condiciones de cautiverio, ocasionando estrés. Ellis *et al.* (2002) mencionan que las densidades altas en un cultivo afectan a la tasa de consumo de alimento en los peces, aumenta la conversión alimenticia y afecta el crecimiento, al igual que presenta un efecto adverso sobre el factor de condición, el cual es un indicador del bienestar en los peces, provee información sobre la variación en el estatus fisiológico como resultado de la interacción con las condiciones alimenticias, aprovechamiento del alimento, factores ambientales, etc (Ighwela *et al.*, 2011; Datta *et al.*, 2013). Además, exhiben efectos sobre la mortalidad debido a un incremento en las incidencias de enfermedades, ya que la cercanía entre individuos hace que la transmisión de patógenos sea horizontal, el deterioro de la calidad de agua favorece el incremento de patógenos afectándose el sistema inmune de los peces. Al-Harbi y Siddiqui (2000) reportaron una reducción significativa en la tasa de alimentación y en la biomasa ocasionada por el incremento en la densidad de tilapias híbridas (*Oreochromis niloticus x O. aureus*). Osofero y Otubusin (2007) señalan que el contenido de proteína cruda en la carcasa de las tilapias, se reduce a medida que la densidad incrementa. Chakraborty y Banerjee (2010) mencionan que existe una relación inversa entre la supervivencia y la densidad de cultivo. Por otro lado, Ani *et al.*, (2021) reportaron en tilapias criadas bajo un sistema acuapónico que la tasa de crecimiento específica se vio reducida, mientras que, el factor de conversión alimenticia se incrementó a medida que la densidad de cultivo aumentaba.

2.3. Parámetros de evaluación del estrés

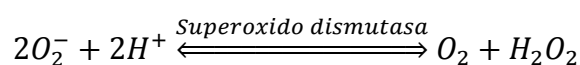
2.3.1. Evaluación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de la hormona Cortisol

La enzima Superóxido Dismutasa (SOD) es el principal componente del sistema de defensa antioxidante y es la encargada de la eliminación del anión superóxido, que es uno de las principales especies reactivas de oxígeno (EROS) producido en las células generando

oxígeno y peróxido de hidrogeno (Figura 3) (Stryer *et al.*, 2013). Sin la mediación de esta enzima, los radicales libres pueden formar radicales hidroxilos, los cuales al tener una vida corta son altamente reactivos y dañinos, ya que no existe algún agente antioxidante que pueda prevenir su accionar siendo solo posible el inhibir su formación o reparar el daño causado por dicha especie. Por otra parte, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) es producido en abundancia durante la reducción del oxígeno, pero puede ser eliminado por diversas enzimas como la catalasa y glutatión peroxidasa (Hoseinifar *et al.*, 2020).

Figura 3

Conversión del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno.



Por otro lado, el cortisol es el principal corticoesteroide circulante en peces bajo condiciones normales que actúa como un factor de regulación de un amplio rango de funciones fisiológicas. Es controlado por la glándula pituitaria y secretado como respuesta a la hormona adenocorticotropa (ACTH), la cual es estimulada por diversos estresores como la densidad, manipulación, shock térmico, etc (Wendelaar Bonga, 1997). A diferencia de los mamíferos, en los peces el cortisol desempeña tanto funciones glucocorticoides como mineralcorticoides. El principal proceso metabólico desencadenado por la liberación de corticoesteroides es la movilización de las reservas energéticas a través de la glucólisis y la gluconeogénesis de la degradación de grasas y proteínas, lo que permite a los peces conseguir los requerimientos energéticos necesarios acorde a la situación (Stryer *et al.*, 2013; Sadoul y Geffroy, 2019). También son responsables de la regulación iónica y de activar una serie de enzimas importantes que controlan el metabolismo intermediario en el hígado (Ostrander y Barnes, 2000), pueden regular la respuesta inmunitaria en peces y modular la respuesta inflamatoria de los tejidos mediante efectos inhibitorios en la producción de citoquinas (Kalamarz, 2017).

Es así que el aumento en los niveles de cortisol en el plasma es el indicador más usado como respuesta al estrés en peces, reportándose valores generales entre 10 y 50 ng/ml (Ostrander y Barnes, 2000). Por su parte Pickering y Pottinger (1989), Barton e Iwana (1991), señalan que los valores de cortisol para peces en reposo son inferiores a 30 – 40 ng/ml pero que idealmente debería ser menor a 5 ng/ml y que los niveles post estrés muestran valores alrededor de 40 – 200 ng/ml.

2.3.2. Parámetros hematológicos

Los parámetros hematológicos son medidos a través de muestras sanguíneas, la cual se obtiene mediante una punción de la vena caudal, cerca de la base del pedúnculo caudal de los peces (Rozas *et al.*, 2015). La sangre al ser un tejido compuesto por una matriz líquida que contiene células y plasma, así como proteínas, glucosa, minerales, hormonas, etc; se encuentra en contacto con todos los órganos del cuerpo gracias al proceso de la circulación sanguínea, por lo tanto, su evaluación permite determinar alteraciones en diversos tejidos (Rozas *et al.*, 2015). Es así que, los análisis hematológicos son generalmente usados para evaluar la salud y bienestar de los peces en acuicultura debido a que brindan una amplia información acerca del estatus nutricional, del potencial inmune, nivel de estrés, capacidad de transporte de oxígeno, entre otros (Fazio, 2019; Witeska *et al.*, 2021).

Los análisis hematológicos incluyen el recuento de células rojas y otros parámetros relacionados con las células sanguíneas como los índices bioquímicos de los compuestos plasmáticos: el recuento de eritrocitos (RBC), concentración de hemoglobina (Hb), valor del hematocrito (Ht), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH) y la concentración de la hemoglobina corpuscular media (MCHC); conteo de leucocitos (WBC) y la evaluación porcentual de los diferentes tipos de leucocitos: linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, etc (Witeska *et al.*, 2021).

Ante situaciones de estrés los valores de los parámetros sanguíneos pueden aumentar, debido a que la respuesta de un individuo implica un mayor gasto de energía que demanda un aumento en el transporte de oxígeno en la sangre, el cual va dirigido hacia los principales órganos en respuesta a la mayor demanda metabólica. Además, en los peces puede implicar el aumento de los eritrocitos, liberación de las reservas esplénicas y el incremento de la eritropoyesis (Dobsikova *et al.*, 2009; Witeska *et al.*, 2021).

2.4. Hidrolizado de subproductos de langostino

La hidrólisis es un proceso por el cual los enlaces químicos entre aminoácidos que conforman las proteínas son separadas; obteniéndose fracciones de bajo peso molecular que favorecen su absorción, haciéndolos más digeribles y mejorando sus propiedades funcionales entre otras como la atractabilidad. Así también es la base para el desarrollo de antioxidantes, inmunomoduladores, emulsificantes, agentes saborizantes y antibacterianos (Molina y Espinoza, 2021). El proceso de hidrólisis influye directamente en la composición química y en la actividad antioxidante de los hidrolizados, y depende de varios factores

incluyendo pH, temperatura, tiempo y la relación de enzima/sustrato (Tabla 5). Es así que las propiedades funcionales de la proteína obtenida se ven alteradas tanto en el grado de solubilidad, amargor y en sus propiedades emulsificantes y espumantes; además de las propiedades biofuncionales como la digestibilidad, biodisponibilidad, actividad antimicrobiana, entre otros (Benítez *et al.*, 2008)

Tabla 5

Condiciones de autólisis para obtener el máximo grado de hidrólisis de subproducto de langostino (Litopenaeus vannamei).

Parámetros	
pH	7,85
Tiempo (hrs)	3
Temperatura (°C)	50
Relación sustrato/enzima	23
(%)	

Fuente: Cao *et al.* (2008)

En nuestro país la producción de langostino (*Litopenaeus vannamei*) viene incrementándose en los últimos 10 años. Según reporta el PRODUCE (2022), la producción acuícola nacional de langostinos para el año 2021 fue de 36 482.4 TM, siendo Piura y Tumbes las principales regiones productoras con 1833.39 y 34 649.01 TM, respectivamente. Sin embargo, en el Perú la industria langostinera solo ha desarrollado la línea comercial de su carne (colas), por lo que los subproductos originados representan entre el 40 a 50 por ciento del producto conformado por cefalotórax (71.4%) y caparazón (28.6%), los cuales son descartados. Ello implica un desaprovechamiento de una fuente de aminoácidos, carotenoides, enzimas y otros compuestos que se presentan en su composición (Cao *et al.*, 2008; Sinthusamran *et al.*, 2018). La reutilización de estos subproductos a través de procesos como la hidrólisis pueden ser un enfoque prometedor para dar solución al impacto perjudicial de los residuos de la industria sobre el ambiente y al mismo tiempo generar valor agregado, al obtener una fuente protéica que puede ser utilizada como ingrediente o aditivo alimenticio, el cual presenta una alta actividad antioxidante (Sowmya *et al.*, 2014; Sinthusamran *et al.*, 2018; Nirmal *et al.*, 2020). Debido al contenido de astaxantina dentro de estos subproductos, Cretton (2019) menciona que al ser este el carotenoide más abundante en el cefalotórax y exoesqueleto de los crustáceos, es posible considerar al procesamiento de subproductos como una fuente natural

de dichos compuestos. En la siguiente tabla se reportan valores de astaxantina encontrados en diferentes subproductos de langostino.

Tabla 6

Valores de astaxantina para diferentes subproductos de langostino (Litopenaeus. vannamei).

Subproducto	Contenido de astaxantina	Referencias
Cabeza, exoesqueleto y cola	19,2 µg/g	Liu <i>et al.</i> (2021)
Exoesqueleto fermentado	0,52 µg/g	Cabanillas <i>et al.</i> (2021)
Exoesqueleto	28,9 µg/g	Chintong <i>et al.</i> (2019)
Cefalotórax, cutículas, pleópodos y cola	7 mg/g	Gómez <i>et al.</i> (2016)

2.4.1. La Astaxantina como aditivo funcional

La astaxantina es un carotenoide xantófilo que actúa como una protección frente al estrés oxidativo buscando y eliminando los radicales libres para poner fin a las reacciones en cadena, evitando el daño oxidativo en las macromoléculas (Rahman *et al.*, 2016).

La suplementación de astaxantina dietaria (50 – 100 mg/kg de alimento) ha demostrado un mejoramiento en el crecimiento, capacidad antioxidativa y la respuesta inmune de la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Rahman *et al.*, 2016; Kalinowski *et al.*, 2019). En juveniles de pámpano blanco (*Trachinotus ovatus*) se ha demostrado que la suplementación de astaxantina (200 mg/kg de alimento) mejora el performance de crecimiento de los individuos y su capacidad antioxidante hepática (Xie *et al.*, 2017). Lim *et al.* (2017), reportaron en juveniles de salmón (*Salmon salar*) una tendencia al incremento en la tasa de crecimiento y supervivencia en individuos que habían recibido una dieta enriquecida con astaxantina frente a una dieta control. Por su parte, Lim *et al.* (2019) señalaron un alto potencial dietario para la inclusión de astaxantina en las dietas de lubina (*L. calcarifer*), debido a que se observó una reducción en el estrés y a su vez un mejoramiento en la condición sanguínea y la capacidad inmune innata. Xie *et al.* (2020) reportaron una mejora en el metabolismo lipídico de juveniles de lubina (*Micropterus salmoides*); así como, la reducción del estrés y la apoptosis inducida por una dieta alta en lípidos suplementada con astaxantina. Asimismo, ha sido ampliamente demostrada la influencia dietaria de la astaxantina sobre la reproducción y sobrevivencia de crías en diferentes especies acuáticas. De igual manera, se

encuentra bien establecido la función precursora de la astaxantina como precursor del retinol, lo cual mejora el desarrollo embrionario y larvario de los organismos, potenciando la producción de anticuerpos y células inmunes (Lim *et al.*, 2017).

2.4.2. Usos de hidrolizado de camarón en acuicultura

Dentro de los estudios con hidrolizado aplicados a la acuicultura podemos mencionar a Khosravi *et al.* (2015) quienes reportaron un incremento significativo en la actividad del SOD y en los niveles totales de inmunoglobulinas de la dorada (*Pagrus major*) alimentados con dietas que contenían proteína hidrolizada de subproductos de camarón frente aquellos alimentados con dietas que presentaban un nivel bajo de harina de pescado. Leduc *et al.* (2018) indican que el uso de hidrolizado de camarón en dietas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) fue un buen ingrediente al ser incorporado en dietas con bajo nivel de harina de pescado (5%) y no alterar la performance ni el metabolismo de los animales. Por su lado, Gisbert *et al.* (2018) señalan que con la suplementación de hidrolizado de camarón en dietas de juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*) se mejoró el sistema inmune de los peces frente al ataque del *vibrio pelagius* obteniéndose una mayor sobrevivencia. Por otro lado, Khosravi *et al.* (2018) reportaron que la inclusión de hidrolizado de camarón tuvo un rol importante en el sistema antioxidante de juveniles de lenguado (*Paralichthys olivaceus*) debido a que se registró una mejora en la actividad de la enzima SOD, necesaria para mantener los niveles de anión superóxido incrementando la capacidad fagocítica de los animales. Bae *et al.* (2021) encontraron que los juveniles de tilapias (*Oreochromis niloticus*) alimentados con extracto de hidrolizado de camarón incrementaron las actividades del SOD comparadas con las alimentadas con la dieta basal. De igual modo Gunathilaka *et al.* (2021) fortalecieron el sistema inmune innato de la dorada (*Pargus major*) suplementando dietas bajas en harina de pescado con inclusión de hidrolizado de camarón.

III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar experimental y duración

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Acuicultura que pertenece a la Facultad de pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), y tuvo una duración de 30 días durante los meses de abril y mayo 2022.

Los análisis químicos proximales de las dietas y de la carcasa de los peces fueron realizados en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) de la UNALM.

La investigación comprendió una etapa pre experimental y una experimental.

3.2. Etapa pre-experimental

3.2.1. Maduración del Sistema de Recirculación (RAS)

El Laboratorio de Acuicultura presenta un sistema de recirculación cerrada (RAS por sus siglas en inglés), que permite mantener y regular los parámetros de calidad de agua exigidos por la especie. Está conformado por un sistema de 16 acuarios de 50 L (unidades experimentales) mantenidos con un sistema de aireación a través de un blower de ½ HP y calefacción continua, los mismos que se encuentran conectados a un sistema de remoción de sólidos donde se encuentra un filtro mecánico y un filtro biológico para el tratamiento de las sustancias nitrogenadas (amonio, nitritos, nitratos) y finalmente, un sistema de bombeo que permite la circulación continua en el sistema.

Para madurar el RAS se preparó el biofiltro que constaba de un filtro sumergido (valvas de concha de abanico) y un filtro de percolación (ruleros) los que se utilizaron como sustrato para el asentamiento de las bacterias nitrificantes obtenidas comercialmente (Denitrol JBL). Estos fueron mantenidos añadiendo una fuente de amonio (sulfato de amonio) en una concentración requerida para todo el sistema con aireación permanente ($> 6\text{mg/L}$), a una temperatura (27°C) y pH (7) adecuado. Se realizaron los controles de parámetros físico-químicos diariamente (concentración de amonio, nitritos y nitratos) a través de kits comerciales y lecturas en un espectrofotómetro para acompañar el desarrollo de las mismas.

El biofiltro estuvo completamente activado aproximadamente a los dos meses posteriores de su instalación, cuando la concentración de compuestos nitrogenados se encontró en equilibrio, es decir que los valores de amonio fueron cercanos a cero, la concentración de nitritos muy baja (< 1 ppm) y la de nitratos en un rango de 0 - 400 ppm aproximadamente (Timmons *et al.*, 2002).

3.2.2. Obtención de las unidades biológicas e implementación de unidades experimentales

Se seleccionaron 120 juveniles revertidos de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) de $18,74 \pm 0.11$ g de peso promedio del Centro de Investigación Piscícola (CINPIS) de la UNALM los que se mantuvieron durante una semana en aclimatación en el laboratorio de Acuicultura y fueron alimentados con una dieta basal (36% proteína).

Previo la distribución de las unidades se procedió a limpiar y desinfectar los acuarios, los que fueron cubiertos en las paredes externas laterales con plástico negro para generar un ambiente de privacidad para los peces.

Se ubicaron paralelamente 6 acuarios de 50 L a cada lado, conectados a su respectivo sistema de drenaje y alimentación de agua (0.12 L/s). Además del sistema de aireación proveniente de un blower de $\frac{1}{2}$ HP, cada acuario fue equipado con un termostato de 150 W para asegurarse de mantener una temperatura constante de 27 °C. Una vez que estuvieron operativas las unidades experimentales se procedió al llenado de los acuarios con agua del distrito de La Molina reposada y almacenada en el laboratorio. Luego se distribuyeron al azar los peces que previamente fueron pesados y tallados mediante el uso de una balanza y un ictiómetro, para finalmente poner en marcha el sistema de recirculación.

3.2.3. Caracterización del hidrolizado de subproductos de langostino

La proteína hidrolizada usada en la presente investigación fue elaborada a base de subproductos de langostino (*Litopenaeus vannamei*) procedentes de la empresa ATISA ubicada en Tumbes a través de un proceso enzimático lento con proteasas alcalinas. Su composición proximal se muestra en la Tabla 7, y en la Tabla 8 se observa el aminograma completo realizado en la empresa AGQ LABS.

Tabla 7

Análisis proximal de Hidrolizado de Subproductos de Langostino (Litopenaeus vannamei) (HSL).

Nutrientes (%)	HSL
Humedad	11,59
Proteína total	45,53
Grasa	17,83
Fibra cruda	0,34
Ceniza	19,5
ELN	5,21
*Astaxantina (mg de equivalentes Trolox/g)	7,7

Fuente: LENA (Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos),

* Determinado por el Instituto de Investigación Científica de la Universidad de Lima

Tabla 8

Aminograma del Hidrolizado de Subproductos de Langostino (Litopenaeus vannamei) (HSL) y Harina de Pescado (HP).

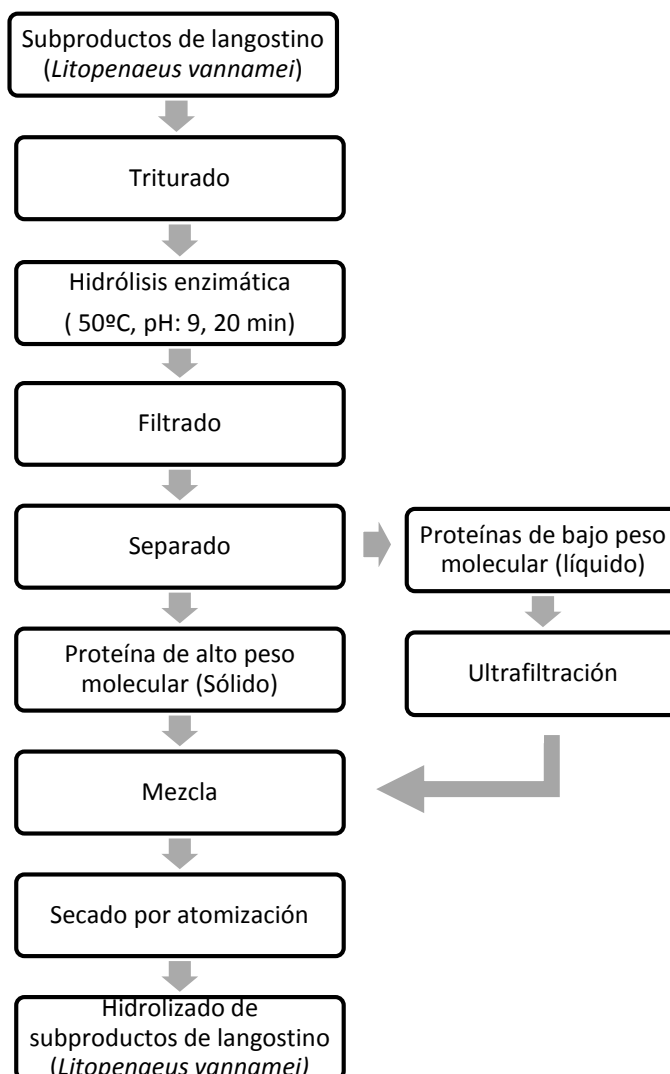
Aminoácidos (%)	HSL*	HP**
Arginina	6,24	3,68
Cisteina	0,32	0,61
Fenilalanina	5,41	2,66
Histidina	2,00	1,56
Isoleucina	4,00	3,06
Leucina	5,53	5,00
Lisina	5,41	5,11
Metionina	7,89	1,95
Tirosina	0,32	2,15
Treonina	4,24	2,82
Triptófano	0,82	0,76
Valina	2,00	3,51

* Laboratorio AGQ LABS, ** Valores tomados del NRC (2011)

Asimismo, en el siguiente flujograma se describe el procesamiento realizado para la obtención del hidrolizado de subproductos de langostino. Este fue usado como ingrediente protéico en reemplazo de la harina de pescado en la dieta de juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Figura 4

Flujograma de la obtención del hidrolizado de subproductos de langostino (Litopenaeus vannamei).



3.2.4. Elaboración de las dietas experimentales

Las dietas se formularon considerando los requerimientos nutricionales para juveniles de tilapia (NRC, 2011). A partir de la formulación de la dieta control se formuló la dieta experimental T-HSL, ambas fueron procesadas en el Laboratorio de Acuicultura y los pellets tuvieron un tamaño de 3 mm. La dieta experimental tuvo un reemplazo del 100% de la harina

de pescado por el hidrolizado de subproductos de langostino. Cabe mencionar que este ingrediente fue entregado de diferentes lotes debido a algunos ajustes realizados en su procesamiento para obtener un mejor producto (el primero se llevó al LENA para su evaluación y fue utilizado en otro experimento). Previamente fue tamizado, mezclado y añadido a la preparación. Finalmente, los pellets fueron secados a 55°C por 3hrs aproximadamente. La formulación de ambas dietas se detalla en la Tabla 9.

Posteriormente se determinó el análisis proximal de las dietas en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos – LENA de la UNALM (Anexo IX).

Tabla 9

Fórmula de la dieta control (TC) y dieta prueba (T-HSL) para juveniles de tilapia (Oreochromis niloticus).

Insumos (%)	Tratamientos	
	TC	T-HSL
Harina de subp. Langostino (HSL)	-	39,2
Harina de pescado	33	-
Harina de soya	25	35
Harina de maíz	13	4,7
Harina de trigo	17	9,9
Aceite de soya	8,8	7,6
Vitamina C	0,4	0,4
Fosfato di cálcico	1,2	1,4
Cloruro de colina	0,2	0,2
Antimicótico	0,2	0,2
Antioxidante	0,03	0,03
Premix Acuicultura*	0,4	0,4
CMC (Carboximetil celulosa)	1	1
Composición proximal (%) (Base seca)		
Proteína total	35,13	35,10
Grasa	12,95	16,03
Fibra cruda	1,44	1,41
ELN	32,88	24,59

*Premix (composición por 1 kg de premezcla):

Vitamina A(9333333 UI), Vitamina D3 (1866667UI), Vitamina E (93333 UI), Vitamina K3 (5,333 g), Tiamina B1(12g), Riboflavina B2 (13,333g), Niacina (100g), Acido pantoténico (33,333g), Piridoxina B6 (10g), Biotina

(0,533g), Ácido fólico (2,667g), Ácido ascórbico (210g), Vitamina B12 (0,02g), Manganeso (26,667g), Hierro (13,333g), Zinc (13,333g), Cobre (1g), Iodo (1g), Selenio (0,2g), Cobalto (0,1g), antioxidante (80g), Excipientes c.s.p (2000G).

3.3. Manejo Experimental

3.3.1. Calidad y monitoreo de la calidad de agua del sistema RAS

Durante todo el experimento fueron controlados los siguientes parámetros físico-químicos: temperatura del agua (°C), concentración de oxígeno disuelto (mg O₂/L), potencial de hidrógeno (pH), alcalinidad (mg CaCO₃·/L), la concentración del nitrógeno amoniacal total (mg NAT/L), nitrito (mg NO₂/L), nitrato (mg NO₃/L) y ortofosfato (mg PO₄⁻³/L) como se detalla en la Tabla 10.

Las muestras se obtuvieron tanto de las unidades experimentales como del filtro del sistema RAS. Para evaluar los parámetros de calidad de agua se utilizó un espectrofotómetro marca Hach modelo DR 3900 con sus respectivos kits para amonio total, nitrito, nitrato, y ortofosfatos; para medir la temperatura se utilizó un termómetro marca Boeco, para el oxígeno un oxímetro marca Ysi modelo 550A; vortex Cole-Parmer; pHmetro Schott Instruments.

Por otro lado, el porcentaje de amoniaco (N-NH₃) se determinó con los datos de pH y temperatura del agua a través de la tabla elaborada por Thruston *et al.* (1979), el valor de la concentración de N-NH₃ (mg/L) se obtuvo multiplicando este porcentaje por la concentración de NAT. Los valores de las lecturas N-NO₂ y N-NO₃ fueron multiplicados por un factor 3.28 y 4.42 respectivamente, para poder expresarlos en unidades de nitritos y nitratos (mg/L).

Tabla 10*Parámetros de calidad de agua en el RAS - métodos y periodicidad.*

Parámetro	Unidad	Equipo	Periodicidad	Método	Valores
Temperatura	°C	Termómetro	Diariamente	Termómetro	26 - 28
Oxígeno Disuelto	mg/L	Oxímetro	Diariamente	Polarográfico	> 5
pH		pHmetro Schott instruments	Diariamente	Potenciómetro	6.5 – 8.5
NAT	mg /L	Kit y Espectrofotómetro	Semanalmente	Nessler	
N-NO ₂	mg /L	Kit y Espectrofotómetro	Semanalmente	Diazotización	
N-NO ₃	mg /L	Kit y Espectrofotómetro	Semanalmente	Cadmio Reducción	
PO ₄ ⁻³	mg /L	Kit y Espectrofotómetro	Semanalmente	Ácido Ascórbico	
Alcalinidad	mg CaCO ₃ ·/L		Semanalmente en el filtro	Volumétrico	

Para la evaluación de parámetros productivos se emplearon: balanza digital marca Daihan Scientific modelo WBA-3200; balanza digital marca Radwag WTC-600 sensibilidad 0.01g.

Como anestésico para los peces se utilizó Tricaina metanosulfonato (Sigma-Aldrich).

Para evaluar los parámetros fisiológicos (hematológicos, cortisol) y la actividad antioxidante se utilizaron: kit comercial con reactivo Drabkin-Valtec Diagnostics, kit ELISA para peces (Mybiosource) y kit para SOD (Sigma-Aldrich), respectivamente; además de un espectrofotómetro para microplacas marca HEALES modelo MB 580; centrífuga refrigerada 4 °C marca Thermo scientific Sorvall Legend X1R; incubadoras de 20 – 25 °C y 37 °C; microcentrífuga para hematocrito marca Boeco; centrífuga para microtubos marca Hettich modelo Mikro 185; microscopio marca Nikon modelo Eclipse E200 y espectrofotómetro Thermo Spectronic modelo Genesys 20.

Entre otros materiales de laboratorio fueron necesarios: Micropipetas de 0.5-1000uL, tips, racks, materiales para extracción de sangre (Jeringas de 1ml, microtubos Eppendorf de 2 ml, tubos separadores de suero (SST) y con EDTA); Tubos capilares para micro hematocrito no heparinizados, plastilina, Cámara de NeuBauer, ictiómetro y materiales de vidrio.

- **Manejo experimental de los peces**

Los peces fueron distribuidos aleatoriamente en 6 acuarios rectangulares de vidrio (0,050 m³) los cuales estuvieron conectados al sistema RAS manteniéndose una densidad de 20 peces equivalente a una carga de 7.2 kg/m³ lo cual es considerado alta densidad (Wambua *et al.*, 2019; Odhiambo *et al.*, 2020; Ani *et al.*, 2021; Shourbela *et al.*, 2021)

Los peces fueron alimentados diariamente a saciedad con las dos dietas, desde las 8:00 am – 6:00pm aproximadamente 5 veces en el día, el alimento administrado fue pesado y suministrado observando que el consumo por los peces sea total, el sobrante en los recipientes fue registrado a diario.

Los acuarios se limpiaron durante la mañana mediante el método de sifoneo dos veces por semana incluidas las piedras difusoras y manguerillas, mientras que el filtro mecánico del sistema RAS conformado por una esponja que fue lavada diariamente con cepillo y enjuagado con agua de caño.

Los muestreos biométricos se realizaron iniciando el experimento y luego cada 15 días. Se evaluó el peso y longitud, para ello se usó una balanza digital (Radwag WTC-600) y un ictiómetro.

- **Muestreo de sangre**

Para la evaluación de la condición fisiológica y la actividad enzimática se realizó la toma de muestras de sangre al final del experimento.

Los peces por tratamiento y repetición fueron capturados cuidadosamente, para ser anestesiados individualmente por el método de inmersión con Tricaína metanosulfonato a una concentración de 240 mg/L en un recipiente con 5 L de agua.

Estos fueron pesados individualmente y puestos sobre una superficie húmeda para proceder con la extracción de sangre mediante el método de punción en la vena caudal (Rozas *et al.*, 2015). Se utilizaron jeringas de 1 cc de capacidad. Se colectaron 0,6 ml de sangre por individuo que fue colocada en tubos con EDTA y tubos con activador de coágulo. Luego de la extracción los peces fueron mantenidos en tinas con suficiente agua fresca y aireación constante hasta su recuperación, para luego ser devueltos a sus acuarios.

3.3.2. Evaluación de la inclusión de hidrolizado de subproductos de langostino (*Litopenaeus vannamei*) sobre el estrés de juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*).

a. Evaluación de parámetros zootécnicos

Con los datos obtenidos se procedió a calcular los siguientes parámetros productivos basados en las fórmulas mencionadas por Battisti *et al.* (2020), Wu *et al.* (2021) y Bae *et al.* (2021):

$$\text{Ganancia de peso (g/d)} = \left(\frac{W_f - W_i}{t_2 - t_1} \right)$$

$$\text{Tasa de Crecimiento Especifico (\%/d)} = \left(\frac{\ln(W_f) - \ln(W_i)}{t_2 - t_1} \right) \times 100$$

$$\text{Factor de Conversión Alimenticia (FCR)} = \frac{\text{alimento consumido}}{\text{ganancia de peso}}$$

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Número de peces final}}{\text{Número de peces inicio}} \times 100$$

$$\text{Densidad final (kg/m}^3\text{)} = \frac{\text{biomasa}}{\text{volumen de agua del cultivo}}$$

$$\text{Valor Productivo de la Proteína (VPP)(\%)} = \frac{(\text{ganancia de proteína}) * 100}{(\text{Proteína ingerida})}$$

$$\text{Tasa de Eficiencia Alimenticia (\%)} = \frac{(\text{ganancia de peso}) \times 100}{\text{alimento ingerido}}$$

$$\text{Tasa de Eficiencia Protéica} = \frac{(\text{ganancia de peso})}{\text{proteína ingerida}}$$

Consumo de alimento (g)

$$= \sum \text{alimento diario consumido durante la experimentación}$$

$$\text{Factor de Condición (g/cm}^3\text{)} = \frac{W \times 100}{(\text{Longitud})^3}$$

Donde:

W = Peso (g); W_f = Peso final (g); W_i = Peso inicial (g)

Para obtener el valor productivo de la proteína fueron sacrificados 10 peces al inicio y 4 peces por cada tratamiento al final del experimento, el proceso de eutanasia fue llevado a cabo según lo señalado por el AVMA (2020) a través del método de la sobredosis de anestésico y posteriormente los ensayos proximales fueron realizados en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) – UNALM, los resultados se muestran en el Anexo X.

b. Evaluación de la condición fisiológica

- Evaluación de los niveles de cortisol en suero

El suero sanguíneo fue obtenido por centrifugación (1000 xg a 4 °C por 15 min) siguiendo las especificaciones del kit comercial para Cortisol (kit ELISA para peces - Mybiosource). Posteriormente se colocó en microtubos Eppendorf de 2 ml. Los resultados fueron obtenidos a través de la lectura en el espectrofotómetro de microplacas de 96 pocillos a una longitud de onda de 540 nm.

- Determinación de los parámetros hematológicos

Los parámetros a evaluar fueron: concentración de hemoglobina (Hb), recuento de eritrocitos y hematocrito (Ht).

• Recuento de eritrocitos:

El recuento de eritrocitos fue llevado a cabo manualmente mediante el método de tinción utilizando la solución Natt-Herrick (Natt y Herrick, 1952) a una dilución de 1/200 (Rozas *et al.*, 2015). Se utilizó una cámara de Neubauer como hemocitómetro y fue visualizado a través de un microscopio compuesto (Nikon modelo Eclipse E200) con el aumento de 400X (Witeska *et al.*, 2021). El número total de eritrocitos se determinó mediante la siguiente fórmula (Rozas *et al.*, 2015):

$$\text{Número de eritrocitos} = \text{cantidad de eritrocitos} \times 10\ 000$$

• Determinación de hematocrito:

La determinación del hematocrito (Ht) se realizó mediante la centrifugación (12000 RPM durante 5 minutos) de la muestra de sangre en tubos capilares no heparinizados y sellados

en uno de los extremos con plastilina. La lectura fue expresada en porcentaje haciendo uso de una regla de lectura (Aquino, 2019).

- **Concentración de hemoglobina:**

La determinación de la concentración de hemoglobina (Hb) se realizó según el método espectrofotométrico de la cianometahemoglobina (Blaxhall y Daisley, 1973), mediante el uso del kit comercial con reactivo Drabkin (Valtec Diagnostics, Santiago de Chile, Chile). Se siguieron las recomendaciones del fabricante y fue leído en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Asimismo, fueron analizados los siguientes índices hematimétricos que describen la morfología y propiedades de los globulos rojos (Witeska *et al.*, 2021):

$$\text{Volumen Corpuscular Medio (VCM)} = \frac{\text{Hematocrito} \times 10}{\text{Recuento de eritrocitos}}$$

$$\text{Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)} = \frac{\text{Concentración de hemoglobina}}{\text{Recuento de eritrocitos}}$$

$$\begin{aligned} \text{Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)} \\ = \frac{\text{Concentración de hemoglobina} \times 100}{\text{Hematocrito}} \end{aligned}$$

c. Evaluación de la actividad antioxidante del hidrolizado mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima SOD fue medido en el plasma sanguíneo obtenido por centrifugación (1000 xg a 4°C por 10 min) siguiendo las especificaciones del kit comercial para SOD (Sigma-Aldrich) y luego fue colectado en tubos Eppendorf de 2ml. Posteriormente, los resultados fueron obtenidos a través de la lectura en el espectrofotómetro de microplacas a una longitud de onda de 540 nm.

3.3.3. Diseño experimental

Se aplicaron dos tratamientos:

Tratamiento 1: TC Peces alimentados con una dieta control basada en harina de pescado cultivados en alta densidad, 20 peces por unidad experimental equivalente a una carga de 7.2 kg/m^3 .

Tratamiento 2: T-HSL Peces alimentados con una dieta con 100% de harina de hidrolizado de subproducto de langostino en reemplazo de la harina de pescado, cultivados en alta densidad, 20 peces por unidad experimental (7.2 kg/m^3).

Variable respuesta: Efecto sobre el estrés de peces cultivados en alta densidad a través de:

- Evaluación de parámetros productivos.
- Determinación de la condición fisiológica, parámetros hematológicos y niveles de cortisol.
- Determinación de la actividad antioxidante del hidrolizado mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD).

3.3.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 2 tratamientos y 3 repeticiones. Los datos fueron procesados a través del software Minitab 21, todos los resultados incluyendo los parámetros de calidad de agua fueron sometidos a pruebas de normalidad. Para detectar diferencias significativas entre las medias se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% y una dado que solo fueron dos tratamientos. Asimismo, se realizaron análisis de correlación de Pearson para determinar la asociación entre las variables.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Calidad y monitoreo de la calidad de agua del sistema RAS

Los valores de los parámetros de calidad de agua para los dos tratamientos y el filtro se muestran en la Tabla 11 y Anexo VII. Los valores de la temperatura presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al filtro, posiblemente debido a la ubicación separada entre los ambientes del filtro y los acuarios; sin embargo, estos valores se encuentran dentro del rango de tolerancia para la especie (Dawood *et al.*, 2019; De León-Ramírez *et al.*, 2022). Con respecto a los otros parámetros como oxígeno disuelto, pH, compuestos nitrogenados, ortofosfato y alcalinidad no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Los valores reportados concuerdan con los registrados por Dawood *et al.* (2019) y De León-Ramírez *et al.* (2022), para tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en altas densidades en sistemas intensivos consideradas soportables por la especie. Por ello podemos concluir que la concentración de los parámetros tóxicos (NAT y NO_2) se encontraron debajo de los niveles recomendados para la especie, por lo que el estrés por la variación de estos no se presentó.

Tabla 11

Parámetros de calidad de agua del RAS para juveniles de tilapia de Nilo (Oreochromis niloticus) cultivadas en alta densidad.

Parámetros (promedio)	Tratamiento Control (TC)	Tratamiento HSL (T-HSL)	Filtro
Temperatura (°C)	27,24 ^a ± 0,02	27,24 ^a ± 0,03	27,47 ^b
Oxígeno Disuelto (mg/L)	6,30 ^a ± 0,07	6,41 ^a ± 0,11	6,51 ^a
pH	7,56 ^a ± 0,04	7,58 ^a ± 0,04	7,51 ^a
NAT (mg/L)	1,68 ^a ± 0,06	1,68 ^a ± 0,03	1,646 ^a
Amoniac (mg N-NH ₃ /L)	0,05 ^a ± 0,00	0,05 ^a ± 0,00	0,04 ^a
Nitrito (mg NO ₂ /L)	1,01 ^a ± 0,01	1,02 ^a ± 0,07	0,92 ^a
Nitrato (mg NO ₃ /L)	76,32 ^a ± 6,82	75,23 ^a ± 2,42	77 ^a
Ortosfato (mg PO ₄ /L)	2,53 ^a ± 0,12	2,49 ^a ± 0,14	2,35 ^a
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	80,44	80,44	80,44

Medias seguidas por letras diferentes en las filas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

4.2. Evaluación de los parámetros zootécnicos

El estrés es un factor fisiológico que afecta la performance de los animales. Como consecuencia de las respuestas primarias y secundarias, se genera una alteración en la homeostasis energética del organismo lo que implica cambios en el crecimiento, comportamiento y sobrevivencia de los peces, lo que se conoce como la respuesta terciaria (Barton, 2002; Schreck *et al.*, 2016).

Los valores obtenidos para los parámetros productivos, como ganancia de peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), factor de conversión alimenticia (FCA), sobrevivencia (S), densidad final (DF), valor productivo de la proteína (VPP), tasa de eficiencia proteica (TEP), tasa de eficiencia alimenticia (TEA), consumo de alimento (CA) y el factor de condición (FC) se muestran en la Tabla 13 y Anexo VIII. Como se puede observar, se presentan diferencias significativas para todos los parámetros productivos ($p < 0,05$) favoreciendo al tratamiento control (TC). En la GP se pueden apreciar valores de 45 y 20 g para el TC y T-HSL respectivamente. Igualmente, para la TCE, los animales alimentados con el TC presentaron un mayor crecimiento (4,10 %/d) frente a los que fueron alimentados con el T-HSL (2,50 %/d). El menor valor del FCA se obtuvo en los peces alimentados con TC en contraste a lo reportado en el T-HSL, registrándose 1,17 y 1,82 respectivamente. Los peces del T-HSL presentaron una mayor sobrevivencia en comparación a los del TC. Tanto el VPP, TEP y TEA de los peces alimentados con el TC presentaron un mayor valor (7,92%; 2,39; 91,45%) en relación al T-HSL (3,42%; 1,17; 53,84%) respectivamente. En cuanto al CA durante el periodo experimental los valores fueron 880,59 y 749,85 g siendo mayor el consumo en los peces alimentados con el TC en comparación a los alimentados con T-HSL. La densidad final para ambos tratamientos fue 22,81 y 15,29kg/m³, respectivamente. Finalmente, en ambos TC y T-HSL, se observó un FC mayor a 1, siendo 1,95 y 1,82 g/cm³ respectivamente.

Tabla 12

*Parámetros productivos de los juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados con dietas experimentales y cultivadas en alta densidad.*

Parámetros (promedio)	Tratamiento Control (TC)	Tratamiento HSL (T-HSL)
GP (g)	45,58 ^a ± 3,18	20,90 ^b ± 1,03
TCE (%/d)	4,10 ^a ± 0,17	2,50 ^b ± 0,09
FCA	1,17 ^a ± 0,17	1,93 ^b ± 0,18
S (%)	88,33 ^a ± 7,64	96,67 ^a ± 5,77
VPP(%)	7,92 ^a ± 0,00	3,42 ^b ± 0,17
TEP	2,39 ^a ± 0,20	1,17 ^b ± 0,04
TEA (%)	91,45 ^a ± 7,83	53,84 ^b ± 2,24
CA (g)	880,59 ^a ± 62,40	749,85 ^b ± 32,23
DF (kg/m ³)	22,81 ^a ± 2,9	15,29 ^b ± 1,01
FC (g/cm ³)	1,95 ^a ± 0,04	1,82 ^b ± 0,03

GP: ganancia de peso. TCE: tasa de crecimiento específico. FCA: factor de conversión alimenticia. S: sobrevivencia. VPP: valor productivo de la proteína. TEP: tasa de eficiencia proteica. TEA: tasa de eficiencia alimenticia. CA: consumo de alimento. DF: densidad final. FC: factor de condición final. Medias seguidas por letras diferentes en las filas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

Los valores de TCE y FCA para el T-HSL son menores con lo registrado por otros autores en trabajos con juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) de similares pesos y cultivados en RAS bajo densidades normales. Por ejemplo, Effendi *et al.* (2017) reportan valores de 12,10%/d y 1,60; Cipriani *et al.* (2021) señalan valores de 3,34%/d y 1,46 y Wu *et al.* (2021) con valores de 2,68%/d y 1,83 para juveniles de tilapia GIFT respectivamente. Contrastando estos valores con el control tenemos que, estos fueron mejores, sin embargo, en este tratamiento se observó una mayor mortalidad que se obtuvo desde la segunda semana de iniciado el experimento y cuyo posible efecto en la disminución de la densidad en los acuarios permitió un mayor crecimiento a los demás peces a diferencia del T-HSL. Es así que, la sobrevivencia fue el único parámetro donde los peces alimentados con el T-HSL presentaron una ventaja con un valor de 96% sin presentar diferencias significativas ($p > 0,05$) con el control.

En los peces la energía obtenida por la ingestión de alimento es almacenada para ser distribuida y destinada inicialmente para mantenimiento y una fracción para el crecimiento o la maduración sexual. Sin embargo, en una situación de estrés, las rutas metabólicas direccionan la limitada energía destinada para el crecimiento debido a la alta demanda

energética que comprende la activación de las vías hormonales como el eje HPI lo que conduce a la producción de cortisol (Martins *et al.*, 2011; Schreck *et al.*, 2016). Autores como, Dawood *et al.* (2019) reportan que las condiciones intensivas de cultivo para tilapia (*Oreochromis niloticus*) ocasionaron una reducción en el crecimiento de los peces, así como en la tasa de eficiencia alimenticia. Por otro lado, en especies como la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) se observó que el consumo de alimento y el crecimiento disminuyeron a medida que la densidad de cultivo aumentaba (Ellis *et al.*, 2002). En nuestros resultados podemos observar que parámetros como VPP, TEP, TEA, CA y FC en el tratamiento HSL fueron menores comparado con el control, lo cual pudo verse afectado por varios factores dentro de ellos el estrés ocasionado por la densidad además de las características del alimento.

Respecto al VPP y TEP, hubo una mayor retención y utilización de la proteína dietaria en los peces alimentados con el control (7,92 % y 2,39) en comparación con los peces alimentados con T-HSL (3,42 % y 1,17). Estos resultados podrían deberse a la composición aminocídica del hidrolizado de langostino que reemplazó en un 100% a la harina de pescado, como se observa en la Tabla 8 el hidrolizado presenta un mayor porcentaje de aminoácidos en comparación a la composición de la harina de pescado, sin embargo, la cisteína, tirosina y valina se encuentran limitantes. Además, las proteínas hidrolizadas proveen péptidos de muy bajo peso molecular que pueden ser fácilmente absorbidos (Nikoo, 2021). Sobre este tema, Hevroy *et al.* (2005) mencionan que existe una relación inversa entre la inclusión de proteína hidrolizada y la utilización de la misma. Es decir, a una mayor inclusión de proteína solubilizada menor será la utilización, debido a la asincronía en la absorción de los aminoácidos esenciales con los no esenciales. Al no poder ser almacenados en los tejidos, terminan por oxidarse reduciéndose así la disponibilidad para la síntesis de proteínas. En la misma línea, Bureau y Encarnação (2019) señalan que el exceso de algunos aminoácidos en relación a otros conlleva a un efecto negativo en el crecimiento y en la ingesta, al producirse un desbalance en el patrón de aminoácidos libres que es detectado por el cerebro mediante un sistema regulador del apetito. Además, las diferencias en la digestión y absorción de aminoácidos libres provocan un desequilibrio en la disponibilidad durante la síntesis de proteínas afectando al crecimiento y la utilización del alimento (Hepher, 1993; Li *et al.*, 2021). Un punto importante observado en este experimento fue la baja aceptabilidad del T-HSL por los juveniles de tilapia los cuales “escupieron” el alimento, cabe mencionar que la eficiencia de un hidrolizado protéico depende en gran medida del método, parámetros y de los equipos empleados para el proceso de las materias primas, lo que puede afectar sus

propiedades funcionales y nutricionales (Benítez *et al.*, 2008; Gisbert *et al.*, 2018). Hevroy *et al.* (2005) mencionan que la ingesta y el crecimiento de los peces podría estar sujeto al nivel de amargor presente en un hidrolizado, ya que durante el procesamiento se originan péptidos amargos o compuestos lipídicos rancios. Esto al parecer podría haber sido lo que ocurrió con el hidrolizado de subproductos de langostino reflejado en el rechazo del alimento por los peces a pesar de presentar apetito y por ende se registró un menor consumo de T-HSL (749,85 g) en comparación con el control (880,59 g) influyendo en la baja performance de los peces. Siguiendo la misma línea, los valores observados en las densidades finales respecto del tratamiento HSL (15,29 kg/m³) frente al control (22,81 kg/m³) se encuentran relacionados con lo mencionado líneas arriba, al haber una baja utilización de la proteína y verse afectado el crecimiento sumado al bajo consumo del alimento, la biomasa final será menor, sin embargo los peces del control que presentaron una mayor biomasa final se observaron comportamientos más intensos de agresividad y de competencia por el espacio y el alimento lo que afecta al bienestar y rendimiento de los animales.

Por otra parte, autores como Ighwela *et al.* (2011) señalan que un valor de FC mayor a 1 en peces es un signo de buena condición y de un crecimiento isométrico; es así que, en ambos tratamientos se registró un valor superior a 1, siendo mayor en los peces alimentados con la dieta control (1,95 g/cm³), estos resultados se ven explicados debido a que el factor de condición es un reflejo del estatus nutricional de los peces, el cual a su vez también se ve afectado por la densidad de cultivo (Ellis *et al.*, 2002).

Finalmente, podemos comprobar que la densidad de cultivo es un estresor que afecta a la performance productiva de los peces, sin embargo, con la inclusión del hidrolizado de subproductos de langostino se obtiene un buen factor de condición y una mayor sobrevivencia en juveniles de tilapia.

4.3. Evaluación de la condición fisiológica

La condición fisiológica se evaluó a través de los niveles de cortisol sanguíneo y parámetros hematológicos.

a) Evaluación de los niveles de cortisol en suero

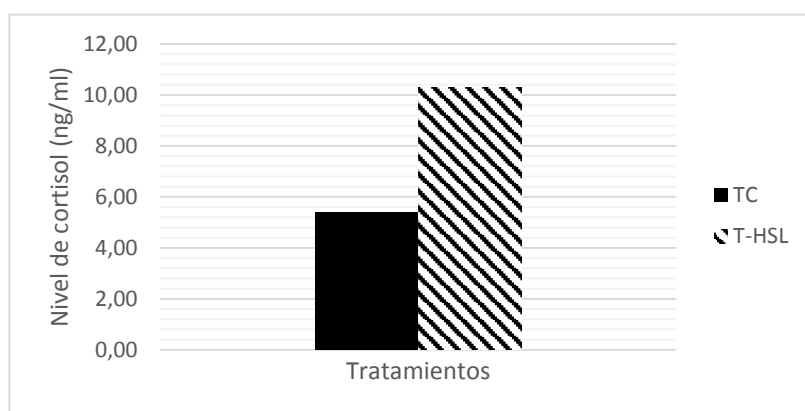
El nivel de cortisol sanguíneo es un indicador común del grado de estrés en los peces (Barton, 2002). Como consecuencia de su liberación, se produce una modificación en el flujo de la limitada reserva energética a causa de la inhibición de la ingesta y la deficiente absorción de energía intestinal, priorizándose la demanda de energía requerida para los procesos de

mantenimiento (respiración, locomoción, reparación de tejidos y regulación hidromineral) sobre el crecimiento del pez (Wendelaar Bonga, 1997; Schreck *et al.*, 2016).

Los valores de los niveles de cortisol obtenidos en el suero de juveniles de tilapia se muestran en la Figura 5 y Anexo XI. El análisis estadístico muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento control (TC) y el tratamiento HSL (T-HSL), reportándose valores de 5,40 y 10,28 ng/ml respectivamente. Barreto y Volpato (2006) mencionan que los valores de cortisol basales para tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) se encuentran en 5 – 60 ng/ml aproximadamente; mientras que para la especie *Oreochromis mossambicus* los valores son de 20-60 ng/ml y para otras especies alrededor de 10-60 ng/ml, bajo condiciones de un sistema de cultivo intensivo. Asimismo, Barcellos *et al.* (1999) indicaron que los valores basales de cortisol para tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) se encontraban entre 17,45 – 20,16 ng/ml y los valores de estrés crónico entre 27,3 - 47 ng/ml. Por otro lado, algunos autores señalan que el estrés por densidad de cultivo afecta los niveles de cortisol en tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*), sin embargo los valores reportados son variados, por ejemplo, Aketch *et al.* (2014) y Flores-Méndez *et al.* (2022) reportan valores de 72,1 ng/ml y 80-90 ng/ml para tilapia cultivada en alta densidad; mientras que Odhiambo *et al.* (2020) reportaron valores de 6,32 ng/ml. Entonces a pesar de las diferencias encontradas podemos mencionar que nuestros valores de cortisol se encuentran dentro del rango normal para tilapia de Nilo.

Figura 5

Niveles de la hormona cortisol en el suero de juveniles de tilapia de Nilo (Oreochromis niloticus) alimentados con las dietas experimentales.



En nuestro caso cabe mencionar que, si bien el control presentó niveles bajos de cortisol, coincidentemente fue el grupo que presentó la mayor mortalidad durante el experimento; en consecuencia, la densidad en estas unidades experimentales se vio reducida disminuyendo el estrés lo cual se reflejó en los niveles de cortisol. Por otro lado, el tratamiento HSL exhibió una menor mortalidad a pesar de tener una alta presión por densidad, aun así, los niveles de cortisol no fueron elevados y se mantuvieron dentro del rango basal para tilapia de Nilo mantenida en alta densidad, probablemente debido a la astaxantina contenida en el hidrolizado (ver Tabla 9). Sobre este punto Lim *et al.* (2019) en su investigación sobre el impacto de la suplementación de astaxantina en dietas de barramundi (*Lates calcarifer*), mencionan que la astaxantina mitiga los efectos del estrés reduciendo los niveles de cortisol posiblemente a través de la inhibición de la hormona adenocorticotrópica (ACTH), intermediaria en la liberación del cortisol; reportando valores de 9,46 y 6,79 ng/ml para la dieta control y la dieta con mayor incorporación de astaxantina (150 mg/kg), respectivamente. Asimismo, Liu *et al.* (2016) con la suplementación de astaxantina (80 mg/kg) en las dietas del bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) lograron reducir los niveles de cortisol y mejorar la resistencia al estrés causado por el hacinamiento.

Como se observa, los resultados encontrados sobre los niveles de cortisol en tilapia son variados. Sin embargo, la ausencia de una elevación en los niveles de cortisol no necesariamente indica la ausencia de estresores como lo reporta Wendelaar Bonga (1997). El grado y duración de la respuesta frente al estrés puede ser afectado por diversos factores externos e internos, ambientales, genéticos, entre otros, que pueden ser heredables por las especies lo que podría explicar la baja producción de hormonas corticoesteroides frente a estresores en ciertas especies (Barton, 2002). Es así que, en situaciones de estrés crónico como el caso de la densidad de cultivo, algunos peces muestran un bajo nivel de cortisol, debido a la habituación de su organismo a dicha condición (Martínez-Porchas *et al.*, 2009). Por otro lado, Sadoul y Geffroy (2019) mencionan que la carga alostática causada por el estrés crónico desensibiliza al eje Hipotálamo-Hipófisis-Ínterrenal (HPI), encargado de iniciar la cascada de reacciones fisiológicas que terminarían con la liberación del cortisol en la sangre sin reflejar apropiadamente el estado de estrés. En este caso, según Wendelaar Bonga (1997), la respuesta del pez dejaría de ser adaptativa y se convertiría en una respuesta disfuncional afectando el crecimiento, la reproducción y la respuesta inmune. En la misma línea, Wang *et al.* (2019) reportan que juveniles de tilapia de la línea GIFT (*Oreochromis niloticus*) mantenidos en una alta densidad (0.85 kg/m³) en cultivo intensivo, mostraron un

deficiente crecimiento sin mostrar diferencias significativas en los niveles de cortisol respecto a peces cultivados en menores densidades (0,57 y 0,28 kg/m³). Por lo tanto, por nuestros valores obtenidos de cortisol podemos concluir que a pesar de encontrarse dentro del rango basal para la especie, no podemos descartar la presencia de estrés ocasionado por la densidad, por otro lado, podemos mencionar un posible efecto del hidrolizado sobre el nivel de cortisol en juveniles de tilapia.

b) Determinación de parámetros hematológicos

Los parámetros hematológicos son una herramienta útil para evaluar y monitorear el estado fisiológico y la salud de los peces (Wang *et al.*, 2019; Witeska *et al.*, 2021). El estrés ocasionado por la densidad de cultivo afecta al bienestar de los peces en la actividad acuícola. Como consecuencia de la liberación de las hormonas del estrés, el hematocrito en sangre se eleva, al igual que el número de células rojas y como resultado se incrementa la hemoglobina en sangre (Wendelaar Bonga, 1997; Yarahmadi *et al.*, 2015; Witeska *et al.*, 2021).

Los valores reportados para los parámetros hematológicos, como el número de eritrocitos (RBC), hematocrito (Ht) y hemoglobina (Hb), se muestran en la Tabla 13 y Anexo XII; también se detallan los índices hematimétricos como el volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

Tabla 13

Parámetros hematológicos e índices hematimétricos de los juveniles de tilapia de Nilo (Oreochromis niloticus) alimentados con dieta control y HSL en cultivo de alta densidad.

Parámetros (promedio)	Tratamiento Control (TC)	Tratamiento HSL (T-HSL)
RBC (10 ⁶ /ul)	1,8 ^a ± 0,51	1,7 ^a ± 0,30
Ht (%)	32,94 ^a ± 5,26	27,89 ^a ± 2,17
Hb (g/dL)	6,88 ^a ± 0,29	6,03 ^a ± 0,54
VCM (fL)	221,28 ^a ± 131,87	190,86 ^a ± 71,72
HCM (pg)	43 ^a ± 17,04	40,52 ^a ± 14,09
CHCM (g/dl)	21,16 ^a ± 3,90	22,04 ^a ± 4,11

RBC: número de eritrocitos; HT: hematocrito; Hb: hemoglobina; VCM: volumen corpuscular medio, HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media. Medias seguidas por letras diferentes en las filas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Los valores de RBC obtenidos para el tratamiento control (TC) y el tratamiento HSL (T-HSL) fueron 1,8 y 1,7 $10^6/\mu\text{l}$ respectivamente, sin presentar diferencias significativas ($p > 0,05$). Witeska *et al.* (2021) registraron un rango de RBC de 0,5 – 1,5 $10^6/\mu\text{l}$ para especies poco activas y 3 – 4,2 $10^6/\mu\text{l}$ para especies activas; mientras que, Esmaeili (2021) reportó un rango de 0.4 – 5,2 $10^6/\mu\text{l}$ para peces en general, nuestros resultados se hallan dentro de dichos valores y coinciden con los reportados por Hrubec *et al.* (2000) para RBC de tilapias (*Oreochromis niloticus x O. mossambicus x O. aureus* hybrid) cultivadas en altas densidades, que se encuentran entre 1,91-2,83 $10^6/\mu\text{l}$. Por otro lado, tampoco se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) en el Ht, cuyos valores fueron 32,94 y 27,89% para el control y el T-HSL respectivamente. Estos valores coinciden con los reportados por Hrubec *et al.* (2000) para tilapias (*Oreochromis niloticus x O. mossambicus x O. aureus* hybrid) cultivadas en altas densidades (27 – 37%). Por su parte, Wang *et al.* (2019) encontraron en juveniles de tilapia de la línea GIFT (*Oreochromis niloticus*) que a medida que la densidad de cultivo aumentaba los valores de RBC y Ht se incrementaron comparados a los obtenidos en los peces cultivados en menor densidad, reportando valores de 2,20 $10^6/\mu\text{l}$ y 49,34% respectivamente. En el caso de la Hb en el control y en T-HSL los valores fueron 6,88 y 6,03 g/dL correspondientemente, sin diferencias significativas ($p > 0,05$). Estos valores son similares a los reportados por Hrubec *et al.* (2000) que obtuvieron un rango de 7 – 9,8 g/dL de hemoglobina en tilapias (*Oreochromis* hybrid) cultivadas en altas densidades (120 kg/m^3).

En relación a los índices hematimétricos de VCM, HCM y CHCM no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos. Estos valores se encuentran dentro de los rangos reportados por Grant (2015) para peces teleósteos y Hrubec *et al.* (2000) para tilapias cultivadas en altas densidades. Aun así, en el presente trabajo se reporta una correlación positiva entre el Ht y VCM en el control (0,973) en comparación con el T-HSL (0,351). Al respecto, Witeska *et al.* (2021) mencionan que el estrés en peces puede generar hinchazón de los eritrocitos incrementando los valores de Ht y VCM.

El estrés causado por la densidad tiene un efecto sobre los parámetros hematológicos, lo cual ha sido observado en juveniles de esturión (*Acipenser schrenckii*) (Ni *et al.*, 2014), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Yarahmadi *et al.*, 2015), tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Shourbela *et al.*, 2017) entre otros. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos indicar que la inclusión del HSL no genera daño en la salud de las tilapias, como se observa en los parámetros hematológicos y los índices hematimétricos que no presentaron diferencias con el tratamiento control. Nuestros

resultados son similares a los que obtuvieron Aracati *et al.* (2021) quienes al suplementar 200 mg/kg de astaxantina en dietas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) no encontraron diferencias significativas en los parámetros hematológicos ni en los índices hematimétricos (VCM y CHCM) al compararse con los de una dieta comercial.

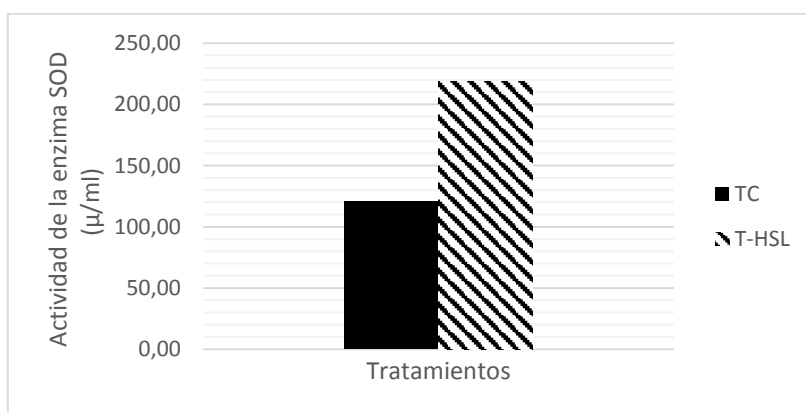
4.4. Evaluación de la actividad antioxidante del hidrolizado (HSL) mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa (SOD) es una de las principales enzimas antioxidantes que actúa como defensa catalizando e inactivando las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos durante el estrés crónico o agudo, principalmente el radical anión superóxido; estos ROS pueden causar daños importantes originando reacciones en cadena debido al daño oxidativo causado en las células y tejidos, llegando a causar la muerte de los peces (Chien *et al.*, 2003; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005; Hoseinifar *et al.*, 2020).

Los valores para la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se muestran en la Figura 6 y Anexo XIII. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento control (TC) y tratamiento HSL (T-HSL), reportándose valores de 120,71 y 218,69 μ /ml respectivamente.

Figura 6

Actividad de la enzima SOD (μ /ml) en plasma de juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados con las dietas experimentales.



El tratamiento control mostró una tendencia similar a la reportada por Dawood *et al.* (2019) quienes reportaron una disminución del SOD (de 34 a 23 IU/L aproximadamente) y otras enzimas antioxidantes en tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) bajo condiciones de cultivo intensivo, y mencionan que la capacidad antioxidante del pez es limitada bajo situaciones de estrés. Igualmente, Shourbela *et al.* (2021) encontraron que las tilapias (*Oreochromis niloticus*) criadas en altas densidades presentaron una baja respuesta antioxidante a través de la actividad del SOD (de 53,83 a 33,17 IU/L) y otras enzimas; también se vio afectada la respuesta inmunológica como la actividad fagocítica y lisosómica.

Analizando nuestros resultados observamos que la dieta con inclusión del HSL el cual contiene astaxantina en su composición (7,7 mg equivalente trolox/g), mostró valores significativamente mayores de actividad de la enzima SOD frente a los peces alimentados con la dieta control. Este hallazgo coincide con los de Bae *et al.* (2021) quienes mencionan que el uso del extracto de hidrolizado de camarón en dietas de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) incrementó la actividad de la enzima SOD (90%) en contraste con lo reportado con su dieta control (65%). Por su parte, Gunathilaka *et al.* (2021) reportan que la suplementación de 5% de hidrolizado de camarón en dieta con bajo nivel de harina de pescado (25%) en la dorada (*Pagrus major*), incrementó la actividad del SOD (81,6%) y fortaleció el sistema inmune de los peces. Asimismo, Liu *et al.* (2016) mejoraron la capacidad antioxidante e inmunitaria del bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) quienes se encontraban sometidos a un estrés por hacinamiento, mediante la suplementación de 80 mg/kg de astaxantina en sus dietas registraron un incremento en la actividad de SOD de 192 U/mg aproximadamente. Lim *et al.* (2019) evaluaron el impacto de la suplementación de diferentes niveles de astaxantina (50, 100 y 150 mg/kg) en dietas de barramundi (*Lates calcarifer*) y concluyeron que la astaxantina estimuló significativamente los parámetros inmunológicos de los peces suplementados frente al grupo control. Por su parte, Xie *et al.* (2017) demostraron que la suplementación dietaria de 200 mg/kg de astaxantina en la dieta del pámpano dorado (*Trachinotus ovatus*) mejoró la capacidad antioxidante *in vivo* e *in vitro* de los peces consiguiendo eliminar una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno.

Wendelaar Bonga (1997) y Lim *et al.* (2019) mencionan que durante el proceso de fagocitosis se liberan enzimas oxidativas y se producen ROS como respuesta de la actividad de la defensa no específica de los organismos frente a un patógeno. Entonces, a mayor nivel de la actividad de la enzima SOD, mayor será la cantidad de radicales superóxido que se

controlarán, mejorándose así las defensas antioxidantes y la respuesta inmune estimulando la fagocitosis en los peces (Chien *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos nos llevan a deducir que el HSL, y su contenido de astaxantina, mejoró la respuesta inmune y antioxidante de juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) mantenidas bajo condiciones de estrés ocasionado por alta densidad, que se reflejó en un buen factor de condición y la buena condición fisiológica de los peces, reforzada por la sobrevivencia observada. Al respecto, Bae *et al.* (2021) mencionan que el uso del extracto de hidrolizado de camarón en dietas para juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) mejoró su resistencia a enfermedades, obteniendo un 100% de sobrevivencia frente a la *Aeromonas hydrophila*. Igualmente, Gisbert *et al.* (2018) obtuvieron una sobrevivencia del 96% en lubinas (*Dicentrarchus labrax*) enfrentadas a un brote de infección natural al incluir 5 % de hidrolizado de camarón. Por su parte, Liu *et al.* (2016) mejoraron la resistencia del bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) a la infección del bacilo *P. mirabilis* suplementando astaxantina en sus dietas.

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se desarrolló el presente experimento podemos concluir que:

La inclusión de hidrolizado de subproductos de langostino (HSL) en las dietas de juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) tuvo un efecto positivo y beneficioso sobre el estrés ocasionado por la alta densidad de cultivo.

El reemplazo del 100% de la harina de pescado por hidrolizado de subproductos de langostino (HSL) en la dieta de los juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) no produjo el mejor performance causado por la palatabilidad del hidrolizado.

El reemplazo del 100% de la harina de pescado por el hidrolizado de subproductos de langostino (HSL) no produce efectos nocivos que atentan contra el bienestar y condición fisiológica de los juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivados en alta densidad.

La inclusión del hidrolizado de subproductos de langostino (HSL) incrementa la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*).

V. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar en futuras investigaciones los análisis de parámetros hematológicos, cortisol y SOD, al inicio y al final del periodo experimental para tener una estimación más exacta frente a los efectos del estrés crónico (densidad), asimismo complementar con otros análisis bioquímicos (glucosa en sangre, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), etc) para tener un diagnóstico más completo.

Evaluar el efecto de diferentes porcentajes de reemplazo de harina de pescado por hidrolizado de subproducto de langostino en dietas para tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Realizar desafíos experimentales inoculando patógenos bacterianos a peces alimentados con dietas donde se incluya el hidrolizado de subproducto de langostino.

Evaluar la palatabilidad del hidrolizado.

Incluir el hidrolizado de subproductos de langostino (HSL) como un ingrediente funcional de efecto inmunoestimulante en dietas de juveniles de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*)

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aketch, B. O., Ang'ienda, P. O., Radull, J. O., & Waindi, E. N. (2014). Effect of stocking density on the expression of glucose transporter protein 1 and other physiological factors in the Lake Victoria Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *International aquatic research*, 6(2). <https://doi.org/10.1007/s40071-014-0069-3>

Al-Harbi, A., & Siddiqui, A. (2000). Effects of Tilapia Stocking Densities on Fish Growth and Water Quality in Tanks. *Asian Fisheries Science*. 13. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/272238411_Effects_of_Tilapia_Stocking_Densities_on_Fish_Growth_and_Water_Quality_in_Tanks

American Veterinary Medical Association (AVMA). (2020) Guidelines for The Euthanasia of Animals. Recuperado de: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>

Ani, J., Manyala, J., Masese, F., & Fitzsimmons, K. (2021). Effect of stocking density on growth performance of monosex Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the aquaponic system integrated with lettuce (*Lactuca sativa*). *Aquaculture and Fisheries*. DOI: 10.1016/j.aaf.2021.03.002

Aquino, R. (2019). Influencia de la densidad de cultivo sobre el estrés en juveniles de *Oreochromis niloticus* cultivados en sistemas con Tecnología Biofloc. (Tesis para obtener el grado de Magister Scientiae en Acuicultura, UNALM). Recuperada de: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3873>

Aracati, M., Oliveira, S., Rodrigues, L., Costa, C., Conde, G., Cavalli, B., Silva, H., Ibelli, B., Scarabel, V., Silva, I., & Belo, M. (2021). Effect of dietary supplementation with astaxanthin on the hematological and biochemical response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ars Veterinaria*, 37(4), 285. <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2021v37n4p285-291>

- Auró de Ocampo, A., & Ocampo, L. (1999). Diagnóstico del Estrés en Peces. *Veterinaria México*, 30(4),337-344. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42330411>
- Bae, J., Song, Y., Moniruzzaman, M., Hamidoghli, A., Lee, S., Je, H., Choi, W., Min, T., & Bai, S. (2021). Evaluation of Dietary Soluble Extract Hydrolysates with or without Supplementation of Inosine Monophosphate Based on Growth, Hematology, Non-Specific Immune Responses and Disease Resistance in Juvenile Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Animals* 2021, 11, 1107. <https://doi.org/10.3390/ani11041107>
- Barcellos, L., Nicolaiewsky, S., De Souza, S., & Lulhier, F. (1999). The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture Research*, 30(11–12), 887–892. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00419.x>
- Barreto, R., & Volpato, G. (2006). Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(12), 1605–1612. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006001200012>
- Barton, B. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Barton, B., & Iwama, G. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticoesteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, pp. 3-26, 1991. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- Battisti, E., Rabaioli, A., Uczay, J., Sutili, L., & Lazzari, R. (2020). Effect of stocking density on growth, hematological and biochemical parameters and antioxidant status of silver catfish (*Rhamdia quelen*) cultured in a biofloc system. *Aquaculture* 524 (2020) 735213. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735213>
- Blaxhall, P., & Daisley, K. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5(6), 771–781. DOI:10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236. Recuperado de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572008000200008&lng=es&tlng=es.

- Bureau, D., & Encarnação, P. (2019). Adequately Defining the Amino Acid Requirements of Fish: The Case Example of Lysine. *Avances en Nutrición Acuícola*. Recuperado de: <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/159>
- Cao, W., Zhang, C., Hong, P., & Ji, H. (2008). Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Food Chemistry*, 109(1), 176–183. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.080
- Cabanillas, L., Gutiérrez, E., González, G., López, L., Castillo, R., Bastidas, P., & Heredia, J. (2021). Valorization of Fermented Shrimp Waste with Supercritical CO₂ Conditions: Extraction of astaxanthin and effect of simulated gastrointestinal digestion on its antioxidant capacity. *Molecules* 2021, 26, 4465. <https://doi.org/10.3390/molecules26154465>
- Cisneros, K. (2021). Producción acuapónica de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y lechuga (*Lactuca sativa*) con adición de nutrientes deficitarios en el sistema. (Tesis para obtener el título de Ingeniero Pesquero, UNALM). Recuperada de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/4915>
- Chakraborty, S., & Banerjee, S. (2010). Effect of Stocking Density on Monosex Nile Tilapia Growth during Pond Culture in India. *World Academy of Science, Engineering and Technology, Open Science Index* 44, *International Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 4(8), 646 - 650. DOI.org/10.5281/zenodo.1057103
- Chien, Y.-H., Pan, C.-H., & Hunter, B. (2003). The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), 216(1–4), 177–191. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(02\)00056-x](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00056-x)
- Chintong, S., Phatvej, W., Rerk-Am, U., Waiprib, Y., & Klaypradit, W. (2019). In Vitro Antioxidant, Antityrosinase, and Cytotoxic Activities of Astaxanthin from Shrimp Waste. *Antioxidants* 2019, 8, 128. <https://doi.org/10.3390/antiox8050128>
- Cipriani, L., Ha, N., de Oliveira, N., & Fabregat, T. (2021). Does ingestion of duckweed (*Lemna minor*) improve the growth and productive performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) given formulated feeds in a recirculation system. *Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society*, 29(5), 2197–2205. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00743-0>

- Cretton, M. (2019) Mejoramiento de la calidad nutricional de alimento balanceado para acuicultura. (Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Departamento de Química, U.N.P.S.J.B.). Recuperado de: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/83444>
- Datta, S. N., Kaur, V. I., Dhawan, A., & Jassal, G. (2013). Estimation of length-weight relationship and condition factor of spotted snakehead *Channa punctata* (Bloch) under different feeding regimes. SpringerPlus, 2(1), 436. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-436>
- Dawood, M., Shukry, M., Zayed, M., Omar, A., Zaineldin, A., & El Basuni, M. (2019). Digestive enzymes, immunity and oxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in intensive conditions. Slovenian Veterinary Research. 56. Doi: 10.26873/SVR-747-2019.
- De León-Ramírez, J., García-Trejo, J., Felix-Cuencas, L., López-Tejeida, S., Sosa-Ferreira, C., & González-Orozco, A. (2022). Effect of the water exchange rate in a recirculation aquaculture system on growth, glucose and cortisol levels in *Oreochromis niloticus*. Latin american journal of aquatic research, 50(2), 267–275. <https://doi.org/10.3856/vol50-issue2-fulltext-2790>
- DeLong, D., Losordo, T., & Rakocy, J. (2009). Tank Culture. Southern Regional Aquaculture Center publicacion N° 282. Recuperado de: <http://aquaculture.ca.uky.edu/publication/tank-culture-tilapia>
- Dobsíková, R., Svobodová, Z., Bláhová, J., Modrá, H., & Velíšek, J. (2009). The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Czech J. Anim. Sci. 54,2009 (11): 510 – 508. DOI 10.17221/52/2009-CJAS
- Effendi, H., Wahyuningsih, S., & Wardiatno, Y. (2017). The use of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivation wastewater for the production of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L. var. longifolia) in water recirculation system. Applied Water Science, 7(6), 3055–3063. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0418-z>
- Ellis, T., North, B., Scott, A., Bromage, N., Porter, M. and Gadd, D. (2002), The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. Journal of Fish Biology, 61: 493-531. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb00893.x>
- El-Sayed, A.-F. (2006). Tilapia Culture (A.-F. M. El-Sayed, Ed.). CABI Publishing.

Martins, C., Conceição, L., & Schrama, J. (2011). Feeding behavior and stress response explain individual differences in feed efficiency in juveniles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), 312(1–4), 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.035>

Esmaeili, M. (2021). Blood Performance: A new formula for fish growth and health. *Biology*, 10(12), 1236. <https://doi.org/10.3390/biology10121236>

Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: Review. *Aquaculture* 500 (2019) 237 – 242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>

Félix-Cuencas, L., García-Trejo, J. F., López-Tejeida, S., de León-Ramírez, J. J., Gutiérrez-Antonio, C., & Feregrino-Pérez, A. A. (2021). Nitrogen and phosphorus flux in wastewater from three productive stages in a hyperintensive tilapia culture. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 11(3), 520–530. <https://doi.org/10.2166/wrd.2021.070>

Flores-Méndez, L. C., Lizárraga-Velázquez, C. E., Sánchez-Gutiérrez, E. Y., Arrizon, J., Leyva-López, N., & Hernández, C. (2022). Study of the effect of dietary agavin supplementation in blood parameters and antioxidant enzymes of juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) under stress conditions. *Fishes*, 7(6), 340. <https://doi.org/10.3390/fishes7060340>

Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (FONDEPES). (2004). Manual de cultivo de la tilapia. Sub-proyecto “Programa de transferencia de tecnología en acuicultura para pescadores artesanales y comunidades campesinas”. Baltazar, P y Palomino, A. Acuerdo de colaboración institucional AECI/PADESPA – FONDEPES. Recuperado de http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manual_tilapia.pdf

Gisbert, E., Fournier, V., Solovyev, M., Skalli, A., & Andree, K. B. (2018). Diets containing shrimp protein hydrolysates provided protection to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) affected by a *Vibrio pelagius* natural infection outbreak. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), 495, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.051>

Gómez, J., Calvo, M., Álvarez, I., Montero, P., & Gómez, M. (2016). Characterization and Storage Stability of Astaxanthin Esters, Fatty Acid Profile and a -Tocopherol of Lipid Extract from Shrimp (*L. Vannamei*) Waste with Potential Applications as Food Ingredient. *Food Chem.* 2017, 216, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.016>

- Grant, K. (2015). Fish hematology and associated disorders. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 18(1), 83–103. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2014.09.007>
- Gunathilaka, B., Khosravi, S., Shin, J., Shin, J., Herault, M., Fournier, V., & Lee, K. (2021). Evaluation of shrimp protein hydrolysate and krill meal supplementation in low fish meal diet for red seabream (*Pagrus major*). *Fisheries and Aquatic Sciences*, 24(3), 109–120. <https://doi.org/10.47853/fas.2021.e11>
- Hepher, B. (1993). *Nutrición de Peces Comerciales en Estanques. (Primera Ed)*. Ciudad de México. Editorial Limusa S.A.
- Hevroy, E., Espe, M., Waagbo, R., Sandnes, K., Ruud, M., & Hemre, G. (2005). Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*, 11(4), 301–313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00357.x>
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. (2006). Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:2, 185-196. DOI: 10.1080/10408690590957188
- Hoseinifar, S., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., & Carnevali, O. (2020). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, DOI: 10.1080/23308249.2020.1795616
- Hrubec, T., Cardinale, J., & Smith, S. (2000). Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*, 29(1), 7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2000.tb00389.x>
- Ighwela, K. A., Ahmed, A. B., & Abol-Munafi, A. B. (2011). Condition factor as an indicator of growth and feeding intensity of Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) feed on different levels of maltose. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 11(4), 559-563. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/235656436_Condition_Factor_as_an_Indicator_of_Growth_and_Feeding_Intensity_of_Nile_Tilapia_Fingerlings_Oreochromis_niloticus_Feed_on_Different_Levels_of_Maltose

- Jiménez-Montealegre, R., Verdegem, M., Zamora, J., & Verreth, J. (2002). Organic matter sedimentation and resuspension in tilapia (*Oreochromis niloticus*) ponds during a production cycle. *Aquaculture Engineering*, 26(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/s0144-8609\(01\)00086-3](https://doi.org/10.1016/s0144-8609(01)00086-3)
- Kalamarz, H. (2017). Cortisol in Correlation to Other Indicators of Fish Welfare. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72392>
- Kalinowski, C., Larroquet, L., Véron, V., Robaina, L., Izquierdo, M., Panserat, S., Kaushik S., & Fontagné-Dicharry, S. (2019). Influence of Dietary Astaxanthin on the Hepatic Oxidative Stress Response Caused by Episodic Hyperoxia in Rainbow Trout. *Antioxidants*. 2019; 8(12):626. <https://doi.org/10.3390/antiox8120626>
- Khosravi, S., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Lee, CR., Dio Bui, HT., Jeong, JB., & Lee, KJ. (2015) Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream (*Pagrus major*). *Fish Shellfish Immunol*. 2015 Aug;45(2):858-68. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.05.039.
- Khosravi, S., Bui, H., Herault, M., Fournier, V., Kim, K.-D., Lee, B.-J., Kim, K.-W., & Lee, K.-J. (2018). Supplementation of protein hydrolysates to a low-fishmeal diet improves growth and health status of juvenile Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*: Hydrolysate in high plant protein diet for flounder. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(5), 897–911. <https://doi.org/10.1111/jwas.12436>
- Leal, A., De Castro, P., De Lima, J., De Souza Correia, E., & De Souza Bezerra, R. (2010). Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) feeds. *Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society*, 18(4), 635–646. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9284-0>
- Leduc, A., Zatylny-Gaudin, C., Robert, M., Corre, E., Corguille, G., Castel, H., Lefevre-Scelles, A., Fournier, V., Gisbert, E., Andree, K., & Henry, J. (2018). Dietary aquaculture by-product hydrolysates: impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4780-0>
- Li, X., Zheng, S., & Wu, G. (2021). Nutrition and functions of amino acids in fish. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1285, 133–168. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54462-1_8

- Lim, C.; Yildirim-Aksoy, M., & Klesius, P. (2009). Lipid and Fatty Acid Requirements of Tilapias. *North American Journal of Aquaculture*, 73, 188-193. DOI:10.1080/15222055.2011.579032.
- Lim, K., Yusoff, F., Shariff, M., Kamarudin, M., & Nagao, N. (2019). Dietary supplementation of astaxanthin enhances hemato-biochemistry and innate immunity of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Aquaculture*, 734339. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734339
- Lim, K. C., Yusoff, F. M., Shariff, M., & Kamarudin, M. S. (2018). Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 738–773. <https://doi.org/10.1111/raq.12200>
- Liu, F., Shi, H.-Z., Guo, Q.-S., Yu, Y.-B., Wang, A.-M., Lv, F., & Shen, W.-B. (2016). Effects of astaxanthin and emodin on the growth, stress resistance and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish & Shellfish Immunology*, 51, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.020>
- Liu, Z., Liu, Q., Zhang, D., Wei, S., Sun, Q., Xia, Q., Shi, W., Ji, H., & Liu, S. (2021). Comparison of the Proximate Composition and Nutritional Profile of Byproducts and Edible Parts of Five Species of Shrimp. *Foods* 2021, 10, 2603. <https://doi.org/10.3390/foods10112603>
- Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L., & Tan, H. (2013). Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture* 422 – 423 (2014) 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.023>
- Martínez-Álvarez, R., Morales, A., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1–2), 75–88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>
- Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L., & Ramos-Enriquez, R. (2009). Cortisol and glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 158-178. Recuperado de: [http://panamjas.org/pdf_artigos/panamjas_4\(2\)_158-178.pdf](http://panamjas.org/pdf_artigos/panamjas_4(2)_158-178.pdf)

Messina, C., Manuguerra, S., Arena, R., Renda, G., Ficano, G., Randazzo, M., Fricano, S., Sadok, S., & Santulli, A. (2021). In Vitro Bioactivity of Astaxanthin and Peptides from Hydrolysates of Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) By-Products: From the Extraction Process to Biological Effect Evaluation, as Pilot Actions for the Strategy “From Waste to Profit”. *Mar. Drugs* 2021, 19, 216. <https://doi.org/10.3390/md19040216>.

Ministerio de la Producción (PRODUCE). (2022). Anuario Estadístico Pesquero y acuícola 2021. Recuperado de: <https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oeedocumentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/1080-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2021>

Molina, C., & Espinoza, M. (2021). Evaluating hydrolysates as functional ingredients in Pacific White shrimp feeds. Recuperado de: <https://www.globalseafood.org/advocate/evaluating-hydrolysates-as-functional-ingredients-in-pacific-white-shrimp-feeds/>

Natt, M., & Herrick, C. (1952). A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. *Poultry Science*, 31(4), 735–738. DOI:10.3382/ps.0310735

Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Bu, Y., Ren, Y., Zhang, M., Song, Z., & Ding, H. (2014). The physiological performance and immune responses of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) to stocking density and hypoxia stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(2), 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.002>

Nikoo, M. (2021). Effective valorization of aquaculture by-products: bioactive peptides and their application in aquafeed. En *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products* (pp. 579–590). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824044-1.00034-9>

Nirmal, N., Santivarangkna, C., Rajput, M., & Benjakul, S. (2020). Trends in shrimp processing waste utilization: An industrial prospective. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.001>

NRC (National Research Council). (2011). *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press. Washington, D.C. Usa. Pags 399.

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(II), 115-126. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=407639218006>

Odhiambo, E., Angienda, P., Okoth, P., & Onyango, D. (2020). Stocking density induced stress on plasma cortisol and whole blood glucose concentration in Nile Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) of Lake Victoria, Kenya. *International Journal of Zoology*, 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/9395268>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2020a). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2022b). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul*. Roma. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2022c). Nile tilapia – Nutritional requirements. Recuperado de: <https://www.fao.org/fishery/affris/perfiles-de-las-especies/nile-tilapia/requerimientos-nutricionales/es/#:~:text=Tilapia%20broodfish%20require%20about%2040,for%20larval%20growth%20and%20survival>.

Osofero, S., Otubusin, S., & Daramola, J. (2007). Effect of stocking density on tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757) growth and survival in bamboo - net cages trial. *African Journal of Biotechnology*. 8. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/237379738_Effect_of_stocking_density_on_tilapia_Oreochromis_niloticus_Linnaeus_1757_growth_and_survival_in_bamboo_-_net_cages_trial

Ostrander, G., & Barnes, S. (2000). *The Laboratory Fish*. Academic press. Johns Hopkins University Baltimore, MD USA. 525 p.

Popma, T., & Lovshin, L. (1996). *Worldwide Prospects for Comercial Production of Tilapia*. Research and Development Series No 41. Interntional Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Department of Fisheries and Allied Allied Aquacultures Auburn University, Alabama 36849. Recuperado de: <http://agriflife.org/fisheries2/files/2013/09/Worldwide-Prospects-for-Comercial-Production-of-Tilapia.pdf>

Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura (PNIPA). (2021). *Cadena de Valor del Langostino. Estudio de prospectiva del langostino. Del Carpio*. Primera edición. Lima-Perú. Recuperado de: <https://repositorio.pnipa.gob.pe>

Rahman, M., Khosravi, S., Chang, K., & Lee, S. (2016). Effects of dietary inclusion of Astaxanthin on Growth, Muscle Pigmentation and Antioxidant Capacity of Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Prev. Nutr. Food Sci.* 2016;21(3):281-288. <http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2016.21.3.281>

Ramírez-Gastón, J., Sandoval, N., & Vicente, K. (2018). Sistema Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura. Fundamentos y propuesta 2017-2022. SERIE: ESTUDIOS DE PREINVERSIÓN 3. PRODUCE. Recuperado de: <https://www.pnipa.gob.pe/wp-content/uploads/2019/02/PESCA-Y-ACUICULTURA-3-1.pdf>

Rozas, M., Walker, R., Muller, A., Bittencourt, P. (2015) Manual de Patología Clínica de peces salmónidos. Determinación de parámetros hematológicos, inmunológicos y mecanismos Involucrados en las respuestas del hospedero a infecciones prevalentes y coinfecciones. PROYECTO FIE 2015-V014. Programa para gestión sanitaria en la acuicultura. Recuperado de: <https://www.pathovet.cl/wp-content/uploads/2018/07/Manual-de-Patologi%CC%81a-Cli%CC%81nica-de-Peces-Salmo%CC%81nidos.pdf>

Sadoul, B., & Geffroy, B. (2019). Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *J Fish Biol.* 2019;94:540–555. DOI: 10.1111/jfb.13904

Schreck, C. B. (2000). Accumulation and long-term effects of stress in fish. In *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare* (eds. G. P. Moberg and J. A. Mench), pp. 147–158. Wallingford: CAB International. <https://doi.org/10.1079/9780851993591.014>

Schreck, C., Tort, L., Farrell, A., & Brauner, C. (2016). *Biology of stress in fish. Fish physiology. Volume 35.* Academic Press.

Sinthusamran, S., Benjakul, S., Kijroongrojana, K., Prodpran, T. & Kishimura, H. (2018). Protein hydrolysates from Pacific white shrimp cephalothorax manufactured with different processes: compositions, characteristics and antioxidative activity. *Waste Biomass Valor* 11, 1657–1670 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0517-1>

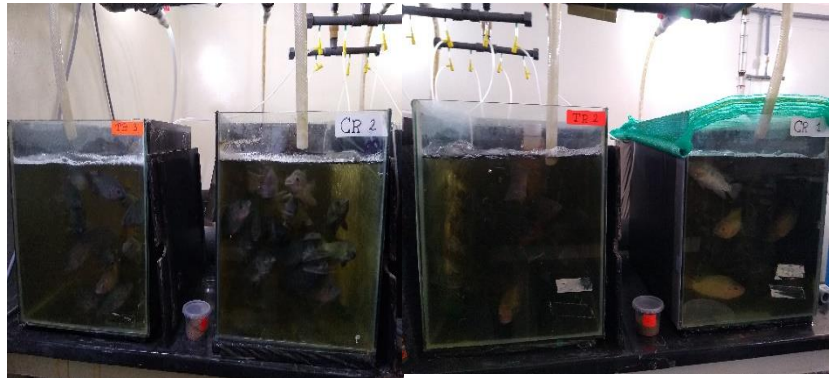
Shourbela, R., ElKholya, S., & ElFadadney, M. (2017). Consequences of high-density fish culture as monitored by growth, behavior and immune responses of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Alexandria journal of veterinary sciences*, 53(2), 45. <https://doi.org/10.5455/ajvs.267244>

- Shourbela, R., El-Hawarry, W., Elfadadny, M., & Dawood, M. (2021). Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), 542(736868), 736868. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736868>
- Sowmya, R., Ravikumar, T., Vivek, R., Rathinaraj, K., & Sachindra, N. (2014). Optimization of enzymatic hydrolysis of shrimp waste for recovery of antioxidant activity rich protein isolate. *Journal of food science and technology*, 51(11), 3199–3207. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0815-8>
- Stryer, L; Berg, J., & Tymoczko, J. (2013). *Bioquímica con aplicaciones médicas*. Editorial Revereté S.A. Barcelona - España
- Timmons, M., Ebeling, J., Wheaton, F., Summerfelt, S., & Vinci, B. (2002). *Recirculating Aquaculture Systems*. Second Edition. NRAC Publication. USA.
- Thurston, R., Russo, R., & Emerson, K. 1979. Aqueous ammonia equilibrium– tabulation of percent un-ionized ammonia. Recuperado de: <http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF/30000I7U.PDF> 34
- Ueberschaer, B. (1999). Fishbase: Tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*). Recuperado de: <https://www.fishbase.se/photos/PicturesSummary.php?StartRow=3&ID=2&what=species&TotRec=21>
- Wang, Y., Xu, P., Nie, Z., Li, Q., Shao, N., & Xu, G. (2019). Growth, digestive enzymes activities, serum biochemical parameters and antioxidant status of juvenile genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at different stocking densities in in-pond raceway recirculating culture system. *Aquaculture Research*, 50(4), 1338–1347. <https://doi.org/10.1111/are.14010>
- Wambua, D., Home, P., Raude, J., & Odimu, S. (2019). Optimization Model for Recirculating Aquaculture Systems (RAS) for Nile Tilapia in Kenya. *Journal of Sustainable Research in Engineering* Vol. 5 (2) 2019, 78-90. Recuperado de: <https://jsre.jkuat.ac.ke/index.php/jsre/article/view/90/89>
- Wendelaar Bonga, S. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*. Vol. 77 (3), 591-625. American Physiological Society. DOI: 10.1152/physrev.1997.77.3.591

- Witeska, M., Kondera, E., Lugowska, K., & Bojarski, B. (2021). Hematological methods in fish-Not only for beginners. *Aquaculture* 547 (2022) 737498. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737498>
- Wu, J.-P., Liu, W., Wen, H., Zhou, Y., & Wu, J.-J. (2021). Animal byproducts with or without enzymatic hydrolysis completely replacement of fish meal in genetically improved farmed tilapia diets (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 52(1), 291–301. <https://doi.org/10.1111/are.14892>
- Xie, J., Chen, X., Niu, J., Wang, J., Wang, Y., & Qiang-qiang, L. (2017). Effects of astaxanthin on antioxidant capacity of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in vivo and in vitro. *Fish Aquatic Sci* 20, 6 (2017). <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0052-1>
- Xie, S., Yin, P., Tian, L., Yu, Y., Liu, Y., & Niu, J. (2020). Dietary Supplementation of Astaxanthin Improved the Growth Performance, Antioxidant Ability and Immune Response of Juvenile Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) Fed High-Fat Diet. *Marine Drugs*. 2020; 18(12):642. <https://doi.org/10.3390/md18120642>
- Yarahmadi, P., Miandare, H., Hoseinifar, S., Gheysvandi, N., & Akbarzadeh, A. (2015). The effects of stocking density on hemato-immunological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society*, 23(1), 55–63. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9797-z>
- Zafar, A., Roni, M. A., Rana, M., & Akter, N. (2022). Growth, digestive enzyme activities, proximate composition and hemato-biochemical responses of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at various stocking densities in a recirculatory aquaculture system. *Journal of Applied Aquaculture*, 1–23. <https://doi.org/10.1080/10454438.2022.2102957>

VII. ANEXOS

ANEXO I. Galería de fotos



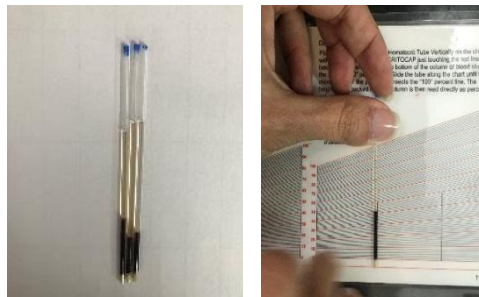
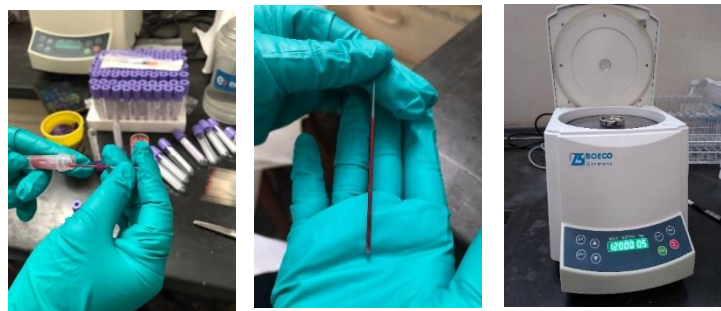
Unidades experimentales sistema RAS



Medición de parámetros de calidad de agua de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*)



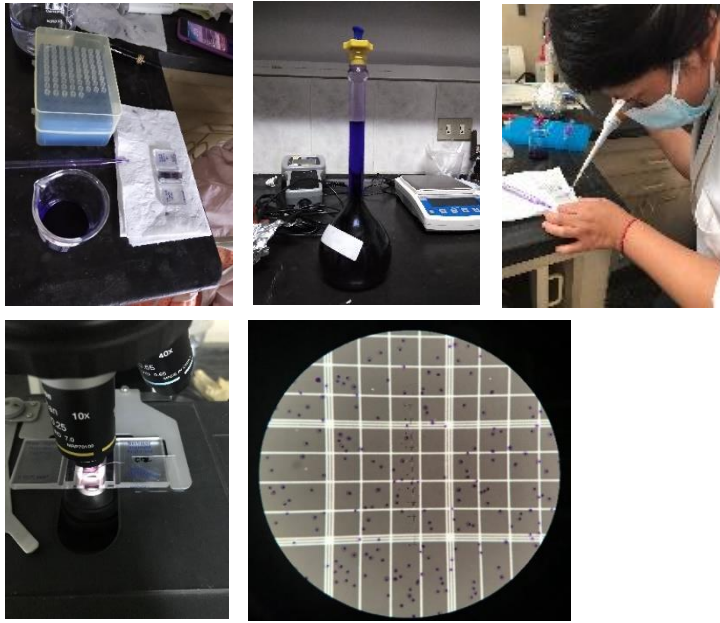
Extracción de sangre, obtención de suero y plasma de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*)



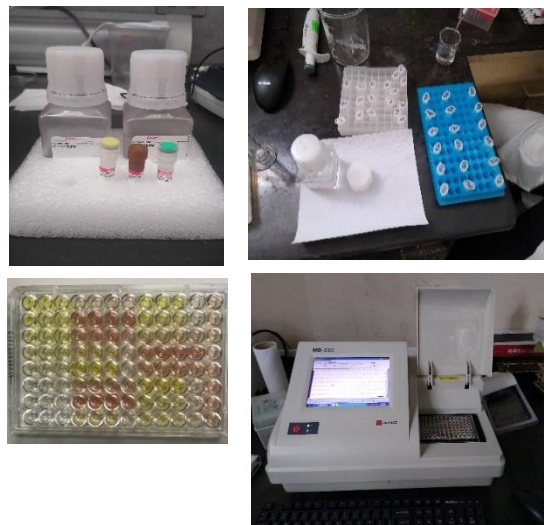
Medición de hematocrito de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*)



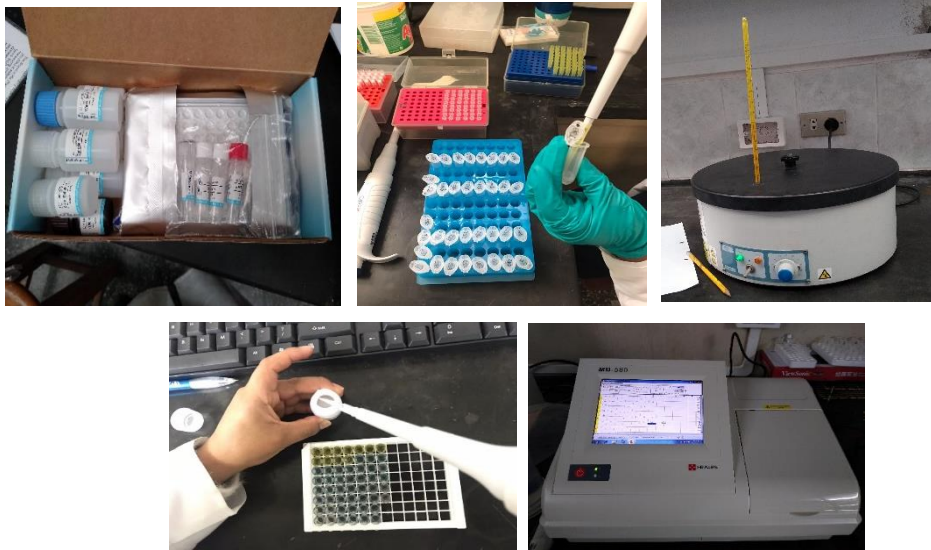
Medición de hemoglobina de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*)



Recuento de Eritrocitos de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*)



Determinación de la actividad de la enzima Sod (u/ml) de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*)



Determinación de cortisol en suero de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ANEXO II. Análisis de varianza de los parámetros de calidad de agua

- **Temperatura (°C)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT 2		0,046431	0,023215	32,2	0,003
Error	4	0,002884	0,000721		
Total	6	0,049315			

- **Oxígeno disuelto (mg/L)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT 2		0,0408	0,0204	2,55	0,193
Error	4	0,03198	0,007996		
Total	6	0,07278			

- **pH**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT 2		0,003924	0,001962	1,27	0,375
Error	4	0,006191	0,001548		
Total	6	0,010115			

- **NAT (mgNAT/L)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	2	0,001174	0,000587	0,25	0,792
Error	4	0,009477	0,002369		
Total	6	0,010651			

- **Amoniaco (mg NH3/L)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tratam	2	0,000097	0,000049	4,76	0,088
Error	4	0,000041	0,000010		
Total	6	0,000138			

- **Nitrito (mg NO2/L)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	2	0,008419	0,004209	1,76	0,283
Error	4	0,009581	0,002395		
Total	6	0,018			

- **Nitrato (mg NO3/L)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	2	3,065	1,532	0,06	0,944
Error	4	104,767	26,192		
Total	6	107,832			

- **Ortosfato (mg PO4/L)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	2	0,02678	0,01339	0,79	0,513
Error	4	0,0676	0,0169		
Total	6	0,09438			

ANEXO III. Análisis de varianza de los parámetros productivos

- Ganancia de peso (GP)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	913,76	913,756	163,27	0,000
Error	4	22,39	5,597		
Total	5	936,14			

- Tasa de crecimiento específico (TCE)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	3,80459	3,80459	196,71	0,000
Error	4	0,07736	0,01934		
Total	5	3,88196			

- Factor de conversión alimenticia (FCA)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	0,8594	0,85936	28,66	0,006
Error	4	0,1199	0,02999		
Total	5	0,9793			

- Sobrevivencia

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	104,2	104,17	2,27	0,206
Error	4	183,3	45,83		
Total	5	287,5			

- Valor productivo de la proteína (VPP)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	30,3587	30,3587	2215,07	0,000
Error	4	0,0548	0,0137		
Total	5	30,4135			

- Tasa de eficiencia alimenticia (TEA)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	2121,4	2121,37	63,98	0,001
Error	4	132,6	33,16		
Total	5	2254,0			

- **Tasa de eficiencia protéica(TEP)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	2,22849	2,22849	100,51	0,001
Error	4	0,08869	0,02217		
Total	5	2,31718			

- **Consumo de alimento (CA)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	25638	25638	10,39	0,032
Error	4	9866	2466		
Total	5	35504			

- **Densidad final (DF)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	84,73	84,734	17,94	0,013
Error	4	18,90	4,724		
Total	5	103,63			

- **Factor de condición final (FC)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	0,026021	0,026021	18,64	0,012
Error	4	0,005583	0,001396		
Total	5	0,031603			

ANEXO IV. Análisis de varianza - Niveles de cortisol

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	35,63	35,628	8,05	0,047
Error	4	17,71	4,429		
Total	5	53,34			

ANEXO V. Análisis de varianza de los parámetros hematológicos

- Recuento de eritrocitos (RBC)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	0,02449	0,02449	0,14	0,726
Error	4	0,69281	0,17320		
Total	5	0,71730			

- Hematocrito (Ht)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	38,34	38,34	2,37	0,198
Error	4	64,65	16,16		
Total	5	102,99			

- Hemoglobina (Hb)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	1,0725	1,0725	5,74	0,075
Error	4	0,7480	0,1870		
Total	5	1,8204			

- Volumen Corpuscular Medio (VCM)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	1388	1388	0,12	0,743
Error	4	45068	11267		
Total	5	46456			

- **Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	9,225	9,225	0,04	0,855
Error	4	977,774	244,444		
Total	5	986,999			

- **Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	1,167	1,167	0,07	0,801
Error	4	64,306	16,077		
Total	5	65,473			

ANEXO VI. Análisis de varianza – Actividad de la enzima SOD

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	14400	14400	8,84	0,041
Error	4	6516	1629		
Total	5	20916			

ANEXO VII. Datos registrados de los parámetros de calidad de agua

Parámetros	Control R1	Control R2	Control R3	Dieta Prueba R1	Dieta Prueba R2	Dieta Prueba R3	Filtro
Temperatura (°C)	27,23	27,23	27,26	27,26	27,26	27,20	27,47
Oxígeno Disuelto (mg/L)	6,32	6,35	6,22	6,52	6,31	6,40	6,51
pH	7,58	7,58	7,52	7,62	7,54	7,57	7,51
NAT (mg /L)	1,63	1,664	1,754	1,66	1,71	1,68	1,646
Amoniaco (mg NH3/L)	0,048	0,048	0,044	0,054	0,048	0,047	0,039
Nitrito (mg NO2/L)	1,00	1,01	1,01	0,98	0,98	1,10	0,92
Nitrato (mg NO3/L)	83,7	70,3	75,0	77,1	76,1	72,5	77,0
Ortosfato (mg PO4/L)	2,59	2,61	2,40	2,66	2,42	2,41	2,35

ANEXO VIII. Parámetros productivos

Parámetros	Control R1	Control R2	Control R3	Dieta Prueba R1	Dieta Prueba R2	Dieta Prueba R3
Ganancia de peso (g)	42	46,64	48,1	20,77	19,94	21,99
Tasa de crecimiento específico (%/d)	3,9	4,16	4,23	2,49	2,42	2,61
Factor de conversión alimenticia (FCR)	1,36	1,04	1,12	2,13	1,89	1,77
Sobrevivencia (%)	80	95	90	90	100	100
Valor Productivo de la Proteína (VPP) (%)	7,92	7,92	7,92	3,56	3,24	3,47
Tasa de eficiencia alimenticia (%TEA)	82,92	98,32	93,09	52,24	52,88	56,40
Tasa de eficiencia protéica (TEP)	2,17	2,57	2,44	1,14	1,15	1,23
Consumo de alimento total (CA)	810,47	901,29	930,01	715,72	754,06	779,78
Densidad final (kg/m ³)	19,49	24,85	24,09	14,22	15,45	16,21
Factor de condición final (g/cm ³)	1,9	1,99	1,96	1,79	1,84	1,82

ANEXO IX. Análisis proximal de las dietas experimentales

Composición proximal (%)	Dieta Control	Dieta HSL
Humedad	6,50	10,18
Proteína total	36,0	41,0
Grasa	12,94	15,39
Fibra cruda	1,83	1,87
Ceniza	8,62	7,78
ELN	34,37	23,58

ANEXO X. Análisis proximal de los peces al inicio y final del experimento

Composición proximal (%)	Inicio	Final	
		Control	HSL
Humedad	8,06	6,51	6,95
Proteína total	55,68	55,25	54,26
Grasa	16,19	21,02	23,26
Fibra cruda	0,43	0,19	0,18
Ceniza	17,79	15,15	15,11
ELN	1,85	1,88	0,24

ANEXO XI. Datos obtenidos para determinar el nivel de cortisol

Tratamientos	Absorbancia (540 nm)		Promedio	Nivel de cortisol (ng/ml)
Control Rep 1				
C 1,1	0,6949	0,6496	0,67225	0,604
C 1,2	0,379	0,4059	0,39245	7,530
C 1,3	0,4536	0,4547	0,45415	3,793
Control Rep 2				
C 2,1	0,3787	0,3502	0,36445	10,665
C 2,2	0,3857	0,3977	0,3917	7,598
C 2,3	0,3973	0,3892	0,39325	7,459
Control Rep 3				
C 3,1	0,3985	0,4098	0,40415	6,559
C 3,2	0,4588	0,4523	0,45555	3,739
C 3,3	0,7134	0,5937	0,65355	0,689
Dieta Prueba Rep 1				
DP 1,1	0,4468	0,3803	0,41355	5,888
DP 1,2	0,3797	0,3854	0,38255	8,491
DP 1,3	0,3022	0,3378	0,32	19,673
Dieta Prueba Rep 2				
DP 2,1	0,369	0,3865	0,37775	9,011
DP 2,2	0,3952	0,37	0,3826	8,486
DP 2,3	0,3496	0,3415	0,34555	13,702
Dieta Prueba Rep 3				
DP 3,1	0,3775	0,3581	0,3678	10,216
DP 3,2	0,5288	0,3546	0,4417	4,322
DP 3,3	0,2598	0,4424	0,3511	12,712

ANEXO XII. Parámetros hematológicos e índices hematimétricos

Parámetros	Control R1	Control R2	Control R3	Dieta Prueba R1	Dieta Prueba R2	Dieta Prueba R3
Hemoglobina (g/dL)	6,550	7,077	7,008	6,597	5,519	5,983
Hematocrito (%)	38,67	31,83	28,33	25,67	30,00	28,00
RBC (10 ⁶ /ul)	1,27	2,01	2,24	1,97	1,78	1,39
VCM (fL)	372,66	159,90	131,29	129,33	173,63	269,63
HCM (pg)	62,54	35,25	31,22	33,50	31,33	56,74
CHCM (g/dl)	16,90	22,02	24,56	26,23	18,01	21,89

ANEXO XIII. Datos para determinar la actividad de la enzima SOD

Tratamientos	Absorbancia			Promedio	Actividad SOD (u/ml)
Control Rep 1					
C 1,1	0,1745	0,1903	0,1882	0,184	46,182
C 1,2	0,4626	0,5386	0,5029	0,501	381,765
C 1,3	0,3382	0,3764	0,3669	0,361	33,901
Control Rep 2					
C 2,1	0,2355	0,2365	0,2615	0,245	27,126
C 2,2	0,4555	0,382	0,3663	0,401	4,540
C 2,3	0,26	0,2722	0,2845	0,272	268,895
Control Rep 3					
C 3,1	0,4695	0,5037	0,5285	0,501	275,959
C 3,2	0,1966	0,2173	0,1991	0,204	38,582
C 3,3	0,388	0,3382	0,3291	0,352	9,476
Dieta Prueba Rep 1					
DP 1,1	0,2965	0,2441	0,2707	0,270	21,560
DP 1,2	0,2108	0,209	0,2071	0,209	314,071
DP 1,3	0,4025	0,4429	0,4362	0,427	429,213
Dieta Prueba Rep 2					
DP 2,1	0,2788	0,2785	0,2944	0,284	268,465
DP 2,2	0,3456	0,3374	0,3976	0,360	162,768
DP 2,3	0,2264	0,2047	0,2038	0,212	57,074
Dieta Prueba Rep 3					
DP 3,1	0,2	0,1857	0,1982	0,195	42,070
DP 3,2	0,2259	0,2306	0,2375	0,231	108,031
DP 3,3	0,2879	0,305	0,3123	0,302	564,996