

Universidad de La Laguna

Facultad de Ciencias: Sección de Biología

Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología

**Efecto de la inclusión de algas de arribazón
de Canarias en la dieta del Pacú de vientre
rojo (*Piaractus brachypomus*)**

**Effect of the inclusion of macroalgal wracks
from the Canary Islands in the diet of red
belly Pacu (*Piaractus brachypomus*).**

Trabajo de Fin de Grado

Víctor González Alonso

Tutorizado por Dra. Covadonga Rodríguez González y Dra. Diana B. Reis

Grado en Biología. Septiembre 2020

El presente trabajo forma parte del Proyecto Interreg MACBIOBLUE (MAC/1.1b/086), “Proyecto demostrativo y de transferencia tecnológica para ayudar a las empresas a desarrollar nuevos productos y procesos en el ámbito de la Biotecnología Azul de la Macaronesia”.

Financiación: Interreg MAC 2014-2020 Cooperación Territorial.



Índice

Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción	2
1.1. Importancia y producción de la acuicultura	2
1.2. Importancia y aplicaciones de las algas	3
1.3. Macroalgas de arribazón	4
1.4. Biología del Pacú de vientre rojo	4
1.5. Importancia de los lípidos en la nutrición de peces y síntesis de LC-PUFA	6
2. Objetivos	8
3. Material y métodos	8
3.1. Cultivo del Pacú de vientre rojo	8
3.2. Análisis de la composición lipídica	11
3.2. Extracción de lípidos y determinación de la humedad del tejido muscular	11
3.3. Determinación de clases lipídicas	11
3.4. Determinación del perfil de ácidos grasos	12
3.5. Determinación de la composición lipídica del pienso	13
3.6. Determinación de peróxidos lipídicos en el tejido muscular	14
3.7. Análisis estadístico	15
4. Resultados y discusión	15
4.1. Crecimiento en peso y supervivencia	16
4.2. Lípido total y clases lipídicas de <i>P. brachypomus</i>	18
4.3. Perfil de ácidos grasos de <i>P. brachypomus</i>	19
4.4. Oxidación lipídica del músculo	23
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía	24

Resumen

En el presente estudio se evaluó el efecto de la inclusión de macroalgas de arribazón de Canarias en la dieta del Pacú de vientre rojo (*Piaractus brachypomus*). Para ello, se comparó el efecto de una dieta experimental, pienso comercial suplementado al 15% con un triturado de arribazón multiespecífico y del mismo pienso comercial sin inclusión del triturado (dieta control) en el crecimiento, supervivencia, contenido y perfil lipídico (clases lipídicas y ácidos grasos), además del índice de peróxidos del músculo de los ejemplares. La dieta experimental, indujo a un menor crecimiento, aunque se observó una mayor tasa de supervivencia. El contenido lipídico total del músculo del pacú fue similar entre tratamientos, aunque el perfil mostró un menor contenido de colesterol y ácidos grasos saturados con el tratamiento experimental, así como, un aumento de los ácidos grasos monoinsaturados, sobre todo del 18:1n-9, debido al uso del aceite de oliva como aglutinante del polvo de arribazón. El índice de peróxidos fue igualmente inferior en el tratamiento experimental. Así, la inclusión al 15% de algas en la dieta del pacú, aportó una mejora en la tasa de supervivencia, generando además un menor estado oxidativo del músculo debido, probablemente, a la presencia en las algas de metabolitos con actividad antioxidante.

Abstract

In the present study the effect of the inclusion of macroalgae wracks from the Canary Islands in the diet of the pacu, *Piaractus brachypomus* was evaluated. To this end, the effects of an experimental diet formulated with a commercial diet supplemented at a 15% with macroalgae wrack powder and the same commercial feed without any macroalgae inclusion (control diet), were compared on fish growth, survival, lipid content and profile, as well as the peroxide index of muscle. The inclusion of macroalgae in the diet induced a lower growth, but, a higher survival rate. While the total lipid content of pacu muscle was similar between treatments, its profile presented lower cholesterol and saturated fatty acids contents in experimental fish, The increase in the monosaturated fatty acids, especially 18:1n-9, was also evident due to the inclusion of olive oil in the experimental diet as a binder of the macroalgae wrack powder. The muscle peroxide index was also lower in the experimental treatment. Thus, the inclusion of 15% of algae in the diet of the pacu, induced a higher survival rate and a lower oxidation state, probably due to the presence of metabolites with antioxidant activity in the macroalgae.

1. Introducción

1.1. Importancia y producción de la acuicultura

Según la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en 2015 la población mundial era de 7.300 millones y se prevé un aumento de 2.000 millones de personas en los próximos 30 años, hasta alcanzar los 9.700 millones en 2050. Por ello existe hoy en día una necesidad de suplir la demanda mundial de proteína de origen animal, lo que obliga a optimizar las técnicas para la producción de alimento. La acuicultura es considerada como unas de las actividades económicas de mayor desarrollo y crecimiento. En 2018 la producción mundial de pescado alcanzó aproximadamente los 179 millones de toneladas de los cuales 82 millones de toneladas provienen de la acuicultura, representando así un 46% de la producción total. Sin embargo, cabe destacar que, si consideramos solamente la producción de pescado para consumo humano, la acuicultura representa ya el 52% de la producción. En ese mismo año la acuicultura alcanzó un récord histórico en su producción mundial alcanzando los 114,5 millones de toneladas, con una producción total de 82,1 millones de toneladas de animales acuáticos, 32,4 millones de toneladas de algas acuáticas y 26.000 toneladas de conchas y perlas ornamentales (FAO, 2020). En relación a especies, la producción acuícola mundial está liderada por dos algas, la Laminaria japónica (*Saccharina japónica*) con 11,2 millones de toneladas y el alga Eucheuma (géneros *Eucheuma* y *Kappabyctus*) con 8,6 millones de toneladas producidas en el año 2017 y cuya diferencia con el pez de mayor producción, la carpa china (*Ctenopharyngodon idella*) con 5,5 millones de toneladas, es más que notable (APROMAR, 2019).

Además de para consumo humano, otro de los grandes destinos de la producción de pescado mundial es la producción de harinas y aceites de pescado, para su uso en la alimentación animal. El uso de piensos basados en estos ingredientes fue en muchos cultivos, todo un éxito en su origen, debido a su elevada aceptabilidad por la mayoría de especies cultivadas, cubriendo además las necesidades nutricionales de las mismas. Sin embargo, la utilización exclusiva de estos ingredientes puso de manifiesto su amenaza hacia la sostenibilidad de la acuicultura, haciendo que hoy en día, muchas industrias busquen ingredientes alternativos más sostenibles que sigan supliendo las necesidades nutricionales de los peces y que a su vez permitan una riqueza alimenticia a los humanos (Tocher, 2015).

1.2. Importancia y aplicaciones de las algas

Las macroalgas han estado ligadas tradicionalmente a la alimentación humana, principalmente en países asiáticos, siendo utilizadas como un alimento en sí mismas o bien haciendo uso de componentes contenidos en ellas utilizados como conservantes o aditivos en la industria alimenticia (APROMAR, 2019; Quitral et al., 2012). Uno de los productos más interesantes que se busca conseguir en la explotación acuícola de algas son los ficocoloides. Son polisacáridos de diversa índole (alginatos, carrageninas, agar y fucoidinas) cuya aplicación potencial en un amplio abanico de industrias es más que patente. Por ejemplo, la industria textil hace uso de los alginatos como espesantes que no interactúan con colorantes, o en la industria alimenticia donde los ficocoloides como el agar y las carrageninas son utilizados ampliamente como conservantes, espesantes y agentes gelificantes (Ayarza-León, 2014; Lees y Barton, 2003).

Los pigmentos fotoprotectores (carotenos, astaxantinas o clorofilas) existentes en las algas han demostrado inducir la regeneración celular, una estimulación en la síntesis de colágeno, así como funciones antioxidantes que permiten un uso potencial en productos de cosmética. Además, compuestos bioactivos procedentes del metabolismo secundario de macroalgas poseen actividades antifúngicas, antibacterianas y antivirales que han despertado un creciente interés en el ámbito farmacéutico (Ariede et al., 2017; Grassauer et al., 2010; Kim y Chojnacka, 2016).

Además, se ha demostrado que las algas pueden llevar a cabo una función muy relevante en los cultivos acuícolas integrados o acuicultura multitrófica, como un sistema de filtración biológica de gran eficiencia frente al amonio o nitrato procedente de las heces de los peces y otras especies animales cultivadas y cuyo efecto nocivo puede provocar una pérdida considerable en el rendimiento del sistema y un importante impacto ambiental (De paula et al., 2008; Osorio et al., 2018).

En vista al consumo de algas como alimento, la evolución en el desarrollo tecnológico de su procesado ha permitido la reducción en cuanto a factores anti-nutricionales, permitiendo además una mayor disponibilidad de compuestos favorables a la nutrición humana y animal, tales como fibras dietéticas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos y minerales como calcio o magnesio (Fleurence et al., 2012; Quitral et al., 2012). La presencia de estos componentes en la alimentación ha hecho que sean consideradas también como un potencial sustituyente a las harinas y aceites de pescados pelágicos de

los piensos comerciales que son utilizados en la acuicultura, y cuya sostenibilidad en la producción es cada vez más cuestionada.

1.3. Macroalgas de arribazón

Los arribazones hacen referencia a la llegada de comunidades de macroalgas a las costas, como consecuencia de la fuerza del oleaje que hace que se desprendan ejemplares del sustrato marino y sean arrastrados por la corriente hasta zonas costeras donde se acumulan. Los arribazones pueden actuar como una barrera natural frente a la erosión marina costera y a su vez, como aporte de materia orgánica que es aprovechada por la flora y fauna autóctona como alimento (Becherucci et al., 2016). En Canarias, los arribazones de algunas algas rojas del género *Gelidium* y *Pterocladia* eran utilizados para la recolección de agar. Por otro lado, la llegada de arribazones de *Cymodocea nodosa* junto con otras especies como *Treptacantha abies-marina* fueron utilizados como fertilizantes o como relleno de colchones. Sin embargo, el incremento del turismo costero y la pérdida de acciones de explotación de estas algas han hecho que los arribazones sean eliminados en cantidades importantes de las costas canarias, haciendo que se pierda su papel ecológico en los ecosistemas intermareales (Hahnefeld, 2008). Su retirada supone además un alto coste económico. Ya en los últimos años se está estudiando su potencial como productos naturales de compostaje (Eyras et al., 1995) o como posible sustituto a las harinas y aceites de pescado en la formulación de piensos para la alimentación de organismos acuáticos

1.4. El Pacú de vientre rojo

El Pacú de vientre rojo (*Piaractus brachipomus*) es una especie de considerable importancia en la acuicultura de países latinoamericanos como Colombia, Brasil, Perú o Venezuela, además de países de Asia como Vietnam, Tailandia, Malasia o Bangladesh donde fue introducido (Kumar et al., 2018). Su cultivo ha tomado un protagonismo relevante, debido a su rápida tasa de crecimiento, de ser resistente a enfermedades, así como de ser capaz de tolerar niveles bajos de oxígeno (Chagas et al., 2007). A pesar de que el origen de su cultivo fue como pez ornamental, su carne posee una buena calidad. Además, ha sido demostrada su aceptación como miembro compatible en policultivos con carpas, lo cual hace más eficiente los métodos de explotación de estas especies al poder compartir un mismo espacio (Kumar et al., 2018).

El Pacú de vientre rojo es un actinopterigio (pez con aletas radiadas), perteneciente a la familia Serrasalminidae (antiguamente incluido en la familia Characidae), y al género *Piaractus*. Este pez posee un cuerpo comprimido lateralmente con aleta adiposa pequeña situada a medio camino entre la aleta caudal y dorsal (Figura 1) y se caracteriza por tener un color gris oscuro en el dorso y blanquecino en los costados con manchas anaranjadas en el vientre, mentón, aletas pectorales y de forma ocasional en los radios mayores de las aletas anales (García et al., 2005). La talla de los ejemplares salvajes y maduros sexualmente oscila entre los 52cm y los 88cm, alcanzando un peso máximo de hasta 25kg. Sin embargo, en cautividad estas tallas de interés comercial son inferiores, pudiendo alcanzar un peso entre 390-520g, así como una longitud entre 23-25cm en base al peso del ejemplar (Abad et al., 2014).



Figura 1. Vista lateral de Pacú de vientre rojo (Reenamole y D'cruz, 2014).

Esta especie de pez, posee dos hileras de dientes aplanados, especializados en triturar semillas y otros frutos duros, sin embargo, no están tan desarrollados como los de la piraña de vientre rojo (*Pygocentrus nattereri*) cuyas coloraciones son simuladas por los juveniles de Pacú sobretodo, con la finalidad de evitar depredadores (Reenamole y D'cruz, 2014). Su alimentación pasa de plancton en etapas juveniles, a omnívora y finalmente en estado adulto su dieta es fundamentalmente vegetal (Hensel, 2004). Sin embargo, en cautividad lleva una dieta omnívora, muy proteica basada en alimento comercial para peces como Koi o cíclidos (Reenamole y D'cruz, 2014), dada su palatabilidad y su alto valor nutricional. Sin embargo, se han estudiado alternativas de alimentación más sostenibles y más baratas como por ejemplo harinas de soja, estando estas más relacionadas con la dieta herbívora que lleva a cabo la especie en la naturaleza

y obteniéndose además un rendimiento de producción similar al conseguido con las harinas comerciales (Fernandes et al., 2001).

1.5. Importancia de los lípidos en la nutrición de peces y síntesis de LC-PUFA

Los lípidos y sus componentes principales, los ácidos grasos (AG), son, junto con las proteínas, los principales componentes orgánicos del pescado. Los lípidos juegan un papel importante en los procesos de producción de energía y como fuente de ácidos grasos esenciales (AGE). Además, de estas, los lípidos tienen otras funciones dietéticas importantes como portadores de ciertos nutrientes no grasos como las vitaminas liposolubles A, D y K (Watanabe, 1982). Los requerimientos en AGE en peces difieren considerablemente entre especies. Los ácidos grasos poliinsaturados de 18 carbonos (PUFA; *poliunsaturated fatty acids*) tales como el 18:2n-6 y el 18:3n-3, se consideran nutrientes esenciales para los vertebrados ya que estos no pueden ser sintetizados *de novo*. Si bien los PUFA no desempeñan funciones biológicas vitales por sí mismos, son precursores metabólicos de los PUFA de cadena larga (de 20 a 24 carbonos; LC-PUFA; *long-chain poliunsaturated fatty acids*) como el ácido araquidónico (20:4n-6, ARA), el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) (Tocher, 2015), siendo estos particularmente importantes para los peces, ya que desempeñan funciones cruciales en procesos fisiológicos vitales (Glencross, 2009). Los LC-PUFA están implicados en el mantenimiento de la integridad, la fluidez y la permeabilidad de la bicapa lipídica, la regulación de la homeostasis, la respuesta inmune e inflamatoria, el funcionamiento de muchos órganos, la modulación de la expresión génica, etc. (Pérez et al., 2014).

La carencia por parte de muchos peces de elongasas y desaturasas que permiten la conversión de precursores (PUFA de 18 carbonos) a ARA, EPA o DHA obliga a adquirir estos LC-PUFA directamente a través de la dieta (Bell y Tocher, 2009; Sheila, 2007; Tocher, 2015; van der Meeren et al., 2009). Es por ello, que la tecnología de la acuicultura busca nuevas formas de alimentación que puedan suministrar estos AGE de una manera eficiente y adaptada a las condiciones fisiológicas y ambientales de las especies cultivadas. Hasta hace muy poco se creía que la capacidad de cada especie para biosintetizar LC-PUFA dependía del hábitat de la especie (agua dulce versus marina), teniendo las especies marinas, en general, una capacidad limitada para convertir PUFA

de 18 carbonos en LC-PUFA y donde los peces de agua dulce/diádromos han conservado la capacidad de elongar y desaturar estos PUFA (Garrido et al., 2019; Monroig et al., 2018). Sin embargo, recientemente se han señalado otros factores como responsables de la capacidad biosintética de LC-PUFA en teleósteos, como el nivel trófico y la filogenia (Castro et al., 2016; Garrido et al., 2019; Monroig et al., 2018).

Los peces, al igual que la gran mayoría de vertebrados, son incapaces de convertir 18:1n-9 en 18:2n-6 debido a la carencia de la enzima desaturasa $\Delta 12$. Del mismo modo, son incapaces de convertir el 18:2n-6 en 18:3n-3 en este caso, por la ausencia de la desaturasa $\Delta 15$. Es por ello que la inclusión directa de estos ácidos grasos en la dieta es esencial para una correcta nutrición. La síntesis de los LC-PUFA se basa en la acción de diferentes enzimas elongasas, que añaden 2 átomos de carbono a la cadena hidrocarbonada de los AG mediante una reacción de condensación y de enzimas desaturasas, que añaden un doble enlace. Así, a través de una desaturación ($\Delta 6$), una elongación y una nueva desaturación ($\Delta 5$) del 18:2n-6 se sintetiza el 20:4n-6 (ARA). Alternativamente, puede tener lugar primero una elongación sobre el 18:2 n-6 seguida de una desaturación por la $\Delta 8$ y posteriormente por la $\Delta 5$. Por la acción de estas mismas enzimas, el 18:3n-3 es convertido a EPA. A su vez el DHA es sintetizado a partir del EPA a través de dos elongaciones consecutivas, una desaturación ($\Delta 6$) y un acortamiento de la cadena mediante la oxidación peroxisomal (la llamada “vía de Sprecher”) o bien por la actividad de una desaturasa $\Delta 4$ sobre el 22:5n-3 (producto de la elongación del EPA) (Bell y Tocher, 2009; Tocher, 2015).

Los organismos marinos y mayoritariamente los peces, incluidas las especies cultivadas, son la principal fuente de n-3 LC-PUFA para humanos (Bell y Tocher, 2009). Sin embargo, la sustitución de los ingredientes marinos ricos en n-3 LC-PUFA, como el aceite y la harina de pescado, por harinas y aceites vegetales en los alimentos acuícolas puede comprometer los efectos beneficiosos que el consumo de pescado tiene para la salud humana (Bell y Waagbø, 2008; Shepherd et al., 2017) De hecho, el reemplazo dietético de aceites de pescado por aceites vegetales reduce el contenido de n-3 LC-PUFA, aumentando el contenido de 18:2n-6 en el músculo del pescado (Pérez et al., 2014; Tocher, 2015) y en consecuencia, su valor nutricional para los consumidores puede verse mermado. Por lo tanto, la necesidad de buscar alternativas nutricionalmente adecuadas y sostenibles para alimentar a los peces de cultivo es obligatoria para continuar la expansión de la acuicultura (Ng, et al, 2013).

Uno de los factores que más preocupan en la calidad del pescado es la autooxidación de los lípidos, sobretodo de PUFA y LC-PUFA, cuyo resultado genera una pérdida en la calidad del producto final. Este proceso se basa en la interacción de los AG del tejido con radicales libres lo cuales se unen y eliminan principalmente a hidrógenos muy reactivos de la cadena del AG, produciendo hidroperóxidos. Esta primera fase es inducida por situaciones de estrés como altas temperaturas o un ambiente altamente oxidante. A su vez estos hidroperóxidos se disgregan en nuevos radicales libres (que interactúan con otros AG) y en compuestos volátiles (aldehídos, cetonas o alcoholes) que son los causantes de la pérdida de calidad de los productos (Parra y Navarrete, 2009; Mendéz et al., 2007). Es por ello que la búsqueda de productos con actividad antioxidante se ha vuelto también una necesidad acuciante en la alimentación, de cara a la óptima producción acuícola.

2. Objetivos

El objetivo principal del presente estudio fue determinar el uso potencial de las macroalgas de arribazón de Canarias como suplemento en la dieta de *P.brachypomus*.

Para ello se pretende cuantificar el efecto de un suplemento dietario del 15% de arribazón multiespecífico (mezcla de diferentes especies de macroalgas) mediante los siguientes objetivos específicos:

- Estudio del crecimiento y supervivencia de los individuos de Pacú de vientre rojo sometidos a un tratamiento experimental (con inclusión de macroalga) frente a un tratamiento control (sin inclusión de macroalgas);
- Comparación del contenido lipídico, composición de clases lipídicas y perfil de ácidos grasos del tejido muscular de los peces alimentados con las ambas dietas;
- Estudio del estado de estrés oxidativo de los peces mediante el análisis de peróxidos del tejido muscular de ejemplares alimentados con las diferentes dietas.

3. Material y métodos

3.1. Cultivo del Pacú de vientre rojo

En el marco del proyecto MACBIOBLUE “*Nuevos productos y procesos en el ámbito de la biotecnología azul de la Macaronesia*” (Intereg, MACBIOBLUE, MAC/1.1B/086), se han alimentado ejemplares de *P. brachypomus* con una dieta de tilapia (*Skretting Tilapia*, Nutreco N.V., Amersfoort, Holanda) suplementada en un 15% con un procesado de polvo de macroalgas, procedente de un arribazón multiespecífico. El arribazón multiespecífico

con abundancias relativas estimadas de 33,8% de *Asparagopsis taxiformis*, 28,6% de *Lobophora* sp., 22,6% de *Dictyota* sp., 14,5% de *Cymopolia barbata* y 0,5% de *Laurencia* sp. fue recogido en las playas de Gran Canaria y procesado por el socio líder del consorcio del proyecto (ITC, Centro Pozo Izquierdo, Las Palmas de Gran Canaria). Una vez en las instalaciones del ITC se procedió a la eliminación de forma manual de trozos de basura y plásticos que se encontraban mezclados en los arribazones, seguido de un ligero lavado con agua dulce para eliminar trozos de basura más pequeños y el exceso de sal. Posteriormente, las macroalgas se secaron al aire y fueron mezcladas y trituradas al tamaño de 1mm, envasadas al vacío y enviadas a la Universidad de La Laguna (ULL). La adquisición y cultivo de los ejemplares de *P. brachypomus* se realizó en las instalaciones de la Fundación Neotrópico, situada en Barranco Grande, Santa Cruz de Tenerife. Un total de 50 ejemplares de *P. brachypomus* fueron distribuidos en sendos sistemas de cultivo acuapónico (25 ejemplares por tanque), con equipamiento de recirculación y filtración independiente. Cada sistema está constituido por un tanque de polietileno de 1.000L de capacidad (100cm x 120cm x 100cm), de los cuales se usaron 900L y estabilizado por una estructura externa de acero galvanizado, una bomba de recirculación (Eheim compact+ 3000, EHEIM GmbH & Co. KG, Deizisau, Alemania) y una bandeja superior de 600L de capacidad (fabricada en material similar al de los tanques de mantenimiento de los peces) rellena de lava volcánica donde se cultivaron acelgas y lechugas (Figura 2). Desafortunadamente, no se pudo medir la parte vegetal hasta que el sistema alcanzó la madurez, una vez finalizado el experimento. Por ello, y debido a que el objetivo de este trabajo se centra en fases experimentales preliminares y en la parte animal del sistema, no se presentarán los resultados del cultivo vegetal en la presente memoria.



Figura 2. Tanques de cultivo de *P. brachypomus*.

Con el fin de cuantificar el efecto de la suplementación dietaria con macroalgas de arribazón, en el cultivo de Pacú de vientre rojo, los ejemplares fueron alimentados a razón del 2% de la biomasa total del tanque con:

- Tratamiento Control - Dieta comercial de *Skretting Tilapia*; peso y talla inicial de los ejemplares de $4,2 \pm 0,1$ g y $6,2 \pm 0,5$ cm, respectivamente;
- Tratamiento Experimental - Dieta comercial de *Skretting Tilapia*, suplementada al 15% con polvo de arribazón multiespecífico; peso y talla inicial de los ejemplares de $4,4 \pm 0,5$ g y $6,3 \pm 0,3$ cm.

Para la formulación de la dieta experimental se trituraron los granos de pienso comercial *Skretting Tilapia*, añadiendo un 15% del procesado de arribazón multiespecifico y 3g de aceite de oliva por cada 100g de pienso para aglutinar la mezcla. Además se añadió un poco de agua, con el fin de poder homogeneizar y compactar la masa y volver a peletizar el pienso de forma manual. Posteriormente se colocaron los pellets en una estufa a 35°C (manteniendo la puerta de la estufa abierta) durante toda la noche, para eliminar la mayor cantidad de humedad posible. Tanto la dieta control como la dieta experimental se mantuvieron en nevera hasta su utilización.

La temperatura del agua en los tanques de cultivo se mantuvo en 24°C de media (máximos de 29,5°C y mínimos de 22°C) y se sustituyó solamente el agua evaporada (un 20% mensual) con una fuente de agua cuyos parámetros limnológicos eran iguales a los de los tanques de cultivo: Dureza: 19°F (grados Franceses)/190°A (grados americanos: 190mg/L) = Agua dura, conductividad de 956 μ S/cm, pH (ud de pH) = 8,68, turbidez de 0,35 UNF y color 0,41mg/L Pt/Co.

Al inicio y final del experimento se procedió a la toma de datos biométricos de los individuos de Pacú de cada tanque con el fin de determinar el incremento en peso y talla después de 117 días de cultivo. Los datos recaudados fueron utilizados para determinar: incremento en gramos = promedio peso final – promedio peso inicial; incremento en cm = promedio talla final – promedio talla inicial; tasa de peso ganado (TPG; %) = (promedio peso final *100)/ promedio peso inicial; Incremento de peso por día (IPD; g) = (promedio peso final – promedio peso inicial)/ número de días del experimento; tasa de crecimiento específico (TCE; %) = (log(promedio peso final) – log(promedio peso inicial)/número de días del experimento)*100. Se calculó también la tasa de supervivencia (S; %) = (número final de ejemplares*100)/número inicial de ejemplares en los tanque de cultivo. Antes de ser manipulados los ejemplares de Pacú fueron anestesiados con Clorobutanol a 0,3mL/L

durante 5 minutos. Al final del experimento se sacrificaron 4 individuos de cada tanque para obtener muestras de músculo que fueron preservadas a -80°C hasta su posterior análisis bioquímico.

3.2. Análisis de la composición lipídica

Los análisis bioquímicos se llevaron a cabo en el laboratorio del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología (U.D. Fisiología Animal) de la Universidad de La Laguna.

3.3. Extracción de lípidos y determinación de humedad

Para la extracción de los lípidos del músculo de los ejemplares de Pacú de vientre rojo se usó el método de Christie (2003), una modificación del método de Folch-Lee et al., (1957). Las muestras analizadas se mantuvieron durante todo el procedimiento de extracción en hielo para evitar su degradación por lipasas, y en la medida de lo posible en oscuridad. Se pesaron entre 200 y 500mg aproximadamente de tejido en base a la disponibilidad de cada muestra, y posteriormente se homogeneizó cada una con 10mL de cloroformo:metanol (CL:MET; 2:1, v/v) repartido de 3 veces en un homogeneizador (Virtishear homogenizar, Virtis Company, NY, USA) y se filtró a través de un filtro (Filter-Lab, Barcelona, España) previamente lavado en CL:MET, para eliminar los residuos sólidos, recuperando el contenido en un tubo limpio. Se añadieron 2,5mL de cloruro potásico (KCl; 0,88% w/v) para la separación entre las fases hidrosoluble (fase superior; no orgánica que contiene fundamentalmente proteínas) y la fase liposoluble (fase inferior; fase orgánica donde se encuentran los lípidos). Las muestras se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos en la centrífuga (Beckman Coulter Allegra 25R, IN, USA) y posteriormente se recuperó a la fase liposoluble en un nuevo tubo limpio. Tras esto se procedió a la evaporación bajo atmósfera de nitrógeno y los extractos ya secos se trasvasaron a viales de cristal de 1,5mL previamente pesados, para volver a evaporar los extractos bajo atmósfera de nitrógeno (para evitar la oxidación de los lípidos) dejándose en el desecador al vacío y en oscuridad durante toda la noche para eliminar restos de humedad. Al día siguiente se pesan de nuevo los viales de forma que la diferencia con respecto al peso del vial vacío es la cantidad de lípido total: contenido lipídico = (peso vial + lípido) – peso vial. El extracto lipídico fue resuspendido entonces en CL:MET (2:1, v/v) con una concentración final de la muestras de 10mg/mL. Del extracto lipídico se traspasan 200 μL a un nuevo vial. El extracto restante se evaporó bajo

atmósfera de nitrógeno y una vez seco se redisolvió en CL:MET (2:1, v/v) con 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) a la misma concentración (10mg/mL). Los viales con los extractos lipídicos fueron sellados con nitrógeno y almacenados a -20°C hasta la realización de los análisis de perfil de clases lipídicas y ácidos grasos.

Para la determinación de la humedad del tejido muscular de las muestras se pesó entre 50 y 125mg de tejido que se mantuvieron durante 24 horas en una estufa a 110°C. Tras esto se atemperan las muestras durante 30 minutos en el desecador y se pesan de nuevo para obtener el porcentaje de humedad de cada una, para así poder calcular posteriormente el porcentaje de lípido en peso seco.

3.4. Determinación de clases lipídicas

La separación de clases lipídicas (CL) se realizó mediante el método de doble desarrollo de Olsen y Henderson (1989), en cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, *high performance thin layer chromatography*), en placas de sílica gel de 10cm x 10cm x 0,15mm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las placas previamente lavadas con dietil éter, se activaron en estufa durante 30 minutos a 110°C para quemar impurezas y se mantuvieron en el desecador hasta su utilización. Con ayuda de una pipeta Hamilton de 10µl se cargan 6 muestras en cada placa: un estándar (corresponde a un extracto lipídico de huevo de bacalao de composición conocida), un control (casilla sin muestra, para observación de los frentes de los solventes) y 5 muestras problema. Para la separación de los lípidos polares (LP) se usó una solución de isopropanol: cloroformo: metilacetato: metanol: KCl al 0.25% (5:5:5:2:1,8 v/v). Una vez desarrollada hasta el punto medio de la placa, se sacó la placa y se dejó secar bajo campana extractora por 3 minutos y se colocó posteriormente en un desecador durante 10 minutos. Para la separación de los lípidos neutros (LN) se usó una solución de hexano: éter: ácido acético (20:5:0,5 v/v), dejando que la placa se desarrollara completamente hasta la parte superior. Una vez desarrolladas se tiñeron las placas de forma homogénea con un reactivo basado en 3% de acetato cúprico y 8% de ortofosfórico y se colocaron en la estufa a 160° durante 10 minutos para quemar y revelar las bandas correspondientes a las distintas CL. Las placas se escanearon en el CAMAG TLC visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza) y usando el software informático winCATS, versión 1.4.4, se analizaron las bandas de las distintas CL por densitometría. El procesado de las bandas para obtener la proporción de cada CL se realizó con el software VideoScan, versión 1.02.

3.5. Determinación del perfil de ácidos grasos

Para determinar el perfil de AG del músculo del Pacú de vientre rojo a través de cromatografía de gases, primero se transmetiló una fracción del extracto lipídico de cada muestra de manera que los AG fueran volátiles al transformarse en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES). Para tal fin se tomaron 100µL de la muestra de lípido y se añadió un 5% de 19:0 (estándar interno). Posteriormente las muestras con el standard se evaporaron bajo atmósfera de nitrógeno. Tras esto se añadió 1mL de tolueno y 2mL de sulfúrico al 1% en metanol. A continuación, se colocaron las muestras en el bloque calefactor a 50°C durante 16-18 horas. Tras el periodo de reacción se dejaron atemperar las muestras y se añadieron 2mL de KHCO₃ al 2% y 5mL de hexano:dietiléter 1:1 (v/v) con BHT y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Tras esto se recuperó la fase superior (orgánica) en otro tubo de ensayo y a la fase inferior se repitió el proceso antes mencionado. Las dos fases superiores obtenidas, se evaporan juntas bajo atmósfera de nitrógeno y se resuspendieron en 100µL hexano. La purificación de FAMES de esta mezcla que contiene también los esqueletos hidrocarbonados y el colesterol, se realiza por cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílice de 20cm x 20cm x 0,25mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) cuyo desarrollo se llevó a cabo con 90mL hexano, 10mL éter y 1mL ácido acético (v/v). En cada placa además de 4 muestras se pinchó un estándar externo para identificar la posición de los FAME en la placa. Una vez desarrolladas las placas, se dejaron secar y se tiñeron con iodina 1%, solo la zona lateral del estándar externo y la zona superior de todas las muestras, que se corresponde con el BHT, para identificar y marcar con lápiz la zona de los ésteres metílicos, permitiendo así la delimitación de la zona de raspado. La sílice raspada correspondiente a cada muestra se recuperó en un tubo de ensayo previamente rotulado y se añadieron 10mL de hexano:éter (1:1 v/v; 2ml con BHT y 8 sin BHT). Se centrifugaron los tubos con las muestras a 1500rpm, durante 5 minutos y se recuperó la fase superior que contiene los FAME purificados. Ésta se evaporó totalmente bajo atmósfera de nitrógeno. Las muestras se trasvasan entonces a un vial lavando el tubo de ensayo con ~900µL de hexano de alta pureza. Las muestras se almacenaron en el congelador a -20°C hasta su determinación por cromatografía de gases. La cromatografía de gases se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (GRACE-GC, Thermo Scientific, Milán, Italia), con inyección automatizada *on-column* y un detector de ionización por llama FID (*Flame Ionization Detector*), que separa los AG según su peso molecular. Los ácidos grasos fueron identificados con la ayuda de

un multiestándar con tiempos de retención conocidos para cada AG. Los valores obtenidos para cada muestra se expresaron como porcentaje (%) total de AG.

3.6. Determinación de la composición lipídica del pienso

La determinación del contenido en LT y perfil de AG de las dos dietas (control y experimental), del arribazón multiespecífico y del aceite de oliva utilizados en el experimento se llevó a cabo a través de los procedimientos de extracción lipídica y determinación de ácidos grasos explicados en los puntos 4.3 y 4.5, respectivamente. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de lípido total (% en peso seco) y perfil de AG (% de AG totales) de la dieta control, la dieta experimental, el arribazón multiespecífico y el aceite de oliva utilizados en la mezcla y compactación del arribazón con la dieta experimental

	Dieta control	Dieta experimental	Arribazón multiespecífico	Aceite de oliva
Lípido Total	8,5 ± 0,1	11,3 ± 0,4	2,5 ± 0,1	-
16:0	15,7 ± 0,1	14,3 ± 0,9	36,3 ± 2,0	14,9 ± 0,1
18:0	4,0 ± 0,0	3,7 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,0
Total Saturados¹	23,7 ± 0,0	20,7 ± 0,6	47,2 ± 2,5	17,6 ± 0,2
18:1n-9	29,7 ± 0,4	47,1 ± 2,7	16,4 ± 0,4	60,4 ± 0,1
Total Monoinsaturados¹	39,3 ± 0,2	54,5 ± 0,6	32,6 ± 0,9	65,7 ± 0,1
18:2n-6	21,6 ± 0,1	15,1 ± 0,4	2,6 ± 0,4	13,5 ± 0,2
20:2n-6	nd	nd	0,7 ± 0,1	nd
20:3n-6	nd	nd	0,7 ± 0,1	nd
20:4n-6 (ARA)	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	3,9 ± 0,8	nd
22:4n-6	nd	nd	0,2 ± 0,2	nd
22:5n-6	nd	0,2 ± 0,2	nd	nd
Total n-6 PUFA¹	22,3 ± 0,1	15,7 ± 0,0	8,3 ± 0,8	13,5 ± 0,2
18:3n-3	3,8 ± 0,0	2,4 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,0
20:4n-3	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	nd
20:5n-3 (EPA)	4,0 ± 0,1	2,1 ± 0,0	2,3 ± 0,4	nd
22:5n-3	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2	nd
22:6n-3 (DHA)	3,1 ± 0,1	1,6 ± 0,0	0,1 ± 0,2	nd
Total n-3 PUFA¹	12,4 ± 0,2	6,9 ± 0,4	6,2 ± 0,5	0,5 ± 0,0
Total n-3 LC-PUFA¹	7,8 ± 0,2	3,9 ± 0,3	3,2 ± 0,3	nd
n-3/n-6	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,0 ± 0,0
EPA + DHA	7,1 ± 0,2	7,3 ± 0,0	2,4 ± 0,6	-
ARA/EPA	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,7 ± 0,0	-
DHA/EPA	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,1 ± 0,1	-

Valores expresados como media ± desviación estándar. PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (de 20 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces); n-3, Omega 3; n-6, Omega 6; nd, no detectado.¹ Puede contener componentes minoritarios no mostrados en la tabla

3.7. Índice de peróxidos

La determinación del índice de peróxidos (IP) se basa en una cuantificación espectrofotométrica (Shantha y Decker, 1994) con tiocianato de amonio (NH_4SCN) que al reaccionar con hierro (Fe) III producido por la oxidación de los lipoperóxidos (productos de la primera oxidación de los lípidos) del Fe II, genera un producto coloreado. Primero se preparó la recta patrón a partir de una disolución madre de cloruro de Fe III (FeCl_3) a $10\mu\text{g/mL}$, recta que busca la generación de una curva de referencia para poder extrapolar posteriormente los datos obtenidos de las muestras. Para ello, se añadieron distintas cantidades de CL:MET (7:3, v/v) y disolución madre hasta un volumen de 10mL, de forma que las concentraciones iban siendo crecientes para la disolución madre y decrecientes para el CL:MET (7:3, v/v). Para el análisis de las muestras se resuspendieron los $200\mu\text{L}$ de extracto lipídico separados previamente, en 10mL de CL:MET (7:3, v/v). A cada tubo se añadieron $50\mu\text{L}$ de FeCl_2 y $50\mu\text{L}$ de NH_4SCN . Se agitaron vigorosamente las muestras, y se esperaron 5 minutos, tras los cuales se midió la absorbancia a 500nm en un espectrofotómetro (DU 800 spectrophotometer, Beckman Coulter, CA, EE.UU.) en cubetas de cuarzo. Con los valores obtenidos se calculó la cantidad de μg de Fe^{3+} según la curva patrón. Por último, se determinó el índice de peróxidos expresado en miliequivalentes (meq) de O_2 activo/Kg de lípido, según la relación en la curva patrón de μg de Fe^{3+} frente a la absorbancia; Índice de peróxidos = $((\text{Abs de la muestra} - b)/a)/(m * 55.845 * 2)$, donde “a” es la pendiente de la recta patrón, “b” es la ordenada en el origen de la recta patrón y “m” es la masa del lípido expresada en gramos. El valor 55,845 se refiere al peso atómico del hierro, mientras que el valor 2, hace referencia a los meq de oxígeno.

3.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el estudio de la composición lipídica (LT, CL, perfil de AG y sumatorio de AG totales) al igual que el IP, se reflejan como media \pm desviación estándar (DE; n=5). En el análisis estadístico del experimento se utilizó el test estadístico de comparación de medias t de Student, con la finalidad de encontrar diferencias significativas entre el tratamiento control y experimental. Para la realización de este test se requiere conocer si los datos poseen normalidad y homocedasticidad. En el caso de la normalidad se hizo uso del test de Shapiro-Wilk, y para la homocedasticidad o igualdad de varianzas se utilizó el test de Levene. Los datos que no cumpliesen la presunción de normalidad se transformaron a través de la raíz cuadrada del arcoseno o bien por el

logaritmo en base 10. A aquellos valores que tras las transformaciones no adquirieron la condición de normalidad, se les realizó un test no paramétrico. Se consideraron diferencias significativas aquellas cuyo $p < 0,05$ y altamente significativas para $p < 0,01$. Los análisis fueron realizados por el software IBM SPSS Statistics, versión 25.0 para Windows.

4. Resultados y discusión

4.1. Crecimiento y supervivencia de *P. brachypomus*

Los datos de crecimiento de los ejemplares de Pacú de vientre rojo revelan un mayor incremento en peso y talla de los individuos alimentados con dieta control con respecto a los alimentados con la dieta experimental (Tabla 2). Así mismo, los índices de crecimiento analizados (TPG, TCE e IPD) resultaron ser más elevados en los individuos del tratamiento control. En este sentido, la inclusión de algas de arribazón multiespecífico en la dieta no muestra mejoras en relación al crecimiento de los ejemplares de *P. brachypomus*. De hecho, parece reducir estos parámetros con respecto a la misma dieta comercial sin sustituir. Sin embargo, es destacable la presencia de un mayor porcentaje de supervivencia en los individuos del tratamiento experimental.

Tabla 2. Índices de crecimiento de *P. brachypomus* alimentados con diferentes dietas.

	Tratamiento Control	Tratamiento Experimental
Incremento (g)	36,0	24,5
Incremento (cm)	6,4	5,1
IPD(g/día)	0,3	0,2
TPG (%)	1029	666
TCE (%/día)	2,3	1,9
Supervivencia (%)	84	96

IPD, Incremento de peso por día; TPG, Tasa de peso ganado; TCE, tasa de crecimiento específico. n=25.

Los peores resultados de crecimiento podrían deberse a diversos factores. Por un lado, al alto grado de suplementación, de manera que la adición del 15% del peso de la dieta en forma de polvo de macroalgas podrían generar una disminución en la palatabilidad o incluso la digestibilidad del alimento. La elevada proporción de algas pardas presentes en el arribazón cuyo contenido proteico es inferior al de algas verdes, que se encontraban en menor proporción (Fleurence, 1999), o incluso el menor aporte global de proteína y omega-3 LC-PUFA aportado por ese 15% del arribazón frente a la dieta control, podría

estar afectando negativamente al valor nutricional del pienso experimental, pudiendo llegar a ser insuficiente para el correcto desarrollo de los ejemplares. Esto, junto con los componentes anti-nutricionales que poseen las algas (inhibidores enzimáticos, polifenoles e inhibidores de proteasas, entre otros componentes), parecen indicar que una menor cantidad de algas de arribazón en la dieta podría permitir un mejor rendimiento en la tasa de crecimiento manteniendo la alta tasa de supervivencia que se ha demostrado en este estudio. De hecho, en estudios recientes realizados en el marco del mismo proyecto MACBIOBLUE, con este mismo tipo de arribazón, suplementando la dieta al 20, 15 y 7%, permitió obtener una mejora significativa en el crecimiento de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), respecto a los peces control, al disminuir el grado de suplementación a un 7%. Sin embargo, hay estudios que han demostrado unas tasas de crecimiento similares frente a la utilización de piensos comerciales, con un porcentaje de inclusión de harinas de algas $\geq 20\%$ en la dieta de otras especies, como el pez gato americano (*Ictalurus punctatu*) o el mero gigante (*Epinephelus lanceolatus*), lo cual implica que la composición de las algas o el hábito alimenticio de la especie puede ser determinante en el éxito de la dieta (García-Ortega et al., 2016; Zachary et al., 2015). La elevada tasa de supervivencia del grupo experimental, podría estar indicando que pese al menor crecimiento, las algas podrían estar aportando otros elementos beneficiosos que pueden favorecer la buena salud de los ejemplares, su resistencia al estrés y la adquisición de infecciones.

4.2. Lípido total y clases lipídicas de *P. brachypomus*

La inclusión del arribazón multiespecífico en la dieta parece no haber afectado el contenido de lípido total del tejido muscular de los individuos de *P. brachypomus*, ni su composición en clases lipídicas, observándose solamente un incremento en el contenido de colesterol ($p < 0.01$) en el tratamiento experimental (Tabla 3). Esta diferencia en los valores de colesterol parece indicar que la dieta experimental basada en algas podría inducir a cierta acumulación de colesterol en el tejido muscular del Pacú de vientre rojo. En los peces el colesterol no sólo es un componente indispensable en la formación de membranas celulares, sino que también está implicado en la absorción de los AG en el intestino, así como su transporte cuando forma ésteres de colesterol.

Las algas por lo general poseen menos cantidad de colesterol que las dietas comerciales basadas en aceites de pescado, de forma que el tratamiento experimental con un 15% de arribazón multiespecífico puede indicar un contenido en colesterol insuficiente que

induzca a su acumulación en el músculo por parte de los individuos de *P. brachypomus*, como se ha demostrado en otros estudios (Guerra-Olvera et al., 2015). Otra posible causa de este incremento puede deberse a la riqueza en precursores de colesterol que poseen las algas tales como el escualeno (Conchillo et al., 2006), que suele ser abundante en la flora ficológica, de forma que la alta proporción de este precursor en los individuos permite una mayor tasa de biosíntesis de colesterol.

Tabla 3. Contenido en lípido total (% en peso seco) y composición de clases lipídicas (% en área) del tejido muscular de *P. brachypomus* alimentados con diferentes dietas

	Tratamiento Control	Tratamiento Experimental	
Lípido Total	7,4 ± 1,6	7,4 ± 2,1	
Esfingomielina	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	
Fosfatidilcolina	14,5 ± 2,2	16,4 ± 3,0	
Fosfatidilserina	1,3 ± 0,3	1,8 ± 0,3	
Fosfatidilinositol	3,5 ± 0,6	4,2 ± 0,8	
Fosfatidilglicerol	1,8 ± 0,3	2,2 ± 0,5	
Fosfatidiletanolamina	10,2 ± 0,9	11,5 ± 1,7	
Mono- y Diglicéridos	3,7 ± 1,5	1,3 ± 0,3	
Colesterol	12,5 ± 1,1	17,2 ± 1,7	**
Ácidos Grasos Libres	4,6 ± 2,7	5,8 ± 1,6	
Triglicéridos	44,4 ± 8,9	39,4 ± 7,3	
Ésteres de esteroles	3,8 ± 2,2	nd	

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=5). ** indica diferencias significativas entre tratamientos (p<0,01); nd, no detectado.

La presencia de ésteres de esteroles en los individuos sometidos al tratamiento control frente al experimental, posiblemente se deba a que una cantidad del colesterol acumulado intramuscularmente se esté transformando en ésteres de esteroles, mientras que en el tratamiento experimental, la presencia de fitoesteroles existentes en las algas incluidas en la dieta impiden el proceso de esterificación del colesterol, dando como resultado la ausencia de ésteres en este tratamiento (Valenzuela y Bronco, 2004).

4.3. Perfil de ácidos grasos de *P. brachypomus*

Aunque las diferentes dietas (control y experimental) no han afectado el contenido total de AG en el tejido muscular de los ejemplares de Pacú, el perfil de AG si se vio afectado según el tratamiento (Tabla 4). De hecho, ya en la Tabla 1 se observa cómo, el nivel de suplementación ensayado, junto con la adición de aceite de oliva para aglutinar y compactar la mezcla dieta/arribazón, genera un efecto diluyente especialmente sobre los AG 18:2n-6, EPA y DHA, y un aumento del 18:1n-9. A nivel muscular las principales diferencias entre los tratamientos se observaron en el contenido de ácidos grasos

monoinsaturados (*monounsaturated fatty acids*, MUFA), mayoritariamente afectado por el elevado valor del ácido oleico (18:1n-9) en el tejido muscular del Pacú de vientre rojo alimentados con la dieta experimental. Este hecho se justifica por el elevado contenido del pienso experimental en este AG, debido primordialmente a la inclusión de aceite de oliva (rico en 18:1n-9) como aglutinante en la formulación de la dieta.

Los valores de n-6 PUFA fueron similares entre tratamientos, no habiendo sido detectada ninguna diferencia entre los AG que componen este sumatorio (Tabla 4). Este hecho es especialmente interesante si tenemos en cuenta los diferentes contenidos de las dietas en 18:2n-6 ($21,6 \pm 0,1\%$ del total de AG en la dieta control y $15,1 \pm 0,4\%$ del total de AG en la dieta experimental; Tabla 1). Además, es importante destacar el contenido en ARA observado en el músculo del Pacú, considerando su aporte casi nulo a partir de las dietas ensayadas ($0,7 \pm 0,0$ en la dieta control y $0,5 \pm 0,0$ en la dieta experimental), y que llegan a alcanzar valores de 1,6% y 1,4% respectivamente.

El ARA es un AG fisiológicamente muy activo siendo precursor de eicosanoides, moléculas que poseen funciones inmunológicas, antiinflamatorias o neuronales muy importantes y que en altos niveles puede implicar la presencia de condiciones de estrés para el animal (Sargent et al., 2003). Se trata de un AGE, requerido en cantidades muy moderadas pero importantes en el medio marino. El contenido de ARA presente en el músculo del pacú, parece indicar bien una bioacumulación y retención preferente de este AG en el músculo, o la capacidad de esta especie para biosintetizar ARA a partir de su precursor, el 18:2n-6. Esta capacidad de sintetizar LC-PUFA a partir de sus precursores de 18 carbonos como el 18:2n-6, ha sido previamente descrita en diversas especies de agua dulce como la tilapia (*Oeochromis sp.*) o el ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Saito y Okabe, 2012; Triana-García et al., 2013; Tocher, 2015). De hecho, llama la atención cómo, otros AG n-6 que no fueron aportados por la dieta y que son intermediarios de la síntesis de ARA desde el 18:2n-6, parecen en el músculo de los ejemplares de ambos tratamientos, de la misma manera que aparecen ciertas cantidades del derivado del ARA el 22:5n-6.

En relación a los n-3 PUFA, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que la inclusión de algas en la dieta parece no haber afectado el contenido de estos AG en el músculo del Pacú (Tabla 4). Sin embargo, al analizar los AG de las dos dietas, sí observamos una disminución importante de las proporciones de EPA y DHA al añadir la harina de macroalgas al pienso comercial, por lo que la dieta experimental presenta un menor valor en n-3 PUFA que la dieta control (Tabla 1).

Tabla 4. Total de ácidos grasos (mg/100g de tejido) y perfil de ácidos grasos (% de ácidos grasos totales) del tejido muscular de *P. brachypomus* en ambos tratamientos.

	Tratamiento Control	Tratamiento Experimental	
Total de ácidos grasos	1070,8 ± 192,8	1134,5 ± 443,5	
C14:0	3,4 ± 0,3	2,2 ± 0,3	**
C15:0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	**
C16:0	21,6 ± 1,6	19,9 ± 0,8	
C18:0	6,9 ± 0,6	6,6 ± 0,4	
Total Saturados	32,6 ± 1,1	29,2 ± 0,7	**
C16:1n-9	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	
C16:1n-7	5,6 ± 0,6	3,3 ± 0,3	**
C18:1n-9	24,6 ± 3,3	33,6 ± 2,7	**
C18:1n-7	3,1 ± 0,4	2,6 ± 0,1	*
Total Monoinsaturados	35,9 ± 3,5	41,5 ± 3,1	*
C18:2n-6	12,4 ± 1,2	12,4 ± 0,4	
C20:2n-6	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	
C20:3n-6	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	
C20:4n-6 (ARA)	1,6 ± 0,5	1,4 ± 0,4	
C22:4n-6	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	
C22:5n-6	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	
Total n-6 PUFA	15,7 ± 0,4	15,6 ± 0,5	
C18:3n-3	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,2	
C18:4n-3	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	
C20:4n-3	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	
C20:5n-3 (EPA)	3,4 ± 1,1	2,2 ± 0,4	
C22:5n-3	1,5 ± 0,5	1,1 ± 0,3	
C22:6n-3 (DHA)	6,6 ± 2,4	6,3 ± 2,0	
Total n-3 PUFA	14,2 ± 4,0	12,0 ± 2,6	
LC-PUFA	15,1 ± 4,8	13,1 ± 3,5	
DHA + EPA	10,0 ± 3,5	8,4 ± 2,4	
n-3/n-6	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,1	
ARA/EPA	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	
DHA/EPA	1,9 ± 0,4	2,9 ± 0,4	**

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. * indica diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). ** Indica diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,01$). PUFA, ácidos grasos poliinsaturados (3 o más dobles enlaces); n-6: serie Omega 6; n-3: serie Omega 3; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (20 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces).

A pesar de ello, los valores de DHA en el músculo del Pacú fueron similares entre tratamientos, siendo este además el n-3 LC-PUFA más abundante, seguido del EPA. Tal y como se ha sugerido anteriormente para el ARA, los datos indicarían bien una bioacumulación-retención selectiva de este AG, o la capacidad de esta especie para sintetizar LC-PUFA a partir de sus precursores de 18 carbonos. Observando el contenido de 18:3n-3 en el tejido muscular (Tabla 4), vemos que este es menor que el proporcionado

por las dietas (Tabla 1), lo que posiblemente indica su bioconversión a EPA y DHA. No obstante, se observó una ligera disminución en la cantidad de EPA en el músculo cuando los peces fueron alimentados con la dieta experimental, que se podría justificar por la menor cantidad de este AG aportada en la dieta experimental, o por su bioconversión en 22:5n-3, siendo este un intermediario en la biosíntesis de DHA (Bell y Tocher, 2009). Debido a esta menor proporción de EPA en los individuos tratados con la dieta experimental, se observa un valor significativamente superior en la proporción DHA/EPA ($p < 0,01$; tabla 4) en estos ejemplares ($2,9 \pm 0,4$) frente a los individuos sometidos al tratamiento control ($1,9 \pm 0,4$).

En los humanos, una alta ingesta de n-3 LC-PUFA ha demostrado su efecto positivo en la prevención de diferentes enfermedades como el cáncer de colon o mama y enfermedades inflamatorias o neurodegenerativas (Zarate et al., 2017). Particularmente, el EPA y el DHA han demostrado reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y la artritis y mejorar la función cerebral (Harwood, 2019). En el presente estudio, observamos que, si se consumen 100g de filete de Pacú de vientre rojo, obtendríamos cerca de 1100 mg de AG en ambos tratamientos. No obstante, la cantidad de EPA+DHA sería algo mayor en el tratamiento control (107,8mg en el tratamiento control frente a los 95,3mg en el tratamiento experimental) lo cual indica que el tratamiento experimental ha producido cierta disminución en el aporte, en términos absolutos, de omega-3 LC-PUFA a pesar de la mayor proporción de AG totales en 100g de producto. Si consideramos, las recomendaciones de la FAO, la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), al consumo diario de EPA+DHA de al menos 250 mg, verificamos que con tan solo 100g de filete de *P. brachypomus* se estaría cubriendo aproximadamente un 45% de esa demanda, lo cual hace que este sea un producto interesante en vistas a la óptima nutrición humana, considerando además su condición de especie herbívora de agua dulce.

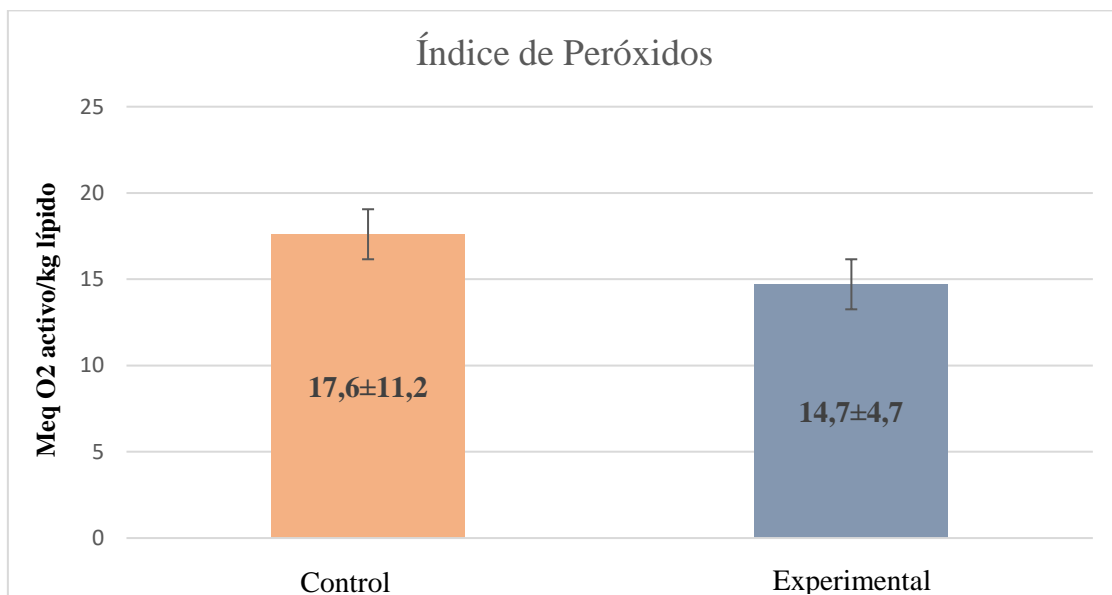
4.4. Índice de peróxidos en el músculo

El estudio del índice de peróxidos (IP) revela que no hay diferencias significativas entre tratamientos (Figura 3). A pesar de ello, se observaron valores medios superiores del tratamiento control (17,6 Meq O₂ activo/kg de lípido) con respecto al tratamiento experimental (14,7 Meq O₂ activo/kg de lípido), lo que indica un menor estado de oxidación de la grasa del músculo cuando los ejemplares fueron alimentados con la dieta experimental. Este hecho podría deberse a la riqueza de metabolitos secundarios con

actividad antioxidante encontrada en las algas como los polifenoles (principalmente ácido p-coumárico, ferúlico o cinnámico), ácido ascórbico, polisacáridos sulfatados o pigmentos como clorofilas o xantofilas, que pueden ser utilizados por los organismos como un mecanismo de defensa frente a las condiciones adversas del medio, por ejemplo, elevadas tasas de insolación o de estrés que inducen la producción de radicales libres (Díaz et al., 2015). Estos productos del metabolismo secundario permiten un sistema de protección eficiente frente a la peroxidación lipídica en distintos animales.

La presencia de una cantidad óptima de antioxidantes es relevante desde el punto de vista comercial, puesto que el animal, tras la muerte deja de sintetizar *per se* compuestos con estas cualidades, generando así una pérdida en las propiedades organolépticas y nutricionales de la carne del animal en vistas a su posible consumo.

Figura 3. Índice de peróxidos (meq O₂ activos/kg de lípido) en los ejemplares de Pacú sometidos a los diferentes tratamientos



Además, los PUFA, son los AG más susceptibles a interaccionar con estos radicales libres, generando hidroperóxidos cuya posterior ruptura genera subproductos como cetonas, aldehídos o alcoholes que acentúa la degradación del tejido muscular y produce, por ende, la pérdida de calidad de la carne (Mendéz et al., 2007). Por otro lado, una buena batería de antioxidante favorece un buen estado de salud y bienestar y la supervivencia de los ejemplares, siendo especialmente elevado en este caso, el porcentaje de supervivencia del tratamiento experimental que incorpora las macroalgas.

Los resultados generados en este estudio demuestran que la inclusión de un 15% de polvo de arribazón multiespecífico no favorece el crecimiento de los ejemplares, pero parece favorecer, en cierta medida, un mejor estado oxidativo y la supervivencia de los ejemplares. El uso potencial de algas o los extractos de algas como aditivos antioxidantes naturales y eficientes, podría permitir sustituir a aquellos aditivos sintéticos cuya seguridad alimenticia ha sido puesta en duda (Vidal et al., 2001), si bien sería necesario realizar nuevos ensayos experimentales, a dosis inferiores de suplementación y realizando un estudio más complejo que incluya otros parámetros indicadores de bienestar y salud de los ejemplares.

5. Conclusiones

- La inclusión de un 15% de alga de arribazón en la dieta de los ejemplares de *P. brachypomus* no favorece su crecimiento. Si bien, la tasa de supervivencia es elevada y ligeramente superior con respecto a la de los individuos del tratamiento control.
- La inclusión del arribazón multiespecífico en la dieta parece no haber afectado el contenido lipídico del tejido muscular de los individuos de *P. brachypomus*, ni su composición, verificándose apenas pequeños incrementos a nivel de MUFA, causados por el mayor aporte de 18:1n-9 procedente del aceite de oliva incluido en la dieta experimental.
- Los valores de ARA, EPA y DHA observados en el músculo del Pacú, indican una posible bioacumulación-retención selectiva de estos AG, o bien una capacidad de biosíntesis de estos ácidos grasos a partir de sus precursores.
- La tendencia hacia un menor IP en los ejemplares de *P. brachypomus* alimentados con la dieta experimental parece indicar que la inclusión de algas en la dieta induce un mejor estado oxidativo del tejido muscular debido probablemente, a componentes antioxidantes existentes en las macroalgas del arribazón utilizado en esta dieta.
- El conjunto de los resultados obtenidos señalan que el nivel de inclusión de un 15% de polvo de arribazón es demasiado elevado y la necesidad de ensayar dosis inferiores que permitan evaluar mejor el potencial de los componentes antioxidantes de las algas sin afectar negativamente al crecimiento de los ejemplares.

Conclusions:

- The inclusion of 15% of algae wracks in the diet of *P. brachypomus* individuals do not favor its growth. Nonetheless, pacu survival rate was high and slightly higher than that of control treatment individuals.
- The inclusion of multiespecific algae wrack in the diet did not affected the lipid content of *P. brachypomus* fillet nor its composition, being only detected a small increment of MUFA content, caused by the increment of 18:1n-9 from the olive oil used in experimental diet formulation.
- The high contents of ARA, DHA and EPA on pacu fillet, indicate a selective bioaccumulation- retention of these FAs, or the capacity for this species to biosynthesize LC-PUFA from its precursors.
- The trend towards a lower IP in *P. brachypomus* individuals fed with the experimental diet, seems to indicate that the inclusion of macroalgae in the diet induces a better oxidative state of fillets, probably due to the antioxidant components present on macroalgae wracks used in experimental diet formulation.
- Overall, the results of the present study indicate that the inclusion level of 15% of macroalgae powder might be too high, being necessity to test lower macroalgae inclusion rates, in order to evaluate algae antioxidant components potential, without negatively affect its growth.

6. Bibliografía

- Abad, D., Rincón, D., & Poleo, G. (2014). Índices de rendimiento corporal en morocoto *Piaractus brachypomus* cultivado en sistemas biofloc. *Zootecnia Tropical*, 32(2), 119-130.
- APROMAR. 2019. La acuicultura en España.
- Ariede, M., Candido, T., Jacome, A., Velasco, M., De Carvalho, J., & Baby, A. (2017). Cosmetic attributes of algae - A review. *Algal Research*, 25, 483-487.
- Ayarza-León, J. (2014). Alginates: 20000 applications of submarine algae. *Revista De Química*, Vol. 28, No. 1-2, 19-23.
- Becherucci, M. E., & Benavides, H. (2016). Composición florística de arribazones de algas marinas en playas del sudeste de la provincia de buenos aires, Argentina. *Iheringia - Serie Botanica*, 71(1), 22-26.
- Bell, G. & Waagbø, R. (2008). Safe and nutritious aquaculture produce: benefits and risks of alternative sustainable aquafeeds. *Aquaculture in the Ecosystem*. 185-225.
- Bell, M. V., & Tocher, D. R. (2009). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: General pathways and new directions. *Lipids in Aquatic Ecosystems*, 211-236. Springer New York.
- Castro, C., Corraze, G., Basto, A., Larroquet, L., Panserat, S., & Oliva-Teles, A. (2016). Dietary Lipid and Carbohydrate Interactions: Implications on Lipid and Glucose Absorption, Transport in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Juveniles. *Lipids*, 51(6), 743-755.
- Chagas, C.E., Gomes, C.I., Júnior, M.H., & Roubach, R. (2007). Produtividade de tambaqui criado em tanque-rede com diferentes taxas de alimentação Tambaqui productivity reared in cages with different feeding rations. *Ciência Rural*, 37(4), 1109-1115.
- Conchillo, A., Valencia, Puente, Ansorena, & Astiasarán. (2006). Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutrición Hospitalaria*, 21(3), 369-373.
- Díaz Gutierrez D., Méndez Ortega W., De Oliveira e Silva A.M., Zaldívar Muñoz C., Mancini-Filho J., & Vidal Novoa A. (2015). Comparación de las propiedades antioxidantes y contenido de polifenoles de extractos acuosos de las algas marinas *Bryothamnion triquetrum* y *Halimeda opuntia*. *Ars pharmaceutica*, 56(2), 89-99.
- De Paula Silva, P., McBride, S., De Nys, R., & Paul, N. (2008). Integrating filamentous 'green tide' algae into tropical pond-based aquaculture. *Aquaculture*, 284(1), 74-80.
- Eyras, M. A. & Rostagno, C. M. (1995). Bioconversion of drift seaweed: An experience in Puerto Madryn, Chubut (Argentina). *Naturalia Patagónica*, 3(1-2), 25-39.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma.
- Fernandes Kochenborger, J.B., Carneiro Dalton J., & Sakomura Nilva K. (2001). Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(3), 617-626.
- Fleurence J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in food science and technology*, 10, 25-28.
- Fleurence, J., Moranchais, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., & Jaouen, P. (2012). What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? *Trends in Food Science & Technology*, 27(1), 57-61.
- García dávala, C. R., François Renno, J., Duponchelle, F., & Nuñez, J. (2005). Filogeografía de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* en la Alta Amazonía (Perú y Bolivia). *Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura*, 129-134.
- García-Ortega A., Trushenski T.J., & Kissinger K. (2016). Evaluation of fish meal and fish oil replacement by soybean protein and algal meal from *Schizochytrium limacinum* in diets for giant grouper *Epinephelus lanceolatus*. *Aquaculture*, 452, 1-8.
- Garrido, D., Kabeya, N., Hontoria, F., Navarro, J. C., Reis, D. B., Martín, M. V., & Monroig, Ó. (2019). Methyl-end desaturases with $\Delta 12$ and $\omega 3$ regioselectivities enable the de novo PUFA biosynthesis in the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(8), 1134-1144.
- Glencross, B. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2), 71-124.
- Grassauer, A., Prieschl-Grassauer, E., Meier, C., & Pretsch, A. (2010). Uso de carrageninas para el tratamiento de infecciones por rinovirus. MX2009005838 A. Instituto Mexicano de la propiedad intelectual.
- Guerra-Olvera, F., & Viana, M. (2015). Effect of dietary cholesterol content on growth and its accumulation in liver and muscle tissues of juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Ciencias Marinas*, 41(2), 143-156.

- Hahnefeld, E. P.** (2008). Arribazones de algas y plantas marinas en Gran Canaria (1.^a ed.). Las Palmas de Gran Canaria, España: Instituto Tecnológico de Canarias, Departamento de Biotecnología.
- Harwood, J.** (2019). Algae: Critical Sources of Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Biomolecules*, 9 (11).
- Hensel, K.** (2005). First record of the pirapitinga *Piaractus brachypomus* (*Actinopterygii: Serrasalminidae*) in Slovakia *Biologia*, 59(15), 205-210.
- Kim, S., & Chojnacka, Katarzyna.** (2015). Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications, Vol 1-2. Wiley.
- Kumar, A., Pradhan, P.K., Das, P.C., Srivastava, S.M., Lal, K.K. & Jena, J.K.** (2018). Growth Performance and Compatibility of Pacu, *Piaractus Brachypomus* with Indian Major Carps in Polyculture System. *Aquaculture* 490, 236-39.
- Parra, M.A.L., & Navarrete, J.A.Z.** (2009). La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola. *Revista De Investigación Agraria Y Ambiental*, 1, 13-22.
- Lees, E., & Barton, R.** (2003). The use of Niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 46(1), 13-17.
- Mendéz, M.I., Abuin, J.M., Pérez, A.A., Palmeiro P., Fernandez M., Guzman B.J., & Alonso, S.I.** Procedimiento para prevenir el desarrollo de la rancidez y preservar la calidad en productos pesqueros y productos transformados de la pesca. (2007).
- Monroig, O., Tocher, D. R., & Castro, L. F. C.** (2018). Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis and Metabolism in Fish. *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism*, 31-60.
- Ng, W., Chong, C., Wang, Y., & Romano, N.** (2013). Effects of dietary fish and vegetable oils on the growth, tissue fatty acid composition, oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and efficacy of using fish oil finishing diets. *Aquaculture*, 372, 97-110.
- Osorio, J.M., Luongo, H., Del Mondo, V., Pinto, A., Pollio, G., Frunzo, A., & Esposito, P.** (2018). Nutrient removal from high strength nitrate containing industrial wastewater using *Chlorella sp.* strain ACUF_802. *Annals of Microbiology*, 68(12), 899-913.
- Pérez, J. A., Rodríguez, C., Bolaños, A., Cejas, J. R., & Lorenzo, A.** (2014). Beef tallow as an alternative to fish oil in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Effects on fish 30 performance, tissue fatty acid composition, health and flesh nutritional value. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(5), 571-583.
- Quital R, V., Morales G, C., Sepúlveda L, M., & Schwartz M, M.** (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Revista Chilena De Nutrición*, 39(4), 196-202.
- Reenamole, G. R., & D'cruz, F.G.** (2014). New Record of Exotic Fish Red Bellied Pacu, *Piaractus Brachypomus* (Cuvier, 1818) from Vellayani Fresh Waterlake, Southwest Coast Of India. *International Journal of Science and Research*, 4(12), 1106-1110.
- Saito, H., & Okabe, M.** (2012). Characteristics of lipid composition differences between cultured and wild ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Food Chemistry*, 131(4), 1104-1115.
- Sargent, J. R., Tocher, D. R & Bell, J. G.** (2002).4- The lipids. *Fish nutrition*, 3.^a ed., 181-257. Elsevier.
- Sheila, M. Innis.** (2007). Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development. *The Journal of Nutrition*, 137(4), 855-859.
- Shepherd, C. J., Monroig O., Tocher, D. R.** (2017). Future availability of raw materials for salmon feeds and supply chain implications: the case of Scottish farmed salmon. *Aquaculture*, 467, 49-62.
- Tocher, D.** (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449(C), 94-107.
- Triana-García, P.A., Gutierrez-Espinosa, M.C., & Eslava-Mocha, P.R.** (2013). Rendimiento productivo e hígado graso en tilapia híbrida (*Oreochromis spp*): Influencia de dos fuentes de lípidos. *ORINOQUIA*, 17(2), 183-196.
- Valenzuela B, A., & Ronco M, A.** (2004). Fitoesteroles y fitoesteranos: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Revista Chilena De Nutrición*, 31(1), 161-169.
- Van der Meeren, G., F. Tlusty, M., Metzler, A. & van der Meeren, T.** (2009). Effects of dietary DHA and EPA on neurogenesis, growth, and survival of juvenile American lobster, *Homarus americanus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 43(1), 225-232.
- Watanabe, T.** (1982). Lipid nutrition in fish. Comparative Biochemistry and Physiology, *Part B: Comparative Biochemistry*, 73(1), 3-15.
- Zachary A. Kupchinsky, Shawn D. Coyle, Leigh A. Bright1, & James H. Tidwell.** (2015). Evaluation of Heterotrophic Algae Meal as a Diet Ingredient for Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of the world aquaculture society*, 46(4), 445-452.
- Zárate, R., Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J., & Rodríguez, C.** (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1), 25.

Agradecimientos.

Nunca había estado ante un reto como este, un trabajo de tal importancia en el que no consideraba que tuviese los conocimientos necesarios para llevarlo a cabo al nivel que exigía. Sin embargo, tuve la suerte de contar con grandes profesionales a mi lado que me dotaron de todas las facilidades para que ese trabajo que en un principio se me antojaba imposible se hiciese realidad.

Así pues, me gustaría empezar agradeciendo enormemente a Covadonga por dejarme formar parte activa de este proyecto tan ambicioso y por todos sus consejos, no sólo académicos, sino también de vida que ha ido dando a lo largo de este curso y de este TFG.

A mis compañeros de laboratorio David Barrios y Ana Perdomo por hacerme esas horas mucho más amenas, más entretenidas y sobre todo por ayudarme cuando andaba algo perdido.

A Ana Galindo y Manuel Marrero que siempre estuvieron al pie del cañón supervisando y asesorando tanto en laboratorio como en los análisis que todo fuese bien, y a los que les estaré eternamente agradecido por la paciencia que tuvieron conmigo.

Un enorme agradecimiento a mi cotutora Diana Reis que siempre se mostró muy colaborativa y preocupada en todo momento por como lo llevaba, por no haber perdido los papeles nunca ante mis locuras y, sobre todo, como profesional ejemplar que es, enseñarme el porqué de las cosas de una forma que pudiese entender hasta el que no estudia Biología. Por todo ello la considero un ejemplo de cómo hacer las cosas para que se aproximen al máximo a la perfección.

A mis amigos de carrera y de toda la vida, por haber buscado de donde no había para levantarme el ánimo cuando estaba decaído, pero también por hacer que me pusiera las pilas cuando andaba perdido. Me siento afortunado de tenerles a mi lado.

A mi familia, la que ha estado presente todo este tiempo tanto de forma física como en mi corazón, por enseñarme los valores de responsabilidad, de esfuerzo, trabajo y sudor que son necesarios para llevar a cabo un trabajo como este, pero también por darme amor, cariño y ánimos cuando sentía que todo se desmoronaba.

Finalmente, a Paula, sin si todo esto hubiese sido imposible, sin ti no estaría donde estoy, y es que gracias a ti tengo un motivo para esforzarme, para sacar fuerzas de donde no había y realizar este trabajo y los que vengan de la mejor forma posible.

Muchas gracias a todos por la confianza y el apoyo depositado en mí, me sentiré eternamente agradecido.