



Efecto de la dieta con compuestos bioactivos de origen vegetal en las respuestas fisiológicas y tisulares de la carpa común (*Cyprinus carpio*)

Effect of diet with plant-derived bioactive compounds on physiological and tissular responses in the common carp (*Cyprinus carpio*)

Autores

✉ ¹Raad M. Sayed-Lafi

✉ ²Fatima A.M. Sultan

✉ ²Riyadh A. Al-Tameemi

¹National University of Science and Technology, Thi-Qar, Iraq.

²Department of Fisheries and Marine Resources, College of Agriculture, University of Basrah, Basrah, Iraq.

*Autor de correspondencia.

Resumen

El objetivo de este estudio fue investigar algunas respuestas fisiológicas a la influencia de la epicarpio (cáscara) de granada cruda (*Punica granatum*) (RPP) y su extracto alcohólico (PPE) en parámetros hematológicos, respuestas inmunológicas y antioxidantes, junto con su examen histológico en alevines de carpa común (*Cyprinus carpio*) ($13,5 \pm 0,1$ g). Los tratamientos incluyeron dos concentraciones de RPP y PPE (testigo, 0,5 y 1 mg·kg⁻¹ de dieta) en la dieta comercial (~35% de proteína) durante 70 días. Al final del experimento, todos los peces fueron anestesiados para realizar mediciones morfométricas y toma de muestras de sangre. Se observaron aumentos significativos en hemoglobina (HGB), hematocrito (Hct) y glóbulos rojos (RBCs) en los peces alimentados con RP y PPE en la dieta ($P < 0,05$). La efectividad de la lisozima mejoró significativamente en todas las dietas que contenían PPE en comparación con el testigo ($P < 0,05$). Se observó una mejora en la actividad de la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx) ($P < 0,05$). El examen histológico mostró un hígado normal con vacuolas lipídicas. El presente estudio revela una mejora general en la sangre, la respuesta inmune, el estado antioxidante y el mantenimiento de la eficiencia hepática con PPE en la dieta.

Palabras clave: antioxidantes; fenoles; cáscara de granada; carpa común.

Abstract

The aim of this study was to investigate some physiological responses to the influence of raw pomegranate peel (*Punica granatum*) (RPP) and alcoholic extract (PPE) on hematological parameters, immunological responses, and antioxidants with its histological examination of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling (13.5 ± 0.1 g). Treatments included two concentrations of RPP and PPE (control, 0.5 and 1 mg·kg⁻¹ of diet) of the commercial diet (~35 protein) for 70 days. At the end of the experiment, all fish were anaesthetized for morphometric measurements and blood sampling. Significant increases in hemoglobin (HGB), hematocrit (Hct), and red blood cells (RBCs) were observed in RP and PPE from the diet ($P < 0.05$). Show up the effectiveness improved significantly in all diets containing PPE compared to the control ($P < 0.05$). An improvement in catalase and glutathione peroxidase (GPx) activity were observed ($P < 0.05$). Histological examination showed a normal liver with lipid vacuoles. In summary, the present study revealed an overall improvement in blood, immune response, antioxidant status and maintenance of liver efficiency of PPE in the diet.

Keywords: antioxidants; phenols; pomegranate peel; common carp.

Citación sugerida: Sayed-Lafi, R. M., Sultan, F. A. M. and Al-Tameemi, R. A. (2024). Efecto de la dieta con compuestos bioactivos de origen vegetal en las respuestas fisiológicas y tisulares de la carpa común (*Cyprinus carpio*), Ecuador. *La Técnica*, 14(2), 95-102. DOI: <https://doi.org/10.33936/latecnica.v14i2.6194>

Recibido: Noviembre 14, 2023

Aceptado: Mayo 25, 2024

Publicado: Julio 5, 2024



Introducción

Una variedad de factores adversos ambientales (estrés) tienen un impacto en especies de peces en el sector de la acuicultura intensiva. Al recibir estímulos dañinos, como cambios de temperatura, pH, niveles de oxígeno, aumento en los niveles de amonio, manejo, transportación y cambios osmóticos en el agua, los peces muestran reacciones a fuentes de estrés (Pickering, 1993; Everly y Lating, 2013).

La respuesta integrada al estrés de los peces tiene componentes de comportamiento, hormonales y fisiológicos que pueden afectar su salud, y reducir la resistencia a enfermedades y estrés, y a los peces les toma tiempo regresar a su estado natural (Lebelo et al., 2001; Suljević et al., 2016). Aun ante sus efectos secundarios adversos, los antibióticos comúnmente son usados para tratar las enfermedades en los peces. Como resultado, se ha buscado conseguir alternativas más seguras, asequibles y efectivas, como las hierbas, vegetales y otras plantas alimenticias, para usarlas como potenciadores de crecimiento e inmunidad (Badrey et al., 2019).

En este escenario, los fitogénicos se definen como compuestos bioactivos vegetales que se usan como aditivos alimenticios funcionales que muestran efectos positivos en el crecimiento y salud de los animales. Los fitogénicos normalmente incluyen extractos de plantas aromáticas, y aceites esenciales que se caracterizan por ser ricos en compuestos biológicamente activos (Suphoronski et al., 2019; Christaki et al., 2020). En la acuicultura, un amplio espectro de fitogénicos han sido estudiados principalmente por su gran repertorio de propiedades, que incluyen promoción del crecimiento, y actividades antimicrobiales, inmunoestimulantes, antioxidantes, antiinflamatorias y sedantes (Reverter et al., 2021).

Los fitogénicos derivados de la cáscara de la granada (epicarpio; *Punica granatum* L.) y los productos manufacturados a partir de este fruto, son en particular más ricos en antioxidantes que el jugo de este fruto, lo que los convierte en candidatos atractivos para ser usados como suplemento alimenticio de animales (Badawi y Goma, 2016). Sin embargo, Türkyılmaz et al. (2013) reportaron que la cáscara de granada contiene también flavonoides, ácidos fenólicos y taninos (elagitaninos como punicalina, punicalagina, ácido gálico y ácido elágico).

Esto hace que la cáscara de granada sea una posible vía para descubrir compuestos naturales con diversas funciones biológicas, acciones antibacteriales y potenciales ventajas para la salud (Kaderides et al., 2015). Es bien sabido que la cáscara de granada (*P. granatum*) contiene químicos fenólicos en cantidades aproximadamente 10 veces mayor que en la pulpa (mesocarpo; Li et al., 2006). Las características antibacteriales, antioxidantes, antiinflamatorias, antiproliferativas, hipolipidémicas, hipoglucémicas de la granada han sido estudiadas extensamente tanto en las secciones comestibles

y no comestibles de la planta, incluyendo la cáscara, las semillas y las flores (Akhtar et al., 2015; Banihani et al., 2017; Danesi y Ferguson, 2017; Tortora et al., 2017; Bassiri-Jahromi, 2018; Altieri et al., 2019; Hou et al., 2019).

Con el fin de aprovechar sus beneficios para la salud, los productos derivados de la cáscara han sido seleccionados como potenciales aditivos naturales para la preservación de alimentos y la mejora de la calidad, así como componentes de suplementos y nutraceuticos (Akhtar et al., 2015). Dado este contexto, la cáscara de la granada (*P. granatum*) fue elegido como objeto de estudio con la intención de examinar sus efectos en los parámetros hematológicos, estados oxidativos, respuestas inmunológicas y salud hepática de la carpa común (*Cyprinus carpio*).

Materiales y métodos

Preparación del extracto de cáscara de granada

Siguendo el método de Gülçin et al. (2003) la preparación incluyó mezclar 25 mg de cáscara de granada en polvo con 250 mL de etanol (96%), revolver la mezcla durante 24 horas en una mezcladora magnética, y filtrar el líquido dos veces a través de una gasa. Una vez que el filtrado fue recogido con papel filtro (Whatmann No. 1), fue concentrado con una rotatoria a vapor, secado a 40 °C, colocado en una botella opaca sellada, para luego ser puesto en el refrigerador hasta un futuro uso. El proceso se repitió con los mismos pasos y condiciones hasta que se obtuvo la cantidad requerida del extracto.

Medición del contenido fenólico total

Se determinó con el reactivo I Folin Ciocalte (Chun et al., 2003). En resumen, se mezclaron 0,5 mL del extracto y 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. La solución se mantuvo a 25 °C de 5 a 8 minutos para luego añadir 2 mL de solución de carbonato de sodio al 7,5% e incrementar con agua el volumen a 8 mL.

La absorbancia fue determinada usando un espectrofotómetro (LKB 4050, Inglaterra) a 725 nm después de 2 horas de incubación. Una curva de calibración usando ácido gálico fue realizada. Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico para biomasa fresca ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Los resultados fueron calculados con la siguiente fórmula y expresados como porcentaje w/w: $\text{GAE} \times V \times D \times 10^{-6} \times 100 / W = \text{contenido fenólico total (\% w/w)}$, donde GAE fue el equivalente de ácido gálico ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), V fue el volumen total de la muestra (mL), D fue el factor de dilución, y W fue la biomasa de la muestra (g) (Chun et al., 2003).

Determinación del contenido total de flavonoides

Se usó una prueba colorimétrica para determinar la concentración total de flavonoides (Zhishen et al., 1999). Agua destilada (4 mL) donde se mezcló 100 microlitros del extracto. Luego, se agregó 0,3

mL de una solución al 5% de nitrato de sodio. Cloruro de aluminio (0,3 mL al 10%) fue agregado 5 minutos después. Se añadió hidróxido de sodio (2 mL 1 M) a la mezcla 6 minutos después. El agua destilada (3,3 mL) fue añadida enseguida, y el líquido fue mezclado correctamente después de ser diluido.

En 510 nm, la absorbancia fue medida comparándola con una vacía. Rutina sirvió como el estándar para la curva de calibración. Se usó el equivalente de Rutina por gramo de la muestra ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) para expresar la cantidad total de flavonoides en el extracto. Diez miligramos de Rutina fueron diluidos en 10, 20, 40, 80, o 160 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ luego de ser disueltos en 100 mL de metanol (80%) (Lin et al., 2007). Los 0,5 mL de la solución estándar diluida se combinaron con 1,5 mL de metanol 95%, 0,1 mL de cloruro de aluminio al 10%, 0,1 mL de 1 M de acetato de potasio, y 2,8 mL de agua diluida en lotes separados. Con un espectrofotómetro, la absorbancia del reactivo de la muestra fue medido a 415 nm luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. El mismo volumen de agua destilada se usó en lugar del cloruro de aluminio al 10% en el ensayo en blanco (Zhishen et al., 1999).

Peces experimentales

El Departamento de Acuicultura de la Facultad de Agricultura proporcionó los alevines de carpa común para el estudio. Los pescados que eran muy grandes o que han sufrido estrés extremo no fueron incluidos. Cada pez fue pesado en una balanza electrónica, mientras estaban sumergidos en un tazón con agua, hasta acercarse a 13,51 g. Cinco tratamientos con tres réplicas se aplicaron a los peces, (5 peces). Antes de comenzar el experimento, se les dio 2 semanas a los peces para que se aclimaten al ambiente del laboratorio. Cuando comenzó el experimento, los peces fueron colocados en un acuario de $60 \times 40 \times 50$ cm, lo que sirvió también como unidad experimental.

Proceso experimental

Se utilizó como testigo una dieta comercial iraní, de la que se conocía su composición química, como se muestra en la tabla 1. Cáscara de granada en polvo (RPP) y extractos de alcohol (PPE) al 0,5% y 1%, respectivamente, fueron agregados a cuatro dietas experimentales. Se alimentó a los peces dos veces al día (a las 9 am y 4 pm) siguiendo la dieta en una proporción de 2% de su peso corporal. Durante el periodo de prueba se midieron los parámetros de calidad del agua ($\text{pH} = 8,78$, $\text{EC} = 2,71 \text{ ds} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\text{DO} = 9,43 \text{ ppm}$, $\text{Temp} = 24,34 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{Sal} = 1,30 \text{ psu}$).

Análisis hematológico

Muestras de sangre se extrajeron del corazón usando una jeringa de vidrio, y dicha sangre se colocó en tubos de ensayo organizados en dos grupos: el primer grupo libre de anticoagulantes, para extraer el suero con una centrífuga (Labofuge 400 E, 600 g; Heraeus, Os-terode, Alemania) a 3.000 rpm por 15 minutos, para luego mantenerlos en refrigeración hasta el análisis bioquímico. El analizador de hematología Mindray-BC-30S se utilizó para medir la concentración de hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), glóbulos rojos (RBC) y glóbulos blancos (WBC).

Tabla 1. Aproximado de la composición química de la dieta comercial usada en el experimento.

Nutrición	Cantidad
Humedad	10%
Proteína cruda	35%
Ceniza	12%
Energía metabolizable	3700 Kcal·kg ⁻¹
Fibra cruda	5,5%
Grasa cruda	6%
Nitrógeno volátil total (NVT)	50 mg·100 g ⁻¹
Aminoácidos esenciales	
Lisina	1,80%
Metionina	0,48%
Treonina	1,15%

Composición: harina de trigo, cebada, gluten de maíz, harinas vegetales, harinas de pescado, almidón, aceite de pescado, cloruro de colina, lisina, metionina, treonina, mezcla especial de minerales, inositol

Respuestas inmunes y actividad antioxidante

La actividad de la lisozima fue analizada con base a las mediciones de turbiedad. En esta prueba, el suero (10 μL) fue colocado en cubetas a 200 μL en suspensión de *Micrococcus* (35 mg de polvo seco de *Micrococcus* en 95 mL de 0,15 M de tampón fosfato + 5,0 mL de solución de NaCl). El cambio en la extinción fue medida inmediatamente a 546 nm al inicio de la reacción y después de una incubación de 20 minutos a 40 $^\circ\text{C}$. El contenido de lisozima se determinó con base a la curva de calibración y la extinción fue medida según Schäperclaus et al. (1992). La catalasa y la glutatión peroxidasa se determinaron usando kits comerciales (kit de ensayo Cayman 707002 Catalase, y kit de glutatión peroxidasa Cayman 703102, respectivamente).

Análisis histopatológico

Dos peces de cada acuario fueron seleccionados al azar y sacrificados ($n = \text{seis}$ por tratamiento). Se les removió la cabeza y la cola a cada pescado, y se diseccionó el hígado y las vísceras, los cuales se colocaron en formol tamponado neutro al 10% (Thermo Fisher, Kalamazoo, MI). Las muestras del hígado fueron fijadas en formalin por 48 horas. Luego, se lavaron y secaron las muestras en grados sucesivos de alcohol etílico. Posteriormente, las muestras fueron tratados de manera rutinaria para obtener cuatro cortes de parafina con un microtomo Cambridge Rocking. Los tejidos fueron seccionados longitudinalmente. Para el análisis microscópico, se utilizaron tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) para teñir los cortes (Bancroft y Layton, 2013).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media $\pm$ SD. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto del tratamiento en el rendimiento de los peces. Los datos fueron analizados con el programa IBM SPSS (2013). Las diferencias entre medias se compararon usando el test de rango múltiple de LSD a un nivel de $P < 0,05$.

Resultados y discusión

Los beneficios para la salud de los flavonoides han sido objeto de investigaciones recientes, y se ha comprobado su potente efecto



antioxidante (Orak et al., 2012). Como se muestra en la tabla 2, en la cáscara de granada se observaron altas actividades antioxidantes y contenido fenólico. Según estudios previos que han reportado actividad antioxidante y contenido fenólico y flavonoide total, los extractos de cáscara fueron más potentes (casi 10 veces más) que los de la pulpa, lo cual indicó que el extracto de la cáscara tuvo compuestos que fueron potencialmente más efectivos (Ardekani et al., 2011; Orak et al., 2012).

Tabla 2. Contenidos fenólicos y flavonoides del extracto de cáscara de granada (n = 3).

	Fenólico total mg GAE·g ⁻¹ *	Flavonoide total mg RE·g ⁻¹ **
Extracto de alcohol	175,95±1,41	42,89±1,30

*(GAE) g-1 -mg equivalentes de ácido gálico ** (RE) g-1 -mg equivalentes rutina.

Los resultados del antioxidante fueron consistentes con los obtenidos por Nuamsetti et al. (2012) y Badawi y Gomaa (2016), quienes descubrieron que el extracto de alcohol contenían fenoles (185) mg·mg⁻¹ GAE g⁻¹ y flavonoides (32 mg) RE·g⁻¹, así como un total de 166,83 mg GAE·g⁻¹, 152,6 mg GAE·g⁻¹, y 85,48 mg GAE·g⁻¹ de fenoles, respectivamente. Por lo tanto, el contenido antioxidante de esta planta fue mayor que el de muchas otras plantas. Aunque hubo diferencias entre el contenido antioxidante con otros estudios, se debe considerar que las variaciones en el contenido total fenólico de una granada puede estar influenciado por el solvente usado para la extracción (Ambigaipalan et al., 2016).

La enzima lisozima mostró un incremento en todos los tratamientos (figura 1). Badawi y Gomaa (2016) explicaron que la lisozima es uno de los agentes no especializados, considerados como la primera línea contra los patógenos, y en el estudio se indicó que al agregar PPE, los niveles de lisozima incrementan, y este mismo resultado fue mostrado por Monir et al. (2020), quienes notaron una mejora en los niveles de lisozima en el suero de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) después de agregar extractos de hoja de moringa (*Moringa oleifera*) y PPE. Los resultados del estudio de Harikrishnan et al. (2012) mostraron un aumento en los niveles de lisozima después de incorporar PPE a la dieta de platijas (*Paralichthys olivaceus*).

Hamed y Abdel-Tawwab (2021) comprobaron que los niveles de lisozima aumentaron en tilapias del Nilo que habían sido alimentadas con dietas que incluían RPP. El estudio de Sönmez et al. (2022) mostró un aumento continuo en la actividad de lisozimas durante los 40 días del experimento en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Sin embargo, los resultados de la presente investigación concordaron con los de Badrey et al. (2019). No obstante, estos resultados pueden estar relacionados con los compuestos químicos

de la cáscara de la granada, como los flavonoides, y derivados del ácido elágico (Dahham et al., 2010).

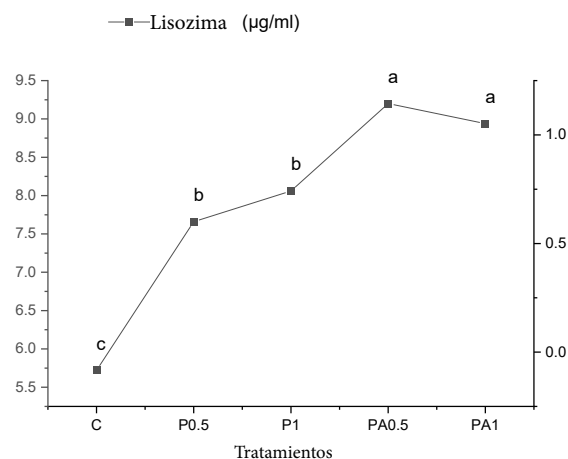


Figura 1. Actividad de la lisozima en el suero de la carpa común (*Cyprinus carpio*) alimentada con RPP y PPE. Los valores se presentan como media ±SD. Las diferentes letras por encima de la línea expresan diferencias significativas entre tratamientos (P<0,05). T: Testigo, P0.5: cáscara de granada 0,5%, cáscara de granada en polvo 1%, PA0.5: Extractos de alcohol 0,5%, PA1: Extractos de alcohol al 1%.

Ambas actividades antioxidantes (Catalasa y GPX) incrementaron significativamente (P<0,05) en el suero sanguíneo de las carpas alimentadas con diferentes concentraciones de RPP y PPE como se muestra en la figura 2.

Sin embargo, el aumento en la Catalasa puede atribuirse a la presencia de algunos compuestos fenólicos en la cáscara de granada, como el ácido protocatequico, ácido gálico, pirogalol, ácido p-cumárico, cataquina, ácido rosmarínico, rutina, naringina, mircetina, escopolatino e hisperdina, los cuales tuvieron actividad antioxidante al reducir el estrés causado por la generación de radicales libres y la peroxidación de lípidos (Mashkor y Muhson, 2014).

Así mismo, los compuestos fenólicos mejoraron la actividad enzimática GPx (Moskaug et al., 2005). El PPE puede ser un factor importante para proteger a los tejidos del daño oxidativo al incrementar la eliminación de radicales libre por parte de la Catalasa y las enzimas GPx (Abdel-Moneim, 2012)

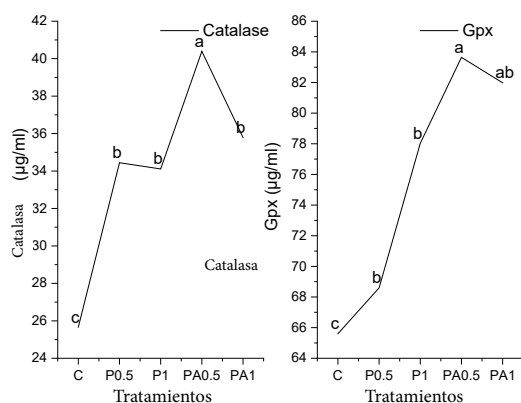
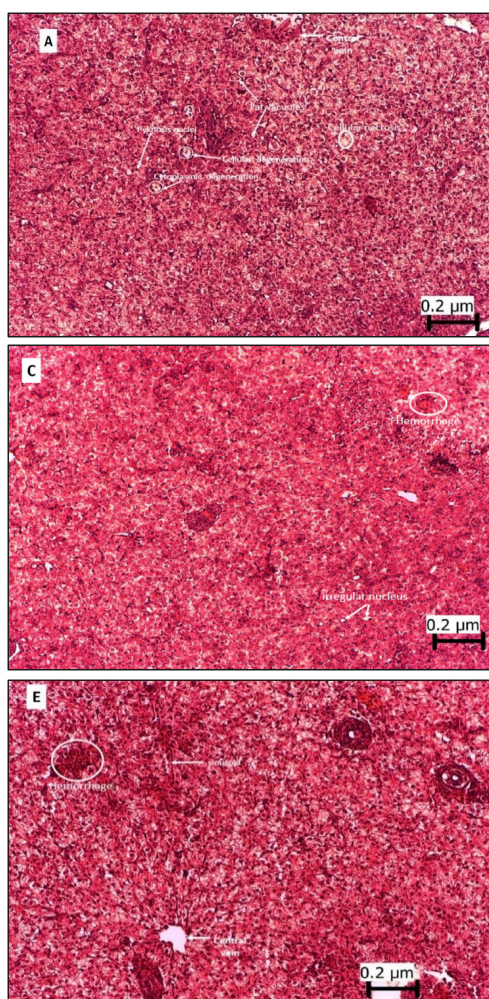


Figure 2. Actividad de Catalasa y GPx en el suero de la carpa común (*Cyprinus carpio*) alimentada con RPP Y PPE (). Los valores se presentan como media $\pm$ SD. Las diferentes letras por encima de la línea expresan diferencias entre grupos ($P < 0,05$). C: Testigo, P0.5: cáscara de granada 0,5%, cáscara de granada en polvo 1%, PA0.5: Extractos de alcohol 0,5%, PA1: Extractos de alcohol al 1%.



Los estudios histológicos son muy importantes para evaluar la salud de los peces; estos permiten que los efectos patológicos que pueden ser causados por nutrientes puedan ser evaluados, además de poder entender los mecanismos de digestión, metabolismo, y monitorear el estado de salud de los peces. En general, la forma y la estructura del canal alimenticio están estrechamente relacionados con sus hábitos alimenticios. (Banan, 2012; Bonvini, 2017).

Los resultados del estudio histológico se muestran en la figura 3, correspondiente a las carpas comunes alimentadas con suplementos de RPP y PPE. En el tratamiento de control, se observa que en la figura 3A la vacuolización en las células, y una especie de necrosis, y, adicionalmente, la degeneración del citoplasma. El histológico del hígado con RPP y PPE muestran una morfología del hígado con una apariencia relativamente normal, y la estructura hepática se caracterizó por hepatocitos dispuestos en una capa simple, alineados con sinusoides. La parénquima estaba compuesta principalmente por hepatocitos poliedrales, típicamente con núcleos centrales, márgenes de cromatina teñidos y nucléolos prominentes. También se observó masa pancreática, situada alrededor de las ramas de la vena porta hepática.

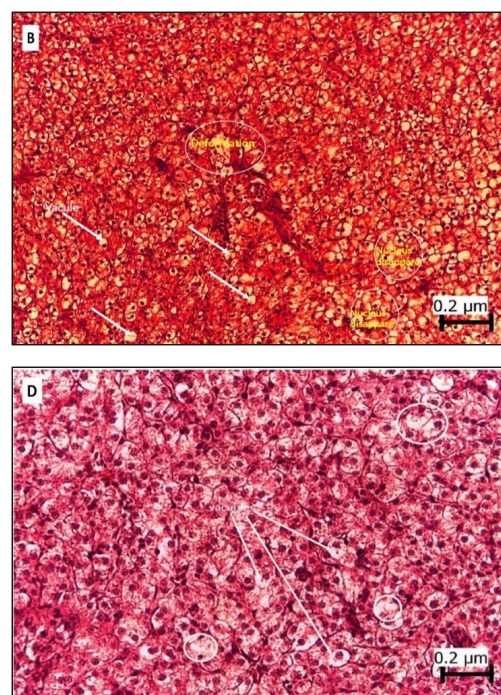


Figure 3. Fotomicrografías del hígado de una carpa común alimentada con RPP (P0.5%, P1%), PPE (PA0.5%, PA1%), y tratamiento testigo (c). (A) Degeneración y necrosis de los hepatocitos (flechas blancas) y vacuolas de grasa y un pequeño número de deformaciones desplazadas periféricamente (círculo blanco). (C) Hemorragia (círculo blanco) y núcleos irregulares (flechas blancas). (D) y (E) vacuoles de grasa (flechas blancas). H&E; bar= 20 µm.

La figura 3B muestra la vacuolización y el núcleo desaparecido. Mientras que, la apariencia normal histológica con la acumulación de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos se puede apreciar en las figuras C, D y E. En general, se descubrió que añadir el RPP y el PPE mejora el tejido normal del hígado. El desarrollo de las vesículas lipídicas durante el tratamiento con alcohol es representado en la figura 3. Quizás, los lípidos y glicógenos, los cuáles están relacionados con el operar normal del hígado, puede estar presente también en el citoplasma de los hipocitos.

La creación de las vacuolas en el hígado indica un desbalance entre el ritmo de la sintetización de químicos en las células de la parénquima y la tasa en la que son liberados en el flujo sanguíneo. Los hepatocitos pueden producir vacuolas como protección ante compuestos peligrosos, y este mecanismo de defensa puede estar a cargo de recolectar a las moléculas tóxicas y de evitar que éstas interfieran con las funciones básicas de las células (Ayadi et al., 2015).

Además, la evaluación morfométrica del hígado reveló que en P0.5%, se observó un pequeño número de núcleos desplazados periféricamente. Según Caballero et al. (1999) núcleos agrandados de hepatocitos y desplazamiento nuclear de la periferia de los hepatocitos, dependiendo de las condiciones experimentales, son consideradas como una situación patológica o puede ser visto como un mecanismo de adaptación de los hepatocitos. En la presente investigación, la morfología de los hepatocitos fue similar a las dietas analizadas de las carpas.

Por lo tanto, la morfología hepática observada refleja un estado de buena alimentación y no una situación patológica. Los descubrimientos presentes se deben a los compuestos activos de la cáscara de granada, y resultados similares fueron reportados por Hussein et al. (2022).

Conclusión

Los resultados de este estudio demuestran que la inclusión del extracto del alcohol de cáscara de granada aumenta los parámetros sanguíneos, la inmunidad, antioxidantes, y la salud hepática. Futuras investigaciones deberán enfocarse en determinar las proporciones óptimas para la alimentación de los peces con el fin de mejorar la resistencia y la salud de peces de piscifactorías usando fitogénicos en lugar de antibióticos.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no hubo conflicto de interés en esta publicación ni en ninguna de sus fases.

Referencias bibliográficas

- Abdel-Moneim, A. E. (2012). Evaluating the potential role of pomegranate peel in aluminum-induced oxidative stress and histopathological alterations in brain of female rats. *Biological Trace Element Research*, 150(1), 328-336.
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternal, D. and Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174, 417-425.
- Altieri, F., Cairone, F., Giamogante, F., Carradori, S., Locatelli, M., Chichiarelli, S. and Cesa, S. (2019). Influence of ellagitannins extracted by pomegranate fruit on disulfide isomerase PDIA3 activity. *Nutrients*, 11(1), 186. <https://doi.org/10.3390/nu11010186>
- Ambigaipalan, P., De Camargo, A. C. and Shahidi F. (2016). Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(34), 6584-6604. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02950>
- Ardekani, M. R. S., Hajimahmoodi, M., Oveisi, M. R., Sadeghi, N., Jannat, B., Ranjbar, A. M., Gholam, N. and Moridi, T. (2011). Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of persian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 519. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2011.948>
- Ayadi, I., Monteiro, S. M., Regaya, I., Coimbra, A., Fernandes, F., Oliveira, M. M., Peixoto, F. and Mnif, W. (2015). Biochemical and histological changes in the liver and gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to Red 195 dye. *RSC Advances*, 5(106), 87168-87178. <https://doi.org/10.1039/C5RA13127H>
- Badawi, M. E. and Gomaa, A. M. (2016). Influence of diets supplemented with pomegranate peel extract on performance in *Oreochromis niloticus*. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 64 (Supplement 2), S87-S94. <http://hdl.handle.net/2115/62021>
- Badrey, A. A., Osman, A., Farrag, S. M., Toutou, M. M. M. and Moustafa, M. (2019). Influences of diets supplemented with pomegranate peel on haematology, blood biochemistry and immune status in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(2), 133-144. <https://dx.doi.org/10.21608/ejabf.2019.33559>

- Banan Khojasteh, S. M. (2012). The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes: a brief review. *International Journal of Aquatic Science*, 3(2), 71-88.
- Bonvini, E. (2017). Development of innovative feed products and feed concepts for marine species in aquaculture. Ph.D. Thesis. University of Bologna. 100 p.
- Bancroft, J. D. and Layton, C. (2013). The hematoxylin and eosin. pp. 172-214. In: Suvarna, S. K., Layton, C. and Bancroft, J. D. (Eds.). *Theory and practice of histological techniques*. 7th Ed., Churchill Livingstone of El Sevier, Philadelphia, Ch. 10 and 11.
- Banihani, S., Swedan, S. and Alguraan, Z. (2013). Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutrition Research*, 33(5), 341-348. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.03.003>
- Bassiri-Jahromi, S. (2018). *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. *Oncology Reviews*, 12(1), 345,351. <https://doi.org/10.4081%2Foncol.2018.345>
- Caballero, M. J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F. J., Izquierdo, M. S. and Fernández, A. J. (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179(1-4), 277-290. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00165-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00165-9)
- Christaki, E., Giannenas, I., Bonos, E. and Florou-Paneri, P. (2020). Innovative uses of aromatic plants as natural supplements in nutrition. pp. 19-34. In: Florou-Paneri, P., Christaki, E. and Giannenas, I. (Eds.). *Feed Additives*. Cambridge, Massachusetts. Academic Press.
- Chun, O. K., Kim, D. O., Moon, H. Y., Kang, H. G. and Lee, C. Y. (2003). Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7240-7245. <https://doi.org/10.1021/jf0343579>
- Dahham, S. S., Ali, M. N., Tabassum, H. and Khan, M. (2010). Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 9(3), 273-281.
- Danesi, F. and Ferguson, L. R. (2017). Could pomegranate juice help in the control of inflammatory diseases?. *Nutrients*, 9(9), 958. <https://doi.org/10.3390/nu9090958>
- Everly, G. S. and Lating, J. M. (2013). The anatomy and physiology of the human stress response. pp. 17-51. In: Everly, G. S. and Lating J. M. (Eds.). *A clinical guide to the treatment of the human stress response*. Springer, New York, NY.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E. and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem.*, 83(3), 371-382.
- Hamed, H. S. and Abdel-Tawwab, M. (2021). Dietary pomegranate (*Punica granatum*) peel mitigated the adverse effects of silver nanoparticles on the performance, haemato-biochemical, antioxidant, and immune responses of Nile tilapia fingerlings. *Aquaculture*, 540, 736742. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736742>
- Harikrishnan, R., Kim, J. S., Kim, M. C., Balasundaram, C. and Heo, M. S. (2012). Pomegranate enriched diet enhances the hematology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Philasterides dicentrarchi*. *Veterinary Parasitology*, 187(1-2), 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.006>
- Hou, C., Zhang, W., Li, J., Du, L., Lv, O., Zhao, S. and Li, J. (2019). Beneficial effects of pomegranate on lipid metabolism in metabolic disorders. *Molecular Nutrition and Food Research*, 63(16), 1800773. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800773>
- Hussein, E. E., Fatan, N., El-Betagy, A. E. D. and Naeem, M. A. (2022). Enhancement of the nutritional value, antioxidant properties and growth performance in mono-sex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fries by pomegranate peel supplementation. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1717922/v1>
- Kaderides, K., Goula, A. M. and Adamopoulos, K. G. (2015). A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31, 204-215. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.08.006>
- Lebelo, S. L., Saunders, D. K. and Crawford, T. G. (2001). Observations on blood viscosity in striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum) associated with fish hatchery conditions. *Kansas Academy of Science*, 104, 183194. [https://doi.org/10.1660/0022-8443\(2001\)104\[0183:OOBVIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1660/0022-8443(2001)104[0183:OOBVIS]2.0.CO;2)
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. and Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>
- Lin, J. Y. and Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101(1), 140-147.
- Mashkor, I. M. A. A. and Muhson, A. A. (2014). Total phenol, total flavonoids and antioxidant activity of pomegranate peel. *International Journal of ChemTech Research*, 6(11), 4656-4661.

- Monir, W., Abdel-Rahman, M. A., Hassan, S. E. D. and Awad, S. M. (2020). Pomegranate peel and moringa-based diets enhanced biochemical and immune parameters of Nile tilapia against bacterial infection by *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 145, 104202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104202>
- Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M. C. and Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 277S-283S.
- Nuamsetti, T., Dechayuenyong, P. and Tantipaibulvut, S. (2012). Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils. *Science Asia*, 38(3), 319-322.
- Orak, H. H., Yagar, H. and Isbilir, S. S. (2012). Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 373-387. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0049-6>
- Pickering, A.D. (1993). Growth and stress in fish production. In Genetics in aquaculture. *Aquaculture*, 111, 51-63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81527-9.50010-5>
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sarter, S., Sasal, P. and Caruso, D. (2021). Moving towards more sustainable aquaculture practices: A meta-analysis on the potential of plant-enriched diets to improve fish growth, immunity and disease resistance. *Review in Aquaculture*, 13(1), 537-555. <https://doi.org/10.1111/raq.12485>
- Sönmez, A. Y., Bilen, S., Özdemir, K. Y., Alagöz, K. and Özçelik, H. (2022). Effect of aqueous methanolic extract of pomegranate peel (*Punica granatum*) and veratrum (*Veratrum album*) on oxidative status, immunity and digestive enzyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural Sciences*, 28(2), 159-170. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.870923>
- Suphoronski, S. A., Chideroli, R., Facimoto, C. T., Mainardi, R. M., Souza, F. P. and Lopera-Barrero, N. M. (2019). Effects of a phytogetic, alone and associated with Potassium diformate, on tilapia growth, immunity, gut microbiome and resistance against *Francisella*. *Scientific Reports*, 9(1), 6045. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42480-8>
- Suljević, D., Alijagić, A., Mitrašinović-Brulić, M., Fočak, M. and Islamagić, E. (2016). Comparative physiological assessment of common carp (*Cyprinus carpio*) and crucian carp (*Carassius carassius*) based on electrolyte and hematological analysis. *Macedonian Journal of Animal Science*, 6(2), 95-100. <http://dx.doi.org/10.54865/mjas1662095s>
- Tortora, K., Femia, A. P., Romagnoli, A., Sineo, I., Khatib, M., Mulinacci, N., Giovannelli, L. and Caderni, G. (2018). Pomegranate by-products in colorectal cancer chemoprevention: effects in apc-mutated pirc rats and mechanistic studies in vitro and ex vivo. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(2), 1700401. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700401>
- Türkyılmaz, M., Tağı, Ş., Dereli, U. and Özkan, M. (2013). Effects of various pressing programs and yields on the antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic content and colour of pomegranate juices. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1810-1818. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.100>
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

Declaración de contribución a la autoría según CRediT

Raad M. Sayed-Lafi: Investigación, análisis formal, redacción-borrador original, redacción, revisión y edición. **Fatima A. M. Sultan:** Redacción-borrador original, redacción-revisión y edición. **Riyadh A. Al-Tameemi:** Análisis formal, redacción-revisión y edición.