

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Diseño de un protocolo de obtención de liposomas con compuestos
bioactivos contra bacterias patógenas de camarón

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Jorge Gary Coque Indacochea

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2019

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

College of Maritime Engineering of Sea Science

Design of a protocol for obtaining liposomes with bioactive compounds
against pathogenic shrimp bacteria

CAPSTONE COURSE

A Project submitted in partial fulfillment of the requirements for
the degree of:

Aquaculture Engineer

By:

Jorge Gary Coque Indacochea

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2019

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a mi familia, quienes me han apoyado de forma incondicional durante toda mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora, a mi profesor de la materia integradora, a los docentes de la carrera, y a todos mis compañeros por apoyarme en cada etapa de mis estudios en la universidad.

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Jorge Gary Coque Indacochea* doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

Jorge Gary Coque Indacochea

EVALUADORES

Wilfrido Arguello, Ph.D
Profesor de la materia

Bonny Bayot, Ph.D
Tutora

RESUMEN

Las infecciones bacterianas de camarón de cultivo son un limitante para la industria del cultivo de camarón. Con el afán de aumentar la producción, es necesario encontrar métodos que disminuyan la incidencia de problemas provocados por eventos de etiología bacteriana, por lo que la administración de compuestos bioactivos contra *Vibrios* dentro de cápsulas en las dietas balanceadas es la opción analizada. Se requiere seleccionar el compuesto bioactivo específico y el diseño de un protocolo que lo encapsule para que sea incorporado con la dieta. La investigación realizó un trabajo bibliográfico en el que se determinó que los compuestos bioactivos más adecuados son probióticos y fitobióticos. De la misma manera, se encontró que el método de extrusión utilizando lípidos y alginato de sodio permiten la formación de microcápsulas efectivas para fitobióticos y probióticos, respectivamente. Luego de hacer un análisis de costos, se determinó que \$575.686 fueron necesarios para la elaboración de un lote de liposomas, de los cuales ESPOC tendría que invertir solamente \$217, debido a que ya cuenta con los equipos para realizar los procesos. Los liposomas y las cápsulas de alginato deben ser sujetos a pruebas de efectividad de encapsulación, así como a pruebas de desafío, y cultivos experimentales y comerciales. Este estudio ha sido diseñado para la producción de encapsulados a pequeña escala, tal como lo que es requerido para investigadores que deseen probar *in-house* la eficiencia real de compuestos bioactivos.

Palabras Claves: camarón, fitobióticos, liposomas, microencapsulación, probióticos.

ABSTRACT

Bacterial infections in shrimp culture are a limitation for the shrimp farming industry. In order to increase production, it is necessary to find methods that reduce the incidence of problems caused by events of bacterial etiology, so the administration of bioactive compounds against Vibrios within balanced diets is the option analyzed. It is required to select the specific bioactive compound and design a protocol that encapsulates it to be consumed with the diet. The research carried out a bibliographic work, in which it was determined that the probiotics and phytobiotics are the most appropriate bioactive compounds. In the same way, it was found that the extrusion method using lipids and sodium alginate allows the formation of effective microcapsules for phytobiotics and probiotics, respectively. After doing a cost analysis, it was determined that \$575686 was necessary for the elaboration of a batch of liposomes, from which ESPOL would require \$217 because it has the equipment to carry out the processes. Liposomes and alginate capsules should be subject to encapsulation analysis tests, as well as challenge tests, and experimental and commercial cultures. This study has been designed for the production of small-scale encapsulates, such as what is required for researchers who wish to test the real efficiency of bioactive compounds in-house.

Keywords: *bioencapsulation, shrimp, phytobiotics, microencapsulation, probiotics*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	6
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	¡Error! Marcador no definido.9
1.1 Descripción del problema	9
1.2 Justificación del problema	10
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivo General	12
1.3.2 Objetivos Específicos.....	12
1.4 Marco teórico	12
CAPÍTULO 2	155
2. Metodología.....	155
2.1 Análisis de los requerimientos de la biocápsula.....	15
2.1.1 Selección de los compuestos bioactivos.....	16
2.1.2 Otros requerimientos.....	18
2.2 Protocolo para obtención de liposomas conteniendo compuestos bioactivos.....	21
2.3 Determinación de eficiencia de encapsulación.....	22
2.4 Evaluación de eficiencia de encapsulación en condiciones de experimentación y producción.....	22
CAPÍTULO 3	¡Error! Marcador no definido.3
3. Resultados y análisis	¡Error! Marcador no definido.3

3.1	Análisis de requerimiento de la biocápsula.....	23
3.1.1	Selección del compuesto bioactivo.....	23
3.1.2	Otros requerimientos.....	23
3.2	Protocolo para obtención de liposomas conteniendo compuestos bioactivo...24	
3.2.1	Protocolo para encapsulación de fitobióticos en liposomas.....	24
3.2.2	Protocolo para encapsulación de probióticos en cápsula de alginato...24	
3.3	Determinación de eficiencia de encapsulación.....	28
3.4	Evaluación de eficiencia de encapsulación en condiciones de experimentación y producción.....	31
CAPÍTULO 4		¡Error! Marcador no definido.
4.	Conclusiones y recomendaciones	¡Error! Marcador no definido.2
BIBLIOGRAFÍA		35

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
AHPND	Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda
SENESCYT	Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e innovación
BCE	Banco Central del Ecuador

SIMBOLOGÍA

pH	Potencial de Hidrógeno
μ	Micras
gr	Gramo

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 REPRESENTACIÓN GRÁFICA D PARA EL DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS CON COMPUESTOS BIOACTIVOS CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS DE CAMARÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.5
FIGURA 2.2 PROCESO DE ANÁLISIS DE LOS REQUERIMIENTOS DE LA BIOCÁPSULA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.6
FIGURA 2.3 MORFOLOGÍA DEL SISTEMA DIGESTIVO DE CAMARÓN (PRANCHUWAT ET AL. 2018)	20
FIGURA 3.1 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PROTOCOLO PARA LA ENCAPSULACIÓN DE FITOBIÓTICOS EN LIPOSOMAS	25
FIGURA 3.2 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PROTOCOLO PARA ENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS EN CÁPSULA DE ALGINATO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.7
FIGURA 4.1 DISEÑO CONCEPTUAL FINAL DE BIOCÁPSULAS CONTENIENDO COMPUESTOS BIOACTIVOS CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS DE CAMARÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 3.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS BASADOS EN LA VALORIZACIÓN DE EVIDENCIAS EN LA LITERATURA CIENTÍFICA (ESCASA, INTERMEDIA Y ABUNDANTE) DE PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS O ANTIVIRULENTAS CONTRA INFECCIONES BACTERIANAS Y ENCAPSULACIÓN EFICIENTE ...	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.3
TABLA 3.2 ANÁLISIS DE COSTO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN LOTE DE LIPOSOMAS CONTENIENDO FITOBIÓTICOS POR EL MÉTODO DE DISPERSIÓN SIMPLE Y EXTRUSIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.6
TABLA 3.3 ANÁLISIS DE COSTO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN LOTE DE CÁPSULAS CONTENIENDO PROBIÓTICOS POR EL MÉTODO DE EXTRUSIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.28
TABLA 3.4 ANÁLISIS DE COSTO PARA LAS PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN PARA PROBIÓTICOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.0
TABLA 3.5 ANÁLISIS DE COSTO PARA LAS PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN PARA FITOBIÓTICOS.....	31

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

Los compuestos bioactivos naturales como bacterias probióticas, o compuestos derivados de plantas, constituyen alternativas prometedoras a los antibióticos para prevenir y tratar enfermedades bacterianas en camarón. Pese a que algunos de estos compuestos pueden mostrar eficacia en pruebas *in vitro* e *in vivo*, su efectividad en los sistemas de cultivo puede verse afectada por dificultades presentadas en la forma de administración. En el caso que los compuestos bioactivos son administrados en forma directa al agua de cultivo, las cantidades proporcionadas pueden ser elevadas, especialmente en unidades productivas grandes, lo que podría acarrear un problema de contaminación ambiental o pueden ser insuficientes para el camarón, y no llegar la cantidad necesaria a los órganos diana del animal donde colonizan las bacterias patógenas (principales órganos del sistema digestivo: estómago, hepatopáncreas e intestino). Por otro lado, los compuestos bioactivos pueden ser mezclados en la dieta del camarón, ya sea incorporados al inicio de la línea de manufactura del alimento o al finalizar este a través de un recubrimiento con aceite vegetal o de pescado. Sin embargo, el proceso de fabricación de alimento involucra altas temperaturas, lo cual puede deteriorar los compuestos bioactivos, mientras que el recubrimiento trae problemas de lixiviación y palatabilidad, lo que redundaría negativamente en la eficacia del tratamiento. La encapsulación de compuestos bioactivos es un proceso mediante el cual se encierra los compuestos bioactivos, incluyendo organismos vivos, en una cápsula de material natural o sintético. Los compuestos bioactivos encapsulados son luego incorporados a la dieta comercial y son liberados durante la administración de la dieta comercial a determinadas condiciones, generalmente de pH, como pueden ser los del tracto intestinal del camarón, y por tanto protegiendo los compuestos del ambiente, minimizando desperdicios al sistema. A su vez, los compuestos bioactivos pueden resistir las condiciones de manufactura del alimento dada las características del material encapsulador. Sin embargo, la efectividad de la encapsulación es multifactorial y depende del compuesto bioactivo, organismo que recibirá la encapsulación, condiciones del tracto intestinal del animal, materiales de la biocápsula y método de encapsulación. El reto

consiste en diseñar apropiadamente para cada caso, de tal forma que la entrega de estos compuestos se realice en forma efectiva para que llegue mayor cantidad a los órganos diana del camarón, sin afectación de la bioactividad.

1.2 Justificación del problema

El cultivo de camarón es el primer producto no petrolero de exportación en Ecuador, generando \$3038 millones en el 2017 y superando ligeramente a los ingresos generados por la exportación de banano (\$3034) (BCE, 2018). Sin embargo, las enfermedades son la principal limitante a la producción (Bondad-Reantaso et al., 2012). Por ejemplo, entre 1999 y 2003, la epidemia del virus de la mancha blanca (White spot syndrome virus – WSSV) diezmo al sector camaronero, causando \$1.200 millones de dólares en pérdidas para el Ecuador, una caída del PIB de 4.5 a 1.5%, 122.000 plazas de trabajo perdidas y la quiebra de la industria camaronera (García, 2003).

Actualmente, los problemas mundiales más emergentes de enfermedades de camarón son provocados por bacterias del género *Vibrio*, siendo la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease) la enfermedad bacteriana más emergente (Thitamadee et al., 2016), con pérdidas en los países afectados que bordean el \$1 billón (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015). AHPND es causada por cepas bacterianas patógenas principalmente pertenecientes al clado *Harveyi* (Tran et al., 2013). Las bacterias causantes de AHPND contienen plásmidos portadores de los genes *PirVP* que expresan las toxinas (*PirA* y *PirB*) y que una vez liberadas en el sistema digestivo de los camarones causan principalmente una descamación severa de las células del hepatopáncreas y la consecuente muerte del camarón infectado (Tran et al., 2013). La industria camaronera ecuatoriana ya ha enfrentado algunos eventos epidémicos bacterianos, que han afectado a granjas y a laboratorios de larvas. Entre 1989 y 1990, el síndrome de la Gaviota, asociado a cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, y *Vibrio alginolyticus* provocó hasta 90% de mortalidad en granjas camaroneras y una caída importante en la producción nacional. Sin embargo, los principales problemas bacterianos han afectado a las larviculturas de larvas, destacando el síndrome de Bolitas, causado por *Vibrio harveyi* (Robertson et al., 1998), y el síndrome de Zoea 2, causado por *V. harveyi* y *V. alginolyticus* (Vanderberghe et al., 1998). Recientemente, se encontró que nuevas cepas patogénicas han aparecido en las

larviculturas ecuatorianas (*Vibrio campbellii*, *Vibrio owensii*, *Vibrio inhibens* y *Vibrio natriegens*), evidenciando la necesidad de encontrar tratamientos efectivos para combatir estas cepas patogénicas (Sotomayor et al., 2019)

El uso de antibióticos es el método tradicionalmente aplicado en acuicultura para controlar infecciones bacterianas. Sin embargo, su empleo como tratamiento preventivo, y en general descontrolado, conlleva importantes desventajas, como desarrollo y transmisión de resistencia a estos compuestos químicos entre bacterias, así como bioacumulación de antibióticos en los tejidos de los camarones (Cabello, 2006). Existen algunas alternativas a los antibióticos amigables con el ambiente, como probióticos, fitobióticos y ácidos orgánicos, que han mostrado ser eficaces contra enfermedades bacterianas de camarón. Mientras que, nuevos compuestos bioactivos contra bacterias patógenas acuícolas se están estudiando, principalmente derivados de plantas terrestres y marinas.

Sin embargo, existe la necesidad de desarrollar protocolos de administración de estos compuestos bioactivos para que puedan llegar en forma efectiva al sistema digestivo del camarón, sin que ocurra desperdicios al medio ambiente y sin que su bioactividad se vea afectada por las condiciones presentes en su sistema digestivo del animal. La encapsulación es una alternativa para administrar eficientemente los compuestos bioactivos, dado que se encuentran protegidos por un material encapsulante. En algunos casos se utiliza liposomas, siendo estas vesículas compuestas por membranas de fosfolípidos que pueden albergar compuestos bioactivos, que una vez liberados en un organismo genera el proceso de bioactividad esperado. Sin embargo, es necesario desarrollar la metodología para incluir dentro de los liposomas compuestos bioactivos específicos para el problema bacteriano en camarón de cultivo. La presente propuesta consiste en el diseño de protocolos seriados para la obtención y prueba de liposomas conteniendo compuestos bioactivos contra bacterias patógenas de camarón. Estudios *in-house* del efecto de los compuestos bioactivos apropiadamente encapsulados permitirá cerrar el ciclo de investigación de los agentes terapéuticos que a nivel de laboratorio han mostrado potencial, permitiendo conocer su eficacia real y facilitando su futura comercialización al mercado.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Diseñar un protocolo para la obtención de liposomas que incluyan compuestos bioactivos contra bacterias patógenas locales de camarón

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Seleccionar al menos un compuesto bioactivo contra bacterias patógenas de camarón para ser bioencapsulado.
2. Generar un protocolo de obtención de liposomas conteniendo el compuesto bioactivo seleccionado.

1.4 Marco teórico

Microencapsulación de compuestos bioactivos

La microencapsulación es un proceso usado principalmente en las industrias de nutrición y farmacéuticas, por el cual se encapsula materiales bioactivos para ser liberados a tasas controladas sobre un periodo de tiempo específico (Champagne, 2007). Las microcápsulas son esferas con diámetros entre 50 nm a 2 mm, presentan pared porosa para la protección de las micropartículas encapsuladas y están compuestas de una cobertura y un núcleo. El núcleo es la fase activa y puede ser sólido, líquido o gaseoso. El estado de la materia del núcleo determinará si se requiere que este tenga un tratamiento previo a la formación de la microcápsula, ya que esto va a influir de forma importante en su morfología final y rendimiento. La cobertura puede estar formada por uno o más materiales, seleccionados de acuerdo con el uso al que se le dará a la microcápsula, al método de microencapsulación escogido y a las circunstancias ambientales a las que la microcápsula estará expuesta. Los materiales usados en la cobertura del microencapsulado pueden ser principalmente polisacáridos, tales como gomas, carbohidratos y celulosas. El material encapsulante también puede ser de lípidos, como aceites, ceras, grasas, parafinas, ácidos esteáricos, monoglicéridos y diglicéridos. También se puede utilizar proteínas como material encapsulante, tales como caseína, gluten y albúmina. Otros materiales inorgánicos también han sido usados como silicatos y sulfato de calcio. Las microcápsulas pueden clasificarse de acuerdo con su configuración final. Las microcápsulas mononucleares presentan un núcleo cubierto por

un recubrimiento, mientras que las microcápsulas polinucleares presentan varios núcleos y pueden presentar varios tipos de matriz y también pueden estar distribuidas de forma homogénea en el recubrimiento (Nava et al. 2015).

Métodos de microencapsulación

Los métodos de microencapsulación se clasifican en tres categorías de acuerdo con el tipo de proceso que conlleva su producción: físicos, químicos y fisicoquímicos. Los procesos físicos de encapsulación son: recubrimiento por aspersión, secado por aspersión, y extrusión. Mientras que, los procesos químicos son inclusión molecular y polimerización interfacial. En tanto, los procesos fisicoquímicos son: gelificación iónica, coacervación, y atrapamiento en liposomas o micelas inversas (Villena, 2009).

Actualmente, las técnicas de encapsulación más utilizadas producen cuentas de gel o cápsulas elaboradas con hidrocoloides por medio de las técnicas de extrusión o emulsificación. Los hidrocoloides son biomateriales (polímeros naturales o sintéticos) dispersos en solución acuosa.

La técnica de extrusión es uno de los métodos de encapsulación más recomendados para encapsular probióticos porque es el menos agresivo (Shi et al., 2013). En la técnica de extrusión, el hidrocoloide es mezclado con los probióticos. La mezcla resultante se lleva a un extrusor, que típicamente es una jeringa. Luego de ejercer presión sobre la jeringa, el contenido de esta se vierte en una solución de gel, y se agita lentamente. El tamaño y la forma de las gotas liberadas de la jeringa van a depender del diámetro de la aguja, y de la distancia entre la aguja y la solución de gel. La extrusión es un proceso sencillo y de fácil implementación, permitiendo la retención de un número alto de probióticos dentro de la cápsula, además de que puede ser un proceso automatizado. La extrusión forma partículas de gel llamadas cuentas. La formación de microcápsulas por medio de extrusión implica un proceso físico de algunas etapas. El objetivo final es la obtención de esferas de tamaño uniforme. En la etapa de granulación, se incorpora el agente bioactivo, estabilizadores y agua para formar una pasta húmeda. Esta masa húmeda pasará a la etapa de extrusión, en el que, al pasar por un troquel, se forman filamentos cilíndricos con un diámetro y longitud determinado y uniforme. Las hebras formadas se cortan en longitudes iguales y se vuelven esféricas cuando pasan por una

plaza de marumerizado. Finalmente, se recogen las esferas húmedas y se someten a secado, ya sea por medio de un lecho fluidizado o un secador de bandeja. Por tanto, la extrusión será eficaz si el material que se usa para encapsular tiene la capacidad de hacerse sólido cuando entre en contacto con los líquidos, para que de esta manera pueda formar una matriz que permita atrapar el núcleo (Flores & Jiménez, 2013).

En la técnica de emulsificación, la mezcla representa una fase discontinua. Esta fase se dispersa en un gran volumen de aceite vegetal (fase continua). La emulsión de agua en aceite formada es homogeneizada continuamente mediante agitación. La velocidad de agitación de la mezcla es un paso crítico ya que afectará al tamaño y forma de las cápsulas formadas, una vez que se haya terminado la emulsión, las partículas son recogidas por asentamiento. La emulsificación genera partículas oleosas o acuosas comúnmente llamadas cápsulas.

Comparando los dos métodos de extrusión y emulsificación, se observa que el contenido de la cápsula es líquido, mientras que, el contenido de las cuentas tiene una red porosa. Las cápsulas tienen tamaños 100 veces menor que los de las cuentas. En tanto que, las cápsulas tienen tamaños y formas desiguales en comparación con las cuentas, cuyas formas son uniformes. En cuanto a simplicidad, es importante destacar que la extrusión es mucho más fácil de realizar que la emulsificación. La emulsificación es más costosa porque requiere de materiales adicionales como aceites vegetales y emulsificadores para estabilizar la emulsión. Además, la emulsificación presenta dificultades para ofrecer estabilidad a la emulsión, y su necesidad de agitación vigorosa puede llegar a ser negativa para la supervivencia de las células, además de que existe una incorporación aleatoria de las células a la cápsula.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

El diseño del protocolo de obtención de liposomas con compuestos bioactivos contra bacterias patógenas de camarón fue obtenido a través de un proceso de cuatro pasos. La figura 2.1 muestra el esquema metodológico que se realizó para el diseño de obtención del liposoma. En el primer paso del diseño se analizaron los requerimientos de la biocápsula. Posteriormente, en el segundo paso, se desarrolló el protocolo para la obtención de liposomas conteniendo los compuestos bioactivos seleccionados y considerando que la biocápsula debía cubrir todos los requerimientos identificados en el primer paso. En un tercer paso, se diseñaron las actividades para determinar la eficiencia de encapsulación. Finalmente, en el cuarto paso se diseñaron las actividades necesarias para evaluar la eficiencia real de la encapsulación en condiciones de experimentación y producción con camarón *Penaeus vannamei*.

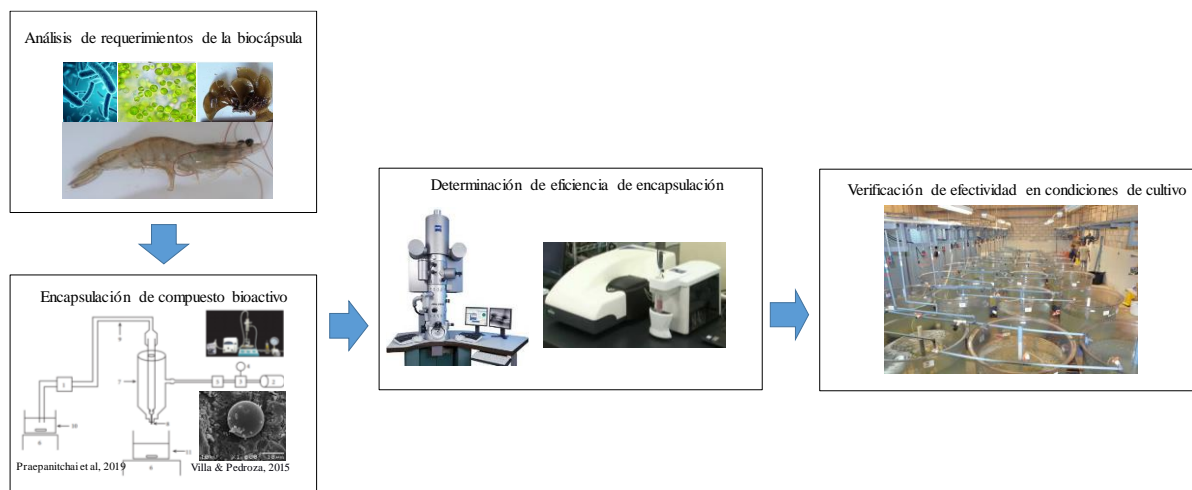


Figura 2.1. Representación gráfica para el diseño de un protocolo de obtención de liposomas con compuesto bioactivos contra bacterias patógenas de camarón.

2.1 Análisis de los requerimientos de la biocápsula

Dado que el método y proceso de encapsulación depende principalmente del material a ser encapsulado, el análisis de los requerimientos de la biocápsula inició con la selección

de los compuestos bioactivos (Figura 2.2). Además, se analizaron los requerimientos de protección del encapsulado, lugar de liberación y tamaño de las capsulas (Figura 2.2).

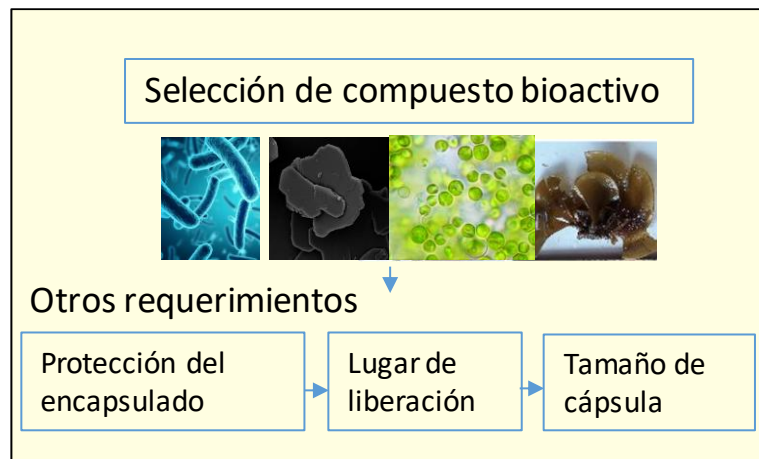


Figura 2.2. Proceso de análisis de los requerimientos de la biocápsula.

2.1.1 Selección de los compuestos bioactivos

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los compuestos bioactivos usados en acuicultura. Los compuestos bioactivos seleccionados fueron los que según la literatura mostraron ser agentes más efectivos contra bacterias patógenas en camarón y para los cuales se reporta más evidencia de encapsulación eficiente. Estos dos criterios fueron categorizados y valorizados como: escasa, intermedia y abundante. Este análisis fue realizado para probióticos, fitobióticos y ácidos orgánicos. En el grupo de los fitobióticos se incluyó los aceites esenciales y extractos de plantas terrestres y marinas. A continuación se muestra un resumen de la búsqueda bibliográfica sobre compuestos bioactivos en acuicultura.

Compuestos bioactivos en acuicultura

Los compuestos bioactivos son agentes que presentan un efecto benéfico en la salud del organismo que los consume, interfiriendo en los procesos ocasionados por patógenos, pudiendo ser efectos antibacterianos, antivirales, antioxidantes y antifúngicos, entre otros. Estas sustancias han sido identificadas con mayor frecuencia

en los vegetales (Biesalski et al., 2009), siendo denominados en forma general como fitobióticos.

Entre los compuestos bioactivos de origen vegetal usados en acuicultura destacan los aceites esenciales. Estos compuestos fitobióticos son mezclas complejas de compuestos volátiles (como benzenoides, monoterpenos, sesquiterpenoides, entre otros) producidos por especies de plantas. Los aceites esenciales han mostrado propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antifúngicas en especies acuícolas (Lambert et al.; 2001; Al-Sagheer et al., 2018; Kordali et al., 2008; Sarter et al., 2011). Los aceites esenciales tienen las ventajas de bajo costo de producción, alta biodegradabilidad y bajo riesgo de efectos secundarios y/o toxicidad en los organismos acuáticos. La presencia de los aceites esenciales en etapas tempranas de desarrollo de las especies acuícolas tiene mucha influencia, estimulando la secreción de enzimas digestivas, acelerando la absorción de glucosa y previniendo la adherencia de patógenos a la mucosa intestinal. La desventaja de los aceites esenciales radica en su baja solubilidad en agua, así como otros compuestos lipofílicos y aromáticos. También se debe tomar en cuenta su baja estabilidad, alta sensibilidad a la luz y fuertes características organolépticas (Sibaja, 2019). Sin embargo, estas desventajas pueden ser solucionadas encapsulándolas, de tal forma que estén protegidas de ambientes externos.

Otros compuestos fitobióticos prometedores para ser usado en casos de infecciones bacterianas en camarón con aquellos provenientes de compuestos obtenidos de las macroalgas, los mismos que presentan propiedades antibacterianas, antioxidantes e inmunoestimulantes en especies acuícolas (Kanjana et al., 2011; Kudus et al., 2017). Además, ciertos compuestos presentes en las macroalgas pueden interferir en la comunicación bacteriana y hasta ser inductores para la respuesta de choque térmico, estimulando una respuesta inmunológica en organismos acuícolas (Yudiati et al., 2016).

Por su lado, los probióticos es quizás el grupo de compuestos bioactivos más utilizados en acuicultura. Sin embargo, al momento existen pocos probióticos identificados para combatir AHPND (Chumpol et al., 2017; Girija et al., 2018). Los probióticos son microbios vivos que se administran en forma de suplemento en la dieta de las especies cultivadas o en el agua donde estas habitan. Su presencia beneficia de distintas maneras al cultivo, ya que entre otros modos de acción tienen la capacidad de colonizar el tracto

gastrointestinal, presentar antagonismo selectivo contra patógenos bacterianos, mejorar el sistema inmune del camarón, incrementar el crecimiento y supervivencia del camarón y degradar los detritos y mantener una adecuada calidad del agua de cultivo (Gullian et al., 2004; Balcázar et al., 2007; Verschueren et al. 2000).

Los ácidos orgánicos son otros compuestos usados como control antibacteriano en acuicultura. Estos compuestos son producidos por organismos y utilizados como conservantes y control bacteriano en la alimentación, la agricultura y la producción animal (Defoirdt et al., 2009; Kara et al, 2018; Hassaan et al., 2016). Los ácidos orgánicos han mostrado inhibir el crecimiento de *Vibrios* patogénicos (Ng et al., 2015; Mine & Boopathy 2013, Adams & Boopathy 2013) y han mostrado propiedades inmunoestimulantes (Ng et al., 2015; Anuta et al. 2010) y de mejora del estado nutricional y de salud de los camarones (Da Silva et al., 2013; Morken et al., 2011). Los ácidos orgánicos: ácido acético, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido butírico son eficientes para controlar *Vibrios* patogénicos (Adams & Boopathy 2013; Da Silva et al., 2013; Defoirdt et al. 2006). Ácidos lácticos y cítrico inhiben *V. harveyi* en *Macrobrachium rosenbergii* (Ng et al. 2017), además ácido láctico puede inhibir la microbiota patogénica de peces (Vázquez et al. 2005). El ácido fórmico es considerado muy efectivo para *Vibrios* patógenos en acuicultura. El ácido acético es un excelente desinfectante de *V. parahaemolyticus* (Salim & Amin 2012). Sin embargo, se ha encontrado que en algunos casos, las concentraciones efectivas pueden ser tóxicas para camarones *P. vannamei*.

2.1.2 Otros requerimientos

Para identificar el lugar adecuado de liberación de la cápsula se realizó una búsqueda bibliográfica de la morfología y fisiología del sistema digestivo de los camarones peneidos. Esto permitió identificar la ruta que sigue el alimento una vez que es ingerido por el camarón. Para complementar la identificación del lugar adecuado de liberación de la cápsula, se realizó una búsqueda bibliográfica de la patogénesis de AHPND y con ello identificar los órganos de colonización de la bacteria causante de AHPND. Esta enfermedad fue escogida por ser al momento una de las enfermedades bacterianas más emergentes. Una vez que se identificó los órganos diana donde debería liberarse la cápsula se realizó una búsqueda bibliográfica de las condiciones de pH del sistema

digestivo de los camarones y finalmente se identificó el tamaño óptimo de la cápsula. A continuación se muestra un resumen de la búsqueda bibliográfica sobre morfofisiología del sistema digestivo de camarón y patogénesis de AHPND.

Morfología y fisiología del sistema digestivo de camarón

Los conocimientos sobre la fisiología del sistema digestivo del camarón y de la patogénesis de una infección bacteriana en camarón son importantes para el proceso de diseño de encapsulados dirigidos a controlar bacterias patógenas. Las microcápsulas deben ser incorporadas a la dieta de camarón para que sean ingeridas a través del alimento e ingresen directamente a los órganos diana que son colonizados por las bacterias patógenas (sistema digestivo), sean liberadas en estos sitios y efectúen la acción de bioactividad. El tracto digestivo del camarón consiste en el intestino anterior, medio y posterior (Figura 2.3). El intestino anterior se compone de la boca, esófago y parte del estómago (Caballero, 2006). Mientras que, el intestino medio está formado por una porción del estómago y por el hepatopáncreas (glándula digestiva). En tanto que, el intestino posterior se compone del recto y del ano. Una vez que el alimento ha ingresado por la boca gracias a los apéndices especializados (maxílula, maxila, mandíbula y maxilípedos), pasa directamente al esófago, siendo este un conector que conduce el alimento desde la boca hasta la porción anterior del estómago, conocido también como molino gástrico (Figura 2.3). En la porción anterior del estómago ocurre la masticación del alimento. Los alimentos pasan del molino gástrico a la porción posterior del estómago, también llamada bolsa pilórica, y regresan varias veces a la porción anterior del estómago, para que por este proceso mecánico se complete el proceso de digestión. A su vez, en la región pilórica existen filtros con tamaño menor a 1μ , por los que entran los alimentos al hepatopáncreas. El hepatopáncreas es el órgano que sintetiza y secreta las enzimas que van a realizar la digestión química de los alimentos que logren ingresar, para que posteriormente ocurra la absorción. Aquellas partículas que no pudieron ingresar al hepatopáncreas son dirigidas inmediatamente al intestino posterior para que sean expulsados como desecho del camarón.

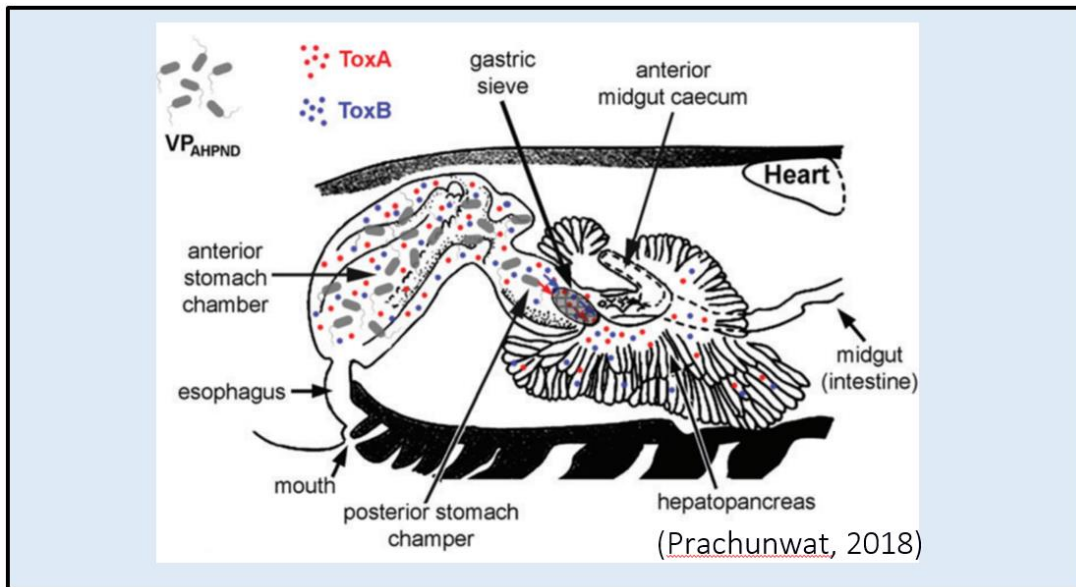


Figura 2.3. Morfología del sistema digestivo de camarón. Fuente Prachunwat et al. 2018.

Patogénesis de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND)

En enfermedades bacterianas como AHPND, el camarón es infectado vía ingestión y los órganos diana son principalmente el estómago y hepatopáncreas. En el caso de AHPND, las bacterias colonizan la cutícula del estómago y son secuestradas en sus pliegues, dientes del molino gástrico y seta del tamiz gástrico (Figura 2.3). Las toxinas PirA y PirB producidas durante el proceso infeccioso no son absorbidas en el estómago al estar protegido por una cutícula impermeable. Las bacterias y las toxinas pasan a través del tamiz gástrico dentro de la parte anterior del intestino medio al ducto hepatopancreático primario. Las toxinas pasan rápidamente al citoplasma de las células del hepatopáncreas. El efecto de las toxinas en las células es dependiente de la dosis. Así, bajas dosis de las toxinas producen más bien atrofas y respuestas no letales de las células del hepatopáncreas, mientras que altas dosis provocan que las células mueran rápidamente, desprendiéndose de la membrana basal, dentro del lumen. Las células desprendidas de la membrana basal y la pérdida de la estructura normal de los túbulos del hepatopáncreas desencadenan una profunda respuesta inflamatoria. Las bacterias patógenas, así como otras bacterias proliferan en este medio rico en nutrientes de células necróticas y residuos citoplasmáticos. Las toxinas son liberadas desde las bacterias,

pudiéndose liberar otras toxinas y enzimas digestivas bacterianas, lo que a su vez contribuye a la propagación de la necrosis, desprendimiento y respuesta inflamatoria en áreas adyacentes al hepatopáncreas. Una vez que ocurre la necrosis y desprendimiento severos de la membrana del hepatopáncreas sobrevendría la muerte del camarón. Este análisis permitió determinar que el órgano diana de infecciones bacterianas como AHPND debe ser el estómago.

2.2 Protocolo para la obtención de liposomas conteniendo los compuestos bioactivos

Para el diseño del protocolo de encapsulación se identificó todos los pasos usados en los procesos de encapsulación, incluyendo la selección del material encapsulador, que dependió del método y compuestos bioactivos seleccionados.

El primer paso del diseño reveló la importancia de realizar diseños para dos compuestos bioactivos distintos. Por tanto, se desarrolló un protocolo para encapsulación de fitobióticos en liposomas y otro protocolo para encapsulación de probióticos en cápsula de alginato. El primer paso de ambos protocolos fue muy similar y consistió en la mezcla de materiales de compuestos bioactivos y material encapsulante. El segundo paso consistió en el protocolo de extrusión de los encapsulados conteniendo los compuestos bioactivos. Pero dado que, los dos métodos tenían una diferencia fundamental en el material encapsulante, el segundo paso de ambos métodos fue distinto. Para el caso de los compuestos bioactivos fitobióticos se diseñó un proceso de extrusión de solución orgánica y formación de liposoma, mientras que en el caso de los probióticos, se diseñó un proceso para la extrusión mezcla de gel de alginato con probiótico. En el primer caso, se incluyó un proceso posterior para la estabilización de liposoma y evaporación de los solventes utilizados en la extrusión. Mientras que, para el diseño de encapsulación de probióticos, se incluyó un paso de filtración y lavado de las capsulas obtenidas en la extrusión. Finalmente en ambos casos, se incluyó un proceso de almacenamiento de los microencapsulados obtenidos en la extrusión. En ambos casos, se realizó un análisis de los costos (desglosado por subproceso) que se requería producir un lote de liposomas conteniendo los compuestos bioactivos.

2.3 Determinación de eficiencia de encapsulación

En un tercer paso del diseño se colectó de las referencias bibliográficas las pruebas necesarias para determinar la eficiencia de la encapsulación, enfatizando en los equipos y materiales necesarios para realizarlos, incluyendo las distintas alternativas para determinar un mismo parámetro de eficiencia. Los parámetros de eficiencia de encapsulación incluidos fueron morfología y tamaño de partícula, determinación del parámetro zeta y porcentaje de eficiencia de encapsulación. También se incluyó en el diseño los siguientes parámetros de eficiencia de encapsulados conteniendo probióticos: viabilidad de probióticos encapsulados en pH bajo, estabilidad de almacenamiento de probiótico encapsulado y estudio de liberación del probiótico encapsulado. Se incluyó en este diseño los costos involucrados en las pruebas de eficiencia de encapsulación.

2.4 Evaluación de eficiencia de la encapsulación en condiciones de experimentación y producción

Como último paso se diseñaron una serie de pasos para evaluar la eficiencia del encapsulado contra bacterias patógenas de camarón. Para la elaboración de esta componente se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos científicos que hayan realizado evaluación de los compuestos bioactivos seleccionados identificando las pruebas realizadas para probar la bioactividad contra bacterias patógenas y adaptándolos al caso de la biocápsulas. El diseño de evaluación de la eficiencia de encapsulación incluyó: pruebas *in vitro*, pruebas de citotoxicidad, desafío con bacterias patógenas, pruebas *in vivo* y pruebas en instalaciones comerciales. Las pruebas incluidas esta componente. En este paso del diseño también se incluyó un análisis de los costos necesarios para desarrollar la componente.

CAPÍTULO 3

3.1 Análisis de requerimientos de la biocápsula

3.1.1 Selección del compuesto bioactivo

Existe abundante literatura científica que respalda que los probióticos y fitobióticos son efectivos contra infecciones bacterianas en acuicultura (Tabla 3.1). La información encontrada con respecto a ácidos orgánicos es menor comparada con los dos tipos de compuestos bioactivos previamente mencionados, por tanto la cantidad de evidencias en la literatura científica fue categorizada como intermedia. Por otro lado, se determinó que existe abundante cantidad de evidencias en la literatura científica de información referente a encapsulación para probióticos y fitobióticos, pero escasa referencias bibliográficas de encapsulación de ácidos orgánicos (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Criterios de selección de compuestos bioactivos basados en valorización de evidencias en literatura científica (escasa, intermedia y abundante) de propiedades antimicrobianas o antivirulentas contra infecciones bacterianas y encapsulación eficiente.

Compuestos bioactivos	Cantidad de evidencias en la literatura científica	
	Propiedades antimicrobianas o antivirulentas contra infecciones bacterianas	Encapsulación
Probióticos	Abundante	Abundante
Fitobióticos (aceites esenciales, extractos de plantas terrestres y marinas)	Abundante	Abundante
Ácidos orgánicos	Intermedia	Escasa

3.1.2 Otros requerimientos

El análisis de la morfología y fisiología de los camarones permitió determinar que el órgano diana de infecciones bacterianas como AHPND es el estómago. Por tanto, este es el lugar en donde la biocápsula debe liberar los compuestos bioactivos, ya que es donde el *V. parahaemolyticus* coloniza y forma biopelículas, luego del cual libera toxinas que serán causantes del AHPND (Soowannayan et al, 2019). Esta biocápsula debe ser

agregada en el alimento del camarón, para que con sus características de atractabilidad pueda ser ingerido, además de soportar las condiciones que brinda el ambiente acuoso en el que se desenvuelve el crustáceo. El material encapsulante deberá contener el compuesto bioactivo hasta llegar al estómago, donde junto con la masticación que se da en esta área y la exposición a los jugos digestivos liberados por el hepatopáncreas, podrá realizar la acción deseada. Por tanto, el material encapsulante deberá liberar los compuestos bioactivos en un medio ácido. El tamaño de la biocápsula debe ser menor que un pellet del alimento balanceado del camarón, ya que va a formar parte de este. Se considera que el tamaño de pellet de alimento para larvas de camarón debe ser de diámetro menor a 50 μ , mientras que para post larvas estaría entre 50 a 100 μ (Prilabsa, 2019). Además, debe superar el tamaño de 1 μ de diámetro, pues este es el tamaño de los filtros que permite el paso de alimento triturado desde el estómago hasta el hepatopáncreas para continuar con la digestión química y absorción (Arias, 2006). De esta forma la biocápsula se quedará en el estómago del camarón y liberará su contenido en este sitio.

3.2 Protocolo para la obtención de liposomas conteniendo compuestos bioactivos

3.2.1 Protocolo para encapsulación de fitobióticos en liposomas

El material que compone la cobertura del liposoma debe incluir una mezcla aniónica de lípidos y colesterol. La mezcla puede realizarse adquiriendo individualmente los lípidos, tal como referencia Sou et al., 2003 y Grillone et al., 2017, pudiendo ser, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,5-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate (DHSG) y 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[monomethoxy poly (ethylene glycol) (5000)] (PEG-DSPE). Aunque también se puede utilizar una mezcla comercial de lípidos, como: Phospholipon®80H, Phospholipon®90H o Lipoid S100. En el caso que se utilice la mezcla de lípidos es necesario liofilizar la mezcla y disolver en etanol usando agitación magnética. Posteriormente, los compuestos bioactivos fitobióticos son añadidos a la mezcla. Se coloca la mezcla orgánica en una jeringa a presión mediante bomba para empezar el extrusado, dejando caer el producto en un recipiente con agua ultra pura con agitación magnética y temperatura sobre el punto de fusión de los lípidos. A medida que la solución entra en contacto con el agua, los liposomas se forman

espontáneamente. Se deja reposar la solución liposomal bajo agitación por unos minutos. Finalmente, se usa un rotavapor para retirar el etanol y gran parte del agua bajo presión reducida. Los encapsulados deben ser almacenados a 4°C (Figura 3.1).

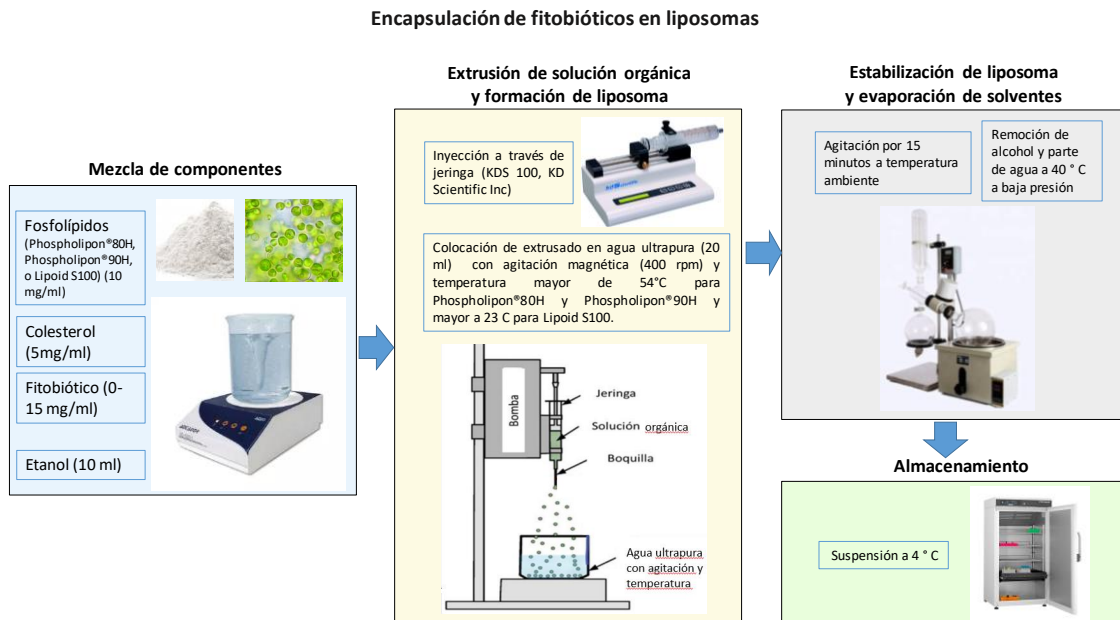


Figura 3.1. Representación gráfica del protocolo para encapsulación de fitobióticos en liposomas.

Costos de producción de liposomas conteniendo fitobióticos

La producción de un lote de liposomas conteniendo fitobióticos implica un gasto de \$7946,00 en equipos y \$145 en materiales (Tabla 3.2). Esto excluye tanto el costo de investigación para la obtención de fitobióticos bioactivos contra bacterias patógenas como el costo de producción de estos.

Tabla 3.2. Análisis de costo para la producción de un lote de liposomas conteniendo fitobióticos por el método de dispersión simple y extrusión.

Proceso	Subproceso	Equipos		Consumibles		
		Detalle	Costos (\$)	Detalle	Costos (\$)	
Dispersión simple y extrusión	Mezcla de materiales	Vaso de precipitado	48,00	Phospholipon® 80H (50 g)	\$25,00	
		Varilla de agitación	25,00	Colesterol (5 g)	\$90,00	
		Agitador magnético*	365,00	Etanol (500 mL)	\$30,00	
	Extrusión solución orgánica, formación de liposoma	Bombas de jeringas KDS 100, KD Scientific Inc	450,00			
		Agitador magnético y disolución	-			
		Sistema purificador de agua	4.000,00			
		Beaker	48,00			
	Estabilización liposomas y evaporación de solventes	Agitador magnético*	-			
		Balón de vidrio	10,00			
		Rotavapor	2.500,00			
	Almacenamiento	Refrigeradora	500,00			
	Subtotales			\$7.946,00		\$145,00

* Equipo utilizado en varios subprocesos

3.2.2 Protocolo para encapsulación de probióticos en cápsula de alginato

El siguiente método funciona para encapsular bacterias probióticas del género *Bacillus* (Figura 3.2). Para esto se debe preparar y cultivar la bacteria a encapsular. Las bacterias deben ser cultivadas en condiciones aeróbicas en medios de cultivo, como MRS (de Man, Rogosa y Sharpe). Las colonias deben ser cosechadas mediante centrifugación a baja temperatura, lavadas y re-suspendidas. Este proceso considera como material encapsulante al gel de alginato de sodio. Para empezar el proceso de encapsulación se autoclava el alginato. La solución de gel de alginato de sodio es mezclada con las cepas aisladas de bacterias y agitadas hasta que exista una mezcla homogénea.

Encapsulación de probiótico en cápsula de alginato

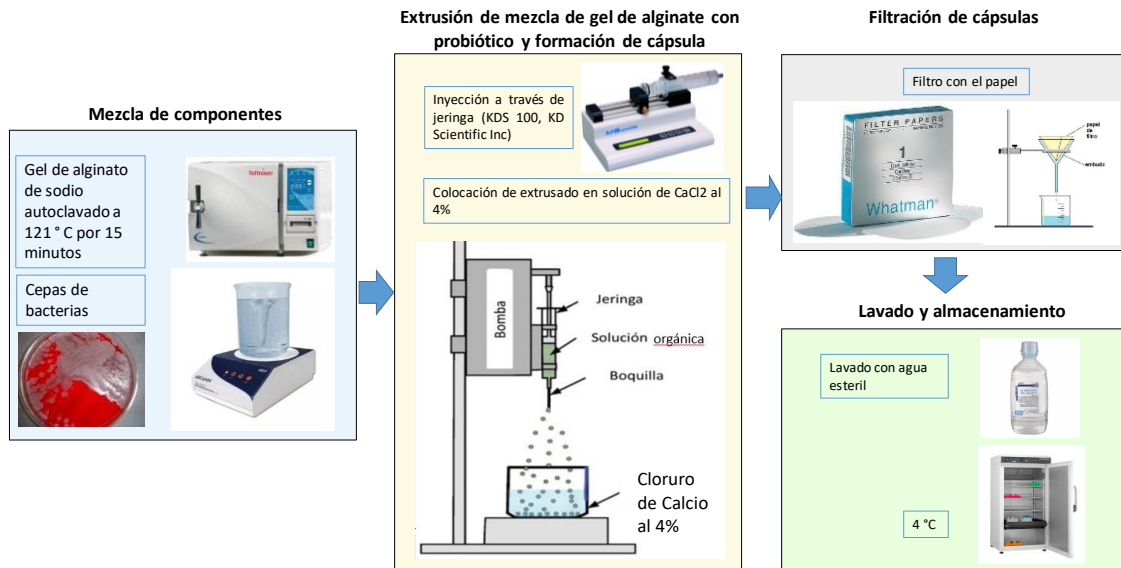


Figura 3.2. Representación gráfica del protocolo para encapsulación de probióticos en cápsula de alginato.

La mezcla es expuesta a extrusión mediante jeringas y el producto pasa a una solución estéril de cloruro de calcio, para la formación de microcápsulas. Estas microcápsulas son aisladas mediante filtración y lavado con agua estéril para proceder a almacenarlas (Haghshenas et al, 2015).

Costos de producción de encapsulación de probióticos en cápsulas de alginato

La producción de un lote de liposomas conteniendo probióticos implica un gasto de \$6.867,00 en equipos y \$197 en materiales (Tabla 3.3), lo cual excluye tanto el costo de investigación para la obtención y producción de los probióticos.

Tabla 3.3. Análisis de costo para la producción de un lote de cápsulas conteniendo probióticos por el método de extrusión.

Proceso	Subproceso	Equipos		Consumibles		
		Detalle	Costos (\$)	Detalle	Costos (\$)	
Extrusión	Mezcla de materiales	Beaker	48,00	Gel de alginato de sodio (250 g)	40,00	
		Varilla de agitación	25,00		17,00	
		Agitador magnético	365,00			
		Autoclave	5.300,00		30,00	
	Extrusión de solución alginato y formación de cápsula	KDS 100, KD Scientific Inc	450,00	Cloruro de Calcio (500 g)	10,00	
		Agitador magnético	*			
		Beaker	48,00			
	Filtración	Beaker	48,00	Papel filtro Whatman No 1	90,00	
		Embudo	10,00			
		Varilla agitación	25,00			
	Lavado y almacenamiento	Vaso de precipitado	48,00	Agua estéril	10,00	
		Refrigeradora	500,00			
	Subtotales			\$6.867,00		\$197,00

3.3 Determinación de eficiencia de encapsulación

Análisis de morfología y potencial zeta de la biocápsula

Se debe observar la morfología de la partícula usando microscopio electrónico de barrido para confirmar la forma esférica de la biocápsula. Además, utilizando un analizador de tamaño de partículas se determinará la distribución de tamaños de las cápsulas. Se determinará el potencial zeta entre el material encapsulante y el medio donde está disuelto. El potencial zeta es definido como la carga electrostática entre ambos materiales, donde valores altos son deseados alrededor de 120 mV para evitar la aglomeración entre las biocápsulas. La determinación del potencial zeta está incluida en

algunos equipos de analizador de tamaño de partícula (Han & Zhou, 2016). Este análisis se realiza para los dos tipos de compuestos bioactivos analizados.

Parámetros de eficiencia de encapsulación

Probióticos

Para determinar la eficiencia de encapsulación de los probióticos se colocan los probióticos encapsulados en una solución con pH bajo (pH 5 - 7), agregando posteriormente buffer de fosfato para lograr que se desintegre el material encapsulante. Se agita la mezcla anterior a temperatura ambiente hasta que el contenido de la cápsula sea completamente liberado. El probiótico liberado es diluido con solución salina y colocado en un agar apropiado. Se deja incubar a 37 °C por 24 horas. Se contabilizan las colonias de probióticos bajo condiciones aeróbicas. Se debe tener en cuenta la cantidad de bacterias que se colocó en la mezcla antes de encapsular. Por medio de la siguiente fórmula se obtiene el porcentaje de contenido que fue exitosamente encapsulado.

$$EE (\%) = \frac{\text{Contenido agregado} - \text{contenido no encapsulado}}{\text{contenido agregado}} \times 100$$

Para determinar la supervivencia o viabilidad de las bacterias encapsuladas a pH bajos, se calcula la supervivencia de las colonias cosechadas luego de la exposición a la solución de pH bajo y se calcula mediante la siguiente fórmula.

Supervivencia (%) = Unidades formadoras de colonias (UFC/g) después de la exposición / UFC/g antes de la encapsulación

Para determinar la estabilidad en el tiempo de los probióticos encapsulados, se almacenan los probióticos encapsulados por un periodo prolongado (ejemplo 1 mes) a 4°C y se calcula la supervivencia de los probióticos varias veces durante ese periodo siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

Fitobióticos

El cálculo de la eficiencia de encapsulación se realiza con ultra centrifugación de la suspensión liposomal. Se agregan las soluciones estándares de los fitobióticos a la suspensión liposomal. Se exponen las muestras a sonicación a temperatura ambiente y

se centrifuga. Los sobrenadantes son analizados con un HPLC. Para determinar la estabilidad en el tiempo de los fitobióticos encapsulados son almacenados por un periodo a 4°C y se mide la viabilidad varias veces durante ese periodo siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. j

Costos de determinación de eficiencia de encapsulación

Las pruebas de determinación de eficiencia de encapsulación para probióticos implican un gasto de equipos de \$547.278,00 y \$272,00 en materiales (Tabla 3.4). Mientras que para fitobióticos, los costos en equipos son \$567.278,00 y \$72,00 en materiales (Tabla 3.5). A pesar de que el costo por concepto de equipo es oneroso, los más caros ya han sido adquiridos por la ESPOL y están en laboratorios de la institución.

Tabla 3.4. Análisis de costo para las pruebas de determinación de eficiencia de encapsulación para probióticos.

Proceso	Subproceso	Equipos		Consumibles	
		Detalle	Costos (\$)	Detalle	Costos (\$)
Determinación eficiencia de encapsulación	Morfología de partícula	Microscopio electrónico de barrido	500.000,00	Reactivo para tinción (Ácido fosfotungstico)	55,00
	Tamaño de partícula, potencial zeta	Analizador de partículas	45.000,00	solución PBS	7,00
	Porcentaje EE	Incubadora	1.700,00	solución PBS	*
		Cajas Petri	30,00	Agar MRS (500 g)	200,00
	Viabilidad de encapsulados a pH bajo	Beaker	48,00	Ácido clorhídrico	10,00
				Solución PBS	*
				Agar MRS (500 g)	*
	Estabilidad de almacenamiento	Refrigeradora	500,00	Solución PBS	*
				Agar MRS (500 g)	*
	Subtotales			547.278,00	

Tabla 3.5. Análisis de costo para las pruebas de determinación de eficiencia de encapsulación para fitobióticos.

Proceso	Subproceso	Equipos		Consumibles	
		Detalle	Costos (\$)	Detalle	Costos (\$)
Determinación eficiencia de encapsulación	Morfología de la partícula	Microscopio electrónico de barrido	500.000,00	Reactivo para tinción (Ácido fosfotungstico)	55,00
	Tamaño de partícula y potencial zeta	Analizador de partículas	45.000,00	solución PBS	7,00
	Porcentaje EE	Incubadora	1.700,00		
		Cajas Petri	30,00		
	Viabilidad de encapsulados a pH bajo	Vaso de precipitado	48,00	Ácido clorhídrico	10,00
		HPLC	20000,00	solución PBS	*
				Agar MRS (500 g)	*
	Estabilidad de almacenamiento	Refrigeradora	500,00	solución PBS	*
				Agar MRS (500 g)	*
	Subtotales			567.278,00	

Se observa que el costo para determinar la eficiencia de los encapsulados con fitobióticos es superior, por el equipo de HPLC. Sin embargo, como se mencionó previamente, ESPOC cuenta con el equipo. Los dos protocolos presentan un costo similar en cuando a materiales.

3.4 Evaluación de eficiencia de la encapsulación en condiciones de experimentación y producción

La efectividad de los encapsulados deben ser posteriormente probadas en condiciones experimentales y de cultivo. Se propone realizar pruebas *in vitro* de antagonismo, prueba de ensayos inmunitarios en camarones, viabilidad de probióticos en tracto digestivo de los animales tratados, pruebas de desafío con los patógenos bacterianos, cultivos experimentales y comerciales.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este estudio ha sido diseñado para la producción de encapsulados a pequeña escala, tal como lo que es requerido para un grupo de investigadores que deseen probar *in-house* la eficiencia real de compuestos bioactivos. La implementación del diseño permitirá conocer la eficacia real de compuestos bioactivos que a nivel de laboratorio han mostrado potencial terapéutico, facilitando las gestiones para su futura comercialización al mercado. La figura 4.1. muestra el diseño conceptual final de biocápsulas conteniendo compuestos bioactivos contra bacterias patógenas de camarón.

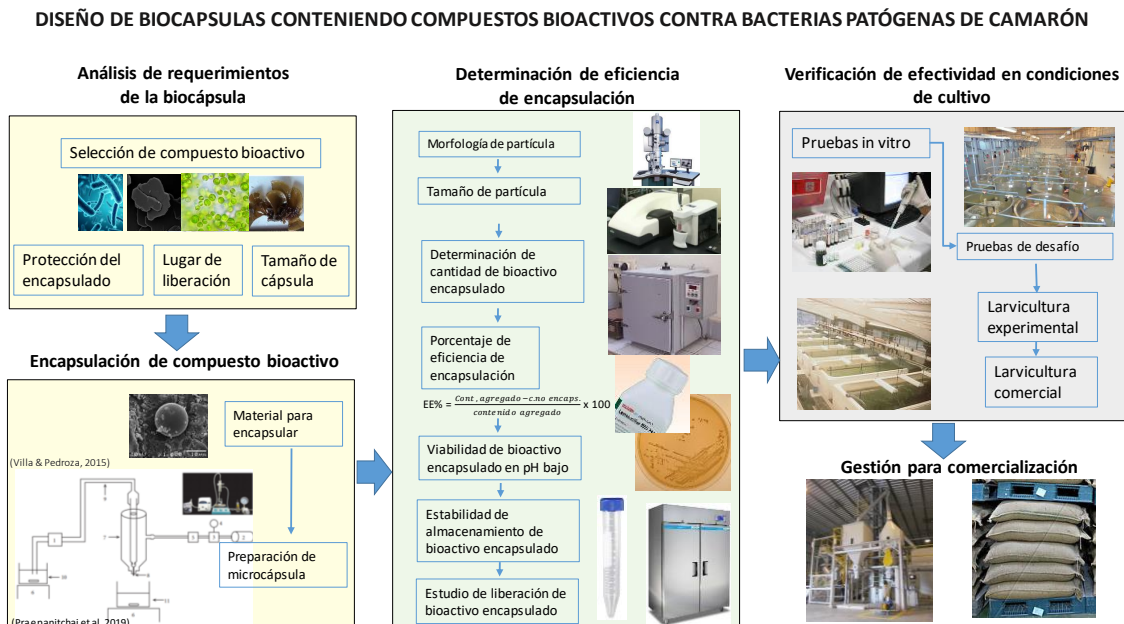


Figura 4.1. Diseño conceptual final de biocápsulas conteniendo compuestos bioactivos contra bacterias patógenas de camarón.

Luego de la revisión bibliográfica se determinó que existen algunos compuestos bioactivos potenciales en contra del *V. parahaemolyticus*, agente patógeno que produce la enfermedad AHPND. Entre ellos se encuentran los probióticos, extractos de microalgas y macroalgas, aceites esenciales y ácidos orgánicos. Los bioactivos escogidos en este análisis fueron los fitobióticos y probióticos debido al alto número de ensayos ejecutados con resultados prometedores.

De acuerdo con el análisis de patogenicidad de infecciones bacterianas, tal como las producidas por *V. parahaemolyticus* y junto con el conocimiento de la morfofisiología del sistema digestivo del camarón blanco, se determinó que el sitio de acción del compuesto bioactivo debe ser el estómago, ya que es aquí donde el patógeno crea una biopelícula, que luego liberará las toxinas causantes de la enfermedad expuesta.

Se realizó la propuesta de encapsular dos compuestos bioactivos (fitobióticos y probióticos) para que puedan ser consumidos por el crustáceo junto a su alimento balanceado habitual. Tal cápsula debe tener el tamaño apropiado para que pueda ser incluido en la dieta y pueda ser ingerido inclusive por larvas de camarón ($< 50 \mu$ en el caso de larvas y $< 150 \mu$ en el caso de juveniles de camarón), además de que debe ser lo suficientemente grande para no pasar por los filtros hacia el hepatopáncreas ($> 1 \mu$), y permanecer en el estómago del camarón para que su contenido sea ahí liberado.

Al hacer un estudio del material encapsulante y del método de encapsulación apropiado, los lípidos y el alginato de sodio serían los mejores encapsuladores, debido a que han sido comprobados en numerosos estudios. Ambos materiales han sido eficientemente encapsulados por el método de extrusión. Es importante que el material encapsulante debe ser compatible con lo que va a encapsular, por lo que se decidió que la cápsula que contiene a los fitobióticos debe ser una clase de lípidos, formando un liposoma; mientras que la cápsula que contiene el probiótico debe estar compuesta de alginato de sodio.

Una vez detallados los pasos para generar las cápsulas, es importante probar diversas formas del producto ofrecido. Las pruebas necesarias empiezan con pruebas de efectividad de encapsulación, en el que se somete a la cápsula a caracterización para comprobar su morfología, tamaño, potencial zeta, porcentaje de eficacia de encapsulación, exposición a distintas condiciones, liberación del material encapsulado, y estabilidad de la cápsula en almacenamiento. Luego de esto es necesario realizar pruebas en condiciones de cultivo, por lo que pruebas *in vitro* de antagonismo, pruebas de desafío, larvicultura experimental y larvicultura comercial deben ser consideradas en esta clase de estudios.

Todo este protocolo, desde la elección del compuesto bioactivo y método de encapsulación hasta las pruebas de efectividad del producto, asegura que la biocápsula

tendrá efectos positivos en las etapas de producción de cultivo de camarón, disminuyendo de forma significativa la mortalidad de los camarones por enfermedades bacterianas y aumentando la economía de todos los involucrados en el negocio.

Este trabajo está dirigido a los grupos de investigación y desarrollo, para que ellos determinen la eficiencia real de los compuestos bioactivos. Pruebas adicionales de eficiencia de los encapsulados a condiciones ambientales que se generan durante el proceso de fabricación del alimento permitirá conocer si los factores envueltos en estos, como son las altas temperaturas, van a afectar la estructura externa e interna de la biocápsula.

Los costos de los equipos requeridos en los procesos explicados son elevados. Sin embargo, ESPOL dispone de los equipos de mayor valor, por lo que las investigaciones de encapsulación deber ser realizadas por un grupo multidisciplinario expertos en acuicultura, tecnología de materiales y química. Si se considera que ya se cuenta con el equipamiento, el costo por concepto de materiales es bajo y manejables para los centros de investigación de la ESPOL. Este costo no incluye los gastos por el desarrollo de las cápsulas por parte del personal.

El diseño debe ser ejecutado, siguiendo los pasos descritos para preparar biocápsulas con los compuestos bioactivos, para posteriormente probarlas con los métodos descritos. También puede ser complementado realizando estudios de fabricación de biocápsulas en condiciones industriales y a nivel de procesos de inclusión en alimentos balanceados. Finalmente podrían realizarse otros protocolos con combinaciones de otros materiales de cobertura y contenidos para posteriormente probar su respectiva efectividad.

La presente investigación está enmarcada en el proyecto “Biotecnología azul para el fortalecimiento de la industria acuícola ecuatoriana controlando Vibrios patógenos”, auspiciado por el Programa INEDITA de SENESCYT.

BIBLIOGRAFÍA

Adams D, Boopathy R. Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biología, Section Cellular and Molecular Biology*. 2013; 68 (6):1017-1021. Available from: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/biolog.2013.68.issue-6/s11756-013-0251-x/s11756-013-0251-x.pdf>. doi: <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0251-x>

Al-Sagheer AA, Mahmoud HK, Reda FM, Mahgoub SA, Ayyat MS. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquac Nutr*. 2018; 24 (3): 1006–1014.

Anuta JD, Buentello A, Patnaik S, Lawrence A, Mustafa A, Hume ME, Kemp MC. Effect of dietary supplementation of acidic calcium sulfate (vitoxal) on growth, survival, immune response and gut microbiota of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *World aquaculture society*. 2010; 42 (6). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-7345.2011.00519.x> doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00519.x>

Balcázar JL, Rojas-Luna T, Cunningham DP. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J Invertebr Pathol*. 2007; 96 (2): 147–150. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.008>. PMID: 17544437.

BCE. Banco Central del Ecuador (2018). Boletín Anuario 40

BONDAD-REANTASO, Melba G., et al. The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: past, present and future. *Journal of invertebrate pathology*, 2012, vol. 110, no 2, p. 158-165.

Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol.* 2006; 8 (7): 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x> PMID: 16817922

Da Silva BC, Do Nascimento F, Mouriño JL, Ferreira GS, Seiffert WQ. Salts organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. 2013; 384-387: 104-110 doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.12.017>

Da Silva BC, Vieira FDN, Mouriño JLP, Ferreira GS, Seiffert WQ. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture.* 2013; 384–387: 104–110.

Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. Short-chain fatty acids and poly-beta-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnol Adv.* 2009; 27 (6): 680-685. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.026>.

Defoirdt T, Halet D, Sorgeloos P, Bossier P, Verstraete W. Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture.* 2006; 261 (2): 804–808.

García, M. 2003. Análisis del sector camaronero. Apuntes de Economía No. 29. Banco Central del Ecuador.

Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 2004; 233 (1–4): 1–14.

Hassaan M, Soltan M, Jarmołowicz S, Abdo H. Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture nutrition.* 2016; 24(1): 83-93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/anu.12536>.

Kanjana K, Wongprasert K, Radtanatip T, Asuvapongpatana S, Withyachumnarnkul B. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2011;30(1):389–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.016>

Kara K, Özkaya S, Erbaş S, Baytok E. Effect of dietary formic acid on the in vitro ruminal fermentation parameters of barley-based concentrated mix feed of beef cattle. *J. Appl. Anim. Res.* 2018; 46 (1): 178-183. doi: <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1284073>.

Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. *Bioresour Technol.* 2008; 99: 8788–8795. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.048> PMID: 18513954

Kudus K, Grasian I, Madasamy S, John A. Immunomodulatory Effect of Alginic Acid from Brown Seaweed *Sargassum Wightii* on Disease Resistance in *Penaeus Monodon*. 2017;1(1):26–9.

Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(3): 453–462. PMID: 11556910.

Mine S, Boopathy R. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Curr Microbiol.* 2011; 63 (1): 1-7 . doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9932-2>.

Morken T, Kraugerud O F, Barrows F T, Sørensen M, Storebakken T, Øverland M. Sodium diformate and extrusion temperature affect nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 2011; 317 (1-4): 138-145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.020>

Ng WK, Lim CL, Romano N, Kua BC. Dietary short-chain organic acids enhanced resistance to bacterial infection and hepatopancreatic structural integrity of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Int Aquat Res.* 2017; 9 (4): 293–302.

Ng WK, Koh B, Teoh C, Romano N. Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. *Aquaculture.* 2015; 449 (1): 69–77, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.006>.

Prachumwat A., Taengchaiyaphum S., Mungkongwongsiri N., Aldama D., Flegel T., Sritunyalucksana K. (2018). Update on early mortality syndrome/ acute hepatopancreatic necrosis disease by April 2018. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jwas.12559>

Robertson, P. A. W., et al. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1998, vol. 32, no 2, p. 151-155.

Salem AM, Amin RA. Evaluation of some organic acids as potential decontaminants of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh shrimp. *World Journal of Dairy & Food Sciences.* 2012; 7 (1): 41–48.

Sarter S, Randrianarivelo R, Ruez P, Raherimandimby M, Danthu P. Antimicrobial effects of essential oils of *Cinnamosma fragrans* on the bacterial communities in the rearing water of *Penaeus monodon* larvae. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 1(4): 433–437.

Shi, L. E., Li, Z. H., Li, D. T., Xu, M., Chen, H. Y., Zhang, Z. L., & Tang, Z. X. (2013). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 99-104.

Sibaja A., Ramos E. De Oliveira J., & Fernandes L, (2019). Trends in aquaculture sciences: from now to use of nanotechnology for disease control. *Reviews in Aquaculture* (2019) 11, 119-132. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/raq.12229>

Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLoS one*, 14(1), e0210478.

Sou, K., Naito, Y., Endo, T., Takeoka, S., & Tsuchida, E. (2003). Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnology progress*, 19(5), 1547-1552.

Thitamadee, Siripong, et al. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 2016, 452, p. 69-87.

Tran, Loc, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 2013, vol. 105, no 1, p. 45-55.

Vanderberghe, J., et al. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 1998, vol. 169, no 1-2, p. 121-132.

Vázquez JA, González MP, Murado MA. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fishes. *Aquaculture*. 2005; 245 (1–4): 149–161.

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64 (4): 655–671. PMID: [11104813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11104813/).

Yudiati E, Isnansetyo A, Murwantoko, Ayuningtyas, Triyanto, Handayani. Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2016;54:46–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.022>.

Zorriehzahra, M. J.; Banaederakhshan, R. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 2015, vol. 3, no 2S, p. 64-72.