

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Diseño de un protocolo de inclusión de extractos de macroalgas como estrategia para mejorar la supervivencia en postlarvas de camarón blanco del Pacífico (*Pennaeus vannamei*)

PROYECTO INTEGRADOR

Previo a la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Aguilar Aguilar Ana Belén

Aguilar Astudillo María Patricia

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2020

DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado a Dios, por ser una guía en mi camino y mi fortaleza en momentos de debilidad.

Dedicado a mi familia, especialmente a mis papitos, Luis y Sandra porque siempre han luchado para darnos lo mejor, estuvieron a mi lado en cada paso apoyándome cuando sentía que todo iba mal, ellos son mi más grande orgullo y mi motor de vida para salir adelante y ser mejor persona cada día.

A mis hermanos Sandrita y Juan Luis, por ser mi compañía, alentarme, y creer en mí. A mi cuñado Viche porque siempre estuvo dispuesto brindarme su ayuda y regalarme un consejo cuando lo necesitaba.

A mis amigos y compañeros de todas las facultades, por hacer que esta experiencia sea maravillosa, gracias por cada momento compartido a su lado, me llena de alegría saber que cuento con ustedes. Finalmente, gracias a mi mejor amiga y compañera de tesis María Patricia, porque sin ti nada de esto habría sido igual.

Ana Belén Aguilar Aguilar

DEDICATORIA

Gracias a Dios que me sostuvo y me dio fuerza en los momentos donde sentí que no lo lograría, sin él nada hubiera sido posible.

Dedico este logro a mis padres y hermanos, principalmente a mi abuelito Alfredo cuyo sueño de ser profesional yo lo he cumplido, gracias por no permitir que nada me falte y poner toda su confianza en mí.

A mi abuelita y mi tía quienes me apoyaron incondicionalmente y me brindaron palabras de aliento a la distancia, a mis tíos y mis primas que me hicieron sentir como en casa tomando mi mano cuando más lo necesité.

Gracias a mis amigos y compañeros de cada facultad, por haber hecho de esta etapa una experiencia maravillosa, llena de mucho aprendizaje y sacrificio, sin ellos nada hubiese sido igual.

Finalmente quiero agradecer a Davide por alentarme a seguir adelante y convertirse en una pieza fundamental en mi vida.

María Patricia Aguilar Astudillo

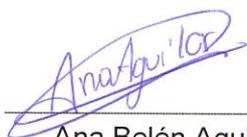
AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por haber hecho posible alcanzar este logro tan importante para nuestra vida. A nuestro tutor de tesis, MSc. Adrián Márquez quién confió firmemente en nosotras y estuvo presente en cada etapa durante el desarrollo de nuestro proyecto, por ser uno de los mejores profesores de nuestra carrera, enseñando siempre con pasión y motivando a los estudiantes a ser grandes profesionales. Gracias a nuestros profesores de FICMC – ESPOL, en especial a: Ph.D. Francisca Burgos por siempre exigirnos realizar un buen trabajo, Ph.D. Bonny Bayot por estar siempre dispuesta a ayudar a sus estudiantes, Ph.D. Wilfrido Arguello, Marco Álvarez y Víctor Osorio; a los MSc. Enrique Blacio, Eduardo Cervantes y Sonia Guartatanga por haber sido una pieza fundamental en nuestro aprendizaje y formación.

Ana Belén Aguilar & María Patricia Aguilar

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Ana Belén Aguilar Aguilar* y *María Patricia Aguilar Astudillo* doy(damos) mi(nuestro) 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"



Ana Belén Aguilar
Aguilar



María Patricia Aguilar
Astudillo

EVALUADORES

VICTOR HUGO
OSORIO
CEVALLOS

Firmado digitalmente
por VICTOR HUGO
OSORIO CEVALLOS
Fecha: 2021.02.12
11:06:30 -05'00'



Firmado electrónicamente por:
ADRIAN JOSE
MARQUEZ
MONTIEL

Nombre del Profesor

Ph.D Víctor Osorio

Nombre del Profesor

MSc. Adrián Márquez

RESUMEN

Este proyecto tiene como propósito diseñar un protocolo de inclusión de extractos de macroalgas para el mejoramiento de la supervivencia de postlarvas de camarón del Pacífico *Penaeus vannamei*. Con la finalidad de optimizar el proceso de producción mediante la incorporación de quimio-tratamientos naturales y de bajo impacto ambiental, que podrían ayudar a reducir el estrés durante el transporte y acortar el tiempo de aclimatación. El desarrollo del proyecto se basó en el análisis y descripción bibliográfica de los métodos más utilizados en estudios previos, para la extracción de compuestos bioactivos de macroalgas marinas como: 1) ensayos de citotoxicidad, 2) vías de administración y 3) técnicas para determinar la actividad inmunológica y antimicrobiana de los extractos. Seleccionando los métodos más viables para su implementación en base a diversos criterios de selección aplicados en los estudios previos. Es importante destacar que el protocolo va dirigido hacia un proceso industrial donde es necesario optimizar la tecnología de producción de manera que cause un impacto mínimo al medio ambiente, es por eso que; nuestra propuesta promueve las prácticas de acuicultura sustentable, posicionándose los extractos de macroalgas como nuevos agentes de control en una etapa donde los organismos son más susceptibles a los cambios ambientales y malas prácticas de manejo.

Palabras clave: Macroalgas, compuestos bioactivos, actividad inmunológica, estrés, camarón.

ABSTRACT

This project aims to design a standard protocol (SP) to include seaweed extracts to improve the survival of Pacific shrimp postlarvae *Penaeus vannamei*. To optimize the production process by incorporating natural and low-impact chemo-treatments that could reduce the stress during transport and cut the acclimatization time. The SP has based on the analysis and bibliographic description in previous studies. These methods were used to describe extract bioactive compounds from marine macroalgae: 1) cytotoxicity tests, 2) administration routes, and 3) techniques to determine the immunological and antimicrobial activity of these extracts for selecting the most feasible implementation methods. It is important to highlight, the protocol was directed towards an industrial process. Where it is necessary to optimize the production technology to cause minimal impact to the environment, and it is why; our proposal promotes sustainable aquaculture practices. Positioning the seaweed extracts as new control agents in a stage where organisms are more susceptible to environmental changes and poor management practices (transport and acclimation).

Key words: Seaweed, bioactive compounds, immunological activity, stress, shrimp.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| EVALUADORES..... | I |
| RESUMEN..... | II |
| ABSTRACT | III |
| ÍNDICE GENERAL | IV |
| ABREVIATURAS..... | VII |
| SIMBOLOGÍA..... | VIII |
| ÍNDICE DE FIGURAS | IX |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | X |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS..... | XI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Descripción del problema | 2 |
| 1.2. Justificación del problema | 3 |
| 1.3. Objetivos | 4 |
| 1.3.1. Objetivo General..... | 4 |
| 1.3.2. Objetivos Específicos..... | 4 |
| 1.4. Marco Teórico | 4 |
| 1.4.1. Condiciones de estrés en Postlarvas de camarón | 4 |
| 1.4.1.1. Manipulación y transporte | 4 |
| 1.4.1.2. Aclimatación..... | 5 |
| 1.4.1.3. Condiciones de siembra..... | 5 |
| 1.4.2. Tratamientos para mejorar la salud en organismos de cultivo | 6 |
| 1.4.2.1. Probióticos..... | 6 |
| 1.4.2.2. Aceites Esenciales (AE) | 7 |
| 1.4.2.3. Uso de macroalgas marinas..... | 8 |
| 2. METODOLOGÍA | 10 |
| 2.1. Bioactividad de macroalgas..... | 10 |
| 2.1.1. Actividad antioxidante | 10 |
| 2.1.2. Fenoles totales..... | 11 |
| 2.1.3. Auxinas totales (hormonas) | 11 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.1.4. | Fucoidans | 11 |
| 2.2. | Citotoxicidad de los extractos | 11 |
| 2.2.1. | Ensayo de citotoxicidad por aislamiento de células | 12 |
| 2.2.2. | Ensayo de letalidad con <i>Artemia salina</i> | 13 |
| 2.3. | Inclusión de los extractos | 13 |
| 2.3.1. | Extracción | 13 |
| 2.4. | Vías de administración | 14 |
| 2.4.1. | Inmersión | 15 |
| 2.4.2. | Inyección..... | 15 |
| 2.4.3. | Dietas..... | 16 |
| 2.5. | Evaluación de Actividad Inmunológica | 16 |
| 2.5.1. | Recuento de Hemocitos..... | 17 |
| 2.5.2. | Actividad Fenoloxidasa (PO) | 17 |
| 2.5.3. | Actividad Superóxido Dismutasa (SOD) | 18 |
| 2.5.4. | Actividad Anión Superóxido | 18 |
| 2.5.5. | Actividad de Lizosima | 19 |
| 2.5.6. | Actividad Fagocítica | 19 |
| 2.6. | Evaluación Bactericida - Bacteriostática..... | 20 |
| 2.6.1. | Desafío con <i>Vibrio spp.</i> | 20 |
| 2.6.1.1. | Desafío In vitro: | 20 |
| 2.6.1.2. | Desafío In vivo:..... | 20 |
| 2.7. | Selección de métodos | 20 |
| 2.7.1. | Extracción | 20 |
| 2.7.2. | Vías de administración..... | 21 |
| 2.7.3. | Actividad inmunológica | 21 |
| 2.7.4. | Evaluación del efecto de los extractos de macroalgas | 22 |
| 3. | RESULTADOS Y ANÁLISIS | 24 |
| 3.1. | Bioactividad de las macroalgas | 24 |
| 3.2. | Citotoxicidad | 25 |
| 3.3. | Extracción..... | 27 |
| 3.2.1 | Solventes más utilizados | 27 |
| 3.4. | Vías de administración | 27 |

| | |
|---|----|
| 3.5. Actividad Inmunológica..... | 29 |
| 3.6. Actividad Bactericida - Bacteriostática..... | 30 |
| 3.7. Evaluación del efecto de los extractos de macroalgas | 33 |
| 3.8. Diseño y contenido del protocolo | 33 |
| 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 35 |
| 4.1. Conclusiones | 35 |
| 4.2. Recomendaciones..... | 36 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura |
| BPM | Buenas Prácticas de Manejo |
| PLs | Postlarvas |
| CNA | Cámara Nacional de Acuacultura |
| NMFS | Servicios Nacionales de Pesca Marina |
| THC | Recuento total de hemocitos |
| PO | Fenoloxidasa |
| SOD | Superóxido Dismutasa |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidracilo |
| TCA | Caldo de soja tripticasa |
| NBT | Nitroblue Tetrazolium |
| L-DOPA | L- dihidroxifenilalanina |
| TBS | Tris buffered saline |
| OTC | Oxitetraciclina |
| FFC | Florfenicol |
| SARA | Sarafloxacina |

SIMBOLOGÍA

| | |
|-----|---------------------------------|
| ppt | Partes por mil |
| mg | Miligramos |
| gr | Gramos |
| L | Litros |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| °C | Grados centígrados |
| nm | Nanómetros |
| µg | Microgramos |
| ml | Mililitros |
| ufc | Unidades formadoras de colonias |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Ilustración 1.1 Probióticos usados actualmente en acuicultura | 7 |
| Ilustración 1.2 Sargassum sp. Tomado por: Liz Yongue, Monroe County Extension Coordinator..... | 8 |
| Ilustración 2.1. Ensayo para determinar la citotoxicidad. Fuente: (Domínguez-Borbor, Chalén-Alvarado, & Rodríguez, 2018)..... | 12 |
| Ilustración 2.2. Extractos de macroalgas verdes y pardas con diferentes tipos de solventes. Tomado por: MSc. Adrián Márquez (CENAIM)..... | 14 |
| Ilustración 2.3. Ejemplo de camarones desafiados bajo la prueba de inmersión. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 15 |
| Ilustración 2.4. Ejemplo de camarones desafiados bajo la prueba de inyección. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 16 |
| Ilustración 2.5. Ejemplo de camarones desafiados bajo la prueba de alimentación con dietas. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021..... | 16 |
| Ilustración 2.6. Diferentes tipos de hemocitos que produce el camarón <i>P. vannamei</i> para combatir las enfermedades que los atacan. Tomado por: M. Roman, Alltech..... | 17 |
| Ilustración 2.7. Liberación de diferentes efectores inmunológicos (proPO) después de la activación de hemocitos por patógenos. Fuente: (Azañero Díaz & Jara Campos, 2014)... | 18 |
| Ilustración 3.1 Método de administración del extracto escogido para el protocolo. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 29 |
| Apéndice 1 Portada del protocolo para la inclusión de extractos de macroalgas. Elaborado por: Aguilar, A. B. & Aguilar, M. P., 2021..... | 12 |
| Apéndice 2 Parte de los métodos usados en el protocolo para el proceso de extracción. Elaborado por: Aguilar, A. B. & Aguilar, M. P., 2021 | 13 |
| Apéndice 3 Principales especies de algas presentes en Ecuador que se han usado en estudios previos. Elaborado por: Aguilar, A. B. & Aguilar, M. P., 2021..... | 14 |
| Apéndice 4 Principales especies de <i>Vibrios</i> presentes en Ecuador. Elaborado por: Aguilar, A. B. & Aguilar, M. P., 2021 | 15 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1.1 Rangos de parámetros óptimos para el cultivo de camarón blanco <i>P. vannamei</i> . Fuente: (García Molina, y otros, 2020), (Cuéllar-Anjel, y otros, 2010). Elaborado por: Aguilar, A. B., 2020..... | 6 |
| Tabla 2.1 Ejemplos de extracción de bioactivos de algas rojas. Fuente: (Torres, Flórez, & Domínguez, 2019)..... | 13 |
| Tabla 3.1 Factibilidad de la vía de administración. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 27 |
| Tabla 3.2 Factibilidad del método para evaluación de la Actividad Inmunológica. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 29 |
| Tabla 3.3 Recopilación de estudios donde se demuestra la actividad antimicrobiana de los extractos de macroalgas. Elaborado por: Aguilar, A. B., 2021 | 32 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 2.1 Síntesis de los métodos para medir la actividad inmunológica en distintos ensayos con macroalgas. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 22 |
| Gráfico 3.1 Proceso desarrollado para la elaboración del protocolo. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 24 |
| Gráfico 3.2 Representación porcentual de los solventes más utilizados para la extracción. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021..... | 27 |
| Gráfico 3.3 Representación porcentual de la vía de administración más utilizados para los extractos. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 28 |
| Gráfico 3.4 Representación porcentual de la factibilidad del método para evaluación de la Actividad Inmunológica. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 30 |
| Gráfico 3.5 Resultados de la actividad inmunológica. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 | 33 |
| Gráfico 3.6 Estructura del contenido del protocolo. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021 ... | 34 |

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de productos acuícolas ha aumentado de forma significativa, alcanzando el 53% de toda la producción mundial en 2018 y llegando a convertirse en el sector de mayor crecimiento dentro de la industria alimentaria (FAO, 2020), lo que pone de manifiesto la importancia de la acuicultura en función de proporcionar alimentos de buena calidad nutricional a los miles de millones de consumidores que se benefician.

En Latinoamérica la acuicultura presenta un incremento mayor al de otras regiones (FAO, 2018), a pesar del impacto de enfermedades que han generado caídas en los volúmenes de producción, ha logrado mantenerse estable con el pasar de los años. Debido al aporte alimenticio como proteínas, vitaminas y minerales su demanda se ha incrementado en países Latinoamericanos y su exportación a otros países consumidores como Estados Unidos, China, Vietnam, entre otros (Varela Mejias & Varela Moraga, 2019).

Ecuador, en el que el sector acuícola es considerado el más importante de la región según (Anderson, Valderrama, & Jory, 2018) por el impresionante crecimiento del cultivo de camarón *Penaeus vannamei*. En el 2019 alcanzó las cifras más altas con un total de 291.5 millones de libras exportadas, generando ingresos de USD 3 375.4 millones (El Comercio, 2020) y consolidándose como el segundo producto de exportación no petrolero del país.

Es necesario recalcar que, debido a la alta demanda de camarón se ha incrementado el número de hectáreas de cultivo y paralelamente la demanda de postlarvas (PLs). Anteriormente la acuicultura dependía de semillas silvestres, pero a partir del año 2002 la Subsecretaría de Recursos Pesqueros mediante la expedición de una normativa prohibió la captura de PLs del medio natural (Acuerdo Ministerial No. 106, 2002), debido al impacto causado en los ecosistemas acuáticos que trae como consecuencia la aparición de nuevas enfermedades que afectan a la producción.

El sistema de cultivo actual en Ecuador es el resultado de la mejora tecnológica del método desarrollado en el Laboratorio NMFS Galveston, donde sembraron larvas de camarón en

criaderos, con la oportunidad de intensificar y controlar las operaciones (Nash, 2011), promoviendo la idea de un programa de mejora genética (Piedrahita, 2018).

De acuerdo con Zambrano Mero, et al. (2019) *“Las condiciones en las que se desarrollan las diferentes etapas de estos crustáceos son vitales para el logro de su supervivencia”* (p.130). Por eso los laboratorios se rigen bajo condiciones estrictas de bioseguridad y buenas prácticas de manejo (BPM) para obtener larvas de excelente calidad. Durante el despacho y transporte se debe asegurar que las larvas se encuentren en las mejores condiciones, para evitar altos niveles de estrés, por la sobre densidad, acumulación de metabolitos, movimiento y variaciones de temperatura que pueden causar mortalidad (Jaime Ceballos, y otros, 2008); (Jory, 2019).

La resistencia bacteriana es un problema que aqueja a los investigadores y a la acuicultura en general, se intenta erradicar el uso de antibióticos actuales y cambiarlos por antimicrobianos de origen natural (El Wahidi, y otros, 2015), como las macroalgas; cuya composición es rica en macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y sustancias de naturaleza estimulante y antibiótica (Ferdouse, y otros, 2018).

1.1. Descripción del problema

Las enfermedades de carácter vírico, bacteriano, fúngico y parasitarias, se han convertido en el mayor obstáculo para el desarrollo de la industria camaronera en Ecuador y el mundo, principalmente en la producción de larvas donde una serie de variables deben ser consideradas a lo largo de toda la cadena de producción, con especial énfasis en el transporte y aclimatación donde el control de los parámetros ambientales es fundamental, además de la manipulación y movimiento de los organismos en su camino hacia las camaroneras.

El incumplimiento de los protocolos de bioseguridad y las buenas prácticas de manejo pre y post siembra causan estrés al pasar los organismos desde un ambiente totalmente controlado a uno semi controlado, afectando su crecimiento y supervivencia. Por otro lado, el uso indiscriminado de antibióticos para prevenir y tratar enfermedades representa un peligro inminente para la industria, debido a la resistencia bacteriana y el daño medioambiental, no solo para los organismos de cultivo, sino también para las comunidades

acuáticas. Así mismo, los probióticos son muy utilizados actualmente para mejorar la respuesta inmunológica de los camarones y a pesar de que no existe evidencia científica sobre los efectos negativos que pueden producirse durante el cultivo, su mecanismo de acción no está claro (Raja, y otros, 2015).

Al ser pocos los quimioterapéuticos que pueden ser empleados para el control de mortalidades dentro de los criaderos, según (El-Din & El-Ahwany, 2016) existen compuestos derivados de las macroalgas que tienen un amplio rango de actividad biológica con propiedades antioxidantes promotoras de crecimiento, antiestrés, antibacterianas, estimulantes del apetito y el sistema inmunológico, convirtiéndolos en candidatos ideales para hacer frente a esta dificultad.

1.2. Justificación del problema

La importancia de adquirir larvas de buena calidad, representa una gran probabilidad de éxito en la obtención del producto final para las camaroneras, por lo tanto, identificar procesos que resulten efectivos, rentables y con la menor cantidad de componentes tóxicos como los solventes orgánicos para la aplicación de extractos de macroalgas como agentes quimioterapéuticos, representaría una gran alternativa para optimizar la tecnología de producción, fortaleciendo y promoviendo una industria más sustentable.

Siendo el sector camaronero considerado como uno de los más importantes del país debido a la cantidad de ingresos que genera, su enfoque debería estar dirigido a la obtención de un producto cuyo un impacto ambiental sea mínimo, ya que se estima que en los próximos años las enfermedades bacterianas pueden convertirse en el principal problema para la producción de organismos acuícolas, así como para la salud del ser humano, debido a la resistencia antimicrobiana emergente (FAO, 2017), por lo tanto, continuar con las prácticas tradicionales como el uso de antibióticos o probióticos como agentes de control biológico, implica un gran riesgo para el sector aun cuando ha dado buenos resultados (Parmar, y otros, 2018).

Se ha evidenciado en algunos estudios que extractos provenientes de especies como *Caulerpa racemosa*, *Ulva lactuca*, *Gracilaria foliifera*, entre otras, contienen propiedades antioxidantes y actúan contra bacterias patógenas gram-positivas y gram-negativas

presentes en el ambiente (Shimma M., Samh. S, & Mostafa M., 2015), por eso que el empleo de dichos extractos durante el transporte podría promover la supervivencia y acelerar el crecimiento de las larvas, acortando así el tiempo de aclimatación gracias a la reducción del estrés.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Diseñar un protocolo de inclusión de extractos de macroalgas basado en el análisis bibliográfico de los métodos utilizados en estudios previos para el mejoramiento de la supervivencia de postlarvas de camarón del Pacífico *P. vannamei* durante el transporte.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Describir los métodos utilizados en la medición del rango de actividad biológica de los extractos de macroalgas para la evaluación de su efectividad.
- Seleccionar las técnicas de extracción y administración más adecuados para su aplicación en la fase post larval del camarón.
- Analizar los ensayos de inclusión de los extractos de macroalgas marinas en el sistema inmune de camarón y la actividad bactericida sobre patógenos de impacto para el conocimiento de su efectividad.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Condiciones de estrés en Postlarvas de camarón

1.4.1.1. Manipulación y transporte

La calidad de las postlarvas va a depender de diversos factores tales como: las características otorgadas por los parentales, las condiciones medioambientales donde se desarrollan y especialmente el manejo y control de estas durante toda la fase de producción. Se considera que el transporte de larvas hacia las granjas es una de las etapas que produce

mayor cantidad de estrés en los organismos, debido a diversos factores relacionados con la cosecha, pesaje, empaque, transporte y monitoreo.

En algunos estudios se ha demostrado que la aclimatación y traslado a bajas salinidades produce un estrés severo en las larvas, sin embargo, la densidad debe ser considerada dependiendo del tiempo de transporte, la capacidad del contenedor y los soportes para brindar estabilidad ante el movimiento producido por el camión, evitando de esta manera pérdidas que pueden ser de hasta un 100% en caso de que cayeran (Aguirre Vinza & López Loaiza, 2020).

Cuando se da una reducción de la temperatura y el pH, la actividad bactericida, fenoloxidasa (PO) y fagocitosis disminuye, lo que implica que la capacidad inmunológica se vea afectada, ocasionando que las larvas se hagan susceptibles a contraer enfermedades que bajo otras condiciones nunca le afectarían (Pascual, y otros, 2003).

1.4.1.2. Aclimatación

Aclimatación es el proceso de ajuste fisiológico gradual de las postlarvas, al pasar de condiciones de laboratorio a la siembra en estanques de engorde. Las variables más importantes de aclimatación son la salinidad y temperatura, sin embargo, también se deben tomar en cuenta los demás parámetros de calidad de agua (Treece, 2001).

Este procedimiento se lo realiza con el fin de reducir la mortalidad de las larvas durante la siembra, como consecuencia del estrés causado por la manipulación y el transporte; las larvas cuando son liberadas a las piscinas de engorde tienen menos probabilidades de sobrevivir al pasar a un ambiente semi-controlado (Balbi, y otros, 2005); lo que dificulta su crecimiento inmediato debido al tiempo de adaptación, al igual que su desarrollo, producción y rentabilidad (Jory, 2019).

1.4.1.3. Condiciones de siembra

La siembra de las postlarvas, luego de su respectiva aclimatación, es necesario que se realice en las primeras horas del día (6 a 8 a.m.) ya que en este lapso las temperaturas son menores y por lo tanto se reduce el estrés (Cuéllar-Anjel, y otros, 2010).

Un punto importante es la calidad del agua, esto dependerá de las condiciones de cada camaronera; el agua de cada piscina o estanque se debe chequear y controlar diariamente, además de realizar análisis físicos, químicos y biológicos para conocer la calidad y la cantidad de algas presentes.

Tabla 1.1 Rangos de parámetros óptimos para el cultivo de camarón blanco *P. vannamei*. Fuente: (García Molina, y otros, 2020), (Cuéllar-Anjel, y otros, 2010). Elaborado por: Aguilar, A. B., 2020

| Niveles de tolerancia | <i>Penaeus vannamei</i> |
|------------------------------|--------------------------------|
| Salinidad (ppt) | 15 – 25 |
| Temperatura (°C) | 25 – 32 |
| Oxígeno disuelto (mg/L) | 5 – 15 |
| Turbidez | Entre 30 y 45 |
| pH | 6.5 – 8.5 |
| Amonio (mg/L) | 0.01 – 0.10 |

1.4.2. Tratamientos para mejorar la salud en organismos de cultivo

Actualmente existen pocos quimioterapéuticos que pueden ser empleados para el control de mortalidades dentro de los laboratorios de larvas (Rerver, y otros, 2014). El descubrimiento y reconocimiento mundial de la eficacia de los antibióticos revolucionó el paradigma de la terapéutica; sin embargo, su uso indiscriminado ha promovido la resistencia antibacteriana, convirtiéndose en la principal amenaza para la salud pública en el siglo XXI. Dentro de los más utilizados en acuicultura tenemos: la oxitetraciclina (OTC), florfenicol (FFC), sarafloxacina (SARA), clortetraciclina, quinolonas, ciprofloxacina, norfloxacina, ácido oxolínico, perfloxacina, sulfametazina, gentamicina y tiamulina; mayormente usados para tratar patologías relacionadas a infección por *Vibrio sp*, causante de altas mortalidades y pérdidas económicas en camarones (Espinoza P., Santiago H., & Bermúdez A., 2009).

En este sentido se ha generado un nuevo sector cuyos estudios van dirigidos a la búsqueda de nuevas alternativas que permitan solventar los principales problemas del uso de antibióticos y puedan ser utilizadas en todas las etapas de desarrollo del camarón.

1.4.2.1. Probióticos

Ampliamente utilizados en la actualidad con el objetivo de mejorar la salud de los camarones a través del equilibrio microbiano, son específicamente de dos tipos: probióticos intestinales administrados por vía oral mediante el alimento y probióticos aplicados en el medio de

cultivo (agua). El mecanismo de funcionamiento no es claro, sin embargo, en algunas investigaciones se ha demostrado que los probióticos inhiben el crecimiento de posibles patógenos causantes de la enfermedad, además de generar la estimulación en el apetito del individuo (Raja, y otros, 2015).

Desempeñan múltiples funciones dentro del sistema de cultivo, como, reducción de compuestos nitrogenados, aumento de oxigenación y tasas de crecimiento, mayor producción de eritrocitos y leucocitos, mejora la respuesta inmunitaria, entre otras; lo que va depender específicamente de la cepa añadida, las mayormente usadas son; *Carnobacterium*, *maltaromaticum B26*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacilo sp.*, *Lactobacillus rhamnosus*, etc. (Raja, y otros, 2015).

A pesar del aislamiento de diversas cepas en *P. vannamei*, no se han identificado aún la mayoría de especies presentes en la microbiota intestinal, por esta razón es fundamental llevar a cabo más investigaciones basadas en el aislamiento de cepas probióticas en medios de cultivo mejorados, su secuenciación para identificar los genes funcionales que promuevan el desarrollo de nuevos productos enzimáticos por medio de ensayos *in vitro* y diversos factores que influyan en el comportamiento de dichas bacterias (Xu, y otros, 2018).



Ilustración 1.1 Probióticos usados actualmente en acuicultura

1.4.2.2. Aceites Esenciales (AE)

Constituyen uno de los grupos de materias primas más importantes para la industria alimentaria, de higiene, farmacéutica, perfumería y otras. Varios estudios demuestran que ciertos AE, utilizados como anestésicos y/o sedantes, reducen los niveles de cortisol plasmático y atenúan la respuesta al estrés (da Cunha, y otros, 2010; Zeppenfeld, y otros,

2014; Souza, y otros, 2017). Además, es importante señalar que tienen propiedades lipofílicas y liposolubilidad, lo que contribuye a una rápida dispersión a través de membranas biológicas, incluida la barrera hematoencefálica en el sistema nervioso central (SNC), modulando la función cerebral (Zahl, Samuelsen, & Kiessling, 2012; Manayi, y otros, 2016).

Un ejemplo es, *Melaleuca alternifolia*, capaz de prevenir la inhibición de las actividades de la creatina quinasa esplénica y piruvato quinasa causadas por enfermedades (Baldissera, y otros, 2017), demostrando la posibilidad de ser utilizado como reductor de estrés. Además, la anestesia profunda con *Cymbopogon nardus* promueve una depresión notoria en el poder de contracción muscular con pérdida de tono muscular y depresión cardiorrespiratoria transitoria (Barbas, y otros, 2017). Haciendo evidente el uso de estos AE en la industria acuícola como potenciales estimulantes que ayudan a reducir el uso de antibióticos.

1.4.2.3. *Uso de macroalgas marinas*

Las algas marinas y de agua dulce poseen varios compuestos que tienen características farmacológicas intrínsecas, cuyos campos de aplicación se han extendido debido a su rápido crecimiento y adaptabilidad; lo que las hace candidatas ideales para la formulación de antibacterianos e inmunoestimulantes de alta eficacia.

Durante el metabolismo, las algas producen una serie de moléculas como: polifenoles, alcaloides, terpenos, polisacáridos, ácidos grasos, esteroides, lactonas, proteínas, péptidos y hormonas, los mismos que tienen una actividad biológica significativa (Kinghorn & Balandrin, 1993; König & Wright, 1993).



Ilustración 1.2 *Sargassum sp.* Tomado por: Liz Yongue, Monroe County Extension Coordinator

En los últimos años se han estudiado varias especies de algas marinas, cuyos extractos juegan un papel imperativo en la prevención de enfermedades (Dashtiannasb & Yeganeh, 2016; Sakthivel, y otros, 2015) informó que los nauplios de artemia enriquecidos con pasta de algas rojas, mejora el crecimiento y resistencia del camarón contra el estrés por salinidad e infección por *Vibrio*. El polisacárido Fucoidan extraído de *Sargassum wightii*, favorece el crecimiento y la resistencia inmune en *P. monodon*, frente a cepas de *V. parahaemolyticus* (Sivagnanavelmurugan, y otros, 2015). Extractos de *Chaetomorpha antennina* dosificados en el agua de cultivo de *P. monodon* infectados con *V. parahaemolyticus*, promueven la resistencia específica contra este patógeno (Thanigaivel, y otros, 2016). La adición de *Undaria pinnatifida* como aditivo en el alimento incrementa la respuesta inmunitaria y específica de *P. vannamei* frente a *Vibrio* spp., mientras que *Sargassum filipendula* estimula la tolerancia contra variaciones térmicas (Schleder D. D., y otros, 2017).

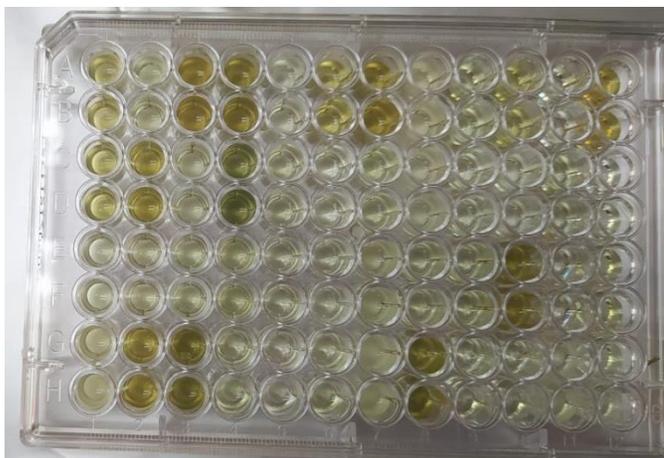


Ilustración 1.3. Extractos de macroalgas a diferentes concentraciones. Tomada por: Msc. Adrián Márquez (CENAIM)

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

El diseño del protocolo se basó en una recolección bibliográfica referente a ensayos con diversas especies de macroalgas (rojas, verdes y pardas) utilizadas para medir la estimulación del sistema inmune de los camarones (*P. vannamei*) ante estrés y patógenos específicos especialmente del género *Vibrio* sp., causante de altas mortalidades. En la primera parte se realizó una propuesta de los métodos de cuantificación de los compuestos bioactivos de macroalgas de mayor importancia, pruebas de citotoxicidad, además de técnicas de extracción; así como vías de administración. Finalmente, la descripción de los métodos más utilizados para determinar el rango de actividad biológica, (actividad inmunológica y antimicrobiana), junto con una síntesis de los resultados más prometedores de un grupo de estudios analizados, en base a los cuales se determinaron los criterios de selección de los métodos más apropiados para el diseño del protocolo.

2.1. Bioactividad de macroalgas

De forma general todas las macroalgas extraídas del mar fueron limpiadas para remover los restos de arena, epibiontes y otras especies de macroalgas, luego congeladas a -20 °C hasta el momento del análisis, cuando son molidas y procesadas para la extracción. Cabe recalcar que todos los métodos descritos a continuación, serán medidos espectrofotométricamente.

2.1.1. Actividad antioxidante

Este método se utiliza para determinar la capacidad antioxidante de los extractos, mediante la reacción del compuesto DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) que es un radical libre, mismo que reacciona con los compuestos antioxidantes generando un cambio de color medido en absorbancia, expresando el % de la actividad antioxidante de la muestra en comparación con diferentes concentraciones de Trolox como estándar (Murray, y otros, 2004).

2.1.2. Fenoles totales

Los fenoles totales de cada muestra de macroalgas se determinan de acuerdo con el método propuesto por (Tanna, Choudhary, & Mishra, 2018); los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul que es determinada a 765 nm, donde la absorbancia producto de la reacción representa la concentración de la muestra en equivalentes de ácido gálico usado como estándar ($\mu\text{g/ml}$) del extracto.

2.1.3. Auxinas totales (hormonas)

Para determinar el contenido de auxinas totales, el extracto se analiza mediante la reacción con el reactivo de Salkowski que permite la oxidación de los compuestos indólicos (Glickmann & Dessaux, 1995), en el cual la absorbancia resultante es comparada con un estándar (Indol-3-acético) obteniendo la concentración de las auxinas totales en $\mu\text{g/ml}$ de extracto.

2.1.4. Fucoïdians

Se emplea el método de (Dische & Shettles, 1948), obteniendo las lecturas de absorbancia 396 nm – Abs 427 nm para corregir la presencia de hexosas. Los valores de absorbancia comparados con un fucoïdian crudo de *F. vesiculosus* (Sigma-Aldrich), que se preparó de la misma manera que las muestras experimentales y sirvió como estándar, dando los resultados en mg/ml.

2.2. Citotoxicidad de los extractos

Según (Pagano & Faggio, 2015), las pruebas de citotoxicidad son técnicas aplicadas en la evaluación del daño biológico provocado por diversas sustancias que afectan a los organismos. Es importante determinar la concentración en la cual las macroalgas se vuelven tóxicas para los organismos, mucho antes de ser incluidas en el agua de cultivo o en las dietas (Ayaz, y otros, 2016); (Genovese, y otros, 2012).

2.2.1. Ensayo de citotoxicidad por aislamiento de células

La citotoxicidad puede ser determinada mediante la memoria plasmática que define el efecto causado por agente químico, físico o biológico capaz de provocar daño a las células (Pagano & Faggio, 2015).

Las células provenientes del cultivo celular, se suspenden en solución salina fisiológica y son expuestas al extracto; posteriormente se mide el daño celular mediante el método de azul de triptán o formazán (Marino, y otros, 2016); se debe llevar un control positivo (sin tratar) para realizar la lectura de microplaca de 620 nm usando la siguiente fórmula (Domínguez, Chalén, & Rodríguez, 2018):

$$\% \text{ Viabilidad celular (OD)} = \left(\frac{\text{OD células expuestas}}{\text{OD células control}} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

Se espera que el % de viabilidad celular sea mayor al 70%, lo que demuestra que la toxicidad del extracto no compromete la salud del organismo.

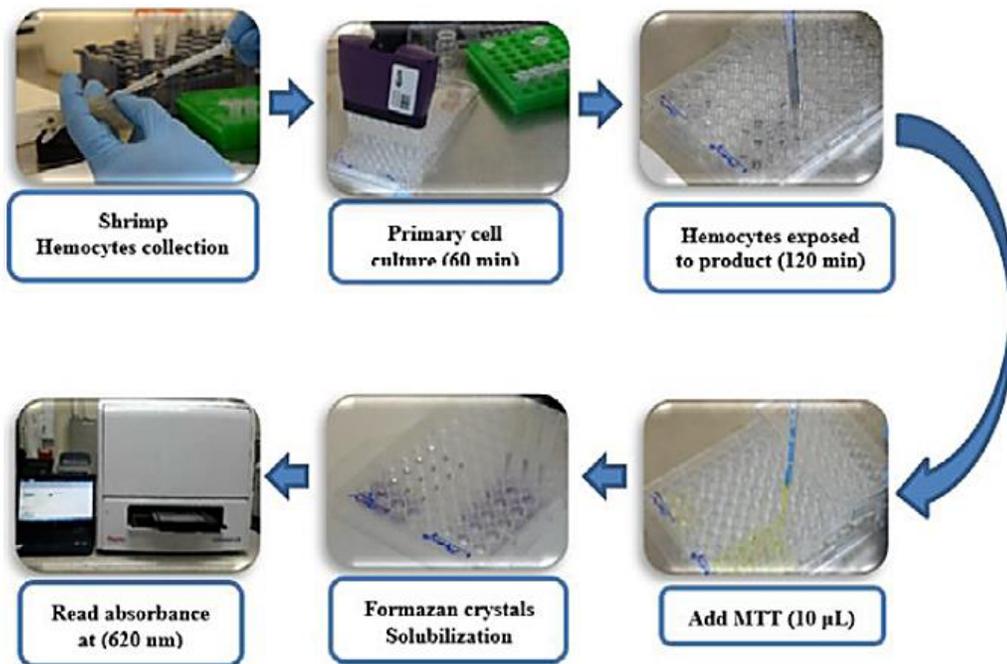


Ilustración 2.1. Ensayo para determinar la citotoxicidad. Fuente: (Domínguez-Borbor, Chalén-Alvarado, & Rodríguez, 2018)

2.2.2. Ensayo de letalidad con *Artemia salina*

Se lleva a cabo un bioensayo de letalidad del camarón de salmuera usando nauplios de *Artemia salina* (Caldwell, Bentley, & Olive, 2003). Los quistes se incuban para que a los dos días de su eclosión alcancen la madurez (Yuvaraj & Arul, 2014; Neethu, Suthindhiran, & Jayasri, 2017).

El ensayo de toxicidad se trabaja con placas donde se colocan los nauplios desafiados bajo diferentes concentraciones de los extractos (Neethu, Suthindhiran, & Jayasri, 2017) y posteriormente se cuenta la cantidad de nauplios muertos.

La mortalidad se calcula mediante la fórmula:

$$\text{Tasa de mortalidad \%} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de nauplios muertos}}{\text{N}^\circ \text{ de nauplios totales}} \times 100 \quad (2.2)$$

Mortalidad menor al 50% se considera no tóxica, entre 50-75% levemente tóxica y mortalidad por encima del 75% altamente tóxica (Yuvaraj & Arul, 2014).

2.3. Inclusión de los extractos

2.3.1. Extracción

Las muestras de macroalgas recolectadas deben pasar por todo un proceso y requieren del uso de ciertos disolventes, que pueden influir en la composición, actividad y mecanismos de acción de los extractos. Debido a la gran diversidad de especies y sus compuestos los solventes orgánicos más utilizados son: metanol, etanol, acetona o sus mezclas (cloroformo), solventes inorgánicos como agua caliente o extracción asistida por enzimas y ultrasonido (Torres, Flórez, & Domínguez, 2019).

Tabla 2.1 Ejemplos de extracción de bioactivos de algas rojas. Fuente: (Torres, Flórez, & Domínguez, 2019).

| Solvente | Alga <i>vannamei</i> | Actividad |
|---|--|---|
| Etanol (70-80%), Metanol (80%), Acetona, Acetato de etilo, Cloroformo: metanol (2:1) (80%), Dimetilsulfóxido (80%) | <i>Gracilaria changii</i> , <i>Gelidium amansii</i> , <i>Kappaphycus alvarezii</i> , <i>Osmundea pinnatifida</i> , <i>Codium tomentosum</i> , <i>Gracilaria lemaneiformis</i> | Antioxidante, Regulación de la absorción de glucosa, Antidiabético, Neuroprotector, Gastroprotector |

| | | |
|--|--|------------------------------|
| <i>Enzimas asistidas (proteasas, carbohidratos)</i> <i>Buffer fosfato</i> <i>Ultrasonido asistido</i> <i>CO2 supercrítico</i> <i>Enzimas y alta presión hidrostática</i> | <i>Parmaria palmate</i> | Antioxidante |
| | <i>Gelidium amansii</i> | Antitumoral |
| | <i>Laurencia obtusa</i> | Antioxidante |
| | <i>Gloiopeltis tenax,</i> <i>Gracilaria mammillaris</i> | Antioxidante, antimicrobiano |
| | <i>Parmaria palmate,</i> <i>Solieria chordalis</i> | Antioxidante |

Los métodos no solo difieren en la selección del solvente, sino también en el procesamiento pre-post extracción y el tiempo de exposición con el solvente (8 – 72 horas) (El-Din & El-Ahwany, 2016; El Wahidi, y otros, 2015) se puede realizar a partir de congelación, liofilización o secado de las algas para luego mezclarlas con etanol o metanol como sugieren (Marino, y otros, 2016; Esquer-Miranda, y otros, 2016), además, se pueden evaluar otros solventes como cloroformo, acetona o éter di etilo para hacer una comparación en la actividad de los extractos siguiendo la metodología de (El-Din & El-Ahwany, 2016; El Shafay, Ali, & El-Sheekh, 2016) cómo se observa en la Tabla 2.

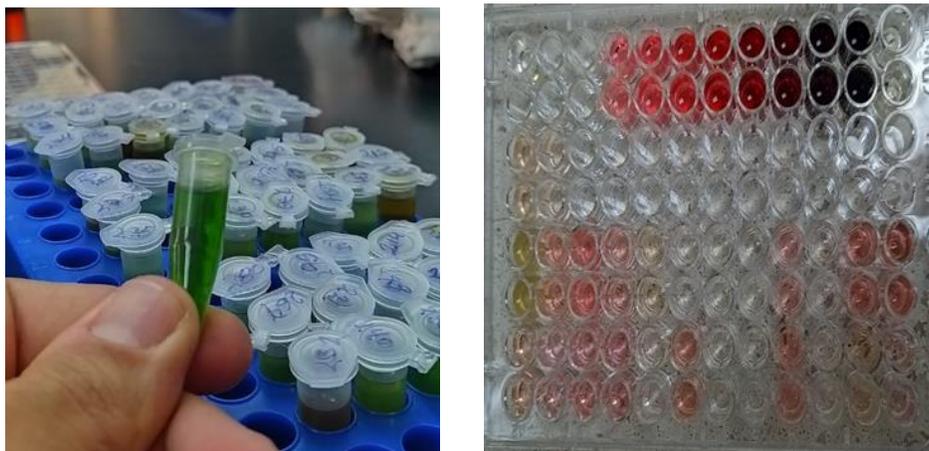


Ilustración 2.2. Extractos de macroalgas verdes y pardas con diferentes tipos de solventes. Tomado por: MSc. Adrián Márquez (CENAIM)

2.4. Vías de administración

Una vez realizada la extracción y evaluación de la toxicidad, se identificaron tres vías de administración por medio de las cuales pueden ser evaluada la efectividad de los extractos: inmersión, inyección y dieta.

2.4.1. Inmersión

Los extractos son diluidos en 1 L de agua destilada y luego mezclada con agua de mar, utilizando concentraciones de 0.5 a 600 mg/L, luego son colocados en los tanques donde se encuentran los animales y se corre diferentes tiempos de exposición que van desde 0.5 a 5 horas; además de las réplicas se debe tener un control positivo y uno negativo (Esquer-Miranda, y otros, 2016; Giang Huynh, y otros, 2011).



Ilustración 2.3. Ejemplo de camarones desafiados bajo la prueba de inmersión. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

2.4.2. Inyección

Se inyecta individualmente en el seno ventral del camarón el extracto a una concentración de 2-3 mg/ml de solución, es decir 20 ml por cada 10 gr de peso y luego para la prueba de desafío se inyecta la solución bacteriana a razón de 1×10^8 ufc/ml, siguiendo la metodología descrita por (Fu, y otros, 2007; Wen-Ying & Jiann-Chu, 2005).



Ilustración 2.4. Ejemplo de camarones desafiados bajo la prueba de inyección. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

2.4.3. Dietas

Las dietas se preparan por medio de la molienda a diferentes concentraciones del extracto (0.1-0.3 %) junto con 0.2 % de celulosa o quitosano, posteriormente son filtradas en una malla y mezcladas con aceite de pescado, para finalmente peletizar la masa y conservar el alimento (Sinurat, y otros, 2016; Immanuel, y otros, 2012).

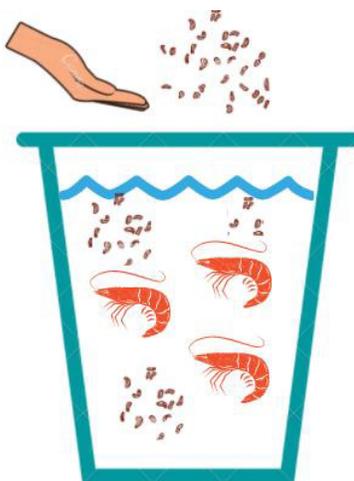


Ilustración 2.5. Ejemplo de camarones desafiados bajo la prueba de alimentación con dietas. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

2.5. Evaluación de Actividad Inmunológica

Para determinar la actividad inmunológica que los extractos producen en el individuo, se evalúan diversos parámetros antes y después del evento con diferentes cepas patógenas,

especialmente del género *Vibrio* sp., causante de altas mortalidades en el cultivo de camarón.

2.5.1. Recuento de Hemocitos

Se debe hacer un recuento antes y después de que los animales hayan sido desafiados, así como expuestos únicamente al extracto. Una vez que la hemolinfa sea extraída, es colocada en un tubo de centrifuga y luego en un hemocitómetro bajo un microscopio de contraste de fase invertido (Giang Huynh, y otros, 2011) o microscopio óptico con aumento de 400 X (Sinurat, y otros, 2016) para diferenciar células hialinas, células granulares, semigranulares y recuento total de hemocitos (THC) (hemocitos totales/mm³) (Johansson, y otros, 2000).

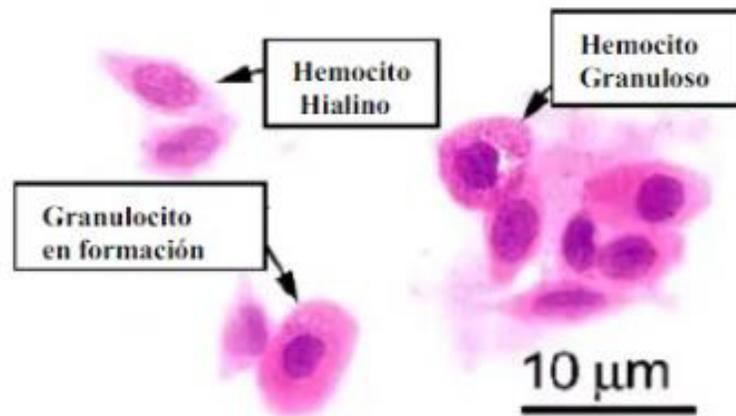


Ilustración 2.6. Diferentes tipos de hemocitos que produce el camarón *P. vannamei* para combatir las enfermedades que los atacan. Tomado por: M. Roman, Alltech

2.5.2. Actividad Fenoloxidasa (PO)

La fenoloxidasa se encuentra dentro de los hemocitos como una enzima inactiva (proPO), cumpliendo un papel fundamental en la reparación de heridas y endurecimiento de la cutícula del camarón; se activa en presencia de un estímulo (bacterias), catalizando la reacción dependiente de oxígeno que transforma difenoles en quinonas y a su vez en melanina, acelerando la remoción de bacterias (Cárcamo-Aréchiga, y otros, 2016).

Una vez aislados los hemocitos, para determinarla se utiliza un método espectrofotométrico, donde se registra la absorbancia del dopacromo a 490 nm contra un blanco que contiene

200 ml de TBS y 60 ml de L- dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (Immanuel, y otros, 2012; Fu, y otros, 2007).

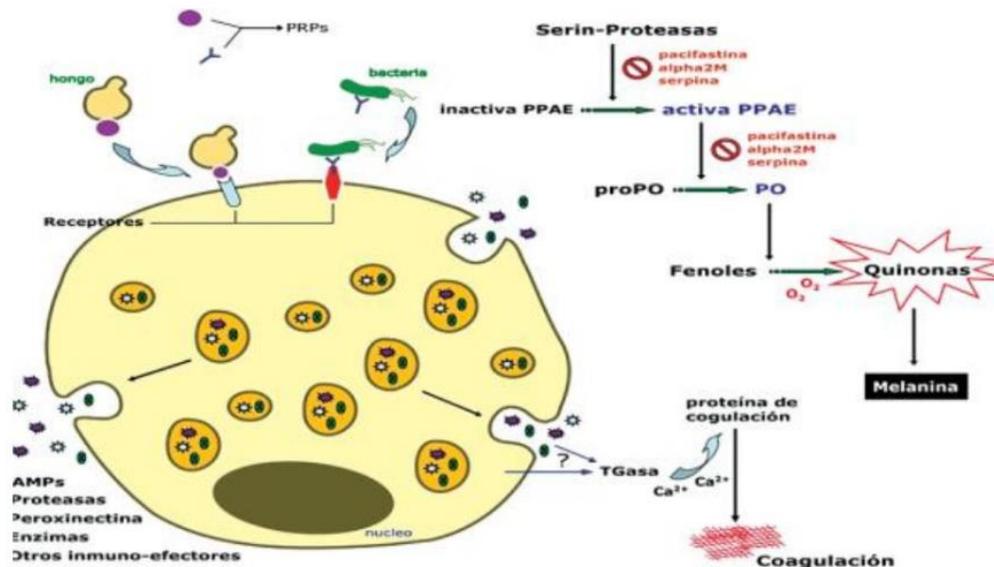


Ilustración 2.7. Liberación de diferentes efectores inmunológicos (proPO) después de la activación de hemocitos por patógenos. Fuente: (Azañero Díaz & Jara Campos, 2014)

2.5.3. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)

El superóxido dismutasa es una enzima utilizada como un indicador del estrés oxidativo y dependiendo del ion metálico que posea actúa en la reparación celular, reduciendo el daño de los superóxidos o destruyendo parásitos ingeridos en la explosión respiratoria generada durante la fagocitosis (Campa, y otros, 2005).

Se mide por su capacidad para inhibir reacciones dependientes de radicales superóxido utilizando el kit Ransod y siguiendo los métodos descritos por (Immanuel, y otros, 2012; Misra & Fridovich, 1972), donde una unidad de SOD se define como la cantidad necesaria para inhibir la tasa de reducción de xantina en un 50% y se expresa como unidad SOD/ml.

2.5.4. Actividad Anión Superóxido

Los aniones súper óxido tanto como los radicales hidroxilos durante la generación de las quinoides tienen un papel importante como antimicrobianos (Cárcamo, y otros, 2016) y al estar relacionado con todos los parámetros anteriores, es importante conocer su actividad.

Para su medición se utiliza un lector de microplacas, expresado como reducción de NBT en 10 ml de hemolinfa, siguiendo la metodología de (Immanuel, y otros, 2012).

2.5.5. Actividad de Lizosima

Las lizosimas son parte de las células que se activan para fagocitar las bacterias o invasiones que llegan a las células (bacterias), si existe un incremento en la actividad lizosomal, incrementará la actividad inmunológica. Además, es considerada como una de las proteínas antibacterianas más importantes dentro del inmunidad innata del camarón (Cárcamo, y otros, 2016).

El ensayo se basa en la lisis de bacterias gram positivas sensibles a la lizosima y se puede medir de dos maneras: turbidimétricamente o en placas de agarosa, donde la cuantificación se realiza siguiendo los procedimientos de Ellis (Stolen, y otros, 1990).

2.5.6. Actividad Fagocítica

La fagocitosis forma parte del sistema de inmunidad innata activado para eliminar los organismos, cuya actividad está relacionada con la SOD extracelular, de manera que coopera en la destrucción de parásitos encapsulados durante la explosión respiratoria (Cárcamo, y otros, 2016).

Para medir la actividad fagocítica se pueden utilizar dos métodos, el descrito por (Immanuel, y otros, 2012) donde se utilizan perlas látex para conocer cuántos hemocitos las digieren y el descrito por (Fu, y otros, 2007) donde se inyecta una muestra de suspensión bacteriana; ambas utilizan la misma fórmula para calcular el % de fagocitosis.

$$\% \text{ de fagocitosis} = \frac{N^{\circ} \text{ de células que inieren perlas}}{N^{\circ} \text{ de células observadas}} \times 100 \quad (2.3)$$

2.6. Evaluación Bactericida - Bacteriostática

2.6.1. Desafío con *Vibrio spp.*

2.6.1.1. Desafío In vitro:

- **Actividad antibacteriana**

Se deben probar diferentes cepas de *Vibrios* patógenos incubadas en caldo de soja tripticasa (TSA). Los ensayos de actividad antibacteriana se realizan en microplacas con diferentes concentraciones de extractos agregados en pocillos donde se prueban frente al inóculo bacteriano usando antibióticos como control (Esquer-Miranda, y otros, 2016).

2.6.1.2. Desafío In vivo:

- **Resistencia antibacteriana**

Esta prueba se puede llevar a cabo mediante la inyección, inmersión o alimentación con extractos de macroalgas a ejemplares de *P. vannamei*. Posteriormente se coloca la suspensión bacteriana al momento de comenzar la prueba, estos ensayos pueden durar entre 2 y 12 días, donde se evalúa la supervivencia y el crecimiento como mediciones indirectas de la efectividad de los extractos. Por otro lado, un grupo de camarones se mantendrá sin recibir la suspensión bacteriana (control negativo) y otro tratamiento con los extractos (control positivo) (Fu, y otros, 2007; Esquer-Miranda, y otros, 2016). Las vías de administración varían entre sí (inmersión, inyección o dieta), sin embargo, el análisis es el mismo siendo los organismos expuestos al patógeno en el medio.

2.7. Selección de métodos

2.7.1. Extracción

Para el método de extracción se hizo un análisis de 11 estudios y se cuantificó de manera porcentual el solvente más utilizado en cada uno de ellos. Adicionalmente, se consideró qué extractos eran los menos tóxicos para las larvas y se eligieron dos métodos para su aplicación en el protocolo.

2.7.2. Vías de administración

Se utilizaron 3 criterios de selección con una valoración máxima de 5 puntos y mínima de 0 para cada indicador, haciendo un total de 15.

Invasividad: Referente al daño o estrés que produce esa vía de administración al organismo. No invasivo (5), medianamente invasivo (3), muy invasivo (1).

1) Escala de aplicación: Se hace énfasis en el volumen del extracto que se debe utilizar en cada vía y el costo que implicaría a gran escala. Más difícil (5), medianamente difícil (3), muy difícil (1).

2) Dificultad: Se dividió en 2 subcriterios:

- Preparación del extracto para determinada vía. Menor dificultad (5), dificultad intermedia (3), mayor dificultad (1).
- Manera de administrar el extracto por determinada vía. Menor dificultad (5), dificultad intermedia (3), mayor dificultad (1).

2.7.3. Actividad inmunológica

Se utilizaron 3 criterios de selección con una valoración máxima de 5 puntos y mínima de 0 para cada indicador, haciendo un total de 15.

1) Más utilizado: Método más repetido (5), haciendo una comparación en el Gráfico 2.1 donde se hace un resumen de 6 estudios.

2) Menor dificultad PL15 – PL29: Para extraer la muestra de los organismos (hemolinfa) usando un método adicional al descrito. Si ese método es aplicable para medir determinado parámetro (5) si no es aplicable (0).

3) Menos dificultad > PL30: Para extraer la muestra de los organismos (hemolinfa) usando el método convencional descrito. Si ese método es aplicable para medir determinado parámetro (5) si no es aplicable (0).

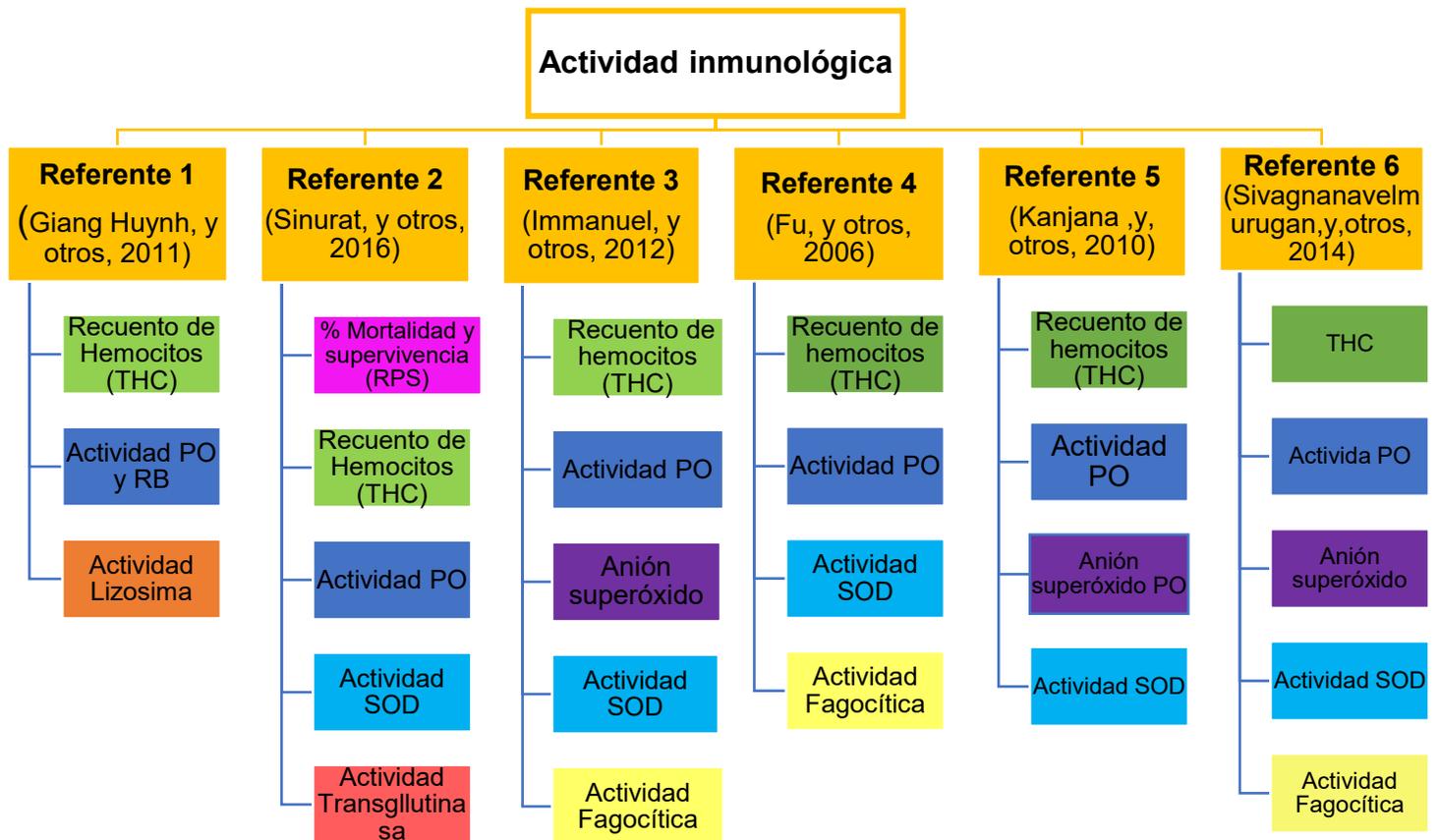


Gráfico 2.1 Síntesis de los métodos para medir la actividad inmunológica en distintos ensayos con macroalgas. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

2.7.4. Evaluación del efecto de los extractos de macroalgas

Se realizó una síntesis de 8 ensayos para conocer la actividad inmunológica potenciada por los extractos. Los ensayos fueron seleccionados en base al interés de la especie, siendo *P. vannamei* parte de nuestro objetivo de estudio, y las especies de macroalgas con las que se han realizado mayor cantidad de investigaciones.

La cuantificación se basó en el número de veces en que cada parámetro de la actividad inmunológica fue eficiente en cada ensayo.

Tabla 2.2 Síntesis del efecto producido por diferentes especies de macroalgas en varias especies de camarón y ante diversos patógenos. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021.

| Extracto (Macroalga) | Camarón - Fase de crecimiento | Patógeno | Actividad Inmunológica | Referencia |
|---|--------------------------------------|---|---|--|
| <i>Polvo y extracto de Sargassum hemiphyllum var. chinense</i> | <i>P. Vannamei</i> 10-12 gr | <i>Vibrio alginolyticus</i> y WSSV | Proliferación de Hemocitos, aumenta Actividad PO-RB, SOD y Lizosima | (Giang Huynh, y otros, 2011) |
| <i>Sargassum wightii (Fucoïdan)</i> | <i>P. Monoddon</i> 6-9 gr | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Proliferación de hemocitos, aumenta actividad de PO explosión respiratoria, SOD, actividad fagocítica. | (Sivagnanavelmurugan, y otros, 2014) |
| <i>Fucoïdants derivados de Algas Pardas (diferentes pesos moleculares y puresa)</i> | <i>P. Vannamei</i> PL 30 | WSSV | El nivel transcripcional del gen PO mejorar el sistema de defensa del camarón. | (Sinurat, Saepudin, peranginangin, & Hudiyono, 2016) |
| <i>Extracto de agua caliente de Gracilaria tenuistipitata</i> | <i>P. Vannamei</i> 8 – 12 gr | <i>Vibrio alginolyticus</i> | Proliferación de hemocitos, aumenta la actividad de PO, Explosión respiratoria, actividad fagocítica, SOD y fácil eliminación | (Wen-Ying & Jiann-Chu, 2004) |
| <i>Extracto de agua caliente de Gelidium amansii</i> | <i>P. Vannamei</i> 8-13 gr | <i>Vibrio alginolyticus</i> | Proliferación de hemocitos, aumenta la actividad de PO, SOD explosión respiratoria y la resistencia. | (Fu, Hou, Yeh, Li, & Chen, 2006) |
| <i>Extracto de Gracilaria fisheri</i> | <i>P. Monoddon</i> 10-15 gr | <i>Vibrio Harveyi</i> | Proliferación de hemocitos, aumenta la actividad de PO, SOD y explosión respiratoria. | (Kanjana, y otros, 2011) |
| <i>Sargassum wightii (Fucoïdan)</i> | <i>P. Monoddon</i> PL 30 | WSSV | Proliferación de hemocitos, aumenta actividad de PO explosión respiratoria, SOD, actividad fagocítica. | (Immanuel, y otros, 2012) |
| <i>Extracto de Caulerpa sertularoides y Ulva Latuca</i> | <i>P. Vannamei</i> 0.75 gr | <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Proliferación de hemocitos, aumenta actividad de PO explosión respiratoria, SOD y alta eficacia en actividad fagocítica | (Ésquer-Miranda, y otros, 2016) |

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Basados en los métodos revisados en el capítulo 2 y según los criterios seleccionados para su evaluación, selección y aplicación se ha propuesto un protocolo de inclusión de extractos de macroalgas en el cultivo de camarón blanco del pacífico *Penaeus vanammei*, siguiendo el orden propuesto en el Gráfico 3.1.

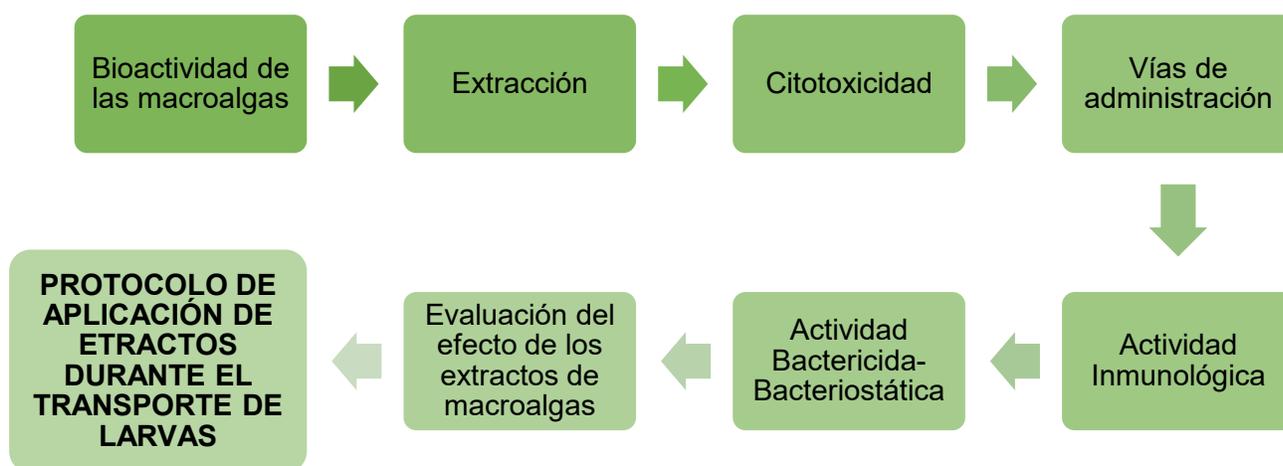


Gráfico 3.1 Proceso desarrollado para la elaboración del protocolo. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

3.1. Bioactividad de las macroalgas

De acuerdo con (Esquer-Miranda, y otros, 2016) es posible la obtención a partir de las macroalgas marinas de diversos compuestos bioactivos como antioxidantes, fucoidanos, fenoles y auxinas de gran interés debido a sus propiedades antimicrobianas y terapéuticas. Thanigaivel, y otros en el 2014, estudiaron el efecto de una macroalga verde (*Chetomorpha antennina*) considerada como una fuente potencial de antioxidantes naturales, encontraron que concentraciones de 50 mg/ml tienen una acción estimulante que promueve la resistencia en camarones desafiados con *Vibrio parahaemolyticus*. Otros compuestos como

los fucoidans de las macroalgas *Sargassum wightii* y *Sargassum duplicatum* suministrados en concentraciones bajas (0,1-0,3% de la biomasa seca del alimento) mostraron una eficacia en la estimulación del sistema inmune de camarones, así como un aumento en la resistencia antibacteriana al ser desafiados con *Vibrio parahaemolyticus*, consiguiendo una correlación positiva con la concentración de fucoidans dentro del alimento (Sivagnanavelmurugan, y otros, 2015). Otros ensayos han mostrado la efectividad de enriquecer nauplios de artemia con fucoidans evidenciando ventajas al promover un aumento en el peso de los camarones, incluso en concentraciones bajas (100 mg/l).

Los fenoles además de cumplir roles biológicos fundamentales se encuentran en concentraciones altas dentro de las macroalgas (Thanigaivel, y otros en el 2014), especialmente altos en algas rojas. Por otra parte, las auxinas son un grupo de hormonas presentes en plantas entre ellas las macroalgas, donde el indol representa cerca del 80% de ellas. Se ha demostrado que es una molécula de señalización entre especies y entre reinos, jugando un papel importante en la patogénesis bacteriana y la inmunidad eucariota (Lee, Wood, & Lee, 2015). Además, el indol y sus derivados se consideran compuestos inhibidores del Quórum Sensing y la producción de factores de virulencia contra patógenos resistentes a los antibióticos (Defoirdt, y otros, 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que en *Vibrio harveyi* y *Vibrio campelli* el indol proveniente de macroalgas puede inhibir significativamente la motilidad, formación de biopelículas, exopolisacáridos y bioluminiscencia en concentraciones de 50, 100 y 200 μ M (Yang, y otros, 2017).

La bioactividad de los extractos de macroalgas puede ser la suma de los efectos relacionados a la supervivencia y crecimiento de organismos de cultivo (Schleder D. D., y otros, 2017). En las diversas investigaciones realizadas se ha comprobado su eficacia puesto que gran parte de estos compuestos pueden ser utilizados para mejorar la calidad del alimento y actuar como agentes potenciadores de la actividad antimicrobiana y el sistema inmune.

3.2. Citotoxicidad

De acuerdo con (Genovese, y otros, 2012; Marino, y otros, 2016) existe un porcentaje de viabilidad celular muy alto (entre el 92 al 100%), esto indica que el alga *Asparagopsis*

taxiformis no causa toxicidad en sus diferentes concentraciones a lo largo de todo el tiempo de exposición.

Para las algas rojas, la toxicidad se mide en rangos de LC₅₀, donde se reportan valores de 0-80 µg/ml, 80-250 µg/ml y 250 µg/ml considerados altamente, moderadamente y débilmente tóxico. El extracto de *Gracilaria fisheri* tiene un LC₅₀ a concentración de 4,3 mg/ml, considerado no tóxico en el experimento realizado por (Kanjana, y otros, 2011), donde se demostró que alimentando postlarvas (PL15) con artemia enriquecida e inyectando directamente a juveniles de *P. monodon* no produce ningún efecto negativo; sin embargo, el extracto de *Hypnea flagelliformis* y *Gracilaria salicornia* resultaron tóxicas por tener un LC₅₀ de 3 y 4 µg/ml respectivamente (Saeidnia, y otros, 2009), por lo que la toxicidad depende de la especie y el método de extracción que se utilice (Kanjana, y otros, 2011; Mian, y otros, 2003).

En cuanto a las algas pardas, se ha reportado que estas son más tóxicas en comparación con las algas rojas, puesto que a concentraciones de 500 µg/ml causan mortalidad completa (Yuvaraj & Arul, 2014); *Dictyopteryis australis*, *Sargassum marginatum*, *Spatoglossum variable* y *Spatoglossum aspermum* a 100 µg/ml son altamente citotóxicas después de 18 horas de exposición (Vinayak, Sabu, & Chatterji, 2011).

3.3. Extracción

1.5. 3.2.1 Solventes más utilizados

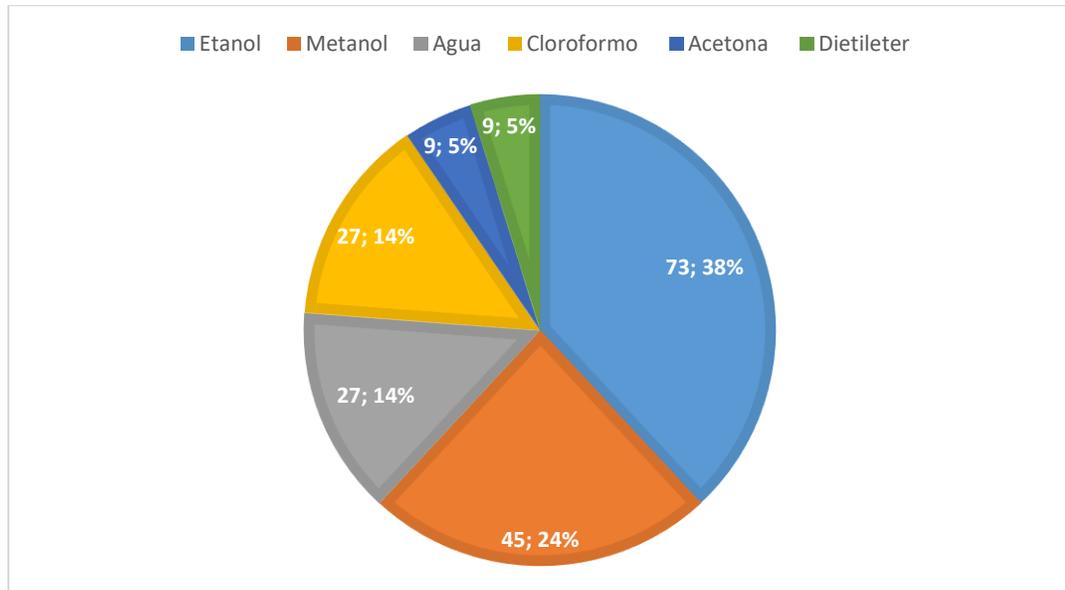


Gráfico 3.2 Representación porcentual de los solventes más utilizados para la extracción. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

De 11 estudios analizados se obtuvo que el solvente de mayor recurrencia fue el etanol seguido del metanol, siendo el agua y el cloroformo iguales (27,14%), finalmente los menos utilizados son la acetona y el dietiléter (9,5%).

A pesar de que el etanol y metanol fueron los solventes más utilizados en los ensayos, los métodos que más se recomiendan según la bibliografía son etanol y agua, considerados como los de menor toxicidad (Fu, Hou, Yeh, Li, & Chen, 2007). Por esta razón el método de extracción para el protocolo va dirigido hacia las dos alternativas mencionadas y está relacionado con los propuestos por (Wen-Ying & Jiann-Chu, 2005; Kanjana, y otros, 2011).

3.4. Vías de administración

Tabla 3.1 Factibilidad de la vía de administración. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

| Vía de Administración | Indicador | | | | | | |
|-----------------------|-------------|--------------------------------------|-----------------------|------------|------------|-----------|-----|
| | Invasividad | Escala de aplicación (Volumen-Costo) | Dificultad (Promedio) | | Valoración | Resultado | (%) |
| | | | Preparación | Aplicación | | | |
| Inmersión | 5 | 3 | 5 | 5 | 13/15 | 0,86 | 86% |

| | | | | | | | |
|------------------|---|---|---|---|-------|------|-----|
| <i>Inyección</i> | 1 | 3 | 3 | 1 | 6/15 | 0,40 | 40% |
| <i>Dieta</i> | 5 | 5 | 1 | 5 | 13/15 | 0,86 | 86% |

Valoración de 1-5 viene descrito de la siguiente manera, **Invasividad:** No invasivo (5), medianamente invasivo (3), muy invasivo (1). **Escala de aplicación:** Más difícil (5), medianamente difícil (3), muy difícil (1). **Dificultad:** a) Preparación del extracto para determinada vía: Menor dificultad (5), dificultad intermedia (3), mayor dificultad (1); b) Manera de administrar el extracto por determinada vía. Menor dificultad (5), dificultad intermedia (3), mayor dificultad (1).

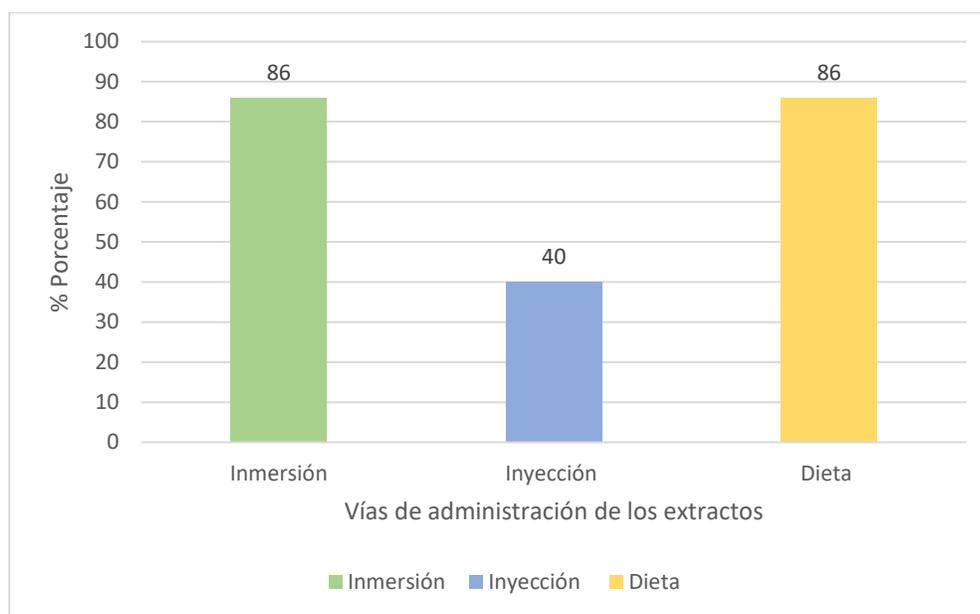


Gráfico 3.3 Representación porcentual de la vía de administración más utilizados para los extractos. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

Las vías de administración de los extractos mejor valoradas son la inmersión y dieta por encima de la inyección según los criterios establecidos. Se puede observar que la dieta e inmersión alcanzaron la misma valoración de acuerdo a los criterios de selección (86%), sin embargo, haciendo referencia a la etapa a la que va dirigido el protocolo (transporte y aclimatación), la inmersión de los organismos resulta la más favorable, ya que en líneas generales son expuestos a concentraciones de 0,1 %-0,5% del volumen total del agua de mar, lo que equivaldría a 100-500 mg/L a diferencia de la inyección (500 -20 000 mg/L) y la dieta (500 – 2000 mg/kg) donde se utilizan concentraciones más altas (Fu, y otros, 2007; Kanjana, y otros, 2011; Wen-Ying & Jiann-Chu, 2005).

Entre los resultados encontrados podemos observar que existen 2 maneras de inmersión: 1) Exposición por tiempo definido, previo al periodo de transporte y aclimatación de entre 0,5 y 5 horas (Fu, y otros, 2007; Giang Huynh, y otros, 2011) y 2) Exposición prolongada durante

el transporte. Es importante denotar que las concentraciones más altas de extractos observadas (0,3-0,5%) reportan mayor actividad inmunológica y supervivencia en los organismos después de ser sometidos a estrés o desafiados con bacterias patógenas (Giang Huynh, y otros, 2011; Immanuel, y otros, 2012).



Ilustración 3.1 Método de administración del extracto escogido para el protocolo. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

3.5. Actividad Inmunológica

Tabla 3.2 Factibilidad del método para evaluación de la Actividad Inmunológica. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

| <i>Actividad inmunológica</i> | Indicador | | | Valoración | Resultado | Porcentaje (%) |
|--------------------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------|------------|-----------|----------------|
| | Más utilizadas | Menor dificultad PL 15 – PL 29 | Menor Dificultad > PL30 | | | |
| <i>THC</i> | 5 | 0 | 5 | 10/15 | 0,66 | 66% |
| <i>Actividad PO Anión superóxido</i> | 5 | 0 | 5 | 10/15 | 0,66 | 66% |
| <i>Actividad SOD</i> | 3 | 5 | 5 | 13/15 | 0,86 | 86% |
| <i>Actividad Lizosima</i> | 4 | 0 | 5 | 9/15 | 0,60 | 60% |
| <i>Actividad Fagocítica</i> | 1 | 5 | 5 | 11/15 | 0,73 | 73% |
| | 3 | 0 | 5 | 8/15 | 0,53 | 53% |

Valoración de 1-5 viene descrito de la siguiente manera, **Más utilizado:** Método más repetido (5). **Menor dificultad PL15 – PL29:** Para extraer hemolinfa de los organismos usando un método adicional al descrito, si el método es aplicable (5) si no es aplicable (0). **Menor dificultad > PL30:** Para extraer hemolinfa de los organismos usando un método descrito, si el método es aplicable (5) si no es aplicable (0).

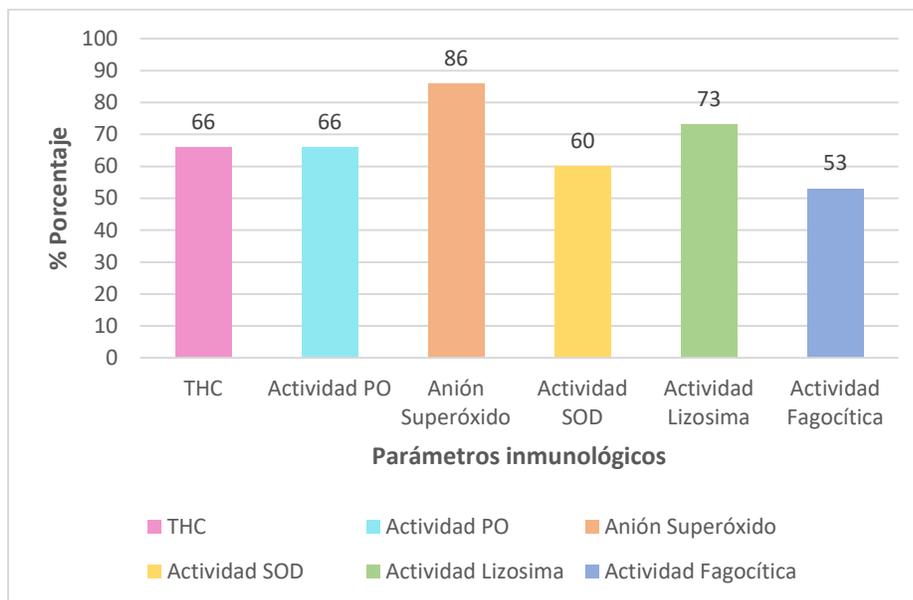


Gráfico 3.4 Representación porcentual de la factibilidad del método para evaluación de la Actividad Inmunológica. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

La actividad SOD y lisozima son los métodos que alcanzaron mayor porcentaje de valoración (86% y 73% respectivamente), debido a que ambos pueden realizarse tanto en postlarvas (a partir de PL15) como en juveniles y adultos, (Huang, Zhou, & Zhang, 2006) mencionan que sus métodos no dependen del uso de la hemolinfa para analizar estos parámetros inmunológicos. Por otro lado, la valoración de la actividad PO, THC, SOD y Anión superóxido reflejan un menor porcentaje, debido a que estas técnicas involucran la extracción de hemolinfa que es imposible obtener del celoma de postlarvas menores a PL 30, pero sí resultan viables para etapas posteriores.

3.6. Actividad Bactericida - Bacteriostática

Los extractos de macroalgas son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias, en este caso diferentes especies de *Vibrio* sp. (Yeh, Lee, & Chen, 2006; Manilal, Selvin, & George, 2012; Thanigaivel, y otros, 2014). Muchas de las especies de macroalgas marinas analizadas en diferentes condiciones vs. diferentes bacterias patógenas, mostraron respuesta en la inhibición de su crecimiento, aumentando la supervivencia en los camarones desafiados, como se puede demostrar en la Tabla 3.3.

Por ejemplo, la inmersión en el extracto de *C. sertularioides* a concentración de 300 mg/L probada por (Esquer-Miranda, y otros, 2016) demostró que los camarones desafiados con

V. parahaemolyticus, tuvieron una disminución significativa en su mortalidad (20-25%) mientras que aquellos camarones infectados y sin tratar con el extracto presentaron un 100% de mortalidad después de 12 horas de infección; asimismo, el extracto de *Sargassum duplicatum* en concentración de 300 y 500 mg/L mostró una disminución en la mortalidad del 20-30% después de haber sido desafiados con *V. alginolyticus* (Yeh, Lee, & Chen, 2006).

Concentraciones altas de pienso complementado con extracto de *Asparagopsis* sp. (850 y 1150 mg/Kg) lograron inhibir significativamente a *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, mostrando una mortalidad menor al 20% (infección leve), a diferencia de *V. harveyi* que causó una mortalidad de 31% tras la infección a las 12 horas; todos los tratamientos control (sin extractos), reportaron entre 60-100% de mortalidad (Yeh, Lee, & Chen, 2006). De igual manera, las macroalgas *Ulva fasciata*, *Corallina elongata* y *Sargassum vulgare* tuvieron efectos inhibidores fuertes contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, con zonas de inhibición de 24.66, 19.86 y 15.66 mm respectivamente (Osman, Abushady, & Elshobary, 2010).

Tabla 3.3 Recopilación de estudios donde se demuestra la actividad antimicrobiana de los extractos de macroalgas. Elaborado por: Aguilar, A. B., 2021

| Extracto (Macroalga) | Patógeno | Actividad Bactericida | Referencia |
|--|---|---|---|
| <i>Caulerpa sertularioides</i> y <i>Ulva lactuca</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> | - Reduce la mortalidad de <i>P. vannamei</i> . - Protege contra la vibriosis. | (Esquer-Miranda, y otros, 2016) |
| <i>Gracilaria fisheri</i> | <i>Vibrio harveyi</i> | Potencia la actividad antibacteriana. | (Kanjana, y otros, 2011) |
| <i>Laurencia brandenii</i> | - Gram-positivas: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> . - Gram-negativas: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i> | - Mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas que contra bacterias Gram-negativas. - Potencia la actividad bactericida contra <i>Vibrio</i> . | (Manilal, y otros, 2011) |
| <i>Sargassum duplicatum</i> | <i>Vibrio alginolyticus</i> | Aumenta la resistencia contra infecciones bacterianas y vibriosis. | (Yeh, Lee, & Chen, 2006) |
| <i>Halimeda opuntia</i> y <i>Sarconema filiforme</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> | Exhiben propiedades antibacterianas. | (Selim, 2012) |
| <i>Asparagopsis sp.</i> | <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Reduce la prevalencia de infecciones contra <i>Vibrio</i> . | (Manilal, Selvin, & George, 2012) |
| <i>Gelidium amansii</i> | <i>Vibrio alginolyticus</i> | Presentan resistencia contra infección por patógenos. | (Fu, Hou, Yeh, Li, & Chen, 2007) |
| <i>Sargassum sp.</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Escherichia coli</i> . | Potencia la actividad antimicrobiana contra bacterias gramnegativas y grampositivas. | (Patra, Rath, & Jena, 2008) |
| <i>Sargassum oligocystum</i> | <i>Vibrio alginolyticus</i> | Potencia la Inmunidad innata contra patógenos oportunistas. | (Baleta, y otros, 2013) |
| <i>Asparagopsis taxiformis</i> | <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> y <i>Aeromonas salmonicida</i> | Potencia la actividad antibacteriana. | (Marino, y otros, 2016) |
| <i>Chaetomorpha antennina</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Presenta buena actividad antibacteriana. | (Thanigaivel, Vijayakumar, Mukherjee, Chandrasekaran, & Thomas, 2014) |

3.7. Evaluación del efecto de los extractos de macroalgas

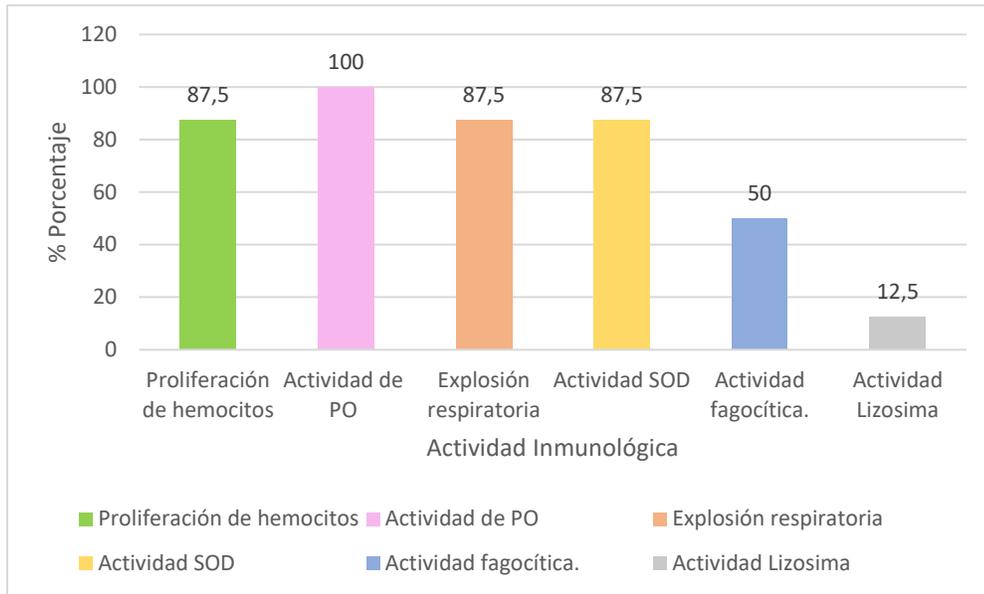


Gráfico 3.5 Resultados de la actividad inmunológica. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021

El hecho de que la actividad fagocítica (50%) y lizosima (12%) presentan la valoración más baja (con respecto al criterio del método de mayor uso), no quiere decir que el extracto no tuvo efecto en esos dos parámetros, simplemente que fueron evaluados en un número limitado de artículos, sin embargo, se comprobó en todos los ensayos de la Tabla 2.1 que se potenciaban dicha actividad. Con respecto a la actividad PO, SOD, explosión respiratoria y proliferación de hemocitos, los extractos de macroalgas evaluados en diversos estudios tienen una respuesta positiva en el organismo de los camarones.

3.8. Diseño y contenido del protocolo

El diseño del protocolo se realizó a partir de la revisión bibliográfica, de manera que los criterios condicionaron la selección de los métodos más recomendables, basados en los mejores resultados obtenidos en los estudios.

Su estructura consta de 6 secciones, donde se explica a detalle las técnicas para la obtención de los compuestos bioactivos, evaluación de la citotoxicidad, extracción y la vía de administración por inmersión. Adicionalmente se resumen las pruebas para medir la actividad biológica (inmunológica, antimicrobiana) de los extractos una vez realizada la aplicación.

Gráfico 3.6 Estructura del contenido del protocolo. Elaborado por: Aguilar, M. P., 2021



Como anexo del protocolo contamos con una lista de algas con alto potencial biotecnológico entre las que destacan *Asparagopsis* sp., *Codium* sp, *Hynea* sp. y *Padina* sp., cuyo estudio es llevado a cabo por el proyecto Seaweed-based Innovations for a RESilient Aquaculture and Agriculture (SIRENA) financiado por VLIR-USO y llevado a cabo por la Universidad de Gante (Bélgica) y ESPOL. Además, una lista de especies de *Vibrios* identificados como patógenos de importancia para la acuicultura, misma que fue otorgada por CENAIM-ESPOL.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se obtuvo el prototipo de un protocolo de inclusión de extractos de macroalgas que va dirigido a optimizar la tecnología existente en la producción de camarón blanco del Pacífico *P. vannamei*, mejorando la supervivencia de postlarvas para ser usado durante el transporte. Es importante destacar que este prototipo va dirigido hacia un proceso industrial de producción de postlarvas de camarón, que para Ecuador representa un volumen de 6000 millones de PL al mes, por lo que es necesario garantizar su estado y calidad al momento de llegar a las camaroneras, tomando en cuenta que en estudios previos camaroneros han evidenciado mortalidades (1-20%) en sus granjas en un estudio realizado por Aguirre Vinza & López Loaiza, 2020. Sin embargo, la estructura del protocolo al estar basada en fuentes bibliográficas debe ser probado *in vivo* durante el transporte para lograr medir el alcance real de los métodos propuestos.
- Gracias a la descripción de los métodos utilizados, en la medición del rango de actividad biológica de los extractos, se logró seleccionar aquellos más convenientes para las diferentes etapas de crecimiento del camarón, cuyo procedimiento facilita la obtención de resultados donde se compruebe su efectividad.
- El ensayo de citotoxicidad por artemia se ha propuesto por ser un método fácil, rápido y de bajo costo, por medio de este se puede conocer que los extractos en dosis muy altas no sólo son tóxicos para las larvas, sino que también se usan como un monitor para detectar componentes bioactivos/naturales que favorecen la actividad inmunológica y antimicrobiana. Es por esto que se considera a las macroalgas como la nueva alternativa que beneficiará la producción acuícola, cuyo éxito debe ser comprobado en más experimentaciones *in vivo*.
- Los métodos de extracción seleccionados para el protocolo, se basaron en el uso de solventes orgánicos como el etanol y agua caliente, porque sus bajos niveles de

toxicidad no repercuten perjudicialmente en el organismo, además se considera que el costo al emplear otros compuestos como la acetona, eter-dietílico, metanol o cloroformo resulta elevado. En cuanto a las vías de administración la inmersión necesita un gran volumen para ser disuelto en el agua que contenga las larvas de camarón al momento del envío, no obstante; la concentración del extracto es mucho menor al de las otras vías, su preparación no conlleva un proceso de molienda en comparación a la dieta (resultando más simple), adicionalmente es el método menos invasivo.

- La mayoría de parámetros evaluados en los estudios tuvieron efectos significativos en cuanto a la actividad inmunológica y bacteriostática, sin embargo; se determinó que los resultados dependían de la especie utilizada, los compuestos bioactivos y la concentración del extracto.
- Finalmente podemos decir que nuestro protocolo impulsa las prácticas sustentables al ser amigable con el medio ambiente puesto que los extractos de macroalgas son una alternativa natural como quimio tratamiento para las infecciones bacterianas en granjas de acuicultura, gracias a sus compuestos bioactivos.

4.2. Recomendaciones

- Gracias a la disponibilidad de artemia en los laboratorios se recomienda llevar a cabo el ensayo de citotóxicas con estos organismos, debido a que su enriquecimiento con el extracto facilita la evaluación de su efectividad, además de no involucrar directamente a las larvas en caso de que los resultados no fueran favorables.
- El protocolo puede ser utilizado tanto por el comprador para exigir una mejora en las condiciones del organismo cuando llegan a la camaronera, o por el vendedor como parte del protocolo para mejorar la calidad de las larvas cuando salen del laboratorio.
- Es importante contar con buenas condiciones para el almacenamiento y extracción ya que de eso va a depender la calidad de los extractos, otro parámetro importante que se debe considerar es el secado correcto de las macroalgas, sin embargo, los pretratamientos deben definirse según la especie y temporada de recolección.
- Consideramos que la mejor manera de realizar la aplicación es darles una ducha a las larvas antes del envío, ya que la segunda opción de enviarlas con el extracto en

el agua depende del tiempo de exposición al agente estimulante, debido a que el desgaste fisiológico que las larvas pueden llegar experimentar podría tener repercusiones en su crecimiento, a pesar de ser más resistentes a la enfermedad. Esta teoría debe ser comprobada con estudios más profundos para conocer realmente la manera en que actúan los extractos en ensayos *in vivo* durante el transporte.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuerdo Ministerial No. 106. (27 de septiembre de 2002). Subsecretaria de Recursos Pesqueros. Guayaquil, Guayas.
- Aguirre Vinza, G. E., & López Loaiza, P. N. (Septiembre de 2020). Proyecto Integrador. *Elaboración de una guía de transporte para postlarvas de Penaeus vannamei*. Guayaquil, Ecuador.
- Allsopp, M., Johnston, P., & Santillo, D. (2008). La industria acuícola y de engorde: Un reto de sostenibilidad. *Greenpeace Intenacional. Amsterdam, The Netherlands, 24-25*.
- Anderson, J. L., Valderrama, D., & Jory, D. E. (5 de noviembre de 2018). Revisión y pronóstico de la producción mundial de camarón: crecimiento constante por delante. *Global Aquaculture Alliance*. Obtenido de <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/revision-y-pronostico-de-la-produccion-mundial-de-camaron-crecimiento-constante-por-delante/>
- Ayaz, M., Junaid, M., Ullah, F., Sadiq, A., Subhan, F., Khan, M. A., . . . Ahmad, S. (2016). Molecularly characterized solvent extracts and saponins from Polygonum hydropiper L. show high anti-angiogenic, anti-tumor, brine shrimp, and fibroblast NIH/3T3 cell line cytotoxicity. *Frontiers in pharmacology, 7, 74*.
- Azañero Díaz, C. A., & Jara Campos, C. A. (2014). Efecto de la infección de Aeromonas salmonicida sobre la actividad de fenoloxidasa en hembras adultas de Cryphiops caementarius. *Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA, 10(2), 49-60*.
- Balaraman, D., & Subramanian, V. (2017). Immunity Enhancement through Seaweed Extracts in Fish. *Annual Aquaculture Research 4(2), 1035*.
- Balbi, F., Rosas, J., Velásquez, A., Cabrera, T., & Maneiro, C. (2005). Aclimatación de postlarvas de diferentes edades y criaderos del camarón marino Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) a baja salinidad. *Revista de biología marina y oceanografía, 40(2), 109-115*.
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Moreira, K. L., da Rocha, M. I., da Veiga, M. L., & Baldisserotto, B. (2017). Melaleuca alternifolia essential oil prevents oxidative stress and ameliorates the antioxidant system in the liver of silver catfish (Rhamdia quelen) naturally infected with Ichthyophthirius multifiliis. *Aquaculture, 480, 11-16*.
- Baleta, F. N., Lin, Y. C., Chen, Y. Y., Chen, J. C., Yeh, S. T., Putra, D. F., & Huang, C. L. (2013). Efficacy of Sargassum oligocystum extract on the innate immunity of white shrimp Litopenaeus vannamei and its resistance against Vibrio alginolyticus. *J Fish Soc Taiwan, 40(4), 241-256*.

- Barbas, L. A., Maltez, L. C., Stringhetta, G. R., de Oliveira Garcia, L., Monserrat, J. M., da Silva, D. T., . . . Sampaio, L. A. (2017). Properties of two plant extractives as anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, *469*, 79-87.
- Baruah, K., Duy Phong, H. P., Norouzitallab, P., Defoirdt, T., & Bossier, P. (2015). The gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*) model system reveals that the phenolic compound pyrogallol protects against infection through its prooxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, *89*, 593-601.
- Bjerregaard, R., Valderrama, D., Radulovich, R., Diana, J., Capron, M., Mckinnie, C., . . . Forster, J. (01 de Julio de 2016). *Seaweed aquaculture for food security, income generation and environmental health in Tropical Developing Countries (English)*. Washington, D.C. : World Bank Group. Obtenido de <http://documents.worldbank.org/curated/en/947831469090666344/Seaweed-aquaculture-for-food-security-income-generation-and-environmental-health-in-Tropical-Developing-Countries>
- Caldwell, G. S., Bentley, M. G., & Olive, P. J. (2003). The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*, *42(3)*, 301-306.
- Campa-Córdova, A., Hernández-Saavedra, N., Aguirre- Guzmán, G., & Ascencio, F. (Junio de 2005). Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants. *Ciencias Marinas*, *31(4)*, 661-669. Obtenido de Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants.
- Cárcamo-Aréchiga, N., Grijalva-Chon, J. M., Hernández-López, J., Varela-Romero, A., López-Torres, M. A., & Medina-Juárez, L. Á. (2016). MECANISMOS DE DEFENSA DE LOS CAMARONES PENEIDOS DURANTE UN PROCESO INFECTIVO: UNA REVISIÓN/DEFENSE MECHANISMS OF PENAEID SHRIMP DURING THE INFECTIVE PROCESS: A REVIEW. *Biotecnia*, *18(1)*, 32-42.
- Cruz-Suárez, L. E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M. G., & Ricque-Marie, D. (2008). A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. *Avances en Nutrición Acuicola*, 304–333.
- Cuéllar-Anjel, J., Lara, C., Morales, V., De Gracia, A., & García Suárez, O. (2010). *Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco Penaeus vannamei*. Panamá: OIRSA.
- da Cunha, M. A., de Barros, F. M., de Oliveira Garcia, L., Lima Veeck, A. P., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., . . . Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, *306(1-4)*, 403-406.

- Dailianis, S., & Kaloyianni, M. (2004). Cadmium induces both pyruvate kinase and Na⁺/H⁺ exchanger activity through protein kinase C mediated signal transduction, in isolated digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Journal of experimental biology*, 207(10), 1665-1674.
- Dashtiannasb, A., & Yeganeh, V. (2016). The effect of ethanol extract of a macroalgae *Laurencia snyderia* on growth parameters and vibriosis resistance in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 16(1), 210-221.
- De Lorenzo, M., Quadros Seiffert, W., & Viera, F. (21 de Noviembre de 2016). *Global Aquaculture*. Obtenido de Probando un sistema intensivo de criadero de camarones con tecnología biofloc: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/probando-un-sistema-intensivo-de-criadero-de-camarones-con-tecnologia-biofloc/#:~:text=La%20etapa%20de%20criadero%20es, donde%20se%20requiere%20atenci%C3%B3n%20constante.&text=Estas%20microalgas%20no%20s%C3%B3> lo
- Defoirdt, T., Benneche, T., Brackman, G., Coenye, T., Sorgeloos, P., & Scheie, A. A. (2012). A quorum sensing-disrupting brominated thiophenone with a promising therapeutic potential to treat luminescent vibriosis. *PloS one*, 7(7), e41788.
- Dische, Z., & Shettles, L. B. (1948). A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *Journal of Biological Chemistry*, 175(2), 595-603.
- Domínguez-Borbor, C., Chalén-Alvarado, B., & Rodríguez, J. A. (2018). A simple in vitro method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture. *MethodsX*, 5, 90-95.
- Echavarría, B., Franco, A., & Martínez, A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae*, 16(1), 126-131.
- El Comercio. (8 de enero de 2020). *El camarón alcanzó cifra récord en el 2019 en el Ecuador*. Obtenido de <https://www.elcomercio.com/actualidad/camaron-record-ecuador-exportacion-economia.html>
- El Shafay, S. M., Ali, S. S., & El-Sheekh, M. M. (2016). Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(1), 65-74.
- El Universo. (19 de octubre de 2002). Prohibida la captura de larvas de camarón. *El Universo*.
- El Wahidi, M., El Amraoui, B., El Amraoui, M., & Bamhaoud, T. (2015). Screening of antimicrobial activity of macroalgae extracts from the Moroccan Atlantic coast. *In Annales Pharmaceutiques Françaises, Vol. 73, No. 3*, 190-196.

- El-Din, S. M., & El-Ahwany, A. M. (2016). Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 471-484.
- Espinoza P., A., Santiago H., M., & Bermúdez A., M. (Septiembre de 2009). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Obtenido de Uso de antibióticos en la camaronicultura: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57912963005.pdf>
- Esquer-Miranda, E., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, M. E., Anselmo, M.-B., & Piña-Valdez, P. (2016). Effects of methanolic macroalgae extracts from *Caulerpa sertularioides* and *Ulva lactuca* on *Litopenaeus vannamei* survival in the presence of *Vibrio* bacteria. *Fish & shellfish immunology*, 51, 346-350.
- FAO. (27 de Junio de 2013). *Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304)*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/i3422e/i3422e00.htm>
- FAO. (2016). *THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>
- FAO. (24 de Noviembre de 2017). *El Uso de Antimicrobianos en la Acuicultura en América Latina: Desafíos y Perspectivas Futuras*. Obtenido de Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe: <http://www.fao.org/americas/eventos/ver/es/c/1032720/>
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Roma.
- FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma.
- Farvin, K. S., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food chemistry*, 138(2-3), 1670-1681.
- Félix, R., Félix, C., Januário, A. P., Carmona, A. M., Baptista, T., Gonçalves, R. A., . . . Lemos, M. F. (2020). Tailoring shrimp aquafeed to tackle Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease by inclusion of industry-friendly seaweed extracts. *aquaculture*, 529, 735661.
- Ferdouse, F., Holdt, S. L., Smith, R., Murúa, P., & Yang, Z. (2018). The global status of seaweed production, trade and utilization. *Globefish Research Programme*, 124, 1.
- Fu, Y. W., Hou, W. Y., Yeh, S. T., Li, C. H., & Chen, J. C. (Agosto de 2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 22(6), 673-685.

- García Molina, J. A., Hernández Martínez, J. J., & Meza Montenegro, A. I. (2020). *Determinación de sobrevivencia de Post-larvas Litopenaeus vannamei la comparativa de los métodos de aclimatación: Por flujo continuo mínimo con intervalos de tiempo y flujo continuo mínimo, agosto 2019 (Doctoral dissertation)*. Las Peñitas, León, Nicaragua.
- Genovese, G., Faggio, C., Gugliandolo, C., Torre, A., Spanò, A., Morabito, M., & Maugeri, T. L. (2012). In vitro evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. *Marine environmental research*, *73*, 1-6.
- Giang Huynh, T., Tuen Yeha, S., Chin Lin, Y., Feng Shyu, J., Li Chen, L., & Chu Chen, J. (2011). White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, *31*(2), 286-293.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, *61*(2), 793-796.
- GLOBEFISH. (23 de octubre de 2019). Información y Análisis sobre el Comercio Mundial de Pescado. *Se estima que 3 millones de toneladas de camarón entraron en el comercio internacional en 2018*. FAO.
- Huang, X., Zhou, H., & Zhang, H. (2006). The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & shellfish immunology*, *20*(5), 750-757.
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnan, S., & Palavesama, A. (Enero de 2012). The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish & shellfish immunology*, *32*(4), 551-564.
- Jaime Ceballos, B., Galindo López, J., Laria Lamela, E., Cupul Magaña, F., & Vega Villasante, F. (2008). Traslado de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) a diferentes tiempos, salinidades y densidades y su efecto en la supervivencia y algunos marcadores bioquímicos. *Revista de biología marina y oceanografía*, *43*(3), 681-686.
- January, G. G., Naidoo, R. K., Kirby-McCullough, B., & Bauer, R. (2019). Assessing methodologies for fucoidan extraction from South African brown algae. *Algal Research*, *40*, 101517.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Soderhall, K. (9 de Mayo de 2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, *191*(1-3), 45–52.

- Jory, D. E. (2019). ¿Qué tan buenas son sus postlarvas de camarón? *Global Aquaculture Alliance*.
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (Noviembre de 2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 389-396.
- Kinghorn, A. D., & Balandrin, M. F. (1993). Human medicinal agents from plants. *American Chemical Society*.
- König, G. M., & Wright, A. D. (1993). Algal Secondary Metabolites and Their Pharmaceutical Potential, Human Medicinal Agents from Plants. *American Chemical Society*, 276-293.
- Lee, J. H., Wood, T. K., & Lee, J. (2015). Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends in microbiology*, 23(11), 707-718.
- Lewis, J. G., Stanley, N. F., & Guist, G. G. (1988). Commercial production and applications of algal hydrocolloids. En *Algae and human affairs/edited by Carole A. Lembi, J. Robert Waaland*. Phycological Society of America, Inc.
- Lightner, D., Redman, R., Pantoja, C., Noble, B., & Tran, L. (2012). *Early Mortality Syndrome Affects Shrimp In Asia*. Obtenido de Global Aquaculture Alliance: <https://www.aquaculturealliance.org/pdf/GAA-Lightner-Jan12.pdf>
- Lin, Y. C., Tayag, C. M., Huang, C. L., Tsui, W. C., & Chen, J. C. (2010). White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6), 1092-1098.
- Manayi, A., Nabavi, S. M., Daglia, M., & Jafari, S. (2016). Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. *Pharmacological Reports*, 68(4), 671-679.
- Manilal, A., Selvin, J., & George, S. (2012). In vivo therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius. *Saudi journal of biological sciences*, 19(2), 165-175.
- Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Shakir, C., Gandhimathi, R., & Panikkar, M. V. (2009). Biopotentials of seaweeds collected from southwest coast of India. *ournal of Marine Science and Technology*, 17(1), 67-73.
- Manilal, A., Sujith, S., Sabarathnam, B., Kiran, G. S., Selvin, J., Shakir, C., & Lipton, A. P. (2011). Biological activity of the red alga *Laurencia brandenii*. *Acta Botanica Croatica*, 70(1), 81-90.

- Marino, F., Di Caro, G., Gugliandolo, C., Spanò, A., Faggio, C., Genovese, G., . . . Santulli, A. (2016). Preliminary study on the in vitro and in vivo effects of *Asparagopsis taxiformis* bioactive phycoderivates on teleosts. *Frontiers in physiology*, 7, 459.
- Mian, P., Heilmann, J., Bürgi, H. R., & Sticher, O. (2003). Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical biology*, 41(4), 243-247.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (28 de Octubre de 1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, 247(10), 3170-3175.
- Morante Carriel, J., Agnieszka Obrebska, A., Bru-Martínez³, R., Carranza Patiño, M., Pico-Saltos, R., & Nieto Rodriguez, E. (29 de Enero de 2014). *Distribution, location and inhibitors of polyphenol oxidases in fruits and vegetables used as food*. Obtenido de https://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_Doc2.pdf
- Murray, A. P., Rodriguez, S., Frontera, M. A., Tomas, M. A., & Mulet, M. C. (2004). Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(7-8), 477-480.
- Nash, C. E. (2011). The globalization of marine shrimp farming. En *The History of Aquaculture* (pág. 133). Iowa: John Wiley & Sons.
- Neethu, P. V., Suthindhiran, K., & Jayasri, M. A. (2017). Antioxidant and antiproliferative activity of *Asparagopsis taxiformis*. *Pharmacognosy research*, 9(3), 238-246.
- OIE. (23 de Agosto de 2017). *Acute hepatopancreatic necrosis disease, United States of America*. Obtenido de https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=24597
- OMS. (29 de Enero de 2018). *Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>
- Osman, M. E., Abushady, A. M., & Elshobary, M. E. (2010). In vitro screening of antimicrobial activity of extracts of some macroalgae collected from Abu-Qir bay Alexandria, Egypt. *African Journal of Biotechnology*, 9(42), 7203-7208.
- Pagano, M., & Faggio, C. (2015). The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell biochemistry and function*, 33(6), 351-355.
- Parmar, P. V., Yusufzai, S. I., Parmar, H. V., Nanjiyani, R. P., & Chavda, V. M. (2018). Therapeutic potentiality of florfenicol against vibriosis in *Litopenaeus vannamei*. *J. Entomol. Zool. Stud*, 6, 463-467.

- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas Albores, F., LeMoullac, G., & Rosas, C. (2003 de Marzo de 2003). *Haemolymph metabolic variables and immune response in Litopenaeus setiferus adult males: the effect of an extreme temperature*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848602003009>
- Patra, J. K., Rath, S. K., & Jena, K. (2008). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed (*Sargassum* sp.) extract: A study on inhibition of Glutathione-S-Transferase activity. *urkish Journal of Biology*, 32(2), 119-125.
- Peña, N., & Varela Mejias, A. (Noviembre de 2015). *Análisis histopatológico en Litopenaeus vannamei infectado con Vibrio parahaemolyticus*. Obtenido de Agronomía Mesoamericana : https://www.researchgate.net/publication/273503557_Analisis_histopatologico_en_Litopenaeus_vannamei_infectado_con_Vibrio_parahaemolyticus
- Piedrahita, Y. (2018). La industria de cultivo de camarón en. *Global Aquaculture Alliance*.
- Raja, S., Nandhini, E., Sahana, K., & Dhanakkodi, B. (Enero de 2015). *Beneficial and destructive effects of probiotics in aquaculture systems-A review*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/271199184_Beneficial_and_destructive_effects_of_probiotics_in_aquaculture_systems-A_review
- Rerver, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaings, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433, 50-51.
- Restrepo , L., Bayot, B., Betancourt, I., & Pinzón , A. (11 de Agosto de 2016). *Draft genome sequence of pathogenic bacteria Vibrio parahaemolyticus strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America*. Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4992007/>
- Saavedra Olivos, K., Peralta Ortíz, T., Ordinola Zapata, A., Sandoval Ramayoni, J., Vieyra Peña, E., Zapata Cruz, M., . . . Campoverde Peña, S. (3 de Noviembre de 2017). *Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en Litopenaeus vannamei bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador*. Obtenido de Revista de Investigaciones Veterinarias Perú: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000100032
- Saeidnia, S., Gohari, A. R., Shahverdi, A. R., Permeh, P., Nasiri, M., Mollazadeh, K., & Farahani, F. (2009). Biological activity of two red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis* from Persian Gulf. *Pharmacognosy Research*, 1(6), 428.
- Sakthivel, M., Deivasigamani, B., Rajasekar, T., Kumaran, S., & Alagappan, K. (2015). Immunostimulatory Effects of Polysaccharide Compound from Seaweed

- Kappaphycus alvarezii on Asian seabass (*Lates calcarifer*) and its Resistance against *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Marine Biology & Oceanography*, 4:2.
- Santiago, M. L., Espinosa, A., & Bermúdez, M. d. (2009). Uso de antibióticos en la camaricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3), 22-32.
- Schleder, D. D., Da Rosa, J. R., Guimarães, A. M., Ramlov, F., Maraschin, M., Seiffert, W. Q., . . . Andreatta, E. R. (2017). Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *Journal of Applied Phycology*, 29(5), 2471-2477.
- Schleder, D. D., Da Rosa, J. R., Guimarães, A. M., Ramlov, F., Maraschin, M., Seiffert, W. Q., . . . Andreatta, E. R. (2017). Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *Journal of Applied Phycology*, 29(5), 2471-2477.
- Selim, S. A. (2012). Antimicrobial, antiplasmid and cytotoxicity potentials of marine algae *Halimeda opuntia* and *Sarconema filiforme* collected from Red Sea Coast. *World Acad Sci Eng Technol*, 61, 1154-1159.
- Shimma M., E., Samh. S, A., & Mostafa M., E.-S. (15 de Noviembre de 2015). *Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687428515000849>
- Sinurat, E., Saepudin, E., Peranginangin, R., & Hudiyono, S. (Octubre de 2016). Immunostimulatory activity of brown seaweed-derived fucoidans at different molecular weights and purity levels towards white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(10), 82-91.
- Sivagnanavelmurugan, M., Karthik Ramnath, G., Jude Thaddaeus, B., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2015). Effect of *Sargassum wightii* fucoidan on growth and disease resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon* post-larvae. *Aquaculture Nutrition*, 21(6), 960-969.
- Souza, C. d., Baldissera, M. D., Salbego, J., Lopes, J. M., Vaucher, R. d., Mourão, R. H., . . . Baldisserotto, B. (2017). Physiological responses of silver catfish to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology*, 15(1), 1-10.
- Stolen, J., Fletcher, T., Anderson, D., Roberson, B., & Van Muiswinkel, W. (1990). Ellis AE. Lysozyme assay. En *Technique in fish immunology*, Vol 1 (págs. 101-103). Fair Haven (USA): SOS Publications.

- Tanna, B., Choudhary, B., & Mishra, A. (2018). Metabolite profiling, antioxidant, scavenging and anti-proliferative activities of selected tropical green seaweeds reveal the nutraceutical potential of *Caulerpa* spp. *Algal research*, 36, 96-105.
- Tayag, C. M., Lin, Y. C., Li, C. C., Liou, C. H., & Chen, J. C. (2010). Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 28(5-6), 764-773.
- Thanigaivel, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., & Thomas, J. (2016). Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture* 464, 529-536.
- Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., & Thomas, J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of *Chaetomorpha antennina* against shrimp pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 433, 467-475.
- Torres, M. D., Flórez, N., & Domínguez, H. (2019). Integral utilization of red seaweed for bioactive production. *Marine drugs*, 17(6).
- Treece, G. D. (2001). Aclimatación y siembra de postlarva. En M. C. Haws, & C. E. Boyd, *Método para mejorar la camaronicultura en Centroamérica* (pág. 109). UCA.
- Turker, A. U., & Camper, N. D. (2002). Biological activity of common mullein, a medicinal plant. *Journal of ethnopharmacology*, 82(2-3), 117-125.
- Varela Mejias, A., & Varela Moraga, T. (2019). La camaronicultura como fuente sustentable de alimentos de origen animal. Logros, retos y oportunidades. *Ecología y Desarrollo Sostenible*, 1(1).
- Vinayak, R. C., Sabu, A. S., & Chatterji, A. (2011). Bio-prospecting of a few brown seaweeds for their cytotoxic and antioxidant activities. *Evidence-based complementary and alternative medicine*.
- Wen-Ying, H., & Jiann-Chu, C. (2005). The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 127-138.
- Xu, C., Wang, X., Wang, S., Zhao, Q., Zhang, M., Qin, J., & Chen, L. (5 de Marzo de 2018). *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. Obtenido de Gut Microbiota and its Modulation for Healthy Farming of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23308249.2018.1440530?src=recsys>
- Yang, C., Chung, D., & You, S. (2008). Determination of physicochemical properties of sulphated fucans from sporophyll of *Undaria pinnatifida* using light scattering technique. *Food Chemistry*, 111(2), 503-507.

- Yang, Q., Pande, G. S., Wang, Z., Lin, B., Rubin, R. A., Vora, G. J., & Defoirdt, T. (2017). Indole signalling and (micro) algal auxins decrease the virulence of *Vibrio campbellii*, a major pathogen of aquatic organisms. *Environmental microbiology*, *19*(5), 1987-2004.
- Yeh, S. T., Lee, C. S., & Chen, J. C. (2006). Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, *20*(3), 332-345.
- Yuvaraj, N., & Arul, V. (2014). Preliminary screening of anti-biofilm, anti-larval settlement and cytotoxic potential of seaweeds and seagrasses collected from Pondicherry and Rameshwaram coastal line, India. *World J. Fish & Marine Sci*, *6*(2), 169-175.
- Zahl, I. H., Samuelsen, O., & Kiessling, A. (2012). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish physiology and biochemistry*, *38*(1), 201-218.
- Zambrano Mero, R. A., Real Pérez, G. L., Quimis Reyes, J. R., & Hidalgo Ávila, A. A. (2019). Aplicación del enfoque y control de procesos en la reducción de la mortalidad de nauplios y postlarvas de camarón en un laboratorio de producción. *ECA Sinergia*, *10*(2), 129-139.
- Zeppenfeld, C. C., Toni, C., Becker, A. G., dos Santos Miron, D., Parodia, T. V., Heinzmann, B. M., . . . Baldisserotto, B. (2014). Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture*, *418*, 101-107.

APÉNDICES

**Protocolo
de inclusión de extractos de
macroalgas aplicado al transporte
de postlarvas de camarón blanco**

Penaeus - vannamei

Por:

María Patricia Aguilar & Ana Belén Aguilar

Dirigido por:

Msc. Adrián Márquez



Apéndice 1 Portada del protocolo para la inclusión de extractos de macroalgas. Elaborado por: Aguilar, A. B. & Aguilar, M. P., 2021

6. EXTRACCIÓN

Se describen dos métodos de extracción con el uso de dos diferentes solventes considerados como los de menor toxicidad y costo: 1) Agua caliente y 2) Etanol.

Agua caliente (Wen-Ying & Jiann-Chu, 2005).

1

Las frondas de las algas se lavan con agua de mar y secadas a temperatura ambiente, luego son sometidas a un proceso de liofilización y molienda.

2

Se pesan 10 gramos de las algas molidas y se añade 300 ml de agua desionizada, se hierve durante 3 h.

3

La suspensión se filtra a través de una malla de nailon y se concentra a presión reducida, finalmente el extracto de agua caliente se prepara con una solución tampón fosfato (PBS) para hacer 2 y 3 mg /ml.



Etanol (Kanjana, y otros, 2011).

Las macroalgas son lavadas con agua de mar limpia y secadas a temperatura ambiente, luego son pulverizadas y expuestas al solvente de la siguiente manera: para 30 gr de biomasa se utilizan 500 ml de etanol utilizando un equipo Soxhlet durante 24 horas, luego el disolvente se evapora al vacío (rotavapor) a 60 C hasta que se extrae el residuo seco (extracto). Los extractos se almacenaron a 20 °C.

**Apéndice 2 Parte de los métodos usados en el protocolo para el proceso de extracción.
Elaborado por: Aguilar, A. B. & Aguilar, M. P., 2021**

ALGAS EN ECUADOR

A continuación se presentará una lista de algunas especies de macroalgas, cuyo género es el mismo al de las especies utilizadas en estudios previos, mismos que fueron clave para el desarrollo de este protocolo.

| Género | Especies en Ecuador | Especies Estudiadas |
|--------------|--|--|
| Ulva | <i>Ulva dactylifera</i> <i>Ulva latuca</i> <i>Ulva lobata</i> | <i>Ulva latuca</i> |
| Caulerpa | <i>Caulerpa peltata</i> <i>C. racemosa v. occidentalis</i> <i>Caulerpa racemosa v. uvifera</i> <i>Caulerpa vickersiae</i> | <i>Caulerpa sertularoides</i> <i>Caulerpa racemosa v. uvifera</i> |
| Codium | <i>Codium cervicorne</i> <i>Codium dichotomum</i> <i>Codium foveolatum</i> <i>Codium isabellae</i> <i>Codium santamariae</i> | <i>Codium fragile</i> |
| Asparagopsis | <i>Asparagopsis sanfordiana</i> <i>Asparagopsis taxiformis</i> <i>Asparagopsis svedellii</i> | <i>Asparagopsis taxiformis</i> |
| Corallina | <i>Corallina officinalis</i> <i>Corallina pinnatifolia</i> | <i>Corallina mediterranea</i> |



Caulerpa peltata



Codium cervicorne



Corallina officinalis

Apéndice 3 Principales especies de algas presentes en Ecuador que se han usado en estudios previos. Elaborado por: Aguilar, A. B. & Aguilar, M. P., 2021

11. VIBRIOS EN ECUADOR

En Ecuador existen varias especies de vibrios causantes de grandes problemas en la producción de camarón blanco, algunos oportunistas debido a las malas condiciones del medio y otros con un alto grado de virulencia, a continuación mostraremos una lista otorgada por CENAIM, sobre las especies más comunes, de más alta patogenicidad en el cultivo de camarón en Ecuador y los más utilizados con extractos de macroalgas en estudios previos.

| Especies en Ecuador | Especies Estudiadas |
|---|----------------------------|
| <i>V. parahaemolyticus</i> Cepa 1 positiva para AHPND Cepa 2 Patógena | <i>V. parahaemolyticus</i> |
| <i>V. vulnificus</i> | <i>V. cholerae</i> |
| <i>V. harveyi</i> | <i>V. vulnificus</i> |
| <i>V. campbellii</i> | <i>V. harveyi</i> , |
| | <i>V. alginolyticus</i> |

