

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

USO DE EXTRACTOS DE MACROALGAS PARA COMBATIR
BACTERIAS PATÓGENAS DE IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA DEL
CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Dayanna Andre Zambrano Sanmartin

Julio Sebastián Insuasti Hidalgo

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021

DEDICATORIA

“Todo lo que soy es gracias a mi madre y familia.”

Ellos, son la mayor motivación en mi vida. Cada uno de sus consejos me impulsaron a ser mejor persona y lograr mis metas. De todo corazón agradezco el amor y la unión que nos hace una familia perfecta.

El, quien me ha apoyado incondicionalmente y sin duda me guio y sostuvo cuando más lo necesitaba. Eres la mejor persona que podría haberme cruzado en el camino Kleber Arcentales.

Dayanna Zambrano

El presente proyecto lo dedico a mi familia, especialmente a mis padres quienes me han apoyado constantemente durante todo este trayecto, han confiado en mí y guiado de la mejor forma, gracias, por tanto. Todo lo que soy y he logrado es gracias a ustedes.

También lo dedico a aquella persona que encontré en mi etapa universitaria, quién me ha llenado de amor, alegrías y apoyo cuando más lo necesité, me alegra compartir esta etapa junto a ti Rebeca Reyes y que nuestros caminos se hayan cruzado.

A mis amigos que me han acompañado desde el Pre-politécnico, Steeven, Diego, Samuel, Andrés, también a aquellos que conozco desde mi infancia quienes me han demostrado que hay amistades eternas. A todos muchas gracias por formar parte de mi vida.

Julio Insuasti.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por brindarme fortaleza, sabiduría y entendimiento que me han permitido alcanzar mis metas.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral, sus docentes, por brindarnos una educación integral, cada enseñanza fue nutriéndome de conocimiento y a la vez para la vida.

A mi tutor, M Sc. Adrián Marquez quien nos brindó todo su apoyo y conocimiento en la realización de este proyecto. Al CENAIM y su personal, especialmente el laboratorio de microbiología por permitirnos llevar a cabo nuestro proyecto y apoyarnos durante la realización.

A mis amigos, por cada experiencia compartida, sin duda el camino fue largo, pero con su compañía y sonrisas han hecho que esta etapa sea la mejor de mi vida.

Dayanna Zambrano

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica del Litoral, a todos sus docentes, quienes me han llenado de conocimientos durante todos estos largos años, son tantos con los que he vivido experiencias que quedaran en mi memoria siempre les estaré agradecido por darme la oportunidad de aprender y ser mejor, compartiendo sus experiencias, valores e inspiración. Gracias además por su apoyo.

A mi tutor MSc. Adrián Marquez por brindarnos su apoyo durante esta etapa culminante y decisiva, por sus consejos y por inspirarnos para la realización de este proyecto.

Al CENAIM y su personal, especialmente el laboratorio de microbiología por permitirnos llevar a cabo nuestro proyecto y apoyarnos durante la realización.

Sin todos ellos no estaría en este punto así que estaré eternamente agradecido con todos, muchas gracias.

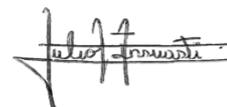
Julio Insuasti

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; (**Dayanna Andre Zambrano Sanmartin y Julio Sebastián Insuasti Hidalgo**) damos 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”.



Dayanna Andre
Zambrano Sanmartin



Julio Sebastian Insuasti
Hidalgo

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:

**ADRIAN JOSE
MARQUEZ
MONTIEL**

M Sc. Jerry Landívar

PROFESOR DE LA MATERIA

M Sc. Adrián Marquez

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La camaronicultura ha presentado grandes trabas en su desarrollo a lo largo de la historia esto se debe principalmente a la aparición de enfermedades emergente y remergentes en los cultivos causando así grandes pérdidas económicas, se han optado por diferentes alternativas para el control de estas enfermedades, aunque ciertas como los antibióticos tienen consecuencias que perjudican a la larga, por esta razón hemos propuesto el uso de extracto de la macroalga *Acanthophora spicifera* para combatir estas bacterias mediante ensayos de toxicidad, antimicrobiana y bioluminiscencia, además de conocer la caracterización bioquímica de ella. Los mejores resultados obtenidos para las pruebas antimicrobianas fueron de los extractos agua caliente molida y agua etanol sin moler contra el *V. vulnificus* en concentraciones de 15 mg/ml, para la inhibición de la bioluminiscencia fue el extracto agua etanol/sin moler con hasta un 80% de inhibición en una dilución de 1/10 del extracto, y el extracto menos tóxico fue el congelado/descongelado con concentración de 5 mg/ml, con respecto a la bioquímica en Auxinas el extracto Agua caliente sin moler tubo las mejores concentraciones (113,42 µg/ml), en fenoles el extracto congelado y descongelado (3.42µg/ml), en pigmentos para Clorofila a fue agua caliente molido (2,5 µg/ml), Carotenoides fue agua caliente molido (4.31 µg/ml), Ficoeritrina fue Agua caliente/molida (0,07 µg/ml) y en Actividad antioxidante el agua etanol sin moler (53.73%). Se analizo la bioactividad de *A. spicifera* presentando una alta bioactividad de auxinas, fenoles, pigmentos, antioxidantes comparados con otras especies de macroalgas, además presento actividad antimicrobiana (*V. Vulnificus*) e inhibición de la bioluminiscencia (*V. Harveyi*), por otro lado, los extractos acuosos presentaron menor toxicidad en comparación con solventes orgánicos.

Palabras Claves: Bioactividad, Extracto de macroalgas, Biocompuestos, *Vibrios*, *Acanthophora spicifera*

ABSTRACT

*Shrimp farming has passed away significant obstacles in its development throughout history, this is mainly due to the appearance of emerging and re-emerging diseases in crops, thus causing significant economic losses. Different alternatives have been chosen for the control of these diseases, although Certain such as antibiotics, have consequences that are harmful in the long run; for this reason, we have proposed the use of seaweed extract *Acanthophora spicifera* to combat these bacteria through toxicity, antimicrobial, and bioluminescence tests, in addition to knowing the biochemical characterization of it. The best results obtained for the antimicrobial tests were the extracts of hot water/ ground and water-ethanol / unmilled against *V. vulnificus* in concentrations of 15 mg/ml. To inhibit bioluminescence, the extract was water-ethanol / unmilled with up to an 80% inhibition in a 1/10 dilution of the extract. A minor toxic extract was frozen/unfrozen with a concentration of 5 mg/ml, to the biochemistry in Auxins, the extract Hot water/without grinding had the best concentrations (113.42 µg / ml), in phenols the frozen/unfrozen extract (3.42 µg / ml), in pigments for Chlorophyll a was hot water/ ground (2.5 µg / ml), Carotenoids was hot water/ ground (4.31 µg / ml), Phycoerythrin was hot water/ground (0.07 µg / ml) and in antioxidant activity the water-ethanol/ unmilled (53.73%). The bioactivity of *A. spicifera* was analyzed, showing high bioactivity of auxins, phenols, pigments, antioxidants compared to other macroalgae species; in addition, it presented antimicrobial activity (*V. vulnificus*) and inhibition of bioluminescence (*V. harveyi*), on the other hand, the aqueous extracts showed lower toxicity compared to organic solvents.*

Keywords: *Bioactivity, Seaweed extract, Biocompounds, Vibrios, Acanthophora spicifera.*

SIMBOLOGÍA

C°	Centígrados
Ppt	Partes por mil
ml	Mililitros
g	Gramos
µm	Micras
mg	Miligramos
G	Fuerza de gravedad
H	Horas
Min	Minutos
V	Volumen
M	Molaridad
N	Normalidad
µM	Micro molar
p	Peso
µg	Microgramos

ABREVIATURAS

AHPND	Necrosis hepatopancreática aguda
EMS	Síndrome de mortalidad temprana
OIE	Organización mundial de sanidad animal
QS	Quorum sensing
OD620	Osciloscopio
TSB	Caldo Triptona de soya
UFC	Unidades formadoras de colonias
CHLa	Clorofila A
H	Horas
Min	Minutos
S	Segundos

INDICE GENERAL

EVALUADORES	VI
RESUMEN	I
<i>ABSTRACT</i>	II
SIMBOLOGÍA	III
ABREVIATURAS	IV
CAPÍTULO 1	1
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.....	5
1.4.1 Enfermedades bacterianas ocasionadas por el género <i>Vibrio</i> en camarones. 5	
1.4.2 Efectos de los antibióticos en cultivos de camarón	6
1.4.3 Efectos de los extractos de macroalgas en cultivos de camarón.	7
1.4.4 Toxicidad	8

1.4.5	Compuestos bioactivos y bioactividad	9
1.4.6	Extracción de compuestos	10
1.4.7	Actividad antibacteriana	10
1.4.8	Actividad inmuno estimulante	10
1.4.9	Quorum Sensing	11
CAPITULO 2		19
2.	METODOLOGÍA	19
2.1	Recolección de algas y condiciones ambientales	19
2.2	Caracterización bioquímica de las macroalgas.....	19
2.2.1	Peso seco y peso seco sin cenizas.....	19
2.3	Métodos de extracción	20
2.3.1	Extracción en agua caliente	20
2.3.2	Extracción en Etanol y Agua	20
2.3.3	Extracción de biomasa con congelación y descongelación	21
2.4	Caracterización bioquímica de las macroalgas.....	21
2.4.1	Auxinas totales	21
2.4.2	Actividad antioxidante total	22
2.4.3	Fenoles totales	22
2.4.4	Pigmentos.....	22
2.5	Citotoxicidad.....	23

2.6	Actividad antibacteriana	24
2.7	Ensayo de bioluminiscencia de <i>V. harveyi</i>	24
2.8	Statistical análisis	24
CAPITULO 3		26
3.	RESULTADOS	26
3.1	Antioxidante	26
3.2	Fenoles	27
3.3	Pigmentos	28
3.4	Auxinas	31
3.5	Toxicidad.....	32
3.6	Actividad Antimicrobiana Y Bioluminiscencia.....	34
3.6.1	Bioluminiscencia	34
3.6.2	Actividad Antimicrobiana.....	35
CAPITULO 4		37
4.	CONCLUSIONES	37
4.1	RECOMENDACIONES	37
5.	Bibliografía	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Actividad antioxidante de los diferentes extractos medidos en porcentaje de inhibición	27
Figura 3.2 Concentración de fenoles totales (mg/ml) de los diferentes extractos en <i>A. spicifera</i>	28
Figura 3.3 Concentraciones de clorofila a, medida en $\mu\text{g/ml}$ de los diferentes extractos.	29
Figura 3.4 Concentraciones de carotenoides medidas en $\mu\text{g/ml}$ de los diferentes extractos	30
Figura 3.5 Concentraciones de ficoeritrina medida en $\mu\text{g/ml}$ de los diferentes extractos.	30
Figura 3.7 Concentraciones de auxinas medidas en $\mu\text{g/ml}$ de los diferentes extractos	31
Figura 3.8 Porcentaje de supervivencia de larvas de camarón <i>Penaeus vannamei</i>	33
Figura 3.9 Concentraciones de Bioluminiscencia medidas en % de inhibición de los diferentes extractos. E1: Agua caliente molida, E2: Agua caliente sin moler, E3: Congelado/descongelado, E5: Agua etanol sin moler, C1: 0,1mg/ml, C2: 0,01mg/ml, C3: 0,001 mg/ml, C4: 0,0001 mg/ml.	34
Figura 3.10 Extracto de <i>Acanthophora spicifera</i>	35
Figura 3.11 Interacción entre la bacteria y los compuestos de <i>A. spicifera</i> . a. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , b. <i>Vibrio vulnificus</i>	36
Figura 3.12 Exposición sin bacteria + extracto, hubo reacción de mancha oscura	36

INDICE DE TABLA

Tabla 2.1 Estudios sobre los efectos de los extractos de macroalgas en diversos patógenos. Elaborado por: Zambrano e Insuasti, D. A.,2021.	15
---	----

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Según la FAO la acuicultura es el sector de producción de alimentos que mayor crecimiento anual y cuyas características de desarrollo representan menos impacto ambiental, al compararlas con la pesca, ganadería y agricultura. Pero para poder continuar con un desarrollo acorde con el ambiente y la demanda de alimentos actuales y futuros, es necesario implementar procesos más sustentables. La producción de camarón, aunque representa en volumen el 4 rubro de mayor producción en acuicultura económicamente representa el segundo rubro de producción de mayor valor económico en el mundo, esperando que se supere en el 2021 los 5 MT (Anderson J., et.al. 2019). Dentro de Latinoamérica Ecuador es uno de los mayores exportadores mundiales de camarón con más de 600 mil toneladas por año y el primer producto nacional de producción no petrolero (CNA, 2020). Sin embargo, el incremento en la aparición de enfermedades, dejan ver cuál la principal vulnerabilidad del sector limitando el desarrollo y afectando su producción severamente (Krammer, 2020).

La mayor parte de las enfermedades de impacto para la camaronicultura son causadas por agentes bacterianos, que son la principal causa de mortalidad y pérdidas económicas en el cultivo de camarón. En los últimos años debido al uso inadecuado y acumulado de antibióticos se ha originado un incremento en la resistencia microbiana y decrecimiento en la eficacia de los tratamientos dando como resultado, aplicación de dosis cada vez más altas y con un mayor impacto ambiental (FAO, 2017) Esta resistencia puede ser arrastrada a otras bacterias ambientales, incluso bacterias patógenas humanas (Agurto, 2011), que podrían adquirir resistencia a uno a más antibióticos, haciéndolos ineficaces para tratar enfermedades de alta difusión y mortalidad.

Hoy en día la acuicultura presenta un auge frente a la búsqueda de alternativas a los quimiotratamientos tradicionales de alto impacto ambiental (antibióticos). Con un marcado interés en el estudio de compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas, inmunoestimulantes, antivirulentas, e inclusive que posean efectos mas rentables y eficiente (Dawood M., et.al. 2021) (Hai, 2015) (Austin, 2017) (Vega J., et.al.

2020). En los últimos 5 años existe un creciente número de información científica alrededor del uso de macroalgas, relacionando su rica bioactividad con efectos 1 inmunoestimulantes, 2 antivirales, 3 antifúngicas y 5 citostáticas y antibacterianas en todos los filos de algas estudiadas (Magallanes,et.al 2003). Los principales biocompuestos que componen las algas están formados por metabolitos secundarios, con funciones específicas en el ambiente (Magallanes,et.al 2003 y Ambika, 2020).

La presente propuesta explora el contenido de compuestos bioactivos de interés para el control de enfermedades de impacto para la acuicultura de camarón, en la macroalga marina *Acanthophora spicifera*, como una alternativa para el control de enfermedades.

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Las enfermedades emergentes han sido la más importante traba en la producción de camarones a nivel mundial, sin que; Ecuador pueda escapar a esta realidad. A lo largo de la historia de la camaronicultura se puede observar cómo distintos brotes de enfermedades han afectado severamente la producción causando no solo miles de millones de UDS en pérdidas, la estabilidad económica del país se estima 250 mil familias dependen de la renta del camarón en Ecuador.

Estos brotes de enfermedades que afectan el cultivo (tanto en la etapa larvaria como de engorde) son principalmente de origen bacteriano, siendo el género *Vibrio* el que ha generado las mayores pérdidas. Por esta razón uno de los más grandes desafíos en la camaronicultura es el tratamiento adecuado de estas infecciones con alternativas de bajo impacto ambiental y que no generen resistencia en las bacterias.

1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Las enfermedades en acuicultura generan grandes pérdidas tanto económicas, si no son controladas a tiempo, estas podrían acabar con toda la producción y/o contaminar otros cultivos, por esta razón se busca una alternativa para contrarrestar a las bacterias que atacan cuando el animal se encuentra débil por los factores bióticos o abióticos, cuyas principales herramientas de control son antibióticos.

Para poner en contexto económico, Ecuador con la aparición del síndrome de la mancha blanca (White spot) causado por una bacteria del género *Vibrio*, reporto severas pérdidas económicas (551 millones de USD) durante los años 1999 hasta el 2004 cuando logro ser controlado parcialmente (Graindorge A. Griffith, 2000). Recientemente enfermedades emergentes también causadas por bacterias del género *Vibrio* han causado en Asia un brote del síndrome hepatopancreático agudo (HPND por sus siglas en inglés) causando más de 1 billón de USD en pérdidas de producción de camarón hasta el 2018 (Jee Eun Han, et.al.2017).

Actualmente existen diferentes métodos para combatir las enfermedades en la camaronicultura las más utilizadas son: probióticos, ácidos orgánicos y antibióticos (métodos terapéuticos/ métodos profilácticos), siendo los antibióticos el método más utilizado para este fin, sin embargo; el uso de estos puede ser nocivos tanto para los organismos en cultivo como para el ambiente. Además, la administración frecuente promueve la resistencia contra estos, haciendo el trabajo de combatirlos cada vez más difícil (Agurto, 2011)

Dentro de una variedad de alternativas exploradas, el uso de macroalgas marinas y sus extractos para el control de enfermedades se muestra como una alternativa promisoría para la optimización de la tecnología de cultivo y una herramienta que nos acerque más a la sustentabilidad en los procesos de producción.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

- Evaluar los efectos terapéuticos de los extractos de macroalgas contra enfermedades bacterias del camarón *Penaeus vannamei* mediante ensayos *in vitro*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Cuantificar la actividad antioxidante, contenido de fenoles, auxinas y pigmentos como indicadores de bioactividad en la macroalga *Acanthophora spicifera*.
- Evaluar el efecto de los extractos de macroalgas mediante ensayos *in vitro*: citotoxicidad en larvas de camarón.
- Determinar *in vitro* las mejores concentraciones de los extractos de macroalgas con actividad antibacteriana sobre cepas de bacterias patógenas en el cultivo de camarón *Penaeus vannamei*.

1.4 MARCO TEÓRICO

1.4.1 Enfermedades bacterianas ocasionadas por el género *Vibrio* en camarones.

Los *vibrios* son bacterias Gram-negativas que presentan un metabolismo fermentativo y son anaeróbicos, cuya versatilidad metabólica, rápida adaptación a entornos adversos, junto con varios mecanismos que conducen a la variación e intercambio genético eficiente (horizontal y vertical), así como la resistencia generada por años de exposición a antibióticos los convierten en uno de los principales peligros que limitan el desarrollo de la acuicultura de camarón (Itxaso Montánchez, et. al, 2020).

1.4.1.1 *Vibrio harveyi*

Es una cepa de *Vibrio* luminiscente y estudios han revelado importantes efectos deletéreos relacionadas al *V. harveyi* en camarones blancos como: lesiones oculares (Smith, 2000), cambios patológicos en el intestino (Gary G. Martin et al., 2004), desprendimiento del exoesqueleto (Austin, B, Zhand,X, 2006), letargia, nado errático y melanización (Jorge, 2013). Entre 1990 y 1992 China reportó masivas mortalidades en camarones y pérdidas económicas de \$120 millones (Q., Wei, 2002).

1.4.1.2 *Vibrio vulnificus*

La mayoría de las infecciones por este *Vibrio* se da en regiones tropicales o subtropicales con temperaturas superiores a 18 °C con salinidades entre 15 y 25 UPS. Esta bacteria tiene la mas alta capacidad invasiva reportada para el género *vibrio*. (Heng Sing-Peng, et.al, 2017). Los principales signos clínicos son: putrefacción de cola, necrosis hepatopancreática séptica, coloración marrón en branquias y caparazón negro (Jayasree L,et.al, 2006). Este *Vibrio* apareció por primera vez en Ecuador alrededor de 1988 en hatcheries de todo el país con *P. vannamei*, también se ha reportado en Malasia con cultivos de *P. monodon* dando mortalidades en los últimos días de cultivo de engorde de más del 70% (McVey, 1993).

1.4.1.3 Vibrio parahaemolyticus

Son infecciones orales con colonización del tracto digestivo y donde se producen sustancias tóxicas que afectan al hepatopáncreas, provocando una difusión de células en la fase aguda de la enfermedad. Algunos de los síntomas que se manifiestan es letargia, anorexia, cromatóforos extendidos, estómago e intestinos vacíos y la mortalidad puede ser significativa en camarones *P. vannamei* (Rodríguez, 2017) (Tranl, Nunan I, et.al, 2013).

En el año 2009, el AHPND en el continente asiático causó un 80 por ciento de pérdidas económicas (13.300 millones de dólares US) (FAO, 2013) y denominada inicialmente como síndrome de la mortalidad temprana (EMS). La AHPND es ocasionada por *Vibrios parahaemolyticus* aunque se ha reportado casos que también puede ser ocasionada por *V. campbelli* (Cepa KC13.17.5 reportada en Vietnam) y *V. owensii* (Cepa SH14 reportada en China). (Muñiz, 2020)

1.4.1.4 Vibrio Campbelli

Al igual que el *V. harveyi* este presenta luminiscencia, he ahí la famosa enfermedad de vibriosis luminiscente, los signos clínicos que este presenta son los siguientes: coloración rojiza por expansión de cromatóforos, músculo opaco, necrosis y pérdida de setas en los apéndices (Hameed et.al 1996). Al microscopio se puede ver los cúmulos de bacterias en el hemocele de las larvas moribundas (Lavilla-Pitogo et.al, 1990).

1.4.2 Efectos de los antibióticos en cultivos de camarón

La capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales desfavorables se conoce como resistencia. Las bacterias a demás por presión selectiva son capaces de generar resistencia a los antibióticos, la cual se puede transmitir de un organismo a otro por medio de transferencia horizontal cumpliéndose tres procesos: conjugación, transducción y transformación.

La presencia de antibióticos en los cultivos de camarón o alimentos que se proporciona a estos cultivos pueden conllevar a la aparición de cepas resistentes teniendo como consecuencia limitados antibióticos y concentraciones elevadas para su uso, además se puede presentar enfermedades de difícil control en humanos debido a la resistencia cruzada por los antibióticos terapéuticos de uso en Acuicultura, (Mejías V, et.al. 2018),

Según este autor “El impacto ambiental es de interés, ya que parte de los antibióticos puede permanecer en el sedimento, ya sea porque no es consumido por el camarón o porque a pesar de ser ingerido, parte de este es eliminado sin cambio a través de las excretas”, la acumulación de los antibióticos en el sedimento depende básicamente de tres condiciones profundidad, sustratos y tasa de recambio, lo que generara un impacto ambiental y biológico consecuentemente con su uso (concentración y frecuencia).

1.4.3 Efectos de los extractos de macroalgas en cultivos de camarón.

Las macroalgas son un tipo de alga marina de tamaño macroscópico, son organismos multicelulares, existen básicamente tres tipos de algas: rojas (*Rhodophyta*), pardas (*Phaeophyta* o *Phucophyta*) y verdes (*Chlorophyta*). Estos organismos tienen una gran importancia en los ecosistemas litorales, no solo por todas las funciones medioambientales que realizan sino por la diversidad de usos: 1 alimenticio, 2 extracción de bioproductos simples como hidrocoloides (alginato y carragenina), fertilizantes y 3 en complemento para alimento balanceado funcional (Nutraceuticas), A nivel mundial el cultivo de macroalgas son el segundo producto en volumen después de los peces generando empleos y alimentos nutritivos. (FAO, La industria de las algas marinas , 2000).

A nivel mundial existen muchos tipos de macroalgas que se cultivan por ejemplo en África tenemos el cultivo de *Eucheuma denticulatum* y *Kappaphycus alvarezii*, *Gracilaria* sp, *Hypes musciformis*, en Asia podemos encontrar también *Gracilaria* sp., *K. alvarezii*, *Porphyra* sp. En América *Gigartina skottsbergi*, *Sarcothalia crispata*. (FAO, 2002).

Entre las diversas macroalgas que nosotros podemos encontrar ciertas son muy reconocidas por sus propiedades y los diferentes usos que les podemos otorgar, como puede ser *Ulva lactuca* y *Kappaphycus alvarezii* que son de las más usadas en biotecnología (biocombustible, textiles, carragenina, alimento, entre otros). (Suganya T, Renganathan S., 2012) (Henriques B., et.al., 2017) (Fleurence J., 1999) (Yu-Qing T., et.al., 2016) (Rogelio, 2019) (Rahim F., et.al. 2014)

Adicionalmente se están desarrollando estudios en *Acanthophora spicifera* que apuntan a su uso en la acuicultura por sus propiedades bioquímicas que pueden beneficiar a los organismos y combatir patógenos, siendo conocidas también por su abundancia en la

naturaleza, rendimiento preliminar en cultivo y poder ser comestible. (Aili N., et.al.,2011) (Michael M., Immanuel G., 2007) (Nurul, Z. A. ; et.al., 2010)

1.4.3.1 Acanthophora spicifera

Es una especie cosmopolita de aguas tropicales y subtropicales, con una amplia distribución geográfica, es perteneciente al filo de las algas rojas (*Rhodophytas*) (Luis Ernesto Aguilar,et.al, 2014).

Su habitat es en la zona intermareal en los arrecifes poco profundos y que tengan un oleaje tranquilo, así también podemos encontrarla en lagunas de mar o bancos rocosos. El alga roja es usada en ciertos lugares para la gastronomía (Parek R., et.al., 1989) (Kaliaperumal N, et.al.,1986), aunque también se han encontrados estudios últimamente sobre su uso como fuente de compuestos antioxidantes naturales que pueden obtenerse de sus extractos (Aili N., et.al., 2011), además hay investigaciones de esta alga contra el cáncer o en la creación de fármacos (Cedeño Kristell, Ramírez Gregory, 2020). Esta especie de macroalgas es abundante en las costas de Ecuador, en estudios preliminares presenta un rápido crecimiento y un prometedor perfil de actividad biológica (Marquez et al 2021) lo que la hacen una candidata ideal para desarrollos tecnológicos para la diversificación de la canasta productiva del país.

1.4.4 Toxicidad

Conocemos que las algas marinas tienen muchas propiedades benéficas para la salud debido a las sustancias que estas poseen, pero además de contener estas podrían encontrarse aquellas que perjudican y son tóxicas. Este es el caso de las algas pardas que suelen tener mayores contenidos de metales o metaloides como por ejemplo el arsénico, estos compuestos son tóxicos para los organismos en concentraciones altas. (Salomone V., et. al, 2017)

Se considera que las algas no son venenosas, pero solo algunas especies presentan ciertos grados de toxicidad y esto se puede deber a 3 razones:

- Activación del sistema de defensa contra herbivoría, al verse amenazadas y atacadas las algas pueden segregar sustancias para tratar de evitar esta acción.
- Otros organismos que tienen propiedades tóxicas o venenosas pueden encontrarse en conjunto con las macroalgas como por ejemplo ciertos dinoflagelados o microalgas que segregan toxinas, además de la contaminación de las aguas que puede llevar a encontrar coliformes fecales.
- Absorción de minerales que se encuentran en el agua, en la mayoría de los organismos solo podríamos encontrar calcio y hierro que no es perjudicial para la salud, pero hay excepciones de algas pardas que tienen metales tóxicos como es el caso del arsénico. (Radulovich R., et. al, 2013)

Como se ha mencionado estas algas pueden tener contenidos de metales como el arsénico, los cuales son tóxicos para los animales llegando a provocar problemas de salud, por lo tanto, es de suma importancia el evaluar la toxicidad de los compuestos de estas algas y sus riesgos antes de proceder con el consumo o uso de ellas. (Shutterstock, 2015)

1.4.5 Compuestos bioactivos y bioactividad

Los compuestos bioactivos son sustancias conocidas como metabolitos secundarios, sustancias fotoquímicas o nutraceuticos, podemos encontrarlos en la mayoría de las plantas, frutas y vegetales así como en las macroalgas (G. Cárdenas, et.al 2015), (Urango L., Montoya G., et.al., 2009).

Estos son compuestos importantes debido a sus propiedades (Inmunoestimulante, antibacteriano, antivirulencia). Se ha demostrado que tienen muchas propiedades farmacológicas en animales y plantas, inclusive en humanos; donde estudios han demostrado que pueden ayudar a reducir el impacto de ciertas enfermedades como el cáncer, debido a sus propiedades antioxidante, anti angiogénicas, antiinflamatorias (Rasul H., Barrow C , 2020).

Los estudios cuantitativos y cualitativos de los compuestos bioactivos dependen mucho de los métodos que se usen para su extracción, y hay que tener en cuenta que estos pueden verse afectados por ciertos factores como la fuente del producto, el solvente, temperatura, presión, entre otros. (Rasul H., Barrow C , 2020).

1.4.6 Extracción de compuestos

En la naturaleza existen muchos compuestos que pueden tener propiedades bioactivas de interés para la acuicultura, dependiendo de su estructura química y efecto. En los últimos años el consumo de estos compuestos ha ido incrementando al punto de emerger nuevas tecnologías con las cuales se puede realizar la extracción de biocompuestos, por ejemplo: arrastre por solventes (Polares o no polares), cavitación, pulsos eléctricos, destilación, microondas, presión, ultrasonido entre otros. Que según la composición bioquímica, estabilidad y afinidad electroquímica pueden ser separados conservando sus propiedades.

Es por esto que la exploración de métodos de extracción simples, se pueden mantener los compuestos estables para ser aplicados y pueda ser escalables a procesos industriales rentables (Consuegra, 2014).

1.4.7 Actividad antibacteriana

Los agentes antimicrobianos inhiben o matan el crecimiento de bacterias, para determinar la actividad antibacteriana se realiza el método de difusión en discos (disco-placa-cultivo) (Udayakumar Hazzena, 2002) o pozos (perforación en el agar) (Álvarez et al. 2005). Según estudios se ha reportado que algunas especies de algas poseen actividades biológicas sobre microorganismos (Vacca D, & Walsh R, 2006), entre ellas se destaca el trabajo de Doty y Aguilar en el año 1996 quienes describen una sustancia con propiedades antimicrobianas que se denominan Caulerpicina (Arteaga M, Silvestri J. , 1985)

1.4.8 Actividad inmuno estimulante

Los inmunoestimulantes son químicos, drogas, estresantes o acción con la capacidad de promover la respuesta inmunológica de los organismos, así optimizando su capacidad de defensa contra algún patógeno. Existen ciertos indicadores que permiten determinar la capacidad inmunoestimulante de un compuesto que son: Respuesta Fagocítica, conteo total de hemocitos, proteínas totales, inmunoglobulinas, actividad lisozímica, linfocitos circulantes, conteo de macrófagos, etc. (P., Anderson Douglas, 1992) (Tort L., et al. 2004)

Solo son ciertos compuestos que pueden lograr esta actividad en los organismos, suelen ser fragmentos de la pared celular de microorganismos, como, por ejemplo: péptidos muramil, Lipopolisacáridos, lipopéptidos, aciloligopéptidos, B-glucanos, moléculas poliglucosas, entre otras. (Moullac G., et.al. 2000)

En los crustáceos muchos mecanismos de defensa dependen de la producción controlada de radicales libres durante la fagocitosis y encapsulación, generando así un estrés oxidativo que conlleva a la producción de sustancias reactivas al oxígeno que son eliminadas por un sistema de defensa antioxidante como son el superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. Estos compuestos pueden ser utilizados como indicadores de la activación del sistema inmune. (Córdova A., et.al., 2010)

1.4.9 Quorum Sensing

Las bacterias se comunican entre sí mediante moléculas de señales químicas, la información proporcionada por estas moléculas es fundamental para sincronizar las actividades de grandes grupos de bacterias. La comunicación implica liberar, producir, detectar y responder a pequeñas moléculas que son similares a hormonas denominadas auto inductores. Además, cada vez hay más datos que sugieren que los auto inductores provocan respuestas específicas de los organismos a los hospederos (Melissa Miller, Bonnie Bassler , 2001).

Ya que el QS está implicado en varios eventos patológicos relevantes como la formación de biofilm o la virulencia bacteriana, los inhibidores del QS son herramientas de gran valor en búsqueda, la mayoría de estos compuestos inhibidores suelen ser antagonistas del AI-1 (AHLs) o AL-2 (Autoinducer2) y mediadores de las vías AIP (autoinducing peptides). (Ni N., et.al. 2009).

Los microorganismos que causan enfermedades poseen factores de virulencia, los cuales permiten invadir el hospedero y dañar sus tejidos la mayoría relacionados con el quorum sensing y sus moléculas de señalización. (Atlas, 1984). La capacidad de sustancias de inhibir esta comunicación afecta significativamente la aparición de la enfermedad causada por las bacterias patógenas.

Tabla 2.1 Estudios sobre los efectos de los extractos de macroalgas en diversos patógenos. Elaborado por: Zambrano e Insuasti, D. A.,2021.

EXTRACTO DE MACROALGA	PATÓGENO	ACTIVIDAD/PRUEBA	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	COMPUESTOS	CONCENTRACIONES	REFERENCIA
ULVA LACTUCA SP. ETANÓLICO	<i>Salmonella</i> Typhymurium ATCC 14028	Antibacteriana Concentración mínima Inhibitoria (MIC)	10.0mm	Sesquiterpenoides y diterpenoides	Algas secas 5ml	Muñoz A, Santome R, Selma,& LeónQ, Jorge. (2020).
ULVA LACTUCA SP HEXÁNICO	<i>Salmonella</i> . Typhymurium ATCC 14028	Antibacteriana Concentración mínima Inhibitoria (MIC)	8.5mm	Sesquiterpenoides y Dieterpenos	Algas secas 5ml	Muñoz A, Santome R, Selma,& LeónQ, Jorge. (2020)
GRALELOUPIA. DORYPHORA, ETANÓLICO	<i>Vibrio vulnifus</i> , <i>parahaemolyticus</i>	Antibacteriana Técnica de difusión en agar.	<6.2mm	Metabolitos	5ml	Magallanes, Claudio, Córdova, César, & Orozco, Rita. (2003)

ACANTHOPHORA SPICIFERA.	<i>Staphylococcus aureus,</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Bacteriostático Bactericida Uso de discos estériles de papel filtro Whatman N°42 de 6mm de diámetro	No presenta halos de inhibición en estos patógenos	Terpenoides halogenados	0.1 ml	Isassi G, Álvarez S, Ramírez C, Hernández N. (1999)
DASYCLADUS VERMICULARIS	<i>Staphylococcus aureus,</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Bacteriostático Uso de discos estériles de papel filtro Whatman N°42 de 6mm de diámetro	13mm No hubo inhibición 15mm 16mm	Metabolitos	0.1 ml	Isassi G, Álvarez S, Ramírez C, Hernández N. (1999)
ARIS	<i>Escherichia coli,</i> <i>Shygella sonnei</i>					
LIAGORA FARINOSA	<i>Staphylococcus aureus,</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Bactericida Uso de discos estériles de papel filtro Whatman N°42 de 6mm de diámetro	14mm 17mm 22mm 27mm	Metabolitos	0.1ml	Isassi G, Álvarez S, Ramírez C, Hernández N. (1999)
ACETÓNICO						
ACUOSO						

AHFELTIOPSIS FLABELLIFORMIS N-BUTANOL	A. tumefaciens	Inhibidor del QS, inhibición de actividad AHL. Control positivo de Fimbroside DI, butanol 0,74 de 1	Absorbancia del X-gal a 600nm por 6,5h para medir la actividad del lacZ.	Florodoside, betonidine y ácido isethionic, una combinación estos compuestos salieron del butanol.	1,000 µg/mL	(Kim J., Kim Y., Seo Y., Park S., 2007)
DELISEA PULCHRA	V. harveyi	Inhibidor del QS	Absorbancia de la LuxR protein, inhibition index 0.26	Halogenated furanones, del acetato etílico	50µM	(Manefield M., Rasmussen T., Morten H., Andersen J., Steinberg P., Kjelleberg S., Givskov M., 2002) (Nys R., Wright A., Konig G., Sticher O., 1993)
CANISTROCARPUS CERVICORNIS METHANOL:DICLOROMETANO,1:1	Chromobacterium Violaceum	Inhibidor de QS, se midió con la inhibición de la coloración por el pigmento violacein (C6- HSL)	Absorbancia > 60% del pigmento	Metabolitos secundarios	2,4mg/ml	(Carvalho A., Batista D., Dobretsov S., Coutinho R., 2016)
A.TAXIFORMIS SERRATIA LIQUEFACIENS METANOL EXTRACT	Chromobacterium violaceum	Inhibidor del QS e inhibidor del crecimiento, inhibición de la coloración por el pigmento violacein y	Se realizo un cultivo de agar y se añadió el extracto para observar luego	2-dodecanoyloxy ethanesulfonate (C14H27O5S)	5 µl en agar para QSI	(Jha B., Kavita K., Westphal J., Hartmann A., Schimtt P., 2013)

green fluorescent
protein en Serratia

bajo UV la
actividad. Se uso
control positivo a
cinnamaldehyde.

CAPITULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Recolección de algas y condiciones ambientales

Para el estudio se recolecto la macroalga marina *Acanthophora spicifera*, la cual en estudios preliminares ha mostrado concentraciones prometedoras de ciertos biocompuestos (Auxinas, antioxidantes y pigmentos como ficoeritrina) (Márquez et al 2021). Esta alga fue colectada durante el mes de junio durante la marea baja en la zona intermareal, donde solo pasan un par de horas al día expuestas durante la marea más baja en la zona de San Pedro (-1.972137,-80.77686). Tomándose cinco replicas biológicas. Todas las muestras fueron inmediatamente almacenadas en fundas plásticas y transportadas a los laboratorios en hieleras a (10°C) el mismo día, para luego ser lavadas con agua estéril, limpiadas manualmente de epifitos y congeladas a -20°C para su análisis.

2.2 Caracterización bioquímica de las macroalgas

2.2.1 Peso seco y peso seco sin cenizas

Para determinar el peso seco, de cada muestra de algas, se secaron 20 g a 104°C durante 12 h en un horno (IPC100, Memmert, Alemania) se pesaron en una balanza analítica (Boeco,Bass 31 plus, Alemania) para determinar la biomasa seca, esta biomasa se incineró a 450 °C durante 3 h en una mufla (Thermo Controller , Isuzu, Japón) y se pesó para determinar el peso seco libre de cenizas (APHA et al., 2017).

2.3 Métodos de extracción

2.3.1 Extracción en agua caliente

Para la preparación del extracto crudo de *A. spicifera* se utilizó el método de extracción con agua caliente descrito por (Tayag et,al. 2010) con ciertas modificaciones. La biomasa de algas fresca fue molida, se añadió 20g de la muestra en 20 ml de agua desionizada, luego se hirvió por 3 horas.

El material suspendido se filtró con una malla de nylon (60µm), lo filtrado se concentró a presión reducida, luego se centrifugo a 2,5G por 20 minutos para separar el sobrenadante de sedimentos (Kokusan, H-103N, Japón), los tubos fueron cubiertos con papel aluminio para evitar la degradación de compuestos, se congeló a -80°C hasta su uso. Para su análisis de actividad antimicrobiana, citotoxicidad y caracterización bioquímica se tomó alícuotas del sobrenadante previamente obtenido. Cabe mencionar que también se obtuvo extracto de alga sin moler con el mismo procedimiento antes mencionado.

2.3.2 Extracción en Etanol y Agua

Para extraer los biocompuestos de *A. spicifera* se utilizó una mezcla de etanol absoluto y agua en relación 1:1 (Sabeena, K.Dakota del Norte- Jacobsen, C. 2009), se molieron las algas frescas, se usó 10gr de la muestra con 5 ml de etanol absoluto y agua destilada a temperatura ambiente, primero se añadieron los 5ml de etanol absoluto, para dejar reposar por 24h en el refrigerador, luego se añadieron los 5ml de agua destilada dejando reposar 24h de igual manera en el refrigerador. El extracto se centrifugo a 2.5 G durante 20 min (Kokusan, H-103N, Japón). El alcohol de los extractos se evaporo al ambiente antes de proceder a realizar las pruebas. Los tubos fueron cubiertos con papel aluminio para evitar la degradación de compuestos, finalmente el extracto se congeló a 80 °C hasta su análisis. Para su análisis de actividad antimicrobiana, citotoxicidad y caracterización bioquímica se tomó alícuotas del sobrenadante previamente obtenido. Cabe mencionar que también se obtuvo extracto de alga sin moler con el mismo procedimiento antes mencionado.

2.3.3 Extracción de biomasa con congelación y descongelación

Para la extracción en agua se pesó 10 gramos del alga sin moler, se colocó la muestra en un tubo falcón, también se añadió 10ml de agua destilada, el alga debe quedar totalmente sumergida, luego el tubo fue llevado al congelador por 24h. Posteriormente se centrifugo a 2,5G por 20 minutos para separar el sobrenadante de sedimentos (Kokusan, H-103N, Japón), los tubos fueron cubiertos con papel aluminio para evitar la degradación de compuestos, se congeló a -80°C hasta su uso. Para su análisis de actividad antimicrobiana, citotoxicidad y caracterización bioquímica se tomó alícuotas del sobrenadante previamente obtenido (Hende et,al 2012).

2.4 Caracterización bioquímica de las macroalgas

Se tomo alícuotas de cada extracto correspondiente al volumen que se necesitaba para cada preparación según el procedimiento a realizar en cada una de las pruebas (Auxinas totales, Antioxidantes, Clorofila a y carotenoides, Ficoeritrina y ficocianina, Fenoles totales)

2.4.1 Auxinas totales

El sobrenadante fue analizado para el contenido de auxinas utilizando el método colorimétrico de Salkowski propuesto por (Glickmann & Dessaux, 1995). Se utilizó como referencia el ácido indol-3-acético (Sigma, USA). Para la curva de calibración se prepara concentraciones de 0,5,10,20,50 y 100 ug/ml. El indol no es soluble en agua por lo que se solubiliza en etanol, descrito por (Gordon&Weber 1951)

El método colorimétrico de Salkowski identifica los esteroides y triterpenos, mediante la oxidación de compuestos indólicos por sales férricas dando positiva cuando presenta una coloración que va desde el rosado claro a intenso, esta va a depender de la concentración del ácido indol acético presente (Rojas, M. et,al. 2012).

Para la lectura de auxinas se realizó la curva de calibración con el reactivo de Sarkowski y el IAA, donde se usó relaciones de 1:1 o 2:1 que dependen de la cantidad de auxinas que haya presente. Para el conteo de auxinas de igual forma se tomó 100 µl del extracto y 100 µl de Sarkowsky para la relación 1:1 y se usó 100 µl del extracto y 200 µl de Sarkowsky para la relación 2:1, se hizo 2 réplicas para cada extracto y relación.

Posteriormente se dejó reposar en oscuridad por 30 minutos (cubierto con papel aluminio) se leyó en el Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, VL0000D0, US) a 530 nm.

2.4.2 Actividad antioxidante total

Los distintos extractos de *A. spicifera* fueron analizados para determinar la actividad antioxidante, utilizando el método de captura radical DPPH. Propuesto por (Murray et,al 2004). Se preparó el Reactivo DPPH al 0,004% p/v, se tomó una alícuota de 200 µl de los extractos y se añadió 3000 µl de reactivo DPPH en un tubo de ensayo, de esta preparación se tomó 200 µl para colocar en la placa microelisa, se realizaron 4 réplicas de cada extracto. Se esperó por 30 minutos en oscuridad hasta obtener la reacción (cubierta de aluminio) se leyó en el Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, VL0000D0, US) a 517nm.

2.4.3 Fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron de cada muestra de extractos en base al método espectrofotométrico basado en (Tanna et,al 2018) con las siguientes modificaciones, se tomó una alícuota de 20 µl del extracto, se colocaron en tubo de ensayo y se le adiciona 1580 µl de agua destilada luego 100 µl del reactivo Folin-Ciocalteu, mezclar bien esperando entre 30s y 8 min, para adicionar 300 µl de una solución de carbonato de sodio al 20% p/v y agitar bien. Se espero 2 h a una temperatura de 20 °C, una vez termina la reacción se toma 200 µl se coloca en los pocillos con 4 réplicas cada extracto.

2.4.4 Pigmentos

Para medir el contenido total de clorofila a (Chla), y carotenoides totales, de cada uno de los extractos de algas, el método utilizado es descrito por (Lightner et,al 2012). En el cual se utilizó una alícuota de 200 µl de cada extracto colocándola en una placa microelisa con 2 réplicas para cada extracto, estas fueron leídas a longitudes de ondas dependiendo del pigmento, para la clorofila a 667/750 nm, carotenoides a 666/750 nm, la ficoeritrina a 618/645 nm, posteriormente se oxidó la clorofila para obtener la ficocianina adicionando 1 µl de HCL al 0,01 N y mezclándolo con el extracto para ser leído a 564/592/455 nm. (Hende, 2012)

Los resultados fueron analizados con las siguientes fórmulas:

Clorofila a

$$(13,36*B3) - (5,19*D3)$$

B3= Longitud de onda de 664 nm de los diferentes tipos de extractos.

D3= Longitud de onda de 664 nm de los diferentes tipos de extractos.

Clorofila b

$$(27,43*D4) - (8,12*B4)$$

B4= Longitud de onda de 664 nm de los diferentes tipos de extractos.

D3= Longitud de onda de 648 nm de los diferentes tipos de extractos.

Carotenoides

$$((1000*D3) - ((2,13*S3) - (97,64*T3))) / 209$$

D3= Longitud de onda de 664 nm de los diferentes tipos de extractos.

S3= Valores de clorofila a.

T3= Valores de clorofila b.

2.5 Citotoxicidad

Se usaron larvas provenientes del laboratorio SEMACUA, de un hachery comercial estas fueron recibidas en el Laboratorio de CENAIM para ser aclimatadas durante 24h, el estadio de las larvas al llegar era de PL-11 que al cabo de las 24hr llegarían a PL-12, se verificaron las condiciones de calidad de la larva al microscopio, viendo que tengan una actividad elevada, una relación musculo intestino ideal, formación de las branquias, cromatóforos, etc.

Se utilizaron 2 placas con 24 pocillos cada una con un volumen de 3ml aproximadamente, se probaron 3 concentraciones (5mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml) de los extractos con 3 réplicas para cada una, por pocillo ubicamos 4 larvas elegidas aleatoriamente del lote, el control fue solo agua mili-Q sin extractos. Se llevo a cabo la observación cada 3 h en un Estereoscopio hasta ver mortalidad total de las larvas en los extractos o en el control.

2.6 Actividad antibacteriana

Los distintos extractos de la especie de macroalga *A. spicifera* se probaron contra cepas provenientes del laboratorio de microbiología del CENAIM-ESPOL, patógenas para camarones: *V. parahaemolyticus* (BA55) causante AHPND, *Vibrio campellii* (Ba94c2), *V. harveyi* (E22), *V. vulnificus*. Estas bacterias se mantuvieron a -80°C en caldo de triptona de soya suplementado con 2% (p/v) de NaCl (TSB) y 25-30 % (v/v) de glicerol y se reactivaron mediante incubación durante un periodo de 18-24 horas en $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en caldo de tripticasa de soya con 2% (p/v) de NACL.

2.7 Ensayo de bioluminiscencia de *V. harveyi*

Debido a la bioluminiscencia del *Vibrio* y que este es un fenómeno el cual es controlado por el quorum sensing, se examinó la posibilidad de que los extractos puedan afectar la bioluminiscencia, usando la metodología de (Nackerdien A., et.al., 2008) con modificaciones. El cultivo bacteriano de *V. harveyi* fue diluido de una concentración de 10^8 UFC/ml a 10^6 UFC/ml, en caldo tripticasa de soya (TSB) + 2%NACL, de este cultivo bacteriano se usarían 20 µl por pocillo en la placa micro-Elisa con 180 µl de la dilución de los extractos, los extractos a usar fueron cuatro, con diluciones de 10-100-1000 y 10000 de cada extracto. Para el control positivo, se usó cultivo bacteriano 20µl más caldo TSB 180µl con 2% NACL sin el extracto. La placa micro-Elisa fue montada con 5 réplicas de cada concentración, así como del control negativo que fue 200 µl de caldo TSB, esta fue incubada por 12hr para luego ser leída en el Varioskanlux (Thermo Fisher Scientific, VL0000D0, US) a 600 nm.

2.8 Statistical análisis

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete SPSS Statistics, versión 22 (IBM, USA). Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (SE). Todos los parámetros fueron evaluados para la normalidad usando la prueba de

Kolmogorov-Smirnov, y para la homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene.

Donde se observó normalidad y homogeneidad de las varianzas, se analizaron diferencias en las medias mediante ANOVA unidireccional con la prueba posthoc HSD de Tukey ($p < 0,05$). De lo contrario, se utilizó la prueba de Wilcoxon no paramétrica con una prueba post hoc de Dunn que incluía una corrección de Bonferroni ($p < 0,05$).

CAPITULO 3

3. RESULTADOS

La bioactividad observada en la especie de macroalga *Acanthophora spicifera* en cuanto a: 1. actividad antioxidante, 2. contenido de fenoles, 3. contenido de pigmentos y 4. hormonas(auxinas) fueron evaluados mediante la extracción de 7 diferentes métodos, con la intención de determinar cuáles son los más eficientes en extracción general o selectiva de estos compuestos. Se analizo el porcentaje de masa seca contra masa húmeda de la macroalga dando como resultado un $5,9 \pm 0,26$ % de biomasa seca.

Se probaron distintas formas de obtener los extractos, con la finalidad de ver cuáles de ellos presentan mayores concentraciones de pigmentos, sin embargo, para las pruebas de toxicidad se dio preferencia a las soluciones acuosas para evitar la presencia de alcohol.

3.1 Antioxidante

La actividad Antioxidante fue medida en base a su porcentaje de inhibición cuando es medida en base al estándar de trolox. Los extractos que presentaron mayor porcentaje de inhibición fueron metanol (56,86%), agua etanol sin moler (53.73%), agua etanol molido (52.38%) Congelado/Descongelado (52.51%), siendo el más bajo agua caliente/molida (31,8% grafico 3.4). Debido a la diferencia en las técnicas de extracción (solventes y temperatura) existe una diferencia entre los biocompuestos que se puede arrastrar en base a la afinidad y la forma en que se rompe las células de las macroalgas, por ejemplo, el agua caliente puede desnaturalizar algunos compuestos de interés lábiles como la ficoeritrina el cual se conoce como potente antioxidante afectando la concentración final de la medición.

El mejor solvente para la extracción de biocompuestos (antioxidantes) son los compuestos apolares (alcoholes), según estudios sobre *A. spicifera* (Nurul Aili Zakaria, et al, 2011) (Echavarria Z, et.al. 2009). Los principales compuestos comunes que se extraen con solventes apolares son acidos grasos, flavonoides, polifenoles que estan estrechamente relacionados con la actividad antioxidante.

Finalmente se logró evidenciar que existen diferencias significativas ($p > 0.05$) para la actividad antioxidante (% actividad) entre los distintos tipos de extractos formándose un total de 5 grupos, figura 3.1 en los cuales se evidencia los distintos grados de afinidad de los compuestos a solventes orgánicos e inorgánicos y su posible desnaturalización ante la temperatura (Nurul Aili Zakaria, et.al. 2011).

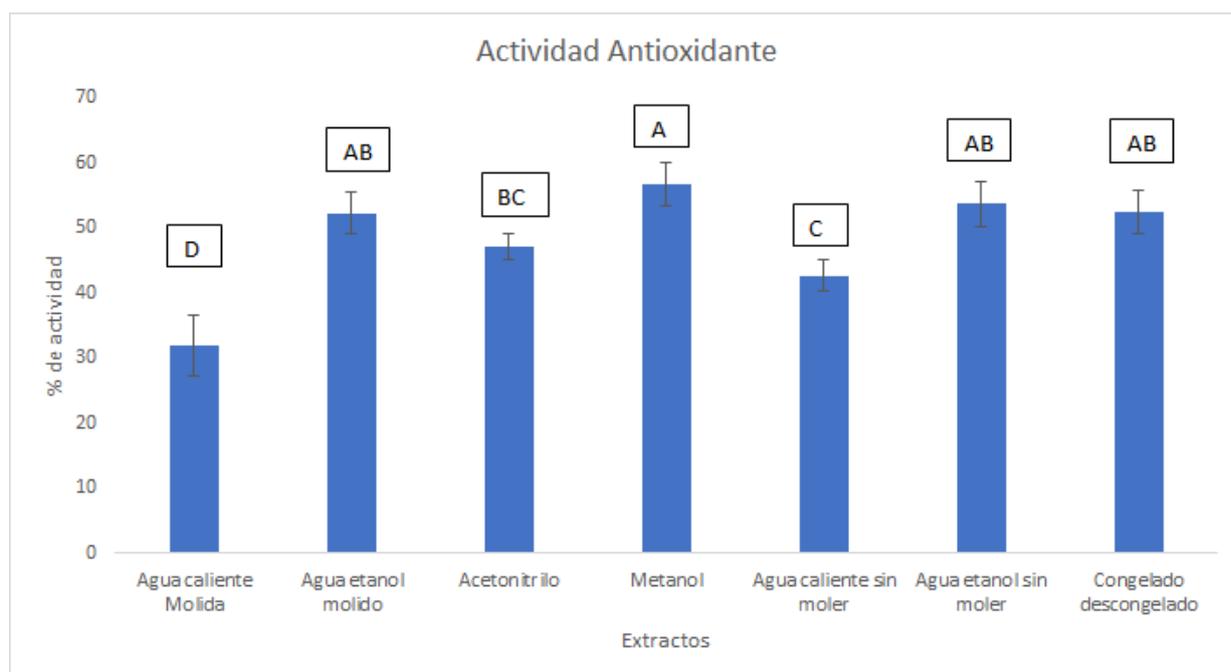


Figura 3.1 Actividad antioxidante de los diferentes extractos medidos en porcentaje de inhibición

3.2 Fenoles

Para medir el contenido de fenoles totales en los distintos extractos de *A.spicifera* se realizó una equivalencia de mg de ácido gálico (estándar) en la cual se pudo observar que la extracción sin calentamiento y con solventes inorgánicos (agua) presentaron las mayores concentraciones congelado y descongelado ($3.42 \mu\text{g/ml}$), seguido de las extracciones 50% agua y 50%etanol ($2.47 \mu\text{g/ml}$) y agua caliente sin moler ($2.13 \mu\text{g/ml}$). El resto de los extractos tuvieron concentraciones por debajo de ($1.5 \mu\text{g/ml}$).

Existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los métodos de extracción generándose 5 grupos, figura 3.2. Los solventes no polares presentaron una mejor extracción para los compuestos fenólicos crudos, sin embargo; este hallazgo no concuerda con los estudios realizados por (Koivikko R, Loponen J, Honkanen T, Jormalainen, 2005) quien comparó la eficiencia de extracción de los compuestos polifenólicos del alga *Fucus vesiculosus* utilizando solventes polares (25.125 ± 0.331 a $40.583 \pm 1.161 \mu\text{g}/\text{mg}^{-1}$). Los compuestos fenólicos suelen ser más afines a solventes orgánicos polares que al agua, no obstante, existen ciertos fenoles que suelen tener afinidad por solventes inorgánicos y es por esta razón que algunos de los métodos de extracción más eficientes resultan de la mezcla de fracciones acuosas con etanol y/o metanol.

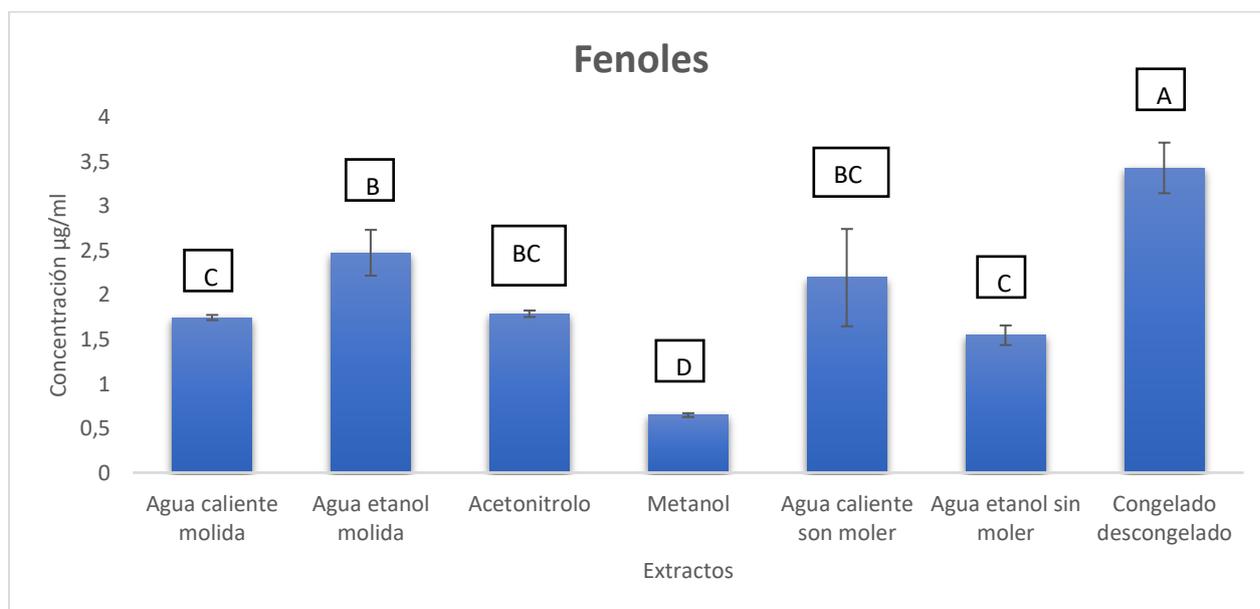


Figura 3.2 Concentración de fenoles totales (mg/ml) de los diferentes extractos en *A. spicifera*.

3.3 Pigmentos

Se ha determinado que existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la concentración de clorofila *a* en los diferentes métodos de extracción formándose 6 grupos, figura 3.3 donde destaca el acetonitrilo ($15 \mu\text{g}/\text{ml}$) en la cantidad de pigmentos fotosintéticos que puede arrastrar de cada extracto, el resto de los métodos de extracción estuvieron por debajo de ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) aunque existe ligeras diferencias para el resto de los extractos estas son significativas.

La actividad antioxidante y Pro-oxidante de las algas *Linnaeus*, *Fucus serratus Linnaeus* y *Ascophyllum nodosum* no solo se debe al contenido de alfa-tocoferoles sino también a los compuestos con efecto sinérgico, metabolitos aislados de las algas, algunos de estos compuestos son La clorofila a, contenido de carotenoides, lípidos solubles. (Dos Santos et,al. 2004) realizo pruebas de actividad antioxidante de algunas algas de indonesia donde determino que los extractos metanólicos de estas contenían compuestos polifenólicos debido a la presencia de carotenoides totales y clorofila a. Por otro lado (Fallarero et,al. 2006) concluyo que la actividad antioxidante se encuentra relacionada con el ácido ferúlico, sin embargo, cuando se administra con otros ácidos fenólicos no se obtiene la misma actividad que el extracto crudo, haciendo suponer que las propiedades antioxidantes también dependen de los componentes del extracto.

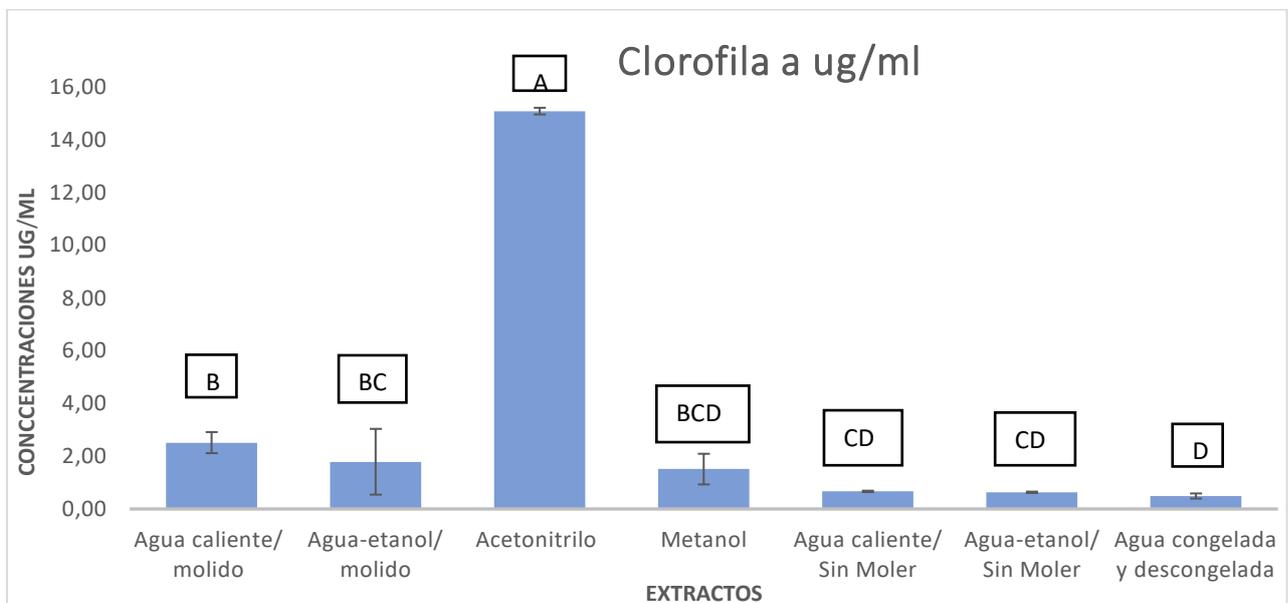


Figura 3.3 Concentraciones de clorofila a, medida en $\mu\text{g/ml}$ de los diferentes extractos.

Se ha determinado que existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la concentración de carotenoides en los diferentes métodos de extracción formándose 5 grupos donde la concentración que destaca es agua caliente con alga molida ($4.31 \mu\text{g/ml}$), seguido de la extracción con acetonitrilo ($3,41 \mu\text{g/ml}$) figura 3.4

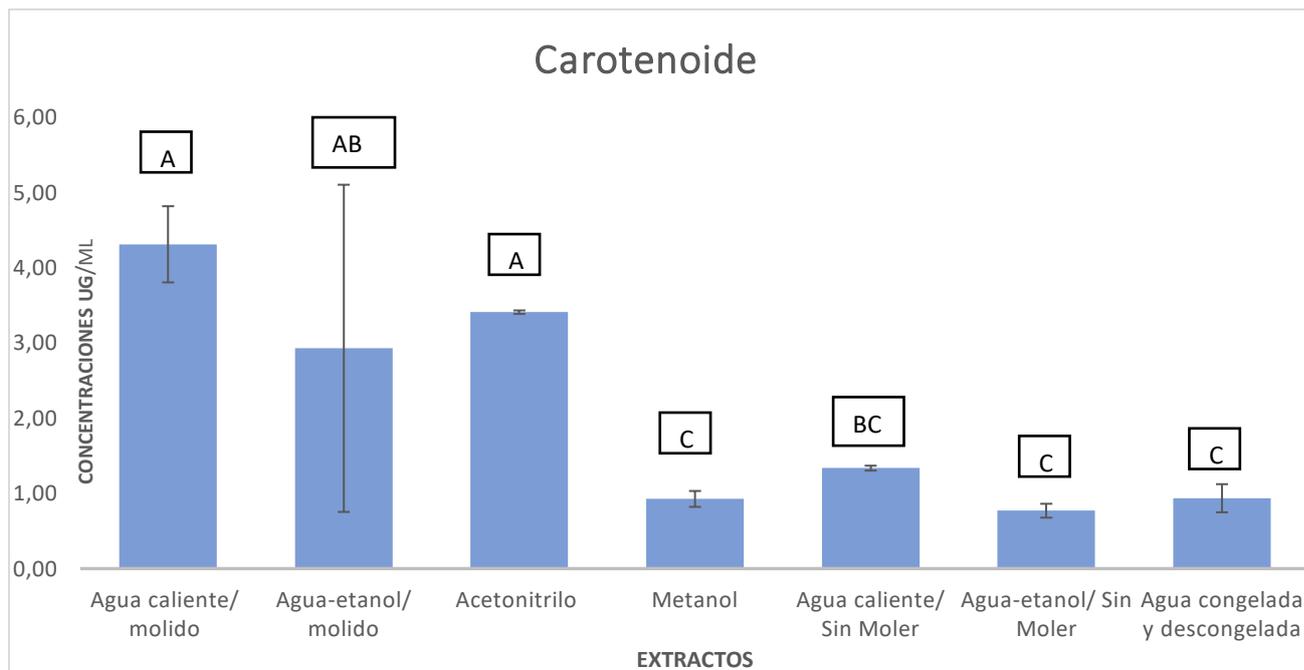


Figura 3.4 Concentraciones de carotenoides medidas en µg/ml de los diferentes extractos

Se ha determinado que existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la concentración de ficoeritrina en los diferentes métodos de extracción formándose 2 grupos figura 3.5 donde destaca el Acetonitrilo (0,09 µg/ml), seguido del Agua caliente/molida (0,07 µg/ml) mientras que el de menor concentración fue el de Agua etanol/ sin moler (0,02 µg/ml).

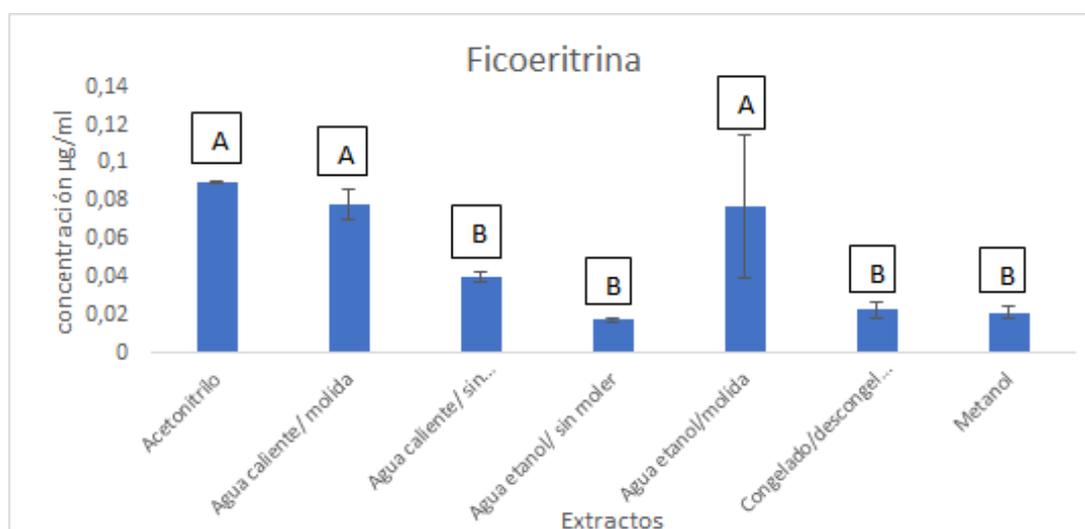


Figura 3.5 Concentraciones de ficoeritrina medida en µg/ml de los diferentes extractos.

3.4 Auxinas

Para las concentraciones de Auxinas el extracto Agua caliente sin moler tubo las mejores concentraciones (113,42 $\mu\text{g/ml}$) seguido de metanol (100.14 $\mu\text{g/ml}$) y agua etanol molido (83.14 $\mu\text{g/ml}$). las concentraciones más bajas las obtuvo el extracto congelado/descongelado (12.08 $\mu\text{g/ml}$) figura 3.7. Existe diferencias significativas entre el Agua caliente sin moler del resto de los extractos ($p < 0.05$), solo no existieron diferencias significativas entre Agua caliente molida y Agua etanol sin moler ($p > 0.05$).

Algunos autores concuerdan que el alga marina tiene efecto bioestimulante de los extractos, esta se debe a la acción combinada de todos los componentes presentes en la formulación, se ha identificado auxinas, citocininas, giberelinas, poliaminas, entre otros (Crouch y van Staden, 1993; Tarakhovskaya et al., 2007; Yokoya et al., 2010; Craigie, 2011; Yalçin et al., 2019); sin embargo, en cuanto a la cantidad y actividad las auxinas es el compuesto más relevante que regula el crecimiento de las plantas (Stirk y van Staden, 1997; Wally et al., 2013).

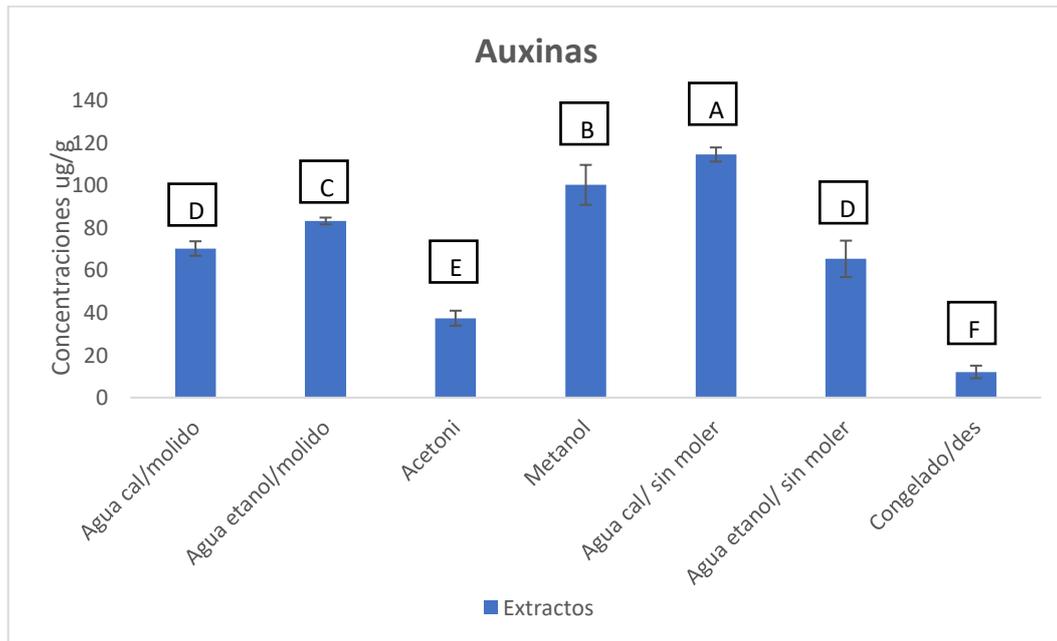


Figura 3.6 Concentraciones de auxinas medidas en $\mu\text{g/ml}$ de los diferentes extractos

3.5 Toxicidad

Para determinar la viabilidad de los compuestos, es necesario saber la tolerancia de los organismos a distintos extractos y concentraciones de *A.spicifera*. Para esto PL -12 que han sido seleccionados en base a criterios de calidad y que gozaban de buena salud serán expuestos a concentraciones medias, bajas y altas (5,10,15 mg/ml). La intención de esta prueba es determinar en base al LC50 cuales son las concentraciones no toxicas en las que pueden ser aplicados estos compuestos en exposición directa a las postlarvas de camarón.

Al analizar la gráfica 3.8 en la cual se contrasto el tipo de extracto, concentración versus la supervivencia en el tiempo se pudo evidenciar que el extracto congelado y descongelado resulto ser el menos toxico en todas sus concentraciones, seguido del alga molida agua etanol. Para el resto de los tratamientos la mortalidad se dio en las 3 horas, lo que significa que tienen una toxicidad intermedia-alta (10,15 mg/ml).

Según (pompermayer L., 2013) que realizó análisis de toxicidad de varias especies de macroalgas entre ellas 4 *Rhodophytas* determinó que según un protocolo concentraciones que causen un LC50 con una concentración menor de 1mg/ml son toxicas dandole como resultado que *Hypnea musciformis* era toxica mientras que *Laurencia dendroidea*, *Ochtodes secundiramea*, *Pterocladella capillacea* no las considero toxicas ya que presentaron un LC50 mayor a 1mg/ml que en nuestro caso las concentraciones probadas fueron mucho mayores y podríamos considerarlas no toxicas.

Estado PL	Tipo de Extractos	Extractos	Concentraciones	tiempo					
				30min	3hr	6hr	9hr	12hr	15hr
PL-12	Agua caliente molido	E1	C1	100% supervivencia	83% supervivencia	42% supervivencia	0		
			C2	66% supervivencia	0				
			C3	0					
PL-12	Agua caliente sin moler	E2	C1	100%, 30% letargia	0				
			C2	0					
			C3	0					
PL-12	Congelado y Descongelado	E3	C1	100% supervivencia	100% supervivencia	100% supervivencia	42% supervivencia	30% de supervivencia	0
			C2	92% supervivencia, 33% de letargia	92% supervivencia, 33% de letargia	17% de supervivencia	0		
			C3	0					
PL-12	Agua con etanol molido	E4	C1	100% de supervivencia	25% de supervivencia, 25% de letargia	0			
			C2	0					
			C3	NO SE TESTEO					
PL-12	Agua con etanol sin moler	E5	C1	100% de supervivencia y	0				
			C2	0					
			C3	0					
		Control	C	100% de reproducidos	100% de reproducidos	100% de reproducidos	R1 1larva con letargia	100% de reproducidos	R1 y R2: vivas

Figura 3.7 Porcentaje de supervivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei*.

3.6 Actividad Antimicrobiana Y Bioluminiscencia

3.6.1 Bioluminiscencia

La bioluminiscencia es una medición indirecta de la actividad virulenta de bacterias bioluminiscentes la cual se mide en el porcentaje de inhibición de los extractos probados. Los extractos que presentaron mayor porcentaje de inhibición fueron agua/etanol sin moler en concentración de 0,1mg/ml (88,19%), agua caliente molida en concentración de 0,1 mg/ml (67,76%), congelado/descongelado en concentración de 0,0001 mg/ml (63,13%) siendo el más bajo Agua caliente sin moler en la concentración 0,0001 mg/ml (13,75%) gráfica 3.7. Finalmente se lograr evidenciar que existen diferencias significativas ($p>0.05$) para la bioluminiscencia entre los distintos tipos de extractos formándose un total de 7 grupos.

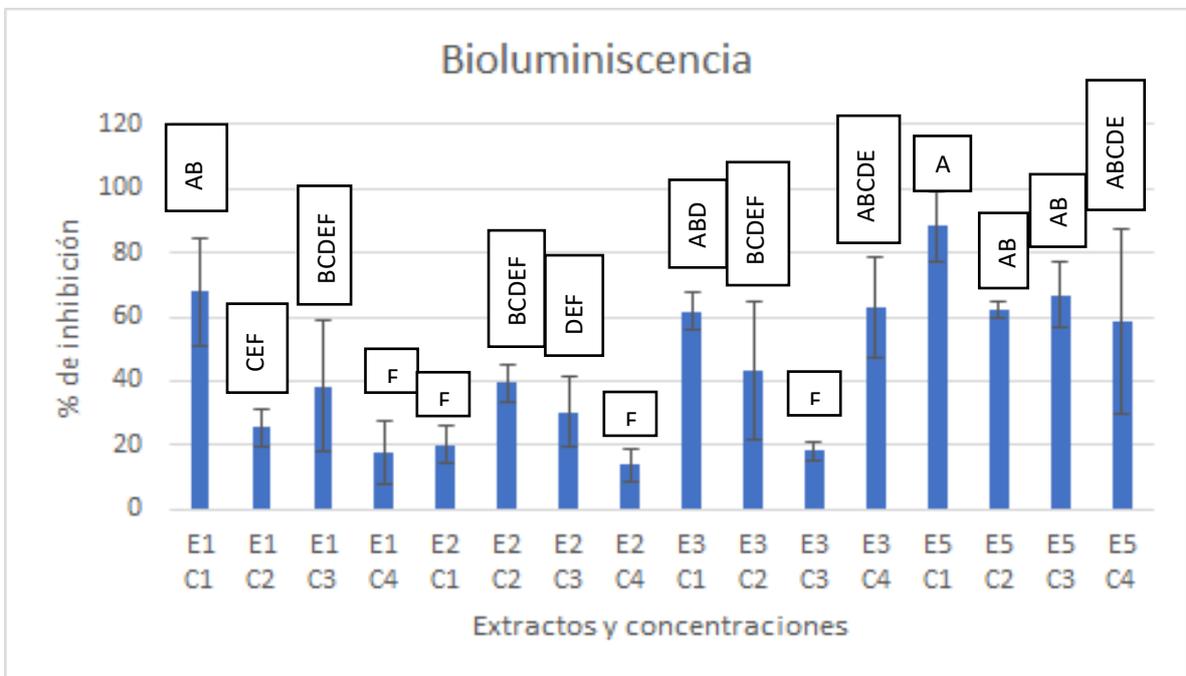


Figura 3.8 Concentraciones de Bioluminiscencia medidas en % de inhibición de los diferentes extractos. E1: Agua caliente molida, E2: Agua caliente sin moler, E3: Congelado/descongelado, E5: Agua etanol sin moler, C1: 0,1mg/ml, C2: 0,01mg/ml, C3: 0,001 mg/ml, C4: 0,0001 mg/ml.

3.6.2 Actividad Antimicrobiana

Todos los extractos fueron evaluados a distintas concentraciones contra 4 cepas del género *Vibrio* (*V.harveyi*, *V. vulnificus*, *V.campbelli*, *V. parahaemolyticus*) para determinar la actividad antimicrobiana de los distintos tipos de extractos en el control de bacterias de impacto para el cultivo de camarón.



Figura 3.9 Extracto de *Acanthophora spicifera*

Ninguno de los extractos probados en cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, *harveyi* y *campbelli* presentaron actividad antibacteriana a las concentraciones probadas. Sin embargo, si hubo inhibición en el *V. vulnificus* por parte del extracto agua caliente molida y agua etanol sin moler. Es importante destacar, como se observa en la imagen (3.10 a, b) que frente a estos patógenos existió una interacción entre los biocompuestos y la bacteria, observándose una mancha oscura sobre el disco de exposición a los extractos, correspondientemente fue más oscura la mancha en las concentraciones más altas. Esta interacción es atribuible a la bacteria + extracto la cual fue verificada por la exposición sin bacteria + extractos (solo agar), donde se observó que no existió ninguna reacción en esta combinación.

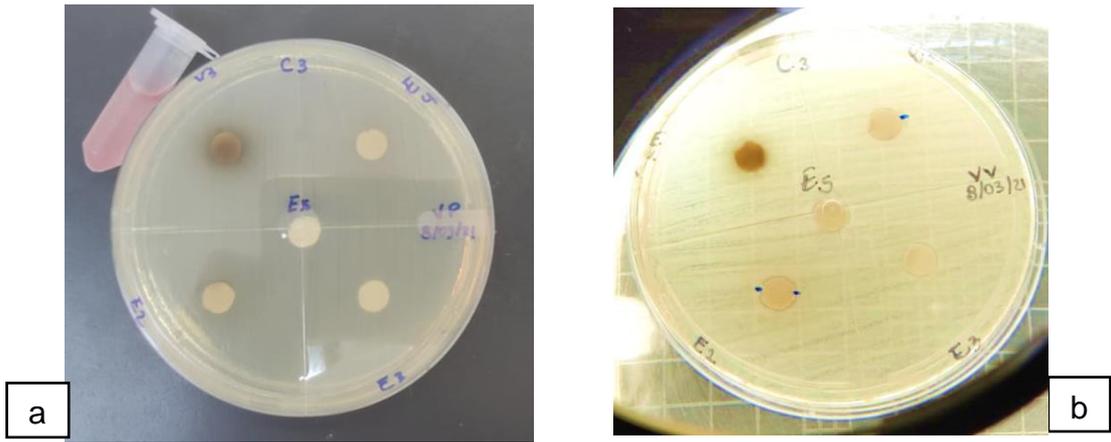


Figura 3.10 Interacción entre la bacteria y los compuestos de *A. spicifera*.

a. *Vibrio parahaemolyticus*, b. *Vibrio vulnificus*

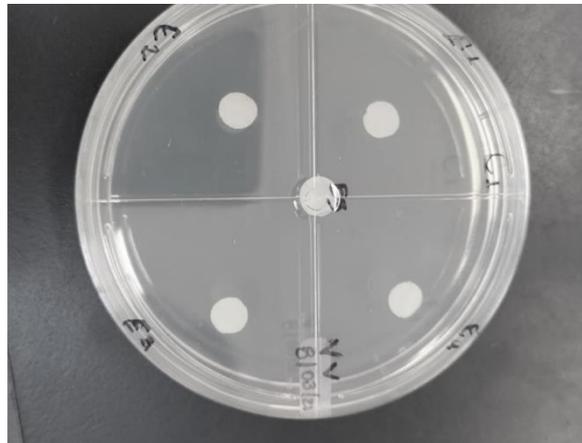


Figura 3.11 Exposición sin bacteria + extracto, hubo reacción de mancha oscura

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES

- La especie de macroalga roja *Acanthophora spicifera* al analizar la bioactividad presenta un contenido alto en antioxidantes con 56,86% de inhibición, en Auxinas con 114,43 µg/g, en Fenoles 3,42 µg/ml, Clorofila A 2,51 µg/ml, Carotenoides 4,31 µg/ml, Ficoeritrina 0,07 µg/ml en comparación con otras especies de macroalgas según la (Echavarría et,al. 2009) (Koivikko et,al. 2005).
- Los ensayos de toxicidad mostraron que tiene una menor toxicidad en extractos cuyo solvente era el agua, en estos casos las concentraciones que mejores resultados dieron (15,10 y 5 mg/ml) con el extracto congelado/descongelado y agua caliente con alga molida. Para los extractos con solventes orgánicos la toxicidad fue mucho más marcada inclusive en concentraciones bajas y poco tiempo (hasta las 3 horas).
- Los extractos de agua caliente molida y agua etanol sin moler de *Acanthophora spicifera* en cuanto a la actividad microbiana mostraron inhibición en el crecimiento de las bacterias en las concentraciones (15 mg/ml) para la cepa de *V. vulnificus*.
- En la prueba de control antivirulencia de los diferentes extractos se observó que los extractos a base de 50% agua y 50% alcohol obtuvieron hasta un 70% de inhibición en la bioluminiscencia (*Vibrio harveyi*) con lo cual se considera que podría ser una buena alternativa para el control del impacto de patógenos.

4.1 RECOMENDACIONES

- Se observó una reacción de oscurecimiento (en la zona de contacto del extracto y la bacteria), esta interacción no ocurre en el agar libre de bacteria, por lo tanto, es importante estudiar a que se debe esta reacción y averiguar si se debe a la inhibición del crecimiento de la bacteria o algún tipo de intervención en el control de la virulencia.

- Hemos podido observar que según el tipo de extracto hay variaciones en su composición bioquímica, es recomendable explorar extracciones dirigidas a efectos específicos según el biocompuesto de interés.
- Realizar la caracterización bioquímica de la macroalga *A. Spicifera* en diferentes épocas del año debido a que la composición puede variar.
- En el futuro será indispensable identificar de forma precisa cuales son los biocompuestos que generan efectos benéficos en el camarón y cuales ayudan a controlar la microbiota.
- Es necesario desarrollar tecnología de cultivo para no depender de la biomasa del ambiente que puede genera un impacto debido a la extracción.
- Dos de los mejores hallazgos fueron la baja toxicidad y la alta actividad antioxidante en *A. spicifera* lo que hace que sea una alternativa de bajo impacto ambiental para optimizar la producción de camarones en Ecuador.

5. BIBLIOGRAFIA

- Agurto, M. G. (2011). *Cenaim/Espol - Selección Y Evaluación De Concentraciones De Extractos Naturales Con Potencial Actividad Antibacterial, Antioxidante E Inmunoestimulante Sobre El Camaron Penaeus (Litopenaeus) Vannamei*". Obtenido De Cenaim/Espol - Selección Y Evaluación De Concentraciones De Extractos Naturales Con Potencial Actividad Antibacterial, Antioxidante E Inmunoestimulante Sobre El Camaron Penaeus (Litopenaeus) Vannamei" : [Http://Www.Cenaim.Espol.Edu.Ec/Sites/Cenaim.Espol.Edu.Ec/Files/AGURTO_0.Pdf](http://www.cenaim.espol.edu.ec/sites/cenaim.espol.edu.ec/files/AGURTO_0.Pdf)
- Aili N., Ibrahim D., Sulaiman S., Afifah N. (2011). *Assessment Of Antioxidant Activity, Total Phenolic Content And Invitro Toxicity Of Malaysian Red Seaweed, Acanthophora Spicifera*. Malaysia: ISSN.
- Alberto Couce Rodriguez, Javier Cremadez. (2009). *Centro De Investigaciones Avanzadas- Optimización Del Cultivo En Tanque De Distintas Especies De "Lechuga De Mar" (Ulva Spp., Chlorophyta)*. Obtenido De Centro De Investigaciones Avanzadas- Optimización Del Cultivo En Tanque De Distintas Especies De "Lechuga De Mar" (Ulva Spp., Chlorophyta): [Https://Ruc.Udc.Es/Dspace/Bitstream/Handle/2183/17641/Coucerodriguez_Alberto_TFM_2016.Pdf?Sequence=2&Isallowed=Y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/17641/Coucerodriguez_Alberto_TFM_2016.Pdf?Sequence=2&isallowed=Y)
- Álvarez, N. O. (2004). *Evaluación De Factores De Virulencia De Hongos Infecciosos En Camarón Blanco (Litopenaeus Vannamei)* . Obtenido De Evaluación De Factores De Virulencia De Hongos Infecciosos En Camarón Blanco (Litopenaeus Vannamei): [Https://Repositoriodigital.Ipn.Mx/Bitstream/123456789/14515/1/Ochoaa1.Pdf](https://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/14515/1/Ochoaa1.Pdf)
- Ambika, B. (2020). *Seaweed Extracts To Mitigate Aquatic Diseases*. Tamil Nadu: Biota Research Today.
- Anderson J., Valderrama D., Darryl E., Jory. (2019). *GOAL 2019: Revisión De La Producción Mundial De Camarones*. Responsible Seafood.
- Arteaga M, Silvestri J. . (1 De Enero De 1985). *Estudio De Las Sustancias Con Propiedades Antimicrobianas Extraordinarias De Algas Marinas Pertenecientes Al*

- Litoral Atlantico Colombiano I*. Obtenido De Evaluación De La Actividad Antimicrobiana De Las Sustancias Extraídas De *Hypnea Musciformis*, *Enteromorphae* Sp. :
[Https://Revistas.Unal.Edu.Co/Index.Php/Rccquifa/Article/View/56647/55561](https://Revistas.Unal.Edu.Co/Index.Php/Rccquifa/Article/View/56647/55561)
- Austin, B, Zhand,X. (2 De Agosto De 2006). *Scopus- Vibrio Harveyi Un Patógeno Importante De Vertebrados E Invertebrados Marinos* . Obtenido De Scopus- Vibrio Harveyi Un Patógeno Importante De Vertebrados E Invertebrados Marinos :
[Https://Www.Scopus.Com/Record/Display.Uri?Eid=2-S2.0-33745895666&Origin=Inward&Txgid=6604d80bc44061382408360ef683454f#](https://Www.Scopus.Com/Record/Display.Uri?Eid=2-S2.0-33745895666&Origin=Inward&Txgid=6604d80bc44061382408360ef683454f#)
- Austin, B. (2017). Diagnosis And Control Of Diseases Of Fish And Shellfish. En *Plants In Aquaculture* (Pág. 223). Wiley .
- Barrios, J. (2005). *Dispersión Del Alga Exótica Kappaphycus Alvarezii (Gigartinales:Rhodophyta) En La Región Nororiental De Venezuela*. Obtenido De Dispersión Del Alga Exótica Kappaphycus Alvarezii (Gigartinales:Rhodophyta) En La Región Nororiental De Venezuela:
[Https://Core.Ac.Uk/Download/Pdf/235929537.Pdf](https://Core.Ac.Uk/Download/Pdf/235929537.Pdf)
- Blanco A., G. R. (2020). *Evaluación De La Actividad Antivirulencia De Aceites Esenciales Contra Pseudomonas Aeruginosa*. Chapingo: Revista Fitotecnia Mexicana.
- Carvalho A., Batista D., Dobretsov S., Coutinho R. (2016). *Extract Of Seaweed As Potential Inhibitors Of Quorum Sensing And Bacterial Growth*. Rio De Janeiro: Crossmark.
- Cedeño Kristell, Ramírez Gregory. (2020). *Evaluación De La Capacidad De Adsorción En Biomasa Del Alga Roja (Acanthophora Spicifera) Para La Remoción Del Ión Cobre (Cu+2) En Soluciones Acuosas.*. Obtenido De Evaluación De La Capacidad De Adsorción En Biomasa Del Alga Roja (Acanthophora Spicifera) Para La Remoción Del Ión Cobre (Cu+2) En Soluciones Acuosas.:
[Http://Repositorio.Ug.Edu.Ec/Bitstream/Redug/51151/1/BCIEQ-T-0573%20Miranda%20Cede%C3%B1o%20Kristell%20Nicole%3b%20Parrales%20Ram%C3%Adrez%20Gregory%20Xavier.Pdf](http://Repositorio.Ug.Edu.Ec/Bitstream/Redug/51151/1/BCIEQ-T-0573%20Miranda%20Cede%C3%B1o%20Kristell%20Nicole%3b%20Parrales%20Ram%C3%Adrez%20Gregory%20Xavier.Pdf)

- Chávez Marina, Llanos Kimberly. (2015). *Estudio De La Actividad Antibacteriana De Diferentes Ácidos Orgánicos Sobre Distintas Bacterias Gram Negativas De Importancia En La Industria Acuicola*. Guayaquil: ESPOL.
- Christopher Waters, Bonnie Bassler. (28 De Junio De 2005). *Sensor De Quorum: Comunicación De Célula A Célula En Bacterias*. Obtenido De Sensor De Quorum: Comunicación De Célula A Célula En Bacterias : <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Chuaya N., Zambrano Héctor. (2015). *Eficiencia Del Uso De Un Complejo De Ácidos Orgánicos En El Cultivo De Camarón (Litopenaeus Vannamei) En Una Camaronera Del Recinto Pagua Del Cantón Guabo De La Provincia De El Oro*. Guayaquil: ESPOL.
- Consuegra, V. (2014). *Extracción De Antioxidantes Polifenólicos Desde Macroalgas Macrosystis Pyrifera Y Ulva Rigida*. Obtenido De <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/132021/extraccion-de-antioxidantes-polifenolicos-desde-macroalgas.pdf?sequence=4&isallowed=y>
- Córdova A., Salmerón H., Valle A., Guzmán A. (2010). *Respuesta Inmune Y Antioxidante En Camarón Blancolitopenaeus Vannamei, Expuesto A Inmunoestimulantes Y Probióticos*. Nutrición Acuicola.
- Cremades J., Cañavate J., Fernandez J., Ojeda J. (2020). *Observatorio-Acuicultura*. Obtenido De Elaboración De Indicadores De Sostenibilidad Para La Explotación De Macroalgas En España: https://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/imagenes/adjuntos/libros/indicadores_macroalgas_esp_apromar.pdf
- Dawood M., Basuini M., Zaineldin A., Yilmaz S., Tawheed M., Ahmadifar E., El Asely, Alagawany M., Abu-Elala N., Van Doan H., Sewilam H. (2021). *Antiparasitic And Antibacterial Functionality Of Essential Oils: An Alternative Approach For Sustainable Aquaculture*. Egypt: Pathogens.
- Diego V., Cai J., Hishamunda N., Ridler N., Neish I., Hurtado A., Msuya F., Krishnan R., Kronen M., Robledo., Gasca E., Fraga J. (2015). *The Economics Of Kappaphycus*

Seaweed Cultivation In Developing Countries: A Comparative Analysis Of Farming Systems. Rome: Taylor & Francis.

Do Nascimento Vieira, F., Bolivar, N. C., Chamorro Legarda, E., Quadros Seiffert, W., & Hayashi, L. (2017). *Aditivos Alimentarios Para Camarones Marinos: Sauid Y Nutrición*. Florianópolis: Universidad Federal De Santa Catarina.

Domínguez-Borbor C., Sánchez A., Sannenholtzner S. (2020). *Essential Oils Mediated Antivirulence Therapy Against Vibriosis In Penaeus Vannamei*. Loja: Aquaculture.

Dos Santos RM, Horta P, Fett R. (2004). Actividade Antioxidante In Vitro De Extratos De Algumas Algas Verdes (Chlorophyta) Do Litoral Catarinense. *Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas*, 495-503.

Echavarría B., Francos A., Martínez A. (2009). *Evaluación De La Actividad Antioxidante Y Determinación Del Contenido De Compuestos Fenólicos En Extractos De Macroalgas Del Caribe Colombiano*. Medellín: Revista De La Facultad De Química Farmacéutica.

ECHAVARRIA Z, FRANCO S, MARTINEZ M. (14 De Septiembre De 2021). *Scielo* . Obtenido De Evaluación De La Actividad Antioxidante Y Determinación Del Contenido De Compuestos Fenólicos En Extractos De Macroalgas Del Caribe Colombiano:

[Http://Www.Scielo.Org.Co/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S0121-40042009000100015&Lng=En&Tlng=Es.](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000100015&lng=en&tlng=es)

Ee Eun Han, D.V.M. Ph.D. Kathy F.J. Tang, Ph.D. Luis F. Aranguren, Ph.D. Patharapol Piamsomboon, D.V.M., Ph.D. Seung Hye Han, M.A. (10 De Febrero De 2017). *Global Aquaculture Advocate - Cuatro Cepas De AHPND Identificadas En Granjas De Camarón De América Latina*. Obtenido De Cuatro Cepas De AHPND Identificadas En Granjas De Camarón De América Latina: [Https://Www.Aquaculturealliance.Org/Advocate/Cuatro-Cepas-De-Ahpnd-Identificadas-En-Granjas-De-Camaron-De-America-Latina/](https://www.aquaculturealliance.org/advocate/cuatro-cepas-de-ahpnd-identificadas-en-granjas-de-camaron-de-america-latina/)

Espinosa Andrews, . García Marquez, Gastélum Martínez. (Diciembre De 20016). *Compuestos Bioactivos* . Obtenido De Compuestos Bioactivos : [Https://Www.Researchgate.Net/Profile/Rogelio-Rodriguez-](https://www.researchgate.net/profile/Rogelio-Rodriguez-)

Rodriguez/Publication/317275062_ACIDOS_GRASOS_CLASIFICACION_E_IMPORTANCIA_EN_LA_SALUD_HUMANA/Links/593405f745851553b6da2e6f/ACIDOS-GRASOS-CLASIFICACION-E-IMPORTANCIA-EN-LA-SALUD-HUMANA.Pdf#Page=8

Esquivel E., N. R.-M. (2012). *Plantas Utilizadas En La Medicina Tradicional Mexicana Con Propiedades Antidiabéticas Y Antihipertensivas*. Michoacán: Revista De La DES Ciencias Biologicas Agropecuarias.

Fallarero A, Peltoketo A, Loikkanen J, Tammela P, Vidal A, Vuorela P. (2006). Are Cinnamic Acids Responsible For In Vitro Neuroprotection Exerted By Bryothamnion Triquetrum (S.G.Gmelin) . *Planta Medica* , 72-80.

FAO. (2000). *La Industria De Las Algas Marinas* . Obtenido De La Industria De Las Algas Marinas : [Http://Www.Fao.Org/3/Y3550s/Y3550S04.Htm#3.6%20Otros%20usos%20de%20las%20algas%20marinas](http://www.fao.org/3/Y3550s/Y3550S04.htm#3.6%20Otros%20usos%20de%20las%20algas%20marinas)

FAO. (Noviembre De 2002). *Participación De La FAO En La Industria De Las Algas Marinas: Propuestas*. Obtenido De Participación De La FAO En La Industria De Las Algas Marinas: Propuestas: [Http://Www.Fao.Org/3/Y3550s/Y3550S06.Htm](http://www.fao.org/3/Y3550s/Y3550S06.htm)

FAO. (3 De Mayo De 2013). Obtenido De Secretaría General Del Sistema De La Integración Centroamericana -Institución Integrada Al Portal Del SICA: [Https://Www.Sica.Int/Busqueda/Noticias.aspx?Iditem=77979&Idcat=2&Ident=47](https://www.sica.int/Busqueda/Noticias.aspx?Iditem=77979&Idcat=2&Ident=47)

FAO. (2017). *El Uso De Antimicrobianos En La Acuicultura En América Latina: Desafíos Y Perspectivas Futuras*. LIMA: FAO.

FAO. (2020). *El Estado Mundial De La Pesca Y La Acuicultura*. Roma: FAO.

Fleurence J. (1999). *Seaweed Proteins: Biochemical, Nutritional Aspects And Potential Uses*. Francia: Trends In Food Science & Technology.

G. Cárdenas, G. Arrazola Y M. Villalba. (Julio De 2015). Frutas Tropicales: Fuente De Compuestos Bioactivos Naturales En La Insutria De Alimentos. *INGENIUM*, Pág. 12.

- García Pérez, J., & Marroquín Mora, D. (2021). *Evaluación In Vitro De Extractos De Plantas Medicinales Como Posibles Agentes Antimicrobianos Para Bacterias Patógenas En Tilapia*. San Carlos, Guatemala: Multidisciplinary Health Research.
- Gary G. Martin, Nicole Rubin, Erica Swanson. (5 De Julio De 2004). *Sciencedirect - Vibrio Parahaemolyticus And V. Harveyi Cause Detachment Of The Epithelium From The Midgut Trunk Of The Penaeid Shrimp Sicyonia Ingentis*. Obtenido De Sciencedirect - Vibrio Parahaemolyticus And V. Harveyi Cause Detachment Of The Epithelium From The Midgut Trunk Of The Penaeid Shrimp Sicyonia Ingentis: [Http://Www.Int-Res.Com/Abstracts/Dao/V60/N1/P21-29/](http://www.int-res.com/abstracts/dao/v60/n1/p21-29/)
- 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.
- Gracia, A., Medellín-Mora, J., Gilagudelo, D.L. Y V. Puentes (Eds.). (2011). Guía De Las Especies Intoducidas Marinas Y Costeras De Colombia. En INVEMAR, *Guía De Las Especies Intoducidas Marinas Y Costeras De Colombia*. (Pág. 136). Bogotá, Colombia: INVEMAR. Obtenido De INVEMAR, Serie De Publicaciones Especiales No. 23.
- Graindorge A. Griffith. (12 De Marzo De 2000). *FAO- Amenazas Y Riesgos De La Introducción De Especies De Camarones Exóticas*. Obtenido De Amenazas Y Riesgos De La Introducción De Especies De Camarones Exóticas: [Http://Www.Fao.Org/3/A0086s/A0086s08.Htm](http://www.fao.org/3/A0086s/A0086s08.htm)
- H G MAUTNER, G M GARDNER, R PRATT. (0 De Mayo De 1953). *Antibiotic Activity Of Seaweed Extracts. II. Rhodomela Larix*. Obtenido De Antibiotic Activity Of Seaweed Extracts. II. Rhodomela Larix: [Https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/13052548/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13052548/)
- Hai, N. (2015). *The Use Of Probiotics In Aquaculture*. Bentley: Applied Microbiology.
- He W., R. S. (2017). *Effects Of Organic Acids And Essential Oils Blend On Growth, Gut Microbiota, Immune Response And Disease Resistance Of Pacific White Shrimp (Litopenaeus Vannamei) Against Vibrio Parahaemolyticus*. China: Fish & Shellfish Immunology.

- Hende, V. D. (2012). Microalgal Bacterial Floc Properties Are Improved By A Balanced Inorganic/Organic Carbon Ratio. *Biotechnology And Bioengineering*, 550-558.
- Heng Sing-Peng, Letchumanan Vengadesh, Deng Chuan-Yan, Ab Mutalib Nurul-Syakima, Khan Tahir M, Chuah Lay-Hong, Chan Kok-Gan, Goh Bey-Hing, Pusparajah Priyia, Lee Learn-Han. (2017). *Frontiers In Microbiology- Vibrio Vulnificus : An Environmental And Clinical Burden*. Obtenido De Frontiers In Microbiology- Vibrio Vulnificus : An Environmental And Clinical Burden: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00997>
- Henriques B., Rocha L., Lops C., Figueira P., Duarte A., Vale C., Pardal M., Pereira E. (2017). *A Macroalgae-Based Biotechnology For Water Remediation: Simultaneous Removal Of Cd, Pb And Hg By Living Ulva Lactuca*. Aveiro: Journal Of Environmental Management.
- Hessisen, N. (2016). *Prebióticos, Probióticos Y Sistema Inmune*. Universidad Complutense.
- Itxaso Montánchez, Vladimir R. Kaberdin,. (14 De Febrero De 2020). *Scimedirect - Vibrio Harveyi: A Brief Survey Of General Characteristics And Recent Epidemiological Traits Associated With Climate Change*,. Obtenido De Scimedirect - Vibrio Harveyi: A Brief Survey Of General Characteristics And Recent Epidemiological Traits Associated With Climate Change,: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113619305987#Bib13>
- Jha B., Kavita K., Westphal J., Hartmann A., Schimtt P. (2013). *Quorum Sensing Inhibition By Asparagopsis Taxiformis, A Marine Macro Alga: Separation Of The Compound That Interrupts Bacterial Communication*. Germany: Marine Drugs.
- Jorge, C. (Agosto De 2013). *Institute For International Cooperation In Animal Biologics*. Obtenido De Institute For International Cooperation In Animal Biologics: <https://www.cfsph.lastate.edu/factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Kaliaperumal N., Kalimuthu S., Ramalingam J. And Sei.Varaj M. (1986). *Experimental Field Cultivation Of Acanthophora Spicifera In The Nearshore Area Of Gulf Of Mannar*. Nadu: Regional Center Of Fisheries Research Institute.

- Kim J., Kim Y., Seo Y., Park S. (2007). Quorum Sensing Inhibitors From The Red Alga *Ahnfeltiopsis Flabelliformis*. En *Biotechnology And Bioprocess Engineering 2007* (Págs. 308-311). Korea: BBE.
- Koivikko R, Loponen J, Honkanen T, Jormalainen. (31 De Enero De 2005). *Springer*.
Obtenido De Ontents Of Soluble, Cell-Wall-Bound And Exuded Phlorotannins In The Brown Alga *Fucus Vesiculosus*, With Implications On Their Ecological Functions: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15839490/>
- Krammer, L. (2020). *Mercado A La Industria, Gobiernos: Soluciones Las Enfermedades Del Camarón*. Global Aquaculture Alliance.
- L. JAYASREE, 1P. JANAKIRAM, AND R. MADHAV. (Diciembre De 2006). *Journal Of The World Aquaculture Society - Characterization Of Vibrio Spp. Associated With Diseased Shrimp From Culture Ponds Of Andhra Pradesh (India)*. Obtenido De *Journal Of The World Aquaculture Society - Characterization Of Vibrio Spp. Associated With Diseased Shrimp From Culture Ponds Of Andhra Pradesh (India)*: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1749-7345.2006.00066.x>
- Lara A., Alberto C. (2014). *Eficiencia Del Uso De Ácidos Orgánicos En Camarón*. Guayaquil: ESPOL.
- Leaño E., Lavilla C., Paner M. (1998). *Bacterial Flora In The Hepatopancreas Of Pond-Reared Penaeus Monodon Juveniles With Luminous Vibriosis*. Philippines: Aquaculture.
- Ledea O. (2011). *Determinación De La Bioactividad In Vitro De La Polipapatita*. Habana: Researchgate.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L., & Tran, L. (2012). *Early Mortality Syndrome Affects Shrimp In Asia*. Obtenido De Global Aquaculture Alliance: <https://www.aquaculturealliance.org/pdf/GAA-Lightner-Jan12.pdf>
- Lorenzo De García A. (2015). *VI Workshop Probiotics, Prebiotics And Health: Scientific Evidence*. Madrid: Sepyp.

Luis Ernesto Aguilar, Francisco Flores, Jose Antonio Zertuche. (2014). *Algas Marinas No Nativas En La Costa Del Pacifico Mexicano*. Obtenido De https://biobc.info/biblioteca/84865191_selection.pdf

Magallanes, Et.Al . (29 De Abril De 2003). *Scielo- Actividad Antibacteriana De Extractos Etanóicos De Macroalgas Marinas De La Costa Central Del Perú*. Obtenido De Scielo- Actividad Antibacteriana De Extractos Etanóicos De Macroalgas Marinas De La Costa Central Del Perú: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332003000200003&lng=es&tlng=es.

Manefield M., Rasmussen T., Morten H., Andersen J., Steinberg P., Kjelleberg S., Givskov M. (2002). Halogenated Furanones Inhibit Quorum Sensing Trouhg Accelerated Luxr Turover. En *Microbiology* (Págs. 1119-1127). Sydney: Great Britain.

Martínez-Navarrete, N., Del Mar Camacho Vidal, M., & José Martínez Lahuerta, J. (2008). *Los Compuestos Bioactivos De Las Frutas Y Sus Efectos En La Salud*. Obtenido De Los Compuestos Bioactivos De Las Frutas Y Sus Efectos En La Salud: <https://sci-hub.se/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1138032208756232>

Mcvey, J. P. (1993). Obtenido De CRC Handbook Of Mariculture: Crustacean Aquaculture, Second Edition, Volumen 1: <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=H3uubpyeby0c&oi=fnd&pg=PA393&dq=Diseases+Of+Cultured+Shrimp,&ots=V4cdqvbenu&sig=Lcynbva6iwgmf6uwmfnkf05aya#v=onepage&q=Diseases%20of%20cultured%20shrimp%2C&f=false>

Mejías V, Et,Al. (2018). Revisión Sobre Aspectos Farmacológicos A Considerar Para El Uso De Antibióticos En La Camaronicultura. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 1-14.

- Melissa Miller, Bonnie Bassler . (2001). *Detección Del Quorum En Bacterias* . Obtenido De Detección Del Quorum En Bacterias : <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Mendoza, M. L. (Febrero De 1999). *Centro Austral De Investigaciones Cientificas, Conicet, Ushula - Las Macroalgas Marinas Bentonicas De Argentina* . Obtenido De Centro Austral De Investigaciones Cientificas, Conicet, Ushula - Las Macroalgas Marinas Bentonicas De Argentina: http://aquaticcommons.org/16707/2/CienciaHoy1999_9_50_40.pdf
- Michael M., Immanuel G. (2007). *Developing Feed For The Culture Of Brine Shrimp Artemia Franciscana Using Marine Algae As Major Dietary*. Tamilnadu: Selection Of Seaeeds.
- Moullac G., Phillip L., Saulnier D., Goarant C., Dehasque. (2000). *Principios Y Problemas Involucrados En La Evaluación De Inmunoestimulantes En Juveniles De Camarón*. La Paz.
- Muñiz, M. M. (Febrero De 2020). *Biosíntesis De Nanopartículas Con Extractos De Macroalgas, Caracterización Y Evaluación Contra Vibrio Parahaemolyticus Causante De La Enfermedad De Necrosis Hepatopancreática Aguda (Ahpnd/ Ems) En Camarón Blanco Litopenaeus Vannamei aguda (Ahpnd/ Ems) En Ca*. Obtenido De Biosíntesis De Nanopartículas Con Extractos De Macroalgas, Caracterización Y Evaluación Contra Vibrio Parahaemolyticus Causante De La Enfermedad De Necrosis Hepatopancreática Aguda (Ahpnd/ Ems) En Camarón Blanco Litopenaeus Vannamei.: <http://eprints.uanl.mx/19669/1/1080314189.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.
- Nackerdien A., Keynan A., Bassler B., Lederberg J., Thaler D. (2008). *Quorum Sensing Influences Vibrio Harveyi Growth Rates In A Manner Not Fully Accounted For By The Marker Effect Of Bioluminescence*. New Jersey: PLOSONE.

- Ni N., Choudhary G., Peng H., Li M., Chou H., Lu C., Gilbert E., Wang B. (2009). *Inhibition Of Quorum Sensing In Vibrio Harveyi By Boronic Acids*. Atlanta: Department Of Chemistry And Center For Biotechnology And Drug Design.
- Nurul Aili Zakaria, Darah Ibrahim, Shaída Fariza Sulaiman, Ni Afifah Supardy. (21 De Enero De 2011). *Industrial Biotechnology Research Laboratory, School Of Biological Sciences, Universiti Sains*. Obtenido De Assessment Of Antioxidant Activity, Total Phenolic Content And Invitro Toxicity Of Malaysian Red Seaweed, *Acanthophora Spicifera* : https://www.researchgate.net/profile/Afifah-Supardy/publication/286395213_Assessment_Of_Antioxidant_Activity_Total_Phenolic_Content_And_Invitro_Toxicity_Of_Malaysian_Red_Seaweed_Acanthophora_Spicifera/links/572bd0fc08aef7c7e2c6b924/Assessment-Of-Antioxida
- Nurul, Z. A. ; Darah, I. ; Shaída, S. F. ; Nor, S. A. (2010). *Screening For Antimicrobial Activity Of Various Extracts Of Acanthophora Spicifera (Rhodomelaceae, Ceramiales) From Malaysian Waters*. Pulau Pinang: Biological Science.
- Nys R., Wright A., König G., Sticher O. (1993). New Halogenated Furanones From The Marine Alga *Desilea Pulchra*. En *Tetrahedron* (Págs. 11213-11220). Zurich: Great Britain.
- Ochao L., Campoverde M., Reyes R. (2017). *Estudio Preliminar Del Extracto De Dos Plantas Medicinales Con Efecto Antibacteriano Para Uso En Acuicultura*. Machala: Aquatic.
- Olayiwola, A. (1993). *Las Plantas Medicinales: Un Tesoro Que No Debemos Desperdiciar*. Foro Mundial De Salud.
- P., Anderson Douglas. (1992). *IMMUNOSTIMULANTS, ADJUVANTS, AND VACCINE CARRIERS IN FISH: APPLICATIONS TO AQUACULTURE*. Virginia: Fish Diseases.
- Palanikumar P., Wahjuningrum D., Abinaya P., Michael M., Citarasu T. (2020). *Usage Of Plant Natural Products For Prevention And Control Of White Feces Syndrome (WFS) In Pacific Whiteleg Shrimp Litopenaeus Vannamei Farming In India*. Switzerland: Aquaculture International.

- Parek R., Doshi A., Chauhan V. (1989). *Polysaccharides From Marine Red Algae Acanthophora Spicifera, Grateloupia Indica Halymenia Porphyriodes*. Bhavnagar: Short Communications.
- Proveda C., Mora C. (2021). Acción Antibacterial De Los Aceites Esenciales Y Su Efecto Sobre El Crecimiento En El Cultivo De Camarón Blanco *Litopenaeus Vannamei*. *ISSUU*.
- Q., Wei. (2002). *Aquaculture Development. FAO Fish*. Obtenido De Social And Economic Impacts Of Aquatic Animal Health Problems In Aquaculture In China: [Http://Www.Fao.Org/3/Y3610e/Y3610e06.Htm](http://www.fao.org/3/Y3610e/Y3610e06.htm)
- Radulovich R., Umanzor S., Cabrera R. (2013). *Algas Tropicales: Cultivo Y Uso Como Alimento*. San José: Universidad De Costa Rica. Obtenido De https://www.researchgate.net/profile/Ricardo-Radulovich/publication/272168650_Algas_Tropicales_Cultivo_Y_Uso_Como_Alimento_2013_Tropical_Seaweeds_Cultivation_And_Use_As_Food/links/54dd0c190cf25b09b912e9fb/Algas-Tropicales-Cultivo-Y-Uso-Como-Alimento-2013-
- Rahim F., Wasoh H., Rafein M., Ariff A., Kapri R., Ramli N., Siew-Ling L. (2014). *Production Of High Yield Sugars From Kappaphycus Alvarezii Using Combined Methods Of Chemical And Enzymatic Hydrolysis*. Selangor: Food Hydrocolloids.
- Rasul H., Barrow C . (2020). *Bioactive Compounds From Plant Origin*. Florida: APPLE ACADEMIC PRESS.
- Rodriguez, S. S. (2017). *Situación Sanitaria En México: Caso Vibriosis Y AHPND*. Obtenido De Situación Sanitaria En México: Caso Vibriosis Y AHPND: [Www.Researchgate.Net/Publication/331561209_Situacion_Sanitaria_En_Mexico_Caso_Vibriosis_Y_AHPND](http://www.researchgate.net/publication/331561209_Situacion_Sanitaria_En_Mexico_Caso_Vibriosis_Y_AHPND)
- Rogelio, G. (2019). PLANTA. En *Ficocoloides* (Págs. 30-31). Nuevo Leon: ISSN.
- Rojas, M. M., Hernández Rodríguez, A., Rives Rodríguez, N., Tejera Hernández, B., Acebo Guerrero, Y., & Heydrich, M. (1 De Mayo De 2012). *Portal De Revista UN - PRODUCCIÓN DE ANTISUEROS PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO EN CULTIVOS DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL*. Obtenido De PRODUCCIÓN DE ANTISUEROS

PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO EN CULTIVOS DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL: <https://Revistas.Unal.Edu.Co/Index.Php/Actabiol/Article/View/24334/32833>

- Salomone V., Riera M., Muniain C. (2017). *Metales Y Metaloides De Importancias Ambiental En Macroalgas Marinas Del Litoral Argentino* . Santa Fe: Congreso Nacional De Ciencia Y Tecnología Ambiental.
- Shutterstock. (2015). *La Seguridad De Las Algas Marinas Puesta A Prueba*. Cordis.
- Sivaram V., Babu M., Immanuel G., Murugadass., Citarasu T., Marian M. (2004). *Growth And Immune Response Of Juvenile Greasy Groupers (Epinephelus Tauvina) Fed With Herbal Antibacterial Active Principle Supplemented Diets Against Bivrio Harveyi Infections*. Nadu: Aquaculture.
- Smith, P. (21 De Diciembre De 2000). *Sciencedirect - Diseases Of The Eye Of Farmed Shrimo Penaeus Monodon. Diseases Of Aquatic Organisms*. Obtenido De Sciencedirect - Diseases Of The Eye Of Farmed Shrimo Penaeus Monodon. Diseases Of Aquatic Organisms: <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v43/n3/p159-173/>
- Sowndarya J., F. S. (2019). *Agroo Food By-Products And Essential Oil Constituents Curtail Virulence And Biofilm Of Vibrio Harveyi*. Nadu: Microbial Pathogenesis.
- Suganya T, Renganathan S. (2012). *Optimization And Kinetic Studies On Algal Oil Extraction From Marine Macroalgae Ulva Lactuca*. India: Bioresource Technology.
- 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, Carina Miranda; Lin, Yong Chin; Li, Chang Che; Liou, Chyng Hwa; Chen, Jiann Chu. (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.

- Toledo A., Castillo N., Carrillo O., Arenal A. . (2018). *Probióticos: Una Realidad En El Cultivo De Camarones*. Camaguey: Revista Producción Animal.
- Tort L., Balasch J., Mackenzie S. (2004). *Fish Health Challenge After Stress. Indicators Of Inmunocompetence*. Barcelona: Contributions To Science.
- Tranl, Nunan L, Redman Rm, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV. . (9 De Julio De 2013). *Determination Of The Infectious Nature Of The Agent Of Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome Affecting Penaei Shrimp*. Obtenido De Determination Of The Infectious Nature Of The Agent Of Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome Affecting Penaei Shrimp: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23836769/>
- TURRILLAS, F. A. (15 De Diciembre De 2007). *PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS MEDIANTE MICROONDAS Y FLUIDOS PRESURIZADOS* . Obtenido De PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS MEDIANTE MICROONDAS Y FLUIDOS PRESURIZADOS : <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/10251/esteve.pdf>
- Urango L., Montoya G., Cuadros M., Henao D., Zapata P., Mira L., Castaño E., López Á, Vanegas C., Loaiza M., Gómez B. (2009). *Bioactive Compounds On Food And Health–Promoting Properties*. Antioquia: Perspectivas En Nutrición Humana.
- Vacca D, & Walsh R. (15 De Junio De 2006). *Journal Of The American Pharmaceutical Association*. . Obtenido De The Antibacterial Activity Of An Extract Obtained From *Ascoplyllum nodosum*.: https://www.researchgate.net/publication/229608448_The_Antibacterial_Activity_Of_An_Extract_Obtained_From_Ascoplbyllum_Nodosum/Citation/Download
- Varela Mejías, Alexander, & Alfaro Mora, Ramsés. (2018). Revisión Sobre Aspectos Farmacológicos A Considerar Para El Uso De Antibióticos En La Camaronicultura. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 1-14. Obtenido De Revisión Sobre Aspectos Farmacológicos A Considerar Para El Uso De Antibióticos En La Camaronicultura.: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172018000100001&script=sci_arttext

- Vega J., Gómez F., Guenaga L., Figueroa F., Gómez J. (2020). *Antioxidant Activity Of Extracts From Marine Macroalgae, Wild-Collected And Cultivated, In An Integrated Multi-Trophic Aquaculture System*. Málaga: Aquaculture.
- Vivot, E. P., Sánchez, C., Cacik, F., & Sequin, C. (2012). *Actividad Antibacteriana En Plantas Medicinales De La Flora De Entre Ríos (Argentina)*. Entre Rios: Ciencia, Docencia Y Tecnologia.
- Yu-Qing T., Mahmood K., Shedzade R., Furqan M. (2016). *Ulva Lactuca And Its Polysaccharides: Food And Biomedical*. China: Agriculture And Healthcare.
- Zygodlo J., L. A. (1995). *Empleo De Aceites Esenciales Como Antioxidantes Naturales*. Cordoba: Consejo Superior De Investigaciones Científicas.