



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EFICACIA ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS
HIDROALCOHÓLICOS DE MANGLE BLANCO Y ROJO
SOBRE CEPAS DE *Vibrio harveyi* Y *Vibrio campbellii* EN
CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*)**

Por:

Blanca Alicia Ramírez Azpilcueta

TESIS APROBADA POR LA

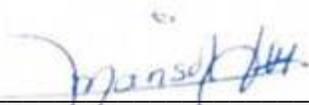
COORDINACIÓN DE ACUACULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Blanca Alicia Ramírez Azpilcueta la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Ma. Soledad Morales Covarrubias
Directora de Tesis



M.P.A. Noemí García Aguilar
Integrante del comité de tesis



M.C. Ana C. Puello Cruz
Integrante del comité de tesis



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Eficacia Antibacteriana de Extractos Hidroalcohólicos de Mangle Blanco y Rojo sobre Cepas de *Vibrio harveyi* y *Vibrio campbellii* en Camarón Blanco (*Penaeus vannamei*)” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Blanca Alicia Ramírez Azpilcueta, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por el apoyo prestado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C. unidad Mazatlán, por darme la oportunidad de realizar mi tesis dentro de sus instalaciones.

A la Dra. María Soledad Morales Covarrubias, por permitirme seguir en esta línea de investigación a su lado, compartiendo sus conocimientos, así como ser mi guía en la realización de este presente estudio y, sobre todo, por la confianza. Las palabras no serán suficientes para el inmenso agradecimiento que le tengo. ¡Muchísimas gracias!

A mi comité de tesis, M.C. Ana C. Puello Cruz, M.P.A. Noemí García Aguilar y Dr. Bruno Gómez-Gil Rodríguez Sala, por siempre estar ahí para ayudarme cuando lo necesitaba, no perder su esperanza en mí y ayudarme en mi formación de estudiante a Maestra en Ciencias, estoy muy contenta de haber tenido un comité conformado por todos ustedes.

Al personal del CIAD, con una mención especial para M.C. Ma. Del Carmen Bolán Mejía y M.C. Selene Ma. Abad Rosales por su inmensa ayuda a lo largo de la maestría, gracias por ayudarme en todas mis dudas por más insignificante que fuera, les soy enormemente agradecida de verdad.

A mi madre, quien siempre a pesar de carencias y retos que da la vida, siempre se preocupa por darme la mejor educación posible y por ser mi motivación para empezar este ciclo de mi vida. Gracias, madre, por todo, te amo.

A mi mejor amigo David, quien no solo estuvo presente durante mi crecimiento en esta nueva experiencia, si no que ha compartido casi una vida a mi lado. Parte de mí no sería lo que es si no hubieras estado presente desde hace ya 15 años. Gracias, hermano.

A mi mejor amiga Conchita, gracias por ser un apoyo incondicional a pesar de la distancia, es todo lo que voy a decir, porque todo lo demás ambas lo sabemos. Soy muy agradecida de tener una amistad como la tuya.

A mi prima Elisa, gracias por siempre echarme porras a distancia, siempre lo voy a apreciar. ¡Te quiero muchísimo!

A mis mejores amigas Mariany, Alondra y Elizabeth, yo siempre lo he dicho y siempre lo diré, jamás pensé llegar a tener amigas hasta que llegaron ustedes y no cambiaré por nada todo lo que

vivimos dentro y fuera de maestría ni hoy ni nunca. Gracias por su inmensa amistad y espero que nos dure hasta el fin. ¡Las quiero mucho!

A mi pareja, quien en ningún momento dejó de apoyarme incondicionalmente. ¡Te amo!

A mis compañeros de laboratorio Lizbeth y Javier, quienes me apoyaron en la realización de mis experimentos.

A mis amistades por todo su apoyo y por todas las risas y buenas energías que siempre me transmiten.

Gracias a todos mis maestros a lo largo de esta experiencia de vida, no siempre se encuentra a docentes que comparten sus conocimientos de una forma tan alegre.

A Valerie Williams, por su apoyo en esta redacción. Agradezco que se haya tomado el tiempo de ayudarme, muchas gracias.

Sobre todo, gracias a aquellos que no confiaban que lo iba a lograr. Son mi constante motivación.

DEDICATORIA

A mis bebés, Lulú, Coco por su amor incondicional y Patricia, quien pronto vendrá a mi vida. A mí misma, por demostrarme que puedo con esto y más. A mi pareja Osvaldo, muchas gracias por todo tu apoyo a lo largo de esta experiencia que fue nueva para ambos, gracias por siempre creer en mí y contar con tu ayuda siempre que fue necesario. A mi madre, quien, a pesar de las adversidades, siempre ha puesto todo su empeño y esfuerzo para que yo dé lo mejor de mí misma en cualquier etapa de mi vida. Siempre te voy a estar eternamente agradecida.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Acuicultura en México	16
2.2. Enfermedades Producidas por Bacterias en los Cultivos de Camarón.....	16
2.2.1. Género <i>Vibrio</i>	17
2.3. Antibióticos en el Cultivo de Camarón	19
2.4. Uso de Plantas Medicinales para el Tratamiento de Enfermedades Bacterianas	20
2.4.1. Mangle Rojo y sus Aplicaciones	22
2.4.1. Mangle Blanco y sus Aplicaciones	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo General.....	25
4.2. Objetivos Específicos	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Área de Estudio	26
5.2. Preparación de Extractos Hidroalcohólicos de Mangle rojo y Blanco	26
5.3. Evaluación de Eficacia Antibacteriana <i>in vitro</i>	26
5.3.1. Preparación del Inóculo Bacteriano.....	26
5.3.2. Antibiograma de Discos	27
5.2.3. Concentración Mínima Inhibitoria	27
5.4. Análisis para Composición Fitoquímica y Capacidad Antioxidante.....	28
5.4.1. Clorofila y Carotenoides Totales.....	28
5.4.2. Contenido Fenólico Total	29
5.4.3. Taninos Totales	29
5.4.4. Fenoles Totales.....	29
5.4.5. Actividad de Eliminación de Radicales Libres DPPH	30
5.4.6. ABTS	30

CONTENIDO (Continuación)

5.4.7. Capacidad de Reducción Férrica del Plasma (FRAP).....	31
5.5. Elaboración de Alimento Modificado	32
5.5.1. Análisis <i>in vitro</i>	32
5.5.2. Análisis <i>in vivo</i>	32
5.6. Acondicionamiento del Área de Bioensayo	33
5.7. Preparación del Inóculo Bacteriano.....	33
5.8. Bioensayo de Infección Experimental por Inyección.....	34
5.9. Análisis Histológico	34
5.10. Análisis Hematológicos.....	34
5.11. Análisis Estadísticos.....	35
6. RESULTADOS.....	36
6.1. Bioensayo Experimental por Inyección.....	40
6.2. Análisis Histológicos.....	43
6.3. Análisis Hematológicos.....	53
6.3.1. Conteo Total Hemocitario	53
6.3.2. Conteo Diferencial Hemocitario	55
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIONES.....	60
9. RECOMENDACIONES.....	61
10. REFERENCIAS	62
11. ANEXOS	75
11.1. Técnica de Análisis Histológico	75
11.1.1. Fijación o Conservación.....	75
11.1.2. Corte Histológico	75
11.1.3. Inclusión en Parafina	76
11.1.4. Embebido en Parafina	76
11.1.5. Cortado de Bloque.....	76
11.1.6. Tinción Hematoxilina-Eosina.....	77
11.2 Técnica de Recuento Total y Diferencial de Hemocitos	78

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Extractos hidroalcohólicos de Mangle rojo (a) y Mangle blanco (b).	36
2. Halos de inhibición de extractos de mangle rojo (izquierda) y blanco (derecha) en <i>V. harveyi</i> (a) y <i>V. campbellii</i> (b).....	37
3. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria para <i>V. campbellii</i> (a) y <i>V. harveyi</i> (b)....	37
4. Pellet adicionado con mangle blanco (a) y análisis de antibiogramas con dietas (b).....	39
5. Organismo con pellet adicionado con mangle rojo (a) y heces y alimento no consumido de organismo post-alimentación, alimento adicionado con mangle blanco (b).	40
6. <i>Penaeus vannamei</i> normal.....	41
7. Organismo con acalambamiento e intestino con presencia entrecortada de heces (a) y camarón en decúbito lateral.	41
8. Mortalidad acumulada en bioensayo experimental infectado con <i>V. harveyi</i>	42
9. Mortalidad acumulada en bioensayo experimental infectado con <i>V. campbellii</i>	43
10. Órganos y tejidos normales de <i>Penaeus vannamei</i>	44
11. Corte histológico longitudinal del órgano linfoide normal de <i>Penaeus vannamei</i>	45
12. Órganos y tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>Vibrio harveyi</i>	46
13. Corte histológico longitudinal de intestino de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>Vibrio harveyi</i>	46
14. Órganos y tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>V. harveyi</i> y tratado con <i>L. racemosa</i>	47
15. Corte histológico longitudinal de intestino de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>Vibrio harveyi</i> y tratado con <i>L. racemosa</i>	48
16. Órganos y tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>V. harveyi</i> y tratado con <i>R. mangle</i>	48
17. Corte histológico longitudinal de intestino de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>Vibrio harveyi</i> y tratado con <i>R. mangle</i>	49
18. Órganos y tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>V. campbellii</i>	50
19. Corte histológico longitudinal de intestino de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>Vibrio campbellii</i>	50
20. Órganos y tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>V. campbellii</i> y tratado con <i>L. racemosa</i>	51

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	Página
21. Corte histológico longitudinal de intestino de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>Vibrio harveyi</i> y tratado con <i>L. racemosa</i>	52
22. Órganos y tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>V. campbellii</i> y tratado con <i>R. mangle</i>	52
23. Corte histológico longitudinal de intestino de <i>Penaeus vannamei</i> infectado con <i>Vibrio harveyi</i> y tratado con <i>R. mangle</i>	53
24. Conteo de Hemocitos Totales - Bioensayo con bacteria <i>V. harveyi</i>	54
25. Conteo de Hemocitos Totales - Bioensayo con bacteria <i>V. campbellii</i>	55
26. Conteo Diferencial Hemocitario - Bioensayo con bacteria <i>V. harveyi</i>	56
27. Conteo Diferencial Hemocitario – Bioensayo con bacteria <i>V. campbellii</i>	57
28. Diagrama de técnica de tinción Hematoxilina y Eosina (H&E).....	78
29. Vista de un cuadrante de la cámara de Neubauer con el ocular de 40x	79

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Figura
1. Composición fitoquímica y capacidad antioxidante de muestras de Mangle rojo y blanco.....	38
2. Grados de severidad en deformación tubular en HP con análisis en fresco.	44

RESUMEN

En acuicultura, la intensificación actual del cultivo de camarón favorece la vulnerabilidad de su sistema inmune y como consecuencia las enfermedades se manifiestan causando mortalidades altas. Con la finalidad de contrarrestar enfermedades bacterianas, se han empleado antibióticos (oxitetraciclina, florfenicol, entre otros) como agentes profilácticos y/o terapéuticos. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud ha expresado su interés en reconsiderar el uso de herbolaria como alternativas para potencial terapéutico, ya que la medicina empleada genera residuos en tejido y resistencia bacteriana. El objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vitro* e *in vivo* la eficacia antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de Mangle rojo (*R. mangle*) y Mangle blanco (*L. racemosa*) sobre bacterias del género *Vibrio* en camarón blanco en infección experimental. Las hojas pulverizadas de cada mangle se combinaron con alcohol al 30% y se analizaron para perfil fitoquímico y actividad antioxidante, y se evaluaron con cada bacteria (*V. harveyi* CAIM1792 y *V. campbellii* CAIM333) mediante antibiograma de discos y concentración mínima inhibitoria (MIC). Los compuestos encontrados en los extractos presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) en flavonoides (1.96 ± 0.71 y 2.60 ± 0.15 mg QE/mL) y polifenoles totales (4.50 ± 0.26 y 3.36 ± 1.29 mg GAE/ mL), los halos de inhibición para cada extracto fueron $20 \text{ mm} \pm 2$ para Mangle rojo (Mr) y $18 \text{ mm} \pm 2$ para Mangle blanco (Mb) en *V. harveyi* y en *V. campbellii*, Mr presentó halos de $21 \text{ mm} \pm 2$ y Mb con $25 \text{ mm} \pm 1$; los resultados de MIC para ambas bacterias fueron de 1.65 g/mL. Los alimentos adicionados con los extractos se pusieron a prueba mediante una infección experimental por inyección en organismos *P. vannamei* con una concentración de 1×10^8 UFC/mL, en *V. harveyi*, la sobrevivencia con Mr fue del 53% y con Mb fue del 70%; por otro lado, en *V. campbellii*, la sobrevivencia fue 90% con Mr y 80% con Mb, respectivamente. Estos resultados se confirman mediante análisis histológicos, ya que los órganos y tejidos de los organismos tratados exponen un grado bajo de severidad. Por lo tanto, Mr y Mb son excelentes candidatos para el tratamiento de enfermedades generadas por estas bacterias del género *Vibrio*.

Palabras clave: camarón, *Vibrio*, mangle, antibacteriano.

ABSTRACT

In aquaculture, the rapid expansion of shrimp farming has led to the vulnerability of the shrimps' immune system and as a result disease outbreaks that cause high mortality have occurred. In order to counteract bacterial diseases, antibiotics (oxytetracycline, florfenicol, among others) have been employed as prophylactic and/or therapeutic agents. However, the World Health Organization has expressed interest in reconsidering the use of herbal medicine as a potential alternate therapeutic option, since actual medicines generate tissue residues and bacterial resistance. The aim of this work was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the antibacterial efficacy of hydroalcoholic extracts of the Red Mangrove (*R. mangle*) and the White Mangrove (*L. racemosa*) on bacteria belonging to the genus *Vibrio* in white shrimp (*P. vannamei*) by experimental infection. Leaves of both mangroves were pulverized and 30% alcohol added, and the samples were analyzed for phytochemical profile and antioxidant activity. Trials were conducted using antibiogram discs and minimum inhibitory concentration (MIC) to evaluate the effect of the extract on the pathogens *V. harveyi* (CAIM1792) and *V. campbellii* (CAIM333). The compounds found in the extracts gave significant differences ($p < 0.05$) in flavonoids (1.96 ± 0.71 and 2.60 ± 0.15 mg QE / mL) and total polyphenols (4.50 ± 0.26 and 3.36 ± 1.29 mg GAE / mL) with the inhibition halos for each extract being $20 \text{ mm} \pm 2$ for Red Mangrove (Mr) and $18 \text{ mm} \pm 2$ for White Mangrove (Mb). For *V. harveyi* and *V. campbellii*, Mr presented halos of $21 \text{ mm} \pm 2$ and for Mb halos of $25 \text{ mm} \pm 1$; while MIC for both bacteria was 1.65 g/mL. The effects of food with extracts added was determined by injecting 1×10^8 CFUs/mL of *V. harveyi* and *V. campbellii* to challenged *P. vannamei*. Results show that survival for Mr with *V. harveyi* was 53% and for Mb it was 70% while for *V. campbellii* it was 90% with Mr and 80% with Mb respectively. The degree of severity on the organs and tissues of the treated organisms after evaluation was low, this was further confirmed by histological analysis. Therefore, Mr and Mb are promising candidates for treating diseases caused by bacterial pathogens of the genus *Vibrio*.

Key words: shrimp, *Vibrio*, mangrove, antibacterial.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el 60% de los alimentos del mar ya se producen con acuicultura (Mendoza-Escamilla, 2018). Los sistemas de producción acuícola de crustáceos se han convertido en la industria de más rápido crecimiento dentro del sector primario y casi triplican ya a los volúmenes obtenidos por los métodos de pesca en estero y en alta mar (Vargas, 2019). El cultivo de camarón se ha visto afectado por brotes de diversas enfermedades que han llegado a convertirse en uno de los principales retos a resolver (CESASIN, 2017). Entre las enfermedades bacterianas destacan las provocadas por *Vibrio harveyi* y *Vibrio campbellii*, causantes de enfermedades en el camarón blanco como bolitas blancas, vibriosis sistémica, vibriosis luminiscente, necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés), síndrome “Rojos vivos”, entre otras (Varela & Choc-Martínez, 2020).

La acuicultura actualmente depende del uso de productos químicos y biológicos para mejorar su producción; encargados de mejorar la productividad en los criaderos, mejorar aspectos como la supervivencia y eficiencia alimentaria (Dixon, 2000; FAO, 2015). Actualmente existe un uso indebido de fármacos dentro de la producción, por lo cual muchos de estos compuestos han generado resistencia frente a los patógenos de origen bacteriano (Rosado, 2018).

Para el control de enfermedades bacterianas se utilizan antibióticos como: oxitetraciclina (OTC), enrofloxaxina (ENRO), florfenicol (FFC), sarafloxaxina (SARA) y ormetoprim-sulfa-metoxazol para la trata de vibriosis. La creciente preocupación por parte de las autoridades sanitarias, tanto a nivel europeo como mundial, en relación con el aumento de las resistencias bacterianas a los diferentes antibióticos, llevó a la Comisión Europea y a sus agencias a establecer una estrategia común para afrontar este problema. Como consecuencia de esta inquietud, nació el Plan de Acción sobre Resistencia a los Antibióticos (PRAN), cuya duración sería de cinco años en una primera fase, en el que se instauró la prohibición del uso de antibióticos en medicina veterinaria como promotores de crecimiento (Buschmann *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2015; Behbahani & Yazdi, 2015, Aznan *et al.*, 2018).

Además de lo anteriormente descrito, junto con la mayor influencia en procesos de la inocuidad alimentaria, las progresivas preocupaciones por la salud animal y la protección del ambiente y el incremento del costo de los alimentos balanceados son factores que hacen de los aditivos

alimentarios alternativos foco de atención entre científicos, nutricionistas fabricantes de alimentos y productores.

El uso de plantas y sus compuestos se han usado en la nutrición y medicina humana desde tiempos remotos. Los aditivos fitogénicos (derivados de plantas) comprenden una amplia gama de plantas, como hierbas, especias y aceites esenciales vegetales (extractos de compuestos vegetales volátiles, principalmente hidrocarburos que contienen la mayoría de las sustancias activas de la planta) y oleorresinas (extractos basados en disolventes no acuosos) (Ferreira *et al.*, 2019; Robles, 2018).

El mangle rojo, una planta tropical con alto contenido en polifenoles, posee propiedades muy potentes como cicatrizante, antiséptico, antimicrobiano, antiulceroso, antiinflamatorio, antioxidante, entre otras; actualmente está siendo muy demandado por sus beneficios en la trata de problemas de la piel, el cáncer, cardiopatías y problemas neurodegenerativos, como el Alzheimer. Por otro lado, el mangle blanco contiene taninos los cuales curten pieles; la corteza y hojas tienen propiedades medicinales astringentes y tónicas (Fickert, 2020; García & Bedoya, 2020).

Teniendo en cuenta el potencial farmacológico de los extractos de manglar, se requieren estudios más específicos para que se puedan identificar y seleccionar las mejores opciones; un ejemplo es *Acanthus ilicifolius* (planta de manglar), el cual fue probado para una gama diferente de actividades biológicas, incluida la actividad antimicrobiana contra 5 patógenos de *Vibrio* tales como *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y “*V. alcaligenes*” (Manilal *et al.*, 2009).

Dada la resistencia bacteriana a antibióticos presentes en cultivos de camarón, los productos de origen natural son una excelente opción que favorece el control de enfermedades y, por ende, conseguir una mejor supervivencia en cosecha; por lo que en este trabajo se evaluó la eficacia antibacteriana de extractos de mangles sobre cepas del género *Vibrio* en camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

2. ANTECEDENTES

2.1. Acuicultura en México

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos, tanto en zonas costeras como en estanques de cultivo; datos obtenidos de CONAPESCA (2017) ubican al camarón en el segundo lugar de la producción pesquera en México, con una tasa media de crecimiento anual del 1.67%; en cambio, por su valor económico es posicionado en el número uno.

Las estadísticas presentadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) la denomina como “el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento”, ya que el 50% de las especies acuáticas están destinadas a la alimentación mundial (FAO, 2020).

2.2. . Enfermedades Producidas por Bacterias en los Cultivos de Camarón

Durante la última década, la producción de camarones se ha caracterizado por una alta presencia de enfermedades bacterianas y virales en los cultivos (Morales-Covarrubias et al., 2018), que, al no ser tratadas a tiempo, han derivado en epidemias y afectado la economía de los productores, así como a las fuentes de trabajo (Tenecota *et al.*, 2018).

Entre las enfermedades de origen bacteriano reportados en los sistemas de cultivo, destaca el género *Vibrio*; éste causa enfermedades económicamente importantes, ya que afecta la producción de un gran número de especies en diversos países (Ibarra, 2015; Orellana-De Granados, 2017; Barreno-Coba y Martínez, 2018).

2.2.1. Género *Vibrio*

El género *Vibrio* se encuentra con mayor abundancia en ecosistemas marinos. En él convergen especies patógenas como *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. damsella*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. mediterranii*, *V. nigripulchritudo*, *V. ordalii*, *V. orientalis*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagicus*, *V. penaeicida*, *V. splendidus* y *V. vulnificus*. Estas especies han dado lugar a la presencia de enfermedades como Síndrome de la gaviota (también conocido como vibriosis sistémica), Vibriosis luminiscente, Bolitas blancas, Síndrome “rojo vivo”, AHPND, entre otras (Perea *et al.*, 2015; Varela-Mejías y Peña-Navarro, 2017; Jimbo-Jaramillo, 2017; Varela-Mejías *et al.*, 2017; Tenecota, *et al.*, 2018; Peña-Osorio y Cuéllar-Anjel, 2019; Coque, 2019).

Los signos clínicos relacionados a enfermedades de este género son organismos con opacidad muscular y tracto digestivo vacío, presencia de camarones moribundos nadando cerca de la superficie y en orillas de los estanques con coloración amarillenta en branquias o en decúbito lateral al fondo del estanque (Morales-Covarrubias, 2008).

2.2.2.1 *Vibrio harveyi*. Es una bacteria condicionalmente patógena; cuando el organismo huésped está inmunodeprimido o fisiológicamente estresado, se producirán brotes bacterianos a gran escala; esto se atribuye a cultivos intensivos y condiciones ambientales adversas (Zhao *et al.*, 2020). *Vibrio harveyi* es causa importante de mortalidad en camarones de cultivo en el noroeste de México, ya que es portadora del gen hemolisina que infecta larvas y camarones en desarrollo, causando daños principalmente en el hepatopáncreas (Chen *et al.*, 2015). El factor de virulencia contribuye a formar biopelículas y secretar proteasas, hemolisinas o lipopolisacáridos que son tóxicos para el organismo (Bermúdez-Almada *et al.*, 2017). Se sabe que la hemolisina es una exotoxina que lisa la membrana de las células sanguíneas del huésped, lo que representa un papel crítico en la infección (Setiawan *et al.*, 2015). La histología en el hepatopáncreas muestra atrofia tubular y necrosis, infiltración hemocítica y una menor prevalencia de células ribosomales (R) y células secretoras (B) (Wing-Keong *et al.*, 2015). Otros exámenes histológicos muestran aglomerados de bacterias en todos los órganos y tejidos del organismo, lo que conduce a vibriosis

sistémica (Zhao *et al.*, 2020).

En estado larvario, esta cepa produce las enfermedades de “Bolitas blancas” (o Síndrome de Zoea II) y bacterias luminiscentes, causando hasta el 100% de mortalidad (Otero-González, 2018). “Bolitas blancas” está caracterizado por la presencia de pequeñas formaciones de color blanco en el hepatopáncreas del camarón, las larvas infectadas presentan falta de apetito, nado errático y mortalidades elevadas (Reyes-Delgado, 2018). La enfermedad de bacterias luminiscentes, de acuerdo con su avance de infección, colonizan masivamente los apéndices en el trato digestivo y se extiende al intestino medio y hepatopáncreas, convirtiéndose en una septicemia generalizada; este grupo de bacterias pueden ser visibles en las larvas por la noche, teniendo en cuenta que se deben observar en el organismo, y no en el agua (Sathish-Kumar *et al.*, 2017).

Por otro lado, en organismos de cultivo ha sido reportada la enfermedad del Síndrome “Rojos vivos” en el Noroeste de México (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010). Los signos clínicos que presentan los organismos son nado errático, letárgico, opacidad en músculo abdominal, coloraciones rojizas en cutícula, así como presencia de melanizaciones rodeando dichas manchas; las alteraciones histológicas que se observan son atrofia y necrosis de los paquetes musculares, presencia de aglomerados bacterianos con o sin melanización en órgano linfoide, corazón y tejidos conectivos (Soto-Rodríguez *et al.*, 2012).

2.2.1.2. *Vibrio campbellii*. El clado *Vibrio harveyi* consiste en él y sus especies estrechamente relacionadas *V. owensii*, *V. jasicida* y *V. campbellii*, ésta última catalogada como uno de los más importantes patógenos en acuicultura (Huei-Mien *et al.*, 2016; Noor *et al.*, 2018). *V. campbellii* se ha utilizado previamente para monitorear cambios en la inmunocompetencia de crustáceos expuestos a una variedad de estresores ambientales, ya que se adapta a los cambios ambientales que causan una alteración crítica desfavorable para el cultivo en condiciones de laboratorio, así como una mortalidad significativa en cultivos de organismos acuáticos (Norouzitallab *et al.*, 2015; Thirugnanasambandam *et al.*, 2017; Leads *et al.*, 2019). Los factores implicados a esta patogenicidad incluyen la formación de biopelículas y motilidad de la natación (Yang *et al.*, 2017).

Además de *V. parahaemolyticus*, a esta bacteria también se le atribuye AHPND (Han *et al.*, 2016; Wangman *et al.*, 2018). De acuerdo con Dong y colaboradores (2019) al comparar ambas cepas

resultan positivas para los genes de virulencia para *pirABvp* con patogenicidad similar. Los organismos presentan nado errático, encontrándose la mayoría en el fondo del estanque, con hepatopáncreas de coloración pálida o blanquecina y atrofia severa; el intestino con presencia entrecortada de alimento y algunos sin alimento con una secreción blanquecina y el músculo abdominal opaco con exoesqueleto suave (Han *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2017a). Por histología se observa encapsulación de células y túbulos, infiltración hemocítica severa, presencia de aglomerados de bacterias en lumen de los túbulos, nódulos hemocíticos con y sin melanización y en las paredes de los túbulos melanizados y necróticos (Dong *et al.*, 2017b; Kumar *et al.*, 2019).

2.3. Antibióticos en el Cultivo de Camarón

Navarrete-Soriano (2015) define un antibiótico como sustancias producidas por organismos animales y vegetales, o bien por síntesis química, y que por dosis requeridas tienen la propiedad de inhibir el crecimiento e incluso destruir bacterias y otros microorganismos. Este es uno de los métodos más utilizados para el control de enfermedades, tanto en larvicultura como en el engorde del camarón (Ramon-Espinoza, 2020). Los antibióticos de uso común en cultivos de camarón son oxitetraciclina (OTC), florfenicol, orometoprim - sulfametazol, sarafloxaxina, sulfoamidas y eritromicina, siendo OTC el más utilizado (Sosa-Pacheco *et al.*, 2013; Bermúdez-Almada *et al.*, 2014; Acevedo-Barrios *et al.*, 2015).

La intensificación de la producción acuícola está directamente relacionada al uso indiscriminado de antibióticos para tratar o prevenir enfermedades y aumentar la productividad de forma constante y compensar las deficiencias de manejo y cría (Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018; Brunton *et al.*, 2019); ante esto, las bacterias patógenas y ambientales han desarrollado resistencia a antibióticos (Rocha *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015). Las repercusiones de antibióticos residuales en el medio provocan la aparición de nuevas enfermedades, las cuales por sus resistencias es más complicado encontrar un tratamiento efectivo y sitúa a la camaronicultura como una actividad no rentable ni sostenible (Espinoza-Berrezueta, 2017; Vega-Villavivencio, 2019). Por ello, se ha empleado la búsqueda de nuevas alternativas para control de enfermedades

infecciosas, siendo las plantas medicinales un candidato adecuado (Sorroza-Ochoa *et al.*, 2017; Redrován-Heras, 2017; Coronel-Bustamante, 2019; Flegel, 2019).

2.4. Uso de Plantas Medicinales para el Tratamiento de Enfermedades Bacterianas

El uso de plantas para prevención o tratamiento de numerosas enfermedades o para mantener la salud, se ha convertido en una alternativa viable debido a la gran cantidad de compuestos que contienen estas plantas sin efectos negativos en los animales, los seres humanos o el medio ambiente. En la actualidad la ciencia ha dado un reconocimiento al uso de plantas medicinales para la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades; en los productos naturales como sus derivados, se han distinguido la presencia de algunos compuestos de diversa estructura química que tienen acción farmacológica sobre el organismo humano y animal que promueve investigar para determinar dicha actividad, debido a que estos productos son usados por el hombre desde la antigüedad constituyendo sus primeros medicamentos (Loli-Ponce *et al.*, 2016; Aybar-Parian y Ari-Condori, 2018; Blanco y Millones, 2019; Valverde-Zumba, 2019).

Chávez-Nuñez y colaboradores (2019) definen a una planta medicinal como cualquier especie vegetal con sustancias que pueden ser empleadas con propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Los metabolitos son sustancias presentes en las plantas medicinales como alcaloides, taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas, terpenoides, entre otros, que cumplen funciones no esenciales en ellas, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas (Aguirre-Chanta, 2019; Vargas-Arana, 2020). De estas sustancias son los flavonoides obtenidos de hojas de Pimienta (*Piper delineatum*) que inhiben el crecimiento bacteriano de *Vibrio harveyi* (Martín-Rodríguez *et al.*, 2015) así como los obtenidos de Toronjil (*Melissa officinalis*) y Albahaca (*Ocimum basilicum*) (Sarango-Jaramillo, 2019). Los extractos de plantas de Tomillo (*Thymus vulgaris*), Guayaba (*Psidium guajava*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), además de minimizar la carga bacteriana del género *Vibrio*, no generan residuos en el animal y son amigables con el ambiente (Carbay-Uyaguari y Sorroza-Ochoa, 2019). Al utilizar bajas concentraciones del extracto etanólico de Alga roja (*Gracilaria fisheri*) en infección experimental en *P. vannamei* por histología se observó baja

colonización de bacterias en estómago (Karnjana *et al.*, 2019); el tratamiento a base de esencias naturales de Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) y Quebracho blanco (*Schinopsis lorentzi*) en camarón blanco en estanque experimental mostró poca presencia de colonias en hepatopáncreas (Sarango-Saldaña, 2019); Por histología, los extractos obtenidos de *Galla chinensis* y/o *Scutellaria baicalensis* (hierbas medicinales chinas) por inmersión en *P. vannamei* mejoran la actividad fagocítica de los hemocitos reestableciendo su defensa inmunológica (Tingshuang y Maocang, 2019). Los manglares son un grupo interesante de plantas que pueden sustentarse en un ecosistema altamente desafiante con factores de estrés bióticos y abióticos como salinidad e inundaciones. Parte de su mecanismo de adaptación es la producción de compuestos fenólicos en las hojas, que son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas así como actuar como agentes protectores frente a patógenos que son secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros (Muñoz *et al.*, 2007); tanto las hojas de *Rhizophora mangle* como *Laguncularia racemosa* contienen una serie de compuestos fenólicos que incluyen taninos y flavonoides, entre otros.

Múltiples investigadores han establecido que los manglares con ricos en polifenoles, entre los cuales los flavonoides son un grupo importante; varias clases de estos juegan un papel significativo en numerosos procesos fisiológicos, muestran actividad antioxidante y fungicida, así como antihistamínicos naturales. Por otro lado, los miembros de la familia *Rhizophoraceae* y *Combretaceae* son una rica fuente de taninos y se ha atribuido cada vez más atención al uso de taninos como agentes antibacterianos (Ramírez *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017; Ramírez-Rojo *et al.*, 2018; Dotulong *et al.*, 2018; Siahaya *et al.*, 2018; Dahibhate *et al.*, 2019; Rajani *et al.*, 2020; Arulkumar *et al.*, 2020).

El mangle rojo y blanco debido a que poseen compuestos biológicamente activos han sido utilizados para tratar enfermedades en humanos y animales (ratas de laboratorio, salmón, trucha arcoíris, lubina, langostinos peneidos), por lo que son candidatos para utilizarse en enfermedades de origen bacteriano en camarones (Morales-Covarrubias *et al.*, 2019). Se debe mencionar que ambas especies se encuentran sujetas a protección especial de acuerdo con la NOM 059-SEMARNAT-2010, ya que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad, determinando la necesidad de propiciar su recuperación y conservación (PROFEPA, 2020).

2.4.1. Mangle Rojo y sus Aplicaciones

Rhizophora mangle (Mangle rojo) es una especie arbórea que se encuentra en clima tropical en terrenos profundos inundados, tiene como característica principal sus raíces prominentes que se extienden hacia el sustrato en forma de zancos (De la Cruz-Francisco, 2012; EcuRed, 2020). Los principales compuestos químicos presentes en el extracto de mangle rojo son polifenoles de bajo peso molecular como ácido gálico, elágico y clorogénico; catequina y epicatequina; también se encontraron galotatinos, elagitaninos, taninos condensados, entre otros (Acosta-Sánchez, 2018). A los compuestos polifenólicos y fitoesteroles se les atribuyen la actividad antioxidante, antibacteriana, antiinflamatoria, lo que convierte al mangle rojo en un posible candidato para inhibir ciertos patógenos (Reglado *et al.*, 2016; Marroquín y Cruz, 2016). Un ejemplo es el extracto obtenido de *Rhizophora apiculata* que controla la mortalidad causada por *Vibrio harveyi* durante la larvicultura de camarones, así como inhibir el crecimiento de la bacteria y modular sus factores de virulencia (Kannappan *et al.*, 2018).

2.4.2. Mangle Blanco y sus Aplicaciones

Laguncularia racemosa (Mangle blanco) es una especie arbórea de crecimiento moderadamente rápido, siempre-verde, caracterizado por medir aproximadamente 15 metros de alto y presentar raíces zancudas y tallos múltiples (Blanco, 2020; Naturalista, 2020). Los extractos de hojas obtenidos de mangle blanco presentan saponinas, taninos, terpenoides, fenoles (López *et al.*, 2018), entre otros componentes, que ayudan como herramienta biológica en el control de proliferación de *Biomphalaria glabrata* (caracol) (Mendes *et al.*, 2017); así como molusquicida eficaz a bajas concentraciones para evitar efectos colaterales sobre la diversidad de organismos que habitan junto a *Galba cubensis* (caracol). También contiene elagitaninos activos contra la adhesión celular de *Candida albicans* (hongo) ya que tiene elementos estructurales como el ácido gálico y ácido elágico (Glaserapp *et al.*, 2019).

El tanino Casuarictina (Casu), caracterizado por primera vez en *Laguncularia racemosa*, mostró

capacidad antiinflamatoria al neutralizar la actividad enzimática y farmacológica inducida por la fosfolipasa secretora A2 del veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Víbora de cascabel). En relación con la actividad antibacteriana, el compuesto pudo interactuar con la membrana bacteriana e inducir la muerte de las bacterias (Bittencourt-Rodrigues *et al.*, 2019).

3. HIPÓTESIS

Por lo menos un extracto hidroalcohólico adicionado (sea de mangle rojo y blanco) en la dieta de *P. vannamei* infectado con *Vibrio harveyi* y/o *Vibrio campbellii* aumentará la sobrevivencia, su respuesta hemocitaria celular y presentará menos daño en sus órganos y tejidos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la eficacia antibacteriana *in vitro* e *in vivo* de extractos hidroalcohólicos de 2 mangles sobre 2 bacterias del género *Vibrio* de camarón blanco en infección experimental.

4.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar *in vitro* la eficacia antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de mangle rojo y blanco con *Vibrio harveyi* CAIM 1792 y *Vibrio campbellii* CAIM 342.
2. Elaborar el alimento con extractos de mangle rojo y blanco para pruebas *in vitro* e *in vivo*.
3. Probar la eficacia del alimento modificado en juveniles de *Penaeus vannamei*, realizando desafíos por inyección con *V. harveyi* y *V. campbellii* para evaluar sobrevivencia, realizar análisis hematológicos y revisar alteraciones histológicas en órganos y tejidos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de Estudio

R. mangle se obtuvo en Estero el Infiernillo (23.236851, -106.419134) y *L. racemosa* Isla de la Piedra (23.197939, -106.402126) en Mazatlán, Sinaloa. Las hojas se obtuvieron cerca de las ramificaciones de ambos mangles y se almacenaron en bolsas de papel a 18°C.

5.2. Preparación de Extractos Hidroalcohólicos de Mangle rojo y Blanco

Las hojas obtenidas de cada mangle se secaron a 26°C y pulverizadas con un molino a cortos tiempos para evitar generación de calor. En relación 3:1 (3 gramos de mangle en 1 ml de alcohol 30%) se colocaron 100 ml de extracto hidroalcohólico en un frasco de vidrio envuelto en papel aluminio y se mantuvo en la oscuridad a 25°C por un tiempo de 10 días.

5.3. Evaluación de Eficacia Antibacteriana *in vitro*

5.3.1. Preparación del Inóculo Bacteriano

Se tomaron muestras de las cepas criopreservadas (*Vibrio harveyi* CAIM 1792 y *Vibrio campbellii* CAIM 342) y se incubaron en TSA + NaCl al 2.0% y se incubó durante toda la noche a 30° C. Posteriormente se tomaron varias colonias de las cepas y se resuspendieron en NaCl estéril al 2.5% centrifugándose a 5724 rpm durante 10 minutos a 15° C. Las suspensiones bacterianas clarificadas se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 310 nm, equivalente a 0.5

MacFarland estándar y se diluyeron en serie a densidades estimadas a 108 UFC ml-1).

5.3.2. Antibiograma de Discos

Los antibiogramas se realizaron mediante la técnica Kirby-Bauer descrita por Maye-Bernal y Guzmán (1984). Se preparó el medio Muller-Hinton con 2.5% NaCl de acuerdo con las instrucciones de empaque y se distribuyó en cajas Petri estériles; se sumergió un aplicador de algodón estéril dentro de la suspensión de la bacteria colocando por encima del nivel del contenido del tubo y rotando contra las paredes de este para remover el exceso del inóculo. Se sembró uniformemente sobre la superficie del medio con el aplicador en tres direcciones diferentes; la superficie se secó durante 5-20 minutos manteniendo la caja con la tapa cerrada.

Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con un dispensador o con pinzas estériles, presionando ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto uniforme. Las cajas se incubaron a 35°C y fueron analizadas de 16-24 horas post incubación. Este proceso se repitió por cada bacteria con los dos diferentes extractos de mangle. De acuerdo con la clasificación de los grados de sensibilidad bacteriana a los antibióticos, se comprobará la efectividad en relación con el diámetro de inhibición en placas (≤ 8 mm no sensible, 9 – 14 mm sensible, 15 – 19 mm muy sensible, ≥ 20 mm extremadamente sensible) propuesto por Celikel y Kavas (2008).

5.3.3. Concentración Mínima Inhibitoria

Se realizó el análisis de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) descrita por Horna-Quintana y colaboradores (2005). Se realizaron diluciones seriadas en caldo Mueller-Hinton; con tres controles: el primero fue control positivo (caldo MH al que se añadió 100 μ l de suspensión bacteriana), control negativo (caldo MH sin mangle y sin suspensión bacteriana) y tratamiento (caldo MH con suspensión bacteriana y extracto de mangle).

Después de 24 horas se observó la turbidez en los tubos, se midió con un espectrofotómetro a 600

nm; los tubos con menor turbidez se sembraron en placas de Agar TSA con sal, así como los controles positivo y negativo. Este procedimiento se repitió por cada bacteria a analizar.

5.4. Análisis para Composición Fitoquímica y Capacidad Antioxidante

5.4.1. Clorofila y Carotenoides Totales

La clorofila a, b y el contenido de carotenoides totales se evaluaron colorimétricamente mediante el método propuesto por Wellburn (1994). Las muestras se diluyeron con etanol puro al 96%; las soluciones de muestra se pueden diluir si fuera necesario, y la absorbancia se midió en longitudes de onda características para clorofilas y carotenoides (es decir, 470, 649 y 665 nm) utilizando un espectrofotómetro (GENESYS 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se usó acetona al 80% (v/v) como blanco. Las concentraciones se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones, los valores se refieren al peso de una cantidad conocida de extracto seco:

$$\text{Chla} = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$$

$$\text{Chlb} = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$$

$$\text{Cx+C} = (1000A_{470} - 2.05\text{Chla} - 114.8\text{Chlb})/245$$

Donde Chla = clorofila a; Chlb = clorofila b; Cx+C = carotenoides totales

5.4.2. Contenido Fenólico Total

El contenido total de compuestos fenólicos se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu (Marigo, 1973). Se combinó una alícuota de 100 μ l de cada muestra con 150 μ l de solución de folina (diluida 1:1 con agua desionizada) seguido de la adición de 1 ml de carbonato de sodio al 2% en hidróxido al 0.4%. la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. El complejo azul resultante se midió espectrofotométricamente a 750 nm. El contenido fenólico se expresó como mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de muestra de peso seco. Se preparó una curva estándar de ácido gálico en un rango de concentración de 0-0.25 mg/ml.

5.4.3. Taninos Totales

El contenido total de taninos en los extractos de mangle se determinó mediante el método informado por Makkar y colaboradores (1993) con varias modificaciones, este método basado en la unión de taninos con polivinilpirrolidona insoluble (PVP). En tubos que contenían solución PVP (50 mg/ml) se transfirió un volumen conocido de muestra (relación 5:1 v/v) y se mezcló durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante obtenido por centrifugación (2000 rpm, 15 minutos a 4°C) y se determinó el contenido total de polifenoles (TPC) mediante la prueba FOLIN (Marigo, 1973). El contenido de taninos se determinó por la diferencia de TPC después de la unión de PVP, y se expresó en mg equivalentes de ácido tánico (TAE) por ml de extracto. Se preparó una curva estándar de ácido tánico en un rango de concentración de 0.025-0.2 mg/ml.

5.4.4. Fenoles Totales

El contenido total de flavonoides se evaluó de acuerdo con Luximon-Ramma y colaboradores (2002). Las muestras de soluciones (1 ml) se diluyeron en volúmenes iguales de una solución de cloruro de aluminio al 2% (2 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de metanol). La mezcla se incubó a

temperatura ambiente durante 10 minutos. La absorbancia se valuó a 367 nm. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de quercetina (QE) por gramo de muestra de peso seco. Se preparó una curva estándar de quercetina en un rango de concentración de 0-0.5 mg/ml.

5.4.5. Actividad de Eliminación de Radicales Libres DPPH

El potencial de eliminación de radicales libres de los extractos de algas marinas se analizó de acuerdo con el método descrito por Mensor y colaboradores (2001) con las siguientes modificaciones: se combinó una alícuota de 100 ml de cada extracto (a concentraciones de 0.0015 a 1.5 mg/ml) con 900 ml de una solución radical 0.3-M-2,2-difenil-1-picrilhidralizo (DPPH) en etanol; la mezcla se incubó durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente; la absorbancia se midió a 518 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (GENESYS 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); Trolox se usó como estándar de referencia, mientras que la solución DPPH sirvió como control para calcular el grado de eliminación de radicales tanto por las muestras como por el compuesto de referencia. El porcentaje de eliminación de radicales DPPH se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de barrido DPPH} = (A-B) / A * 100$$

Donde A = valor de absorbancia de la solución de control DPPH; B = valor de absorbancia de la solución de prueba sin control de absorbancia de muestra en solvente.

5.4.6. ABTS

La actividad de eliminación del radical ácido 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina] -6-sulfónico (ABTS) se determinó de acuerdo con el método descrito por Przygodzka y colaboradores (2014)

con las siguientes modificaciones: el radical ANTS se activó previamente para 12-16 h a temperatura ambiente en la oscuridad; la solución radical ABTS^{o+} resultante se diluyó con etanol para obtener una absorbancia a un valor de 734 nm de aproximadamente 0.80; se combinó una parte alícuota de 100 ml de cada muestra (a una concentración de 0.0015 a 1.5 mg/ml) con 2.9 ml de solución ABTS y la absorbancia se midió espectrofotométricamente (GENESYS 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 10 minutos después de la mezcla. Trolox se usó como estándar de referencia, mientras que la solución radical ABTS^{o+} sirvió como control para calcular el grado de eliminación de radicales tanto por las muestras como por el compuesto de referencia. El porcentaje de captación de radicales ABTS se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de barrido ABTS} = (A-B) / A * 100$$

Donde A = valor de absorbancia de la solución de control ABTS; B = valor de absorbancia de la solución de prueba.

5.4.7. Capacidad de Reducción Férrica del Plasma (FRAP)

El ensayo FRAP se realizó de acuerdo con los métodos de Benzie y Strain (1996) con una ligera modificación informada por Szóllózi y Varga (2002). El reactivo FRAP se preparó con una mezcla de tampón de acetato 300 mM, pH 3.6; 2, 4, 6-tridipil-1-2-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM; y solución acuosa de FeCl₃ · 6H₂O, 20 mM (10:1:1, relación). Para el ensayo, a 100 µl de muestra se agregaron 1400 µl de reactivo FRAP, luego se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia a 593 nm. Una absorbancia más alta indica un mayor poder reductor; se utilizó Trolox como estándar de referencia.

5.5. Elaboración de Alimento Modificado

Para cada extracto de mangle, las dietas se prepararon formando una pasta homogénea con alimento comercial Camaronina Purina® (35% de proteína) previamente molido y tamizado, 1 gramo de grenetina por 500 gramos de alimento molido, extracto de mangle (50 mL) y agua destilada (~450 mL). La dieta control se formuló de la misma manera sustituyendo el extracto de mangle por agua destilada. Los pellets fueron formados pasando la pasta por un molino de carne, se secaron con un ventilador a 28°C por 24 horas y se almacenaron a 4° C.

5.5.1. Análisis *in vitro*

Los antibiogramas se realizaron mediante la técnica Kirby-Bauer descrita por Maye-Bernal y Guzmán (1984) descrito en sección 5.3.2 con la siguiente modificación: los discos fueron sustituidos por un pellet modificado de cada mangle.

5.5.2. Análisis *in vivo*

Los análisis *in vivo* se realizaron mediante una prueba de palatabilidad, donde se utilizaron acuarios de fibra de vidrio depositando un organismo en cada acuario con 3 litros de agua; en total se tuvieron 5 organismos control, 5 organismos para pellet modificado de mangle blanco y 5 organismos para pellet modificado de mangle rojo. Durante 5 días consecutivos, los camarones fueron alimentados de forma fija con 0.5 g (10% del peso) que se dejó por un periodo de 4 horas, recolectando tanto heces como alimento no consumido; ambos fueron limpiados con agua destilada para eliminar sales y puestos a secar en horno para volver a pesar. Para sacar el peso del alimento por consumo diario se utilizó la siguiente fórmula:

Peso de los alimentos consumidos = Peso total del alimento - peso del alimento recuperado

5.6. Acondicionamiento del Área de Bioensayo

Previo al experimento, se seleccionó un número representativo de camarones de lote para determinar su estado de salud, se realizarán análisis en fresco (Morales-Covarrubias, 2008), análisis bacteriológico (Cedeno, 2005) para determinar UFC y análisis histológico (Bell & Lightner, 1988) para detección de patógenos y alteraciones en órganos y tejidos.

En el área de bioensayo, se colocaron 10 camarones (con promedio de 11 g) por acuario con 10 litros de agua con 3 repeticiones por tratamiento (mangle blanco, mangle rojo, control positivo y control negativo) y se aclimataron durante 48 horas, en condiciones controladas antes de iniciar el desafío.

5.7. Preparación del Inóculo Bacteriano

Se tomaron muestras de las cepas criopreservadas (*Vibrio harveyi* CAIM 1792 y *Vibrio campbellii* CAIM 342) y se incubaron en TSA + NaCl al 2.0% y se incubó durante la noche a 30° C. Varias colonias se resuspendieron en NaCl estéril al 2.5% y se centrifugaron a 5724 rpm durante 10 minutos a 15° C. Las suspensiones bacterianas clarificadas se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 310 nm, equivalente a 0.5 MacFarland estándar y se diluyeron en serie a densidades estimadas a 108 UFC ml⁻¹. Ambas suspensiones se colocaron en placas TCBS para determinar la densidad real de ambos *Vibrio* utilizados para desafiar a los camarones. Para el control negativo, las bacterias fueron sometidas a un proceso de autoclave para inactivarlas y se sembraron en cajas con agar TCBS para confirmar su nulo crecimiento.

5.8. Bioensayo de Infección Experimental por Inyección

La infección en los camarones se realizó con las bacterias *Vibrio harveyi* CAIM 1792 y *Vibrio campbellii* CAIM 333 por separado. Cada organismo fue inyectado con 100 µl en el tercer segmento abdominal con una concentración de 1.25×10^8 UFC/mL para *V. harveyi* y 1.2×10^8 UFC/mL para *V. campbellii*; para el control negativo, los camarones fueron inyectados con la bacteria inactivada por calor en la solución. La alimentación para los camarones de ambos desafíos fue 30 minutos post-infección bacteriana y cada 4 horas hasta el final del desafío (60% de mortalidad de la población positiva infectada sin tratamiento).

5.9. Análisis Histológico

Se utilizó la técnica descrita por Lightner (1996), y se realizaron cortes a 5 µ de grosor con microtomo (Anexo 1). Las muestras se colocaron en portaobjetos para ser teñidos con hematoxilina de Harris y Eosina (H&E) para posteriormente ser observados en microscopio de luz, adaptado con una cámara digital (Infinity 2) para revisar alteraciones en órganos y tejidos, utilizando lo reportado por Varela-Mejía (2018) para *V. harveyi*, Peña y Varela (2015) para *V. campbellii* y Morales-Covarrubias (2014) para ambas bacterias y su documentación de imágenes.

5.10. Análisis Hematológicos

Se extrajo hemolinfa de organismos sobrevivientes 24 horas post-infección, así como de organismos moribundos a lo largo del experimento de cada grupo analizado. La hemolinfa se conservó con Solución Alsever en tubos Eppendorf a una temperatura de 4°C. La respuesta inmunológica fue analizada mediante la técnica de recuento total y diferencial de los hemocitos descrita por Cuéllar-Anjel (2014) (Anexo 2).

5.11. Análisis Estadísticos

Se realizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) para evaluar el efecto de los extractos de mangle en mortalidad de organismos y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$), para la técnica de conteo total y diferencial hemocitario se realizó un análisis de varianza bifactorial (Tukey) ($p < 0.05$). Los análisis se llevaron a cabo con el programa SigmaStat versión 3.0.

6. RESULTADOS

Los extractos hidroalcohólicos de mangle rojo y blanco (Figura 1a y 1b), inhibieron el crecimiento bacteriano de *V. harveyi*, presentando mayor actividad antibacteriana el extracto de mangle rojo con un halo de inhibición de $20 \text{ mm} \pm 2$ (Figura 2a) en comparación con el extracto de mangle blanco (Figura 2a) con halo de inhibición de $18 \text{ mm} \pm 2$. Para el caso de *V. campbellii*, el extracto hidroalcohólico de mangle blanco presentó mayor actividad antibacteriana con halo de inhibición de $25 \text{ mm} \pm 1$ (Figura 2b) en comparación con el extracto de mangle blanco con halo de inhibición de $21 \text{ mm} \pm 2$ (Figura 2b). La concentración mínima inhibitoria (CMI) para las dos bacterias (figura 3) fue de 1.65 g/mL con 5 mL de extracto de mangle blanco y rojo en tubos con 5 mL de Caldo Soya Trypticaseína y $100 \mu\text{l}$ de cada bacteria a una densidad de $1 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$.

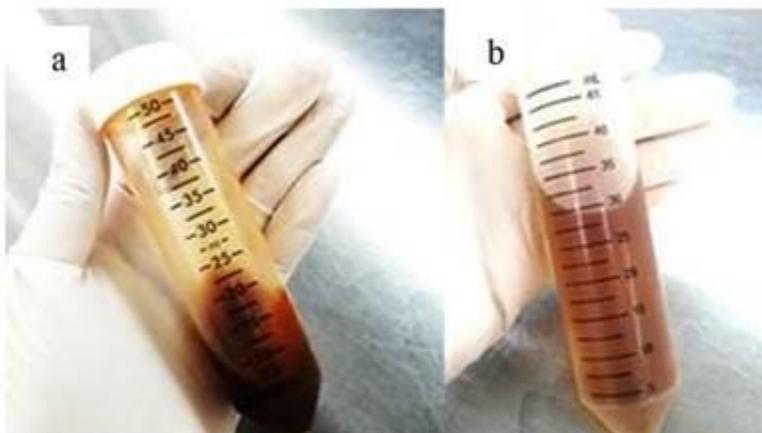


Figura 1. Extractos hidroalcohólicos de Mangle rojo (a) y Mangle blanco (b).

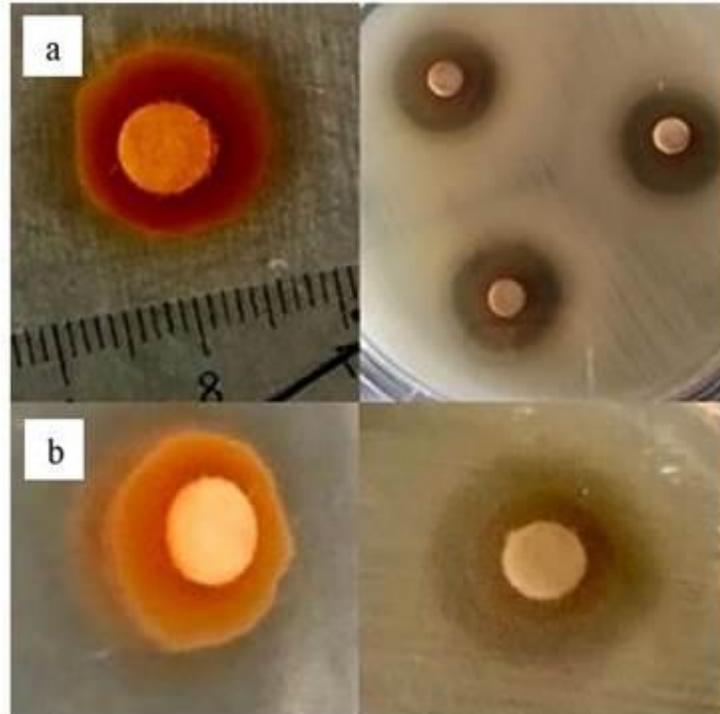


Figura 2. Halos de inhibición de extractos de mangle rojo (izquierda) y blanco (derecha) en *V. harveyi* (a) y *V. campbellii* (b).

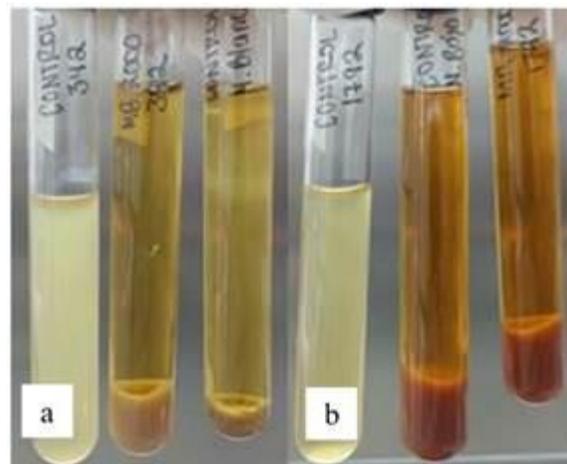


Figura 3. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria para *V. campbellii* (a) y *V. harveyi* (b).

La composición de los extractos de las dos especies empleadas en este estudio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el contenido total de polifenoles y flavonoides. El extracto hidroalcohólico de *Rhizophora mangle* presentó un mayor contenido de polifenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico por cada mililitro de

extracto, respecto del extracto de *Laguncularia racemosa* (4.50 ± 0.26 y 3.36 ± 1.29 mg GAE/mL, respectivamente), de la misma manera, el resultado para el contenido total de flavonoides expresados en mg equivalentes de quercetina por mililitro de extracto reveló que *L. racemosa* contenía una menor cantidad de este tipo de compuestos respecto del extracto de *R. mangle* (1.96 ± 0.71 y 2.60 ± 0.15 mg QE/mL, respectivamente). Por otro lado, los niveles de clorofila “a” y “b” expresados en μl de clorofila por mililitro de extracto, así como carotenoides expresados en μg de carotenoides por mililitro de extracto, se presentan elevados en el extracto de *R. mangle* a diferencia del extracto de *L. racemosa* (38.4 ± 5.5 y 4.0 ± 1.0 μg de Chla por mililitro de extracto, 10.5 ± 0.1 y 0.03 ± 0.0 μg de Chlb por mililitro de extracto, 7.2 ± 1.8 y 1.0 ± 0.4 μg de carotenoides por mililitro de extracto, respectivamente) (Cuadro 1).

La capacidad antioxidante expresados en mg de actividad antioxidante Trolox por mililitro de extracto, se encontraron datos sin y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Ambos extractos mantuvieron la misma cantidad de DPPH (0.12 ± 0.00 y 0.12 ± 0.01 TEAC/mL, respectivamente), para ABTS el extracto hidroalcohólico de *R. mangle* fue elevado en comparación con el extracto de *L. racemosa* (0.74 ± 0.08 y 0.51 ± 0.07 TEAC/mL, respectivamente). Por otro lado, el valor de FRAP fue más elevado en el extracto de *L. racemosa* que en el extracto de *R. mangle* (6.56 ± 0.43 y 1.34 ± 0.62 TEAC/mL, respectivamente) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición fitoquímica y capacidad antioxidante de muestras de Mangle rojo y blanco.

Composición fitoquímica	Mangle Rojo	Mangle Blanco	n
TPC (GAE/mL)	4.50 ± 0.26	3.36 ± 1.29	6
TFC (QE/mL)	2.60 ± 0.15	1.96 ± 0.71	6
TTC (TAE/mL)	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.01	3
Chla ($\mu\text{g/mL}$)	38.4 ± 5.5	4.0 ± 1.0	3
Chlb ($\mu\text{g/mL}$)	10.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0	3
Cx+c ($\mu\text{g/mL}$)	7.2 ± 1.8	1.0 ± 0.4	3
Capacidad Antioxidante (TEAC/mL)			
DPPH	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.01	6
ABTS	0.74 ± 0.08	0.51 ± 0.07	6
FRAP	1.34 ± 0.62	6.56 ± 0.43	6

Donde TPC = Contenido Total de Polifenoles (mg de ácido gálico por mL de extracto); TFC = Contenido Total de Flavonoides (mg de Quercetina por mL de extracto); TTC = Contenido Total de Taninos (mg de ácido tánico por mL de extracto); Chla = Clorofila “a” (μg de Clorofila “a” por 1 mL de extracto); Chlb = Clorofila “b” (μg de Clorofila “b” por 1 mL de extracto); Cx+c = Carotenoides (μg de carotenoides por 1 mL de extracto); TEAC/mL = mg de Actividad antioxidante Trolox por mL de extracto); DPPH, ABTS, FRAP = compuestos cromógenos utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los extractos para captar los radicales libres generados.

Para cada extracto hidroalcohólico se elaboraron dietas a base de camaronina tamizada con el agregado de mangle (Figura 4a); se tomaron pellets de cada dieta adicionada para un análisis de antibiograma de discos con ambas bacterias (Figura 4b) con la modificación del cambio del sensidisco por pellet. La dieta adicionada con mangle rojo presentó la misma medida al analizar su actividad antibacteriana con ambas bacterias ($19 \text{ mm} \pm 1$, respectivamente); respecto a la dieta adicionada con mangle blanco, en *V. campbellii* se mostró una mejor actividad antibacteriana con un halo de inhibición de $23 \text{ mm} \pm 1$, mientras que en *V. harveyi*, el halo de inhibición fue de $17 \text{ mm} \pm 1$, respectivamente. En las pruebas de palatabilidad se observó una respuesta positiva de los camarones hacia ambas dietas (Figura 5a), así como una fácil digestión de estas (Figura 5b).



Figura 4. Pellet adicionado con mangle blanco (a) y análisis de antibiogramas con dietas (b).

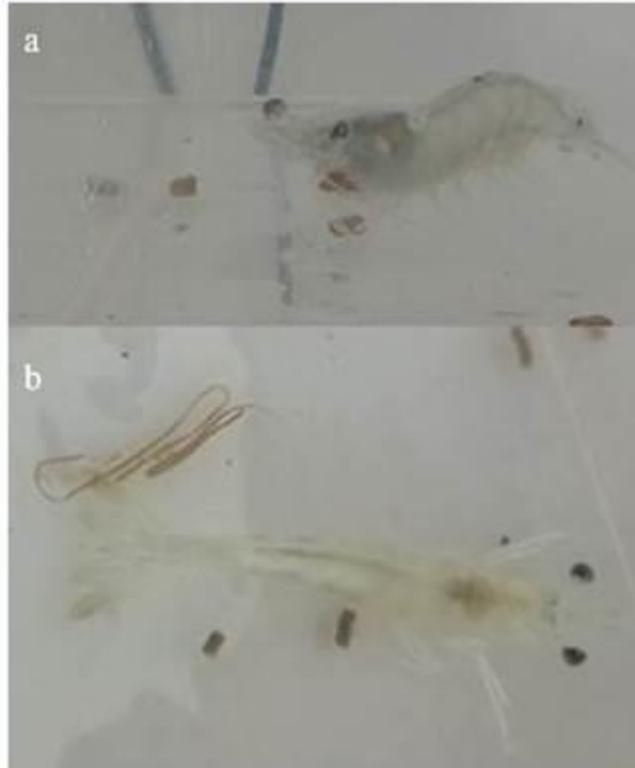


Figura 5. Organismo con pellet adicionado con mangle rojo (a) y heces y alimento no consumido de organismo post-alimentación, alimento adicionado con mangle blanco (b).

6.1. Bioensayo Experimental por Inyección

Por análisis en fresco los camarones del control negativo (*Penaeus vannamei*) presentaron coloración y antenas normales y sin ninguna alteración (Figura 6). En el experimento infectado con *V. harveyi*, a una densidad de 1.25×10^8 UFC/mL, los signos clínicos que presentaron los organismos fueron nado errático, opacidad muscular y coloración rojiza multifocal en cutícula con presencia de melanización, estas alteraciones se empezaron a presentar a las 3 horas post-infección; la sobrevivencia pasadas las 24 horas fue del 40% para el grupo positivo (“cposv” 0.4 en Figura 8), 70% para el tratamiento con Mangle blanco (“blancov” 0.7 en Figura 8) y 53% en el tratamiento con Mangle rojo (“rojov” 0.53 en Figura 8). En el experimento de camarones infectados con *V. campbellii*, a una densidad de 1.2×10^8 UFC/mL, los signos clínicos de los camarones fueron natación en decúbito lateral, intestino con presencia entrecortada de las heces y acalambramiento; estos síntomas se expresaron a las 6 horas post-infección (Figura 7); la

sobrevivencia fue de 47% para el grupo positivo (“cposc” 0.47 en Figura 9), 80% en tratamiento con Mangle blanco (“blancoc” 0.8 en Figura 9) y 90% en tratamiento con Mangle rojo (“rojoc” 0.9 en Figura 9).



Figura 6. *Penaeus vannamei* normal.



Figura 7. Organismo con acalambamiento e intestino con presencia entrecortada de heces (a) y camarón en decúbito lateral.

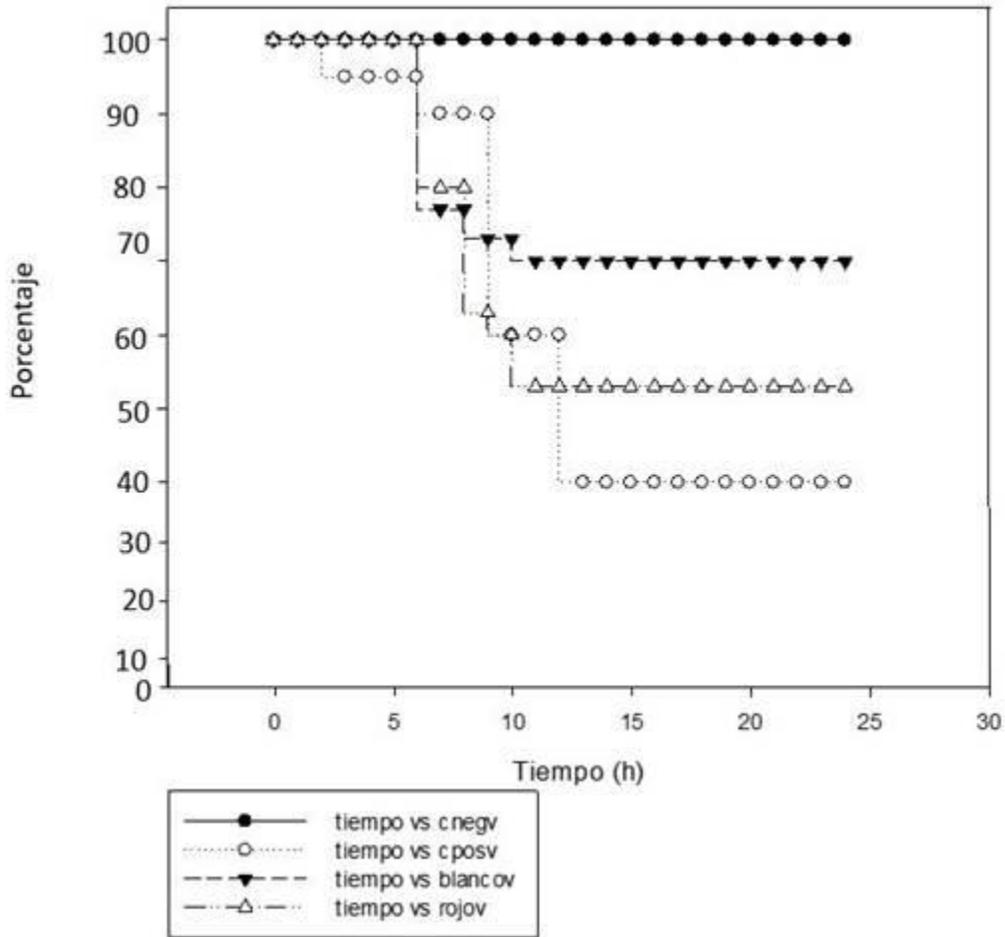


Figura 8. Mortalidad acumulada en bioensayo experimental infectado con *V. harveyi*. Porcentaje expresado en decimales; c negv = control negativo en *V. harveyi*; c posv = control positivo en *V. harveyi*; blancov = tratamiento con mangle blanco en *V. harveyi*; rojov = tratamiento con mangle rojo en *V. harveyi*.

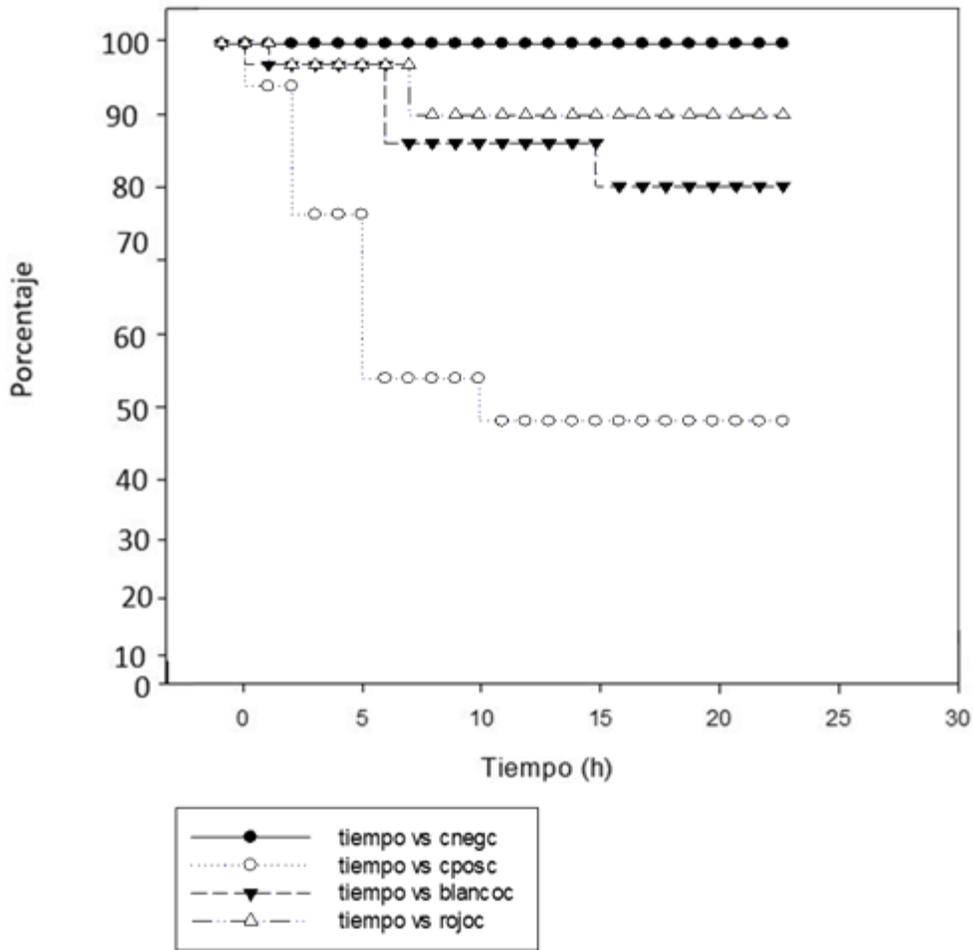


Figura 9. Mortalidad acumulada en bioensayo experimental infectado con *V. campbellii*. Porcentaje expresado en decimales; cnegc = control negativo en *V. campbellii*; cposc = control positivo en *V. campbellii*; blancoc = tratamiento con mangle blanco en *V. campbellii* rojoc = tratamiento con mangle rojo en *V. campbellii*.

6.2. Análisis Histológicos

Las muestras se analizaron en el microscopio, iniciando con el objetivo de menor aumento y finalizando con el mayor, y determinando el grado de severidad que presenten los órganos y tejidos; dichos grados fueron basados en la guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la deformación tubular en hepatopáncreas con análisis en fresco (Morales-Covarrubias, 2014) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Grados de severidad en deformación tubular en hepatopáncreas con análisis en fresco (Tomado de Morales-Covarrubias, 2014).

Grado de severidad	Signos clínicos
0	No presentan signos de infección. No presentan deformación tubular ni rugosidad. Organismo sano
1	Presencia muy baja de deformación tubular (1-5/campo/organismo). Se observa muy poco desprendimiento celular. Fase 0, inicial.
2	Se observa la presencia moderada de deformación tubular (6-10/campo/organismo), atrofia, melanización y necrosis tubular. Se presenta mortalidad si no se aplica tratamiento. Fase 1, inicial.
3	Se observa la presencia alta de deformación tubular (11-16/campo/organismo), con lesiones moderadas a severas, con melanización, necrosis, desprendimiento celular y atrofia tubular. Letal si no se aplica tratamiento. Fase 2, aguda.
4	Se observa gran cantidad de túbulos deformes (más de 16/campo/organismo), con severas lesiones con melanización, necrosis, atrofia tubular y túbulos vacíos. Presencia de hemocitos alrededor de túbulos atrofiados, melanizados y necróticos. Fase 3, crónica.

Los organismos del control negativo para el experimento presentaron órganos y tejidos normales: branquias con hemocitos en circulación y filamentos secundarios ramificados normales (Figura 10A), glándula antenal con túbulos y núcleos normales (Figura 10B), hepatopáncreas con células y lumen definido (Figura 10C), epitelio del intestino con células columnares simples normales (en forma de cepillo) (Figura 10D) y órgano linfoide con células y lumen definido (Figura 11).

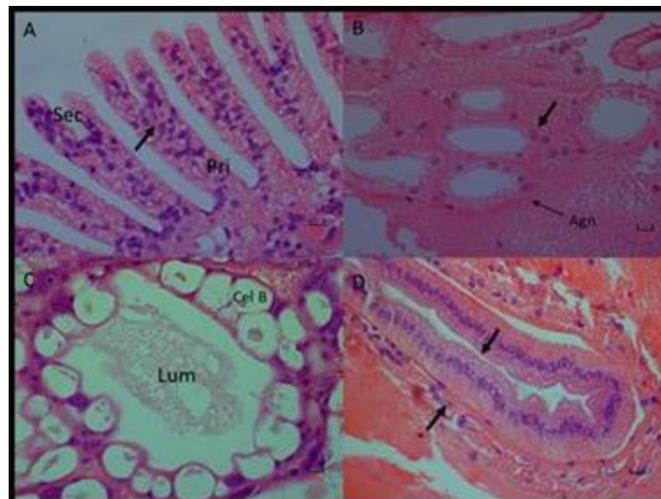


Figura 10. Órganos y tejidos normales de *Penaeus vannamei*. Branquias (A) con filamentos primarios (Pri) y filamentos secundarios ramificados (Sec) con hemocitos en circulación (flecha negra); Glándula antenal (B) con túbulos antenales no secretores (Agn) o laberinto y núcleos (flecha negra) normales; Hepatopáncreas (C) con células B (Cel B) y lumen del túbulo definido (Lum); Epitelio del intestino (D) con células columnares simples normales con borde en forma de cepillo (flechas negras). Tinción H&E. Objetivo 40x.

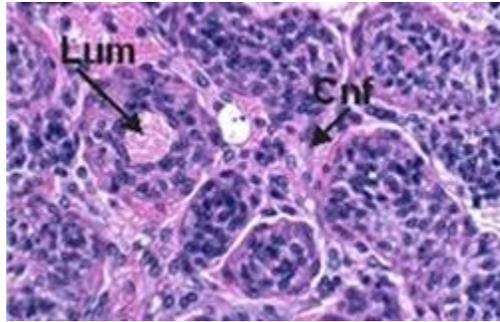


Figura 11. Corte histológico longitudinal del órgano linfoide normal de *Penaeus vannamei*, donde se observan los túbulos con lumen simple (Lum), matriz estromal de células (flecha azul) que lo recubren y tejido conectivo fibroso (Cnf). Tinción H&E. Objeto 40x.

Los organismos infectados con *Vibrio harveyi* presentaron los siguientes resultados: glándula antenal con infiltración de hemolinfa y pérdida de estructura, formación de nódulos hemocíticos y necrosis (Figura 12A); branquias con melanización de las Dendobranquias, pérdida de estructura e infiltración de hemolinfa con hemocitos (Figura 12B); órgano linfoide con pérdida de estructura, formación de esferoides e infiltración de hemolinfa (Figura 12 C); tejido conectivo con infiltración severa de hemocitos y formación de nódulos hemocíticos (Figura 12D); epitelio del estómago con pérdida de estructura e infiltración de hemolinfa con hemocitos (Figura 12E); hepatopáncreas con desprendimiento celular, pérdida de estructura tubular e infiltración de hemolinfa con hemocitos (Figura 12F); intestino con infiltración de hemolinfa con hemocitos y células con cariólisis (Figura 13).

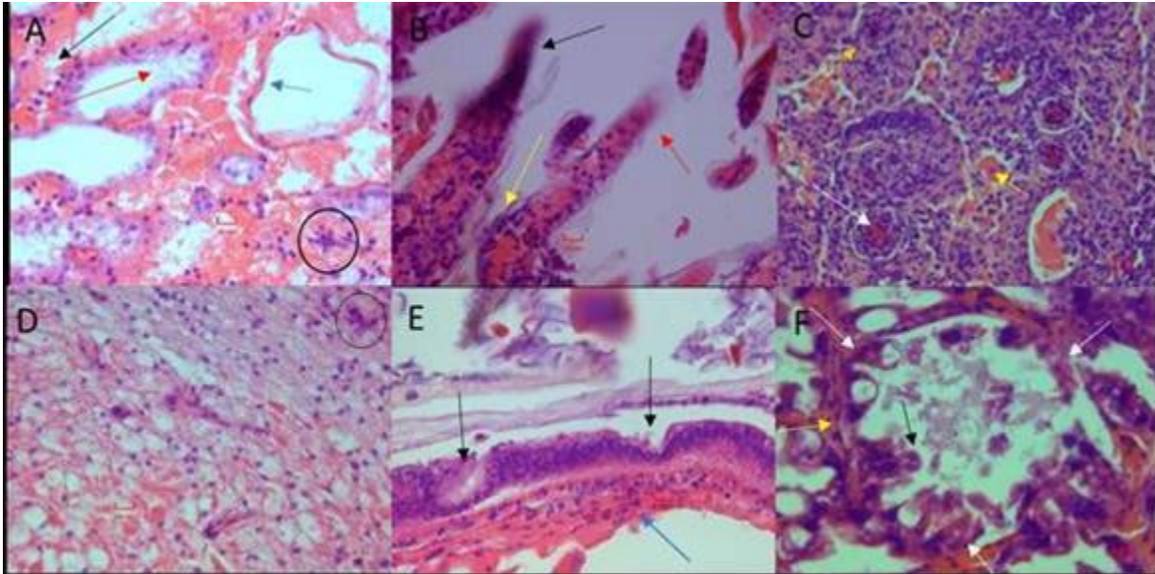


Figura 12. Órganos y tejidos de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio harveyi*: Glándula antenal (A) con infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha negra), pérdida de estructura (flecha roja), formación de nódulos hemocíticos (flecha negra) y necrosis (flecha azul); branquias (B) con melanización en dendobranquias (flecha negra), pérdida de estructura (flecha roja) e infiltración de hemolinfa y hemocitos (flecha amarilla); órgano linfoide (C) con pérdida de estructura, aglomerados bacterianos en lumen (flecha blanca), formación de esferoides (flecha naranja) e infiltración de hemolinfa (flecha amarilla); tejido conectivo (D) con infiltración severa de hemocitos y formación de nódulos hemocíticos (círculo negro); epitelio del estómago (E) con pérdida de estructura (flechas negras) e infiltración de hemolinfa y hemocitos (flecha azul); hepatopáncreas (F) con desprendimiento celular (flecha negra), pérdida de estructura celular (flechas blancas) e infiltración de hemolinfa y hemocitos (flecha amarilla). Tinción H&E. Objetivo 40x.

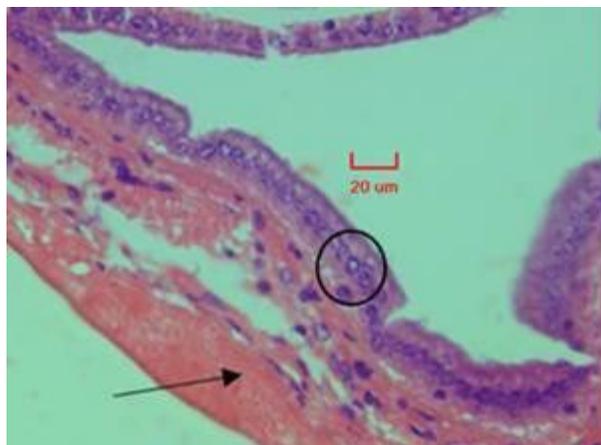


Figura 13. Corte histológico longitudinal de intestino de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio harveyi* donde se observa infiltración de hemolinfa y hemocitos (flecha negra) y células con cariólisis (círculo negro). Tinción H&E. Objetivo 40x.

Los organismos tratados con mangle blanco presentaron en todos sus órganos y tejidos grado de severidad 1: infiltración de hemolinfa con hemocitos y presencia de células normales, con excepción del epitelio del estómago que mostró pérdida de estructura (Figura 14); se observó la misma característica en los organismos tratados con mangle rojo con infiltración de hemolinfa con hemocitos, inflamación en dendobranquias y atrofia de células en epitelio del estómago y túbulos de glándula antenal (Figura 16).

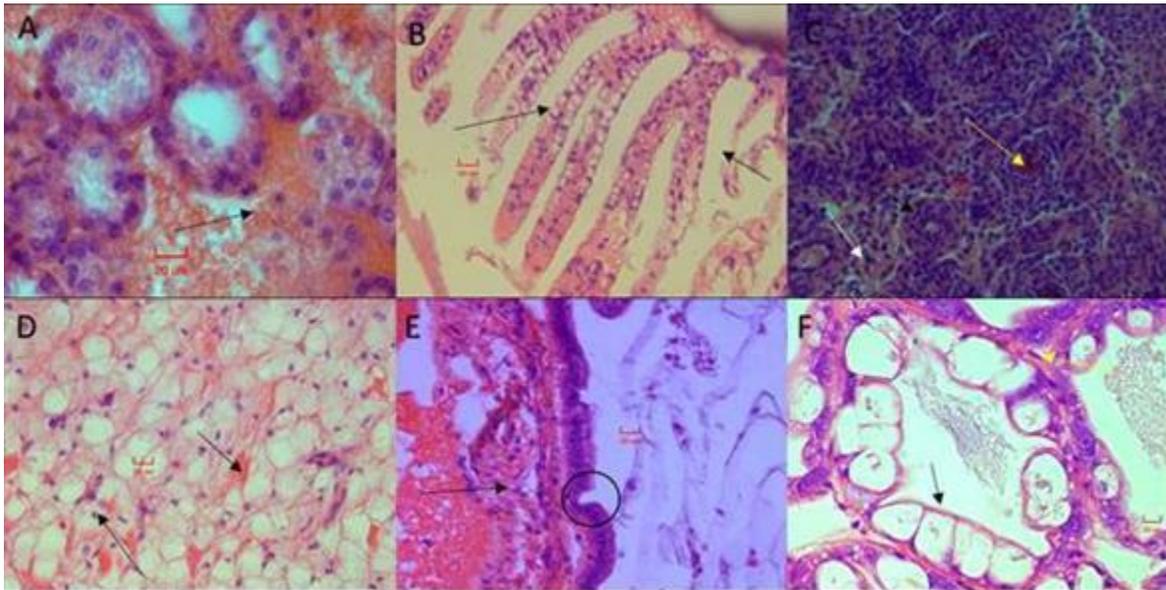


Figura 14. Órganos y tejidos de *Penaeus vannamei* infectado con *V. harveyi* y tratado con *L. racemosa*: Glándula antenal (A) con infiltración de hemolinfa y hemocitos (flecha negra); branquias (B) con infiltración de hemolinfa y hemocitos en dendobranquias normal; órgano linfoide (C) con masa amorfa con vacuolas (flecha blanca), células normales (flecha negra) y fagocitosis de células (flecha amarilla); tejido conectivo (D) con infiltración de hemolinfa y hemocitos (flechas negras); epitelio del estómago (E) con pérdida de estructura (círculo negro) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha negra); hepatopáncreas (F) con presencia de células “B” (vacuolas) (flecha negra) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha amarilla).Tinción H&E. Objetivo 40x.

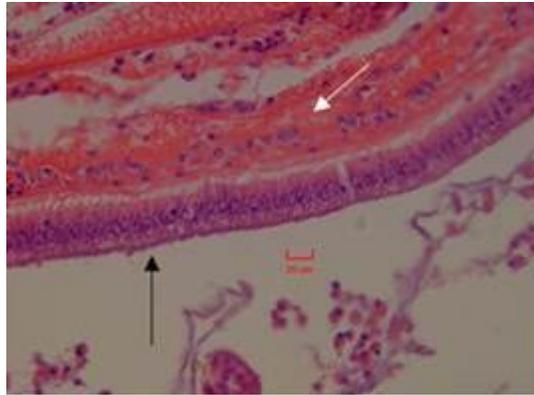


Figura 15. Corte histológico longitudinal de intestino de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio harveyi* y tratado con *L. racemosa* con epitelio cuticular simple (flecha negra) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha blanca). Tinción H&E. Objetivo 40x.

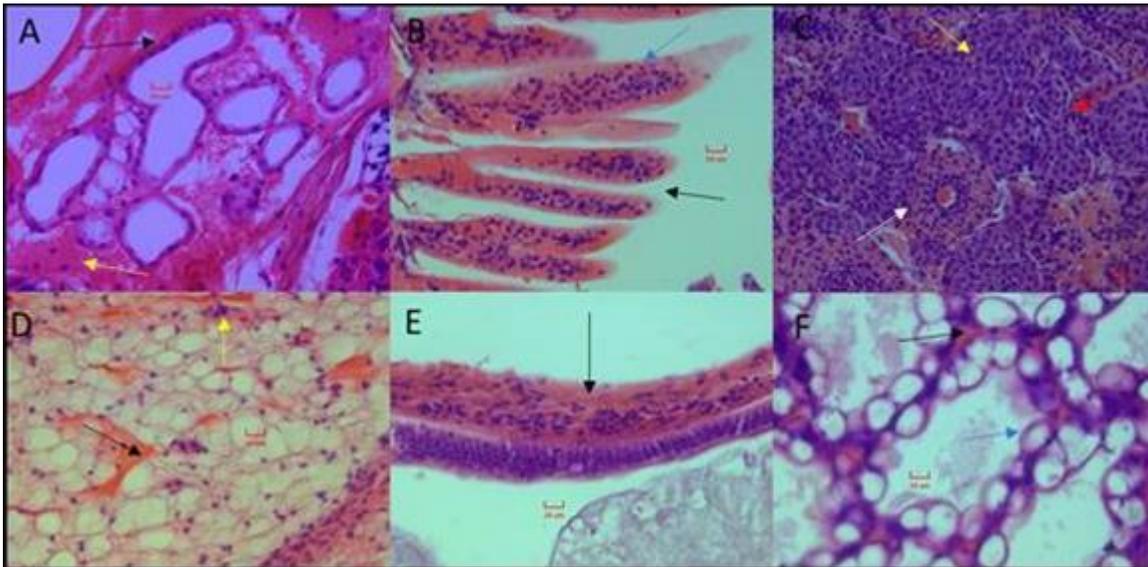


Figura 16. Órganos y tejidos de *Penaeus vannamei* infectado con *V. harveyi* y tratado con *R. mangle*: Glándula antenal (A) con atrofia celular en túbulos (flecha negra) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha amarilla); branquias (B) con ramificación normal en dendrobranchias (flecha negra) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (inflamación) (flecha azul); órgano linfoide (C) con células normales (flecha blanca), masa amorfa con vacuolas (flecha amarilla) y formación de esferoides (flecha roja); tejido conectivo (D) con infiltración de hemolinfa (flecha negra) y hemocitos (flecha amarilla); epitelio del estómago (E) con infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha negra); hepatopáncreas (F) con infiltración de hemolinfa (flecha negra) y presencia de células "B" (flecha azul). Tinción H&E. Objetivo 40x.

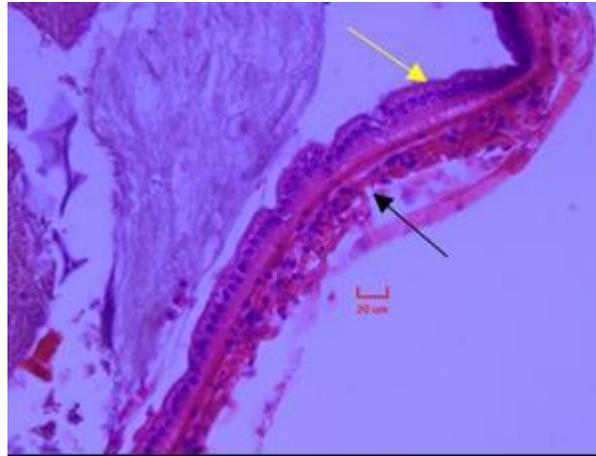


Figura 17. Corte histológico longitudinal de intestino de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio harveyi* y tratado con *R. mangle* con atrofia celular en epitelio del intestino (flecha amarilla) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha negra). Tinción H&E.

Los organismos infectados con *Vibrio campbellii* presentaron los siguientes resultados con grado de severidad 4: glándula antenal y órgano linfoide con pérdida de estructura e infiltración de hemocitos severa (Figura 18A y 18C), hepatopáncreas con atrofia tubular, desprendimiento celular (Figura 18F), tejido conectivo con infiltración severa de hemolinfa y hemocitos (Figura 18D), epitelio del estómago con infiltración de hemolinfa y hemocitos (Figura 18E), branquias con pérdida de estructura e infiltración masiva de hemocitos vía hemolinfa (Figura 18B) e intestino con atrofia celular (Figura 19).

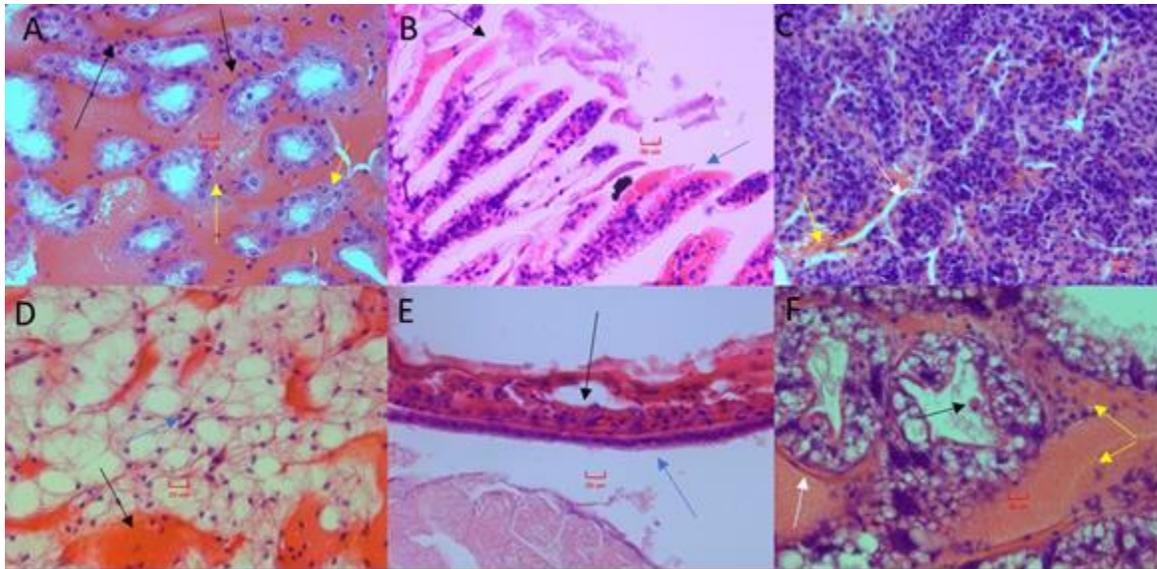


Figura 18. Órganos y tejidos de *Penaeus vannamei* infectado con *V. campbellii*: glándula antenal (A) con pérdida de estructura (flechas negras) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flechas amarillas); branquias (B) con pérdida de estructura (flecha negra) e infiltración severa de hemocitos (inflamación) (flecha azul); órgano linfoide (C) sin presencia de células normales, formación de esferoides (flecha blanca) e infiltración de hemolinfa (flecha amarilla); tejido conectivo (D) con infiltración de hemolinfa (flecha negra) y hemocitos (flecha azul); epitelio del estómago (E) con atrofia celular en células de epitelio (flecha azul) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha negra); hepatopáncreas (F) con atrofia tubular (flecha blanca), desprendimiento celular (flecha negra) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flechas amarillas). Tinción H&E. Objetivo 40x.

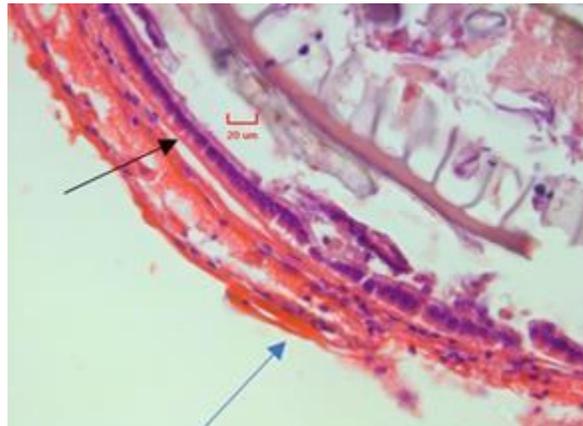


Figura 19. Corte histológico longitudinal de intestino de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio harveyi* con atrofia celular en células del epitelio (flecha negra) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha azul). Tinción H&E. Objetivo 40x.

Los camarones tratados con mangle blanco presentaron en todos sus órganos y tejidos grado de severidad 1: glándula antenal con túbulos normales (Figura 20A); branquias con ramificación

normal en dendobranquias (Figura 20B); órgano linfoide y epitelio del estómago presentaron células normales (Figura 20C y 20E); tejido conectivo con infiltración de hemolinfa y hemocitos (Figura 20D); hepatopáncreas con hipertrofia de lumen e infiltración de hemolinfa y hemocitos (Figura 20F); intestino con infiltración de hemolinfa con hemocitos (Figura 21). Los organismos tratados con Mangle rojo presentaron órganos y tejidos con infiltración de hemolinfa y hemocitos; en hepatopáncreas se observó deformación tubular en grado 2 de severidad con presencia de túbulos melanizados e infiltración de hemolinfa con hemocitos (Figura 22E); la cámara branquial con infiltración de hemolinfa y hemocitos sin daño celular (Figura 22B).

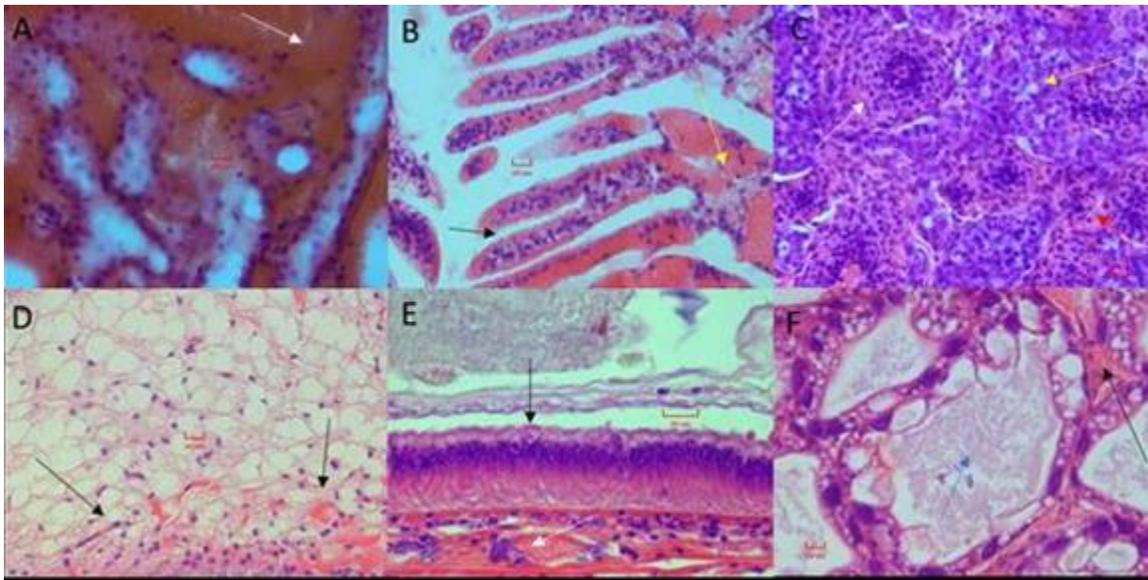


Figura 20. Órganos y tejidos de *Penaeus vannamei* infectado con *V. campbellii* y tratado con *L. racemosa*: glándula antenal (A) con infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha blanca) y células de túbulos de glándula antenal normales; branquias (B) con ramificación normal en dendobranquias (flecha negra) e infiltración de hemocitos vía hemolinfa (flecha amarilla); órgano linfoide (C) con presencia de células normales (flecha blanca), masa amorfa con vacuolas (flecha amarilla) y formación de esferoides (flecha roja); tejido conectivo (D) con infiltración de hemolinfa y hemocitos (flechas negras); epitelio del estómago (E) con estructura normal (flecha negra) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha blanca); hepatopáncreas (F) con hipertrofia de lumen en túbulos (flecha azul) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha negra). Tinción H&E. Objetivo 40x.

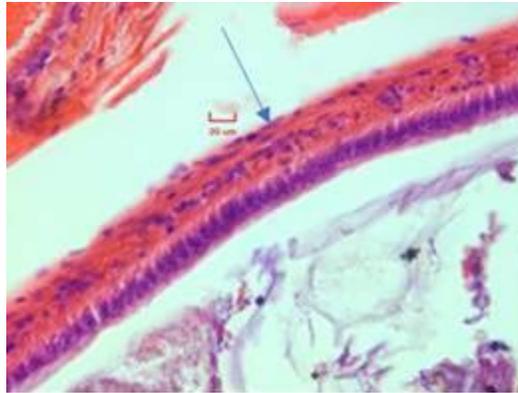


Figura 21. Corte histológico longitudinal de intestino de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio harveyi* y tratado con *L. racemosa* con infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha azul). Tinción H&E. Objetivo 40x.

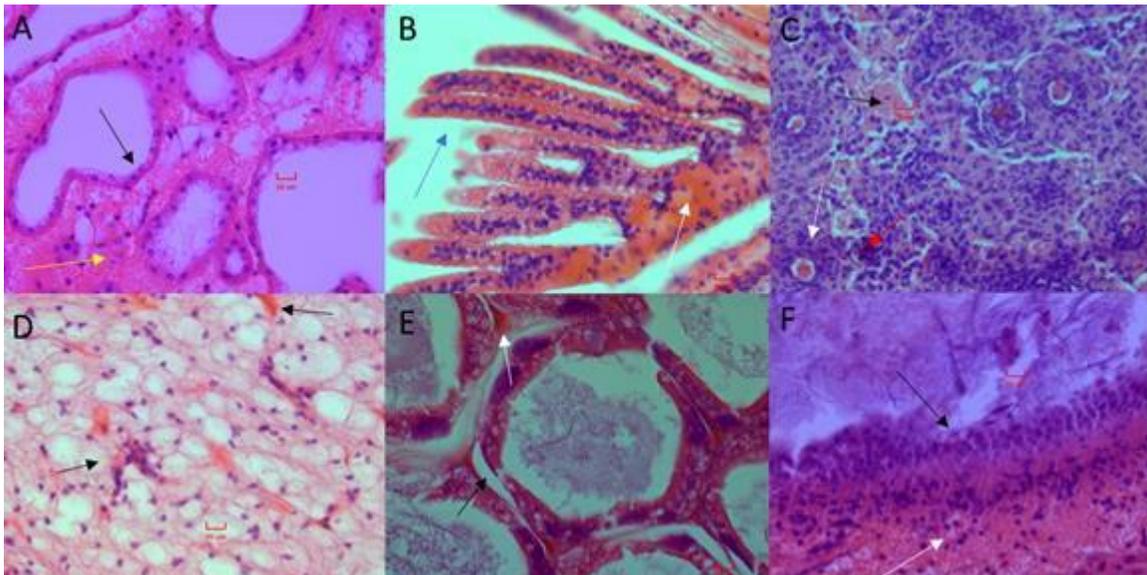


Figura 22. Órganos y tejidos de *Penaeus vannamei* infectado con *V. campbellii* y tratado con *R. mangle*: glándula antenal (A) con atrofia en células de túbulos (flecha negra) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha amarilla); branquias (B) con ramificación normal en dendobranquias (flecha azul) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha blanca); órgano linfoide (C) con presencia de células normales (flecha blanca), infiltración de hemolinfa (flecha negra) y fagocitosis de células (flecha roja); tejido conectivo (D) con infiltración de hemolinfa con hemocitos (flechas negras); hepatopáncreas (E) con infiltración de hemolinfa (flecha blanca) y atrofia tubular (flecha negra); epitelio de estómago (F) con atrofia celular (flecha negra) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha blanca). Tinción H&E. Objetivo 40x.

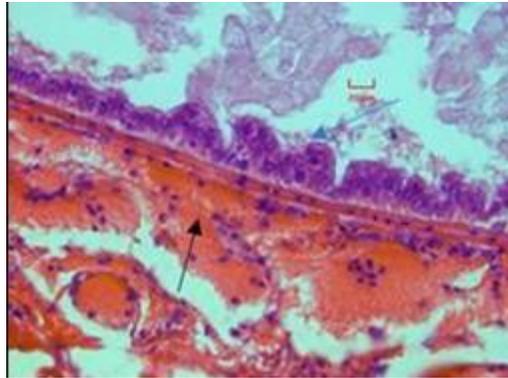


Figura 23. Corte histológico longitudinal de intestino de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio harveyi* y tratado con *R. mangle* con infiltración de hemolinfa con hemocitos y presencia de ondulaciones en epitelio (flecha azul). Tinción H&E. Objetivo 40x.

Todos los órganos y tejidos de cada grupo por bacteria se sometieron a un análisis de varianza ($p < 0.05$) comparando grados de severidad (siendo 0 = no presenta signos de infección, 1 = presencia baja de deformación tubular, 2 = se observa la presencia moderada de deformación tubular, atrofia, melanización, 3 = se observan lesiones de moderadas a severas con melanización, necrosis, atrofia y desprendimiento celular, 4 = lesiones severas con melanización, atrofia y necrosis). Se observaron diferencias significativas entre los grupos control positivo y ambos tratamientos, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre alteraciones de órganos y tejidos entre los dos tratamientos.

6.3. Análisis Hematológicos

6.3.1. Conteo Total Hemocitario

Se realizó la técnica de conteo de hemocitos totales en función de los 4 grupos de cada experimento con cada bacteria y se observaron diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$). Para determinar los grupos donde se presentan dichas diferencias se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

En organismos infectados con *V. harveyi* y tratamientos (Figura 24), la prueba de comparaciones

múltiples indicó lo siguiente: 1) Los hemocitos totales en el control negativo fue significativamente superior a los demás tratamientos ($p < 0.001$), 2) El conteo total hemocitario del control positivo fue inferior a los demás grupos analizados ($p < 0.001$) y 3) Entre los dos tratamientos (T-Blanco y T-Rojo) no se encontraron diferencias significativas ($p = 1.000$).

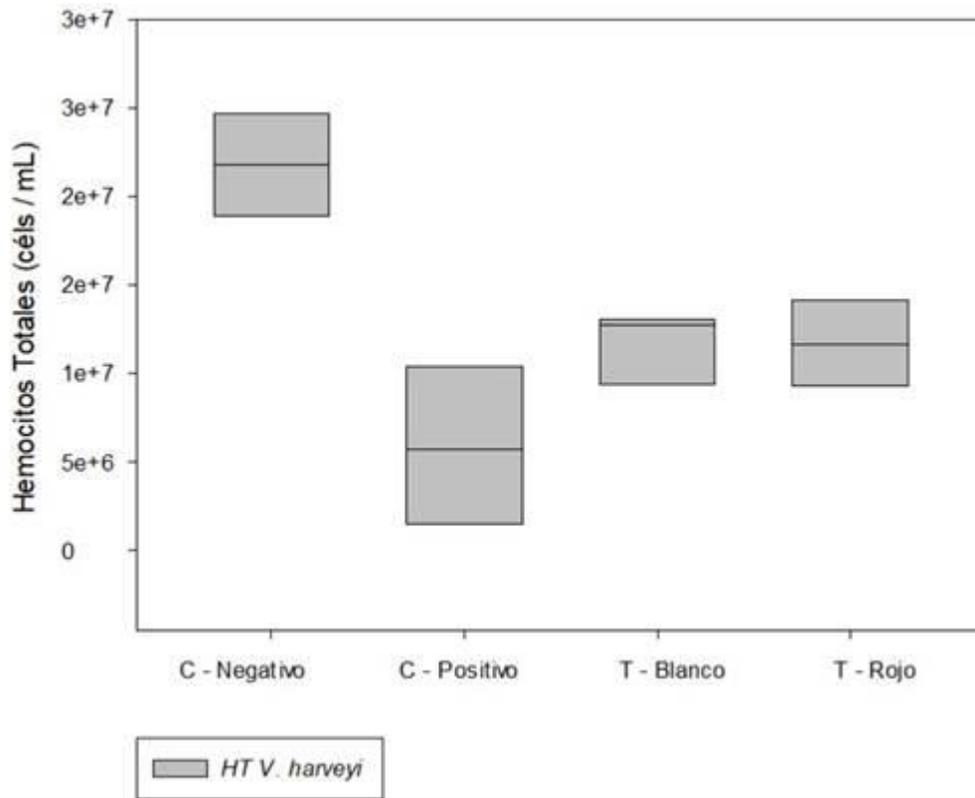


Figura 24. Conteo de Hemocitos Totales - Bioensayo con bacteria *V. harveyi*.

Para los organismos infectados con *V. campbellii* y tratamientos (Figura 25), la prueba Tukey presenta las siguientes conclusiones: 1) El conteo total hemocitario del control positivo fue significativamente inferior a los demás grupos, 2) No se encuentran diferencias significativas entre el control negativo y tratamientos (negativo vs blanco, $p = 0.874$ y negativo vs rojo, $p = 0.561$ respectivamente) y 3) No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.936$).

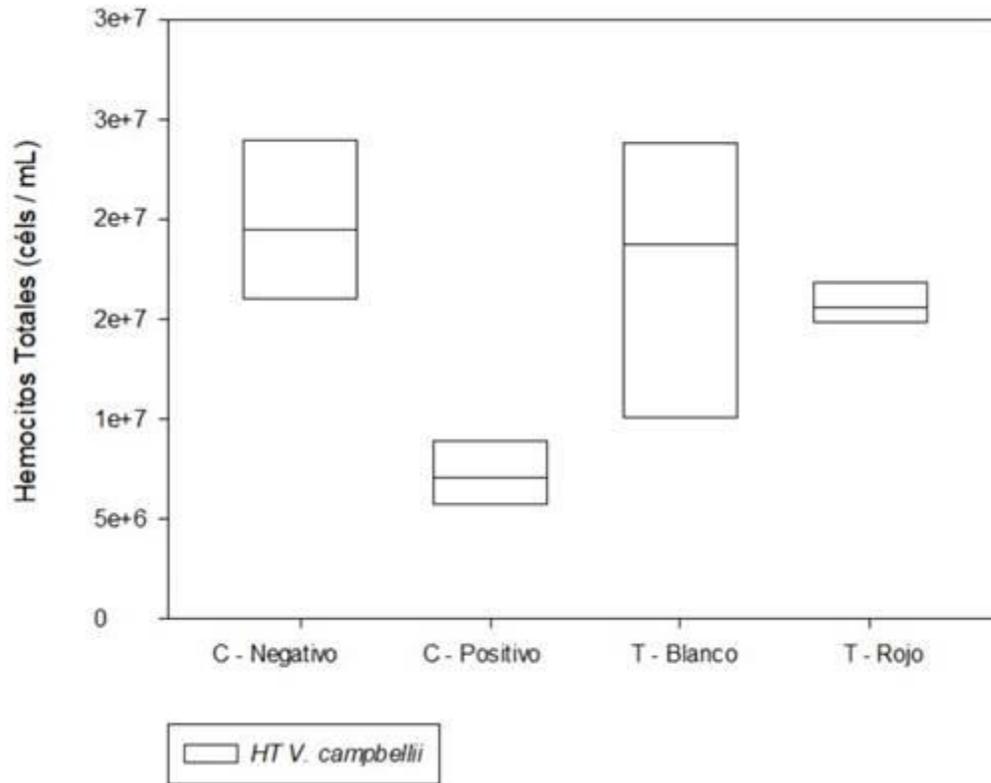


Figura 25. Conteo de Hemocitos Totales - Bioensayo con bacteria *V. campbellii*.

6.3.2. Conteo Diferencial Hemocitario

Por medio de un análisis de varianza bifactorial (tipo de hemocito y grupo) con interacción se evaluaron las diferencias en el conteo de hemocitos hialinos, semigranulares y granulares entre los 4 grupos; los resultados fueron significativos ($p < 0.05$).

Las conclusiones de análisis Tukey para el primer bioensayo fueron las siguientes: 1) Los grupos de hemocitos en el control negativo no presentaron diferencias significativas ($p = 0.132$), 2) En el control positivo todos los grupos de hemocitos presentan diferencias significativas ($p < 0.001$ y $p = 0.014$) y 3) En el tratamiento con mangle blanco los hemocitos granulares altamente significativos con respecto a los hemocitos hialinos y semigranulares ($p < 0.001$), de la misma manera, hay presencia de diferencia significativa entre hemocitos hialinos y semigranulares ($p = 0.002$); esta situación se observó también en tratamiento con mangle rojo ($p < 0.001$ y $p = 0.002$ respectivamente) (Figura 26).

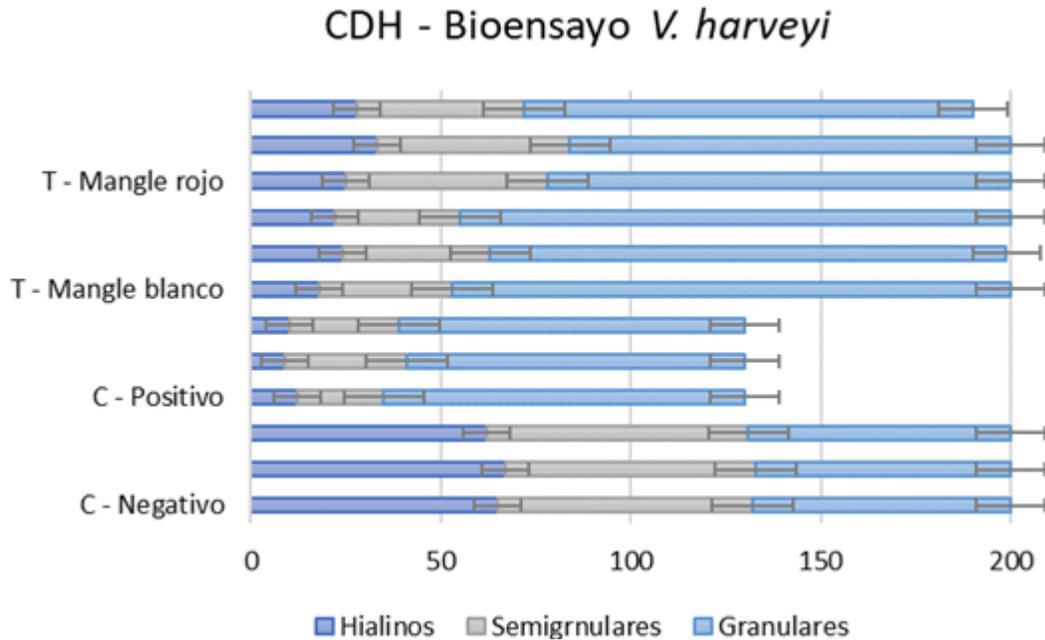


Figura 26. Conteo Diferencial Hemocitario - Bioensayo con bacteria *V. harveyi*.

En el bioensayo con la bacteria *Vibrio campbellii* (Figura 27), el análisis Tukey presenta las siguientes conclusiones: 1) Los hemocitos no presentan diferencias significativas en el control negativo ($p=0.252$), 2) Los hemocitos granulares presentan diferencias significativas en comparación a los hialinos y semigranulares ($p<0.001$), así como entre éstos respectivamente ($p=0.003$), 3) Los grupos de hemocitos en T- Mangle blanco presentan diferencias significativas ($p=0.004$) y 4) Los hemocitos granulares presentan diferencias significativas con respecto a hialinos y semigranulares ($p<0.001$), mientras que entre éstos no se presenta diferencia significativa ($p=0.224$).

CDH - Bioensayo *V. campbellii*

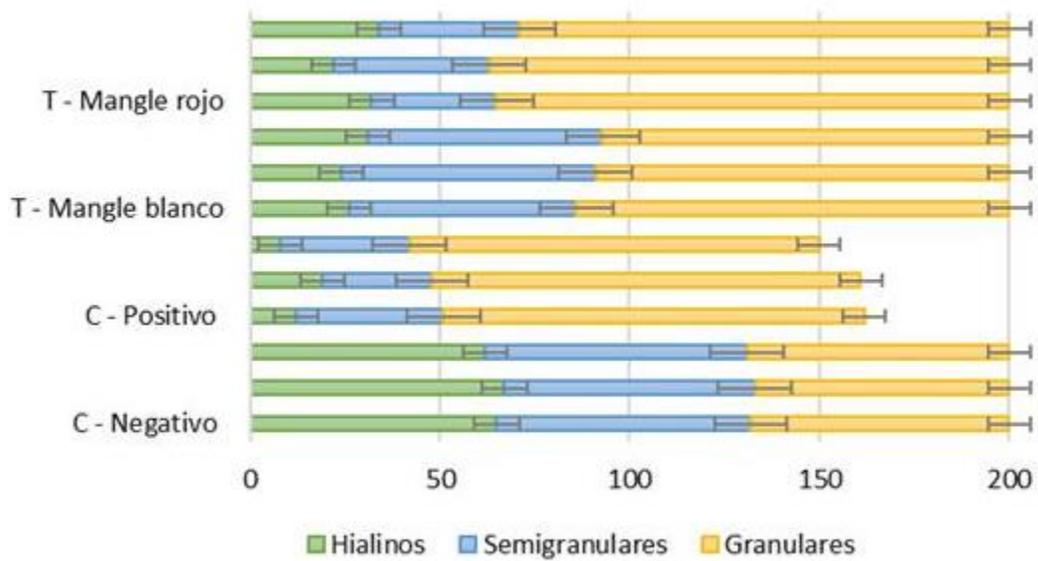


Figura 27. Conteo Diferencial Hemocitario – Bioensayo con bacteria *V. campbellii*.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio mostró que los camarones alimentados con dietas de extracto hidroalcohólico de mangle tuvieron un aumento significativo en la tasa de supervivencia, conteo total y diferencial hemocitario y su estructura histológica en comparación a los organismos infectados. Los resultados obtenidos en los perfiles fitoquímicos de ambos mangles son similares a las investigaciones de Cruz *et al.* (2015), Marroquín y Cruz (2016), López *et al.* (2018) y Da Silva (2019), donde el contenido de flavonoides y taninos se encuentran siempre presentes y en altas cantidades. Estos compuestos están ligados a las propiedades antioxidantes (Rosales-Castro, 2009) y antiinflamatorias (Parvin *et al.*, 2015), donde suponen un efecto estabilizador de la membrana gracias a una unión por cargas entre los componentes del extracto vegetal con la membrana del heritrocito (Oyedapo *et al.*, 2010), y así, proteger a la membrana de agentes que estén involucrados en la lisis de esta (Acosta, 2018).

Los extractos hidroalcohólicos de Mangle rojo y Mangle blanco adicionados en el alimento disminuyó las alteraciones en órganos y tejidos y mejoró la respuesta hemocitaria en los organismos. No existen muchos reportes en camarón, sin embargo, el uso de terapias con plantas dentro de la acuicultura ha mostrado resultados positivos y complementa la posibilidad del uso de herbolaria en esta área. Esto se verifica con los estudios de mejora en sistema inmunológico por ingesta de alimento adicionado con extractos de plantas en salmón del atlántico (Kousoulaki *et al.*, 2015; Kousoulaki *et al.*, 2020), abulón rojo (Méndez-Ancca *et al.*, 2018), trucha arcoíris (Desai *et al.*, 2012), tilapia del nilo (Azaza *et al.*, 2008), besugo (Atalah *et al.*, 2007) y lubina (Tibaldi *et al.*, 2015; Cardinaletti *et al.*, 2018); donde todos presentan un beneficio post cosecha para consumo humano, así como bajo o nulo impacto en el medio ambiente.

Los hemocitos juegan un papel importante en la defensa celular; un número inferior al normal de hemocitos que circulan en los crustáceos se correlaciona bien con una resistencia reducida a los patógenos (Dhayanithi *et al.*, 2015). Se observaron diferencias significativas, tanto en conteo total como en diferencial hemocitario, respecto al control positivo de ambas bacterias; la disminución del conteo total hemocitario (CTH) en los camarones infectados probablemente se debió a la acumulación de hemocitos en el lugar de la inyección para la cicatrización de heridas y la fagocitosis de cuerpos extraños (Aftab-Uddin *et al.*, 2017; Mugidah *et al.*, 2018). En este

estudio, el CTH aumentó después de la ingesta del alimento adicionado con los extractos de mangle rojo y blanco, esto puede deberse a que los concentrados aumentaron la inmunidad de los camarones que conduce a un aumento de CTH, promoviendo la resistencia en los camarones mediante la proliferación de hemocitos y el aumento de su actividad fagocítica (Yeh *et al.*, 2009; Velmurugan & Citarasu, 2010; Kannappan *et al.*, 2018; Zhai & Li, 2019). En este estudio, la estructura histológica en los organismos de ambos tratamientos demostró una mejora en comparación a los grupos infectados, tanto hepatopáncreas como el resto de los órganos y tejidos; esto se observa de la misma manera en la sobrevivencia de los camarones, lo que confirma que el uso de herbolaria para la trata de enfermedades bacterianas es una opción viable. Tal es el caso de la investigación de Aftab *et al.* (2017) donde afirma que la adición de extractos metanólicos de hierbas influyen de manera positiva en *P. monodon* infectados con *V. harveyi*; por otro lado, Mufidah *et al.* (2018) expone al mangle *Avicennia marina* como buen candidato para la trata de *Vibrio parahaemolyticus* en *P. vannamei*.

8. CONCLUSIONES

1. Ambos extractos hidroalcohólicos inhibieron el crecimiento de ambas bacterias *in vitro*.
2. Los extractos adicionados al alimento controlaron la mortalidad causada por *V. harveyi* y *V. campbellii* en los organismos estudiados.
3. Los análisis histológicos y hematológicos presentan diferencias significativas entre grupos control y tratamientos.
4. Los extractos de *R. mangle* y *L. racemosa* pueden utilizarse como excelentes candidatos para tratamiento de enfermedades en *P. vannamei* generadas por *V. campbellii* y *V. harveyi*.

9. RECOMENDACIONES

En base a esta investigación, se numeran las posibles sugerencias:

1. Hidroponia de mangle rojo y/o blanco en estanques experimentales de cultivo de camarón, u otro tipo de crustáceos, para remoción de nutrientes y mejora en la calidad del agua.
2. Dados los resultados en el punto anterior, someter ambos mangles a las pruebas vistas en esta investigación (perfil fitoquímico y actividad antioxidante), con previa obtención de extractos mediante diferentes metodologías.
3. Cuando los camarones obtengan un peso y medida óptimas, someterlos a una infección experimental por inyección con bacterias del género *Vibrio*.

10. REFERENCIAS

- Acevedo-Barrios, R.L., Severiche-Sierra, C.A. y Jaimes-Morales, J.C. 2015. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción + Limpia*. 10(2): 160-172.
- Acosta, G.M. 2018. Evaluación de la actividad antibacteriana y antiinflamatoria *in vitro* del extracto vegetal seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle L.*). Tesis de Licenciatura. Ambato, Ecuador.
- Acosta-Sánchez, G.M. Evaluación de la actividad antibacteriana y antiinflamatoria *in vitro* del extracto vegetal seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle L.*) (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Aftab-Uddin, S., Siddique, M.A.M., Romkey, S.S. & Shelton, W.L. 2017. Antibacterial function of herbal extracts on growth, survival and immunoprotection in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 50: 25 pp.
- Aguirre-Chanta, L.E. Efecto del neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*Origanum vulgare*) en el crecimiento de *Vibrio spp.* resistentes a antibióticos, aislados en *Litopenaeus vannamei* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Tumbes, Perú.
- Arulkumar, A., Kumar, K. S. & Paramasivan, S. 2020. “Antibacterial and *in vitro* antioxidant potential of Indian mangroves”. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14: 10 pp.
- Atalah, E., Hernández, C.M., Izquierdo, M.S., Rosenlund, G., Caballero, M.J., Valencia, A. & Robaina, L. 2007. Two microalgae *Crypthecodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricorutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 270: 178 – 185.
- Aybar-Parian, K. & Ari-Condori, V.A. 2018. Efecto antiinflamatorio y toxicidad aguda del extracto etanólico de las hojas de *Nasa urens* (Jacq.) Weigend (Ortiga de las Lomas) en animales de experimentación. Tesis de Licenciatura. Lima, Perú.
- Azaza, M.S., Mensi, F., Ksouri, J., Dhraief, M.N., Brini, B., Abdelmouleh, A. & Kraiem, M.M. 2008. Growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*) fed with diets containing grades levels of green algae ulva meal (*Ulva rigida*) reared in geothermal Waters of southern Tunisia. *J. Appl. Ichthyol.* 24: 202 – 207.
- Aznan, A.S., Leong, L.K., Fei, L.C., Ibrahimi, N.A., Wan-Ibrahim, W.N., Musa, N., Sung, Y.Y. y Musa N. 2018. Protective effect of apple mangrove *Sonneratia ceseolaris* extract in *Edwardsiella tarda*-infected African catfish, *Clarias gariepinus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 78. 338-445.
- Barreno-Coba, J.A. & Martínez, J.X. Evaluación del rendimiento del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con el uso de dos probióticos como agentes controladores de *Vibrio* (Tesis de Pregrado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Behbahani, B.A. y Yazdi, F.T. 2015. *In vitro* study of antibacterial activity of mangle negro extracts against selected pathogens from *Enterobacteriaceae* and *Bacillaceae* families. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 17(12): 4 pp.

- Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Shahidi, F., Noorbakhsh, H., Vasiee, A. y Alghooneh, A. 2018. Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 114. 225-232.
- Bell, T. A., y Lightner, D. V. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. No. 595.3843 B4
- Benzie, I. F., y Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 239(1):70-76.
- Bermúdez-Almada, M.C., Espinosa-Plasencia, A., Santiago-Hernández, M.L., Barajas-Borgo, C.J., Acedo-Félix, E. 2014. Comportamiento de Oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aisladas de los organismos. *Biotecnia*. 16(3):29-37.
- Bermúdez-Almada, M-C., Espinosa-Plasencia, A., Lara-Espinoza, C.L., Rivera-Domínguez, M., Astorga-Cienfuegos, K.R. y Villalpando-Canchola, E. 2017. Detección de *Vibrio* mediante la amplificación de genes de patogenicidad en camarón *Litopenaeus vannamei* cultivado en un sistema tipo invernadero. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 72: 20-29.
- Bittencourt-Rodrigues, C.F., Pena-Ferreira, M.J., Novo-Belchor, M., Costa, C.R.C., Novaes, D.P., Bispo-dos Santos Junior, A., Tamayose, C.I., Terashima-Pinho, M.V., De Olivera, M.A. y Hikari-Toyama, M. 2019. Evaluation of the inhibitory potential of Casuarictin, an ellagitannin isolated from White mangrove (*Laguncularia racemosa*) leaves, on Snake venom secretory phospholipase A2. *Marine Drugs*.
- Blanco, L. (13-04-2020). Mangle blanco: características, hábitat, taxonomía y usos. Lifeder: <https://www.lifeder.com/mangle-blanco/>.
- Blanco-Olano, J. & Millones-Gómez, P.A. 2020. Efecto cicatrizante del gel de Aloe vera con *Erithroxylum coca* en modelo animal. *Medicina Naturista*. 14 (1): 10 pp.
- Brunton, L.A., Desbois, A.P., Garza, M., Wieeland, B., Mohan, C.M., Hasler, B., Tam, C.C., Thien-Le, P.N., Thanh-Phoung, N., Thi-Van, P., Nguyen-Viet, H., Eltholth, M.M., Pham, D.K., Duc, P.P., Toung-Linh, N., Rich, K.M., Mateus, A.L.P., Hoque, A., Ahad, A., Absar-Khan, M.N., Adams, A. y Guitian, J. 2019. Identifying hotspots for antibiotic resistance emergence and selection, and elucidating pathways to human exposure: Application of a systems-thinking approach to aquaculture systems. *Science of the Total Environment*. 687: 1344-1356.
- Buschamann, A.H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M.A., Henríquez, L.A., Ivanova, L., Moy, L., Godfrey, H.P. y Cabello, F.C. 2012. Salmon acuaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLoS ONE*. 7(8): 11 pp.
- Campos-Ruiz, J. y Pretel-Sevillano, O. 2013. Efecto protector del extracto hidroalcohólico de *Rhizophora mangle* sobre la lipoperoxidación hepática en *Rattus rattus* var. *albinus*. *Sagasteguiana*. 1(1): 39-44.
- Carbay-Uyuguari, Y.A. y Sorroza-Ochoa, L. 2019. Uso de extracto alcohólico de plantas Tomillo (*Thymys vulgaris*), Guayaba (*Psidium guajava*) y Eucalipto (*Eucalyptus melliodora*) frente a Vibriosis en Acuicultura. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*. 2(3):48-55.

- Cardinaletti, G., Messina, M., Bruno, M., Tulli, F., Poli, B.M., Giorgi, G., Chini-Zittelli, G., Tredici, M. & Tibaldi, E. 2018. Effects of graded levels of a blend of *Tisochrysis lutea* and *Tetraselmis suecica* dried biomasses on growth and muscle tissue composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets low in fish meal and oil. *Aquaculture*. 485: 173 – 182.
- Cedeno, R. 2005. Análisis microbiológico y caracterización de poblaciones bacterianas en sistemas de engorde de camarón durante un ciclo de cultivo. *CENAIM*. 124: 6 pp.
- Celikel, N. & Kavas, G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Sciences* (26). P. 174-181.
- CESASIN. 2017. Sanidad Acuícola para cultivo de camarón. CESASIN. Recuperado de <https://cesasin.mx/wp-content/uploads/2018/01/CAMARO%CC%81N-Cuaderno-del-participante-julio-2017.pdf>.
- Chacón, P.A. 2018. Evaluación de la actividad antioxidante de las hojas de *Eugenia churutensis* X. Cornejo. Tesis de Licenciatura. Guayaquil, Ecuador.
- Chávez-Nuñez, R., Morales-Mendoza, J.J. y Frank-Henry, V.G. 2019. Situación actual de las plantas medicinales comercializadas en el mercado Plaza Mariscal Cáceres de San Juan de Lurigancho Lima en el mes de septiembre, 2019. Universidad María Auxiliadora, Lima, Perú.
- Chen, T., Wong, N.K., Jiang, X., Luo, X., Zhang, L., Yang, D., Ren, Ch. y Chaoqun, H. 2015. Nitric oxid as an antimicrobial molecule against *Vibrio harveyi* infection in the hepatopancreas of Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 45:114-120.
- Citarasu, T., Venkatramalingam, K., Babu, M.M., Sekar, R.R.J. & Petermarian, M. 2003. Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea corylifolia* on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae. *Aquaculture International*. 11: 583-895.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. 2017. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Mazatlán, Sinaloa, México. 300 pp.
- Coque, J.G. 2019. Diseño de un protocolo de obtención de liposomas con compuestos bioactivos contra bacterias patógenas de camarón. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Coronel-Bustamante, J.A. 2019. Uso de fármacos utilizados para tratamiento profiláctico y terapéutico de la Vibriosis en el cultivo de Camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- Cruz, S.M., Marroquin, N., Álvarez, L.E., Chang, D.E. & Cáceres, A. 2015. Evaluation of Mangrove (*Rhizophora mangle* L.) products as coloring, antimicrobial and antioxidant agents. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*. 12 (2): 8 pp.
- Cuéllar-Anjel, J. 2014. Métodos para el diagnóstico de enfermedades en camarones peneidos. p. 78. En: Morales, V & Cuéllar-Anjel (eds.) Guía Técnica – Patología e Inmunología de camarones peneidos. OIRSA, Panamá, Rep. De Panamá. 382 pp.
- Da Silva, E.M. 2019. Caracterización fitoquímica, actividad antioxidante y funciones biológicas

del extracto acuoso de hojas de *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn. Tesis de Maestría. Pernambuco, Brazil.

- Dahibhate, N.L., Saddhe, A.A. & Kumar, K. 2019. Mangrove Plants as a source of bioactive compounds: A review. Bentham Science Publishers. 9 (2): 86 -97.
- De la Cruz-Francisco, V. 2012. *Rhizophora mangle* Linnaeus, 1753 como especie sombrilla y razón biológica para la protección y restauración de la Laguna de Tampamachoco, Veracruz, México. Biocyt. 5(18):341-352.
- Desai, A.R., Links, M.G., Collins, S.A., Mansfield, G.S., Drew, M.D., Van Kessel, A.G. & Hill, J.E. 2012. Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 134 – 142.
- Dhayanithi, N.B., Ajithkumar, T.T., Arockiaraj, J., Balasundaram, C. & Harikrishan, R. 2015. Dietary supplementation of *Avicennia marina* extracto on immune protection and disease resistance in *Amphirion sebae* against *V. alginolyticus*. Fish & Shellfish Immunology. 3: 7 pp.
- Dixon, B. 2000. La biología de la resistencia a los antibióticos en Acuicultura. Panorama Acuícola. 3 pp.
- Dong, X., Bi, D., Wang, H., Zou, P., Xie, G., Wan, X., Yang, Q., Zhu, Y., Chen, M., Guo, C., Liu, Z., Wang, W. y Huang, J. 2017. PirABvp-Bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* Pathogens Isolated from the Same AHPND-Affected Pond Possess Highly Similar Pathogenic Plasmids. Front. Microbiol. 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01859. 9 pp. (b)
- Dong, X., Chen, J., Song, J., Wang, H., Wang, W., Ren, Y., Guo, C., Wang, X., Tang, K.F.J. y Huang, J. 2019. Evidence of the horizontal transfer of pVA1-type plasmid from AHPND causing *V. campbellii* to non-AHPND *V. owensii*. Aquaculture. 503:396-402.
- Dong, X., Wang, H., Xie, G., Zou, P., Guo, C. Liang, Y. y Huang, J. 2017. An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the PirVp gene causes acute hepatopancretic necrosis disease. Emerging Microbes & Infections. 6(2): 3 pp. (a)
- Dotulong, V., Wonggo, D. & Montolalau, L.A.D.Y. 2018. Phytochemical content, total phenols, and antioxidant activity of mangrove *Sonneratia alba* Young leaf through different extraction methods and solvents. International Journal of ChemTech Research. 11 (11): 356 – 363.
- EcuRed. (13-04-2020). EcuRed. https://www.ecured.cu/Mangle_rojo.
- Espinoza-Berrezueta, I.S. 2017. Uso y aplicaciones de probióticos en el cultivo de camarón y sus mecanismos de acción. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- Estevam, C.S., Cavalcanti, A.M., Cambui, E.V.F., Neto, V.A., Leopoldo, P.T.G., Araujo, B.S., Porfirio, Z. & Santana, A.E.G. 2009. Ensayo fitoquímico y microbiológico de extractos de corteza de *Maytenus rígida* Mart. (*Celastraceae*). Revista Brasileira Pharmacognosia. 19: 299-303.
- Falqueto, A.R., Silva, D.M. & Venturim, R. 2008. Photosynthetic performance of mangroves *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* under field conditions. R. Árvore, Vicosa-MG. 32 (3): 6 pp.
- FAO. 2015. Informe de situación sobre la resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de:

<http://www.fao.org/3/a-ml542s.pdf>.

- FAO. (03-2020). Acuicultura: Papel de la FAO en la acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado de: <http://www.fao.org/aquaculture/es/>.
- Ferreira, T., Batista, A., Costa, F., Alves, S., Días da Silva, N., Martins, J., Oliveira, K., Jordao, T., Moraes, L., Silva, C., Minafra, C.S., Ramos dos Santos, F. & Silva, C. Aditivos fitogénicos: aceites esenciales para pollos de engorde – revisión. *Research, Society and Development*. 9 (3): 20 pp.
- Fernández-Pachón, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M. & García-Parrilla, M.C. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *ALAN*. 56 (2): 10 pp.
- Fickert, T. 2020. To plant or not to plant, that is the question: Reforestation vs. Natural regeneration of Hurricane-disturbed mangrove forests in Guanaja (Honduras). *Forests*. 11 (10): 22.
- Flegel, T. 2019. A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *World Aquaculture Society*. DOI: 10.1111/jwas.12589. 18 pp.
- García, D. y Bedoya, N, De Vivero, A.F. 2020. Importancia de la Armada Nacional en la Preservación y Control de los Ecosistemas Marinos: Estuarios y manglares en la región Caribe. *Revista de la Ciencia y la Investigación*. 13 (1): 19 pp.
- Glaserapp, Y., Lucas, C., Wöltje, T., Fohrer, J. y Papenbrock, J. Anti-adhesion activity of Tannins isolated from the mangrove *Laguncularia racemosa*. *Chemistry & Biodiversity*. 16(5):1-13.
- González, A., Briceño, H., Chirinos, J., Buonocore, R. & Villarreal, A. 2014. Variación de la concentración total de clorofila a, b, clorofila total y tasa de fotosíntesis en *Avicennia germinans* en el manglar de Punta de Palmas, municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Revista Investigaciones Científicas*. 5 (1,2): 16 pp.
- Han, J., Tang, K. y Lightner, D.V. 2015. Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Dis Aquat Org*. 115: 245-251.
- Han, J.E., Tang, K.F.J., Aranguren, L.F. y Piamsomboon, P. 2016. Characterization of pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, pirABvp (-) *V. parahaemolyticus*, and pirABvp (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture*. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.12.022. 27 pp.
- Harlina, H., Prajitno, A., Suprayitho, E., Nursyam, H. & Rosmiati, H. 2015. Potential study of Kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) leaves as antibacterial against *Vibrio harveyi*, disease causative agent of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) post larvae. *Aquaculture Res. Development*. 6 (10): 5 pp.
- Horna-Quintana, G., Silva-Díaz, M., Vicente-Taboada, W. y Tamariz-Ortiz, J. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev. Med. Hered*. 16(1):1-39.

- Huei-Mien, K., Prachumwat, A., Chun-Ping, Y., Yi-Ting, Y., Promsri, S., Liu, Kuan-Fu, L., Chu-Fang, L., Mei-Yeh, J.L., Mei-Chin, L., Isheng, J.T. y Wen-Hsiung, L. 2016. Comparative genomics of *Vibrio campbellii* strains and core species of the *Vibrio harveyi* clade. *Scientific Reports*. 7:11 pp.
- Ibarra, J.C. 2015. Historia de las enfermedades en el cultivo de camarón en el Noroeste de México. VII Simposio Internacional de Sanidad e Inocuidad Acuícola. Ensenada, B.C.
- Jiang, S., Weng, B., Liu, T., Su, Y., Liu, J., Lu, H., & Yan, C. 2017. Response of phenolic metabolism to cadmium and phenanthrene and its influence on pollutant translocations in the mangrove plant *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco (Ac). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 141: 290–297.
- Jimbo-Jaramillo, J.I. 2017. Uso de probióticos como alternativa a la prevención de enfermedades en el cultivo de camarón (Examen complejo). Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala.
- Kannappan, S., Sivakumar, K. & Sethi, S. 2018. Protective effect of mangrove (*Rhizophora apiculata*) leaves extract in shrimp (*Penaeus monodon*) larvae against bio-luminescent disease-causing *Vibrio harveyi* bacteria. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 16 (1); 9 pp.
- Kannappan, S., Sivakumar, K. y Sethi, S. 2018. Protective effect of mangrove (*Rhizophora apiculata*) leaves extract in shrimp (*Penaeus monodon*) larvae against bio-luminescent disease-causing *Vibrio harveyi* bacteria. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 16(1):9 pp.
- Karnjana, K., Soowannayan, C. y Wongprasert, K. 2019. Ethanolic extract of red seaweed *Gracilaria fisheri* and furanone eradicate *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* biofilms and ameliorate the bacterial infection in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*. 88:91-101.
- Kharisma, A., Tjahjaningsih, W. & Sigit, S. 2020. Determination of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration of ketapang (*Terminatia catappa*) leaves extract against *Vibrio harveyi*. *Earth and Environmental Science*. 441: 6 pp.
- Kousoulaki, K., Berge, G.M., Turid, M., Krasnov, A., Baeverfjord, G., Ytrestoyl, T., Carlehog, M., Sweetman, J. & Ruyter, B. Microalgal *Schizochytrium limacinum* Biomass improves growth and fillet quality when used long-term as a replacement for fish oil, in modern salmon diets. *Frontiers in Marine Science*. 7: 22 pp.
- Kousoulaki, K., Knutsdatter, T.K., Krasnov, A., Torgersen, J.S., Morkore, T. & Sweetman, J. Metabolism, health and fillet nutritional quality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing n-3-rich microalgae. *Journal of Natural Science*. 4: 13 pp.
- Kumar, R., Hann, T. y Wang, H.C. 2019. Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*. DOI: 10.1111/raq.12414. 14 pp.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J. & Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cien. Technol. Aliment*. 25 (4): 726-732.
- Leads, R.R., Burnett, K.G. y Weinstein J.E. 2019. The effect of microplastic ingestion on

survival of the Grass shrimp *Palaemonetes pugio* (Holthuis, 1949) challenged with *Vibrio campbellii*. Environmental Toxicology and Chemistry. 38(10): 2233-2242.

Lightner, D. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society. USA. 305 pp.

Loli-Ponce, R. Hernán-Sandoval, M., Callohuari-Quispe, R. & Mundaca-Pérez, L.A. 2016. Tratamiento regenerativo de la musca gástrica con la mazamorra de tocosh de papa, en animales de experimentación. Theorema, UNMSM. 3 (4): 7 pp.

Lopez, D., Cherigo, L., De Sedas, A., Spadafora, C. y Martínez-Luis, S. 2018. Evaluation of antiparasitic, anticancer, antimicrobial and hypoglycemic properties of organic extracts from Panamanian mangrove plants. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 11(1):32-39.

Luximon-Ramma, A., Baborun, T., Soobrattee, M.A., Aruoma, O.I. 2002. Antioxidant activities of phenolic, pro anthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. J. Agr. Food Chem. 50: 5042–5047

Makkar, H. P., Blümmel, M., Borowy, N. K., y Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. Journal of the Science of Food and Agriculture. 61(2):161-165.

Manilal, A., Sujith, S., Seghal, J., Kiran, J., Selvin, J. y Shakir, C. 2009. Biopotentials of mangroves collected from the southwest coast of India. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. 4(1): 59-65.

Marigo, G. 1973. Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. Analysis 2: 106–110.

Marroquín, N. & Cruz, S.M. 2016. Actividad biológica y caracterización química de los extractos de las hojas y corteza de *Rhizophora mangle* L. Ciencia, Tecnología y Salud. 3 (1). 9 pp.

Martín-Rodríguez, A.J., Ticona, J.C., Jiménez, I.A., Flores, N., Fernández, J.J. y Bazzocchi, I.L. 2015. Flavonoids from *Piper delineatum* modulate quorum-sensing-regulated phenotypes in *Vibrio hareyi*. Phytochemistry. 117:98-106.

Mayer-Bernal, R. y Guzmán, M. 1984. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. Biomédica. 4(3 y 4): 1-10.

Mendes, R.J.A., Pereira-Filho, A.A., Lustosa-Nogueira, A.J., Freitas-Araújo, K.R., Costa-Franca, C.R., Borba- De Carvalho, I., Lindoso-Da Silva, N.M., Santana-Azevedo, A., Garros-Rosa, I. 2017. Evaluation of molluscicidal activity of three mangrove species (*Avicennia schauariana*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*) and their effects on the bioactivity of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 60: 9 pp.

Méndez-Ancca, S., Chagua, S.R., Morales, L.F., Chili, V.F., Ilasaca, L.E., Huayhua, E. & Amachi, F.S. 2018. Aceptabilidad de ensilado de alga parda (*Lessonia trabeculata*) por el abalón rojo (*Haliotis rufescens*) en condiciones experimentales. Revista de Investigaciones Altoandinas. 20 (3): 281 – 288.

Mendoza-Escamilla, V. 2018. Selección 2018: Así es como México siembra y cosecha camarones en Sinaloa. Forbes México. Recuperado de

<https://www.forbes.com.mx/camarones-de-granja-vencen-captura-tradicional/>.

- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. D., Coube, C. S., & Leitão, S. G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research*. 15(2):127-130.
- Mesa-Venegas, A.M., Zapata-Uribe, S., Arana, L.M., Zapata, I.C., Monsalve, Z. & Rojano, B. 2015. Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 14 (1): 1 – 10.
- Morales-Covarrubias, M.S. 2008. Enfermedades Bacterianas (María Soledad Morales-Covarrubias). En: Cuéllar-Anjel y Vielka-Morales. *Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 18 pp.
- Morales-Covarrubias, M.S. 2014. Montajes en fresco. p. 29-47. En: Morales, V. & Cuéllar-Anjel. *Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. OIRSA, Panamá. 382 pp.
- Morales-Covarrubias, M.S., Cuéllar-Anjel, J., Varela-Mejías, A. y Elizondo-Ovares, C. 2018. Shrimp Bacterial Infections in Latin America: A Review. *Asian Fisheries Science* 31S: 76-87.
- Morales-Covarrubias, M.S., García-Aguilar, N. y Puello-Cruz, A.C. 2019. Biopotentials of Mangroves. *International Journal of Agriculture, Environment and BioResearch*. 4(5): 264-281.
- Mufidah, D.A., Wardiyanto, A. & Diantarti, R. 2018. *Avicennia alba* fruit extract as a natural antibacterial treatment of *Vibrio parahaemolyticus* infection in vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Aquasains*. 7 (1): 8 pp.
- Muñoz, A.M., Ramos-Escudero, D.F., Alvarado, C. & Castañeda, B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Quim. Perú*. 73 (3): 142 – 149.
- Naturalista. (13-04-2020). Mangle blanco (*Laguncularia racemosa*). Naturalista. <https://www.naturalista.mx/taxa/62854-Laguncularia-racemosa>.
- Navarrete-Soriano, A. 2015. Protocolo para el uso y aplicación racional de productos químicos, microbiológicos y antibióticos en la producción de camarón marino de cultivo en El Salvador. 1ra. Edición. ITCA Editores. 28 pp.
- Noor, N., Defoirdt, T., Alipiah, N., Karim, M., Daud, H. y Natrah, I. 2018. Quorum sensing is required for full virulence of *Vibrio campbellii* towards tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Journal of Fish Diseases*. DOI: 10.1111/jfd.12946. 7 pp.
- Norouzitallab, P., Biswas, P., Baruah, K. y Bossier, P. 2015. Multigenerational immune priming in an invertebrate parthenogenetic *Artemia* to a pathogenic *Vibrio campbellii*. *Fish & Shellfish Immunology*. 42:426-429.
- Núñez-Fuentes, E.F. 2016. Evaluación de la actividad antibacteriana frente a *Helicobacter pylori* de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. obtenidos mediante secado por aspersión (Tesis de Licenciatura). Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.
- Orellana-De Granados, C.M. 2017. Diagnóstico e Incidencia de Enfermedades Bacterianas y

Parasitarias que afectan el cultivo de Camarón marino en estanques del sector El Zompopero y Salinas del Potrero, Municipio de Jiquilisco, Departamento de Usulután. ITCA Editores. 1ra. Edición. 63 pp.

- Otero-González, J.P. 2018. Enfermedades bacterianas más comunes en la larvicultura del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y sus métodos de control. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- Oyedapo, O. O., Akinpelu, B. A., Akinwunmi, K. F., Adeyinka, M. O., & Sipeolu, F. O. 2010. Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2(4): 5 pp.
- Parvin, M. S., Das, N., Jahan, N., Akhter, M. A., Nahar, L., & Islam, M. E. 2015. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Research Notes*. 8(1): 7 pp.
- Peña-Osorio, L.J. & Cuéllar-Anjel, J. 2019. Vibriosis en camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*: reporte de caso. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá.
- Peña, N. & Varela-Mejías, A. 2015. Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agron. Mesoam*. 26 (1): 43-53.
- Perea, J.E., Castañeda-Chávez, M.R., Lango-Reynoso, F., Cárdenas-Martínez, L. y Landeros-Sánchez, C. 2015. Factores relacionados con la presencia de Vibrios patógenos en un ciclo de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*, en el estado de Tabasco, México. *El Agro Veracruzano*. 2: 59-78.
- Pérez-Bueno, T., Rodríguez, Y., Díaz-Casañas, E., Domínguez, A., Riverón, Y. & Núñez, A. 2011. Influencia de la preparación de la corteza de *Rhizophora mangle* L. en el proceso de extracción sólido-líquido. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 16 (1): 11 pp.
- PROFEPA. 2020. México protege sus manglares. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Recuperado de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/5117/1/mx/mexico_protege_sus_manglares.htm
- Przygodzka, M., Zielińska, D., Ciesarová, Z., Kukurová, K., Zieliński, H. 2014. Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. *LWT Food Sci. Technol*. 58: 321–326.
- Quevedo, O., Sierra, W., Manzano, P. & Barragán, A. 2018. Cuantificación de proteínas y clorofila como indicadores de polución en *Rhizophora harrisonii* en el Puerto de Guayaquil. *Revista Cumbres*. 4 (2): 10 pp.
- Rajani, K.P., Prasanna, K. & Vijaya, K.Ch. 2020. *In-vitro* Pharmacological evaluation of leaf extracts of a Medicinal mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza* L. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 13 (4): 67 - 72.
- Ramírez, A., Serrano, L.B., Barragán, L.E., Quintanar, M.A., Arellano, R.D. & Delgadillo, D. 2016. Determinación de los compuestos polifenólicos en extractos de *Jatropha dioica* y su capacidad antioxidante. *Rev. Mex. Cienc. Farm*. 47 (4): 42 – 50.
- Ramírez-Rojo, M.I., Vargas-Sánchez, R.D., Torres, B.M, Torrescano, G.R. & Sánchez-Escalante, A. 2018. Extractos de hojas de plantas para conservar la calidad de la carne y los productos

cárnicos frescos: Revisión. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 2 (3): 155 – 165.

- Ramon-Espinoza, C.G. 2020. Uso de microorganismos para el control de enfermedades en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Examen complejo). Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- Rangel-Ruiz, L.J., Cruz-Morales, L.A., Arévalo-de la Cruz, J.A., Gamboa-Aguilar, J., Moguel-Ordoñez, E., Pacheco-Figueroa, C.J. y Roa-de la Fuente, L.F. 2017. Actividad molusquicida de *Laguncularia racemosa* (L) C.F. Gaerth sobre *Galba cubensis* (Pfeiffer, 1839).
- Redrován-Heras, K.G. 2017. Medidas terapéuticas para el control de Vibriosis en el cultivo de Camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- Regalado, A.I., Sánchez, L.M. y Mancebo, B. 2016. *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research. 4(1):1-17.
- Reyes-Delgado, J.K. 2018. Sensibilidad bacteriana a agentes terapéuticos utilizados para controlar problemas bacterianos en larvicultura de *Penaeus* (*Litopenaeus vannamei*) (Tesis de Licenciatura). Universidad Estatal Península de Santa Elena, Ecuador.
- Robles, A. 2018. Caracterización del agente causal de las mortalidades atípicas en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en Sonora, Ciclos 2013 – 2014 y la evaluación de nutracéuticos a base de extractos fitogénicos en alimentos para reforzar la inmunidad del camarón. Tesis de Maestría. Nuevo León.
- Rocha, C., Reynolds, N.D., Simons, M.P. 2015. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 32(1): 139-145.
- Rodríguez, J., Domínguez, C., Chalén, B., Agurto, G., Betancourt, I., Panchana, F., Malavé, R., Tomalá, C., Cobo, L. y Bayot, B. 2015. Probióticos, parte de la solución: alternativas de uso en el cultivo de camarón. Faro Iberoam. Rec. Acuí. 7: 9-22.
- Romero, J., Feijoó, C.G. y Navarrete, P. 2012. Antibiotics in Aquaculture – Use, abuse and alternatives. Health and Environment in Aquaculture. 42 pp.
- Rosado, A.A. 2018. Resistencia antimicrobiana de bacterias del género *Vibrio* en Langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) en centros de cultivo de la región de Tumbes. Tesis de Licenciatura. Lima, Perú.
- Rosales-Castro, M., González-Laredo, R.F., Rocha, N.E., Gallegos, J.A., Peralta, J. & Karchesy, J.J. 2009. Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. tecote*. Madera y Bosques. 15 (3): 87 – 105.
- Sánchez, L., Batista, N. Gálvez, J., Duran, R. y Bulnes, C. 2009. Efecto de *Rhizophora mangle* L. sobre colitis ulcerativa experimental en ratas. Revista cubana de plantas medicinales. 14 (1): 539-546.
- Sarango-Jaramillo, J.F. 2019. Evaluación del efecto de dos plantas medicinales sobre la presencia de *Vidrios spp.* en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

- Sarango-Saldaña, V.M. 2019. Evaluación de productos naturales para el control profiláctico de patógenos en el cultivo de Camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Examen complejo). Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- Sathish-Kumar, T., Vidya, R., Kumar, S., Alavandi, S.S. y Vijayan, K.K. 2017. Zoea-2 syndrome of *Penaeus vannamei* in shrimp hatcheries. *Aquaculture*. 24 pp.
- Setiawan, W.A., Widyastuti, U. y Yuhana, M. 2015. Detection of luminous *Vibrio harveyi* in Penaeid shrimp through Nested PCR using Haemolysin Gene Primer. *HAYATI Journal of Biosciences*. 22(2):60-66.
- Siahaya, V.G., Moniharapon, T., Mailoa, M.N. & Leatemia, J.A. 2018. Potential of Mangrove Apples (*Sonneratia alba*) as a botanical insecticide. *Modern Applied Science*. 12 (1): 8 pp.
- Sorroza-Ochoa, L., Campoverde, M.I. y Santacruz-Reyes, R. 2017. Estudio preliminar del extracto de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura. *Revista científica de la Sociedad Española de Acuicultura*. 49: 7 pp.
- Sosa-Pacheco, D., Escobar-Medina, A. y Faure, R. 2013. Empleo de la oxitetraciclina en el cultivo del camarón con énfasis en la especie *Litopenaeus vannamei* y alternativas que favorecen la disminución o sustitución de su aplicación. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 14(7):01-11.
- Soto-Rodríguez, S.A., Gómez-Gil, B., Lozano, R., Río-Rodríguez, R., Diéguez, A.L., Romalde y J.L. 2012. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” syndrome in the Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109:307-317.
- Soto-Rodríguez, S.A., Gómez-Gil, B. y Lozano, R. 2010. “Bright Red” syndrome in Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 92: 11-19.
- Szöllösi, R., & Szöllösi Varga, I. 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biologica Szegediensis*. 46(3-4):125-127.
- Tenecota, R., Mite-Pezo, J. y Alcívar, S.C. 2018. Enfermedades, tratamientos y recomendaciones en el cultivo de camarón. *Espirales revista multidisciplinaria de investigación*. ISSN: 2550-6862. 15 pp.
- Thirugnansambandam, R., Inbakandan, D., Stanley-Abraham, L., Kumar, C., Sundaram, S.M., Subashni, B., Vasantharaja, R., Arul-Anantha, A., Kirubakaran, R., Ajmal-Khan, S. y Balasubramanian, T. 2017. *De novo* assembly and annotation of the whole genomic analysis of *Vibrio campbellii* RT-1 strain, from infected shrimp: *Litopenaeus vannamei*. *Microbial Pathogenesis*. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.11.016. 33 pp.
- Tibaldi, E., Zittelli, G.C., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M.R. & Poli, B.M. 2015. Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried Isochrysis sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*. 440: 60 – 68.
- Tingshuang, P. y Maocang, Y. 2019. The screening of traditional Chinese herbs on nonspecific immune response and protection of Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from

Vibrio harveyi infection. *Aquaculture International*. DOI: 10.1007/s10499-019-00493-0. 1-10.

- Valverde-Zumba, L.P. 2019. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos combinados de *Ilex guayusa* (Loes), *Vernonanthura patens* (Kunth) y *Theobroma cacao* (Linneo) en modelo animal rata (*Rattus norvegicus*). Tesis de Licenciatura. Riobamba, Ecuador.
- Varela-Mejías, A. y Alfaro-Mora, R. 2018. Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 29(1):01-14.
- Varela-Mejías, A. 2018. Patologías del hepatopáncreas en camarones marinos cultivados en América y su diagnóstico diferencial mediante histopatología. *AquaTIC*. 50: 13 -30.
- Varela-Mejías, A., Peña-Navarro, N. y Aranguen-Caro, L.F. 2017. Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agron, Mesoam*. 28(3): 735-745.
- Varela, A. y Choc-Martínez, L.F. 2020. Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y limitaciones. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 31 (3): 16 pp.
- Vargas, R.E. 2019. Sinaloa y Sonora, con el mayor desarrollo de camarón en cautiverio. La Jornada. Recuperado de <https://www.jornada.com.mx/ultimas/politica/2019/02/14/industria-del-camaron-fundamental-para-economia-de-mexico-2788.html>.
- Vargas-Arana, G. (10-04-2020) Principios activos y actividades biológicas de especies vegetales Amazónicas. Universidad Científica del Perú. IIAP. <http://www.iiap.org.pe/Upload/Conferencia/CONF247.pdf>.
- Vega-Villavivencio, J.C. 2019. Principales medidas profilácticas y terapéuticas utilizadas para la prevención de enfermedades en cultivos de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- Velmurugan, S. & Citarasu, T. 2010. Effect on herbal antibacterial extracts on the gut floral changes in indian White shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Romanian Biotechnological Letters*. 15 (6): 9 pp.
- Wangman, P., Longyant, S., Taengchaiyaphum, S., Senapin, S., Sithigorngul, P. y Chaivisuthangkura, P. 2018. PirA & B toxins discovered in archived shrimp pathogenic *Vibrio campbellii* isolated long before EMS/AHPND outbreaks. *Aquaculture* 497: 494–502.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol*. 144: 307–313.
- Wing-Keong, N.G., Chik-Boon, K., Chaiw-Yee, T. y Romano, N. 2015. Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feed with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. *Aquaculture*. 449:69-77.
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y. y Pan, Y. 2017. Shrimp AHPND-causing plasmids encoding PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio species*.

Scientific Reports. 7. DOI: 10.1038/srep42177. 11 pp.

- Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., Zeng, Z. 2015. Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Environmental Microbiology*. 8 pp.
- Yang, Q., Julyantoro-Pande, G.S., Wang, Z., Lin, B., Rubin, R.A., Vora, G.J. y Defoirt, T. 2017. Indole signaling and (micro) algal auxins decrease the virulence of *Vibrio campbellii*, a major pathogen of aquatic organisms. *Environmental Microbiology*. 19(5): 1987-2004.
- Yeh, R.Y., Shiu, Y.L., Shei, S.C., Cheng, S.C., Huang, S.Y., Lin, J.C. & Liu, C.H. 2009. Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 27: 26-32.
- Zapata, K., Cortes, F.B., Rojano, B.A. 2013. Polifenoles y Actividad antioxidante del fruto de guayaba agria (*Psidium araca*). *Información Tecnológica*. 24 (5): 103-112.
- Zhai, Q. & Li, J. 2019. Effectiveness of traditional Chinese herbal medicine, San-Huang-San, in combination with enrofloxacin to treat AHPND-causing strain *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 87: 360-370.
- Zhao, X., Guo, Y., Ni, P., Liu, J., Wang, F., Xing, Z. y Ye, S. 2020. Resveratrol inhibits the virulence of *Vibrio harveyi* by reducing the activity of *Vibrio harveyi* hemolysin. *Aquaculture*. 522: 8 pp.

11. ANEXOS

11.1. Técnica de análisis histológico

Descrita por Lightner, 1996.

11.1.1. Fijación o Conservación

Los órganos y tejidos de juveniles de camarón blanco (*P. vannamei*) se fijaron por inyección en AFA Davidson (Alcohol- Formaldehído-Ácido acético; AFA). Se inyectó el camarón vivo (moribundo) directamente en todo el hepatopáncreas y en cada uno de los segmentos abdominales, con una cuchilla se realizó un corte del rostrum hasta la parte final de los urópodos y se introdujo al organismo en un frasco de 500 ml con solución Davidson para su fijación completa por 24 horas, posteriormente se le retiro la solución Davidson se enjuago con agua dulce y se le adicionó alcohol al 70% hasta su análisis.

11.1.2. Corte Histológico

Los organismos que se encontraban sumergidos en alcohol etílico al 70%, se les realizo un corte longitudinalmente partiendo del rostrum hasta el telson con una navaja de micrótopo, una vez que se obtuvieron los cortes con ayuda de unas pinzas de disección se acomodaron las muestras en Uni-cassette (VWR CS 1500 TEK WHT 14221-384), para colocarse en el recipiente de deshidratación.

11.1.3. Inclusión en Parafina

Los cortes fueron deshidratados en el procesador automático de tejidos (Tissue-Tek II, Mod. 4640-B) este equipo cuenta con 12 vasos de 1 L cada uno. Utilizando una serie de soluciones de alcohol en concentraciones ascendentes y bañadas en parafina, se llevó a cabo en el siguiente orden:

- 1) Alcohol etílico al 70%, 2 baños separados de 1 hora cada uno
- 2) Etanol al 80%, 2 baños separados de 1 hora cada uno
- 3) Etanol al 95%, 2 baños separados de 1 hora cada uno
- 4) Etanol al 100%, 2 baños separados de 1 hora cada uno
- 5) Xilol, 2 baños separados de 1 hora cada uno
- 6) Parafina, 2 baños separados de 1 hora cada uno

11.1.4. Embebido en Parafina

Para la realización de los bloques las muestras se colocaron en moldes con ayuda de centro de embebido (Leica Mod. EG1160) que consta de un dispensador de parafina líquida (55-60°C), una placa caliente para la orientación de las piezas y una placa fría para la solidificación del bloque a una temperatura inferior a 10°C, los tejidos son colocados en moldes con las partes de interés hacia el fondo y se llenaron con parafina líquida (55-60°C) ejerciendo presión sobre ellos en la cama fría del embebedor, cuidando que la parte inclinada del uni-cassette® quede en relación con la porción del tejido más duro (cefalotórax).

11.1.5. Cortado de Bloque

Los bloques de parafina ya descalcificados son puestos en refrigeración a -4°C, por 10 minutos,

para la obtención del corte se utilizó un micrótopo Leica (RM2125 RTS). Los bloques se rebajaron a 20 μm , hasta que todos los tejidos se encontraran expuestos, posteriormente se realizó el corte a 5 μm y se depositaron en un baño de flotación marca (Boekel scientific 044305648-2162) previamente calentado a 50°C, retirándose el corte en un portaobjeto para ponerlo en una gradilla, para luego ser colocada en una estufa por 12 horas a 55°C para el secado de los cortes.

11.1.6. Tinción Hematoxilina-Eosina

Los tejidos fueron teñidos con la técnica de hematoxilina de Harris y Eosina (H&E) pasando por una secuencia de soluciones mostradas a continuación, de acuerdo con la Figura 28:

1. Desparafinizar las laminillas directo en xileno por 2 cambios de 5 minutos cada uno.
2. Dos cambios en alcohol absoluto con 10 sumergidas lentas cada uno.
3. Dos cambios en alcohol al 96% con 10 sumergidas lentas cada uno.
4. Dos cambios en alcohol al 80% con 10 sumergidas lentas cada uno.
5. Alcohol al 50% con 10 sumergidas lentas.
6. Agua destilada con 10 sumergidas lentas.
7. Hematoxilina Harris durante 5 minutos.
8. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
9. Una sumergida rápida en alcohol ácido.
10. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
11. Cinco sumergidas lentas en agua amoniacal.
12. Lavar en agua corriente durante cinco minutos.
13. Eosina durante 2 minutos.
14. Tres cambios en alcohol al 96% con 10 sumergidas lentas cada uno.
15. Tres cambios en alcohol absoluto con 10 sumergidas lentas cada uno.
16. Cuatro cambios en Xileno con 10 sumergida lentas cada uno.

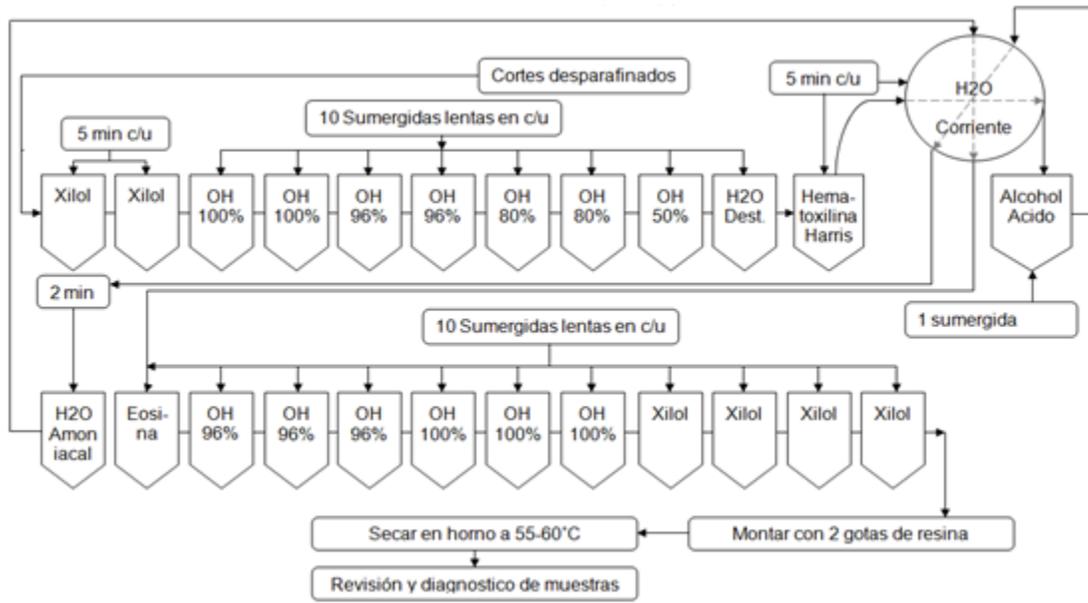


Figura 28. Diagrama de técnica de tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) por Lightner (1998).

Se tomaron las muestras del baño de xileno para el montaje, se colocaron 2 gotas de aceite de resina en el portaobjeto donde fue hecha la tinción y se colocó el cubreobjetos evitando la formación de burbujas, se deja secar durante unas horas antes de su observación al microscopio.

11.2. Técnica de Recuento Total y Diferencial de Hemocitos

Descrito por Cuéllar-Anjel, 2014

Para realizar el recuento total de hemocitos, el microscopio electrónico se enfocó primeramente en el ocular 10x y, posteriormente se pasó al ocular de 40x, donde se visualizó individualmente un cuadrante (Fig. 29a); y con ayuda del carro del microscopio se desplazó por la cuadrícula hasta contar las células presentes en todo el cuadro. Los recuentos se realizaron siguiendo las flechas para evitar que las células se cuenten dos veces o que no se cuenten (Fig. 29b). Además, se observaron 3 líneas que delimitan el cuadro, éstas definieron cuales células eran contables (las que no tocan la 2da línea) o cuales se encontraban fuera del campo de recuento (las que tocan o están encima de la 2da línea) (Figura 29c).

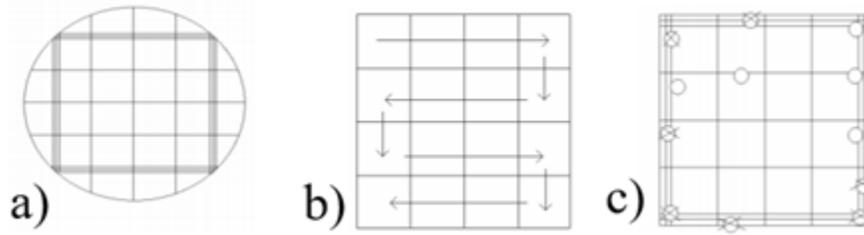


Figura 29. Vista de un cuadrante de la cámara de Neubauer con el ocular de 40x. donde a) cuadrante utilizado para realizar el recuento total; b) indicación de cómo se debe de realizar el recuento; c) indicación de las células que se deben de tomar en cuenta para el recuento.