



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

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIBACTERIANA DE  
EXTRACTOS DE *Gracilaria vermiculophylla* Y *Ulva flexuosa* EN  
INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Vibrio parahaemolyticus* EN  
*Penaeus vannamei***

---

Por:

**IBQ. Lizbeth Guadalupe Gamboa Barraza**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTEL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

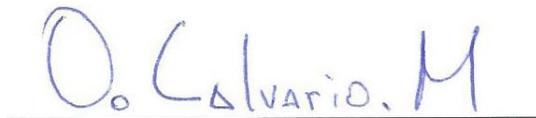
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Lizbeth Guadalupe Gamboa Barraza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



---

Dra. María Soledad Morales Covarrubias  
Directora de Tesis



---

Dr. Omar Calvario Martínez  
Miembro de comité de tesis



---

Dra. Idalia Osuna Ruiz  
Miembro de comité de tesis



---

M.C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez  
Miembro de comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Evaluación de la Eficacia Antibacteriana de Extractos de *Gracilaria vermiculophylla* y *Ulva Flexuosa* en Infección Experimental con *Vibrio parahaemolyticus* en *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 Lizbeth Guadalupe Gamboa Barraza, 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.



  
Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por aceptarme en su programa de posgrado y poder llevar acabo mis estudios de maestría en ciencias.

Al proyecto 2018710219 por el financiamiento económico para el desarrollo experimental de la tesis de maestría.

Agradezco de manera especial a mi directora de tesis la Dra. María Soledad Morales Covarrubias, por darme la oportunidad de realizar la maestría bajo su dirección, por su apoyo incondicional, compromiso, por todas las enseñanzas brindadas a lo largo de este tiempo y sobre todo por su paciencia y confianza.

A cada uno de los miembros de mi comité de tesis, por todas las enseñanzas, por su compromiso, dedicación, disponibilidad, así como sus correcciones y sugerencias para mejorar este trabajo y el tiempo invertido para la revisión del mismo. Al Dr. Omar Calvario Martínez, por su apoyo antes y durante la maestría, por su dedicación, disponibilidad, consejos y enseñanzas. A la M. C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez por su tiempo, apoyo, disponibilidad y compromiso en la realización de este trabajo. A la Dra. Idalia Osuna Ruiz agradezco el haberme aceptado como alumna, por su apoyo incondicional y confianza desde el principio, por todas las enseñanzas, consejos, disponibilidad, entrega y paciencia.

A la M.C. Ma. Del Carmen Bolán Mejía, por su apoyo incondicional, consejos y enseñanzas para la parte experimental de la actividad antibacteriana y durante la etapa de la maestría.

A la M. C. Selene María Abad Rosales, por su apoyo para realizar los análisis histológicos, por su tiempo, paciencia y enseñanzas brindadas.

Al Dr. Pablo Almazán Rueda, por su apoyo incondicional antes y durante la realización de esta tesis, por todos los consejos, enseñanzas y tiempo.

A mis compañeros de generación, Dulce Avelina Delgado, Karem Fausto, Tonatiuh Osuna, Oscar Trejo, Víctor Caña y Fernando Castellanos, muchas gracias por todos los momentos que vivimos durante esta etapa, por todas sus ocurrencias, risas, apoyo y consejos. Gracias por hacer ameno el tiempo, sobre todo por el respeto entre todos, y por la bonita y sincera amistad que formamos.

A mi compañera de laboratorio de microscopia Blanca Ramírez, por su apoyo durante la parte experimental de esta tesis, por aguantarme todo este tiempo y por brindarme su honesta amistad.

A todos mis amigos en general por el apoyo en todo momento, por preocuparse por mí y aconsejarme, y a todas aquellas personas que indirecta o directamente contribuyeron en la realización de esta tesis.

Agradezco especialmente a mi familia, a mis padres Irene Barraza y Enrique Gamboa doy gracias por el cariño y por su apoyo incondicional para cada una de mis decisiones, por su gran paciencia y confianza. A mis hermanos Irene Gamboa y Jesús Enrique Gamboa por su apoyo y paciencia.

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanos por ser el pilar fundamental en mi vida.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>CONTENIDO</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURA</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1 Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND).....	15
2.2 Uso de Antibióticos en la Camaronicultura.....	16
2.3 Las Algas Marinas .....	16
2.4 Algas Marinas como Antibacterianos en la Acuicultura.....	17
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	22
4.1 Objetivo General.....	22
4.2 Objetivos Específicos.....	22
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
5.1 Elaboración de Extractos de las Algas Marinas .....	23
5.1.1 Recolección y Procesamiento de las Algas Marinas.....	23
5.1.2 Obtención de Extractos Acuosa.....	23
5.2 Determinación de la Actividad Antibacteriana de los Extractos Acuosa.....	24
5.2.1 Cepa bacteriana <i>V. parahaemolyticus</i> .....	24
5.2.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	24
5.2.3 Antibiogramas (Halos de Inhibición).....	25
5.3 Determinación de la Composición Fitoquímica y Capacidad Antioxidante de los Extractos Acuosa.....	25
5.3.1 Fenoles Solubles Totales .....	26
5.3.2 Flavonoides Totales.....	26
5.3.3 Determinación del Contenido de Sulfatos.....	27
5.3.4 Determinación del Contenido de Ácidos Urónicos Totales .....	28
5.3.5 Reducción del Radical ABTS .....	29
5.3.6 Potencial Antioxidante Reductor Férrico (FRAP).....	29
5.4 Determinación de Metales.....	30
5.5 Elaboración del Alimento.....	30

## CONTENIDO (continuación)

5.5.1 Evaluación de Consumo de Alimento.....	31
5.6 Aclimatación de los Organismos .....	31
5.7 Diseño Experimental.....	32
5.7.1 Preparación de Suspensión Bacteriana (Inóculo).....	32
5.8 Análisis Histológico .....	33
5.9 Análisis Hematológicos.....	34
5.10 Análisis Estadístico .....	35
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
6.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Acuosos .....	36
6.2 Halos de Inhibición Bacteriana de Extractos Acuosos .....	36
6.3 Composición Fitoquímica y Capacidad Antioxidante de los Extractos Acuosos.....	37
6.4 Determinación de Metales.....	39
6.5 Evaluación de Consumo de Alimento.....	40
6.6 Desafío de Eficacia .....	40
6.7 Análisis Histológico .....	43
6.8 Análisis Hematológicos.....	48
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURA

Figura	Página
1	Montaje de bioensayo infección experimental por inmersión con <i>V. parahaemolyticus</i> ..... 33
2	Cámara de Neubauer, cuadros rojos para CTH..... 35
3	Halo de inhibición de <i>G. vermiculophylla</i> ( $18.00 \pm 0.58$ mm)..... 37
4	Halo de inhibición de <i>U. flexuosa</i> ( $14.00 \pm 0.29$ mm)..... 37
5	Camarón consumiendo alimento con extracto de macroalgas e intestino lleno..... 40
6	Organismos con alteraciones en comportamiento y coloración post infección..... 41
7	Curvas de sobrevivencia (Kaplan–Meier) de juveniles de <i>P. vannamei</i> infectados con <i>V. parahaemolyticus</i> ..... 42
8	Corte histológico longitudinal de hepatopáncreas (zona proximal al intestino) de <i>P. vannamei</i> ..... 44
9	Corte histológico longitudinal de glandula antenal (zona del celomosaco) de <i>P. vannamei</i> ..... 45
10	Corte histológico longitudinal de filamentos branquiales de <i>P. vannamei</i> ..... 46
11	Corte histológico longitudinal de intestino de <i>P. vannamei</i> ..... 47
12	Conteo total de hemocitos de <i>P. vannamei</i> infectados con <i>V. parahaemolyticus</i> ..... 49
13	Diferenciación hemocitaria..... 49
14	Conteo diferencial de hemocitos de <i>P. vannamei</i> infectados con <i>V. parahaemolyticus</i> expresado en porcentajes..... 50

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Resultados de CMI para extractos acuosos de <i>G. vermiculophylla</i> y <i>U. flexuosa</i> .....	36
2	Composición fitoquímica en los extractos acuosos de las macroalgas.....	38
3	Capacidad antioxidante de extractos acuosos de macroalgas.....	38
4	Detección de metales en extractos acuosos de macroalgas.....	39
5	Límites máximos permisibles de la norma NOM-242-SSA1-2009 para metales pesados en productos frescos, refrigerados y congelados (parte comestible).....	39
6	Contenidos máximos de metales pesados en productos alimenticios del Reglamento (CE) no 333/2007 de la Comisión de la Unión Europea.....	39

## RESUMEN

El uso indiscriminado de antibióticos en la acuicultura produce un impacto negativo en el medio ambiente, además de generar patógenos resistentes a los antibióticos. En este sentido, y para minimizar los efectos de estos quimioterápicos sobre los camarones cultivados, el medio ambiente y los consumidores, se han evaluado otras terapias alternativas, entre las que se encuentra el uso de extractos de macroalgas con capacidad antimicrobiana. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar la eficacia antibacteriana de extractos de *Gracilaria vermiculophylla* y *Ulva flexuosa* adicionados al alimento de *P. vannamei* en infección experimental con *V. parahaemolyticus*. Se obtuvieron extractos acuosos de las especies de macroalgas seleccionadas, a éstos se les determinó su actividad antibacteriana sobre *V. parahaemolyticus* mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y antibiogramas; adicionalmente se determinó la actividad antioxidante (ABTS y FRAP), la composición fitoquímica (CTF, CF, % ácidos urónicos y % sulfatos), así como el contenido de metales (Cd, Pb, As, Hg). Posteriormente se realizó un desafío bacteriano por inmersión sobre *P. vannamei*, evaluando alteraciones histológicas en órganos y tejidos, así como cambios en la población hemocitaria. La CMI para ambos extractos fue de 50 mg mL<sup>-1</sup>, con halos de inhibición para *G. vermiculophylla* de 18.00±0.60 mm y para *U. flexuosa* de 14.00±0.29 mm. *G. vermiculophylla* exhibió mayor CTF pero menor CF respecto a *U. flexuosa*, por otro lado *G. vermiculophylla* tuvo mayor capacidad antioxidante ABTS y FRAP, lo contrario de *U. flexuosa*. El análisis de metales resultó estar por debajo de los máximos permisibles de la NOM-242-SSA1-2009 y del Reglamento (CE) n° 333/2007 de la Comisión de la Unión Europea. En el desafío con *V. parahaemolyticus* se obtuvo una sobrevivencia del 67% para los organismos alimentados con *G. vermiculophylla*, y 60% para los de *U. flexuosa*, significando el doble de sobrevivencia con respecto al control positivo (30%) 24 horas post infección. Las alteraciones histopatológicas fueron observadas en el hepatopáncreas en la región proximal al intestino en los organismos del control positivo y fueron menores en los organismos tratados. La población hemocitaria total fue menor en los organismos del control positivo respecto a los organismos tratados. Con base en el análisis de las variables estudiadas se puede concluir que los extractos acuosos de estas macroalgas son una alternativa prometedora para el control de *V. parahaemolyticus* en el cultivo de camarón.

**Palabras clave:** Camarón blanco, AHPND, macroalgas, antibacteriano, hemocitos

## ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics in aquaculture has a negative impact on the environment, in addition to generating antibiotic resistant pathogens. In this sense, and to minimize the effects of these chemotherapeutic agents on shrimp culture, the environment and consumers, they have evaluated other alternative therapies, including the use of macroalgae extracts with antimicrobial capacity. The objective of this study was to evaluate the antibacterial efficacy of extracts of *Gracilaria vermiculophylla* and *Ulva flexuosa* which were added in the diet of *P. vannamei* who were subjected to experimental infection with *V. parahaemolyticus*. Hot water extracts of the selected macroalgae species were obtained, their antibacterial activity on *V. parahaemolyticus* was determined by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and antibiograms; additionally the antioxidant activity was determined (ABTS and FRAP), the phytochemical composition (CTF, CF, % uronic acids and % sulfates), as well as the metal content (Cd, Pb, As, Hg). Subsequently, a bacterial challenge was performed by immersion on *P. vannamei*, evaluating histological alterations in organs and tissues, as well as changes in the hemocyte count and the differential haemocyte count. The MIC for both extracts was 50 mg mL<sup>-1</sup>, with inhibition halos for *G. vermiculophylla* of 18.00 ± 0.60 mm and for *U. flexuosa* of 14.00 ± 0.29 mm. *G. vermiculophylla* exhibited higher CTF but lower CF compared to *U. flexuosa*, on the other hand *G. vermiculophylla* had higher antioxidant capacity ABTS and FRAP, the opposite of *U. flexuosa*. The metal analysis turned out to be below the maximum allowable of NOM-242-SSA1-2009 and Regulation (EC) No 333/2007 of the Commission of the European Union. In the challenge with *V. parahaemolyticus*, a survival of 67% was obtained for organisms fed with *G. vermiculofila*, and 60% for those of *U. flexuosa*, meaning twice the survival with respect to the positive control (30%) 24 hours later infection. Histopathological alterations were observed in the hepatopancreas in the region proximal to the intestine in the positive control organisms and were minor in the treated organisms. The total haemocyte count was lower in the positive control organisms compared to the treated organisms. Based on the analysis of the variables studied, it can be concluded that hot water extracts of these macroalgae are a promising alternative for the control of *V. parahaemolyticus* in shrimp culture.

**Keywords:** White shrimp, AHPND, macroalgae, antibacterial, hemocytes

## 1. INTRODUCCIÓN

En el año 2016, la producción mundial de la acuicultura, ascendió a 110.2 millones de toneladas, de los cuales se produjeron 7.9 millones de toneladas de crustáceos, siendo el camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*), el más cultivado (FAO, 2018). Durante el 2017, México se colocó en el séptimo lugar de producción de camarón a nivel mundial con 221,695 toneladas, siendo el estado de Sinaloa el principal productor, generando en conjunto con Sonora, un valor de producción de 13 mil 368 millones de pesos (SAGARPA, 2018).

Debido a la demanda de este producto, las densidades de siembra se han incrementado, teniendo como consecuencia un aumento en la incidencia de enfermedades causadas por virus, hongos, protozoarios, cianobacterias y bacterias, dando como resultado grandes pérdidas económicas (Lightner y Pantoja, 2001; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

En los últimos años se han registrado pérdidas económicas de hasta 1 000 millones de dólares por año a nivel global en el cultivo de camarón, debido a la enfermedad denominada Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés) causada por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015). En el 2013, México tuvo una reducción importante en la producción de camarón (más del 50%) debido a que esta enfermedad afectó los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit (Nunan *et al.*, 2014).

A nivel mundial en la camaronicultura se aplican antibióticos durante los ciclos de producción, tanto en la fase larvaria como en la de crecimiento, para el control o prevención de enfermedades bacterianas. Como consecuencia se ha incrementado la resistencia bacteriana en los ecosistemas expuestos, con posibles afectaciones a la salud animal y humana debido a la acumulación de residuos de antibióticos en los tejidos de camarón (Santiago *et al.*, 2009; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

Últimamente se ha promovido una producción sana y sostenible del camarón, involucrando aspectos ambientales y sociales (Cuéllar-Anjel *et al.*, 2010). Por lo que resulta necesario buscar

alternativas naturales para sustituir el uso de antibióticos comerciales que no generen resistencia bacteriana. En este sentido han sido utilizados diferentes compuestos naturales antibacterianos provenientes de extractos vegetales para contrarrestar esta problemática (Peña-Navarro *et al.*, 2013; Morales-Covarrubias *et al.*, 2016). A su vez, el ambiente marino puede proveer productos naturales con estructuras únicas que poseen actividades farmacológicas, cuenta de ello es que en los últimos años se han estudiado diversos compuestos bioactivos de esponjas (Kotoku *et al.*, 2017), corales blandos (Lee *et al.*, 2017), briozoos (Ortega *et al.*, 2017), moluscos (Chand y Karuso, 2017), tunicados (Wang *et al.*, 2017), equinodermos (Brasseur *et al.*, 2017) y algas marinas (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016), como nuevas alternativas contra enfermedades. Durante el 2017 se describieron 1490 nuevos compuestos naturales provenientes del ambiente marino, de los cuales 89 compuestos fueron de algas marinas (Carroll *et al.*, 2019).

Las algas marinas o macroalgas, han adquirido gran importancia como fuente prometedora de compuestos bioactivos que pueden utilizarse para el desarrollo de fármacos (Osuna-Ruiz *et al.*, 2019). Estudios alrededor del mundo han demostrado que las algas verdes, rojas y pardas poseen gran variedad de metabolitos activos con propiedades antibacterianas, antivirales, antitumorales, antioxidantes, entre otras (Belattmania *et al.*, 2016; Osuna-Ruiz *et al.*, 2016 y 2019).

En las últimas dos décadas, se ha incrementado el interés por emplear diversos extractos de algas marinas como agentes terapéuticos y/o profilácticos en la acuicultura, principalmente contra patologías de origen bacteriano. Sin embargo, en México existen muy pocos estudios sobre la actividad antibacteriana de macroalgas. En este sentido, el objetivo de éste trabajo fue evaluar la eficacia antibacteriana de extractos de las macroalgas *Gracilaria vermiculophylla* y *Ulva flexuosa* adicionadas en la dieta de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en infección experimental con *Vibrio parahaemolyticus*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND)

En sus inicios, esta patología fue conocida como Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS, por sus siglas en inglés), debido a que aparecía dentro de los primeros 30 días de cultivo, posteriormente fue renombrada como Síndrome de la Necrosis Hepatopancreática, por las lesiones observadas en los camarones enfermos y actualmente se conoce como Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) (Lightner *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2013; Pantoja y Lightner, 2014).

Esta patología afecta al camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* y al camarón tigre negro *Penaeus monodon*, causando pérdidas millonarias en las granjas camaronícolas, ya que puede ocasionar el 100% de mortalidad dentro de los primeros dos días de la infección (Tran *et al.*, 2013). La enfermedad se reportó por primera vez al sur de China, y después se propagó a Vietnam, Malasia, Tailandia, Filipinas, México y Centroamérica (Lightner *et al.* 2012; Flegel, 2012; De la Peña *et al.*, 2015; Nunan, *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015). Cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* han sido reportadas como las causantes de esta enfermedad, que se caracteriza por causar daños en el hepatopáncreas del camarón (Tran *et al.*, 2013).

Los signos clínicos de los camarones afectados por AHPND incluyen nado errático, cromatóforos expandidos, crecimiento reducido, letargia, opacidad muscular, acalambramiento, hepatopáncreas pálido, cutícula blanda, atrofia del hepatopáncreas y estómago e intestino vacíos (Tran *et al.*, 2013; Pantoja y Lightner, 2014).

Esta enfermedad se caracteriza por presentar tres fases, fase aguda, de transición y terminal. En la fase aguda se observa pérdida de la función de las células que recubren los túbulos del hepatopáncreas (células R, B, F y E), desprendimiento agudo de las células de los túbulos del hepatopáncreas con distribución proximal a distal, ausencia de infección bacteriana (de cualquier

tipo) dentro del hepatopáncreas y ausencia de inflamación intertubular o bien inflamación muy leve; en la fase de transición se presenta inflamación intertubular, melanización de las áreas más afectadas, principalmente en la región proximal de los túbulos (las áreas más cercanas al intestino medio), se observa los inicios de la infección bacteriana y posteriormente el desprendimiento de las células de los túbulos; la fase terminal se define por inflamación intertubular muy marcada, melanización multifocal extensa de los túbulos necrosados, infección bacteriana secundaria masiva por especies oportunistas de *Vibrio sp.*, además en esta etapa, es muy difícil diferenciar entre una vibriosis entérica común severa y AHPND (Pantoja y Lightner, 2014).

## 2.2 Uso de Antibióticos en la Camaronicultura

Las enfermedades que enfrenta el cultivo de camarón están relacionadas principalmente con virus y bacterias (Flegel, 2012). Pero desde el 2009 a la fecha, las enfermedades de origen bacteriano a nivel mundial han adquirido mayor relevancia debido a las altas mortalidades que han ocasionado, la forma más común para tratar este tipo de patologías es el uso de antibióticos. En México, los antibióticos más utilizados son oxitetraciclina, florfenicol, ormetoprim-sulfametoxazol, sarafloxacina y enrofloxacina (Roque *et al.*, 2001; Santiago *et al.*, 2009).

El abuso de estos antibióticos ha generado el aumento de bacterias resistentes, la persistencia en el ambiente acuático y la acumulación de residuos de antibióticos en los tejidos del camarón provocando alteraciones en la flora intestinal y problemas de intoxicación o alergias en el consumidor (Santiago *et al.*, 2009).

## 2.3 Las Algas Marinas

Las algas marinas son organismos fotosintéticos que son comparables con las plantas terrestres por ser productores del oxígeno y biomasa de los que dependen el resto de los seres vivos de la cadena

alimenticia en el agua. Son importante fuente de alimento y de múltiples productos que se obtienen de ellas (León *et al.*, 2012). Habitan en diferentes ambientes, tales como litorales rocosos y arenosos, arrecifes coralinos, lagunas costeras, estuarios, manglares o comunidades de pastos marinos. Pueden encontrarse en las zonas supramareal, intermareal o submareal, están fijadas a distintos sustratos del lecho marino o flotando libremente en el agua, son tolerantes a la salinidad del agua de mar, carecen de verdaderos tallos, raíces y hojas (De Almeida *et al.*, 2011; León *et al.*, 2012 y 2019).

El grupo de las macroalgas incluyen tres filos de acuerdo a su pigmentación: Las algas verdes o clorofitas (División Chlorophyta) son organismos fotosintéticos eucariontes que cuenta con aproximadamente 7 000 especies. Se caracterizan por los pigmentos fotosintéticos como las clorofilas a, b y carotenoides (León *et al.*, 2012). Las algas de la clase Phaeophyceae (feofíceas), pardas o cafés por su color común, contiene dos pigmentos principales la xantofila y la fucoxantina que enmascaran la clorofila a y c (León y Núñez 2017). Las algas rojas o rodofitas (División Rhodophyta o clase Rhodophyceae) cuentan con aproximadamente 7 100 especies. Su peculiar color rojo se debe a la dominancia de algunos de los pigmentos accesorios (ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina) que enmascaran a la clorofila (León *et al.*, 2019).

#### 2.4 Algas Marinas como Antibacterianos en la Acuicultura

Las algas marinas poseen actividad antibacteriana que varía según la especie, hábitat, etapa de crecimiento, edad, ubicación geográfica, contaminación, organismos epifitos, método de extracción y disolvente utilizado en la extracción (Pérez *et al.*, 2016; Zerrifi *et al.*, 2018).

Diversos autores han señalado que la actividad antibacteriana que se ha observado en extractos de macroalgas está relacionada con la presencia de metabolitos secundarios entre ellos los compuestos polifenólicos, que han sido reconocidos en diferentes estudios por su bioactividad, entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos, los flavonoides, las isoflavonas, quercetina y lignanos, los cuales son producidos por las macroalgas para protegerse de factores externos como

la radiación UV, el estrés y los parásitos (Keyrouz *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Chojnacka *et al.*, 2012; Janarthanan y Kumar, 2018). El mecanismo de acción antibacteriana descrito para los polifenoles, incluye principalmente la alteración de la permeabilidad de la pared celular y membrana citoplasmática de la bacteria, debido a las interacciones de éstos compuestos con las proteínas de la superficie celular, lo que provoca la ruptura de la membrana y como consecuencia, se produce la salida de macromoléculas internas importantes para la bacteria, dando lugar a la pérdida de integridad celular y por consiguiente la muerte (Eom *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2016; Pava *et al.*, 2017).

Las propiedades antibacterianas de las macroalgas se han utilizado en la acuicultura para controlar o prevenir enfermedades bacterianas. En peces se han realizado estudios en los que se emplean extractos de macroalgas para el tratamiento de enfermedades bacterianas, un ejemplo de ello es el estudio de Thanigaivel y colaboradores (2015), utilizaron dos métodos de extracción diferencial (secuencial, maceración) con diferentes solventes para identificar los compuestos bioactivos presentes *Gracilaria folifera* y *Sargassum longifolium*, encontrando que los extractos etanólicos y acuosos tenían actividad antioxidante y antibacteriana *in vivo* e *in vitro* contra *Aeromonas salmonicida*. Para la prueba antibacteriana *in vivo* infectaron vía inmersión a *Oreochromis mossambicus* (tilapia) con *Aeromonas salmonicida*, y posteriormente agregaron una suspensión de macroalga al agua donde estaban los peces, obteniendo una sobrevivencia de hasta el 90%. Así mismo Fatima y colaboradores (2016), probaron la eficacia antibacteriana y antioxidante de extractos de la macroalga roja *Portieria hornemannii*, infectando intramuscular a tilapia con *V. parahaemolyticus*, para después administrar el tratamiento de macroalgas por inmersión, obteniendo un 75% de sobrevivencia en los organismos tratados con la macroalga y tan solo un 25% en los organismos no tratados.

Las macroalgas también se han utilizado como agentes profilácticos e inmunoestimulantes en peces, mostrado que los organismos alimentados con extractos de macroalga han presentado niveles elevados de los parámetros bioquímicos de sangre, respuestas inmunitarias más fuertes y mayores tasas de sobrevivencia respecto al control (Zeraatpisheh *et al.*, 2018).

De igual manera, en camarones se han llevado a cabo estudios de profilaxis, Selvin y colaboradores

(2011), incorporaron extracto de *U. fasciata* al alimento comercial para camarón, alimentaron a *P. monodon* (1 g kg<sup>-1</sup> de camarón) durante 15 días para posteriormente hacer un desafío bacteriano. Los organismos fueron infectados vía intramuscular con *V. fischeri* (2.8 x 10<sup>7</sup> UFC/camarón) *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *Aeromonas sp.* (1 x 10<sup>6</sup> UFC/camarón). La dieta con extracto de *U. fasciata* tuvo una protección completa (100% de sobrevivencia) contra *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *Aeromonas sp.*, y 60 % de sobrevivencia en organismo infectados con *V. fischeri*. De la misma forma, Manilal y colaboradores (2012), incorporaron extracto de la macroalga roja *Asparagopsis sp.* al alimento comercial para camarones, para posteriormente alimentar a camarones del genero *P. monodon* durante 4 semanas y después desafiarlos con *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *Photobacterium damsela*. Concluyeron que la administración oral de *Asparagopsis sp.* fue eficaz en el tratamiento de infestaciones naturales de vibriosis en *P. monodon*.

Del mismo modo se han llevado a cabo investigaciones sobre inmunoestimulación de las macroalgas en los camarones, los parámetros inmunológicos que comúnmente se analizan en estos estudios son el conteo total (CTH) y diferencial de hemocitos(CDH), la actividad de la fenoloxidasa (PO), el estallido respiratorio (ER), la superóxido dismutasa (SOD), la actividad fagocítica y la tolerancia antibacteriana. Sudaryono y colaboradores (2018), evaluaron la eficacia sobre la respuesta inmune, la tolerancia al estrés y tolerancia a *V. parahaemolyticus* de *P. vannamei* incluyendo el extracto acuoso de *Sargassum cristaefolium* en su dieta. Los organismos se alimentaron durante 28 días y posteriormente fueron desafiados, obteniendo altas tasas de sobrevivencia y mayor respuesta del sistema inmune. Extractos de la macroalga roja *G. fisheri* también aumentaron los parámetros inmunológicos como CTH, CDH, PO y SOD en *P. vannamei*, y cuando los organismos fueron desafiados con *V. harveyi*, la mortalidad se redujo notablemente en comparación con la de los organismos del control (Kanjana *et al.*, 2011). Así mismo, la administración de extracto de la macroalga parda *Petalonia binghamiae* incrementó la respuesta inmune de *P. vannamei* y se observó un aumento en la tasa de sobrevivencia en organismos infectados con *V. alginolyticus* (Chen *et al.*, 2014).

Se han desarrollado otros estudios relacionados con las propiedades antibacterianas de las macroalgas como tratamiento a infecciones bacterianas, un ejemplo de ello es el estudio de Thanigaivel y colaboradores (2014), que probaron la actividad antioxidante y las propiedades

antibacterianas de extracto de la macroalga verde *Chaetomorpha antennina* realizando experimento *in vitro* por el método de difusión en pozo y un experimento *in vivo*, infectaron intramuscularmente a *P. monodon* con *V. parahaemolyticus*, posteriormente sumergieron los organismos infectados en agua que contenía el extracto de la macroalga y obtuvieron un 90% de sobrevivencia. Sivakumar y colaboradores (2014), realizaron pruebas antibacterianas *in vitro* e *in vivo* de extracto crudo de la macroalga *U. fasciata*, utilizaron el método de difusión en agar-agar en donde hubo inhibición contra *V. harveyi*. Para la prueba *in vivo* realizaron un ensayo con desafío de inmersión en donde postlarvas de *P. monodon* se mantuvieron en agua que contenía *V. harveyi* durante 30 días, posteriormente adicionaron el extracto de la macroalga al agua obteniendo como resultado una reducción significativa de los porcentajes de mortalidad.

### 3. HIPÓTESIS

La adición de extractos de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* en la dieta de *P. vannamei* infectado por la bacteria *V. parahaemolyticus*, aumentará la sobrevivencia, la respuesta hemocitaria celular y presentará menor daño en hepatopáncreas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Evaluar la eficacia antibacteriana de extractos acuosos de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* adicionados en la dieta de *P. vannamei* en infección experimental con *V. parahaemolyticus*.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* con *V. parahaemolyticus*.
- Determinar la actividad antioxidante, presencia de metales y composición fitoquímica (contenido total de compuestos fenólicos, contenido de flavonoides, ácidos urónicos (%) y sulfatos (%)) de los extractos acuosos obtenidos a partir de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa*.
- Elaborar el alimento con el extracto de mayor eficacia de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* para pruebas *in vitro* e *in vivo*.
- Probar la eficacia del alimento con los extractos en juveniles de *P. vannamei*, realizando desafíos con *V. parahaemolyticus* para evaluar la sobrevivencia y revisar alteraciones histológicas en órganos y tejidos.
- Realizar análisis hematológicos en hemolinfa para población total y diferenciación hemocitaria de juveniles de *P. vannamei*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Elaboración de Extractos de las Algas Marinas

#### 5.1.1 Recolecta y Procesamiento de las Algas Marinas

Las muestras de *G. vermiculophylla* se recolectaron manualmente en el Estero de Urias (23° 10' 47.81" N, 106° 21' 19.87" O) y las de *U. flexuosa* en la zona intermareal de Playa Norte (23° 12' 29.04" N, 106° 25' 32.10" O) durante las horas de la marea más baja, en el municipio de Mazatlán, Sinaloa. Las muestras se procesaron de acuerdo a la metodología descrita por Thanigaivel y colaboradores (2015), se enjuagaron en el lugar de la recolecta para eliminar el exceso de fango, arena y epicomensales adheridos, después se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron en un recipiente con hielo para su conservación, posteriormente fueron transportadas al laboratorio de microscopia en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán, en donde se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de sal y material extraño. Las muestras recolectadas se separaron, una parte fue secada a la sombra a temperatura ambiente durante 5 días, después se trituraron en un molino doméstico, se tamizaron para obtener un tamaño de partícula uniforme (850 µm) y fueron congeladas a -22 °C en bolsas herméticas, el resto se utilizó para su identificación, se emplearon las claves taxonómicas descritas por León y colaboradores (2012 y 2019), y las descripciones de Ochoa-Izaguirre y colaboradores (2007).

#### 5.1.2 Obtención de Extractos Acuosa

Se utilizó la técnica reportada por Morales-Covarrubias y colaboradores (2016), con las siguientes modificaciones, se prepararon infusiones colocando 5 g de cada macroalga pulverizada en 100 mL de agua destilada a punto de ebullición y se dejó hervir durante 3 minutos, después se filtró el

concentrado y se almacenó a  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 5.2 Determinación de la Actividad Antibacteriana de los Extractos Acuosos

### 5.2.1 Cepa bacteriana *V. parahaemolyticus*

Se utilizó una cepa de *V. parahaemolyticus* (01082013-LS) causante de AHPND que fue aislada de una unidad de producción acuícola de camarón a baja salinidad en el Rosario, Sinaloa, México, en julio de 2013, en donde se registró un evento de mortalidad del 90 al 100% de los organismos (Morales-Covarrubias *et al.*, 2016).

### 5.2.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para la prueba de sensibilidad bacteriana se utilizó la concentración mínima inhibitoria (CMI) en tubo (McDermott *et al.*, 2005). Se prepararon tubos con 5 mL de Caldo Soya Tripticaseína (TSB) (BD Bioxon®) al 2.5% de NaCl (GOLDEN BELL<sup>MR</sup>) y se esterilizaron a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Se prepararon diferentes concentraciones de extracto acuoso de las macroalgas de 5, 30, 50, 70 y  $90\text{ mg mL}^{-1}$ . Posteriormente se agregaron  $100\text{ }\mu\text{L}$  de cada concentración de los extractos acuosos y  $100\text{ }\mu\text{L}$  del inóculo bacteriano (*V. parahaemolyticus*) en los tubos de TSB con sal, se incubaron a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Después, fueron evaluados por medio de un espectrofotómetro para determinar la turbidez, se consideró como CMI a la concentración de extracto necesario para la ausencia de turbidez en el tubo con cultivo bacteriano. La CMI se inoculó en Agar de Soya Tripticaseína (TSA) (BD Bioxon®) con 2.5% de NaCl y agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) (BD Difco<sup>TM</sup>) para corroborar que no hubiese crecimiento bacteriano. Como control negativo se utilizó TSB con sal sin inocular. Tanto los controles positivos como los negativos se realizaron por triplicado.

### 5.2.3 Antibiogramas (Halos de Inhibición)

Para determinar la sensibilidad de la bacteria (*V. parahaemolyticus*) se realizaron antibiogramas por el método de Kirby Bauer (1966). Se prepararon cajas Petri con el medio de agar Mueller Hinton (BD Bioxon®) con 2.5% de NaCl de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 1), y se dejaron secar durante 24 horas. También se prepararon cajas Petri con TSA al 2.5% de NaCl (Anexo 2) en donde se sembró la cepa de *V. parahaemolyticus* y se incubó durante 24 horas a 30 °C. De la placa de TSA sembrada, con un asa se tomó una cantidad de cepa y se resuspendió en solución salina estéril hasta obtener una turbidez de 0.5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Un hisopo estéril fue humedecido con la suspensión bacteriana para sembrar las placas de Mueller Hinton. Posteriormente se colocaron sensibilizadores de 6 mm (Thermo Scientific™) y se impregnaron con 20 µL del extracto acuoso de cada macroalga, se incubó por 24 horas a 30 °C, esto se realizó por triplicado. Se consideraron con actividad antibacteriana a los halos de inhibición  $\geq 6$  mm (Engel *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2013).

### 5.3 Determinación de la Composición Fitoquímica y Capacidad Antioxidante de los Extractos Acuosos

Después de las pruebas antibacterianas *in vitro*, a los extractos que exhibieron actividad antibacteriana se les realizó la determinación de su composición fitoquímica (fenoles solubles totales, flavonoides totales, sulfatos (%) y ácidos urónicos totales (%)) y pruebas de capacidad antioxidante (reducción del radical ABTS y potencial antioxidante reductor férrico (FRAP)), dichos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Compuestos Naturales Bioactivos de la Universidad Politécnica de Sinaloa, en la ciudad de Mazatlán, Sinaloa.

### 5.3.1 Fenoles Solubles Totales

Se utilizó la metodología propuesta por Marigo (1973), para determinar el contenido total de compuesto fenólicos solubles presentes en los extractos. Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto con 150  $\mu\text{L}$  de FOLIN (1:1), 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% y NaOH 0.4%, se incubó a 25 °C por 20 minutos protegido de la luz y se determinó su absorbancia a 750 nm.

Para determinar la concentración de fenoles se empleó una curva estándar de ácido gálico, los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (EAG = mg de Ácido Gálico/g de muestra seca). La cuantificación se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)} = \frac{A - b}{m} \times B^{-1} \quad (1)$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra a 750 nm

b = Ordenada al origen de la curva estándar de ácido gálico

m = Pendiente de la ecuación de la línea recta en la curva estándar de ácido gálico

B = Peso seco de la muestra en gramos

### 5.3.2 Flavonoides Totales

El contenido total de flavonoides se realizó de acuerdo al método de Luximon-Ramma *et al.* (2002). Se tomó 1 mL del extracto y se mezcló con 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  al 2%, se agitaron vigorosamente y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se determinó su absorbancia a 367 nm.

Para determinar la concentración de flavonoides totales de la muestra se empleó una curva estándar

de Quercetina, los resultados fueron expresados en mg equivalentes de Quercetina (EQ) (mg de Quercetina/g de muestra seca) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Equivalentes de Quercetina (EQ)} = \frac{A - b}{mB} \quad (2)$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra a 367 nm

b = Ordenada al origen de la curva estándar de Quercetina

m = Pendiente de la ecuación de la línea recta en la curva estándar de Quercetina

B = Peso seco de la muestra en gramos

### 5.3.3 Determinación del Contenido de Sulfatos

El contenido de sulfatos se determinó con el método descrito por Dogson y Price (1962), se colocó 1 mg de la muestra (en tubo con tapón de rosca) y se le agregó 1 mL de HCl 1 N, se cerraron bien los tubos para hidrolizarlos por 4 – 5 horas a 110 °C. Se tomaron 250 µL del hidrolizado y se colocaron en un tubo de ensayo limpio, se ajustó el volumen a 500 µL por adición de HCl 1 N y después 3.5 mL de Ácido Tricloroacético 30% y se agitó en el vortex, se agregó 1 mL de BaCl<sub>2</sub>-gelatina y se agitó en el vortex, se dejó reposar por 10 minutos, para leer su absorbancia a 360 nm contra blanco HCl 1 N. Mediante la siguiente ecuación se cuantificaron los sulfatos:

$$\text{Contenido de sulfatos } [\mu\text{g/mL}] = \frac{(A - A_0) - b}{m} \quad (3)$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra a 360 nm

A<sub>0</sub> = Absorbancia de blanco reactivo (nm)

b = Ordenada al origen de la curva estándar de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

m = Pendiente de la ecuación de la línea recta en la curva estándar de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 5.3.4 Determinación del Contenido de Ácidos Urónicos Totales

Para la determinación de ácidos urónicos se empleó el método modificado de carbazol (Bitter y Muir, 1962). Se tomaron 3 mL de solución 1 (0.025 M de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se le agregaron 500 µL de la muestra, se cerraron los tubos y se agitaron, se incubaron por 10 minutos en baño de agua hirviendo y después se enfrió a temperatura ambiente para agregarle 100 µL de solución 2 (0.125 % de Carbazol en metanol mantener los tubos en baño de hielo a 4 °C), se agitó vigorosamente y se incubó 15 minutos en baño de agua hirviendo, se dejó enfriar a temperatura ambiente para leer la absorbancia a 530 nm. Se utilizó la siguiente ecuación para cuantificar los ácidos urónicos totales:

$$\text{Ácidos urónicos totales } [\mu\text{g/mL}] = \frac{(A - A_0) - b}{m} \quad (4)$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra a 530 nm

A<sub>0</sub> = Absorbancia de blanco reactivo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

b = Ordenada al origen de la curva estándar de ácido glucurónico

m = Pendiente de la ecuación de la línea recta en la curva estándar de ácido glucurónico

### 5.3.5 Reducción del Radical ABTS

Para determinar la capacidad de reducción de radicales ABTS en los extractos, se utilizó la técnica descrita por Przygodzka *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Se empleó el radical ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate). Para realizar las mediciones, el ABTS se activó 16 horas antes de la siguiente manera, se pesaron 19.2 mg del radical ABTS y se disolvieron en 5 mL de agua desionizada (protegido de la luz) y 37.8 mg de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) disuelto en 1 mL de agua desionizada (protegido de la luz), se tomaron 88 µL de la solución de persulfato y se agregaron a la solución de ABTS, se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente protegido de la luz. Después se tomó 1 mL del radical ABTS activado y se mezcló con 88 mL de etanol, se ajustó a una absorbancia de 0.8 a 734 nm. Para el ensayo en una celda de 4 mL se mezclaron 2.9 mL de la solución de ABTS y 100 µL del extracto respectivo midiendo la absorbancia directamente al tiempo cero y a los 10 minutos después a 734 nm, a temperatura ambiente. Se empleó como blanco etanol a 80% y como estándar se utilizó Trolox. El porcentaje de reducción del radical ABTS se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción ABTS} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (5)$$

Donde:

A= La absorbancia de la solución de ABTS antes de añadir el extracto (tiempo cero).

B = La absorbancia de la solución ABTS después de 10 minutos de la adición del extracto.

### 5.3.6 Potencial Antioxidante Reductor Férrico (FRAP)

Para determinar el Potencial Antioxidante Reductor Férrico (FRAP) de los extractos, se utilizó la metodología descrita por Benzie y Strain (1996) modificada por Szöllösi y Szöllösi (2002). Se

preparó una solución amortiguadora de acetatos 300 mM, pH 3.6; 2,4,6-tripiridil-2-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM; FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O, 20 mM, en agua HPLC. Para el reactivo FRAP, se mezclaron 50 mL de buffer de acetatos con 5 mL de solución TPTZ y 5 mL de FeCl<sub>3</sub>. Para el ensayo, se agregaron 100 µL de la muestra o estándar y 1400 µL de reactivo FRAP en microtubos, se incubó por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, posteriormente se determinó la absorbancia a 593 nm. Como blanco se utilizó agua y se empleó Trolox como estándar.

#### 5.4 Determinación de Metales

Para determinar la posible presencia de metales potencialmente tóxicos en los extractos, se enviaron muestras de las macroalgas al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Guaymas, al laboratorio de Ciencias Ambientales para determinar el contenido de metales tales como Mercurio (Hg), Cadmio (Cd), Plomo (Pb) y Arsénico (As).

Las muestras fueron analizadas por voltamperometría de disolución anódica en un equipo de VA Computrace 747 (Metrohm). El límite de detección para los metales fue de 0.0001 mg/kg.

#### 5.5 Elaboración del Alimento

La elaboración del alimento se realizó de acuerdo al método descrito por Morales-Covarrubias *et al.* (2016). El alimento comercial para camarones (Purina 35; 35% de proteína y 7.70% de lípidos) se pulverizó con un molino doméstico y se tamizó para homogenizar el tamaño de partícula, después se agregaron 50 mL de los extractos acuosos de las algas marinas con una concentración de 50 mg/mL para hacer una pre-mezcla, junto con agua destilada tibia (< 50 °C), se elaboraron nuevamente los pellets con un molino de carne doméstico (3 mm de diámetro) y se secaron en un horno a temperatura no mayor a 40 °C durante 18 horas, posteriormente se almacenaron en refrigeración (4 °C) en bolsas herméticas. Se siguió el mismo procedimiento para elaborar una dieta control solo que sin adicionar extractos.

Para corroborar la efectividad antibacteriana se utilizó el mismo procedimiento de los antibiogramas mencionado anteriormente, y se midió el diámetro del halo de inhibición por cada alimento.

### 5.5.1 Evaluación de Consumo de Alimento

Para evaluar el consumo de alimento y palatabilidad se siguió la metodología por Morales-Covarrubias *et al.* (2016), para este bioensayo se utilizaron acuarios de acrílico con 10 L de agua de mar, en cada acuario se colocó un organismo, utilizando 5 repeticiones con cada alimento (alimentos con extracto de macroalgas y alimento sin extracto de macroalgas).

Se alimentó a los organismos con las dietas, proporcionando un 20% de su peso corporal durante 5 días consecutivos. Después de un periodo de 4 horas el alimento no consumido (sin las heces) se recuperó de cada acuario, se enjugó con agua destilada para eliminar la sal y posteriormente se secó en el horno (40 °C), se enfrió y se pesó, para hacer una estimación del consumo de alimento con la siguiente formula:

$$\text{Peso del alimento consumido} = A - B \quad (6)$$

Donde:

A= Peso total del alimento ofrecido en g

B= Peso del alimento recuperado en g

### 5.6 Aclimatación de los Organismos

Se adquirieron aproximadamente 600 postlarvas de *P. vannamei* de un laboratorio con un peso

aproximado de 2 g, de los cuales se seleccionó un número representativo (10 %) para conocer su estado de salud, se les realizaron análisis bacteriológicos (Lightner, 1996), análisis en fresco (Morales-Covarrubias, 2010), pruebas de biología molecular y análisis histológico (Bell y Lightner 1988) para descartar alguna patología como AHPND, el virus de la mancha blanca, el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa y enfermedades por protozoos.

Una vez descartada cualquier patología los organismos permanecieron confinados aproximadamente un mes en el CIAD Unidad Mazatlán en 6 tanques de 400 L con aireación constante, 35 ups de salinidad, con una temperatura de  $25\pm 3$  °C y se alimentaron 3 veces al día a saciedad con alimento comercial para camarones (Camaronina 35 Purina®; 35% de proteína y 7.70% de lípidos).

## 5.7 Diseño Experimental

Una vez que los organismos pesaron entre 4 y 5 g se realizó el experimento. Los camarones se aclimataron en la sala de bioensayos 24 horas previas a la infección por inmersión. Se emplearon acuarios de acrílico con 10 L de agua de mar (cada acuario contenía 10 camarones), con aireación individual, temperatura de  $29\pm 1$  °C, salinidad de 35 ups. Se utilizaron dos tratamientos y dos controles, cada uno con tres replicas, para el seguimiento de la sobrevivencia (Morales-Covarrubias *et al.*, 2016) (Figura 1). Los tratamientos y controles fueron los siguientes: A) Control negativo (sin adición de bacteria y alimentados con dieta control), B) Control positivo (camarones desafiados con *V. parahaemolyticus* y alimentos con dieta control), C) Tratamiento con *G. vermiculophylla* (camarones desafiados con *V. parahaemolyticus* y alimentados con dieta que contenía extracto de *G. vermiculophylla*) y D) Tratamiento con *U. flexuosa* (camarones desafiados con *V. parahaemolyticus* y alimentados con dieta que contenía extracto de *U. flexuosa*).

### 5.7.1 Preparación de Suspensión Bacteriana (Inóculo)

La infección bacteriana se realizó por el método de inmersión, que consistió en la adición directa

del inóculo. Se preparó una suspensión bacteriana (inóculo) (Anexo 3), tomando una muestra de la cepa de *V. parahaemolyticus* (01082013-LS) criopreservada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se incubó en TSB al 2.5% de NaCl por 24 horas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la suspensión bacteriana se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL (Morales-Covarrubias *et al.*, 2016). El inóculo se adiciono a los acuarios de los tratamientos y de los controles positivos, con excepción de los acuarios de los controles negativos. Los camarones se alimentaron 15 minutos después de la infección, a los organismos del control negativo y del control positivo se les alimentó con alimento control y a los organismos de los tratamientos de macroalgas se les dio el alimento adicionado con extractos de macroalgas (*G. vermiculophylla* y *U. flexuosa*), posteriormente se alimentaron cada 6 horas de la misma forma. Durante el bioensayo se observaron los signos clínicos que presentaban los organismos, además se registró la mortalidad hasta el final del desafío (24 horas).



Figura 1. Montaje de bioensayo infección experimental por inmersión con *V. parahaemolyticus*.

## 5.8 Análisis Histológico

Los organismos sobrevivientes de cada tratamiento y control del desafío bacteriano, se analizaron

con fines histopatológicos para revisar las alteraciones en órganos y tejidos. Todas las muestras se fijaron con solución Davidson (alcohol etílico 96%, formalina 100%, ácido acético glacial y agua destilada) durante 48 horas. Los organismos fueron cortados, para deshidratarse y procesarse en parafina, una vez obtenidos los bloques de parafina se descalcificaron para posteriormente hacer cortes a 5  $\mu\text{m}$  con el micrótopo (LEICA RM2125RT). Se realizó la tinción con hematoxilina-eosina (H & E), y finalmente se examinaron mediante un microscopio óptico (Olympus BX60) adaptado con una cámara digital (Infinity 2) (Anexo 4) (Bell y Lightner 1988; Prophet *et al.*, 1995; Morales-Covarrubias, 2010; Tran *et al.* 2013).

### 5.9 Análisis Hematológicos

Para evaluar el conteo total y diferencial de hemocitos (CTH y CDH), se tomaron muestras de hemolinfa antes de que los organismos sobrevivientes fueran fijados para los análisis histológicos. Con ayuda de una jeringa de 1 mL se tomó la muestra de hemolinfa por cada camarón de la base del pleópodo del primer segmento abdominal, se depositó en un tubo eppendorf con solución Alsever (2:1) y se preservó en refrigeración para posteriormente realizar el CTH y CTD (hialinos, semi-granulares y granulares) en una cámara de Neubauer (Figura 2) con ayuda de un microscopio óptico (Olympus BX60) (Barracco *et al.*, 2008). El CTH fue expresado en millones de células por mL y el CDH en porcentajes hemocitarios. Se consideraron valores entre  $5 \times 10^6$  a  $15 \times 10^6$  hemocitos/mL como aceptables (Guillan *et al.*, 2004).

También se realizó la tinción de los hemocitos adaptando una técnica empleada para frotis sanguíneo (Anexo 5).

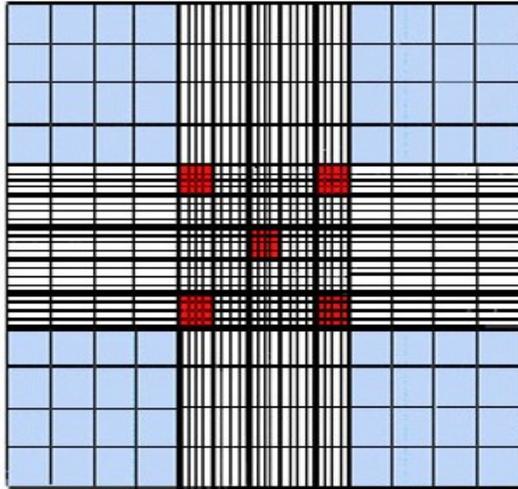


Figura 2. Cámara de Neubauer, cuadros rojos para CTH.

#### 5.10 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en las diferentes determinaciones fueron sometidos a un análisis de normalidad de una vía (ANOVA), a los datos que no presentaron normalidad se les aplicó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparar los datos entre extractos se realizaron pruebas de t de Student ( $p < 0.05$ ). Con los datos de la mortalidad y tiempo de muerte de los desafíos, se obtuvieron curvas de supervivencia de los organismos mediante un estimador no paramétrico y por máxima verosimilitud Kaplan-Meier. Para todas las pruebas se utilizó el software estadístico R.

Todos los resultados se presentan en valor promedio y desviación estándar obtenido de triplicados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Acuosa

La determinación de la CMI se realizó mediante la turbidez presentada por cada concentración de extracto acuoso inoculado. La concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup> presentó turbidez a diferencia de las otras concentraciones 30, 50, 70, 90 mg mL<sup>-1</sup> en donde no se observó crecimiento bacteriano (turbidez) (Cuadro 1). Para corroborar que no hubiese crecimiento bacteriano se sembraron en placas de agar (TSA con sal y TCBS) para contar las UFC de *V. parahaemolyticus*. Se determinó que la CMI tanto para *G. vermiculophylla* como para *U. flexuosa* fue de 50 mg mL<sup>-1</sup>, al no presentar crecimiento bacteriano en las placas de agar.

Cuadro 1. Resultados de CMI para extractos acuosa de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa*.

Macroalgas	Bacteria (1x10 <sup>8</sup> UFC)	Concentraciones (mg mL <sup>-1</sup> )				
		5	30	50	70	90
<i>G. vermiculophylla</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	-	-	-
<i>U. flexuosa</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	-	-	-

+ = crecimiento bacteriano  
- = sin crecimiento bacteriano

### 6.2 Halos de Inhibición Bacteriana de Extractos Acuosa

El extracto acuoso que exhibió mayor actividad antibacteriana fue *G. vermiculophylla* con un halo de inhibición de 18.00 ± 0.58 mm (Figura 3) en comparación a *U. flexuosa* (14.00 ± 0.29 mm) (Figura 4) inhibiendo el crecimiento de *V. parahaemolyticus* (1x10<sup>8</sup> UFC/mL).

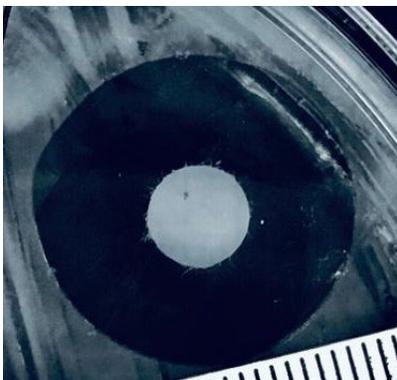


Figura 3. Halo de inhibición de *G. vermiculophylla* ( $18.00 \pm 0.58$  mm).



Figura 4. Halo de inhibición de *U. flexuosa* ( $14.00 \pm 0.29$  mm).

### 6.3 Composición Fitoquímica y Capacidad Antioxidante de los Extractos Acuosa

Respecto de la composición de los extractos de las especies empleadas en este estudio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido total de polifenoles y flavonoides. El extracto acuoso de *G. vermiculophylla* presentó un mayor contenido de polifenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico por cada gramo de extracto seco, respecto del extracto de *U. flexuosa* ( $10.58 \pm 2.31$  y  $4.78 \pm 0.67$  mg EAG/g, respectivamente), sin embargo, el resultado para el contenido total de flavonoides expresado en mg equivalentes de quercetina por cada gramo de extracto seco, reveló que el extracto de *G. vermiculophylla* contenía una menor cantidad de este tipo de compuestos respecto del extracto de *U. flexuosa* ( $10.32 \pm 0.73$

y  $32.07 \pm 0.99$  mg EQ/g, respectivamente). Por otro lado, no se detectó la presencia de ácidos urónicos en el extracto de *G. vermiculophylla*, caso contrario al extracto de *U. flexuosa* donde se encontró un 0.13 % de éstos; el contenido de sulfatos totales presentes en los extractos fue de 10.22% para *G. vermiculophylla* y 12.30% para *U. flexuosa* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición fitoquímica de los extractos acuosos de las macroalgas.

Macroalgas	CTF (mg EAG/g)	CF (mg EQ/g)	Ácidos urónicos (%)	Sulfatos (%)
<i>G. vermiculophylla</i>	$10.58 \pm 2.31^a$	$10.32 \pm 0.73^b$	ND	$10.22 \pm 0.09^a$
<i>U. flexuosa</i>	$4.78 \pm 0.67^b$	$32.07 \pm 0.99^a$	$0.13 \pm 0.06$	$12.30 \pm 0.09^a$

CTF = Contenido total de compuestos fenólicos, expresado como mg Equivalentes de Ácido Gálico por cada gramo de muestra seca (EAG)

CF = Contenido de flavonoides, expresado como mg equivalentes de Quercetina por cada gramo de muestra seca (EQ).

Los valores se muestran en promedio  $\pm$  D.E. Las diferentes letras en las columnas representan diferencias significativas entre los extractos ( $P < 0.05$ ). ND= no detectado.

La capacidad antioxidante medida por reducción del radical ABTS y la capacidad antioxidante reductora férrica (FRAP), a una concentración de 1 mg/mL de extracto, reveló que los extractos de ambas especies poseen una actividad antioxidante similar ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada especie ( $p > 0.05$ ) para estas determinaciones; para el extracto de *G. vermiculophylla* la actividad de reducción del radical ABTS y FRAP fue de  $21.73 \pm 11.59$  y  $46.78 \pm 5.21$  TEAC respectivamente, y para el extracto de *U. flexuosa*  $21.59 \pm 15.22$  y  $44.17 \pm 2.42$  TEAC, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Capacidad antioxidante de extractos acuosos de macroalgas.

Macroalgas	ABTS TEAC	FRAP TEAC
<i>G. vermiculophylla</i>	$21.73 \pm 11.59$	$46.78 \pm 5.21$
<i>U. flexuosa</i>	$21.59 \pm 15.22$	$44.17 \pm 2.42$

#### 6.4 Determinación de Metales

Los resultados del análisis de la determinación de metales para los extractos acuosos de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* (Cuadro 4) fueron comparados con normas para crustáceos, debido a que no existen normas específicas para macroalgas, dichos resultados presentan cantidades menores a los máximos permisibles de la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados (Cuadro 5) y del contenido máximo de metales pesados en productos alimenticios del Reglamento (CE) n° 333/2007 de la Comisión de la Unión Europea (Cuadro 6).

Cuadro 4. Detección de metales en extractos acuosos de macroalgas.

Metales (mg/Kg)	<i>G. vermiculophylla</i>	<i>U. flexuosa</i>
Mercurio (Hg)	0.01082	0.00297
Cadmio (Cd)	< ND	0.00115
Plomo (Pb)	< ND	0.00567
Arsénico (As)	0.02609	0.02437

ND: no detectado

Cuadro 5. Límites máximos permisibles de la norma NOM-242-SSA1-2009 para metales pesados en productos frescos, refrigerados y congelados (parte comestible).

Especificación	Especie	Límite máximo (mg/Kg)
Arsénico (As)	Crustáceos	80
Cadmio (Cd)	Otras	0.50
Plomo (Pb)	Crustáceos	0.50

Cuadro 6. Contenidos máximos de metales pesados en productos alimenticios del Reglamento (CE) n° 333/2007 de la Comisión de la Unión Europea.

Metal	Producto	Contenido máximo (mg/Kg peso fresco)
Plomo (Pb)	Crustáceos	0.50
Cadmio (Cd)	Crustáceos	0.50
Mercurio (Hg)	Crustáceos	0.50

## 6.5 Evaluación de Consumo de Alimento

En cuanto a la evaluación del consumo de alimento, se observó una ingesta favorable por los organismos, ya que 30 minutos después de suministrar el alimento, los camarones tenían el intestino lleno (Figura 5), por lo que se consideró una aceptación positiva del alimento con extracto de macroalga. Cada camarón consumió por día aproximadamente 30 mg de cada alimento con extracto de macroalga.



Figura 5. Camarón consumiendo alimento con extracto de macroalgas e intestino lleno (flecha).

## 6.6 Desafío de Eficacia

Los organismos infectados con la bacteria *V. parahaemolyticus* ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) del control positivo mostraron alteraciones en comportamiento y coloración después de una hora de infección (Figura 6), presentando opacidad muscular (Figura 6a), nado decúbico (Figura 6b) y errático (Figura 6c), acalambramiento (Figura 6d) (con permanencia en el fondo del acuario, Figura 6e),

también se observó coloración rojiza en urópodos y antenas (Figura 6f). Después de 4 horas post infección, los camarones se observaron con intestino vacío, letárgicos, con permanencia en el fondo, y con mortalidad a partir de las 6 horas. Al final del desafío (24 horas después de la infección) la sobrevivencia fue del 30% (Figura 7).

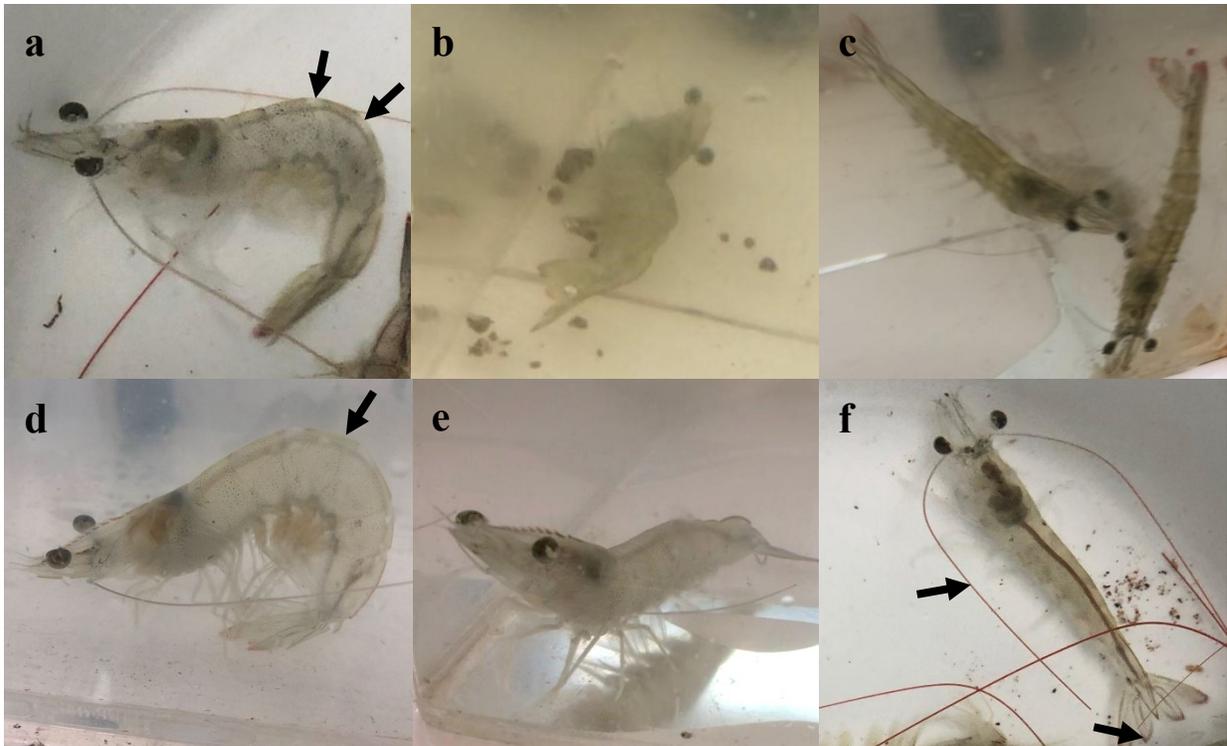


Figura 6. Organismos con alteraciones en comportamiento y coloración post infección. a) opacidad muscular, b) nado decúbiteo, c) nado errático, d) acalambramiento, e) organismo con permanencia en el fondo, f) coloración rojiza en urópodos y antenas.

Los camarones del control negativo no registraron alteraciones en comportamiento ni mortalidad. Los organismos con tratamiento de *G. vermiculophylla* presentaron signos clínicos 2 horas después de la infección (nado decúbiteo, movimiento de los ojos y enrojecimiento en urópodos). Once horas después de la infección se registraron las primeras mortalidades (dos organismos), con una sobrevivencia del 67% al final del bioensayo (Figura 7).

Los camarones tratados con *U. flexuosa* presentaron alteraciones en comportamiento y coloración 2 horas post infección (acalambramiento, enrojecimiento de urópodos y nado decúbito). Se registraron 3 mortalidades 14 horas post infección, y una sobrevivencia del 60% al final del desafío (Figura 7).

En el caso de los organismos tratados con *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* la sobrevivencia fue similar 24 horas post infección ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, entre controles y tratamientos se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

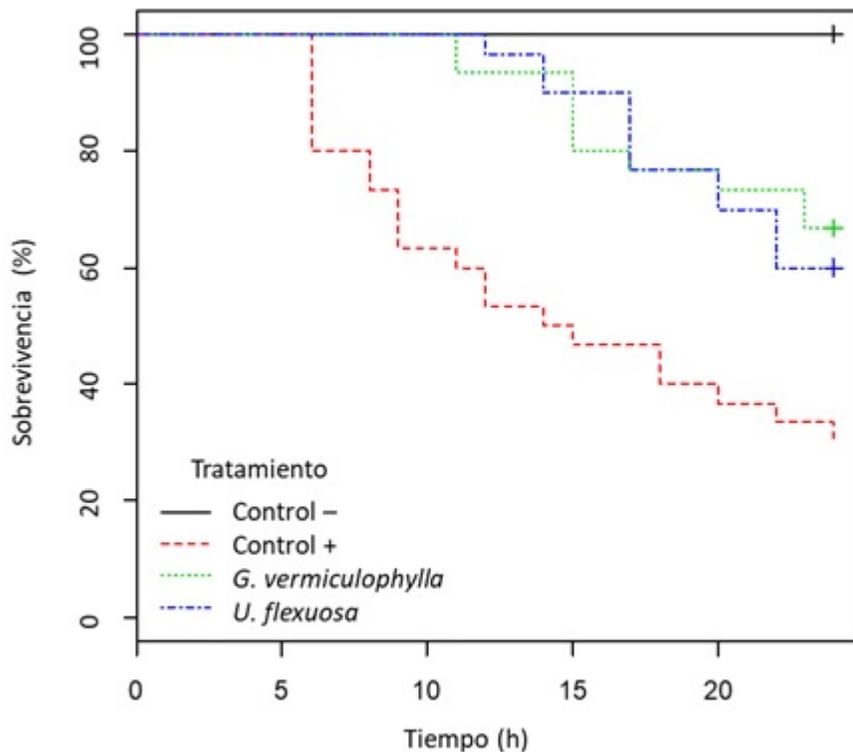


Figura 7. Curvas de sobrevivencia (Kaplan – Meier) de juveniles de *P. vannamei* infectados con *V. parahaemolyticus*.

## 6.7 Análisis Histológico

Los organismos analizados presentaron patologías en sus diferentes órganos y tejidos a lo largo del bioensayo las cuales se describen a continuación:

Hepatopáncreas (Figura 8), los organismos del control negativo mostraron túbulos hepatopancreáticos normales, con células embrionarias (E), fibrilares (F), de reserva (R) y secretoras o globulares (B) (Figura 8a). Los organismos del control positivo, presentaron desprendimiento de las células E, F, B y R de los túbulos del hepatopáncreas de la región proximal al intestino e infiltración severa de hemolinfa con hemocitos en la región intertubular (Figura 8b). En los organismos tratados con la macroalga *G. vermiculophylla* se observaron túbulos normales del hepatopáncreas con estructuras vermiformes en el lumen e infiltración de hemolinfa y hemocitos en tejido conectivo intertubular (Figura 8c). En los organismos tratados con *U. flexuosa*, se observó desprendimiento celular e infiltración de hemolinfa y hemocitos en tejido conectivo intertubular (Figura 8d).

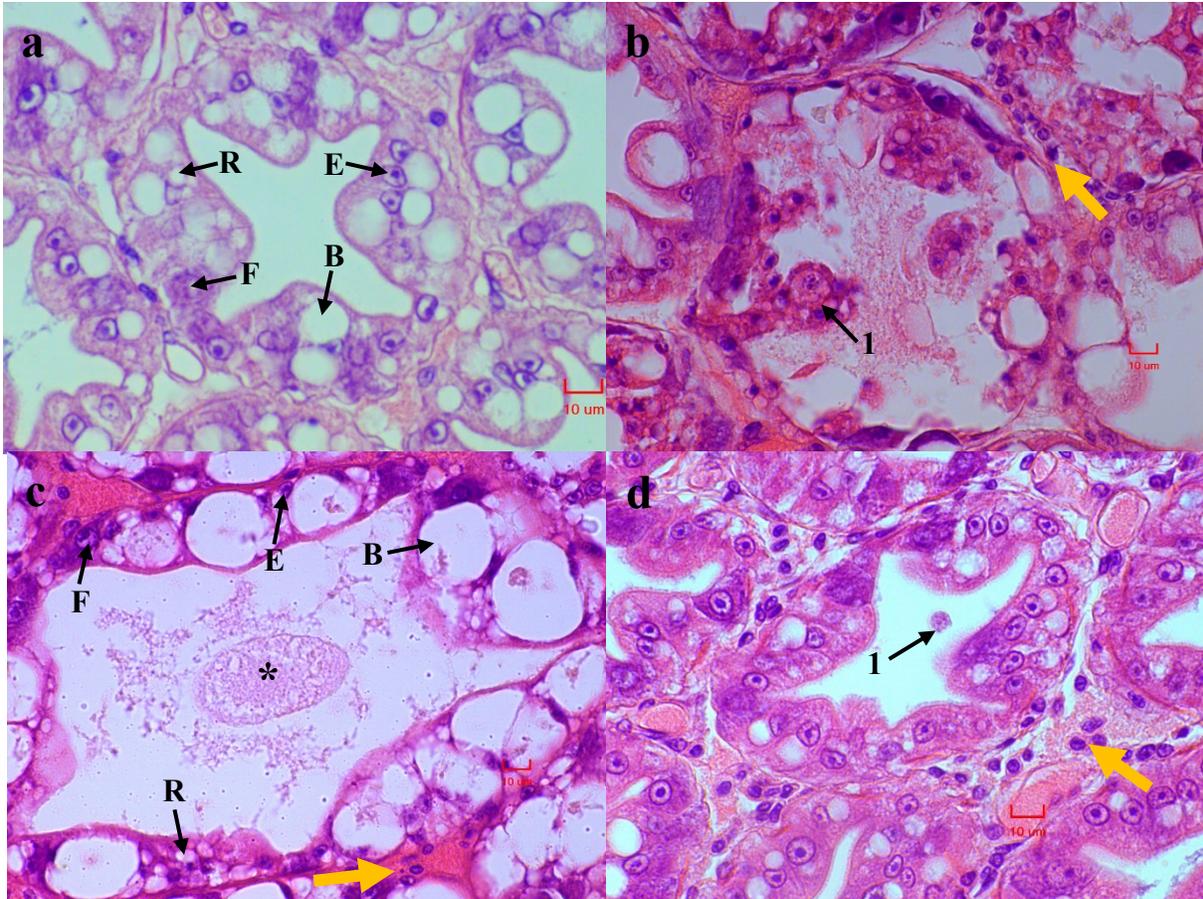


Figura 8. Corte histológico longitudinal de hepatopáncreas (zona proximal al intestino) de *P. vannamei*. a) organismos del control negativo presentan estructura tubular normal, con células E (embrionarias), F (fibrilares), R (reserva) y B (secretoras o globulares); b) organismos del control positivo con túbulo con desprendimiento de células E, F, B y R (1) e infiltración severa de hemolinfa y hemocitos (flecha); c) organismos tratados con *G. vermiculophylla* con túbulo con estructuras vermiformes en el lumen (\*) e infiltración de hemolinfa y hemocitos (flecha); d) organismos tratados con *U. flexuosa* con túbulo con desprendimiento celular (1) e infiltración de hemolinfa con hemocitos (flecha). Tinción H&E.

Glándula antenal (Figura 9), los organismos del control negativo mostraron túbulo y lumen normal e infiltración de hemolinfa con hemocitos (Figura 9a). Los organismos del control positivo, mostraron atrofia en los túbulos e infiltración severa de hemolinfa y hemocitos (Figura 9b). En los organismos tratados con *G. vermiculophylla* se observaron túbulos normales, células picnóticas e infiltración de hemolinfa con hemocitos (Figura 9c). En los organismos tratados con *U. flexuosa* se observó infiltración de hemolinfa y hemocitos con formación de un nódulo hemocítico (Figura 9d).

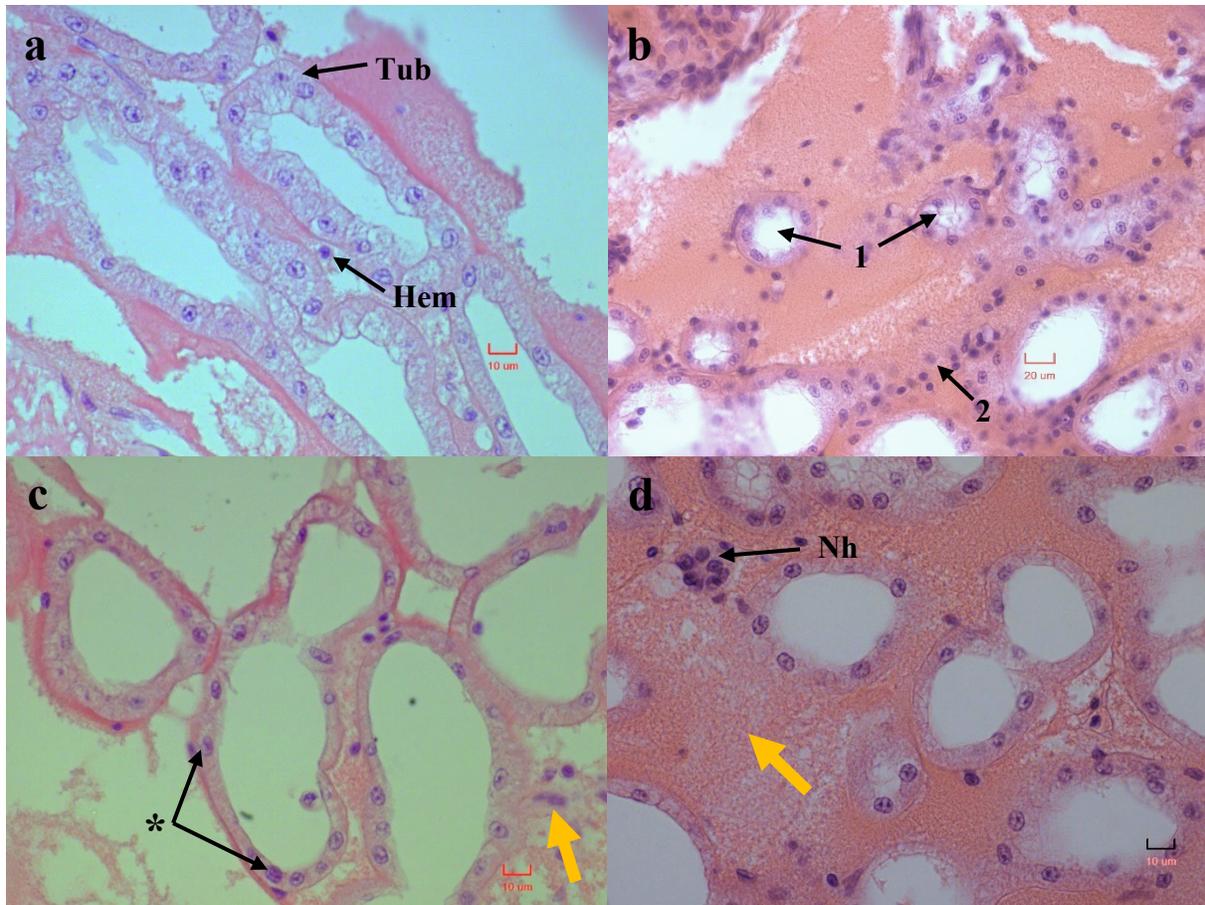


Figura 9. Corte histológico longitudinal de glandula antenal (zona del celomosaco) de *P. vannamei*. a) organismos control negativo presentan túbulo y lumen normal (Tub) con infiltración de hemolinfa con hemocitos (Hem); b) organismos del control positivo con atrofia en los túbulos (1) e infiltración severa de hemolinfa con hemocitos (2); c) organismos tratados con *G. vermiculophylla* con túbulo normal, células picnóticas (\*) e infiltración de hemolinfa y hemocitos (flecha); d) organismos tratados con *U. flexuosa* con infiltración de hemolinfa y hemocitos (flecha) con formación de nódulo hemocítico (Nh). Tinción H&E.

Branquias (Figura 10), en los organismos del control negativo se observó estructura normal de los filamentos secundarios con hemocitos en hemolinfa (Figura 10a). En los organismos del control positivo se observó infiltración severa de hemolinfa y hemocitos con pérdida de la estructura (Figura 10b). En los organismos tratados con *G. vermiculophylla* (Figura 10c) y *U. flexuosa* (Figura 10d) (no mostraron diferencias entre ellos) se observó infiltración de hemolinfa con hemocitos.

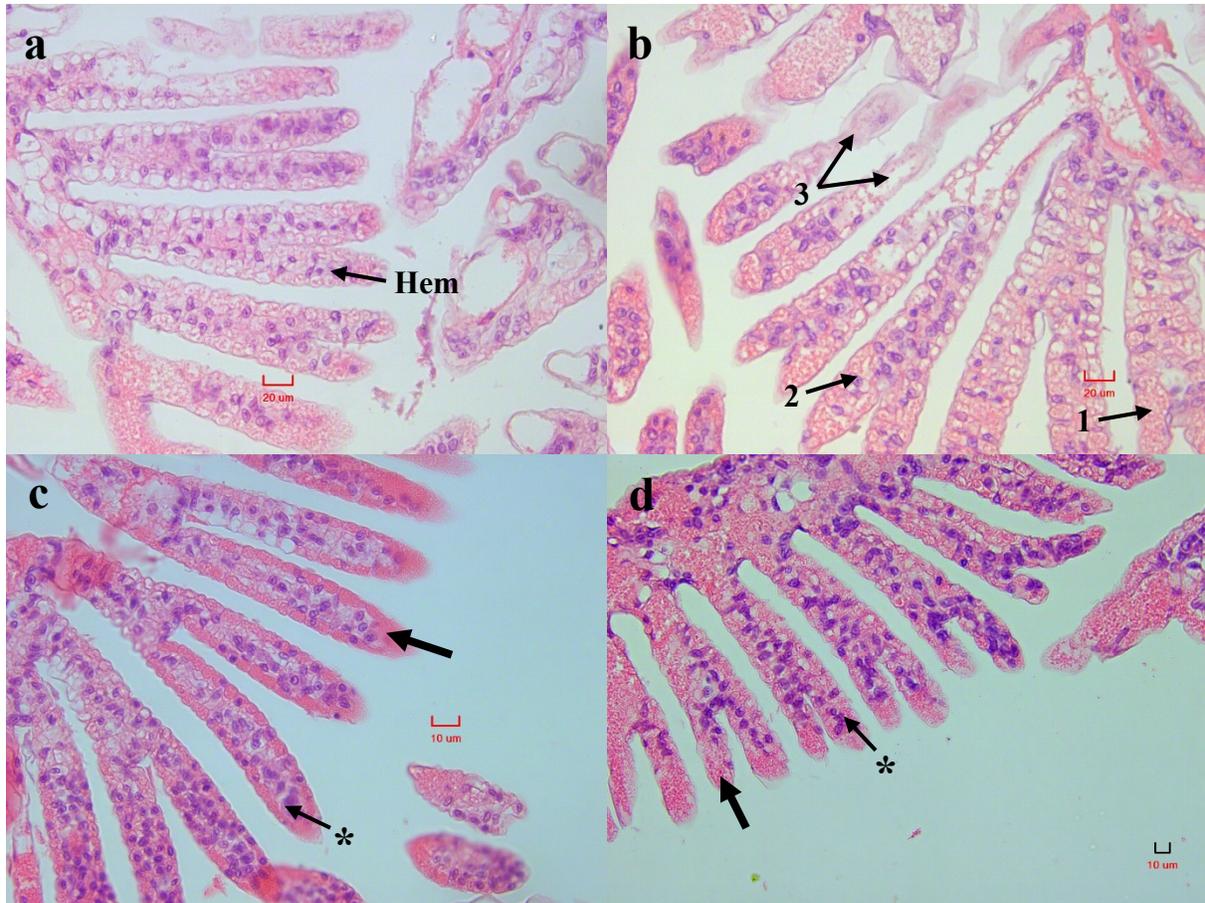


Figura 10. Corte histológico longitudinal de filamentos branquiales de *P. vannamei*. a) organismos del control negativo con filamentos branquiales normales y hemocitos en hemolinfa (Hem); b) organismos del control positivo con infiltración severa de hemolinfa (1) y hemocitos (2) y pérdida de la estructura (3); c) organismos tratados con *G. vermiculophylla* con infiltración de hemolinfa (flecha) con hemocitos (asterisco); d) organismos tratados con *U. flexuosa* con infiltración de hemolinfa (flecha) con hemocitos (asterisco). Tinción H&E.

Intestino (Figura 11), los organismos del control negativo mostraron una estructura normal del epitelio columnar e infiltración de hemolinfa con hemocitos en tejido conectivo esponjoso (Figura 11a). En los organismos del control positivo se observaron células con núcleos picnóticos y cariorréxis en el epitelio columnar e infiltración severa de hemolinfa en tejido conectivo con migración de hemocitos al epitelio columnar (Figura 11b). En los organismos tratados *G. vermiculophylla* se observó estructura normal del epitelio columnar, infiltración de hemolinfa con hemocitos y debris en el lumen (Figura 11c). En los organismos tratados con *U. flexuosa* se

observaron células con núcleos picnóticos en el epitelio columnar e infiltración severa de hemolinfa en tejido conectivo con migración de hemocitos al epitelio columnar (Figura 11d).

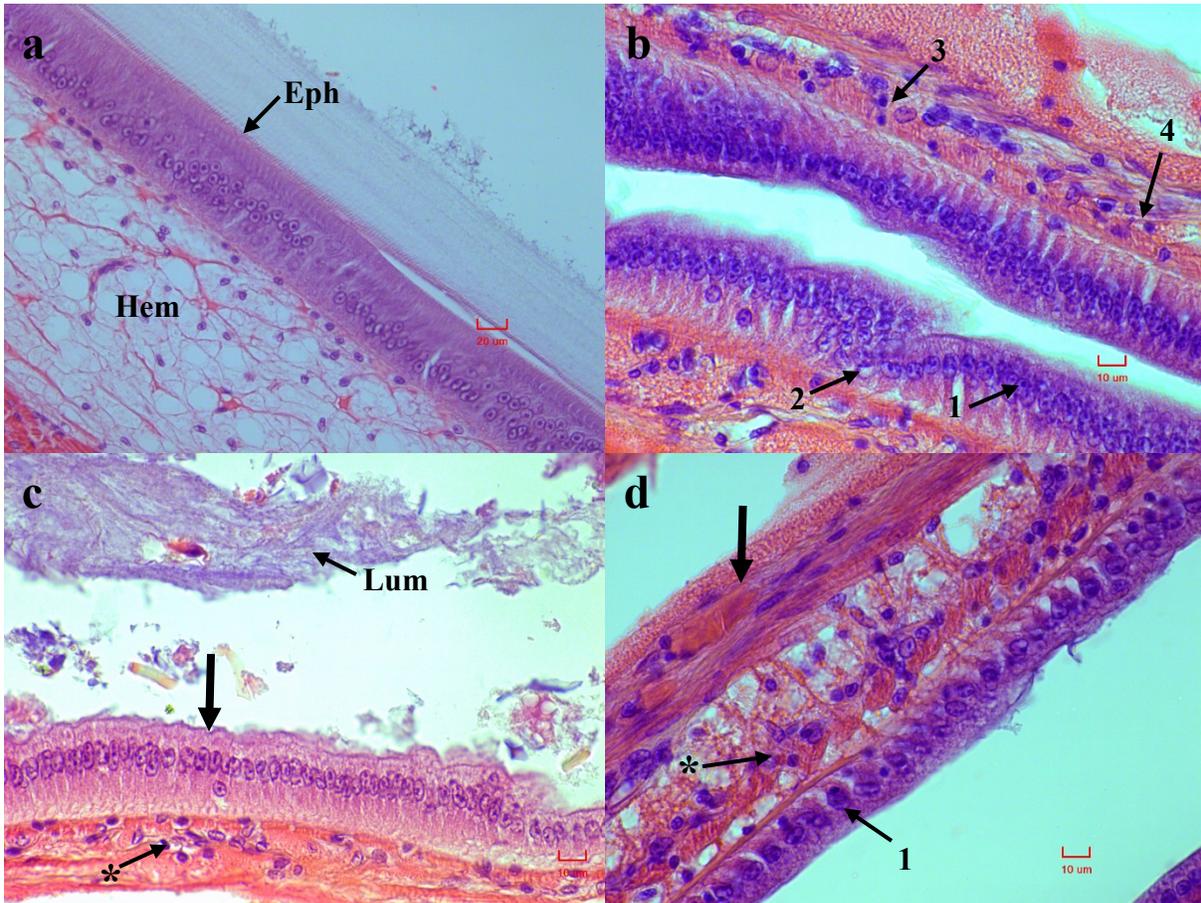


Figura 11. Corte histológico longitudinal de intestino de *P. vannamei*. a) organismos del control negativo con epitelio columnar normal (Eph) e infiltración de hemolinfa con hemocitos en tejido esponjoso (Hem); b) organismos del control positivo con células picnóticas (1) y cariorréxis (2) en epitelio columnar e infiltración severa de hemolinfa (3) con hemocitos migrando al epitelio (4); c) organismos tratados con *G. vermiculophylla* con estructura normal del epitelio columnar (flecha), infiltración de hemolinfa con hemocitos (\*) y debris en el lumen (Lum); d) organismos tratados con *U. flexuosa* con células picnóticas (1) e infiltración severa de hemolinfa (flecha) con migración de hemocitos (\*). Tinción H&E.

## 6.8 Análisis Hematológicos

En los resultados de los hemogramas se observaron variaciones en el conteo total y diferencial de hemocitos entre los controles y tratamientos, en los cuales se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). El CTH fue significativamente menor en los organismos del control positivo ( $1.35 \times 10^6$  cel/mL). En los organismos tratados con las macroalgas se observó una pequeña disminución del CTH comparado con el control negativo (Figura 12).

En las poblaciones hemocitarias: hemocitos hialinos, semi-granulares y granulares (Figura 13), se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (macroalgas) y controles (positivo y negativo). Los organismos del control positivo tuvieron una disminución de los hemocitos hialinos (16%) y una dominancia de los hemocitos granulares (29%). En los organismos tratados con *G. vermiculophylla* se observó con mayor presencia a los hemocitos semi-granulares (33%), seguidos por los hemocitos hialinos y granulares (23%). Los organismos tratados con *U. flexuosa* presentaron mayor porcentaje de hemocitos semi-granulares y granulares (29%) y menor de hemocitos hialinos (19%) (Figura 14).

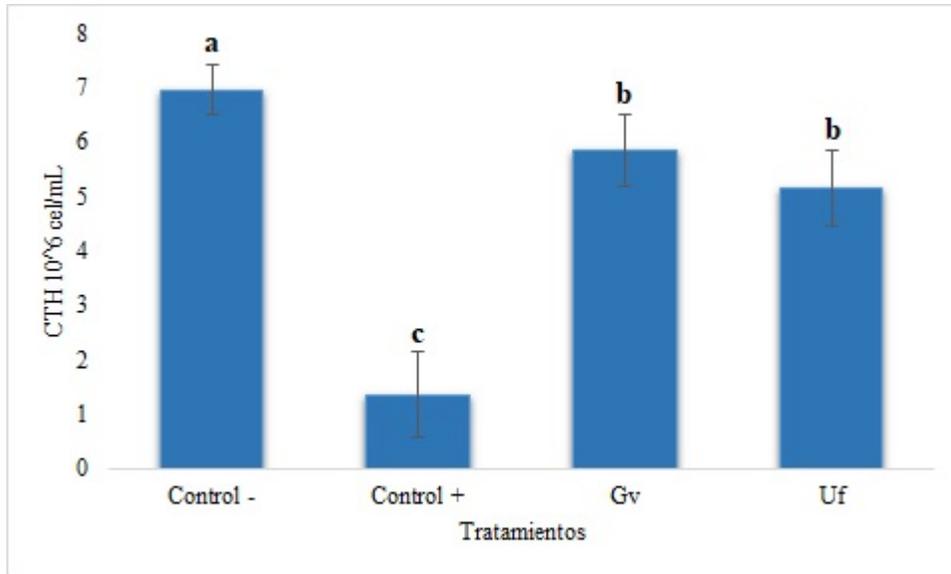


Figura 12. Conteo total de hemocitos de *P. vannamei* infectados con *V. parahaemolyticus*. Los datos son medias  $\pm$  D.E. Las diferentes letras sobre las barras indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

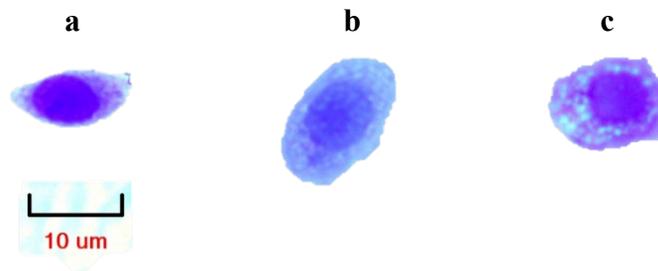


Figura 13. Diferenciación hemocitaria. a) hialino (núcleo amplio y céntrico); b) semi-granular (núcleo típicamente en forma de herradura o esférico con gránulos pequeños); c) granular (tienen grandes gránulos). Tinción Hemocolorante rápido Hycel.

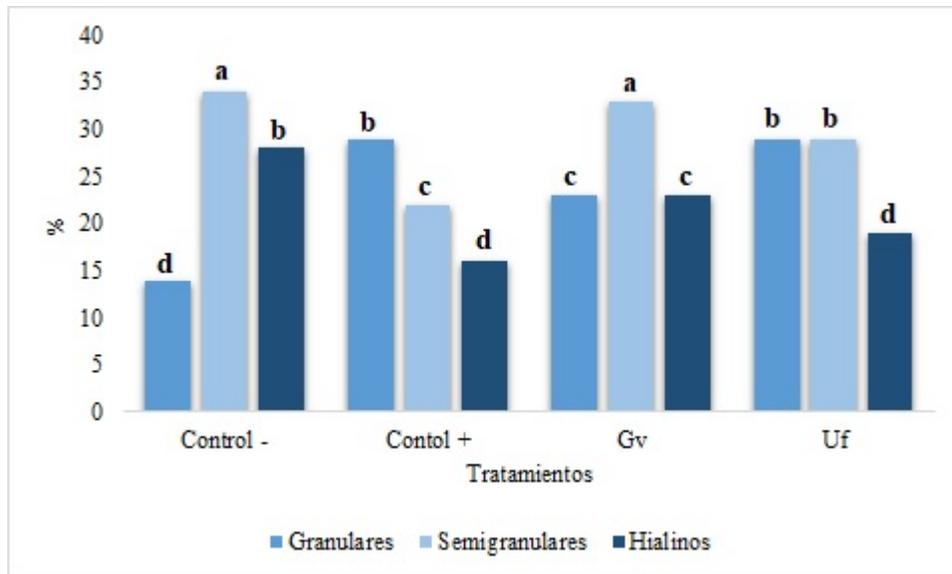


Figura 14. Conteo diferencial de hemocitos de *P. vannamei* infectados con *V. parahaemolyticus* expresado en porcentajes. Las diferentes letras sobre las barras indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

En los últimos años las enfermedades de origen bacteriano han provocado grandes pérdidas económicas. En México desde el 2013 a la fecha la enfermedad de mayor presencia en los sistemas de producción acuícola es AHPND, causada por *V. parahaemolyticus* (Nunan *et al.* 2014). Para tratar esta patología comúnmente se utilizan antibióticos comerciales como la oxitetraciclina, florfenicol y enrofloxacin, su uso indiscriminado ha provocado el aumento de bacterias resistentes, contaminación y problemas de salud al consumidor (Roque *et al.*, 2001; Santiago *et al.*, 2009). Debido a estas problemáticas, en los últimos años se han buscado alternativas de origen natural para sustituir el uso de antibióticos comerciales, es por ello que en este estudio se probó la eficacia antibacteriana de los extractos acuosos de las macroalgas *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* contra *V. parahaemolyticus*, como posibles alternativas para su control en la camaronicultura.

Se evaluó la eficacia antibacteriana *in vitro* de los extractos acuosos de las dos macroalgas, determinando su CMI y mediante antibiogramas sus halos inhibitorios. Se determinó que la CMI tanto de *G. vermiculophylla* como de *U. flexuosa* fue de 50 mg mL<sup>-1</sup> contra *V. parahaemolyticus* (1 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). En cuanto a los resultados de los antibiogramas, el extracto acuoso de *G. vermiculophylla* exhibió mayor eficacia con un halo de inhibición de 18.00 ± 0.58 mm, en comparación al del extracto de *U. flexuosa* que fue de 14.00 ± 0.29 mm.

Para macroalgas rojas contra *V. parahaemolyticus* se han reportado distintos halos de inhibición, lo es el caso de extractos de metanol y acetona de *G. vermiculophylla* en donde se observaron halos de 3.24 ± 1.23 mm y 3.17 ± 0.55 mm respectivamente (Amarillas *et al.*, 2016), así mismo, se reportó un halo inhibitorio de 13.6 ± 0.50 mm con extracto etanólico de otra especie de macroalga roja *Hypnea musciformes* (Silva *et al.*, 2013).

Por otra parte, Manilal y colaboradores (2009), evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de 15 especies de macroalgas rojas de la India, contra diversas bacterias (cepas clínicas y no clínicas), entre ellas *V. parahaemolyticus*, cepa para la cual solo 4 especies de macroalgas mostraron actividad antibacteriana considerable, *Asparagopsis taxiformis* produjo un halo inhibitorio de

22.00 ± 1.60 mm, *Laurencia brandenii* de 16.00 ± 1.60 mm, *Laurencia ceylanica* de 6.00 ± 1.70 mm y *Hypnea valentiae* de 5.00 ± 1.80 mm siendo la que mostró un halo más pequeño.

Otro género bacteriano probado ha sido *V. alginolyticus*, el cual fue evaluado con extracto etanólico de *G. salicornia* obteniendo un halo de 6.00 mm (Vijayavel y Martinez, 2010).

También se han desarrollado investigaciones con especies de macroalgas rojas contra bacterias del género *Vibrio* patógenas de peces, incluyendo a *V. parahaemolyticus*. Fatima y colaboradores (2016), probaron extractos de la macroalga *Portieria hornemannii* contra *V. parahaemolyticus*, resultando el extracto metanólico el más efectivo con una zona de inhibición de 15.00 mm, la misma zona de inhibición fue reportada para extracto cloroformo/metanol de *Gracilariopsis longissima* contra *V. alginolyticus* y *V. vulnificus* (Cavallo *et al.*, 2013).

En investigaciones reportadas para macroalgas verdes, se han observado halos de inhibición menores a los reportados en este estudio, tal es el caso de extractos etanólicos *U. fasciata*, contra *V. parahaemolyticus* (7.90 ± 0.30 mm) (Silva *et al.*, 2013) y contra *V. alginolyticus* (10.00 mm) (Vijayavel y Martinez, 2010), también para el extracto de acetato de etilo de la misma especie de macroalgas contra *V. harveyi* (12.30 mm) (Sivakumar *et al.*, 2014). De la misma forma, se ha reportado la actividad antibacteriana de macroalgas verdes en cepas patógenas de peces, lo cual es el caso de extractos cloroformo/metanol de *Chaetomorpha linum* que fue probado para *V. vulnificus* obteniendo un halo de inhibición de 13 mm y de *Cladophora rupestris* para la misma cepa con una zona de inhibición de 9 mm (Cavallo *et al.*, 2013).

Con lo anterior se puede notar que las especies de las macroalgas poseen distinta actividad antibacteriana, diversos estudios demuestran que las especies pertenecientes a la familia de las macroalgas rojas poseen destacadas propiedades antibacterianas en comparación a las algas verdes y pardas. Otros factores que influyen en la actividad antibacteriana de las macroalgas, tanto rojas, verdes como pardas, son la estación del año que fueron recolectadas (Hornsey y Hide, 1974) y el método de extracción y el solvente utilizado (Tuney *et al.*, 2006).

En el presente estudio se vio reflejado lo anteriormente mencionado, ya que en el experimento *in vivo* la macroalga más eficaz fue *G. vermiculophylla*, los organismos tratados con dieta que

contenía extracto de esta macroalga tuvieron una sobrevivencia del 67% y los organismos alimentados con dieta con que contenía extracto de *U. flexuosa* tuvieron el 60%, lo cual fue el doble a comparación de los organismos sobrevivientes del control positivo (30%) 24 horas post infección, esto concuerda con investigaciones realizadas con diferentes extractos de macroalgas y bacterias, lo es el caso de un estudio donde evaluaron la actividad antibacteriana de extracto etanólico de *C. antennina* vía inmersión en *P. monodon* infectado intramuscularmente con *V. parahaemolyticus*, observaron una sobrevivencia del 90% en organismos tratados y tan solo el 10% en los que no fueron tratados con extracto de macroalga, y concluyeron que *C. antennina* se puede usar para tratar la infección bacteriana en los camarones como una alternativa al uso de antibióticos comerciales (Thanigaivel *et al.*, 2014). También se ha demostrado que los extractos algales son prometedores para la larvicultura del camarón ya que en un estudio el extracto de acetato de etilo de *U. fasciata* redujo la mortalidad en postlarvas de *P. monodon* infectadas con *V. harveyi* (Sivakumar *et al.*, 2014).

Por otro lado, las algas marinas también se han probado como tratamientos profilácticos para camarón contra bacterias del género *Vibrio*, la macroalga *U. fasciata* se probó en camarones *P. monodon*, los cuales fueron alimentados por un periodo de tiempo con dieta que contenía extracto de la misma y después fueron infectados, presentando una sobrevivencia significativa (Selvin *et al.*, 2011), asimismo se probó una dieta que contenía extracto de *Asparagopsis sp* durante 4 semanas y posteriormente infectaron a los organismos (*P. monodon*), y postinfección siguieron alimentándolos de la misma forma, este alimento tuvo un amplio potencial terapéutico, ya que controló la vibriosis (Manilal *et al.*, 2012). Cabe mencionar que las bacterias probadas en los estudios antes mencionados no causan AHPND.

Los extractos algales no solo se han probado para contrarrestar enfermedades bacterianas de camarón, sino también se han realizado investigaciones para combatir enfermedades causadas por bacterias en peces, en especial en tilapia (*O. mossambicus*), en ensayos *in vivo* se han probado extractos de *G. folifera* y *Portieria hornemannii* contra *A. salmonicida* y *V. parahaemolyticus* respectivamente, en ambos estudios se tuvieron resultados favorables (Thanigaivel *et al.*, 2015; Fatima *et al.*, 2016).

Otros estudios demuestran que los extractos de macroalgas actúan como inmunoestimulantes, en camarón se ha comprobado el aumento en la capacidad inmunitaria, ya que se ha observado la estimulación en parámetros de defensa celular y humoral, además disminuye la mortalidad en organismos cuando son expuesto a vibrios (Hou y Chen, 2005; Fu *et al.*, 2007; Yeh y Chen, 2009; Yeh *et al.*, 2010; Kanjana *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2014).

Algunas de las investigaciones anteriormente mencionadas sugieren que la preparación de alimentos que contengan bioactivos provenientes de las macroalgas, pueden aplicarse en campo a gran escala, además es un enfoque rentable y ecológico para el manejo de enfermedades en la acuicultura (Thanigaivel *et al.*, 2015; Fatima *et al.*, 2016).

En el ensayo *in vivo* del presente estudio, los organismos fueron infectados con *V. parahaemolyticus* causante de AHPND, los organismos del control positivo mostraron alteraciones en comportamiento y coloración después de 1 hora de la infección, presentaron opacidad muscular, nado decúbiteo, enrojecimiento en urópodos y antenas, acalambamiento, nado errático, letargia al fondo del acuario y tenían intestino pálido, estos signos clínicos son característicos de la patología y fueron descritos por Tran y colaboradores (2013) y Pantoja y Lightner (2014). En cambio, los organismos que recibieron tratamiento de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* mostraron signos clínicos como movimiento de los ojos, acalambamiento, nado errático, enrojecimiento de urópodos y nado decúbiteo 2 horas después de la infección.

A los organismos sobrevivientes después del reto bacteriano, se les realizó un análisis histopatológico para revisar alteraciones en órganos y tejidos. El hepatopáncreas es considerado el órgano blanco de la enfermedad, ya que AHPND causa desprendimientos de las células E, F, B y R de los túbulos del hepatopáncreas y atrofia de los túbulos. El avance de las lesiones se desarrolla de la zona proximal de los túbulos del hepatopáncreas y avanzan hacia las zonas distales (Tran *et al.*, 2013; Pantoja y Lightner, 2014; Nunan *et al.*, 2014), estos daños fueron observados en los organismos del control positivo, a diferencia de los organismos tratados con ambos extractos de las macroalgas en donde no se observaron alteraciones, lo cual sugiere que los extractos acuosos de las macroalgas *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* tienen un efecto antibacteriano sobre *V. parahaemolyticus* tanto *in vitro* como *in vivo*. En un estudio de Thanigaivel y colaboradores (2014),

también se reportó ausencia de daños y/o alteraciones en hepatopáncreas, branquias y musculo de camarones tratados con extracto etanólico de *C. antennina* infectados con *V. parahaemolyticus* (sin plásmido toxígeno).

Otro órgano analizado en este estudio fue la glándula antenal, es un órgano renal que se encuentra en el cefalotórax y está conformado por túbulos ramificados (llamado laberinto) (Bell y Lightner 1988). Este órgano está involucrado en el control del volumen de la hemolinfa, la regulación iónica y osmótica, la excreción de compuestos orgánicos y la reabsorción de fluidos, azúcares y aminoácidos del filtrado primario de orina (Riegel y Cook, 1975; Mantel y Farmer, 1983; Lin *et al.*, 2000; Fregoso-López *et al.*, 2018). Los organismos tratados con las macroalgas no presentaron alteraciones en el órgano, solo se observó infiltración de hemolinfa con hemocitos lo cual es una respuesta normal del sistema inmunológico. En cambio, los organismos del control positivo si presentaron alteraciones como atrofia de los túbulos e infiltración severa de hemocitos y hemolinfa lo cual concuerda con la investigación de Peña-Navarro y Varela-Mejías (2015) que describieron daños histológicos en *P. vannamei* infectado con *V. parahaemolyticus* en la glándula antenal como nódulos hemocíticos en el laberinto y en la región del celomosaco e infiltración hemocítica difusa, también para la enfermedad bacteriana Necrosis Hepatopancreática Séptica causada por *Vibrios* se describieron alteraciones como infiltración de hemocitos y la formación de nódulos hemocíticos con colonias bacterianas (Morales-Covarrubias *et al.*, 2018).

Además de la glándula antenal, las branquias son el tejido en donde principalmente se logra la regulación osmótica e iónica de los crustáceos. Entre sus funciones está el intercambio de gases, el transporte de iones, y una de las funciones fisiológicas más importantes es la osmorregulación, la homeostasis y la regulación extracelular del pH (Freire *et al.*, 2008). Además, este tejido juega un papel sumamente importante en el sistema de defensa del camarón (Burgents *et al.*, 2005). En el análisis histológico del presente estudio, no se observaron alteraciones en las branquias de los organismos tratados con macroalgas, a diferencia de los organismos del control positivo en los cuales se observó infiltración severa de hemolinfa y hemocitos y perdida de la estructura normal, debido a la infección con *V. parahaemolyticus*, esto indica que los extractos acuosos de las macroalgas tuvieron eficacia antibacteriana, ya que Burgents y colaboradores (2005), en su investigación observaron que las branquias son sitios en donde se adhieren las bacterias vivas, de

acuerdo a sus observaciones sugieren que las bacterias se adhieren primero a las branquias, y más tarde los hemocitos se adhieren a las bacterias, posiblemente formando nódulos y fagocitando las bacterias.

El intestino de los camarones está conformado por un epitelio mucoso y está formado por células columnares que están sostenidas por una membrana y una capa de músculos. Las bacterias que contienen toxinas (por ejemplo *V. parahaemolyticus* causante de AHPND), así como sustancias tóxicas que se ingieren, pueden producir enzimas que degradan la membrana y secretan productos químicos que pasan a través de estas capas, provocando daños en las células intestinales e inflamación hemocítica en el intestino (Fregoso, 2015). Lo anterior coincide con lo que se observó en los organismos del control positivo, ya que presentaron células con núcleos picnóticos en el epitelio columnar, infiltración severa de hemolinfa con hemocitos e inflamación del intestino. Caso contrario para los organismos tratados con los extractos acuosos de las macroalgas en los cuales se observó la estructura normal del epitelio columnar e infiltración de hemolinfa con hemocitos normal, esto indica que la bacteria *V. parahaemolyticus* no causó daños en estos organismos gracias a la dieta con adición de extractos acuosos de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa*.

También se realizó el conteo total y diferencia de hemocitos (CTH, CDH) al ser un parámetro inmunitario ampliamente estudiado en camarones, debido a que pueden usarse como marcadores de salud porque sus cambios están correlacionados con el estado infeccioso (Zhang *et al.*, 2009).

Se han reportado diferentes CTH, para camarón, en los controles negativos se han observado para *Penaeus monodon*  $12 \times 10^6$  cel/mL (Kanjana *et al.*, 2011) y para *Penaeus vannamei*  $7.91 \times 10^6$  cel/mL (Magallón, 2004),  $12 \times 10^6$  cel/mL (Hou y Chen, 2005),  $15 \times 10^6$  cel/mL (Fu *et al.*, 2007),  $12.5 \times 10^6$  cel/mL (Yeh y Chen, 2009),  $14 \times 10^6$  cel/mL (Yeh *et al.*, 2010),  $3-5 \times 10^6$  cel/mL (Campa-Córdova, *et al.*, 2010),  $4 \times 10^6$  cel/mL (Peña-Navarro *et al.*, 2013),  $28.5 \times 10^6$  cel/mL (Luna-González *et al.*, 2013) y  $7.9 \times 10^6$  cel/mL (Tello, 2018), en este trabajo se obtuvo un CTH de  $6.95 \times 10^6$  cel/mL en el control negativo. Estas diferencias se deben a que en los crustáceos los valores de referencia en los conteos de hemocitos son muy variables, ya que están influenciados por condiciones propias del camarón (muda, sexo, y edad) y del medio de cultivo (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, etc.) (Barracco *et al.*, 2008).

Se observó una pequeña disminución del CTH en los organismos tratados con macroalgas, y variación en las diferentes poblaciones de hemocitos, sin embargo, en los organismos del control positivo se observó una disminución significativa en el CTH. Esto se debe a la respuesta inmunológica celular del camarón, los hemocitos migran para eliminar a la bacteria de su organismo, una variación similar del CTH y CDH se ha observado en otros estudios (Flores, 2006; Yeh y Chen 2009; Yeh *et al.*, 2010; Peña-Navarro *et al.*, 2013). Los hemocitos disminuyen y las poblaciones cambian porque tienen la función de coagular, fagocitar, encapsular y activar el sistema profenoloxidasa (proPO) ante algún agente etiológico (Le Moullac *et al.*, 1997). La comprensión de estas reacciones inmuno celulares depende de su identificación y caracterización, se constituyen por tres tipos, los hemocitos hialinos, los cuales están relacionados con los mecanismos de coagulación y se cree que son las principales células fagocitarias; los hemocitos semi-granulares que se consideran como formas intermedias, que luego de su maduración se transforman en hemocitos granulares, en cuanto a la función de estos últimos, se relaciona principalmente con la fagocitosis de microorganismos, la formación de cápsulas y nódulos y también con la producción de moléculas tóxicas y microbicidas (Barracco *et al.*, 2008).

Investigaciones sugieren que algunos compuestos antioxidantes pueden ser los principales responsables de las propiedades antibacterianas de las especies de algas marinas (Rajauria *et al.*, 2012; Patra *et al.*, 2015), en los que, generalmente la actividad antibacteriana ha sido atribuida a compuestos como ácidos grasos, ácido ascórbico, ácidos carboxílicos y en su mayoría a los polifenoles (Manilal *et al.*, 2009; Vijayavel y Martinez, 2010; Sivakumar *et al.*, 2014; Fatima *et al.*, 2016). Los compuestos fenólicos han sido reportados comúnmente en las macroalgas (Rajauria *et al.*, 2012). Estos compuestos son reconocidos por tener por tener diversas actividades biológicas, incluyendo la actividad antibacteriana y antioxidante.

En el presente estudio, el extracto acuoso de *G. vermiculophylla* mostró un contenido total de compuestos fenólicos o CTF de  $10.58 \pm 2.31$  mg EAG/g y fue mayor al reportado por Osuna-Ruiz y colaboradores (2016), para un extracto hexánico ( $2.94 \pm 0.091$  mg EAG/g) de la misma especie, así como para un extracto etanólico de *G. folifera* (5.2 mg EAG/g) (Thanigaivel *et al.*, 2015), por el contrario, en el caso del extracto analizado en este estudio, el contenido de polifenoles fue menor que el encontrado en un extracto etanólico de *G. salicornia* ( $14 \pm 1.1$  mg EAG/g) (Vijayavel y

Martinez, 2010). El extracto de acuoso de *U. flexuosa* tuvo un CTF de  $4.78 \pm 0.67$  mg EAG/g y fue mayor reportado por Farasat y colaboradores (2014), en extracto metanólico de la misma especie ( $2.67 \pm 0.22$  mg EAG/g). Lo que revela la relación que existe en la composición de los extractos evaluados y el tipo de solvente empleado para su obtención. Respecto de la diferencia entre especies, debido a que nos existen reportes similares para extractos de *U. flexuosa*, si consideramos otras especies de macroalgas verdes, se han reportado valores de CTF más elevados cuando se emplea metanol y etanol en la obtención de extractos, tales como *U. fasciata* y *C. antennina* con  $21 \pm 1.3$  y  $180 \pm 0.01$  mg EAG/g, respectivamente (Vijayavel y Martinez, 2010), lo que explicaría en parte el bajo contenido de polifenoles totales encontrados en nuestro extracto obtenido empleado agua como solvente.

De los compuestos polifenólicos, los flavonoides han sido mencionados como compuestos de importancia biológica, por que ejercen efectos beneficiosos para la salud a través de sus propiedades antioxidantes (Osuna-Ruiz *et al.*, 2019), mediante la eliminación de los radicales libres, la elevación de los antioxidantes endógenos, el rompimiento de las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica y además ejercen acciones moduladoras en las células a través de acciones en las vías de señalización (Tsao, 2010; Rajauria *et al.*, 2012). El contenido total de flavonoides (CF) determinado para el extracto acuoso de *G. vermiculophylla* ( $10.32 \pm 0.73$  mg EQ/g) resultó menor que los reportados en un estudio realizado a diferentes extractos de esta macroalga con otros solventes tales como hexano, acetona y metanol de los cuales se obtuvieron diferentes CF:  $12.1 \pm 0.4$ ,  $14.4 \pm 0.2$  y  $10.8 \pm 0.1$  mg EQ/g respectivamente (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016), pero el contenido en el extracto acuoso evaluado en nuestro estudio, fue mayor al reportado para un extracto etanólico de *G. folifera* (9.3 mg EQ/g) (Thanigaivel *et al.*, 2015). En el caso del extracto acuoso de *U. flexuosa* ( $32.07 \pm 0.99$  mg EQ/g) fue mayor al reportado por Farasat *et al.* (2014) para extracto metanólicos de esta misma especie ( $9.46 \pm 1.56$  EQ/g), y menor al exhibido por extracto etanólico de *C. antennina* (CF =  $79.6 \pm 0.01$  mg QE/g) (Thanigaivel *et al.*, 2014). Lo cual una vez más, demuestra la influencia que tiene el solvente utilizado en la presencia de dichos compuestos. Lo que, como consecuencia, puede influir en la actividad biológica exhibida por los extractos, particularmente la actividad antioxidante. En este sentido, las variaciones observadas en este estudio, se encuentran influenciadas por las condiciones de análisis (radical y técnica empleada) y de la naturaleza de la muestra, así como de los solventes y técnicas empleadas para la extracción

de los compuestos naturales (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016 y 2019). Así mismo, la extracción y composición de compuestos fenólicos provenientes de macroalgas se encuentran fuertemente influenciadas por el método de extracción empleado y el tamaño de partícula de la muestra, así como de las sustancias interferentes (Thanigaivel *et al.*, 2014).

Un componente algal de alta solubilidad en agua caliente y al que se le atribuyen distintas actividades biológicas, son los polisacáridos sulfatados, se ha observado que el nivel de sulfatación en estos compuestos, el contenido de ácidos urónicos y la conformación del polisacárido tienen una influencia significativa sobre el tipo de bioactividad y su eficiencia como agente bioactivo (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016). Es por ello que se determinó el contenido de ácidos urónicos y el contenido de sulfatos en los extractos acuosos empleados en el presente estudio. Para el extracto acuoso de *G. vermiculophylla* no se encontraron ácidos urónicos presentes en los polisacáridos del extracto, pero si se detectaron sulfatos en un 10.22 %, en cambio para *U. flexuosa* el contenido de urónicos y sulfatos fue de 0.13 % y 12.30 %, respectivamente. En un estudio realizado para extractos de polisacáridos solubles en agua caliente y precipitados con etanol de *G. vermiculophylla* y *U. expansa* encontraron presencia de urónicos (9.6 y 13.4 %, respectivamente), así como niveles de sulfatación distintos que los encontrados en este estudio (1%, para *G. vermiculophylla*; y 14.9 % para *U. expansa*) (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016). La composición de los polisacáridos sulfatados en algas marinas, intra e inter especie, también se ve influenciada por diferentes factores, como la localización geográfica, la temporada de recolección, la calidad del agua de mar (disponibilidad de nutrientes especialmente sulfatos) y los procesos de extracción (Rioux *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014), lo que pudiera atribuirse a las variaciones encontradas en nuestro estudio entre ambos extractos y las diferencias en comparación con las mismas especies reportadas en otros estudios.

La actividad antioxidante de los extractos acuosos de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* los resultados obtenidos fueron muy similares entre las dos especies de macroalgas para la reducción del radical ABTS por cada mg de extracto seco, para *G. vermiculophylla* fue de  $21.73 \pm 11.59$  TEAC y para *U. flexuosa*  $21.59 \pm 15.22$  TEAC, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). De la misma forma los resultados obtenidos para FRAP indicaron que *G. vermiculophylla* ( $46.78 \pm 5.21$  TEAC) tiene similar poder reductor que *U. flexuosa* ( $44.17 \pm 2.42$  TEAC), esto concuerda con el estudio de Costa y colaboradores (2010), ellos también encontraron

mayor poder reductor en la macroalga roja *G. caudata* con respecto a *C. isthmocladum* una macroalga verde. Sin embargo, estos resultados son diferentes a los encontrados por Kelman y colaboradores (2012), en extractos metanólicos de varias especies de macroalgas verdes y rojas, en donde ellos observaron que los valores obtenidos de FRAP para las macroalgas verdes fueron mayores a los observados para las especies de macroalgas rojas, esto se debe a que la actividad antioxidante de los extractos naturales está asociada principalmente con los polifenoles, flavonoides y carotenoides (Farasat *et al.* 2014; Osuna-Ruiz *et al.*, 2019). Los polifenoles naturalmente son hidrófilos, por lo que los polifenoles libres como aglicones, glucósidos y oligómeros, se extraen fácilmente con agua o con solventes orgánicos polares como el metanol, etanol, acetona o sus mezclas con agua. Pero dependiendo de la solubilidad de las características químicas de los polifenoles objetivo debe seleccionarse el disolvente para extracción (Tsao, 2010; Osuna-Ruiz *et al.*, 2019), por lo que el comportamiento biológico y composicional de los extractos evaluados en este estudio, están íntimamente relacionados con la técnica de extracción empelada.

En este estudio también se realizó la determinación de metales pesados debido al ambiente en donde están expuestas las macroalgas y por su capacidad de acumular y tolerar metales pesados, además los extractos algales se incorporaron a la dieta de *P. vannamei*. Se determinó Hg, Cd, Pb y As a los extractos acuosos, en el de *G. vermiculophylla* se detectó 0.01082 mg/Kg de Hg y 0.02609 mg/Kg de As, Cd y Pb no se detectaron, para *U. flexuosa* se detectó 0.00297 (Hg), 0.00115 (Cd), 0.00567 (Pb) y 0.02437 (As) mg/Kg. Esta distribución de metales pesados es similar a la reportada para extractos etanólicos de *Ascophyllum nodosum*, *U. lactuca* y *Saccharina longicurris*, es decir, el metal pesado más abundante en estas tres macroalgas fue el As (8.57, 7.65 y 6.01 µg/G, respectivamente), seguido por el Pb (0.57, 13.80 y 2.46 µg/G, respectivamente), Cd (0.05, 0.20 y 0.04 µg/G, respectivamente) y en menor cantidad Hg (<0.01, 0.05 y 0.01 µg/G, respectivamente) (Boisvert *et al.*, 2015). Los contenidos de estos metales son variantes, ya que dependen de la especie y la etapa de desarrollo de las macroalgas, además de las variaciones ambientales como la concentración de metales pesados en el agua y la interacción entre metales y salinidad y/o pH (Frikha *et al.*, 2011). En este estudio los resultados obtenidos de metales pesados fueron comparados con los máximos permisibles de la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca, frescos, refrigerados, congelados y procesados (Cuadro 5) y con el contenido máximo de metales pesados en productos alimenticios del

Reglamento (CE) no 333/2007 de la Comisión de la Unión Europea (Cuadro 6), los resultados obtenidos para las dos macroalgas están por debajo de los máximos permisibles de las dos normas, cabe mencionar que se hizo esta comparación ya que no existe una norma específica para macroalgas.

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que los extractos acuosos de las macroalgas *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa* son eficaces contra *V. parahaemolyticus* en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

*G. vermiculophylla* presentó un halo de inhibición de  $18.00 \pm 0.58$  mm. Los organismos tratados con esta macroalga presentaron alteraciones histológicas en hepatopáncreas con presencia de estructuras vermiformes en el lumen del túbulo e infiltración de hemolinfa y hemocitos en tejido conectivo intertubular y en glándula antenal con células picnóticas e infiltración de hemolinfa con hemocitos. En branquias e intestino solo hubo migración de la respuesta hemocitaria. Así mismo presentaron variaciones en las poblaciones hemocitarias, siendo mayores los hemocitos semi-granulares (33%), seguido de los granulares y de los hialinos (23%) con poblaciones equilibradas, y tuvieron una sobrevivencia del 67%.

A diferencia de *U. flexuosa* que tuvo un halo de inhibición de  $14.00 \pm 0.29$  mm, en los organismos tratados con esta macroalga se observaron alteraciones histológicas especialmente en hepatopáncreas con túbulos con desprendimiento celular e infiltración de hemolinfa y hemocitos en tejido conectivo intertubular, en glándula antenal con infiltración de hemolinfa y hemocitos con formación de un nódulo hemocítico y en intestino con núcleos picnóticos en el epitelio columnar e infiltración severa de hemolinfa en tejido conectivo con migración de hemocitos al epitelio columnar. Las poblaciones hemocitarias fueron mayores en los hemocitos semi-granulares y granulares (29%) con poblaciones iguales, y menores en hemocitos hialinos (19%). Al final del desafío presentaron una sobrevivencia del 60%.

## 9. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere ampliar esta investigación, analizando la capacidad antioxidante de las macroalgas para utilizarse como fortificadores del sistema inmunológico en camarón.

Se recomienda caracterizar el compuesto con actividad antibacteriana de los extractos acuosos de *G. vermiculophylla* y *U. flexuosa*.

También se sugiere probar las propiedades antibacterianas de otras especies de macroalgas que se distribuyen en México especialmente en las costas de Sinaloa, para incrementar el conocimiento y para su aplicación en la acuicultura como posibles alternativas a los antibióticos comerciales.

## 10. REFERENCIAS

- Amarillas, P. S. O., Baeza, A. M., Vega, M. E. R., Miranda, E. E., Bedoya, D. G. y Valdez, R. B. 2016. Composición química y actividad antimicrobiana de extractos de macroalga *Gracilaria vermiculophylla* sobre *Vibrio parahaemolyticus*. *Biotecnia*. 18(2): 27-31.
- Barraco, M.A., Perazzolo, L.M. y Rosa, R. D. 2008. Inmunología del Camarón. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, República de Panamá, 169-211 pp.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*. 45(4): 493-496.
- Belattmania, Z., Engelen, A. H., Pereira, H., Serrão, E. A., Barakate, M., Elatouani, S., Zrid, R., Bentiss, F., Chahboun, N., Reani, A. y Sabour, B. 2016. Potential uses of the brown seaweed *Cystoseira humilis* biomass: 2-Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities. *J. Mater. Environ. Sci*. 7(6): 2074-2081.
- Bell, T.A. y Lightner, D.V. 1988 A handbook of normal penaeid shrimp histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Luisiana.
- Benzie, I. F. 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.
- Bitter, T. y Muir, H. M. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical biochemistry*. 4:330-334.
- Boisvert, C., Beaulieu, L., Bonnet, C. y Pelletier, É. 2015. Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of three species of edible seaweeds. *Journal of Food Biochemistry*. 39(4): 377-387.
- Brasseur, L., Hennebert, E., Fievez, L., Caulier, G., Bureau, F., Tafforeau, L., Flammang, P., Gerbaux, P. y Eeckhaut, I. 2017. The roles of spinochromes in four shallow water tropical sea urchins and their potential as bioactive pharmacological agents. *Marine drugs*. 15(6): 179.
- Burgents, J. E., Burnett, L. E., Stabb, E. V. y Burnett, K. G. 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*. 29(8): 681-691.
- Campa-Córdova, A., Hernández-Salmerón, A., Ascencio-Valle, F. y Aguirre-Guzmán, G. 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 8-10 de noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 567-587 pp.

- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A. y Prinsep, M.R. 2019 Marine natural products. *Natural Products Reports* 36:122-173.
- Castro, R., Piazzon, M. C., Zarra, I., Leiro, J., Noya, M. y Lamas, J. 2006. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture*. 254: 9-20.
- Cavallo, R., Acquaviva, M., Stabili, L., Cecere, E., Petrocelli, A. y Narracci, M. 2013. Antibacterial activity of marine macroalgae against fish pathogenic *Vibrio* species. *Open Life Sciences*. 8(7): 646-653.
- Chand, S. y Karuso, P. 2017. Isolation and total synthesis of two novel metabolites from the fissurellid mollusc *Scutus antipodes*. *Tetrahedron Letters*. 58(10): 1020-1023.
- Chen, Y. Y., Chen, J. C., Lin, Y. C., Yeh, S. T., Chao, K. P. y Lee, C. S. 2014. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received *Petalonia binghamiae* extract activate immunity, increase immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Aquaculture Research & Development*. 5(6): 268.
- Chojnacka, K., Saeid, A., Witkowska, Z. y Tuhy, L. 2012. Biologically active compounds in seaweed extracts-the prospects for the application. In *The open conference proceedings journal*. 3(1): 20-28.
- Costa, L. S., Fidelis, G. P., Cordeiro, S. L., Oliveira, R. M., Sabry, D. A., Câmara, R. B. G., Nobre, L.T.D.B, Costa, M.S.S.P., Almeida-Lima, J., Farias, E.H.C., Leite, E.L. y Rocha, H.A.O. 2010. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 64(1): 21-28.
- Cuéllar-Anjel, J., Lara, C., Morales, V., De Gracia, A. y García Suárez, O. 2010. Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*. OIRSA-OSPESCA, C.A. Primera edición. Panamá. 132 pp.
- De Almeida, C. L. F., Falcão, H. S., Lima, G. R. M., Montenegro, C. A., Lira, N. S., Athayde-Filho, P. F., Rodrigues, L. C., V. de Souza, M.F., Barbosa-Filho, J. M. y Batista, L. M. 2011. Bioactivities from marine algae of the genus *Gracilaria*. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(7): 4550-4573.
- De La Peña, L. D., Cabillon, N. A. R., Cathedral, D. D., Amar, E. C., Usero, R. C., Monotilla, W. D., Calpe, A.T., Fernandez, D. D. y Saloma, C. P. 2015. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms*. 116(3): 251-254.
- Diario Oficial de la Unión Europea. 2007. Reglamento (CE) n° 333/2007 de la Comisión, de 28 de marzo de 2007, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios. *Diario Oficial* n° L 88 de 29/3/2007 p. 29. Recuperado de <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:088:0029:0038:ES:PDF>
- Dodgson, K. S. y Price, R. G. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*. 84(1): 106.

- DOF. 2011. Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. México. 10 de febrero de 2011.
- Engel, S., Puglisi, M. P., Jensen, P. R. y Fenical, W. 2006. Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology*. 149(5): 991-1002.
- Eom, S. H., Kim, Y. M. y Kim, S. K. 2012. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology*. 50(9): 3251-3255.
- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 233 pp.
- Farasat, M., Khavari-Nejad, R. A., Nabavi, S. M. B. y Namjooyan, F. 2014. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 13(1): 163.
- Fatima, M. R., Dinesh, S., Mekata, T., Itami, T. y Sudhakaran, R. 2016. Therapeutic efficiency of *Portieria hornemannii* (Rhodophyta) against *Vibrio parahaemolyticus* in experimentally infected *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*. 450, 369-374.
- Freire, C. A., Onken, H. y McNamara, J. C. 2008. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 151(3): 272-304.
- Flegel, T. W. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of invertebrate patholog*. 110(2): 166-173.
- Flores, L.C. (2017). Capacidad antioxidante de polisacáridos sulfatados de macroalgas de Sinaloa (tesis de maestría). Universidad Politécnica de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa.
- Flores, L. L. (2006). Evaluación de pigmentos carotenoides como aditivos alimentarios para la prevención de infecciones producidas por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi* en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.
- Fregoso, L. M. G. (2015). Deterioro de la calidad del agua y su relación con la presencia de enfermedades en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*): efecto del incremento de la concentración de compuestos nitrogenados en agua de baja salinidad (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, Sinaloa.
- Fregoso-López, M. G., Morales-Covarrubias, M. S., Franco-Nava, M. A., Ponce-Palafox, J. T., Fierro-Sañudo, J. F., Ramírez-Rochín, J. y Páez-Osuna, F. 2018. Effect of Nitrogen Compounds on Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Histological Alterations of the Antennal Gland. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 100(6): 772-777.
- Frikha, F., Kammoun, M., Hammami, N., Mchirgui, R. A., Belbahri, L., Gargouri, Y., Miled, N. y Ben-Rebah, F. 2011. Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Túnez. *Ciencias marinas*. 37(2): 113-124.

- Fu, Y. W., Hou, W. Y., Yeh, S. T., Li, C. H. y Chen, J. C. 2007. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*. 22(6): 673-685.
- Gómez, O. E. (2013). Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios *in vitro* e *in vivo* (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Gullian, M., Thompson, F. y Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233: 1-14.
- Han, J. E., Tang, K. F. y Lightner, D. V. 2015. Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Diseases of aquatic organisms*. 115(3): 245-251.
- Hornsey, I. S. y Hide, D. 1974. The production of antimicrobial compounds by British marine algae I. Antibiotic-producing marine algae. *British Phycological Journal*. 9(4): 353-361.
- Hou, W. Y. y Chen, J. C. 2005. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 19(2): 127-138.
- Janarthanan, M. y Senthil Kumar, M. 2018. The properties of bioactive substances obtained from seaweeds and their applications in textile industries. *Journal of Industrial Textiles*. 48(1): 361-401.
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B. y Wongprasert, K. 2011. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & shellfish immunology*. 30(1): 389-396.
- Kelman, D., Posner, E. K., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R. y Wright, A. D. 2012. Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Marine Drugs*. 10(2): 403-416.
- Keyrouz, R., Abasq, M. L., Le Bourvellec, C., Blanc, N., Audibert, L., ArGall, E. y Hauchard, D. 2011. Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food chemistry*. 126(3): 831-836.
- Kotoku, N., Ishida, R., Matsumoto, H., Arai, M., Toda, K., Setiawan, A., Muraoka, O. y Kobayashi, M. 2017. Biakamides A–D, unique polyketides from a marine sponge, act as selective growth inhibitors of tumor cells adapted to nutrient starvation. *The Journal of organic chemistry*. 82(3): 1705-1718.
- Le Moullac, G, Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S. y Levy, P. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*. 7(4): 227-234.
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C.Y., Lin, S.S., Lightner, D. V., Wang, H. C., Wang, A. J., Wang, H. G., Hor, L. I. y Lo, C. F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(34): 10798-10803.

- Lee, W. K., Namasivayam, P. y Ho, C. L. 2014. Effects of sulfate starvation on agar polysaccharides of *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Morib, Malaysia. *Journal of applied phycology*. 26(4): 1791-1799.
- Lee, Y. S., Duh, T. H., Siao, S. S., Chang, R. C., Wang, S. K. y Duh, C. Y. 2017. New cytotoxic terpenoids from soft corals *Nephthea chabroli* and *Paralemnalia thyrsoides*. *Marine drugs*. 15(12): 392.
- León, A. D., Candelaria, S. C., Hernández, A. P. y León, T. H. 2012. Géneros de algas marinas tropicales de México. I Algas Verdes. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. Primera edición electrónica. México, D.F. 173 pp.
- León, A. D., López, G. N., Ponce, M. M., Núñez, R. M., Candelaria, S. C., Cruz, R. A. y Rodríguez, V.D. 2019. Géneros de algas marinas tropicales de México. Algas rojas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. Primera edición electrónica. Ciudad de México. 251 pp.
- León, A. D. y Núñez, R. M. 2017. Géneros de algas marinas tropicales de México: II. Algas pardas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. Primera edición electrónica. Ciudad de México. 78 pp.
- Li, P., Kinch, L. N., Ray, A., Dalia, A. B., Cong, Q., Nunan, L. M., Camilli A., Grishin N. V., Salomon, D. y Orth, K. 2017. Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires. *Applied and Environmental Microbiology*. 83(13): e00737-17.
- Li, Y. X., Wijesekara, I., Li, Y. y Kim, S. K. 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*. 46(12): 2219-2224.
- Lightner, D. V. 1996 A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Lightner, D. V. y Pantoja, C. 2001. Bioseguridad en el cultivo de camarones. En: M.C. Haws y C.E. Boyd (eds.). Métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica. UCA, Managua, 123-165 pp.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L. y Tran, L. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*. 15(1): 40.
- Lin, S. C., Liou, C. H. y Cheng, J. H. 2000. The role of the antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 127(2): 121-129.
- Luna-González, A., Moreno-Herrera, J. T., Campa-Córdova, Á. I., González-Ocampo, H. A., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruíz, P. y Bueno-Ibarra, M. A. 2013. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Latin american journal of aquatic research*. 41(5): 898-907.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M. A. y Aruoma, O. I. 2002. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(18): 5042-5047.

- Magallón, S.P. (2004). Evaluación de moléculas asociadas al sistema inmune, bajo condiciones de hipoxia en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931 (tesis de maestría). Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.
- Marigo, G. 1973. Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analisis*. 2(2): 106-110.
- Manilal, A., Selvin, J. y George, S. 2012. *In vivo* therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius. *Saudi journal of biological sciences*. 19(2): 165-175.
- Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Shakir, C., Gandhimathi, R. y Lipton, A. P. 2009. Antimicrobial potential and seasonality of red algae collected from the southwest coast of India tested against shrimp, human and phytopathogens. *Annals of Microbiology*. 59(2): 207-219.
- Mantel, L.H. y Farmer, L.L. 1983. Osmotic and ionic regulation. In: Mantel, L.H. (Ed.). *The Biology of the Crustacea. Internal Anatomy and Physiological Regulation*. Academic Press, New York, 53-161 pp.
- McDermott, P. F., Bodeis-Jones, S. M., Fritsche, T. R., Jones, R. N. y Walker, R. D. 2005. Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *Journal of clinical microbiology*. 43(12): 6136-6138.
- Morales-Covarrubias, M. S. 2010. Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas. Segunda edición. México. 130 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*. 31: 76-87.
- Morales-Covarrubias, M. S., García-Aguilar, N., Bolan-Mejía, M.D. y Puello-Cruz, A. C. 2016. Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Diseases of aquatic organisms*. 122(1): 57-65.
- Morales-Covarrubias, M. S., Ruiz-Luna, A., Moura-Lemos, A. P., Montiel, V. T. S. y Conroy, G. 2011. Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *FCV-LUZ*. 21(5): 434-446.
- Morales-Covarrubias, M. S., Tlahuel-Vargas, L., Martínez-Rodríguez, I. E., Lozano-Olvera, R. y Palacios-Arriaga, J. M. 2012. Necrotising hepatobacterium (NHPB) infection in *Penaeus vannamei* with florfenicol and oxytetracycline: a comparative experimental study. *FCV-LUZ*. 22(1): 72-80.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C. y Gomez-Jimenez, S. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*. 111(1): 81-86.
- Ochoa-Izaguirre, M. J., Aguilar-Rosas, R. y Aguilar-Rosas, L. E. 2007. Catálogo de macroalgas de las lagunas costeras de Sinaloa. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 117 pp.

- Ortega, M., Pantoja, J., de los Reyes, C. y Zubía, E. 2017. 5-Alkylresorcinol Derivatives from the Bryozoan Schizomavella mamillata: Isolation, Synthesis, and Antioxidant Activity. *Marine drugs*. 15(11): 344.
- Osuna, I. (2016). Caracterización Funcional y Bioquímica de las Principales Especies de Macroalgas de Sinaloa (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa.
- Osuna-Ruiz, I., López-Saiz, C. M., Burgos-Hernández, A., Velázquez, C., Nieves-Soto, M. y Hurtado-Oliva, M. A. 2016. Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. *Pharmaceutical biology*. 54(10): 2196-2210.
- Osuna-Ruiz, I., Salazar-Leyva, J. A., López-Saiz, C. M., Burgos-Hernández, A., Hernández-Garibay, E., Lizardi-Mendoza, J. y Hurtado-Oliva, M. A. 2019. Enhancing antioxidant and antimutagenic activity of the green seaweed *Rhizoclonium riparium* by bioassay-guided solvent partitioning. *Journal of Applied Phycology*. 1-11.
- Pantoja, C. y Lightner, D.V. 2014. EMS/AHPND descripción de la enfermedad en Asia y América. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. 2da ed. OIRSA (Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria), Panamá, República de Panamá, 172-177 pp.
- Patra, J., Das, G. y Baek, K. H. 2015. Chemical composition and antioxidant and antibacterial activities of an essential oil extracted from an edible seaweed, *Laminaria japonica* L. *Molecules*. 20(7): 12093-12113.
- Pava, C. N. R., Sanabria, A. G. Z. y Leal, L. C. S. 2017. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Nova*. 15(27): 119-129.
- Peña-Navarro, N. y Varela-Mejías, A. 2016. Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista de biología marina y oceanografía*. 51(3): 553-564.
- Peña-Navarro, N., Vargas-Cordero, R. y Varela-Mejías, A. 2013. Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana*. 24(1): 133-147.
- Peña-Navarro, N. y Varela-Mejías, A. 2015. Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana*. 26(1): 44-53.
- Pérez, M., Falqué, E. y Domínguez, H. 2016. Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine drugs*. 14(3): 52.
- Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, B. J. y Sobin, L.M. 1995. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Washington, D.C. 400 pp.
- Przygodzka, M., Zielińska, D., Ciesarová, Z., Kukurová, K. y Zieliński, H. 2014. Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. *LWT-Food Science and Technology*. 58:321-326.

- Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Gannam, N. y Gupta, S. 2012. Antimicrobial, antioxidant and free radical-scavenging capacity of brown seaweed *Himanthalia elongata* from western coast of Ireland. *Journal of Food Biochemistry*. 37(3): 322-335.
- Riegel, J.A. y Cook, M.A. 1975. Recent studies of excretion in Crustacea. In: Wessing, A. (Ed.), *Excretion*. Fortschritte der Zoologie 23. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany. 48-74 pp.
- Rioux, L. E., Turgeon, S. L. y Beaulieu, M. 2007. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate polymers*. 69(3): 530-537.
- Roque, A., Molina-Aja, A., Bolán-Mejía, C. y Gómez-Gil, B. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 17(5): 383-387.
- SAGARPA. 2018. Atlas Agroalimentario 2012 – 2018. SIAP. Primera edición. Ciudad de México. 222 pp.
- Santiago, M. L., Espinosa, A. y Bermúdez, M. D. C. 2009. Uso de antibióticos en la camaricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40(3): 22-32.
- Selvin, J., Manilal, A., Sujith, S., Seghal Kiran, G. y Premnath Lipton, A. 2011. Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 39(2): 197-204.
- Silva, G. C., Albuquerque-Costa, R., Oliveira-Peixoto, J. R., Pessoa-Nascimento, F. E., de Macedo-Carneiro, P. B. y Fernandes-Vieira, R. H. S. 2013. Tropical Atlantic marine macroalgae with bioactivity against virulent and antibiotic resistant *Vibrio*. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 41(1): 183-188.
- Sivakumar, K., Kannappan, S., Dineshkumar, M. y Patil, P. K. 2014. Evaluation of marine macro alga, *Ulva fasciata* against bio-luminescent causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8(8): 803-813.
- Sudaryono, A., Chilmawati, D. y Susilowati, T. 2018. Oral Administration of Hot-water Extract of Tropical Brown Seaweed, *Sargassum cristaefolium*, to Enhance Immune Response, Stress Tolerance, and Resistance of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 49(5): 877-888.
- Szöllösi, R. y Szöllösi V. I. 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biologica Szegediensis*. 46(3-4): 125-127.
- Tello, O.M.A. (2018) Actividad inmunoestimulante de nanopartículas de oro en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* contra *Vibrio parahaemolyticus* (tesis de maestría). Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.
- Thanigaivel, S., Hindu, S. V., Vijayakumar, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. y Thomas, J. 2015. Differential solvent extraction of two seaweeds and their efficacy in controlling *Aeromonas salmonicida* infection in *Oreochromis mossambicus*: a novel therapeutic approach. *Aquaculture*. 443: 56-64.
- Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. y Thomas, J. 2014. Antioxidant and antibacterial activity of *Chaetomorpha antennina* against shrimp pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 433: 467-475.

- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K. y Lightner, D. V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*. 105(1): 45-55.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2(12): 1231-1246.
- TÜney, İ., Cadirci, B. H., Ünal, D. y Sukatar, A. 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology*. 30(3): 171-175.
- Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A. y Moenne, A. 2011. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine drugs*. 9(12): 2514-2525.
- Vijayavel, K. y Martinez, J. A. 2010. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of two Hawaiian marine Limu: *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta). *Journal of medicinal food*. 13(6): 1494-1499.
- Wang, W., Kim, H., Patil, R. S., Giri, A. G., Won, D. H., Hahn, D., Sung, Y., Lee, J., Choi, H., Nam, S. J. y Kang, H. 2017. Cadiolides J–M, antibacterial polyphenyl butenolides from the Korean tunicate *Pseudodistoma antinboja*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 27(3): 574-577.
- Yeh, S. T. y Chen, J. C. 2009. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed earlier recovery in immunity after a *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish & shellfish immunology*. 26(5): 724-730.
- Yeh, S. T., Lin, Y. C., Huang, C. L. y Chen, J. C. 2010. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress. *Fish & shellfish immunology*. 28(5-6): 887-894.
- Zhang, L., Mai, K., Tan, B., Ai, Q., Qi, C., Xu, W., Zhang, W., Liufu, Z., Wang, X. y Ma, H. 2009. Effects of dietary administration of probiotic *Halomonas* sp. B12 on the intestinal microflora, immunological parameters, and midgut histological structure of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 40(1): 58-66.
- Zeraatpisheh, F., Firouzbakhsh, F. y Khalili, K. J. 2018. Effects of the macroalga *Sargassum angustifolium* hot water extract on hematological parameters and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Yersinia ruckeri*. *Journal of applied phycology*. 30(3): 2029-2037.
- Zerrifi, S., Khalloufi, F. E., Oudra, B. y Vasconcelos, V. 2018. Seaweed bioactive compounds against pathogens and microalgae: potential uses on pharmacology and harmful algae bloom control. *Marine drugs*. 16(2): 55.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Preparación de Agar Mueller Hinton con 2.5% de NaCl

#### **Materiales y reactivos:**

- Agua destilada
- Matraz con tapón de 1 L
- Probeta de 1 L
- Agitador magnético
- Placas Petri
- Agar Mueller Hinton
- NaCl
- Balanza (resolución 0.01 mg)
- Placa de calentamiento
- Autoclave (121 °C)

#### **Procedimiento:**

Para preparar 1 L de agar, se pesaron 38 g de polvo de agar Mueller Hinton, y 25 g de NaCl y se agregaron a un matraz con un litro de agua destilada, se colocó sobre la placa de calentamiento y con ayuda de la agitación se mezcló frecuentemente dejando hervir por 1 minuto, después se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. El agar se dejó enfriar para posteriormente verterlo a placas Petri hasta obtener un grosor aproximado de 4 mm, se mantuvo a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

## Anexo 2. Preparación de Agar Soya Trypticaseína (TSA) al 2.5% de NaCl

### **Materiales y reactivos:**

- Agua destilada
- Matraz con tapón de 1 L
- Probeta de 1 L
- Agitador magnético
- Placas Petri
- Agar Soya Trypticaseína (TSA)
- NaCl
- Balanza (resolución 0.01 mg)
- Placa de calentamiento
- Autoclave (121 °C)

### **Procedimiento:**

Para preparar 1 L de TSA con sal, se pesaron 40 g de polvo de agar de Soya Trypticaseína y 20 g de NaCl (ya que el TSA contiene 5% de sal), se agregaron a un matraz con un litro de agua destilada, se disolvió y se dejó remojar por 15 minutos, se calentó agitando frecuentemente durante 1 minuto para su dilución. Se esterilizo en la autoclave a 121 °C por 15 minutos, se dejó enfriar para después vaciarlo a placas Petri.

### Anexo 3. Método para la Preparación de Suspensión Bacteriana (Inóculo)

#### **Materiales y reactivos:**

- Agua destilada
- Matraz con tapón de 1 L
- Probeta de 1 L
- Matraz Erlenmeyer de 1 L
- Varilla de vidrio
- Tubo de ensayo estéril
- Tubos de centrifuga estériles
- Pipeta estéril
- Caldo Soya Trypticaseína (TSB) (BD Bioxon®)
- NaCl (GOLDEN BELL<sup>MR</sup>)
- Balanza (resolución 0.01 mg)
- Autoclave (121 °C)
- Incubadora (30 °C)
- Centrifuga (10,000 rpm)

#### **Procedimiento:**

Primeramente, se preparó el medio de cultivo TSB con sal, se pesaron 30 g de polvo de caldo de Soya Trypticaseína y 20 g de NaCl ya que el TSB contiene 5% de sal, y se agregaron al matraz que contenía un litro de agua destilada, se agitó con una varilla de vidrio para disolver bien los reactivos, una vez disueltos el caldo se colocó en la autoclave por 15 minutos a 121 °C y se dejó enfriar para su posterior uso.

Después se preparó solución salina al 2.5%, se pesaron 25 g de NaCl y se agregaron a un litro de agua destilada, la sal se disolvió con ayuda de una varilla de vidrio, posteriormente se metió a la autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Para la preparación de la suspensión bacteriana se inoculo un tubo con 10 mL de TSB con sal, se incubo por 24 horas a 30 °C, se puso el cultivo bacteriano en dos tubos de 5 mL de centrifuga estériles, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se tiró el sobrenadante, y se realizaron dos lavados de la siguiente manera, se adicionaron 5 mL de solución salina estéril en cada tubo, se resuspendió el paquete celular bacteriano y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se tiró el sobrenadante, una vez realizados los dos lavados se leyó a una absorbancia de 610 nm y una D.O. de 1.0, la suspensión bacteriana se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Todos los pasos se realizaron en condiciones de esterilidad.

## Anexo 4. Análisis Histológico

El análisis histológico se realizó con base a lo descrito por Bell y Lightner (1988) y Morales-Covarrubias (2010).

### **Materiales y reactivos:**

- Navaja de disección
- Pinzas de disección
- Guantes
- Jeringa de 3 mL
- Resina
- Parafina
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Uni-cassettes
- Agua destilada
- Hematoxilina
- Eosina
- Etanol 96 %, 80 %, 70 % y 50 %
- Formalina 100 %
- Acido acético glacial
- Alcohol etílico absoluto
- Xilol
- Microscopio compuesto
- Deshidratador
- Embebedor
- Micrótopo
- Estufa

## **Procedimiento:**

### **• Fijación o conservación**

Los organismos sobrevivientes fueron fijados con solución Davidson la cual se prepara de la siguiente manera: 330 mL de alcohol etílico 96%, 220 mL de formalina 100%, 115 mL Ácido acético glacial y 335 mL de agua destilada (se almacena a temperatura ambiente).

Se inyectó al camarón vivo directamente en todo el hepatopáncreas, en la parte posterior y anterior abdominal, teniendo precaución de no tener contacto con la solución fijadora en piel y ojos. Se inyectan entre 5 y 20 % equivalente al peso corporal del camarón. Con ayuda de una navaja se realizó un corte en la parte posterior de los organismos desde el rostrum hasta la parte final de los urópodos y se introdujeron en un frasco con 500 mL de solución Davidson para su fijación completa durante 48 horas, posteriormente se le retiró la solución Davidson se enjuagaron con agua corriente y al frasco se le adicionó alcohol al 70% en donde se colocaron los organismos hasta su análisis. En una etiqueta de papel cera con lápiz se escribió la fecha y hora de la fijación del organismo y del tratamiento que correspondían, cuya etiqueta se puso en el frasco con alcohol.

### **• Corte histológico**

Posteriormente a los organismos se les realizaron cortes longitudinales desde el rostrum hasta el telson y transversales separando los segmentos 1, 3 y 6 del resto del abdomen con ayuda de una navaja, para los dos cortes primero se retiraron las terminaciones distales de los urópodos una vez que se obtuvieron los cortes, con ayuda de unas pinzas de disección se acomodaron las muestras en Uni-cassettes.

### **• Embebido en parafina**

Primeramente, 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, utiliza una serie de soluciones de alcohol en concentraciones ascendentes y parafina, el proceso se llevó a cabo en el siguiente orden:

- Etanol al 70%, 2 baños separados de 1 hora cada uno
- Etanol al 80%, 2 baños separados de 1 hora cada uno

- Etanol al 96%, 2 baños separados de 1 hora cada uno
- Etanol absoluto, 2 baños separados de 1 hora cada uno
- Xilol, 2 baños separados de 1 hora cada uno
- Parafina, 2 baños separados de 1 hora cada uno

Las muestras se colocaron en moldes con ayuda de un 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 menos de 10 °C, los tejidos fueron 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.

#### • Cortado

Los bloques de parafina primeramente fueron rebajados a 20  $\mu\text{m}$  hasta que los tejidos se encontraran expuestos para posteriormente desclasificarlos por media hora, después se refrigeraron a -4 °C, por 15 minutos para obtener los cortes de 5  $\mu\text{m}$  con ayuda de un micrótopo (LEICA RM2125 RT), después el corte se colocó en un portaobjetos para ponerlo sobre una placa caliente por unos minutos y posteriormente colocarlo en una gradilla, una vez terminados todos los cortes, las gradillas fueron puestas en la estufa por 12 horas a 40 °C para el secado de los cortes.

#### • Tinción

La tinción de órganos y tejidos de las muestras de camarón se realizó con la técnica de Hematoxilina – Eosina (H&E), la cual se realiza de la siguiente manera:

- Dos baños separados de xilol (5 minutos cada uno)
- Dos baños separados de etanol absoluto (10 sumergidas lentas cada uno)
- Dos baños separados de etanol 96 % (10 sumergidas lentas cada uno)
- Dos baños separados de etanol 80 % (10 sumergidas lentas cada uno)
- Dos baños separados de etanol 50 % (10 sumergidas lentas cada uno)
- Agua destilada (10 sumergidas lentas)
- Sumergir las muestras 20 minutos en Hematoxilina de Harris
- Sumergir las muestras por 5 minutos en agua con flujo continuo
- Sumergir las muestras dos veces en alcohol ácido

- Sumergir las muestras por 2 minutos en agua con flujo continuo
- Sumergir las muestras 30 veces en agua amoniacal
- Sumergir las muestras por 10 minutos en agua con flujo continuo
- Sumergir las muestras 10 veces en etanol 80%
- Sumergir las muestras por 2 minutos en Eosina-Floxina
- Tres baños separados de etanol 96 % (10 sumergidas lentas cada uno)
- Tres baños separados de etanol absoluto (10 sumergidas lentas cada uno)
- Tres baños separados de xilol (10 sumergidas lentas cada uno)
- Por ultimo montar con resina sintética y dejar secar

- **Diagnostico histológico**

Las láminas histológicas teñidas fueron observadas con un microscopio óptico (Olympus BX60) con objetivos de 40x y 60x para revisar alteraciones en órganos y tejidos provocadas por la infección experimental con *V. parahaemolyticus*. Se tomaron fotografías con ayuda de una cámara digital (Infinity 2) adaptada al mismo microscopio.

## Anexo 5. Técnica para Tinción de Hemocitos

Para teñir hemocitos se modificó la técnica de equipo para tinción de frotis sanguíneo (Hemocolorante rápido Hycel).

### **Materias y reactivos:**

- Porta objetos
- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Solución fijadora
- Hemocolorante I
- Hemocolorante II
- Microscopio óptico

### **Manejo de la muestra**

1. Tomar 30  $\mu$ L de hemolinfa y preservarla con 60  $\mu$ L de alsever (2:1).

### **Procedimiento**

1. Tomar 50  $\mu$ L de la muestra y esparcir en el portaobjetos, dejar secar al aire durante 24 horas.
2. Cubrir la muestra con la solución fijadora durante 3 segundos, dejar escurrir el exceso.
3. Cubrir la muestra con el hemocolorante I durante 3 segundos, dejar escurrir el exceso.
4. Cubrir la muestra con el hemocolorante II durante 3 segundos, dejar escurrir el exceso.
5. Enjuagar con agua destilada (1 vez) y dejar secar durante 1 hora.
6. Observar al microscopio con el objetivo de 100 X, utilizando aceite de inmersión.

**OJO NO SUMERGIR MUESTRA EN ALGUNA DE LAS SOLUCIONES**