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

EFECTOS DEL ÁCIDO BENZOICO EN EL CRECIMIENTO Y ESTADO DE SALUD EN JUVENILES DE CAMARÓN BLANCO *Penaeus vannamei.*

Por:

Mariany Loya Rodríguez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACION DE ACUACULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa Abril 2021

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Mariany Loya Rodríguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

M. en C. Ana Carmela Puello Cruz
Directora de Tesis

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

M.en C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez
Integrante del comité de tesis

Dra. María Cristina Chávez Sánchez
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Efectos del Ácido Benzoico en el Crecimiento y Estado de Salud en Juveniles de Camarón Blanco *Penaeus vannamei*" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Mariany Loya Rodríguez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

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

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

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a CONACyT junto con el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por la oportunidad de realizar la maestría.

Como también a mi tutora M. en C. Ana Carmela Puello Cruz, quien con sus conocimientos y apoyo me guío pasó a pasó para concluir con el trabajo incluso en momentos de crisis.

Del mismo modo agradezco a todo mi comité de tesis, a la M.P.A. Noemí García Aguilar, la M. en C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez y la Doctora María Cristina Chávez Sánchez por su disposición y apoyo para realizar este proyecto. También agradezco al equipo de trabajo de laboratorio M.V.Z. Rodolfo Lozano Olvera y M. en C. Daniel A. Palacios González por ayudarme en el proceso y sus enseñanzas, a Valerie Williams por apoyar en la traducción del resumen de mi tesis.

Mis papás, Antonio Loya y Martha Olivia Rodríguez, les agradezco mucho su amor, paciencia y regaños para hacerme crecer, gracias por todo su apoyo incondicional, igual a mis hermanas Diana Loya y Lauren Loya, a mi prometido Manuel Peña, siempre pude contar con sus motivaciones, consejos y apoyo para yo seguir adelante con este proyecto.

Igual un agradecimiento a mis amigas Blanca, Alondra, Elizabeth y Eunice por hacer de la maestría más fácil y acompañarme en este proceso. A todos los profesores del CIAD, gracias por compartir sus conocimientos y guiarme a este punto.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
LISTA DE CUADROS 7
LISTA DE FIGURAS 8
RESUMEN 9
ABSTRACT 10
1. INTRODUCCIÓN 11
2. JUSTIFICACIÓN 14
3. ANTECEDENTES 15
3.1. Nutrición del Camarón. 15
3.2. Ácidos Orgánicos como Aditivo 15
3.3. Ácido Benzoico 16
4. HIPÓTESIS 20
5. OBJETIVOS 21
5.1. Objetivo General 21
5.2. Objetivos Específicos 21
6. MATERIALES Y MÉTODOS 22
6.1. Inclusión de Diferentes Concentraciones de Ácido Benzoico en una Dieta Comercial 22
6.2. Montaje del Sistema Experimental y Aclimatación de los Organismos 22
6.3. Evaluación de la Condición de Salud de los Camarones 23
6.4. Diseño Experimental 23
6.5. Cálculo de los Parámetros a Eevaluar 25
6.5.1. Supervivencia 25
6.5.2. Crecimiento en Peso y Talla. (Pan *et al*., 2007) 25
6.5.3. Tasa de Crecimiento Específico 25
6.5.4. Factor de Conversión Alimenticia (FCA) 25
6.6. Histología 26
6.6.1. Fijación o Conservación 26
6.6.2. Deshidratación e Inclusión en Parafina 26
6.6.3. Bloqueo 27
6.6.4. Cortes Histológicos 28
6.6.5. Tinción Hematoxilina-Eosina 29
6.6.6. Montaje de las Preparaciones 29
6.7. Contenido de Lípidos en Hepatopáncreas 30
6.8. Contenido Energético 32
6.9. Concentración de Ácido Benzoico 34

CONTENIDO (continuación)

6.10. Análisis de Estrés (Shock Salino)....34
6.11. Análisis estadístico....35
7. RESULTADOS.....36
7.1. Bioensayo....36
7.2. Índice Hepatosomático....38
7.3. Lípidos....39
7.4. Histología....39
7.5. Calorimetría.....44
7.6. Concentración de Ácido Benzoico.....45
8. DISCUSIÓN....46
9. CONCLUSIONES....49
10. RECOMENDACIONES....50
11. BIBLIOGRAFÍA....51
12. ANEXO 1....56

LISTA DE CUADROS

Cuadro **Página**

1. Número de tanques, tratamientos, biomasa inicial y porcentaje de alimentación para camarón blanco (*P. vannamei*) en bioensayo de alimentación con diferentes inclusiones de AB durante 30 días……... 24
2. Resultados de biometría inicial para camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en bioensayo de alimentación con diferentes inclusiones de AB durante 30 días…… 36
3. Resultados obtenidos en bioensayo con juveniles de *P. vannamei* alimentados por 30 días con diferentes inclusiones de AB en alimento comercial…… 37
4. Resultados obtenidos del Índice hepatosomático (IHS).de camarón *P. vannamei* alimentado por 30 días con diferentes inclusiones de ácido benzoico en alimento comercial……... 38
5. Concentración de Lípidos en hepatopáncreas en camarones *P. vannamei* alimentados a diferentes concentraciones de AB durante 30 días…… 39
6. Resultados de cortes histológicos en porcentaje de organismos que presentaron el daño y el grado del daño en los camarones blancos (*P. vannamei*) al inicio y después de alimentarlos por 30 días a diferentes concentraciones de AB…… 41
7. Resultados de extracción de AB de las dietas y en músculo de camarón al inicio y final del bioensayo…… 45

LISTA DE FIGURAS

Cuadro **Página**

1. Sistema de bioensayo donde se realizó el experimento con camarón blanco (*P. vannamei*)…….…....24
2. Fijación de camarón blanco (*P. vannamei*) inyección en hepatopáncreas…….....26
3. Corte longitudinal del cefalotórax y abdomen, corte transversal del abdomen. Colocación en contenedor para la inclusión de parafina en camarones blancos (*P. vannamei*)…….…27
4. Embebedor de parafina (Leica). Derecha se encuentra la zona caliente donde se agregó parafina líquida para formar los bloques, Izquierdo esta la zona fría, se colocaron los moldes con parafina para solidificar y proceder con los cortes…….…28
5. Micrótomo (Leica), en este aparato se realizaron los cortes de los tejidos de los camarones blancos (*P. vannamei*) antes y después del bioensayo…….…..29
6. Portaobjetos con los tejidos con tinción y montados con gotas de bálsamo para conservar en el tiempo el color y tejido del camarón blanco (*P. vannamei*) antes después del bioensayo…….….30
7. Camarones aislados para la extracción de hepatopáncreas después de la biometría final del bioensayo…….……..…..31
8. Formación de las 3 capas después de la extracción de lípidos en la jeringa de 3 ml.....31
9. A) liofilizado de las muestras, B) muestras liofilizadas para pulverizar, C) muestras pulverizadas, D) prensa para elaborar las pastillas, E) pesado de la pastilla, F) bomba calorimétrica sumergida en el contenedor con agua antes de la explosión…..….33
10. Órganos y tejido sano. A) túbulos en vista transversal de HP con distribución y cantidad normal de vacuolas B y células R. B) laberinto de la glándula antenal normal. C) intestino medio en corte longitudinal en buen estado de salud. D) intestino medio en corte transversal (Reglilla 200707A1) (H&E) (10X)……..42
11. Imagen de un hepatopáncreas con necrosis, melanización tubular e infiltración hemocítica. La flecha señala la melanización y por ende, la necrosis. El circulo muestra los hemocitos organizados para formación de nódulos T3 (Reglilla 200707D1) (H&E) (10x)……..42
12. Imagen de los túbulos en vista transversal de un hepatopáncreas, el epitelio tubular atrofiado T3 (Reglilla 200707D4). (H&E) (10X)……...43
13. Corte longitudinal del laberinto de la glándula antenal, el laberinto atrofiado, el núcleo de la célula reduce su tamaño y el epitelio se observa más delgado T1 (Reglilla 200707B1) (H&E) (10X)……..43
14. Imagen de enteritis en el intestino posterior en corte longitudinal de camarón blanco (P. vannamei) después de ser alimentado por 30 días con AB T1 (Reglilla 200707B9) (H&E) (10X)…….44

RESUMEN

En la última década se han empleado ácidos orgánicos y sus sales como aditivos en los alimentos acuícolas con la intención de incrementar sus niveles nutricionales, esto debido a que participan en algunas vías metabólicas y en la generación de energía en los organismos. El ácido benzoico (AB) es uno de los más empleados como aditivo por sus propiedades como inhibidor de crecimiento de hongos, se usa en conservas, vinos y diversos productos de consumo humano. Su inclusión en alimento para pollos, pavos, ganado y cerdos ha demostrado beneficios, mejorando su salud y crecimiento alterando la morfología del tracto intestinal y del metabolismo energético, así como; modificando la microbiota. Existe muy poca información de la inclusión de AB en alimentos acuícolas y es inexistente en alimento balanceado para camarón blanco *P. vannamei*. Debido a lo anterior, en este estudio se evaluaron los efectos en el crecimiento, supervivencia, tasa de conversión alimenticia, contenido energético y el estado de salud (por medio de la cuantificación lipídica en hepatopáncreas, análisis histológico y prueba de estrés salino) de juveniles de *P. vannamei* al incluir AB en un alimento comercial. El AB se incluyó en una dieta comercial utilizando diferentes concentración (0, 1.0, 1,5 y 2 g kg^{-1}). Los tratamientos mostraron diferencias significativas ($p<0.05$) en el porcentaje del índice hepatosomático (IHP% Inicial: 4.51±0.65, T0: 4.01±0.65, T1: 3.44±1.68, T2: 2.37±0.84, T3: 3.18±1.60) y contenido lipídico en hepatopáncreas (Inicial: 1544.67±171.09, T0: 1128.00±86.29, T1: 874.12±41.71, T2: 528.29±80.94, T3; 343.49±23.05), mostrando mayor daño con el aumento de la concentración, la supervivencia más baja fue de 94% con T1. El FCA está dentro de los rangos registrados por la FAO a excepción del obtenido en la dieta T0. En los análisis histológicos del hepatopáncreas el daño fue mayor con el aumento de la concentración. Respecto al análisis calorimétrico y detección de AB en músculo no se presentaron diferencias significativas sin embargo en el HP se observaron diferencias a nivel histológico y lipídico entre los tratamientos. Por los resultados obtenidos no se recomienda la inclusión de AB en las dietas para juveniles de camarón blanco (*P. vannamei*).

Palabras clave: Ácido benzoico, aditivo alimenticio, *Penaeus vannamei.*

ABSTRACT

In the last decade, organic acids and their salts have been used as additives in aquaculture feeds, the aim being to increase nutritional levels since they are components in several metabolic pathways for energy generation. Benzoic acid (BA) is one of the most commonly used due to its properties as a fungal growth inhibitor. BA is used to preserve, wines, and various products for human consumption. Its inclusion in food for chickens, turkeys, cattle and pigs has shown that it has health benefits and improves growth by altering the morphology of the intestinal tract and the energy metabolism, as well as modifying microbiota. Little information exists on the inclusion of BA in aquaculture foods and nothing has been reported for the white shrimp *P. vannamei*. As a consequence of this, this study evaluates the effects on growth, survival, food conversion rate, energy content, and health status (through lipid quantification in hepatopancreas, histological analysis, and saline stress test) of *P. vannamei* juveniles by including BA in a commercial diet. AB was included in a commercial diet using different concentrations (0, 1.0, 1.5 and 2 g kg^{-1}). Significant differences ($p<0.05$) in the percentage of hepatosomatic index (IHP) were obtained in all treatments (initial IHP% 4.51±0.65, T0 4.01±0.65, T1 3.44 ±1.68, T2 2.37 ±0.84, T3 3.18 ±1.60) and lipid content in hepatopancreas (Initial 1544.67 ±171.09, T0 1128.00 ±86.29, T1 874.12 ±41.71, T2 528.29 ±80.94, T3 343.49 ±23.05). Greater damage was observed in the treatment with the highest concentration while the lowest survival (94%) was observed with T1. Food Conversion Rate was consistent with FAO guidelines with T0. In the histological analysis of the hepatopancreas, greater damage was observed as concentration levels increased. No differences were observed in calorimetry and detection of BA in muscle tissue but when carried out in HP differences in histology and lipid content between treatments were observed with respect to concentration. According to the obtained results in this evaluation the inclusion of AB is not recommend in juvenile white shrimp (*P. vannamei*).

Keywords: Benzoic acid, feed additive, *Penaeus vannamei.*

1. INTRODUCCIÓN

Un aditivo puede ser cualquier sustancia que normalmente no se use como ingrediente ni se consuma como alimento, pero que mantenga las cualidades y características del mismo. Puede o no tener valor nutricional, agregarse durante la fabricación, transformación, envase, transporte o almacenaje con un efecto directo o indirecto en el alimento (OMS, 2018). La intención de su uso es mejorar el nivel nutricional de los alimentos, conservarlos, impedir el deterioro causado por microorganismos y/o insectos, evitar o retrasar que las condiciones medioambientales puedan modificar su composición original (oxidarlos, enmohecerlos, etc.) hacerlos más digestibles y palatables (Bharathi *et al*., 2019). La utilización de los aditivos está justificada si esta sustancia mejora la estabilidad del alimento y no tiene un efecto negativo (OMS, 2018).

En México existe la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios la cual clasifica a los aditivos según las funciones o propiedades que proporcionen a los alimentos, dentro de esta clasificación aparecen acentuadores de sabores, antiaglomerantes, acidulantes, alcalinízantes, antiespumantes, colorantes, conservadores, enzimas, hidrolizantes, humectantes, entre otras (FAO, 2019).

En la última década se ha popularizado el uso de ácidos orgánicos y sus sales como aditivos, argumentando el incremento de los niveles nutricionales, debido a que participan en varias vías metabólicas, uno de los más importantes es la generación de energía (ATP), en el ciclo del ácido cítrico o de los ácidos tricarboxílicos, además; los ácidos orgánicos de cadena corta pueden ser absorbidos con mayor facilidad por medio del epitelio intestinal y por medio de diferentes vías metabólicas (Lückstädt, 2008). Debido a que el contenido energético de los ácidos orgánicos es utilizado completamente en el metabolismo, estos deben incluirse en el alimento para mejorar su eficiencia energética, asimismo; otra de sus características es que pueden mejorar la digestibilidad de la dieta.

Los ácidos orgánicos además de la generación de ATP, también actúan directamente en el tracto intestinal participando en dos mecanismos diferentes: reducen el pH en el intestino delgado, a través del suministro de iones H^+ e inhiben el crecimiento de bacterias gram negativas a través de la disociación de los ácidos y la producción de aniones dentro de las células bacterianas (Roth *et al*., 1998). Dentro de los ácidos orgánicos admitidos y reconocidos como seguros para la industria

alimentaria se encuentra el ácido benzoico [AB] (C_6H_5-COOH), su estructura química está conformada por un ácido carboxílico unido a un anillo de benceno, se encuentra naturalmente en tejidos vegetales y animales, donde desempeña funciones importantes en el crecimiento, ya que es un precursor de una amplia gama de metabolitos primarios y secundarios (Zuo *et al*., 2002; Qualley *et al*., 2012; Olmo *et al*., 2015). El AB fue descubierto en el siglo XVI en la goma de la corteza de los árboles del género *Styrax* (Neumüller *et al*., 1988). Se puede sintetizar industrialmente y es utilizado como conservador y potenciador del sabor en alimentos, también se emplea en productos farmacéuticos y cosméticos (Chipley, 2005; Olmo *et al*., 2015).

El AB se puede consumir por dos medios; natural (frutas y verduras) y químico (en medicamentos y como aditivos en el alimento) (Chrikishvili *et al.,* 2006). A este ácido se le atribuyen propiedades como inhibidor de crecimiento de hongos, y es utilizado para la conservación de alimentos como jugos frutales, vinos, encurtidos y en la fabricación de farmacéuticos (Giannenas *et al.,* 2014). Aunque el AB se considera seguro, se ha demostrado que en periodos cortos de exposición irrita ojos, piel y tracto respiratorio y en exposición prolongada o constante puede provocar sensibilización cutánea, asma, urticaria, acidosis metabólica e incluso convulsiones. Altas concentraciones de AB pueden interferir en el ciclo de la urea, glucogénesis, metabolismo de ácidos grasos y el ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos) (Qi *et al*., 2009). Los niveles de inclusión en los alimentos para consumo humano deben ser evaluados y monitoreados correctamente para estandarizar concentraciones máximas, considerando que un adulto sano presentará más tolerancia que un infante, persona de la tercera edad o personas con enfermedades crónicas. FAO/WHO mencionan que la cantidad ingerida diaria debe estar en el orden de 5 mg AB kg^{-1} de peso corporal. En el 2000 se producía un aproximado de 638,000 toneladas de ácido benzoico a nivel mundial por año (OMS, 2000) y se estima que en el mercado para el 2024 a nivel mundial supere 640,000 toneladas (Hexa Research, 2016).

La industria de la acuicultura es uno de los sectores productores de alimentos de más rápido crecimiento en el mundo y se espera que continúe creciendo, rebasando la producción por pesca (Bondad-Reantaso *et al.,* 2005; FAO, 2016). La Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA) menciona que el crecimiento de la acuacultura en México se debe principalmente al cultivo de camarón, por su importancia económica y al incremento de las exportaciones a nivel mundial (Téllez-Castañeda, 2018).

Este crecimiento la producción de camarón de cultivo se ve impulsado por una variedad de factores,

que incluyen el uso de alimentos formulados y la intensificación de los sistemas de cultivo (Wing-Keong *et al.,* 2016). Las tallas de los camarones están determinadas por su genética, sin embargo, existen otros factores que influyen como su alimentación, promotores de crecimiento, la manipulación, la densidad de siembra y la capacidad del animal para lograr su desarrollo y crecimiento (Carrillo *et al.,* 2000).

2. JUSTIFICACIÓN

En el cultivo del camarón es de suma importancia evaluar los efectos de los aditivos incluidos en los alimentos formulados que se suministran, por lo tanto; este estudio propone determinar la concentración óptima del ácido benzoico como aditivo en dietas para camarón blanco (*Penaeus vannamei*), evaluando sus efectos a nivel nutricional, nivel histológico, resistencia a pruebas de estrés y si no hay afectaciones en la integridad de su sistema digestivo. La integridad del intestino es la premisa de un organismo sano pues es el responsable de la digestión, absorción de nutrientes y resistencia a la invasión de bacterias.

3. ANTECEDENTES

3.1. Nutrición del Camarón.

El camarón blanco (*Penaeus vannamei*) es considerado una de las especies de Peneidos más importantes en todo el mundo, debido a su valor económico (Martínez *et al*., 2009), incluyendo su comercialización y las empresas derivadas de ésta, tales como venta de insumos, plantas de alimentos, etc. La nutrición del camarón es un tema de particular interés para la acuacultura, en las dietas formuladas para su alimentación se incluyen aditivos alimentarios que generan beneficios para su crecimiento, estos pueden ser compuestos químicos inertes o activos, naturales o sintéticos, nutritivos o no, los más comúnmente empleados son antibióticos, probióticos, antioxidantes y estimuladores de apetito (Carrillo *et al.,* 2000). De acuerdo al tiempo de cosecha se han realizado diversos estudios para encontrar nuevos aditivos que reduzcan estos periodos, para satisfacer la gran demanda en la producción alimentaria (OMS, 2018).

Puesto que el crecimiento en peso y talla, es la primicia de una buena alimentación, resulta importante desarrollar dietas que permitan optimizar el crecimiento a menor costo y tiempo, manteniendo el buen estado de salud (Skjermo *et al.,* 2006). Es importante mencionar que el abuso de antibióticos y otras drogas usadas como aditivos para las dietas han causado grandes problemas, entre ellos la resistencia de cepas bacterianas y virales.

3.2. Ácidos Orgánicos como Aditivo

Los ácidos orgánicos son compuestos con uno o más grupos carboxilo de cadena corta, ácidos grasos volátiles o ácidos carboxílicos débiles, como el ácido fórmico, cítrico, benzoico y láctico (Wing-Keong *et al*., 2009). En la nutrición animal, los ácidos orgánicos manifiestan sus efectos sobre el rendimiento a través de tres mecanismos diferentes: en el alimento, en el tracto gastrointestinal y en los efectos sobre el metabolismo del animal (Freitag *et al*., 2007).

Estos se han utilizado como aditivos en la alimentación de humanos y animales, se ha demostrado que algunos ácidos orgánicos, como el ácido acético, benzoico, butírico, cítrico, fórmico, láctico, málico y sórbico, mejoran la salud y el rendimiento de crecimiento del ganado y aves al modificar la función del tracto gastrointestinal y el metabolismo energético, aumentando la disponibilidad de nutrientes y también ayuda inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas (Luckstadt, 2008; Wing-Keong *et al*., 2009). De igual manera se ha demostrado que la eficiencia de los mismos se incrementa durante periodos de estrés nutricional o medioambiental generalmente provocados después del destete en cerdos, sin embargo; no genera beneficios como dietas terminales de engorda (Kiarie *et al*., 2018).

Se ha estudiado el efecto de algunos ácidos orgánicos en peces con importancia comercial como la trucha arcoíris, el salmón y la tilapia (Wing-Keong *et al*., 2016), obteniendo buen resultado al incrementar la digestibilidad de nutrientes, crecimiento y resistencia en el sistema inmune (Cuvin-Aralar *et al*., 2011; Castillo *et al*., 2014). En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), se encontró que la suplementación dietética con 1% de diformato de sodio, aumenta la digestibilidad de algunos nutrientes, como proteínas, lípidos y aminoácidos, y mejora la estabilidad de la dieta (Morken *et al*., 2011).

Los estudios de ácidos orgánicos en camarones son limitados, Lückstädt (2008, 2015) registró algunos estudios que no fueron publicados en revistas científicas. Uno de ellos, fue la utilización de citrato de sodio (0.5%) con lactobacilos inactivados en una dieta del camarón *Marsurpenaeus japonicus*, donde se demostró mayor crecimiento. Otro estudio sugirió que el 0.25% de formiato de calcio adicionado a la dieta de camarón tigre *Penaeus monodon* cultivado en granjas de Taiwán; mejoró su supervivencia (Anuta *et al*., 2011).

3.3. Ácido Benzoico

El AB en un compuesto aromático incoloro. Su carácter ácido es debido al grupo carboxil (pK-4.19 a 52°C), es soluble en agua y en solventes orgánicos dependiendo de su grado de protonización (pH del medio). Se le conoce con otros nombres: ácido fenil fórmico y ácido benceno carboxilico. Su fórmula es C_6H_5COOH, se encuentra de manera natural en diferentes alimentos, tales como;

frutas, vegetales, especies, nueces, e incluso en productos lácteos a bajas concentraciones (Sieber *et al*., 1995). Es constituyente natural de fermentados de bifidobacterias de diversos lácteos, los cuales pueden llegar a contener alrededor de 20 mg kg^{-1} de AB. Otro posible mecanismo para la formación de AB podría ser el resultado del metabolismo anaeróbico del fenol, que se encuentra en la corteza de algunos quesos especialmente en el tipo Gruyere (Sieber *et al*., 1995), según el Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) [http://www.fao.org/3/ca7513en/CA7513EN.pdf] se han establecido ingestas diarias aceptables de 0 a 5 mg kg^{-1} de AB por peso corporal en humanos (Lazarević *et al*., 2011).

El AB es una sustancia efectiva para mejoramiento en el crecimiento de lechones y como alternativa al uso de antibióticos (Pérez-Alvarado *et al*., 2013). En pollos, el AB ha mejorado la ganancia de peso y conversión alimenticia sin exceder el 5 g kg^{-1} de inclusión en el alimento (Józefiak *et al*., 2007). En otro estudio donde se mezcló AB con aceites esenciales (Crina Poultry plus®) en dosis de 300 mg kg^{-1}, mostró mejoras en el peso de pollos al ser proporcionado durante 21 y 42 días (Weber *et al*., 2012). De acuerdo con Wenk (2003) la alteración de la microbiota intestinal causada por la combinación de AB y aceites esenciales tales como timol, eugenol y piperina es lo que produce el incremento de la digestibilidad especialmente en los animales monogástricos (aves). De acuerdo a la European Food Safety Authority (EFSA) (2019), es un aditivo seguro y efectivo en dietas de cerdos y está aceptado en la manufactura de alimentos, para producción animal y humanos.

En cerdos se ha comprobado que el AB presenta efectos positivos en el crecimiento, digestibilidad, morfología intestinal y microbiota (Diao *et al*., 2014; Chen *et al.,* 2017). Chen *et al*. (2017), demostraron que la inclusión de AB en las dietas de cerdos recién destetados incrementó la ganancia de peso a los 14 y 42 días de alimentación. También presentaron mayor población de bacterias del género *Bacillum* en la porción ileal y altura de las vellosidades en yeyuno, cuando se incluía AB en la dieta. Sin embargo, cabe mencionar que los efectos variaban dependiendo de las concentraciones de AB en las dietas en muchos de los casos, por ejemplo, a 2000 mg kg^{-1} se incrementó la población de bacterias benéficas tales como *Lactobacillus* a nivel intestinal ileal y de *Bifidobacterium* intestinal ileal y rectal, limitando la proliferación de *Escherichia* coli. También provocó mayor expresión del RNAm a nivel de factores estimuladores del crecimiento "*insulin-like growth factor-1*" (IGF-1), "*insulin-like growth factor-1 receptor"* IGF-1R y *"Zonula occludens-1"* ZO-1. IGF-1 es un importante mediador en la proliferación y diferenciación de

células intestinales.

Jones y Clemmons (1995) demostraron que desempeña un rol clave en el crecimiento, desarrollo y metabolismo en mamíferos post-natales (Xiao *et al*., 2009), de igual manera Chen *et al*. (2017) observaron que de los niveles del factor de crecimiento epidermal (EGF siglas en inglés) eran mayores al incluir AB. El epitelio intestinal actúa como barrera incrementando la permeabilidad que resulta en desplazamiento de las bacterias, tóxico y/o sustancias alérgicas además de influir directamente en la absorción de nutrientes.

En otro estudio donde se añadió AB en el alimento para pavos a niveles de 300 mg kg^{-1} y 1,000 mg kg^{-1}, los resultados mostraron mejoras a una baja inclusión del ácido benzoico. Los valores de pH disminuyeron tanto en el alimento como en el contenido fecal después de incluir el AB, el pH fue similar en las otras partes del tracto digestivo. En el ciego, las poblaciones de bacterias del ácido láctico aumentaron ($p < 0.05$), y las bacterias coliformes disminuyeron ($p < 0.05$) (Giannenas *et al*., 2014).

En la industria alimentaria para acuicultura el AB se emplea como preservador antimicrobiano incluido en el alimento balanceado en concentraciones de 0.2 a 1.0 % (Pérez-Alvarado, 2013). De acuerdo a resultados preliminares obtenidos en el laboratorio de Nutrición del CIAD-Mazatlán con diferentes concentraciones de AB (0, 2, 4, 6 y 8 g kg^{-1} dieta) incluidas en dieta comercial, se decidió evaluar las concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2 g kg^{-1}, basado en que a la concentración de 2 g kg^{-1} se observó mayor crecimiento, sin embargo; a los 30 días de proporcionar el alimento con AB a nivel histológico se mostraron daños en glándula antenal. En las concentraciones mayores de AB se detectaron daños similares al anterior desde los 15 días de alimentación. La forma de evaluar los daños histológicos se basó en la escala presentada por Lightner (1996), siendo grado 0 (G0) ausencia de lesiones en tejido; grado 1 (G1) presencia de lesiones leves y focales; grado 2 (G2) asignado a lesiones extensas locales, grado 3 (G3) lesiones extensas multifocales y grado 4 (G4) para lesiones severas, de multifocal a difusas.

En los experimentos preliminares se observaron daños en la glándula antenal y hepatopáncreas (HP) a los 15 días de alimentación con concentraciones más altas y a los 30 con más bajas. Lo que se observó es que si el AB excede la concentración óptima para la especie puede ser tóxico e incluso mortal. Por eso en el experimento de este trabajo se incluyó la prueba de estrés para comprobar que además de crecer en condiciones óptimas, toleran cambios drásticos de condiciones de cultivo. También se incluyó la determinación de lípidos en HP, para observar si las reservas se ven

modificadas con los diferentes niveles de AB y como parámetro del buen estado de salud de los organismos. Con la determinación del contenido energético (también como referencia de un animal sano) se podía determinar si se ve afectado con las diferentes concentraciones del AB. Finalmente mediante los análisis histológicos, considerando que ya se cuentan con los del bioensayo preliminar, se pueden hacer comparaciones y observar si existen modificaciones en el tracto digestivo y HP en general. Con la determinación de AB en músculo se comprobó que las concentraciones utilizadas no son un riesgo para el consumo humano.

4. HIPÓTESIS

La incorporación de ácido benzoico en la dieta comercial mostrará beneficios en crecimiento y salud del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de ácido benzoico en la dieta balanceada del camarón blanco *Penaeus vannamei.*

5.2. Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de ácido benzoico al incluirlo en una dieta comercial.
- Determinar la concentración de ácido benzoico en el músculo del camarón.
- Evaluar la concentración óptima de ácido benzoico incluido en una dieta comercial para camarón.
- Determinar crecimiento y supervivencia en camarón blanco *P. vannamei* con la concentración óptima.
- Evaluar estado de salud en el camarón *P. vannamei* considerando tolerancia al estrés salino, contenido lipídico en hepatopáncreas, análisis histológico y calorimetría.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Inclusión de Diferentes Concentraciones de Ácido Benzoico en una Dieta Comercial.

La inclusión de AB en las dietas comerciales se elaboró de la siguiente manera:

1. El alimento comercial (35% proteína y 9% de lípidos) y el AB se pulverizaron finamente, se tamizó por una luz de malla de 600 micras.
2. Al alimento tamizado se le añadieron las diferentes concentraciones (0, 0.5, 1.5 y 2.0 g Kg^{-1}) de AB, hasta lograr una mezcla homogénea.
3. A la mezcla del alimento pulverizado sin AB (T0) y con AB (T1, T2 y T3), se le agregó agua destilada a 40°C hasta lograr una completa incorporación, formando una masa uniforme maleable al tacto.
4. Por medio de un molino de carne, se reconstituyó el pellet, y se colocaron en charolas para ser secados a 60°C por 12 horas dentro de un deshidratador.
5. Los pellets fueron cortados y tamizados para obtener el tamaño adecuado.

6.2. Montaje del Sistema Experimental y Aclimatación de los Organismos

Los camarones utilizados pesaron aproximadamente un gramo, fueron obtenidos de un proveedor local de larvas, se colocaron en tanques de fibra de vidrio con capacidad de 300 litros con flujo abierto y agua filtrada a través de cartuchos de 5 y10 μm y filtro UV, cada tanque contaba con aireación al centro (Figura 1) y se manejó un fotoperiodo de 12 h luz/12h oscuridad, se aclimataron durante tres días y mantuvieron en observación mientras se corrían los análisis de calidad del lote de camarones.

6.3. Evaluación de la Condición de Salud de los Camarones

Para asegurar la calidad de los organismos, se realizaron seguimiento de factores físicos y de comportamiento, así como la supervivencia con la finalidad de identificar signos de enfermedad durante el periodo de aclimatación. Se realizaron análisis de PCR para detectar o descartar virus de macha blanca (WSSV siglas en inglés), virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV siglas en inglés) y virus del síndrome de Taura (TSV siglas en inglés) (Anexo 1) y un análisis histopatológico para registrar el estado inicial de los organismos. Al ser negativas todas las pruebas de PCR y normales en los histológicos se consideraron buenos para comenzar el experimento.

6.4. Diseño Experimental

Se pesaron y midieron los camarones individualmente para la obtención de datos iniciales y se sembraron 30 organismos por unidad experimental (UE) con 3 réplicas por tratamiento, cada uno se cubrió con una red como protección, se le colocó manguera de oxigenación, flujo de agua central y calentador individual. El bioensayo duró 30 días periodo en el cual se alimentaron con las dietas que incluían las diferentes concentraciones de AB y una dieta control. La siembra de los diferentes tratamientos se hizo aleatoriamente y se calculó el 9% de biomasa por tanque para determinar la cantidad de alimentación a suministrar diariamente y se modificó conforme crecieron (Cuadro 1). Al iniciar el día, se hacía un sifoneo por tanque para eliminar heces y alimento no consumido, si no se encontraba alimento en el tanque, se le incrementaba 1 gramo más de alimento al día en tres porciones. Al final (30 días) se realizaron biometrías individuales a la totalidad de los camarones de las diferentes concentraciones y seleccionaron y fijaron aquellos que estaban en intermuda para análisis histológico. La temperatura se monitoreaba diariamente, los otros parámetros fisicoquímicos (nitritos, nitratos, amonio, pH) se monitoreaban cada 2 días antes de limpiar el alimento y heces en la mañana (9:00 am) y en la tarde después de la última alimentación (16:00 hrs). Los parámetros físico-químicos óptimos para el crecimiento de juveniles de camarón blanco (*P. vannamei*) son salinidad 33±2 UPS, temperatura 30±1°C, pH 7-9, OD 5± 1 mg L^{-1}, nitritos <0.1

mg L^{-1}, nitratos 0.4-0.8 mg L^{-1} amonio, 0.1-1 mg L^{-1}, turbidez 35 a 45 cm y alcalinidad 100-140 mg L^{-1} (https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-camaron-blanco-del-pacifico).

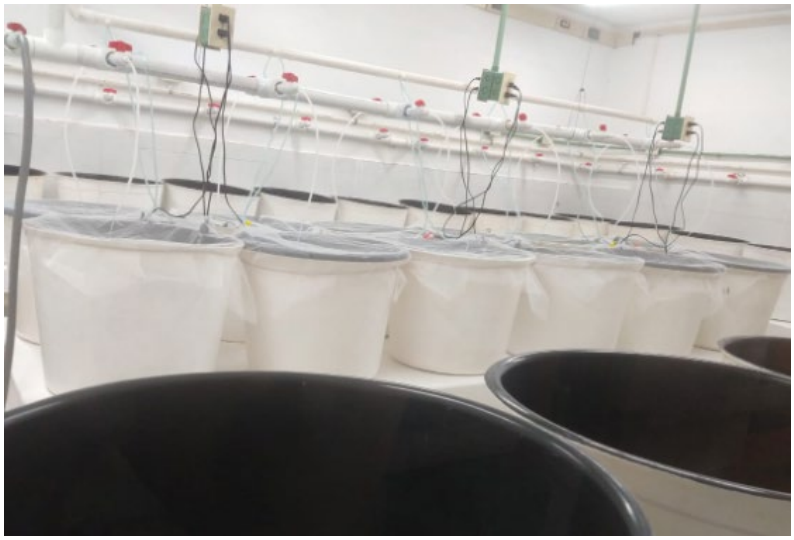

Figura 1. Sistema de bioensayo donde se realizó el experimento con camarón blanco (*P. vannamei*).

Cuadro 1. Número de tanques, tratamientos, biomasa inicial y porcentaje de alimentación para camarón blanco *(P. vannamei*) en bioensayo de alimentación con diferentes inclusiones de AB durante 30 días.

Tratamiento	**Concentración de AB (g/ kg^{-1})**	**Biomasa inicial**	**g de alimento proporcionado (9% de biomasa)**	**Tanque**
T0	0	59.10	5.32	**4**
T0	0	60.86	5.48	**6**
T0	0	60,00	6.49	**10**
T1	1.00	59.10	5.32	**2**
T1	1.00	59.59	5.36	**3**
T1	1.00	60.64	5.46	**12**
T2	1.50	60.38	5.43	**1**
T2	1.50	58.10	5.23	**8**
T2	1.50	61.27	5.51	**9**
T3	2.00	60.84	5.48	**5**
T3	2.00	59.43	5.35	**7**
T3	2.00	60.62	5.46	**11**

6.5. Cálculo de los Parámetros a Evaluar

6.5.1. Supervivencia

Porcentaje de organismos supervivientes durante el bioensayo (Li *et al*., 2007).
Supervivencia (%) = (Número final de organismos / Número inicial de organismos) x 100

6.5.2. Crecimiento en peso y Talla. (Pan *et al*., 2007)

Ganancia de peso = (Peso final - Peso inicial) / (Tiempo experimental)
Incremento de talla = (Talla final - Talla inicial) / (Tiempo experimental)

6.5.3. Tasa de Crecimiento Específico

Aumento de masa por unidad de tiempo (Stadtlander *et al*., 2013).
TCE (%/día) = [(Ln Peso final) – (Ln Peso inicial) /(Día)] x [100]

6.5.4. Factor de Conversión Alimenticia (FCA)

Mide el alimento consumido ganado en masa corporal. Valor cercano a uno expresan alta eficiencia del alimento (Arnold *et al*., 2009). El factor de conversión alimenticia nos indica cuántos gramos de alimento consume el camarón para ganar un gramo de peso. Se calcula, para un periodo de

tiempo determinado, al dividir el total de g de alimento consumidos por el camarón, entre el total de g ganados.

FCA= Alimento total administrado / Ganancia total de biomasa

6.6. Histología

6.6.1. Fijación o Conservación

Se fijaron 9 organismos vivos por tanque antes de iniciar el bioensayo y 9 por tanque al finalizar el bioensayo, la fijación se realizó por medio de inyecciones con solución Davidson (330 ml Etanol 95%, 220 ml de formaldehído 39%, 115 ml de ácido acético glacial 100% y 335 ml de agua).
El fijador se inyectó en el HP (Figura 2.) continuando con el cefalotórax y abdomen. Después se sumergieron en el fijador (solución Davidson) en una relación 1:10. Se dejaron sumergidos 12-24 horas (Morales *et al*. 2008).

Figura 2. Fijación de camarón blanco (*P. vannamei*) inyección en hepatopáncreas.

6.6.2. Deshidratación e Inclusión en Parafina

Este proceso se realizó en un procesador de tejido (Chacín Leica), los tejidos se procesaron a través de 12 recipientes, los cuales contenían etanol 70%, etanol 80%, etanol 95%, etanol 100%, aclarante (Xilol o "Hemo-De") y finalmente parafina líquida a temperatura controlada (Figura 3), en cada uno se mantuvieron una hora (Morales *et al*. 2008).

Figura 3. Corte longitudinal del cefalotórax y abdomen, corte transversal del abdomen. Colocación en contenedor para la inclusión de parafina en camarones blancos (*P. vannamei*).

6.6.3. Bloqueo

Los tejidos fueron colocados en los moldes de metal para hacer el corte, se agregó la parafina líquida caliente y se colocó en una base fría (con escarcha) para solidificar el bloque (Figura 4) (Morales *et al*.2008).

Figura 4. Embebedor de parafina (Leica). Derecha zona caliente donde se agregó parafina líquida para formar los bloques, Izquierda zona fría, donde se colocaron los moldes con parafina para solidificar y proceder con los cortes.

6.6.4. Cortes Histológicos

Los bloques se colocaron en el micrótomo (Leica) y se realizaron los cortes desde 1 a 15 µm (Figura 5) (Morales *et al*. 2008). El corte con el tejido con parafina fue expuesta a una temperatura de 40-50°C, se colocó la tira en un portaobjeto sobre una plancha, o en un equipo llamado "baño de recuperación de tejido". Las tiras se expanden y se seleccionó la tira que contenía el tejido de interés completo.

Figura 5. Micrótomo (Leica), en este aparato se realizaron los cortes de los tejidos de los camarones blancos (*P. vannamei*) antes y después del bioensayo.

6.6.5. Tinción Hematoxilina-Eosina

En camarones, el método de tinción más frecuente es el de Hematoxilina de Mayer-Bennett y Floxina/Eosina (H&E). Esta tinción involucra las siguientes soluciones y reactivos: etanol (100, 95, 80, 50%), agua destilada, hematoxilina, agua corriente, Floxina/Eosina y bálsamo medio de montaje (Lightner,1996; Morales *et al*., 2008).

6.6.6. Montaje de las Preparaciones

El exceso de colorante después de la tinción se eliminó con agua o alcohol y se deshidrató el corte con alcoholes a concentraciones crecientes, pasando después de alcohol absoluto a una solución de agente aclarante (Xileno). Para la preservación de las preparaciones histológicas, se empleó un medio de montaje colocando un par de gotas de bálsamo de Canadá o medios sintéticos y se cubrió con el cubreobjetos dejándose secar (Figura 6). El corte obtenido, fue generalmente de no más de 3 micras de espesor (Morales *et al*., 2008).

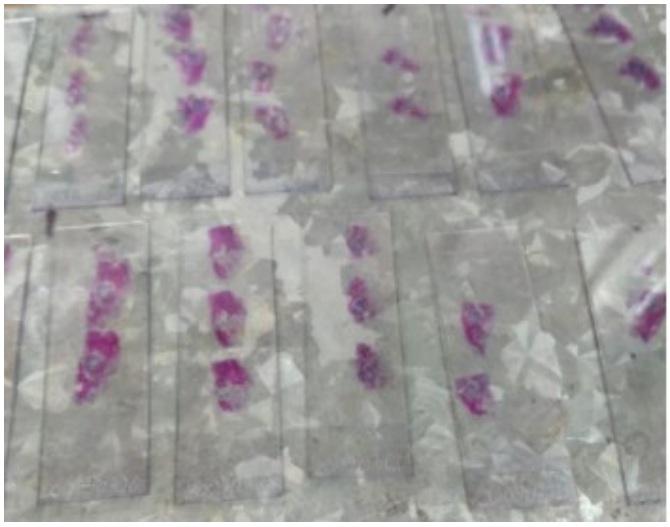

Figura 6. Portaobjetos con los tejidos con tinción y montados con gotas de bálsamo para conservar en el tiempo el color y tejido del camarón blanco (*P. vannamei*) antes y después del bioensayo.

6.7. Contenido de Lípidos en Hepatopáncreas

Los organismos vivos (Figura 7) se pesaron, se extrajo y pesó el HP, para obtener el índice hepatosomático (IHS) con la siguiente fórmula:

IHS = [hepatopáncreas (g)/peso individual (g)] x [100] (Tapia-Salazar, 2012)

Figura 7. Camarones aislados para la extracción de hepatopáncreas después de la biometría final del bioensayo.

Figura 8. Formación de las 3 capas después de la extracción de lípidos en la jeringa de 3 ml.

Los HP por cada tanque y tratamiento se homogenizaron y colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con ayuda de un maceador de plástico, la muestra homogenizada se centrifugó en una mini centrifuga por 5 segundos solo para bajar la muestra de la pared del tubo y con la ayuda de una pipeta Pasteur, se pesaron 100 mg y colocaron dentro de una jeringa de 3 ml y se aforó a 3 ml con una solución de cloroformo:metanol (2:1). Se adicionaron 600 µl de la solución de cloruro de sodio

al 0.9% (agua destilada con el 0.9% de cloruro de sodio) y se dejó reposar a 4 °C durante toda la noche.

Al dejar reposar, se formaron 3 capas (Figura 8), de las cuales se extrajo la fase inferior y se transfirió a un tubo de vidrio de 3 ml se colocó a baño maría a 60 °C hasta que el solvente se evaporó por completo. Una vez evaporado el solvente, se adicionó 1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se regresó a baño María a 100 °C por 10 minutos.

De la muestra con el ácido sulfúrico ya frio se tomaron 10 µl y se vació en un tubo de vidrio de 5 ml y adicionó 5.190 ml del fosfovanilina (mezcla de 400 ml de ácido fosfórico al 85% a 100 ml de agua caliente con vanilina al 0.6%), se dejó reposar por 30 min en la oscuridad a 37 °C. Posteriormente se tomó 1 ml con una pipeta, se vertió en una celda de cuarzo de 1 ml y se midió a una absorbancia de 540 nm en un espectrofotómetro UV VIS Hewlett Packard 8453.

Para la curva de calibración se utilizó colesterol (SIGMA ≥99%), se pesó 1 mg en un tubo de ensayo de 3 ml, se le añadieron 1000 µl de la mezcla de cloroformo metanol, para lograr una concentración de 1 mg ml^{-1}.

Se hicieron diluciones de 0.5000, 0.2500, 0.1250, 0.0625 y 0.0312 mg ml^{-1}, posteriormente se colocaron en baño María a 60 °C hasta que el solvente se evaporó completamente. Después se añadió 1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado en cada uno de los tubos de ensayo y se dejaron nuevamente en baño María a 100 °C durante 10 minutos. Se transfirieron 0.2 ml de la mezcla a un tubo de vidrio de 5 ml y adicionaron 5 ml del fosfovanilina, dejando reposar por media hora en la oscuridad a 37 °C. El blanco se preparó tomando 0.2 ml de cloroformo-metanol (2:1) y 5 ml de reactivo de fosfovanilina.

La mezcla se colocó en una celda de 1 ml de cuarzo, se midió la absorbancia a 540 nm (Método de SPINREACT 2016 estandarizado).

6.8. Contenido Energético

Se evaluó el contenido energético por medio de un calorímetro (Parr 6772 método por Puello-Cruz 2013). Se encendía 30 minutos antes de iniciar con el análisis para su acondicionamiento. El depósito del baño frío se llenó con agua desmineralizada y se dejó enfriar a 20°C, una vez que se

alcanzó la temperatura deseada, se colocó un vaso de precipitado con agua desmineralizada (500 ml). Para la calibración se pesó una pastilla de AB (≈ 0.2 mg) (Figura 9). Para las muestras, se pulverizaron finamente, el polvo se colocó en la prensa para peletizar, una vez elaborada la pastilla, se pesó ≈ 0.2 mg.

Se agregó 450 g de agua a 20°C en la cubeta del calorímetro, se colocó el alambre de fusión en el cabezal de la bomba, de tal manera que tocara la pastilla. Posteriormente, se depositó dentro de la bomba y se conectó el oxígeno en la válvula "check" y se colocó el pin de acero en el orificio sobre la "dona".

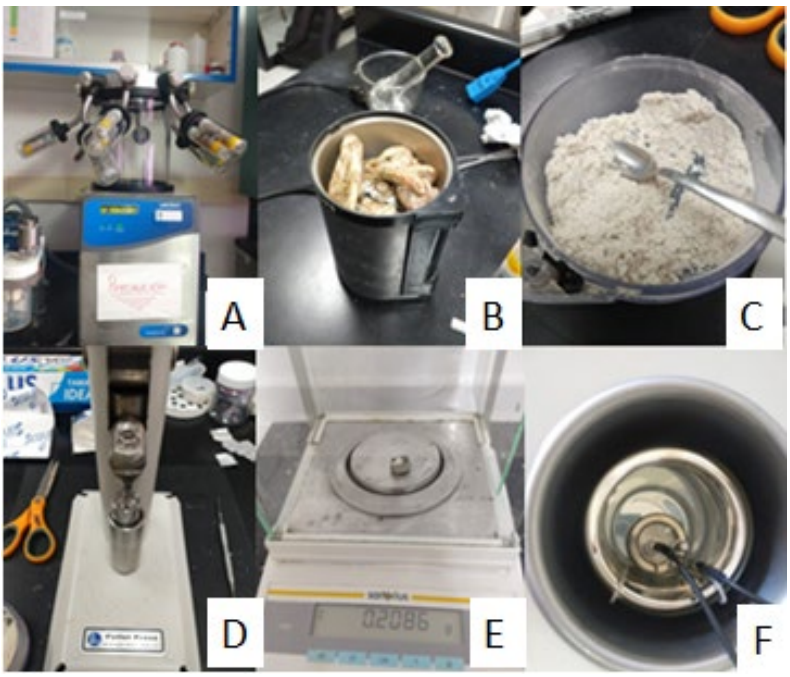

Figura 9. A) liofilizado de las muestras, B) muestras liofilizadas para pulverizar, C) muestras pulverizadas, D) prensa para elaborar las pastillas, E) pesado de la pastilla, F) bomba calorimétrica sumergida en el contenedor con agua antes de la explosión.

Se abrió el tanque de O_2 y se saturó la bomba a 30 atm. La perilla se giró lentamente, sin exceder la presión, se liberó con la válvula de desfogue bajo el regulador, a la presión requerida. Se cerró el tanque y la bomba con el pin de acero, se desfogó la presión y se quitó la dona. Se colocó la bomba en el soporte y se conectaron los dos electrodos, el soporte se depositó al contenedor de agua y se verificó que no burbujeara, se tapó y se colocó la banda para agitación en la tapa.

Se inició la prueba, presionando el botón CALORIMETER OPERATION, posterior sale la opción de OPERATING MODE:

a) STANDARIZATION: corrida con el ácido benzoico.
b) DETERMINATION: corrida con las muestras.

6.9. Concentración de Ácido Benzoico

Determinación de la concentración de ácido benzoico en alimento balanceado y músculo de camarón (Método de Zarad *et al*., 2017, modificado).

Para cada muestra, ya sea músculo o alimento, se hizo un homogenizado, se pesó un gramo por triplicado, se le agregaron 10 ml de metanol:agua destilada:HCl (6:3.95:0.05), se homogenizó con un equipo T25 ULTRA-TURRAX por aproximadamente un minuto a 12000 rpm, se utilizó alimento balanceado sin inclusión AB como control negativo, posteriormente las muestras se colocaron en un equipo de ultrasonido a una temperatura de 40° C por 1 hora para realizar la extracción del ácido benzoico.

Las muestras se centrifugaron en una centrifuga (Beckman-Coulter Allegra X-30r) por 10 minutos a 12,000 rpm, posteriormente se tomaron 50 µl del sobrenadante y se diluyeron en 950 µl de la mezcla de metanol:agua destilada;HCl (6:3.95:0.05), se centrifugó nuevamente y se leyó en un espectrofotómetro UV VIS Hewlett Packard 8453 a una absorbancia de 230 nm, utilizando una celda de cuarzo de 2 ml.

La curva de calibración se elaboró con un estándar de AB, del cual se hicieron diluciones de 0, 5, 10, 15 y 20 µg ml^{-1}.

6.10. Análisis de Estrés (Shock Salino)

Al finalizar el bioensayo, se dejaron 10 camarones por tanque para la prueba de estrés osmótico (shock salino). Se llenaron los tanques para la prueba de estrés un día antes con aeración fuerte,

para eliminar el cloro del agua, esto se corroboró con una prueba preliminar de medición de cloro utilizando el kit Easy Strips Tetra. Los camarones fueron colocaron en baldes con agua dulce (0 UPS), sometiéndolos de esta forma a un cambio brusco de salinidad durante 15 minutos, regresándose posteriormente a la salinidad inicial (35 UPS) y dejándolos en observación por las siguientes 24 horas para monitorear su comportamiento y supervivencia. Al término de este tiempo se contó el número de juveniles sobrevivientes en cada tanque, expresado como porcentaje del número inicial con la siguiente formula:

Supervivencia (%) = (Número final de organismos / Número inicial de organismos) x 100

6.11. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de peso inicial, longitud inicial, peso y longitud final, índice hepatosomático, calorimetría y determinación de ácido benzoico en músculo, se sometieron a un análisis estadístico ANOVA de una vía con significancia $p \leq 0.05$. Se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey para determinar las diferencias significativas. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics Visor.

7. RESULTADOS.

7.1 Bioensayo

En la Cuadro 2 se observan los resultados de la biometría inicial por tanque para demostrar las condiciones y tallas iniciales. En el análisis estadístico se obtuvo una significancia de 0.843 en peso y 0.912 en longitud de los organismos. Una significancia mayor a 0.05, nos indica que los organismos no presentaban diferencias significativas en peso y talla entre los tanques y tratamientos al inicial el bioensayo.

Cuadro 2. Resultados de biometría inicial para camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en bioensayo de alimentación con diferentes inclusiones de AB durante 30 días.

Tanques-Tratamiento	**Peso Inicial g**	**Longitud Inicial mm**
1-T2	2.01 ±0.16	68.93 ±5.23
2-T1	1.97 ±0.17	67.13 ±4.56
3-T1	1.99 ±0.14	67.98 ±3.38
4-T0	1.97 ±0.17	66.71 ±5.51
5-T3	2.03 ±0.19	69.58 ±3.42
6-T0	2.03 ±0.17	68.32 ±3.85
7-T3	1.98 ±0.18	68.64 ±3.63
8-T2	1.94 ±0.19	68.02 ±3.88
9-T2	2.04 ±0.16	69.37 ±3.48
10-T0	2.03 ±0.28	68.88 ±3.95
11-T3	2.02 ±0.18	69.28 ±4.12
12-T1	2.02 ±0.21	66.74 ±5.44

Los parámetros físico-químicos se mantuvieron constantes (nitritos, nitratos, amonio, pH y temperatura), a lo largo del bioensayo. Los valores de nitritos, nitratos y amonio fueron de 0 ppm, el pH de 7.8 y una temperatura de 30°C. Considerados adecuados para el cultivo de camarón.

Al finalizar el experimento (30 días), se pesaron y midieron individualmente nuevamente, además de hacer un conteo de todos los organismos de todos los tanques y tratamientos, con estos datos se determinó el peso ganado, incremento en talla y % de supervivencia. La mayoría de los tanques presentaron una supervivencia mayor de 95% (Cuadro 3) y esto es un buen indicador para los diferentes tratamientos.

Cuadro 3. Resultados obtenidos en bioensayo con juveniles de *P. vannamei* alimentados por 30 días con diferentes inclusiones de AB en alimento comercial.

Tratamiento	PF	LF	GP	IT	Supervivencia	TCE %	FCA
	g	mm	g	mm	%	día	
T0	3.76 ±0.43[a]	85.69±2.75[a]	0.060[a]	0.61[a]	98.89 [a]	2.16 [a]	2.4 [a]
T1	3.40 ±0.61[b]	83.68 ±4.70 [b]	0.049[b]	0.57[a]	94.44 [b]	1.84 [b]	1.9 [b]
T2	3.28 ±0.60 [b]	82.06 ±4.25[b]	0.042[b]	0.46[b]	98.89 [a]	1.65 [b]	1,8 [b]
T3	3.28 ±0.58 [b]	82.49 ±4.21 [b]	0.044[b]	0.46[b]	98.89 [a]	1.69 [b]	1.9 [b]

Peso Final (PF), Longitud final (LF), Ganancia en Peso (GP), Incremento en talla (IT) tasa de crecimiento específico (TCE), factor de conversión alimenticia (FCA), ± desviación estándar. Los valores representan media n=3 y diferentes superíndices denotan diferencias significativas (p>0.05), (a>b).

Se realizó una prueba de varianza en peso y longitud final, TCE y FCA por tratamiento, esta prueba arrojó una significancia $p \leq 0.000$, por lo que al menos en un tratamiento existen diferencias significativas, por lo tanto, se realizó una prueba de Tukey donde se hizo una comparación entre los tratamientos para detectar las diferencias. En supervivencia el valor de p fue de 0.0476, mostrando diferencias en el T1 (mayor mortalidad) en comparación con T0, T2 y T3.

Se mostró un mayor incremento en crecimiento en talla y peso en el tratamiento Control (T0), este fue significativamente diferente respecto a los tratamientos T1, T2 y T3, sugiriendo un efecto negativo al incluir AB en el alimento. Resultados similares se presentaron en FCA y TCE mostrando valores significativamente mayores en el tratamiento control (T0). De igual manera se

observó un decremento en los parámetros medidos (PF, LF, GP y IT) conforme aumentaba la concentración de AB.

7.2 Índice Hepatosomático

Cuadro 4. Resultados obtenidos del Índice hepatosomático (IHS).de camarón *P. vannamei* alimentado por 30 días con diferentes inclusiones de ácido benzoico en alimento comercial.

Tratamiento	PT	PH	IHP%
INICIAL	2.34±0.25	0.11±0.02	4.51±0.65[a]
T0	3.83±0.36	0.15±0.03	4.01±0.92 [a]
T1	3.18±0.76	0.10±0.04	3.44±1.68[ab]
T2	3.20±0.62	0.07±0.02	2.37±0.84[b]
T3	3.35±0.64	0.10±0.05	3.18±1.60 [b]

Peso Total de los organismos (PT), Peso de Hepatopáncreas (PH), Índice Hepatosomático % (IHP). Los valores representan media n=3 y diferentes superíndices denotan las diferencias significativas ($p>0.05$), (a>b).

Al realizar la prueba de ANOVA de un factor, nos arrojó que al menos en un tratamiento existían diferencias significativas, por lo tanto, se realizó una prueba de Tukey.

Al comparar el % IHP inicial con el final del tratamiento Control T0, no hubo diferencias significativas, eso denota que la relación del HP respecto al peso del organismos son constantes, a diferencia con los demás tratamientos T1, T2 y T3 donde se observa una disminución en la relación del HP y el peso, el tratamiento T2 presentó los menores valores. Lo cual sugiere una influencia negativa de las concentraciones empleadas de AB en el desarrollo del hepatopáncreas en los camarones.

7.3 Lípidos

Cuadro 5. Concentración de lípidos en hepatopáncreas en camarones *P. vannamei* alimentados a diferentes concentraciones de AB durante 30 días.

Tratamiento	Concentración mg/dL
INICIAL	1544.67 ±171.09[a]
T0	1128.00 ±86.29[b]
T1	874.12 ±41.71[c]
T2	528.29 ±80.94[d]
T3	343.49 ±23.05[e]

Los valores representan media n=3 y diferentes superíndices denotan las diferencias significativas ($p>0.05$), (a>b>c).

En la prueba de ANOVA de una vía demostró una significancia de $p\leq0.000$, al correr la prueba de Tukey, se demostró que en todos los tratamientos se presentaron diferencias significativas. En la Cuadro 5, se observa que hay una disminución notoria y considerable entre los tratamientos, a mayor concentración de AB, mayor reducción de lípidos en HP, mostrando el menor valor T3 el cual tiene la mayor concentración de AB. Esto también pudiera estar relacionado al menor tamaño reportado en la Cuadro 4 del % IHP.

7.4 Histología

En el análisis de histología se revisaron 3 órganos del camarón, HP (se encontraron 6 patologías), glándula antenal (se detectaron 2 patologías) y el intestino (anterior, medio y posterior) donde se detectaron 2 patologías. De acuerdo a la Cuadro 6, en los cortes histológicos de la muestra inicial se encontraron pocas patologías de primer grado (G1), solo en el HP de un organismo se observó necrosis, melanización tubular e infiltración hemocítica (Figura 11), dos presentaron infiltración hemocítica y tres reducción de vacuolas B y R con atrofia. En la glándula antenal, solo en 5

organismos se detectó una atrofia (Figura 13) y en el intestino (Figura 14), uno tuvo infiltración hemocítica, sin embargo, después del bioensayo aumentaron las patologías y el grado en relación a las concentraciones de AB, encontrándose con daños más severos (G4) en el tratamiento T3. Mostrando mejor resultados en el tratamiento control, seguido por el tratamiento T1, notoriamente las condiciones empeoran conforme la concentración de AB es mayor.

Cuadro 6. Resultados de cortes histológicos en porcentaje de organismos que presentaron el daño y el grado del daño en los camarones blancos (*P. vannamei*) al inicio y después de alimentarlos por 30 días a diferentes concentraciones de AB.

			Hepatopancreas						GA		Ciego anterior		Intestino medio		Ciego posterior	
	Concetración		Necrosis, melanización tubular e hemocitica	Necrosis celular, celulas desprendidas en la luz tubular	Infilt hemocitica	Red de vacuolas en Cel R	Red de vacuolas en Cel B	Atrofia del epitelio	Atrofia	Necrosis	Necrosis	Inf-hemocitica	Infil-hemocitica	Enteritis hemocitica	Necrosis	Inf-hemocitica
C	0		0%	0%	11%	33%	33%	22%	22%	0%	0%	11%	11%	0%	0%	11%
T1	1		NA	NA	G1	G1	G1	G1	G1	NA	NA	G1	G1	NA	NA	G1
			44%	88%	77%	88%	77%	33%	77%	0%	0%	44%	44%	22%	0%	33%
			G1-G2	G1	G1-G2	G1-G2	G2	G1-G2	G1	NA	NA	G1-G2	G2-G3	G2-G3	NA	G2-G3
T2	1.5		0%	33%	44%	77%	77%	55%	55%	11%	0%	11%	22%	11%	0%	11%
			NA	G1	G1	G2-G3	G2-G3	G2-G3	G1-G2	G1	NA	G1	G1	G1	NA	G1
T3	2		44% G1-G2	66%	33%	77%	77%	77%	77%	55%	0%	0%	55%	22%	0%	11%
			11% G3	G1	G1-G2	G3-G4	G3-G4	G3	G2-G3	G1	NA	NA	G1-G3	G2-G3	NA	G1
Inicial			11%	0%	22%	33%	33%	33%	55%	0%	0%	11%	0%	0%	0%	11%
			G1	NA	G1	G1	G1	G1	G1	NA	NA	G1	NA	NA	NA	G1

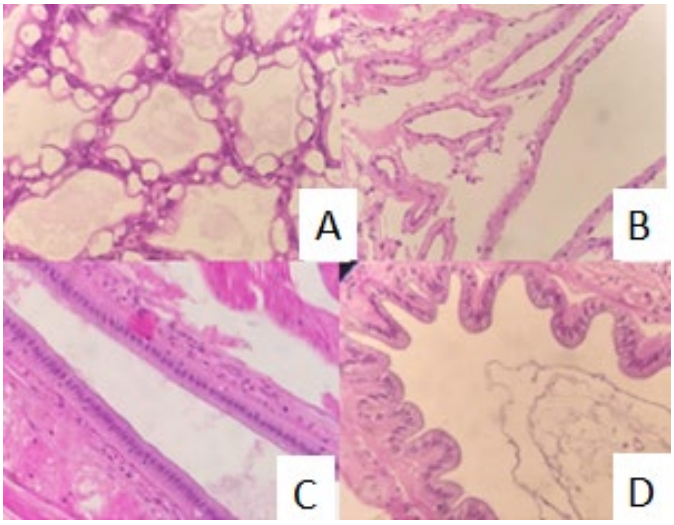

Figura 10. Órganos y tejido sano. A) túbulos en vista transversal de HP con distribución y cantidad normal de vacuolas B y células R. B) laberinto de la glándula antenal normal. C) intestino medio en corte longitudinal en buen estado de salud. D) intestino medio en corte transversal (Reglilla 200707A1) (H&E) (10X).

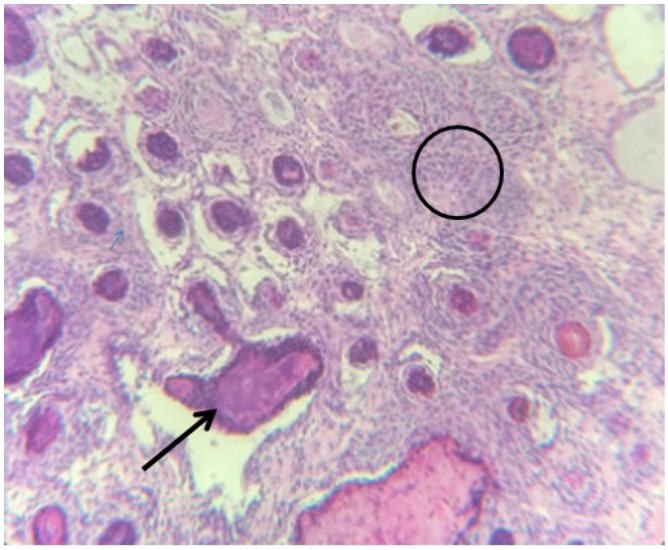

Figura 11. Hepatopáncreas con necrosis, melanización tubular e infiltración hemocítica. La flecha señala la melanización (necrosis). El círculo muestra los hemocitos organizados para formación de nódulos del T3 (Reglilla 200707D1) (H&E) (10x).

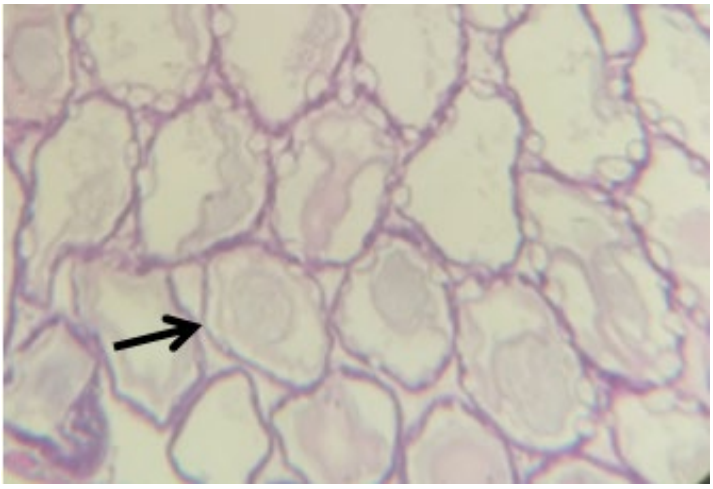

Figura 12. Túbulos en vista transversal de un hepatopáncreas, el epitelio tubular atrofiado T3 (Reglilla 200707D4) (H&E) (10X).

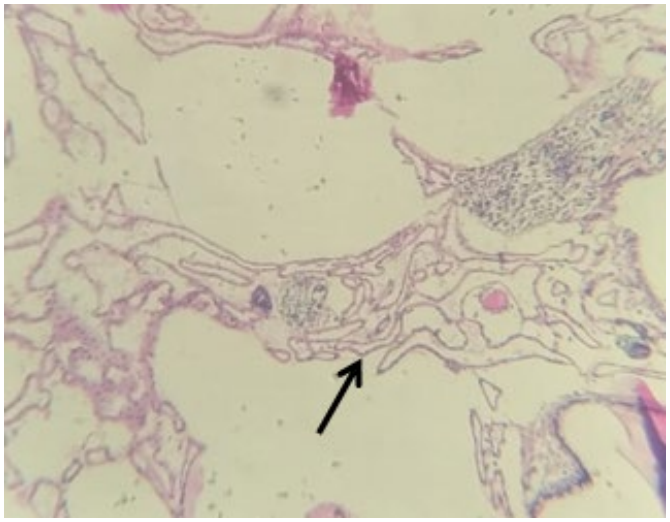

Figura 13. Corte longitudinal del laberinto de la glándula antenal, el laberinto atrofiado, el núcleo de la célula reduce su tamaño y el epitelio se observa más delgado T1 (Reglilla 200707B1) (H&E) (10X).

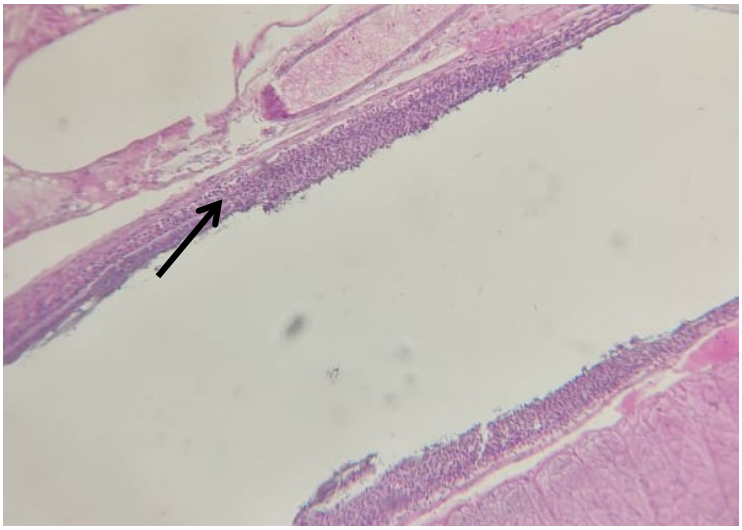

Figura 14. Enteritis en el intestino posterior en corte longitudinal de camarón blanco (P. vannamei) después de ser alimentado por 30 días con AB T1 (Reglilla 200707B9) (H&E) (10X).

7.5 Calorimetría.

Cuadro 6. Resultados de calorimetría al inicio y final del bioensayo, después de una prueba de estrés (shock salino a 0 UPS) en camarones blancos alimentados a diferentes concentración de AB.

Tratamiento	Antes del shock salino cal/g	Después del shock salino cal/g
Inicial	4532.79	NA
T0	4623.54	4676.93
T1	4578.04	4530.58
T2	4600.77	4572.76
T3	4440.53	4487.57

NA: no aplica

En la cuadro 7 se observa que no hay variaciones entre los tratamientos, estadísticamente hay una significancia de 0.001, esto indica que no hay diferencias significativas al inicio y final respecto a los diferentes tratamientos, se mantienen valores similares. Tampoco existe una variación en el contenido energético de los organismos de los diferentes tratamientos, antes y después de estrés

salino, aparentemente el AB no influye en las lecturas de contenido energético de los organismos medidos.

7.6 Concentración de Ácido Benzoico.

Cuadro 7. Resultados de extracción de AB de las dietas y en músculo de camarón al inicio y final del bioensayo.

Tratamiento	**Concentración AB en dieta**	**AB en músculo de camarón**
alimento	(g kg^{-1})	
Inicial	-	ND
T0	ND	ND
T1	0.493 ± 0.041	ND
T2	1.51± 0.14	ND
T3	1.83 ± 0.17	ND

ND: No detectado

Las concentraciones determinadas en las dietas fueron cercanas a las que se incluyeron, la pérdida del AB en el proceso del peletizado fue muy baja. Respecto al análisis del AB en el músculo del camarón no se detectó con la técnica utilizada, lo que sugiere que las concentraciones AB incluidas en las dietas para este bioensayo pueden ser eliminadas por el organismo o la concentración es tan pequeña que no es detectable, garantizando la seguridad de su consumo por los humanos.

8. DISCUSIÓN

Los parámetros físicos-químicos de la calidad del agua que se mantuvieron durante el bioensayo, son adecuados para el cultivo de camarón, según reportados en la literatura (Carbajal *et al*., 2013). Los niveles de amonio, nitritos y nitratos deben mantenerse debajo de 0.01 ppm, valores superiores a este, disminuye la velocidad de crecimiento en el camarón blanco. De la misma manera con el pH, Lim y Dominy (1990) reportan que un pH dentro de 6.5-9 es aceptable y reportado en https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-camaron-blanco-del-pacifico.

El uso de ácidos orgánicos como aditivos en el alimento ha sido una práctica común en la cría de algunos animales por sus efectos como conservadores y posibles promotores del crecimiento (Falkowski y Aherne, 1984).

Generalmente el camarón blanco alcanza factores de conversión alimenticia (FCA) de 1.2 a 1.8 (FAO, 2009). Dentro del experimento realizado con el AB, los resultados de FCA fueron: para T0, 2.4; T1, 1.9; T2, 1.8; T3, 1.9; la mayoría fueron más altos a los reportados por FAO (2009). Resultó inesperado que el FCA en T0 fuera el mayor y que incluso se encuentre arriba de los valores sugeridos y obtuvo el mayor crecimiento. Lo anterior sugiere que a diferencia de otras especies como cerdos y pavos en este caso en AB no aportó beneficios para el crecimiento de los camarones (Giannenas *et al*., 2014. Kiarie *et al*., 2018). Se ha demostrado que estas sales tienen propiedades positivas en el alimento, promueven la salud intestinal y mejoran el crecimiento. Por otra parte, en el estudio de Buhler y colaboradores (2006) del efecto en cabras macho con un peso de 26-106 kg, en el cual; les proporcionaron una dieta con AB al 1%, los resultados al igual que en el camarón no mostraron efectos sobre el aumento de peso ni sobre el factor de conversión alimenticia, sin embargo; si mejoró la digestibilidad en el período de crecimiento (Buhler *et al*., 2006).

En un experimento con pollos de engorde se demostró que el AB reduce la tasa de crecimiento cuando se incluye en el alimento a concentraciones mayores del 0,1%. En estas aves, el AB es desechado por la orina, a altas concentraciones del AB no es procesado y es desechado por medio de la urea. En este trabajo, al realizar las pruebas de detección de AB, en el músculo del camarón blanco *P. vannamei*, no se detectó AB, por lo que se supone que los camarones tienen la capacidad de eliminar el AB a las concentraciones usadas, tal como reportan Nesheim y colaboradores (1963).

El factor de crecimiento parece depender del tipo de ácidos orgánicos utilizados, la concentración y la especie de peces. Sin embargo, la literatura sobre el AB en animales acuáticos es limitada, por lo cual sería conveniente en futuros estudios evaluar el efecto de AB directamente en el proceso de digestión del camarón para tener resultados más puntuales (Ng y Koh, 2011).

La supervivencia al final del experimento (30 días) se considera buena con 98.89% para los tratamientos T0, T2 y T3 y del 94,44% para T1, y del 100% en todos los tratamientos después de la prueba de estrés lo que sugiere un buen estado de salud de los organismos. Sin embargo, al realizar análisis directamente en HP se observan efectos negativos al incrementar las concentraciones de AB, como es la reducción de lípidos y daños histológicos (atrofia, infiltración hemocítica y necrosis)

La composición y el metabolismo de los lípidos en los crustáceos del medio natural comparados con los sometidos a cultivos pueden contribuir a una mejor compresión de la influencia de los factores nutricionales en la capacidad metabólica, que permitan evaluar características de la alimentación y otros factores ambientales en animales a cultivo (Stroud *et al*., 1982). Generalmente el nivel de lípidos en los tejidos y órganos puede variar dependiendo de la dieta, ambiente y estado fisiológico del animal (Oliva *et al*., 1989). En este caso, la variante fue el tipo de dieta, los resultados demostraron la disminución de los lípidos en el HP conforme aumentaba la concentración de AB.

De acuerdo a las observaciones, existe una relación directa entre la concentración de AB y la severidad de los daños en el HP. Los lípidos son requeridos como energía para el camarón, también son utilizados para procesos fisiológicos como la osmorregulación, actividad enzimática, transporte de iones, ácidos grasos, permeabilidad al agua en las branquias y en la síntesis de aminoácidos (Faleiros *et al*., 2018). Los lípidos son una fuente principal de energía química en muchos animales, estas sustancias brindan mayor energía que los hidratos de carbono y que las proteínas como reserva energética (Newholme *et al*., 2006). En los camarones, se ha demostrado en otros estudios que en condiciones de ayuno y estrés por manipulación por un lapso de 3-4 semanas, los lípidos se degradan para generar energía, por lo que esto genera una disminución de las reservas de lípidos (Mercier *et al*., 2006).

En este experimento se observó que a una mayor concentración de AB, provocó menor crecimiento, reducción de lípidos en HP, reducción en el IHP y daño a nivel histológico en glándula antenal y hepatopáncreas HP.

De acuerdo a la calorimetría y detección de AB no se presentaron diferencias significativas, antes y después del bioensayo, del mismo modo en la prueba de estrés, se obtuvo una supervivencia de 100% al terminar la prueba de estrés, confirmando que a estas concentraciones de AB las evaluaciones a nivel HP son más precisas que aquellas donde se emplea el camarón completo.

9. CONCLUSIONES

1) La inclusión de AB en la dieta comercial es un proceso sencillo donde no se altera los componentes originales de este mismo.
2) Los camarones mantuvieron interés por el alimento durante los 30 días, siempre activos a la hora de su alimentación.
3) La supervivencia no se vio afectada por las diferentes concentraciones de AB.
4) La inclusión de AB demostró efecto negativo sobre el crecimiento en los camarones al compararlo con T0 control.
5) Los resultados de histología mostraron que conforme aumenta la concentración de AB, mayor es el grado de daño a nivel histológico en HP y glándula antenal.
6) El porcentaje IHP y contenido de lípidos en HP se ve disminuido conforme aumenta la concentración de AB.
7) De acuerdo con los resultados las detecciones de AB empleando el organismos completo (calorimetría y detección en músculo) no muestran diferencias, sin embargo, al analizar a nivel HP (histología, %IHS, con de lípidos en HP) los efectos de las diferentes concentraciones muestras diferencias negativas para el crecimiento y desarrollo de los camarones.
8) Por los resultados obtenidos, no se recomienda el uso de AB en las dietas para juvenil de camarón blanco (*P. vannamei*) bajo las condiciones descritas.

10. RECOMENDACIONES

En la determinación de lípidos en HP, es necesario analizar las tres capas formadas al momento de la extracción.

Al realizar pruebas de estrés por salinidad, para poder detectar alguna diferencia en los tratamientos, se recomienda aumentar el tiempo a una hora de exposición en agua dulce y posteriormente regresarlos a la salinidad normal.

11. BIBLIOGRAFÍA

Anuta D.J., Buentello A., Patnaik S., Lawrence A.L., Mustafa A., Hume M., Gatlin III D.M. and Kemp M.C. 2011. Effect of dietary supplementation of acidic calcium sulfate (Vitoxal) on growth, survival, immune response and gut microbiota of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculure Society. 42:834-844.

Arnold J.S., Coman F.E., Jackson F.E. and Groves S.A. 2009. High-intensity, zero waterexchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density. Aquaculture. 293:43-48.

Bharathi S., Cheyl A., Rajagopalasamy C., Uma A., Ahilan B. and Aanand S. 2019. Functional feed additives used in fish feeds. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 7(3):44-52.

Bondad-Reantaso M.G., Subasinghe R.P., Arthur J.R., Ogawa K., Chinabut S. and Adlard R. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. Veterinary Parasitology. 132:249–272.

Buhler K., Wenk C., Broz J. and Gebert S. 2006. Influence of benzoic acid and dietary protein level on performance, nitrogen metabolism and urinary pH in growing-finishing pigs. Archives of Animal Nutrition. 60:382-389.

Carbajal Y. and Bolaños N. 2013. Efecto de dos tipos de dietas: Comercial y Experimental sobre el crecimiento de camarones *Litopenaeus vannamei* en etapa de postlarvas. UNAN, León. México. Recuperado de http://repositorio.cnu.edu.ni/Record/RepoUNANL3107

Carrillo O., Vega-Villasante F., Nolasco H. and Gallardo N. 2000. Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento de camarón. In: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M.A. and Civera-Cerecedo R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México. Recuperado de http://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/267.

Castillo S., Rosales M., Pohlenz C. and Gatlin D. 2014. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture. 433:6-12.

Cuvin-Aralar M.A., Luckstadt C., Schroeder K. and Kuhlmann K. 2011. Effect of dietary organic acid salts, potassium diformate and sodium diformate on the growth performance of male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Bulletin of Fish Biology. 13:33–40.

Chen J.L., Zheng P., Zhang C., Yu B., He J., Yu J., Luo J.Q., Mao X.B. and Chen D. 2017. Benzoic acid beneficially affects growth performance of weaned pigs which was associated with changes in gut bacterial populations, morphology indices and growth factor gene expression. Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan, China. 256: 1137-1146.

Chipley J. 2005. Sodium benzoate and benzoic acid. In: antimicrobials in foods. Davidson, P. M.; Sofos, J. N. and Branen, A. L. (Eds.). Third edition. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 11-48.

Chrikishvili D., Sadunishvili T. and Zaalishvili G. 2006. Benzoic acid transformation via conjugation with peptides and final fate of conjugates in higher plants. Ecotoxicology and Environmental Safety. 64:390-399.

Diao H., Zheng P., Yu B., He J., Mao X.B., Yu J. and Chen D. 2014. Effects of dietary supplementation with benzoic acid on intestinal morphological structure and microflora in weaned piglets. Key Ministry of Education laboratory for animal disease-resistan cenutrition,Sichuan Agricultural University,Ya'an 625014,China. 167:249–56.

EFSA. 2019. Safety and efficacy of VevoVitall® (benzoic acid) as feed additive for pigs for fattening. Recuperado de https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2019.5727.

Faleiros R.O., Garçon D.P., Lucena M.N., McNamara J.C. and Leone F.A. 2018. Short- and long-term salinity challenge, osmoregulatory ability, and (Na+, K+)-ATPase kinetics and a-subunit mRNA expression in the gills of the thin stripe hermit crab *clibanarius symmetricus* (Anomura, Diogenidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology. 225:16–25. doi:10.1016/j.cbpa.2018.06.016

Falkowski JF, Aherne FX (1984). Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig nutrition. J. Anim. Sci. 58 (4): 935.

FAO. 2009. *Penaeus vannamei*. In Cultured aquatic species fact sheets. Recuperado de http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_whitelegshrimp.htm.

FAO. 2016. SOFIA El estado mundial de la pesca y acuicultura. Roma 224 pp. Recuperado de http://www.fec-.com.mx/sistema/biblioteca_digital/estado-mundial-acuacultura.pdf.

FAO. 2019. Norma general para los aditivos alimentarios. Recuperado de http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf.

Freitag M. 2007. Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: Acidifiers in Animal Nutrition A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance. 1st ed. Nottingham University Press, Nottingham. 1:1–11.

Giannenas I., Papaneophytou C., Tsalie E., Pappas I., Tontis D. and Kontopidis G. 2014. Dietary Supplementation of Benzoic Acid and Essential Oil Compounds Affects Buffering Capacity of the Feeds, Performance of Turkey Poults and Their Antioxidant Status, pH in the Digestive Tract, Intestinal Microbiota and Morphology. Asian Australas. Journal Animal Science. 27(2):225-236.

Hexa Research. 2016. Benzoic Acid Market Analysis, Market Size, Application Analysis, Regional Outlook, Competitive Strategies and Forecasts, 2016 To 2024. Recuperado de https://www.hexaresearch.com/research-report/benzoic-acid-market.

Jones J. and Clemmons D. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocrine Reviews. 16(1):3-34. doi: 10.1210/edrv-16-1-3.

Józefiak D., Kaczmarek S., Bochenek M. and Rutkowaki A. 2007. A note on effect of benzoic acid supplementation on the performance and microbiota population of broiler chickens. Journal of Animal and Feed Sciences. The August Cieszkowski Agricultural University of Poznań. 16:252–256. DOI: https://doi.org/10.22358/jafs/66746/2007.

Kiarie E., Voth C., Zhu C., Vingerhoeds P., Borucki S. and Squires J. 2018. Comparative efficacy

of antibiotic growth promoter and benzoic acid on growth performance, nutrient utilization and indices of gut health in nursery pigs fed corn-wheatsoybean meal diet. Department of Animal Biosciences, University of Guelph, Guelph, ON, Canada. 98:868–74. https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0056.

Kluge H., Broz J. and Eder K. 2005. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. DSM Nutritional Products, Animal Nutrition and Health R&D, Basel, Switzerland. 90: 316-324. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2005.00604.x.

Lazarević K., Stojanović D. and Rančić N. 2011. Estimated daily intake of benzoic acid through food additives in adult population of south east Serbia. Public Health Institute, Niš, Serbia. 19(4):228–231.

Li E., Chen L., Zeng C., Chen X., Yu N., Lai Q. and Qin JG. 2007. Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. Aquaculture. 265:385-390.

Lightner DV. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. Recuperado de https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2016005577.

Lim C. and Dominy W. 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture. 87:53-63.

Lückstädt C. 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 3:1-8, No. 044, doi: 10.1079/PAVSNNR20083044.

Lückstädt C. 2015. Ácidos orgánicos en la nutrición de salmónidos con especial énfasis en diformiato de potasio. https://www.salmonexpert.cl/article/acidos-organicos-en-la-nutricion-de-salmonidos-8211-con-especial-enfasis-en-diformiato-de-potasio-kdf/

Martínez L., Martínez M. and Cortés E. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminable?. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 25(3):183.

Mercier L., Palacios E., Campa-Córdova A., Tovar-Ramírez D. and Hernández-Herrera R. 2006. Metabolic and immune responses in pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vanammei* exposed to repeated handling stress. Aquaculture. 258: 663-640.

Morales V. and Cuéllar-Anjel J. 2008. Guía técnica: Patología e inmunologuía de camarones penaeidos. PROGRAMA CYTED ÁREA DE AGROALIMENTACIÓN RED II-D: Red *L.vannamei*. USA. 21:32.

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

Neumüller O. 1988. Römpps Chemie-Lexikon. Franckh'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart. 101(3):365-366.

Nesheim M.C. and Garlich J.D. 1963. Studies on ornithine synthesis in relation to benzoic acid

excretion in the domestic fowl. J. Nutr.79:311-317.

Newsholme F.S. and Leech A.R. 1983. Bioquímica médica. Ed. Interamericana, México. Recuperado de https://www.todostuslibros.com/libros/bioquimica-medica_978-84-7605-347-8.

Ng W.K. and Koh C.B. 2011. Application of organic acids in aquafeeds: Impacts on fish growth, nutrient utilization and disease resistance. In C. Luckstadt (Ed.), Standards for Acidifiers, Principles for the Use of Organic Acids in Animal Nutrition, Nottingham, UK: Nottingham University Press. 66:49–58.

Oliva M., García E. and Valderrama S. 1989. Variaciones de los lípidos tisulares durante la vitelogénesis en camarón Rosado *Penaeus notialis*. Universidad de La Habana, Centro de Investigaciones Marinas, La Habana. Cuba. 3: 269-278. Recuperado de https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-de-investigaciones-marinas/34.

Olmo A., Calzada J. and Nuñez M. 2015. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure and controversy. Critical reviews in food science and nutrition. 57: 3084-3103. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087964.

OMS. 2000. Benzoic acid and sodium benzoate. Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva pp 52. Recuperado de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42310/924153026X.pdf

OMS. 2018. Aditivos alimentarios. Recuperado de https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-additives.

Pan L., Zhang L. and Liu H. 2007. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquaculture. 273:711- 720.

Pérez-Alvarado M., Cervantes-López J., Braña-Varela D., Mariscal-Landín G. and Cuarón-Ibargüengoytia J. 2013. Ácido benzoico y un producto basado en especies de *Bacillus* para proteger la productividad de los lechones y al ambiente. Nutritional Products México S.A. de C.V. México. 4(4):447-468.

Puello-Cruz A.C. 2013. Manual de uso de calorimetría. Laboratorio de Nutrición y Organismos Vivos No Convencionales. CIAD. Mazatlán. México. 6.

Roth F.X. and Kirchgessner M. 1998. Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects, Journal of Animal and Feed Sciences. 7:25–33, https://pdfs.semanticscholar.org/05b3/2d90cf4fa00766d625b099c9c5fe4eb7f61f.pdf

Qi Pign, Hong H., Liang X. and Liu D. 2009. Assessment of benzoic acid levels in milk in China. Institute of Food Industry Hygiene Inspection, Guangzhou, Guangdong Province, China. Food control. 20: 414-418.

Qualley A., Widhalm J.R., Adebesin F., Kish C.M. and Dudareva N. 2012. Completion of the core β-oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants. Proceedings of the National.Academy of Sciences of the United States. 109(40):188.

Sieber R., Bütikofer U. and Bosset J.O. 1995. Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. International Dairy Journal, 5(3), 227–246.

Skjermo J., Størseth T.R., Hansen K., Handa A. and Øie G. 2006. Evaluation of -glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and

weaning of Atlan-tic cod (*Gadus morhua* L.). Recuperado de https://pdfs.semanticscholar.org/0a42/44a5129457c56efff7699878d26592a1d5.pdf.

SPINREACT. 2016. Determinación cuantitativa de lípidos totales. Recuperado de www.spinreact.com.mx.

Stadtlander T., Khalil W.K.B., Focken U. and Becker K. 2013. Effects of low and medium levels of red alga Nori (*Porphyra yezoensis Ueda*) in the diets on growth, feed utilization and metabolism in intensively fed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture Nutrition. 19(1):64–73.

Stround G. and Delgarno E. 1982. Wild and farmed lobsters (*Homarus gammarus*). A comparison of yield, proximate chemical composition and sensor y properties. Aquaculture. 29: 147-154.

Tapia-Salazar M., García-Pérez O., Velásquez-Soto R., Nieto-López M., Villarreal-Cavazos D., Ricque-Marie D. and Cruz-Suárez L. 2012. Crecimiento, consumo de alimento, supervivencia y respuesta histológica del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* alimentado con dietas de granos contaminados naturalmente con aflatoxinas. Ciencias. 38:3-11.

Téllez-Castañeda M. 2018. El cultivo de camarón en México, una industria con futuro II. Recuperado de https://www.eleconomista.com.mx/opinion/El-cultivo-de-camaron-en-Mexico-una-industria-con-futuro-I-20180509-0088.html.

Weber G.M., Michalczuk M., Huyghebaert G., Juin H., Kwakernaak C. and Gracia M. 2012. Effects of a blend of essential oil compounds and benzoic acid on performance of broiler chickens as revealed by a meta–analysis of 4 growth trials in various locations. Poultry Science, 91:2820–2828. doi:10.3382/ps.2012–02243.

Wenk C. 2003. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 16: 282–289. doi:10.5713/ajas.2003.282.

Wing-Keong N., Chik-Boon K., Kumar Sudesh and Siti-Zahrah A. 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp*., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture Research, 40, 1490-1500.

Wing-Keong N. and Chik-Bon K. 2016. The utilization and mode of action of organic acid in the feed of culture aquatic animal. Aquaculture Research. 9:1-27. https://doi.org/10.1111/raq.12141.

Xiao S.Q., Li S., Zhang J.B., Zhang S.M., Dai L.S., Bao Y.H., Jiang N., Gao Y., Zhao Z.L. and Chen Y. 2009. Cloning and characterization of class 1 and class 2 insulin-like growth factor-I mRNA in Songliao black pig. Molecular Biology Reports 36:415–421.

Zarad S., Nitin R., Kishor R., Maheshwari S. and Devang M. 2017. Analytical Validation and Comparative Study of HPLC, Spectrophotometric and Titration Method for Determination of Benzoic Acid in Food Products Asian Journal of Chemistry; Vol. 29, No. 7: 1565-1568.

Zuo Y., Wang C. and Zhan J. 2002. Separation, characterization and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. Journal of Agriculture and Food Chemistry 50(13):3789-3794.

12. ANEXO 1

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR (LDM)

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, AC.
Av. Sábalo-Cerritos, S/N, Estero El Yugo, CP 82112, Mazatlán, Sinaloa
Tel. (669) 989 87 00 y 06, Fax. (669) 989 87 01 y 989 87 06

INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

Número de Informe:	20-23	Fecha Recepción de Muestra:	2020-05-20
Folio de Muestra(s):	20-047	Fecha de Ejecución de Análisis:	2020-05-21

DATOS DEL CLIENTE

Nombre del Cliente:	Ana C. Puello Cruz		
Empresa, Entidad o UPA:	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.		
Domicilio:	Av. Sábalo Cerritos s/n Mazatlán, Sinaloa. CP 82100		
Teléfono:	669 989 8700	e-mail:	puello@ciad.mx
Con atención a:	Ana C. Puello cruz		

MÉTODO DE DETECCIÓN UTILIZADO	Técnico Analista Responsable
PRP-002: Procedimiento para la detección de patógenos por PCR Tiempo Real. Acreditado por ema (SA-0672-024/15) y Aprobado por SENASICA (D-005) para: *WSSV (EMB), IHHNV (NHHI), TSV (ST) y NHPB (NHP)*. Método basado en el Manual de Pruebas de Diagnóstico para Animales Acuáticos. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).	Alejandra Sarahí Díaz Sánchez

RESULTADOS *

Número Muestra	Descripción de la Muestra	Patógeno Analizado		
		TSV	IHHNV	WSSV
01	Camarón (organismo entero)	ND	ND	ND

* D: Detectado; ND: No Detectado; NA: No Analizado; NAm: No amplificado.

WSSV: Virus de la Mancha Blanca. **IHHNV:** Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa. **NHPB:** Bacteria Hepatopancreatica Necrotizante. **TSV:** Virus del Síndrome de Taura.

"Este informe muestra únicamente los resultados obtenidos de las pruebas analíticas solicitadas para las muestras aquí enlistadas tal como fueron recibidas, las cuales fueron proporcionadas, suministradas y especificadas por el cliente y acordadas en la cotización o costo de análisis respectivo; por lo cual, este informe y la información contenida en él NO constituye un certificado del estado de salud de la población de donde fue tomada la muestra"

"De acuerdo a lo establecido en el Artículo 151 de la 'Ley Federal de Sanidad Animal' y el 'ACUERDO mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos' vigentes, el LDM debe proporcionar al SENASICA a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE), copia de este informe o brindar información clave contenida en él, en los casos donde se reporten patógenos como DETECTADOS y/o SOSPECHOSOS".

"Queda prohibida la reproducción parcial o total de este informe de resultados sin previa autorización escrita del CIAD y del LDM"

ema
LABORATORIO DE ENSAYO
ACREDITADO SA-0672-024/15
Vigente a partir de: 2015-10-15

MC. Leobardo Montoya Rodríguez
Director Técnico
01 (669) 989 8700, ext:276