

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**AVANCES EN EL DESARROLLO DE NUTRACÉUTICO  
A BASE DE MACROALGAS PARA EL CONTROL DE NECROSIS  
HEPATOPANCREÁTICA AGUDA EN CAMARÓN *Litopenaeus vannamei***

**POR:**

**QBP. DENISSE ANABEL GONZÁLEZ COLUNGA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN NUTRICIÓN Y  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS PARA ORGANISMOS ACUÁTICOS**

**2021**

**AVANCES EN EL DESARROLLO DE UN NUTRACÉUTICO  
A BASE DE MACROALGAS PARA EL CONTROL DE  
NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA AGUDA  
EN CAMARÓN *Litopenaeus vannamei***

**Comité de Tesis**

---

Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez  
Presidente

---

Dr. Martha Guadalupe Nieto López  
Secretario

---

Dra. Mireya Tapia Salazar  
Vocal 1

---

Dr. David Villarreal Cavazos  
Vocal 2

---

Dra. Maribel Maldonado Múñiz  
Vocal 3

---

Dra. Katiushka Arévalo Niño  
Subdirector de Posgrado

**AVANCES EN EL DESARROLLO DE UN NUTRACÉUTICO**

**A BASE DE MACROALGAS PARA EL CONTROL DE**

**NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA AGUDA**

**EN CAMARÓN *Litopenaeus vannamei***

**Dirección de tesis**



---

Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez  
Director



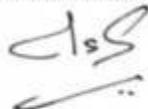
---

Dr. Bruno Gómez-Gil Rodríguez Sala  
Asesor externo



---

Dra. Sonia A. Soto Rodríguez  
Asesor externo



---

Dr. Joseph Selvin  
Asesor externo

## **AVISOS DERECHOS DE AUTOR**

**DERECHOS RESERVADOS©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) a través de los proyectos:

- 1) Evaluación multidisciplinaria del potencial nutracéutico de macroalgas en camarones y murinos y su repercusión en el manejo de enfermedades bacterianas y metabólicas Ciencia Básica #2014-238458. Responsable: Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez.
- 2) Development of anti-infective molecules from marine bacteria to target virulence cascade and biofilm of pathogenic vibrios. Convocatoria Conjunta de Movilidad 2015 México-India (CONACYT-DST) proyecto de colaboración bilateral Mexico India FONCICYT-CONACYT 2015-265613) Responsables: Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez y Dr. Joseph Selvin, University of Pondicherry.

Beca de posgrado CONACyT. No de registro:290695 CVU 514833

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES

Parte del presente trabajo fue presentado en forma de cartel en los siguientes congresos y eventos:

- 1) González-Colunga D., Nieto-López M.G., Maldonado-Muñiz M., Gutiérrez-Uribe J., Selvin J, Seghal-Kiran G., Soto S., Cruz-Suárez L.E. (2017). Screening of extracts of Mexican seaweed against *Vibrio parahaemolyticus* causative of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in cultivated shrimp. 6th Congress of the International Society for Applied Phycology ISAP. Nantes, Francia. Junio 18-23 del 2017.
- 2) González-Colunga D., Maldonado-Muñiz M., Gutiérrez-Uribe J., Selvin J., Ricque-Marie D., Cruz-Suárez L.E. (2018). An *Ecklonia arborea* phlorotannins rich extract as potential feed additive against *Vibrio parahaemolyticus* causative of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in farmed shrimp. 18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. Junio 3-7 2018. Gran Canarias, España.

También, se publicó 1 artículo científico en la revista: *Journal of Applied Phycology* (FI 3.217)

- 1) González-Colunga, D., Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Uribe, J.A. & Cruz-Suárez, L.E 2019. Bioactivity-guided identification of anti-AHPND (acute hepatopancreatic necrosis disease) metabolites of *Ecklonia arborea*. *Journal of Applied Phycology* 31, 3189–3199. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01818-5>

Se realizó una estancia del 01 al 15 de abril 2017 en la Universidad de Pondicherry, India.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que contribuyeron a la realización de este proyecto. Comenzando con mi directora de Tesis, la Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez por haber confiado en mí, por sus innumerables enseñanzas, y su compromiso, por su rigor que me ayudo al éxito en trayectoria de este proyecto. A todo mi comité de tesis conformado por la Dra. Martha Nieto, Dra. Mireya Tapia, y Dr. David Villarreal, por ser parte de mi desarrollo profesional y personal, por vivir y superar a mi lado los desafíos presentados en el camino de la realización de este proyecto. Una especial mención a la Dra. Maribel Maldonado, por su apoyo en toda la parte experimental, el acompañamiento y realización de desafíos. Rubén Estrada por sus aportaciones en la realización de bioensayos. Al Dr. Denis Ricque Marie, por su apoyo en el diseño experimental de los ensayos por sus críticas constructivas en su área de conocimiento y por su apoyo en la revisión de esta tesis. Al Dr. Sergio M. Salcedo por su ayuda en la identificación de las especies de algas.

Una mención muy especial a mis amigos y compañeros del Centro de Biotecnología FEMSA del Tecnológico de Monterrey por su colaboración, en especial a la Dra. Janeth Gutiérrez Uribe y la Dra. Marilena Antunes, gracias a sus aportaciones se llevó la culminación de mucho trabajo en una publicación científica.

Sin dejar de agradecer al Dr. Bruno Gómez-Gill y Dra. Sonia Soto, del CIAD Mazatlán, por su disposición y apoyo en la capacitación e implementación de técnicas de desafíos infecciosos en el programa Maricultura, así como su apoyo incondicional para la realización de este proyecto.

Al Dr. Joseph Selvin y a la Dra. Seghal Kiran de la Universidad de Pondicherry, India, por su asesoría y enseñanza en las técnicas de motilidad y actividad inhibidora de biofilm de bacterias.

A todos mis compañeros del programa Maricultura, por su incondicional apoyo y guía en las innumerables pruebas tanto académicas como espirituales, que implicó la realización de este proyecto.

## **DEDICATORIAS**

Dedico este trabajo principalmente, a mis padres F. Javier González y Ramona Colunga por inculcar en mí el deseo de superación a través de la educación y porque siempre me guiaron y apoyaron en mis decisiones, también a mis hijos quienes son la razón del deseo de superación y la fuerza que necesito para salir a flote, en las adversidades de la vida. A mi amado esposo Carlos Estrada, gracias a tu apoyo incondicional pude llevar a cabo mi realización profesional.

Finalmente, a cada persona que tuvo un impacto en mi vida y en la realización de este proyecto, por confiar en mí y hacer de lo imposible lo posible. El que persevera alcanza.

## ÍNDICE

AVISOS DERECHOS DE AUTOR .....	III
FINANCIAMIENTO .....	IV
PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES .....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
DEDICATORIAS .....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABLAS.....	XVII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XIX
RESUMEN .....	XX
ABSTRACT.....	XXI
1.-INTRODUCCIÓN .....	1
2.-ANTECEDENTES .....	3
2.1.- Producción de camarón .....	3
2.2.-Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática aguda (AHPND).....	3
2.2.1.-Patogénesis de AHPND en camarón.....	5
2.2.2.-Estrategias de manejo contra AHPND.....	6
2.2.2.1-Alternativas utilizadas para combatir AHPND.....	7
2.3.- Aplicaciones de las algas marinas y su potencial antibacteriano .....	7
2.3.1-Las algas marinas en México .....	8
2.3.2.- Actividad antibacteriana de compuestos extraídos de algas marinas pardas --	9
2.3.3. Extracción de compuestos activos de algas marinas .....	12
2.3.3.1.- Determinación de actividad antibacteriana de metabolitos activos .....	13
2.3.3.2.-Identificación de compuestos activos .....	13
2.3.3.2.1.-Purificación de compuestos activos .....	14
2.4.- Aplicación de extractos de algas marinas como aditivo en dietas para camarón para combatir enfermedades bacterianas.....	17
3.-JUSTIFICACIÓN .....	20
4.-HIPÓTESIS .....	21
5.-OBJETIVO GENERAL .....	22
5.1.-Objetivos específicos .....	22
6.-MATERIAL Y MÉTODOS.....	23

6.1.- Recepción, identificación y procesamiento de las algas marinas -----	23
6.2.- Obtención de extractos crudos de algas-----	26
6.2.1.- Selección de solvente-----	26
6.2.2.- Selección de método de extracción-----	27
6.2.2.1.- Extracción fría-----	27
6.2.2.2.- Extracción caliente -----	27
6.3.- Evaluación de extractos crudos de las algas -----	27
6.3.1.-Actividad antibacteriana-----	27
6.3.1.1.- Bacteria de prueba y método de criopreservación-----	27
6.3.1.2.- Activación de la cepa <i>V. parahaemolyticus</i> M09-04-----	28
6.3.1.3.-Ensayo de difusión en discos -----	28
6.3.1.4.-Ensayo de difusión en pozos-----	29
6.3.1.5.- Ensayo de microdilución en placa -----	29
6.4.-Evaluaciones <i>in vivo</i> del Extracto Crudo (EC) del alga seleccionada -----	30
6.4.1.-Ensayo de toxicidad en nauplios de Artemia -----	30
6.4.2.- Bioensayos en camarón con EC del alga seleccionada -----	31
6.4.2.1.-Condiciones experimentales generales en los bioensayos realizados en Programa Maricultura-----	31
6.4.2.1.1.- Sala de bioensayos-----	31
6.4.2.1.2.- Calidad de agua -----	32
6.4.2.1.3.-Animales experimentales -----	32
6.4.2.1.4.- Distribución de los camarones al inicio de los bioensayos -----	33
6.4.2.1.5.-Tiempo de adaptación previo a los bioensayos de desafío -----	33
6.4.2.2.- Bioensayo 1: efecto en consumo y toxicidad (72h) -----	33
6.4.2.3.-Bioensayo 2: efecto en crecimiento (28 días). -----	35
6.4.2.4.- Bioensayo 3: preliminar a bioensayo de desafío, efecto histológico de dosis alta (1000mg de EC/ Kg de biomasa de camarón) -----	36
6.4.2.5.- Bioensayo 4: desafío dosis de 100 mg EC de <i>E. arborea</i> /Kg de biomasa de camarón -----	38
6.5.-Caracterización de compuestos del EC del alga seleccionada ( <i>E. arborea</i> ) -----	40
6.5.1.- Análisis fitoquímico preliminar del EC de <i>E. arborea</i> -----	40
6.5.2.-Análisis proximal y contenido de compuestos fenólicos totales en el EC del alga seleccionada ( <i>E. arborea</i> ) -----	41
6.5.3.- Identificación y cuantificación de compuestos del EC de <i>E. arborea</i> -----	41

6.5.4.-Obtención de fracción soluble en Acetato de etilo del EC de <i>E. arborea</i> ----	42
6.6.- Evaluación de la fracción extraída en acetato de etilo (FAE) de <i>E. arborea</i> ----	43
6.6.1.- Evaluación de toxicidad en <i>Artemia</i> de FAE de <i>E. arborea</i> -----	43
6.6.2.- Bioensayos en camarón con dieta adicionada con FAE de <i>E. arborea</i> -----	43
6.6.2.1.-Bioensayo 5: evaluación de toxicidad en camarones de alimento con FAE del alga <i>E. arborea</i> -----	44
6.6.2.2.- Bioensayos de desafío en camarón con dietas suplementadas con FAE	45
6.6.2.2.1.-Sala de desafíos del Programa Maricultura -----	45
6.6.2.2.2.-Determinación de dosis de biomasa infectiva (volumen de inóculo) para desafío por baño en Programa Maricultura-----	45
6.6.2.2.3.-Bioensayo 6: desafío en camarones alimentados con FAE a dosis de 0.5, 1 y 2 mg de extracto FAE/ Kg de biomasa de camarón -----	47
6.7.- Caracterización química de la FAE -----	49
6.7.1.-Cuantificación de florotaninos en FAE de <i>E. arborea</i> mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) -----	49
6.7.2.-Identificación de florotaninos en FAE de <i>E. arborea</i> por cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC / MS-TOF) -----	49
6.7.3.-Aislamiento de florotaninos por cromatografía de partición centrífuga preparativa (FCPC) -----	49
6.7.3.1.-Selección del sistema solvente bifásico para cromatografía de partición centrífuga (FCPC)-----	49
6.7.3.2.- Equipo-----	50
6.7.3.3- Preparación del sistema solvente bifásico y la solución muestra-----	50
6.7.3.4.-Procedimiento de separación por cromatografía de partición centrífuga (FCPC)-----	50
6.7.3.5.-Purificación de eckol-----	51
6.7.4.-Actividad antibacteriana de los distintos compuestos obtenidos -----	51
6.8.- Mecanismo de acción de FAE de <i>E. arborea</i> -----	51
6.8.1.-Inhibición de quórum- sensing-----	51
6.8.2.- Actividad antibiofilm mediante microscopia láser confocal -----	52
7.- RESULTADOS -----	53
7.1.-Actividad anti <i>V. parahaemolyticus</i> (M0904) de extractos crudos obtenidos con diferentes solventes de algas -----	53

7.2.- Actividad anti <i>V. parahaemolyticus</i> (M0904) de extractos acetónicos de las algas obtenidos con extracción en frío (temperatura ambiente) y con calor evaluados mediante ensayos en discos y en pozos. -----	54
7.3.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acetónico de <i>E. arborea</i> -----	56
7.4.-Evaluaciones del EC de <i>Ecklonia arborea</i> -----	57
7.4.1.-Ensayo de toxicidad en <i>nauplios</i> de <i>Artemia</i> EC de <i>Ecklonia arborea</i> -----	57
7.4.2.- Bioensayos en camarón con dieta adicionada con EC de <i>Ecklonia arborea</i>	57
7.4.2.1.- Bioensayo 1: Prueba de consumo y toxicidad de alimento con extracto EC del alga <i>E. arborea</i> (72 horas)-----	58
7.4.3.- Bioensayo 2: crecimiento en camarones alimentados con el extracto EC de <i>E. arborea</i> (28 días)-----	58
7.4.3.1.-Biomasa-----	59
7.4.3.2.-Tasa de crecimiento -----	60
7.4.3.3.-Sobrevivencia -----	60
7.4.3.4.-Consumo de alimento-----	60
7.4.3.5.-Tasa de conversión alimenticia (TCA) -----	61
7.4.4.-Evaluación de dosis de EC de <i>E. arborea</i> para ensayos de desafío-----	62
7.4.4.1- Bioensayo 3: Efecto histológico de dosis alta (1000mg de EC/ Kg de biomasa de camarón)-----	62
7.4.5.- Bioensayo 4: Desafío bacteriano con Vp M0904 AHPND+ en camarones alimentados con la dosis seleccionada (100 mg EC/Kg de biomasa de camarón) de <i>Ecklonia arborea</i> -----	63
7.4.5.1.- Condición de salud inicial de los camarones-----	63
7.4.5.2.-Distribución de los organismos-----	64
7.4.5.3.-Alimentación con dietas experimentales -----	64
7.4.5.4.-Medición de parámetros fisicoquímicos de calidad de agua-----	64
7.4.5.5.-Cuenta viable (Preparación de inóculo) -----	64
7.4.5.6.-Observaciones y mortalidades del desafío -----	64
7.4.5.7.-Análisis estadístico. -----	67
7.4.5.8.- Análisis Histológico-----	68
7.4.5.8.1.- Análisis histológico de camarones alimentados durante 7 días con la dosis de 100mg EC de <i>E. arborea</i> / Kg de biomasa de camarón. -----	68

7.4.5.8.2.- Análisis histológico de camarones alimentados con la dosis de 100mg EC de <i>E. arborea</i> / Kg de biomasa de camarón e infectados con Vp. AHPND+	69
7.5.- Caracterización y fraccionamiento del extracto crudo (EC)	72
7.5.1.- Análisis fitoquímico preliminar del EC de <i>E. arborea</i>	72
7.5.2.-Análisis proximal del EC de <i>E. arborea</i>	72
7.5.3.-Caracterización de compuestos en EC de <i>E. arborea</i>	72
7.5.3.1.-Identificación y cuantificación	72
7.6.-Evaluación de la FAE de <i>E. arborea</i>	75
7.6.1.- Rendimiento y actividad antibacteriana de las fracciones del EC de <i>E. arborea</i>	75
7.6.2.-Ensayo de toxicidad en <i>Artemia</i> de la FAE de <i>Ecklonia arborea</i>	75
7.6.3.- Bioensayos en camarón con dieta adicionada con la FAE de <i>E. arborea</i>	75
7.6.3.1. -Análisis bromatológico del alimento control	75
7.6.3.2.- Bioensayo 5: evaluación de toxicidad en camarones de alimento con FAE del alga <i>E. arborea</i> (7días).	76
7.6.4.- Determinación de dosis infectiva para reproducir la enfermedad de AHPND en las instalaciones del programa Maricultura	76
7.6.4.1.- Condiciones del ensayo	76
7.6.4.2.- Observaciones y mortalidades durante el desafío.	76
7.6.5.Bioensayo 6: desafío bacteriano con Vp M0904 AHPND+ en camarones alimentados a dosis de 0.5, 1 y 2 mg de extracto FAE/ Kg de biomasa de camarón	78
7.6.5.1.-Condiciones del ensayo	78
7.6.5.2-Medición de parámetros fisicoquímicos de calidad de agua	78
7.6.5.2.-Observaciones y mortalidad durante el desafío.	78
7.6.4.3.4.- Análisis estadístico.	80
7.7.-Caracterización de la FAE de <i>E. arborea</i>	80
7.7.1.- Análisis proximal	80
7.7.2.-Identificación y cuantificación de los florotaninos de la FAE de <i>E. arborea</i> por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	81
7.7.3.-Selección del sistema de solventes de dos fases para separación de florotaninos de <i>E. arborea</i> utilizando la cromatografía de partición centrífuga rápida (FCPC)	84

7.7.4.-Separación de los florotaninos del alga parda <i>E. arborea</i> mediante cromatografía rápida de partición centrífuga (FCPC) y su actividad antibacteriana contra <i>V. parahaemolyticus</i> AHPN+	85
7.8.- Algunos mecanismos de acción de la FAE de <i>E. arborea</i>	89
7.8.1.-Inhibición de quórum- sensing	89
7.8.2.- Ensayos de inhibición de biofilm	89
8.-DISCUSIÓN	91
9.- CONCLUSIONES	101
REFERENCIAS	103
PERSPECTIVAS	118
ANEXO	120

## LISTA DE FIGURAS

- Fig.1.** *Penaeus vannamei* (A, B), camarón infectado con AHPND por ensayos de inmersión. Hepatopáncreas (HP) atrofiado y pálido, estómago (ST) e intestino (MG) vacíos. (C, D) camarón normal, grupo control negativo, mostrando el tamaño y color naranja obscuro normal del HP, además del estómago e intestino lleno, (B) y (C) fueron disectados individualmente de (A) y (C), respectivamente (Tran et al.2013).-----4
- Fig 2.-** Compuestos activos en algas marinas.-----10
- Fig 3.-** Estructuras químicas de diferentes tipos de florotaninos. Floroglucinol (1), Tetrafucol A (2), Tetrafllorethol B (3), Fucodiplorethol A (4), Tetrafulhalol A (5), Tetraisofulhalol (6) y Florofucofuroeckol (7) (Lopes et al., 2012).-----11
- Fig. 4.-** Modos de administración de los extractos de algas en el cultivo de peces y camarones (Vatsos y Rebours 2015).-----18
- Fig 5.-**Esquema general de procedimientos seguidos en la investigación. -----23
- Fig.6.-** Sitio de estudio: Costa de Baja California. -----24
- Fig. 7.-** Procesamiento de algas en laboratorio de Maricultura. -----25
- Fig 8.-** Sistema de acuarios de esfera de vidrio para bioensayo 1 de consumo y toxicidad del extracto crudo. -----35
- Fig 9.-** Instalaciones de la sala de desafíos pertenecientes al CIAD unidad Mazatlán. --37
- Fig 10.-** Representación de diluciones seriadas 1:10. -----40
- Fig 11.-** Obtención de fracción soluble en acetato de etilo a partir del EC.-----43
- Fig 12.-** Instalaciones de la sala de desafíos del programa Maricultura. -----45
- Fig 13. –** Halos de inhibición determinados mediante ensayo de difusión en pozos de extractos obtenidos con extracción caliente. 1: *E. arborea*, 2:*E. menziessi*, 3: *C. osmundacea*, 4: *P. californica*, 5: *S.compressa*, 6: *M. Pyrifera*.-----56
- Fig. 14.-** Halos de inhibición determinados mediante ensayos de difusión con discos de extractos obtenidos con extracción caliente. 1: *E.arborea*, 2:*E. menziessi*, 3: *C. osmundacea*, 4: *P. californica*, 5: *S.compressa*, 6: *M. Pyrifera*.-----56
- Fig 15.-** Peso promedio de *L. vannamei* a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones de EC de *E. arborea*.-----59
- Fig 16.-** Biomasa de *L. vannamei* a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones de EC de *E. arborea*.-----59

<b>Fig 17.-</b> Tasa de crecimiento de <i>L. vannamei</i> a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones de EC de <i>E. arborea</i> .-----	60
<b>Fig 18.-</b> Consumo de <i>L. vannamei</i> a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones EC de <i>E. arborea</i> .-----	61
<b>Fig 19.-</b> TCA de <i>L. vannamei</i> a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones de EC de <i>E. arborea</i> .-----	62
<b>Fig 20.-</b> Microfotografías de camarones <i>L. vannamei</i> al día 7 de alimentación con dieta experimental (1000 mg de EC). Donde se muestra en túbulos de Hp con ligera reducción de vacuolas en células R y B. -----	63
<b>Fig 21.-</b> Microfotografía del hepatopáncreas (Hp) de camarón <i>L. vannamei</i> correspondientes al bioensayo EC (100 mg de extracto/kg de biomasa). a y b Túbulos del Hp antes de la alimentación con las dietas (Día 0). -----	63
<b>Fig 22.-</b> Gráficas de porcentaje de mortalidad acumulada y número de organismos muertos por tratamiento con respecto al tiempo después de infección con Vp AHPND+.(Test+=alimento testigo, T1+= alimento experimental dosis 100mg EC/Kg de biomasa, C+= alimento experimental sin EC, + organismos infectados)-----	66
<b>Fig 23.-</b> Organismos al término del ensayo (106 h.p.i.) (C= Control, T1=100 mgEC <i>Eisenia arborea</i> /Kg de biomasa, Test= testigo, + infectado, - no infectado) a) organismos completos de cada tratamiento, b) disección de estómago, hepatopáncreas e intestino de cada tratamiento (las fotografías no representan al total de los organismos de cada uno de los tratamientos).-----	67
<b>Fig 24.-</b> Grafica de sobrevivencia de los tratamientos (T1+, T1-, Test+ y C+, C-). Análisis Kaplan-Meier (n=4) comparación de medias mediante Holm-Sidak ( $P \leq 0.05$ ). -----	68
<b>Fig 25.-</b> Microfotografía del hepatopáncreas (Hp) de camarón <i>L. vannamei</i> correspondientes al bioensayo con EC de <i>E. arborea</i> c) Tratamiento Test al día 7 de alimentación; d) Tratamiento C al día 7 de alimentación; e y f Tratamiento T1 (100 mg de EC /kg de biomasa ) al día 7, organismos sin infectar. -----	69
<b>Fig 26.-</b> Microfotografía de (Hp) de camarones <i>L. vannamei</i> moribundos entre las 9 y 10 h.p.i. en bioensayo extracto de alga (100 mg de extracto/kg de biomasa). a) Tratamiento Dc+ a las 10 h.p.i.; b) Tratamiento De a las 9 h.p.i.; c. Tratamiento Dt a las 10 h.p.i. ----	70
<b>Fig 27.-</b> Microfotografía de (Hp) de camarones <i>L. vannamei</i> sobrevivientes a las 102 h.p.i. de bioensayo extracto de alga (100 mg de extracto/kg de biomasa). a y b) Tratamiento Test+; c) Tratamiento T1+; d. Tratamiento C+; e) Tratamiento C-; f) Tratamiento T1-. Tinción hematoxilina eosina-floxina. -----	71
<b>Fig 28.-</b> a) cromatograma a 270 nm de extracto crudo de <i>E. arborea</i> . DAD. Los picos marcados con números se identificaron mediante HPLC/MS-TOF, y se muestran en la Tabla 14. -----	73

- Fig. 29.-** Selección de dosis para desafíos de infección en Programa Maricultura. Análisis de sobrevivencia de camarones infectados con 3 dosis de Vp AHPND+ (T1= 0.1mL/L, T5=0.5mL/L, T10=1mL/L) y su respectivo control (medio de cultivo estéril). Kaplan-Meier (n=3) comparación de medias mediante Holm-Sidak ( $P \leq 0.05$ ). -----77
- Fig 30.-** Gráficas de mortalidad promedio acumulada y número de organismos muertos por tratamiento en ensayo de infección donde T1 es dieta con 1mg de FAE de *E. arborea* /Kg de biomasa e camarón y C+ es dieta control. -----79
- Fig 31.-** Análisis de sobrevivencia Kaplan-Meier (n=4) de camarones infectados y no infectados con Vp AHPND+ alimentados con dieta control (C) y dieta suplementada con FAE de *E. arborea* a una dosis de 1 mg FAE / Kg de biomasa , comparación de medias mediante Holm-Sidak ( $P > 0.05$ )-----80
- Fig 32.-** Representación gráfica de la composición química de la FAE de *E. arborea*.--81
- Fig 33.-** Cromatogramas de HPLC-DAD registrados a 270 nm de la FAE de *E. arborea*. Los picos marcados con números se identificaron mediante HPLC/MS-TOF, se muestran en la Tabla 16. -----82
- Fig 34.-**Estructura química, cromatograma de iones extraídos y patrón de fragmentación de (A) eckol y (B) dieckol obtenidos mediante análisis de HPLC/MS-TOF (ESI +). Na +: aducto de sodio.-----83
- Fig 35.-** Coeficiente de partición (Kd) del eckol y dieckol durante el fraccionamiento FCPC de FAE de *E. arborea*. -----85
- Fig 36.-** Cromatogramas de HPLC-DAD registrados a 270 nm (A), cromatogramas de ELSD (B) del pool 8 de FAE obtenido por FCPC. -----86
- Fig 37.-** Cromatogramas de HPLC-DAD registrados a 270 nm de (a) pool 8 obtenidos del fraccionamiento de la FAE por FCPC utilizando el sistema de solvente constituido por n-hexano/acetato de etilo/metanol /agua (2:7: 3:7 v/v /v/v) (b) Eckol purificado por cromatografía semipreparativa y (c) AG dieckol®, producto comercial rico en dieckol. Los picos marcados con los números 4 y 6 fueron identificados tentativamente por HPLC/MS-TOF como eckol y dieckol, respectivamente.-----88
- Fig 38.-** Actividad anti-quórum-sensing de FAE y halo de inhibición de cepa CV026--89
- Fig 39.-** Imágenes de microscopía láser confocal. a) control, c) metanol 100 %, b y d) extracto FAE a concentraciones de 500 y 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente.-----90

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Métodos de separación, aislamiento, purificación e identificación de florotaninos con actividad antibacteriana de extractos de algas pardas.-----	15
<b>Tabla 2.-</b> Métodos y condiciones para cuantificar o purificar florotaninos obtenidos de algas cafés mediante HPLC.-----	16
<b>Tabla 3.-</b> Evaluación de extractos de algas marinas con actividad antibacteriana <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra <i>Vibrio</i> sp. en camarón.-----	19
<b>Tabla 4.-</b> Método de cosecha de las distintas especies de algas.-----	24
<b>Tabla 5.-</b> Identificación de las algas de estudio por el Dr. Sergio Salcedo.-----	26
<b>Tabla 6.-</b> Descripción de la cantidad de EC de <i>E. arborea</i> requerida para preparar los distintos tratamientos. -----	34
<b>Tabla 7.-</b> Descripción de dietas experimentales.-----	38
<b>Tabla 8.-</b> Diseño experimental de tratamientos para evaluación en desafío.-----	39
<b>Tabla 9.-</b> Descripción de la cantidad de FAE de <i>E. arborea</i> requerida para preparar las distintas dosis de prueba.-----	44
<b>Tabla 10.-</b> Diseño experimental del desafío de selección de dosis infectiva.-----	46
<b>Tabla 11.-</b> Descripción de los tratamientos del desafío de extracto FAE.-----	47
<b>Tabla 12.-</b> Diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de Vp M0904 de extractos fabricados con diferentes solventes de seis algas pardas (Ensayo de difusión en agar con discos). (-) sin halo de inhibición, EA: acetato de etilo A: acetona, DCM / M: diclorometano / metanol 1: 1, E: etanol, PE: éter de petróleo. ( $p>0.05$ ).-----	53
<b>Tabla 13. -</b> Actividad antimicrobiana (diámetros de halos de inhibición en mm) de extractos acetónicos de algas mexicanas contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> M09-04 AHPND + determinado mediante el ensayo de difusión en discos.-----	55
<b>Tabla 14. -</b> Actividad antimicrobiana (diámetros de halos de inhibición en mm) de extractos acetónicos de algas mexicanas contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> M09-04 AHPND + determinado mediante el ensayo de difusión en pozos.-----	55
<b>Tabla 15.-</b> Porcentaje de sobrevivencia de <i>Artemia</i> sp, a diferentes concentraciones de EC de <i>E. arborea</i> . Los datos en el ensayo 1 y 2 son representados como la media $\pm$ la desviación estándar -----	57
<b>Tabla 16.-</b> Porcentaje de prevalencia de lesiones de organismos de distintos tratamientos desafiados contra Vp. AHPND+.-----	71

<b>Tabla 17.-</b> Análisis fitoquímico preliminar del EC de <i>E. arborea</i> .-----	72
<b>Tabla 18.-</b> Caracterización de florotaninos mayoritarios en el extracto de acetona de <i>E. arborea</i> en HPLC-DAD-MS-TOF utilizando el modo de ión positivo ESI.-----	74
<b>Tabla 19.-</b> Concentración mínima bactericida (CMB) contra Vp M09-04 y rendimientos de extracción de fracciones obtenidas del alga parda <i>Ecklonia arborea</i> . Los resultados se muestran como promedio $\pm$ desviación estándar (n = 2).-----	75
<b>Tabla 20.-</b> Comparación de análisis proximal entre EC y FAE de <i>E. arborea</i> .-----	81
<b>Tabla 21.-</b> Florotaninos presentes en el EC y FAE del alga <i>E. arborea</i> .-----	84
<b>Tabla 22.</b> Valores de coeficiente de partición (Kd) de los florotaninos: eckol, dieckol, fucofuroeckol (I), y fucofuroeckol (II) en dos diferentes sistemas de solventes.-----	85
<b>Tabla 23.-</b> Concentración bactericida mínima (MBC), contenido de eckol y dieckol e incremento de bioactividad de los pools obtenidos por (FCPC) de la FAE de <i>E. arborea</i> .-----	87

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AHPND	Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (por sus siglas en inglés: acute hepatopancreas necrosis disease)
AP1 y AP2	Detección de AHPND versión 1 y 2
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
EC	Extracto crudo de <i>Ecklonia arborea</i>
EMS	Síndrome de mortalidad temprana (por sus siglas en inglés: early mortality syndrome)
FAE	Extracto enriquecido de florotaninos de <i>Ecklonia arborea</i> (fracción soluble en acetato de etilo)
LC <sub>50</sub>	Concentración requerida para producir 50% de mortalidad
PirA <sup>vp</sup> , PirB <sup>vp</sup>	Genes de toxinas presentes en <i>Vibrio parahaemolyticus</i> causante de AHPND
Vp	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Vp M0904 AHPND+	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> cepa M0904 positiva causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda
FCPC	Cromatografía Rápida de Partición Centrífuga (por sus siglas en inglés: fast centrifugal partition chromatography)
<i>K<sub>d</sub></i>	Coefficiente de partición

## RESUMEN

Una de las problemáticas actuales en camaronicultura es la mortalidad causada por cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) causantes de la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda o AHPND por sus siglas en inglés. Dentro de las estrategias implementadas sin éxito en las granjas de camarón afectadas, el uso de antibióticos ha provocado que algunas bacterias del sistema de cultivo se vuelvan resistentes; de ahí surge la necesidad de buscar productos alternos, como extractos de algas marinas pardas conocidas por poseer un potencial nutracéutico, gracias a su contenido de metabolitos con actividad antibacteriana. Este trabajo se enfocó en evaluar e identificar los compuestos activos del extracto encontrado con la mayor actividad antibacteriana contra Vp AHPND+ a partir de 6 especies de algas pardas colectadas en Baja California, México. El extracto crudo (EC) acetónico del alga *Ecklonia arborea*, obtenido mediante método Soxhlet, fue el que presentó la mejor actividad (concentración mínima bactericida (CMB), de 3500 µg/mL). El EC de esta alga presentó cierta toxicidad en *Artemia salina* y, al adicionarlo en dietas para camarón *Litopenaeus vannamei* a dosis de 1000 mg EC/Kg de camarón, se encontró una disminución en el consumo, crecimiento y daños histológicos en hepatopáncreas. A la dosis de 100 mg EC/Kg de camarón no se presentaron efectos zootécnicos negativos, pero tampoco se mejoró significativamente la sobrevivencia en camarones desafiados con Vp AHPND+. Para tratar de eliminar compuestos tóxicos, el EC fue particionado con distintos solventes, obteniendo una fracción soluble en acetato de etilo (FAE), que presentó una mayor actividad antibacteriana (CMB de 750 µg/mL). Sin embargo, la dosis de 1 mg FAE/Kg de camarón durante 7 días tampoco mejoró la sobrevivencia de camarones infectados con Vp AHPND+. La cromatografía rápida de partición centrífuga (FCPC) permitió obtener un pool con una actividad antibacteriana 10 veces mayor que la de la EC (CMB 350 µg/mL). Los florotaninos eckol (5.23 mg g<sup>-1</sup>) y dieckol (1.67 mg g<sup>-1</sup>) fueron identificados como los compuestos mayoritarios. Los resultados sugieren que la actividad bactericida de la fracción acetato de etilo de *E. arborea* se debe principalmente a la mezcla de florotaninos. El uso nutracéutico de los antibacterianos derivados de *E. arborea* para control del AHPND en camarón requiere de más estudios

## ABSTRACT

One of the current problems in shrimp farming is the mortality caused by pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) strains that cause the Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). Among unsuccessful strategies implemented in the affected shrimp farms, the use of antibiotics has caused some of the bacteria found in the culture system to become resistant; so there is a need to look for alternate products, such as extracts from brown seaweeds that are nutraceutical candidates since they are known to possess a number of metabolites with antibacterial activity. This thesis focused on the evaluation and identification of the active compounds in the extract found with the highest antibacterial activity against Vp AHPND+, from 6 brown algae species collected in Baja California, Mexico. The crude acetonetic extract (CE) from *Ecklonia arborea* algae, produced by Soxhlet extraction, showed the highest activity (minimum bactericidal concentration MBC 3500 µg/mL). *E. arborea* CE presented some toxicity to *Artemia salina* and, once incorporated to *Litopenaeus vannamei* shrimp diets at a dose of 1000 mg EC per Kg shrimp biomass, induced decreased consumption and growth, and histological damage in the hepatopancreas. However, at a dose of 100 mg EC per Kg shrimp in a challenge test with Vp AHPND+, no significant difference was found in terms of survival with respect to control. In order to eliminate toxic compounds, CE was partitioned with different solvents, resulting in a fraction soluble in ethyl acetate (FAE), which presented an improvement in its antibacterial activity with a MBC of 750 µg/mL. However, shrimp that consumed the dose of 1 mg FAE/ Kg shrimp for 7 days, fail to be protected of the mortality caused by Vp AHPND +. Fast-Centrifugal Partition Chromatography (FCPC) allowed to obtain a pool that showed an increase of 10 times the antibacterial activity (MBC 350 µg/mL) with respect to the EC. Eckol (5.23 mg g<sup>-1</sup>) and dieckol (1.67 mg g<sup>-1</sup>) were identified as the major compounds. Data suggest that bactericidal activity in the *E. arborea* FAE could be attributed to the phlorotannin's mix. More studies are required to assess the nutraceutical use of *E. arborea* antibacterial extracts to control AHPND in shrimp

## 1.-INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es una actividad sustentable a nivel mundial. En México la producción de camarón es de aproximadamente 100,000 toneladas, representando una tercera parte del volumen total de la producción acuícola nacional (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2018). Sin embargo, las enfermedades emergentes son un factor limitante, afectando directamente el volumen y costos de producción. En el caso de China, considerado uno de los mayores productores de camarón, desde el año 2012 se reportaron mortalidades en los cultivos de camarón, a consecuencia de la enfermedad de mortalidad temprana o EMS por sus siglas en inglés (Early Mortality syndrome). Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) la tasa de crecimiento anual mostró valores negativos (-1.5%) para los años 2015-2019 (GOAL, 2017). En México en el año 2013, la enfermedad de EMS afectó gravemente la producción cayendo aproximadamente a la mitad (GAA), ocasionando pérdidas económicas de millones de pesos, en las granjas del estado de Sonora y Sinaloa (Soto-Rodríguez et al. 2015).

La enfermedad de EMS fue reportada por primera vez en el año 2009 en Asia, y en el año 2011 se cambió el nombre a Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND por sus siglas en inglés). Esta enfermedad afecta a las especies *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus monodon*, y causa mortalidad por daño celular en el hepatopáncreas producida por la toxina producida por diferentes cepas de *Vibrio parahaemolyticus*. El uso de antibióticos, comúnmente administrados a través de alimentos medicados o por inmersión, no es una opción ya que éstos provocan resistencia bacteriana y acumulación de residuos en el camarón y en el sedimento de las granjas. De hecho, los residuos de antibióticos en los organismos son penalizados por la Administración de Alimentos y Medicamentos o la Food and Drug Administration o (FDA por sus siglas en inglés).

Por esta razón, se ha incrementado la demanda de nuevas alternativas para combatir enfermedades bacterianas en la camaronicultura y muchas investigaciones se han enfocado en el uso de productos naturales. Los compuestos fitoquímicos de origen terrestre ya han sido ampliamente explotados, pero una alternativa adicional la constituye

el ecosistema marino que es una gran fuente de compuestos bioactivos. Particularmente la investigación de las algas marinas como fuente de nutraceuticos se ha intensificado en los ultimos años debido a sus diversas actividades biológicas entre las cuales destaca la actividad antibacteriana (Abu-Ghannam y Rajauria, 2013).

En México contamos con extensos recursos algales. La costa del Pacífico de Baja California Occidental se caracteriza por tener una biodiversidad excepcional contribuyendo con un 67% del total de especies registradas en México (Pedroche y Senties 2003). A pesar del gran recurso con el que se cuenta, solo pocas especies son explotadas y su uso es principalmente para la producción de ficocoloides como alginatos, agar y carragenanos (Instituto Nacional de Pesca, 2000). En contraste, en las Costas del Pacífico en Asia las algas marinas son ampliamente usadas como fuente de compuestos farmacológicos. Las algas marinas en México también podrían aprovecharse de manera más exhaustiva para la producción de nutraceuticos; en especial algunas especies de algas pardas que se encuentran presentes durante todo el año y son muy abundantes.

El potencial nutraceutico de las algas marinas se acentúa debido a su disponibilidad, bajo costo y biocompatibilidad; y aunque su uso ya se ha reportado para el manejo de enfermedades en el cultivo de camarón en India y Asia (Selvin y Lipton 2004; Immanuel et al. 2004; Huang et al. 2006) en México esta aplicación ha sido poco estudiada y desarrollada. Por lo anteriormente mencionado, el objetivo del presente trabajo fue investigar el potencial antibacteriano de algunas algas pardas mexicanas contra *V. parahaemolyticus* AHPND+, y su uso como nutraceutico en dietas para el camarón blanco *L. vannamei*, para el control del AHPND.

## 2.-ANTECEDENTES

### 2.1.- Producción de camarón

En el año 2017 la producción mundial de cultivo de camarón fue estimada entre 2.9 y 3.5 millones de toneladas (<http://www.fao.org/in-action/globefish/marketreports/resource-detail/es/c/1136583>). En México, la producción de camarón por acuicultura es una actividad sustentable para los productores, contando con mil 382 granjas de camarón (71 mil 442 hectáreas) específicamente de la especie *Litopenaeus vannamei*, ubicadas principalmente al noroeste del país. En términos de producción, se ha mantenido arriba de 100,000 toneladas desde el año 2015 (Anderson, Valderama, Jorry, 2019), solo para el año 2016 se cultivaron 129,049 toneladas, representando una tercera parte del volumen total de la producción acuícola nacional, superando en términos de valor a otras especies comerciales como tilapia, atún, ostión y trucha (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2018).

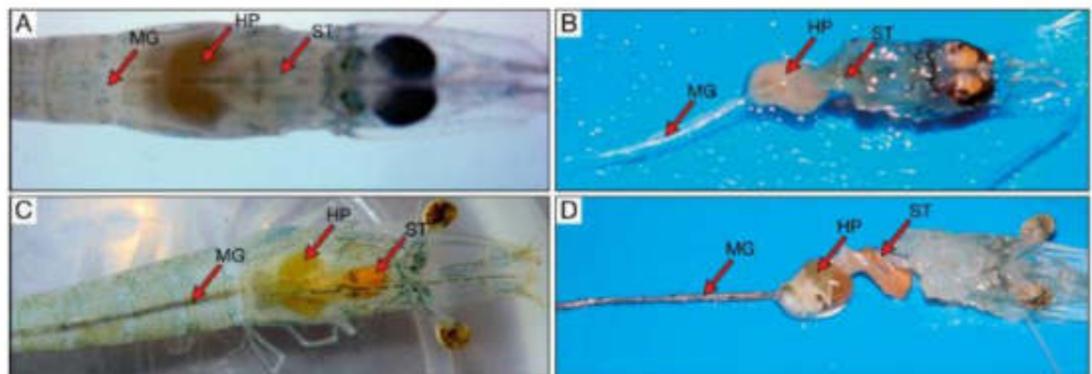
### 2.2.-Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática aguda (AHPND)

Uno de los más importantes problemas en la producción de animales acuáticos es la salud y el manejo de enfermedades. Las enfermedades afectan el cultivo de camarón en las granjas del mundo, ocasionando pérdidas millonarias que van en aumento cada año. El Síndrome de la necrosis hepatopancreática (AHPNS) afecta a las especies de *Penaeus monodon* y *Litopenaeus vannamei*, se caracteriza por mortalidades masivas, alcanzando en algunos casos hasta un 100% en estanques afectados, durante los primeros 10-30 días de cultivo y pocos días después de los primeros signos de la enfermedad; causa enormes pérdidas monetarias en el sector de producción de camarón. Según lo declarado por la Global Aquaculture Alliance (Reantaso y Gomez-Gil, 2013), las pérdidas estimadas debidas a EMS / AHPND para el cultivo de camarón en Asia, fueron de US \$ 1000 millones.

Esta enfermedad, causó pérdidas económicas significativas entre los productores de camarón de China y las Isla Hainan en 2009, esparciéndose por Vietnam y Malasia en 2011 (Lightner et al. 2012) y llegando a Tailandia en 2012 (Flegel, 2012; Thadtapong et al., 2020). En 2012, se diseminó por el noroeste de México, especialmente en los estados del norte (Sonora y Sinaloa), produciendo una disminución del 65% en la cantidad de

camarón *L. vannamei* producido en 2013, en comparación con el año 2011 (Nunan et al. 2014).

Los camarones infectados presentan signos clínicos como; nado errático, aletargamiento, crecimiento reducido, estómago e intestinos vacíos, hepatopáncreas atrofiado con coloración pálida o blanquecina (Fig. 1), y como consecuencia, se produce mortalidad a los 60 días de cultivo (Tran et al. 2013).



**Fig.1.** *Penaeus vannamei* (A, B), camarón infectado con AHPND por ensayos de inmersión. Hepatopáncreas (HP) atrofiado y pálido, estómago (ST) e intestino (MG) vacíos. (C, D) camarón normal, grupo control negativo, mostrando el tamaño y color naranja obscuro normal del HP, además del estómago e intestino lleno, (B) y (C) fueron disectados individualmente de (A) y (C), respectivamente (Tran et al. 2013).

Al principio el origen de la enfermedad era desconocido y las hipótesis eran muy diversas, algunas apuntaban a una amplia gama de agentes como plaguicidas, contaminación, alimentación, parásitos, algas nocivas, probióticos, endogamia, etc., por lo que se consideró como una enfermedad idiopática, es decir, no se sabía si la causa era infecciosa o tóxica. Los primeros estudios fueron publicados por el Profesor Donald V. Lighter y su equipo del laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona (APL/UAZ), los cuales reportaron la primera aparición en el sureste de China y las Islas Hainan en 2010 y subsecuentemente en Viet Nam y Malaysia en 2011. En el año 2013, aislaron el agente causal en cultivo puro e iniciaron pruebas de desafío por inmersión para los estudios de infectividad. Lograron inducir mortalidades del 100%, con la patología EMS / AHPNS típica en camarón expuesto al agente patógeno, encontrando en los análisis histológicos que las lesiones eran idénticas a las encontradas en muestras recolectadas de camarones

infectados (Tran et al. 2013). Con el conocimiento de que EMS / AHPNS tenía una etiología bacteriana, por varias cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, se cambió el nombre a enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND).

### **2.2.1.-Patogénesis de AHPND en camarón**

El patógeno se introduce en el camarón por vía oral colonizando el tracto digestivo, produciendo toxinas que causan la fase aguda, conocida por producir una disfunción de las células del hepatopáncreas (HP), en donde se destruyen las células E, R, F y B y se produce desprendimiento de las células epiteliales tubulares causando infiltración hemocítica y necrosis del HP. En la fase terminal, adicionalmente se presenta una infección secundaria bacteriana masiva (Tran et al. 2013).

*V. parahaemolyticus* es una bacteria oportunista presente en el medio marino, sin embargo, las cepas causantes de AHPND se volvieron virulentas, probablemente debido a una serie de eventos de recombinación para obtener resistencia a antibióticos, a través de plásmidos y / o elementos genéticos móviles (Han et al. 2015). Debido a la importancia del patógeno, varios investigadores han estudiado los mecanismos de virulencia, encontrando un plásmido extracomosomal (~ 63 e 69 kbp) solo en las cepas causantes de AHPND, a este plásmido se le denominó pVA1, y contiene los genes de toxinas PirA y PirB (PirA<sup>vp</sup>, PirB<sup>vp</sup>) denominados así por su origen, ya que son similares a toxinas relacionadas con insectos *Photobacterium* (Pir) (Han et al. 2015). En la investigación realizada por Lai et al. (2015) observaron en camarones que fueron desafiados con bacterias causantes de AHPND que inicialmente la bacteria colonizó el estómago, donde comenzó a producir la toxina PirAB<sup>vp</sup> sin embargo, 6 horas post-infección se detectó la toxina PirB<sup>vp</sup>, pero no la toxina PirA<sup>vp</sup>. Aunque en estudios previos, se ha demostrado que ambos componentes de la toxina binaria PirAB<sup>vp</sup> son necesarios para inducir un efecto tóxico, se infiere que solo PirB<sup>vp</sup> puede ser suficiente para causar daño celular. La síntesis de las toxinas solo tiene lugar cuando las bacterias llegan a cierta concentración, por lo que productos que inhiben la formación de biofilms y el quorum sensing pueden ser nutraceuticos efectivos para controlar la mortalidad causada por esta enfermedad.

### **2.2.2.-Estrategias de manejo contra AHPND**

El uso de antibióticos a través de alimentos medicados o por inmersión, fue una medida inadecuada usada para combatir la enfermedad en cultivos de camarón, ya que ambos métodos provocan un impacto directo en el entorno. El uso de antibióticos es regulado, sin embargo, los niveles actuales de uso de antibacterianos en la acuicultura en todo el mundo no son fáciles de determinar, debido a que los países difieren en los sistemas de distribución y registro. En México la norma NOM-EM-006-PESC-2004, establece los requisitos de sanidad acuícola para la producción y movilización de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos y subproductos, así como para su introducción a los Estados Unidos Mexicanos, también regula el uso de antibióticos permitidos, así como su dosis en cultivo de camarón. Los antibióticos más utilizados para contrarrestar las enfermedades producidas por bacterias del género *Vibrio* son oxitetraciclina (OTC), florfenicol (FFC), fosfomicina, mononensina, sarafloxacin (SARA) y enrofloxacin (ENRO) (Romero et al. 2012).

Otro factor limitante del uso de los antibióticos es la acumulación de residuos en los tejidos de camarón que pueden alterar la flora intestinal y provocar problemas de intoxicación o alergias en el consumidor (Santiago et al. 2009). Además, los residuos en los organismos no están aprobados por las políticas de cero tolerancia de la Administración de Alimentos y Medicamentos de E.U.A., o la Food and Drug Administration (FDA).

Los riesgos para la salud pública relacionados con el uso de antimicrobianos en la acuicultura incluyen el desarrollo y la diseminación de bacterias resistentes a los antimicrobianos debido a genes de resistencia, así como la presencia de residuos antimicrobianos en los productos de la acuicultura y el medio ambiente (Romero et al. 2012). Se ha encontrado resistencia a varios antibióticos en cepas de *V. parahaemolyticus* causantes de AHPND (Lai et al. 2015). Para el caso de cepas provenientes de México, se ha reportado resistencia a tetraciclina conferida por la presencia del gen tetB (Han et al. 2015), adicionalmente se ha estudiado la respuesta fisiológica e inmune de camarones durante la fase aguda de AHPND, y la eficacia de oxitetraciclina (OXI) y florfenicol (FF) para eliminar el patógeno causante de la enfermedad, encontrando que ninguno de los

antibióticos *per se* elimina a la bacteria y ambos antibióticos desarrollaron un efecto negativo sobre su virulencia.

### **2.2.2.1-Alternativas utilizadas para combatir AHPND**

A consecuencia de la problemática con los antibióticos, ha surgido la necesidad de crear tratamientos alternativos para controlar la enfermedad, como la implementación de fagoterapia (Jun et al. 2016), el uso de probióticos (Pinoargote y Ravishankar 2018), predadores de bacterias *Bdellovibrio* (Kongrueng et al. 2017), nanopartículas (Maldonado-Muñiz et al. 2020), formulaciones a base de mezclas de hierbas (Jha et al. 2017) así como extractos de productos naturales como Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) (Chaweepeak et al. 2015). Recientemente, se demostró que el consumo de proteínas (lectinas y phycobiliproteínas) extraídas del alga roja *Gracilaria fisheri* (GPE), aumentó la sobrevivencia de los camarones *L. vannamei* después de una infección con *V. parahaemolyticus* AHPND<sup>+</sup>, manteniendo características histológicas normales en hepatopáncreas y una expresión mínima del gen de la toxina AP3 (Boonsri et al. 2017). Así mismo, una mezcla de algas y probióticos (una combinación de *Bacillus* B2 y 20 mg / ml de algas rojas *Gracilaria* sp.) se reportó como una alternativa a los antibióticos para controlar el brote de AHPND (Lim et al. 2019) ya que mostró una inhibición sinérgica de la cepa de *V. parahaemolyticus* 3HP *in vitro* y en ensayos de desafío en camarones también redujó significativamente la mortalidad.

Aunque la literatura empieza a evidenciar el potencial del desarrollo de nutraceúticos antimicrobianos / inmunoestimulantes potentes y seguros a base de extractos de algas para uso en el control de enfermedades en camarón, ésta es aún un área poco explorada. Cabe señalar que el término nutraceútico fue acuñado desde los conceptos de "nutrición" y "farmacéutico" en 1989 por el Dr. Stephen DeFelice quien definió los nutraceúticos como "un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades" (Brower, 1998).

### **2.3.- Aplicaciones de las algas marinas y su potencial antibacteriano**

Actualmente las investigaciones se centran en la búsqueda de productos naturales con un alto valor comercial con distintas aplicaciones: alimento para ganado, alimento para peces, nutraceúticos, fertilizantes orgánicos, productos farmacéuticos, cosméticos y productos

para el cuidado de la piel entre otros (Michalak and Chojnacka 2014, 2015; Wijesekara et al. 2011; Cardoso et al. 2014). La particularidad de los recursos de origen marino, como las algas, es que contienen compuestos con estructuras únicas que no son encontrados en plantas terrestres, porque los ecosistemas marinos presentan condiciones ambientales variables y para sobrevivir las algas producen una gran variedad de compuestos activos que les permiten protegerse de condiciones extremas como la exposición a rayos ultravioleta, niveles de salinidad cambiantes, variaciones de temperatura y deficiencia de nutrientes (Gupta y Abu-Ghannam 2011), de ahí nace la gran diversidad biológica y la gran variedad de compuestos bioactivos (Maschek and Baker 2008).

Otros aspectos importantes relacionados con las algas marinas, es que poseen una gran diversidad, además de su fácil cultivo, rápido crecimiento y existe la posibilidad de controlar la producción de algunos compuestos bioactivos manipulando las condiciones cuando se producen por cultivo (Koivikko, 2008).

Considerando lo anterior, las algas marinas han recibido un mayor interés en el desarrollo de nutraceuticos o aditivos funcionales (Gupta and Abu-Ghannam 2011; Michalak and Chojnacka 2014; Ganesan et al. 2019).

### **2.3.1-Las algas marinas en México**

Las algas marinas presentes en las costas de México a lo largo de los océanos Atlántico y Pacífico, constituyen un recurso potencial de gran importancia y de múltiples posibilidades económicas. En especial, la costa occidental de Baja California es donde se localiza el mayor número de especies de algas (742 spp.), con un 67% del total de especies registradas para el Pacífico mexicano (Pedroche y Senties 2003). A pesar de esto, en la actualidad el mayor interés está dirigido a la explotación y empleo de especies de importancia industrial especialmente en la zona del Pacífico Norte, para la producción de agar, alginato y carragenano, en donde solo una especie es explotada para cada producto, como es el caso específico de *Gelidium robustum*, *Macrocystis pyrifera* y *Gigartina canaliculata*, esta última exportándose a Estados Unidos (Muñoz-Ochoa, 2010). Esto se debe a su relativa abundancia en nuestro litoral y que se cuenta con el mayor conocimiento científico acumulado sobre ellas. Sin embargo, por su abundancia y amplia distribución, también ofrecen grandes posibilidades especies como *Egregia menziesii*, *Ecklonia*

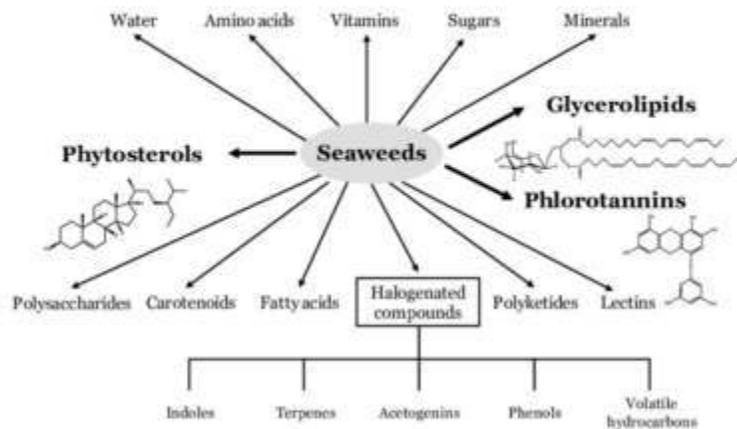
*arborea*, *Laminaria setchellii*, *Silvetia compressa* y *Sargasum muticum* (Aguilar-Rosas et al. 2010).

En México se ha estudiado muy poco el potencial farmacológico de las algas marinas, sin embargo, la actividad antibacteriana contra patógenos de importancia médica y la actividad inhibitoria de los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos de extractos de algas ya ha sido reportado para algunas especies provenientes del Golfo de California (Águila-Ramírez et al. 2012), la Península de Yucatán (Freile-Pelegriño y Morales 2004) y específicamente para Baja California (Muñoz-Ochoa et al. 2010; Villarreal-Gómez et al. 2010). La investigación sobre actividad antibacteriana contra patógenos marinos de importancia en acuicultura de algas de Baja California es muy escasa, pero destaca el trabajo realizado por Muñoz-Ochoa (2010) quien evaluó extractos etanólicos de las algas *Cystoseira osmundacea*, *Macrocystis pyrifera* y *Eisenia arborea* entre otras, encontrando actividad contra diversos patógenos marinos como *Vibrio aestuarianus*, concluyendo que el 80% de las algas evaluadas provenientes de Baja California Sur, son una fuente de compuestos bioactivos antibacterianos.

### **2.3.2.- Actividad antibacteriana de compuestos extraídos de algas marinas pardas**

Como se mencionó anteriormente, las algas marinas son consideradas una fuente de compuestos bioactivos, ya que son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios, con un amplio espectro de actividades biológicas. Se han identificado un gran número de compuestos presentes en algas marinas (figura 2, Lopes, 2014).

Así mismo, en algas verdes, cafés y rojas han sido reportadas una gran variedad de actividades (antiviral, anti-helmínticas, antifúngicas, antioxidantes y antibacteriales) (Bansemi et al. 2006).



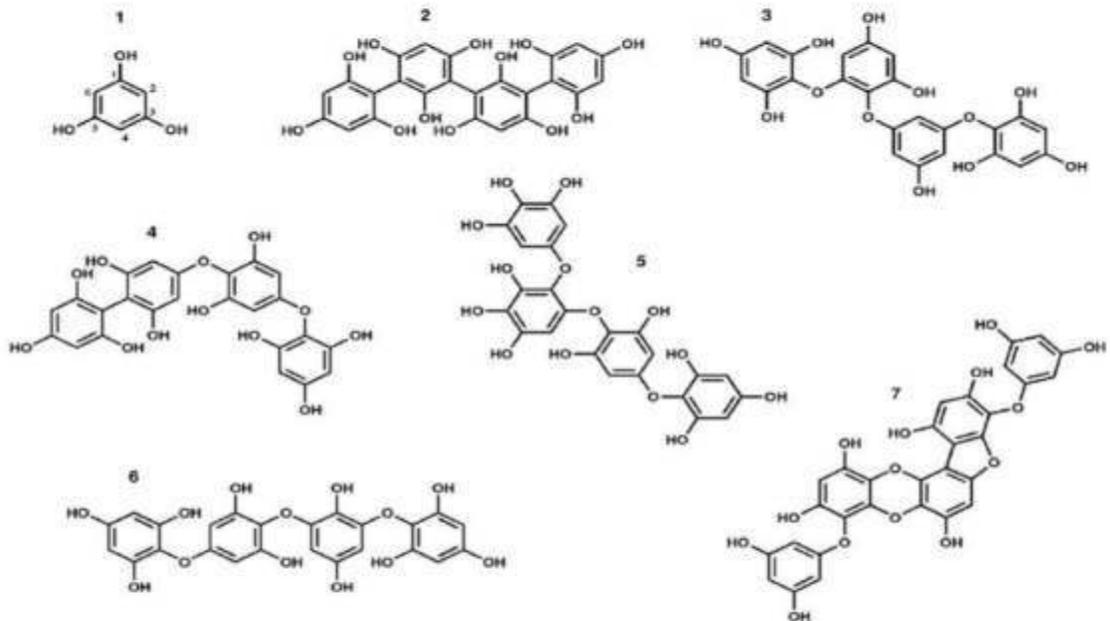
**Fig 2.-** Compuestos activos en algas marinas (Lopes, 2014)

Los compuestos más importantes reportados por poseer actividad antibacteriana en las algas son los polisacáridos sulfatados, ácidos poliinsaturados, los carotenoides, los compuestos fenólicos y florotaninos (Airanthi et al. 2011; Pérez et al. 2016; Zou et al. 2008).

Debido su poder antibacteriano los polifenoles o compuestos fenólicos han adquirido una enorme importancia en los últimos años. Estos compuestos solo son producidos por las algas, no están presentes en plantas terrestres, y son considerados metabolitos secundarios, porque intervienen en procesos de señalización y defensa como respuesta al estrés ambiental (Balboa et al. 2013; Lopes et al. 2012).

Los polifenoles varían ampliamente y se dividen en grupos distintos según sus estructuras, desde simples moléculas como los ácidos fenólicos, hasta taninos y moléculas altamente complejas como los florotaninos (Andrade et al. 2013; Bravo 1998). Los florotaninos están compuestos de unidades de floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) y abarcan una amplia gama de pesos moleculares (126 kDa hasta 650 kDa), se dividen en seis grupos específicos caracterizados por diferencias en la naturaleza de los enlaces estructurales entre las unidades de floroglucinol y el número de grupos hidroxilo presentes. Los fucoles, esfenoles y fuhaloles están conectados por enlaces tipo aril-arilo, los isofuhaloles están conectados por enlaces tipo éter, y los fucofloretoles están conectados por ambos tipos de enlaces; los eckoles se caracterizan por presentar al menos una sección de tres anillos con un elemento de dibenzodioxina substituido por uno grupo fenoxil en C-4

(Lopes et al. 2012; Shibata et al. 2004). En la figura 3 se muestra la estructura química de diferentes tipos de florotaninos encontrados en algas marinas.



**Fig 3.-** Estructuras químicas de diferentes tipos de florotaninos. Floroglucinol (1), Tetrafucol A (2), Tetrafluorethol B (3), Fucodiploethol A (4), Tetrafuhalol A (5), Tetraisofuhalol (6) y Florofucofuroeckol (7) (Lopes et al., 2012).

Estos compuestos son exclusivos de algas pardas (Phaeophyceae) y han sido identificados en distintas familias, incluyendo: las Alariaceae, Fucaceae y Sargassaceae, especialmente los géneros *Cystophora* y *Ecklonia*, los cuales son una buena fuente de florotaninos (Cardoso et al. 2014). Los florotaninos son sintetizados a través de la vía de acetato-malonato en el aparato de Golgi, se conoce que están involucrados en la absorción de radiación ultravioleta, y son considerados agentes químicos de defensa (Lopes et al. 2012). La concentración puede variar entre las especies por el tamaño, la edad, el tipo de tejido, la salinidad, la estacionalidad, los niveles de nutrientes, la presencia de depredadores, la intensidad de la luz y la temperatura del agua. Su concentración puede alcanzar el máximo en el Atlántico templado y tropical (hasta el 20% de la masa seca de algas pardas) y el mínimo en las regiones tropicales del Pacífico e Indo-Pacífico.

Al igual que otros compuestos polifenólicos, los florotaninos han sido sujeto de estudio debido a que han demostrado ser potencialmente benéficos para la salud humana. Se ha

reportado que presentan actividades antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, anti-VIH, anti-diabetes, antiinflamatorias y antialérgicas (Eom y Kim 2012; Lopes et al. 2012).

Las macroalgas pertenecientes a la familia Lessoniaceae, como el género *Ecklonia* y algunos miembros de la familia Laminariaceae han sido evaluados en cuanto a su potencial actividad antibacteriana y la composición de florotaninos presentes (Nagayama et al 2002; Eom et al. 2011; Lopes et al. 2012). Típicamente floroglucinol, eckol y dieckol están relacionados con la actividad antibacteriana (Pérez et al. 2016) y la mayoría de los estudios relacionados con la actividad antibacteriana, se han realizado a partir de extractos y compuestos aislados del género *Ecklonia* y *Eisenia* (Eom et al. 2012). Compuestos como eckol, 8,8'-bieckol, dieckol, dieckoldioxinodehydroeckol, fucofuroeckol-A, 7-phloroeckol y phlorofucofuroeckol-A, han mostrado tener actividad antibacteriana contra una extensa variedad de bacterias incluyendo *Vibrio parahaemolyticus* (Choi et al. 2010; Eom et al. 2012; Nagayama et al. 2002).

### **2.3.3. Extracción de compuestos activos de algas marinas**

En la búsqueda de nuevos productos de origen natural a base de extractos de algas marinas, uno de los primeros pasos a seguir es la selección de la especie algal. La disponibilidad de compuestos activos se ve influenciada por factores como la estacionalidad y el lugar de colecta (Vatsos and Rebours 2015; Shannon and Abu-Ghannam 2016). El tipo de extracción también impacta la eficacia y la cantidad de metabolitos con potencial antibacteriano. Algunos métodos tradicionales de extracción sólido-líquido usados son: maceración, sonicación y soxhlet con variantes en tiempo de extracción, solvente usado, pH, temperatura, tamaño de partícula y la relación solvente muestra (Li et al. 2017; Leyton et al. 2016; Shannon and Abu-Ghannam 2016).

Dependiendo de la polaridad del solvente utilizado, los grupos funcionales extraídos pueden ser lipofílicos polares o no polares, sin embargo, la elección del solvente depende de los compuestos de interés. Se conoce que los solventes orgánicos (metanol, etanol, diclorometano, acetona, entre otros) resultan ser más eficientes en la extracción de compuestos antibacterianos (Ncube et al. 2008, Abu\_Ghannam and Rajauria, 2013).

### **2.3.3.1.- Determinación de actividad antibacteriana de metabolitos activos**

La evaluación de la actividad antibacteriana para productos de origen natural normalmente se lleva a cabo en ensayos de difusión en agar por su simpleza y rapidez, el más utilizado es el ensayo con discos, partiendo de un inóculo estándar esparcido en la superficie del agar (Ncube et al 2008). Una variante del ensayo en pozo es el ensayo de doble capa de agar, diferenciándose en que el inóculo se encuentra dentro del agar y no en la superficie, por lo que la muestra tiene un mayor contacto con él en inóculo (Selvin et al. 2004).

Sin embargo, estos métodos son apropiados como pruebas de selección preliminar ya que el volumen del inóculo, la fase de crecimiento de la bacteria, el medio de cultivo utilizado, pH, también afectan los resultados (Rios et al. 1988) de ahí que la comparación de valores con la literatura no sea precisa (Janssen et al. 1987; Friedman et al. 2002). Además, estos métodos no permiten conocer la concentración mínima inhibitoria o bactericida (CMI o CMB) de los extractos las cuales deben ser determinadas mediante métodos de dilución (Balouiri et al. 2016; Klančnik et al. 2010).

### **2.3.3.2.-Identificación de compuestos activos**

Con el fin de hacer posible la asignación de la actividad antibacteriana a compuestos específicos, es necesario la identificación del o de los compuestos activos. Uno de los métodos basados en la separación de los compuestos más utilizado, es la cromatografía de líquida de alta resolución o HPLC por sus siglas en inglés. En casos en donde los estándares de referencia no están disponibles, una herramienta utilizada es la HPLC acoplada a espectrofotometría de masa de alta resolución (HPLC-MS-TOF) basada en la identificación mediante la medición precisa de la masa iónica y su característico patrón isotópico (en un espectro de masas hay una región de iones moleculares) que corresponden al ión formado por la eliminación de uno o más electrones y una región de fragmentos relacionados con la molécula específicos para cada compuesto por lo cual hacen la función de huella dactilar (Aszyk y Kot-Wasik 2016; Lopes 2014). La identificación de compuestos extraídos de algas, mediante la comparación con espectros reportados en literatura, es un método usado por numerosos investigadores (Sugiura et al. 2007, Shibata et al. 2008, Joung et al. 2012).

#### **2.3.3.2.1.-Purificación de compuestos activos**

En general la purificación de compuestos activos de extractos se llevaba a cabo por métodos como: ultrafiltración, cromatografía de partición centrífuga, cromatografía de capa fina, filtración en gel (Sephadex) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Dieuleveux et al. 1998; Pérez et al. 2016; Shannon y Abu-Ghannam 2016). La Tabla 1 resume el procedimiento de obtención, separación, identificación y purificación de florotaninos con actividad antibacteriana contra distintos patógenos extraídos de algas pardas. La HPLC es uno de los principales métodos utilizados para la purificación de florotaninos obtenidos a partir de algas, con algunas variantes en el método y condiciones de corrida (Tabla 2).

**Tabla 1.-** Métodos de separación, aislamiento, purificación e identificación de florotaninos con actividad antibacteriana de extractos de algas pardas florotaninos obtenidos de algas cafés mediante HPLC

Alga	Extracto crudo	Particiones del extracto crudo	Compuesto	Actividad antibacteriana	CMI/ CMB ug/mL	Fraccionamiento de compuestos	Purificación	Identificación/ Cuantificación	Referencia
<i>Eisenia bicyclis</i>	metanol	hexano, dichlorometano, acetato de etilo y n-butanol	Eckol Dieckol Dioxinodehydroeckol Fucofuroeckol-A 7-floroeckol Florofucofuroeckol	Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>S. aureus</i> resistente a metilina (MRSA) / <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KCTC 2729)	32-64			HPLC / estándares de florotaninos (dieckol, eckol, y eckstolonol)	Eom (2012)
<i>Ecklonia cava</i>	etanol	hexano, dichlorometano, butanol, agua, acetato de etilo	Eckol	Inhibición de <i>S. aureus</i> , MRSA, <i>Salmonella sp.</i>	125-250	Cromatografía en columna con sílica gel usando diclorometano: acetato de etilo: metanol	HPLC	comparación de datos obtenidos de UV, MS, 1H-NMR, y 13C-NMR, con los reportados en literatura	Choi et al. (2010)
<i>Ecklonia kurome</i>	metanol	mezcla de metanol/cloroformo y agua. Fase metanólica particionada con acetato de etilo	8,8'-Dieckol Eckol Dieckol Florofucofuroeckol A Floroglucinol	Inhibición de MRSA, <i>Bacillus cereus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	22.3-800.8	Cromatografía en columna con sílica ácida	Cromatografía de capa fina (TLC)	Cuantificación por HPLC usando estándares de referencia	Nagayama et al. (2002)
<i>Ecklonia stolonifera</i>	metanol caliente	hexano, dichlorometano, acetato de etilo y n-butano	Dieckol	Inhibición de <i>S. aureus</i> , <i>S. aureus</i> (MRSA), <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Legionella birminghamensis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella flexneri</i>	32-256	Cromatografía en columna con sílica gel usando acetato de etilo: metanol (50:1 a 5:1)	Cromatografía en columna con RP-18 (gradiente de metanol de 20% a 100%) and Sephadex LH-20	Resonancia magnética nuclear (NMR)	Lee et al. (2008)

**Tabla 2.-** Métodos y condiciones para cuantificar o purificar (Isaza et al. 2013)

	<i>Ecklonia maxima</i>	<i>Eisenia arborea</i>	<i>Eisenia bicyclis</i>
<b>Fase estacionaria</b>	LiChrosorb Si 60 (Merck), 250 x 8 mm I.D., 7 mm)	Develosil ODS-5 (250 x 4.5 mm I.D., 5 mm) y Develosil ODS-5 column (250 x 10 mm I.D., 5 mm)	Inertsil ODS-3 column (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 mm).
<b>Fase móvil</b>	CHCl <sub>3</sub> -EtOH varias condiciones., flujo: 4 mL/min.	Solución A (0.1% TFA) y solución B (acetonitrilo conteniendo 0.1% TFA).	MeOH/agua (eluyente A) y MeOH (eluyente B)
<b>Gradiente de elución</b>		Condiciones analíticas: 30-min gradiente entre A y B , flujo: 0.5 mL/min. Cromatografía preparativa: se aplicaron tres condiciones de elución. Condición 1: gradiente de elución entre A y B (0-30% B por 120 min, mantenido a 30% B por 30 min y 30-100% B por 30 min); Condición 2: elución isocrática con 18% B; y Condición 3: 47% metanol con 0.1% TFA , flujo : 1.0 mL/min.	Gradiente lineal de 30% a 100% de B por 20 min, mantenido por 25 min.
<b>Detección</b>	UV a 275 nm.	UV a 280 nm	UV de 190 a 400 nm.
<b>Referencia</b>	Glombitza et al. 1985	Sugiura et al. 2007	Shibata et al. 2004

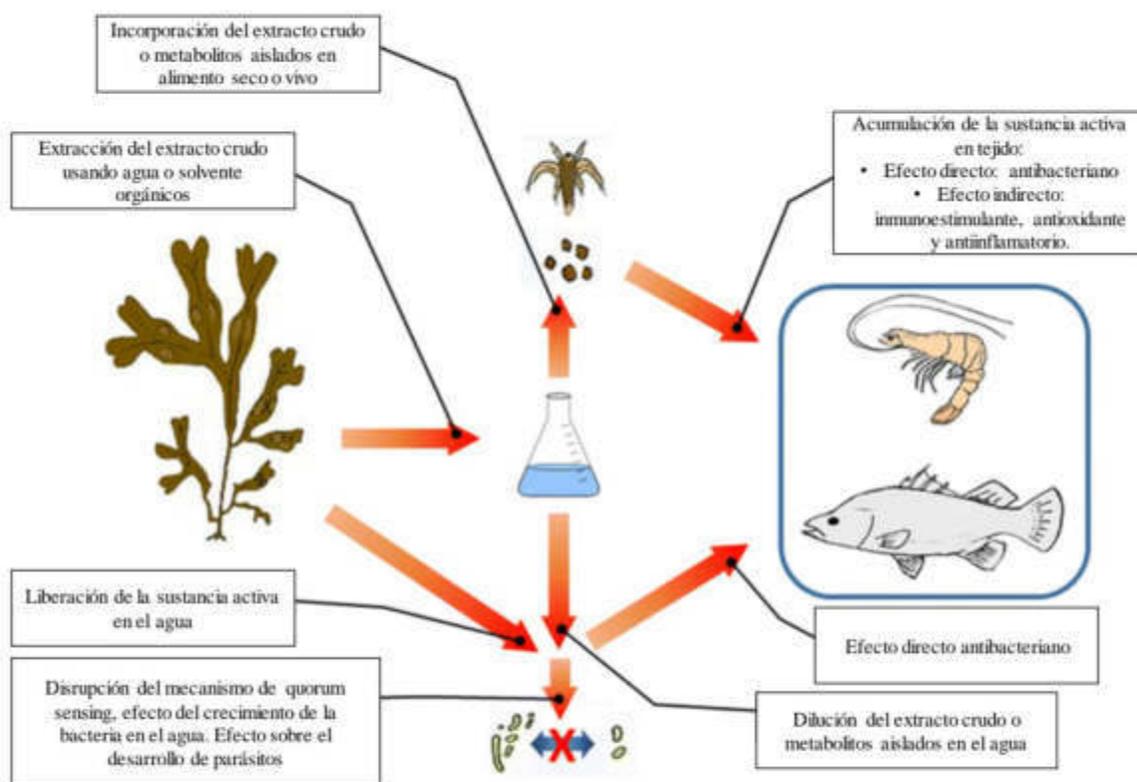
La Cromatografía Rápida de Partición Centrífuga o FCPC por sus siglas en inglés, es un método de cromatografía líquido-líquido que posee numerosas ventajas sobre los métodos convencionales ya que es un sistema cerrado, por lo que no hay presencia de fase sólida estacionaria y los solventes pueden ser completamente recuperados y reciclados. Todo esto sin afectar la bioactividad además de disminuir sustancialmente los costos operativos debido a mayores rendimientos (Lee et al. 2014; Wanasundara and Fedec, 2002). El principio de separación involucra la partición de la muestra entre dos fases de solventes inmiscibles (fase estacionaria y móvil). Una separación exitosa depende de la selección de un sistema de solventes eficiente, que proporcione un rango óptimo del coeficiente de partición o ( $K_d$ ) para obtener la mejor separación de los compuestos de interés. Y esto se logra con valores de  $K_d$  que fluctúen entre 0.125 a 8 (Pauli and Friesen 2008). También, la proporción relativa de la cantidad de muestra que pasa a cada una de las dos fases de solventes es determinada por los coeficientes de partición (Wanasundara and Fedec 2002).

La cromatografía FCPC es una herramienta utilizada en el fraccionamiento y aislamiento de compuestos bioactivos obtenidos a partir de productos naturales incluyendo extractos de algas marinas (Abedini et al. 2016; Lee et al. 2014; Kim et al. 2011). Además, los

extractos crudos se han purificado o refinado en procesos de fraccionamiento guiados por su actividad antibacteriana, que incluyen extracción secuencial de solventes y/o cromatografía (Pérez et al. 2016; Abedini et al. 2016, Abdellaoui et al. 2014); dando como resultado una recuperación de los compuestos del 70 al 95%, con un grado de pureza de entre 80 al 99 % (Kim et al. 2011; Miche et al. 2011, Abedini et al. 2016, Lee et al. 2014).

#### **2.4.- Aplicación de extractos de algas marinas como aditivo en dietas para camarón para combatir enfermedades bacterianas**

Investigadores como Vatsos y Rebours (2015), Saulnier et al (2000) y Pérez et al (2016) recomiendan para evaluar sustancias antibacterianas (como los extractos de algas marinas) se realice un examen *in vitro* inicial, en los que se evalúan distintos métodos para determinar la actividad antibacteriana (tabla 3), seguido de un estudio *in vivo*. Los ensayos en *Artemias* sp son ampliamente utilizados como indicador de toxicidad de productos naturales, como los extractos de algas marinas (Ayesha et al. 2010; Kanjana et al. 2011), (Figura 4). Esto debido a que no es evidente si el efecto protector observado es de origen antimicrobiano directo, o es producto de una inmunoestimulación, o de un efecto sinérgico. La tabla 3 muestra algunas investigaciones en donde se ha evaluado la inclusión de extractos de algas como aditivos para combatir infecciones causadas por *Vibrios* (Vatsos y Rebours 2015)



**Fig. 4.-** Modos de administración de los extractos de algas en el cultivo de peces y camarones (Vatsos y Rebours 2015)

Las algas marinas son utilizadas en la acuicultura, se ha estudiado su valor nutricional como posibles sustitutos de la harina de pescado, o como agentes aglutinantes, los resultados indican que las dietas a base de algas marinas pueden usarse para cultivar muchos organismos acuáticos, como peces, camarones, erizos de mar y abulones (Vatsos y Rebours 2015). Otro ejemplo es el de Immanuel et al. (2004); ellos mostraron que extractos butanólicos de algas aumentan la tasa de supervivencia de juveniles de camarón *P. indicus*. Sin embargo, la literatura relacionada con los alimentos medicados a partir de metabolitos secundarios de algas es escasa (Selvin y Lipton 2004).

**Tabla 3.-** Evaluación de extractos de algas marinas con actividad antibacteriana *in vitro e in vivo* *Vibrio* sp. en camarón (Vatsos y Rebourts 2011)

Especie de alga	Método de extracción	Especie de camarón	Ensayo <i>in vitro</i>	Ensayo <i>in vivo</i>	Patógeno	Resultados
<i>Gracilaria fisheri</i>	Solventes orgánicos	<i>Panaeus monodon</i>	Difusión en disco / CMI	Prueba de seguridad del extracto de alga en etanol/ enriquecimiento de <i>Artemia salina</i> / Desafío por inmersión en post-larvas y juveniles de camarón	<i>Vibrio harveyi</i>	Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> / Disminución de mortalidad
<i>Ulva lactuca</i> / <i>Sargassum wightii</i>	Solventes orgánicos	<i>Penaeus indicus</i>	Difusión en disco	Enriquecimiento de <i>Artemia salina</i> / Desafío por inmersión en juveniles de camarón	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> / Reducción de la carga bacteriana en organos / Disminución de mortalidad
<i>Sargassum polycystum</i>	Agua	<i>Penaeus monodon</i>	Difusión en disco / CMI	Pruebas de alimentación/desafíos de incubación	<i>Vibrio harveyi</i>	Disminución de mortalidad
<i>Ulva fasciata</i>	Solventes orgánicos	<i>Penaeus monodon</i>	Ensayo de difusión en agar en pozo/ CMI	Desafío por inmersión	<i>Vibrio harveyi</i>	Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> / Reducción de la actividad de factores de virulencia/ Disminución de mortalidad
<i>Chaetomorpha antennina</i>	Solventes orgánicos	<i>Penaeus monodon</i>	Ensayo de difusión en agar en pozo	Desafío por inmersión y por inyección intramuscular aplicando el extracto por medio de inyección	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> / Efecto terapéutico después de haber desafiado

### 3.-JUSTIFICACIÓN

La industria de cultivo de camarón enfrenta grandes pérdidas monetarias, a causa del patógeno *Vibrio parahaemolyticus* responsable de la enfermedad AHPND, la cual no ha sido controlada adecuadamente. Las estrategias implementadas como el uso de antibióticos no han tenido éxito, además de producir efectos negativos tales como generar resistencia bacteriana. De ahí la importancia de buscar recursos naturales y sustentables que actúen como antimicrobianos. Considerando que las algas marinas pardas mexicanas poseen una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividades biológicas entre ellas la actividad antibacteriana, resulta relevante e innovador obtener extractos e identificar y caracterizar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus* responsable de la enfermedad AHPND, e incorporarlos como aditivos en dietas para camarón que ayuden al control de la enfermedad de AHPND en el camarón blanco *L. vannamei*. Adicionalmente, la aplicación de productos marinos naturales, como nutraceuticos para controlar las enfermedades del camarón es una estrategia novedosa debido a su gran potencial y su uso seguro para el cultivo de camarón. El desarrollo de la presente investigación, además de promover el aprovechamiento de recursos naturales en México como lo son las algas pardas, podría impactar la producción de camarón blanco al disminuir la mortalidad causada por la enfermedad antes mencionada.

#### **4.-HIPÓTESIS**

Algunas algas pardas de Baja California son una fuente de compuestos con actividad antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) en camarón *Litopenaeus vannamei*. La inclusión de extractos ricos en estos compuestos como aditivos nutraceuticos permite aumentar la sobrevivencia a la infección.

## 5.-OBJETIVO GENERAL

Investigar el potencial antibacteriano de algunas algas pardas de Baja California, México contra *V. parahaemolyticus* AHPND+, y su posible uso como nutraceutico en dietas para el camarón blanco *L. vannamei*, para el control de la AHPND

### 5.1.-Objetivos específicos

- 1.- Obtener extractos crudos de 6 algas pardas con diferentes solventes orgánicos, mediante dos métodos de extracción y evaluar su actividad antibacteriana *in vitro* contra Vp AHPND+ para seleccionar el extracto crudo del alga con mayor potencial antibacteriano.
- 2.- Evaluar la toxicidad del extracto crudo seleccionado en nauplios de Artemia
- 3.- Evaluar el efecto del extracto crudo de alga seleccionada al adicionarlo en dietas para camarón *L. vannamei* en términos de consumo, crecimiento, sobrevivencia y efecto protector ante la infección causada con Vp AHPND+.
- 4.- Caracterizar químicamente el extracto crudo del alga seleccionada
- 5.- Fraccionar el extracto crudo del alga seleccionada para aumentar la actividad antibacteriana contra Vp AHPND+
- 6.- Aislar y purificar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana de la fracción más activa del alga seleccionada.
- 7.- Evaluar el efecto de la fracción más activa al adicionarla en dietas para camarón *L. vannamei* en términos de consumo, sobrevivencia y efecto protector a la infección con Vp AHPND+.
- 8.- Investigar mecanismos de acción de la fracción más activa mediante pruebas de inhibición de biofilm y de inhibición de quorum sensing.

## 6.-MATERIAL Y MÉTODOS

Los procedimientos generales seguidos por etapas en esta investigación se muestran a manera de esquema en la figura 5.

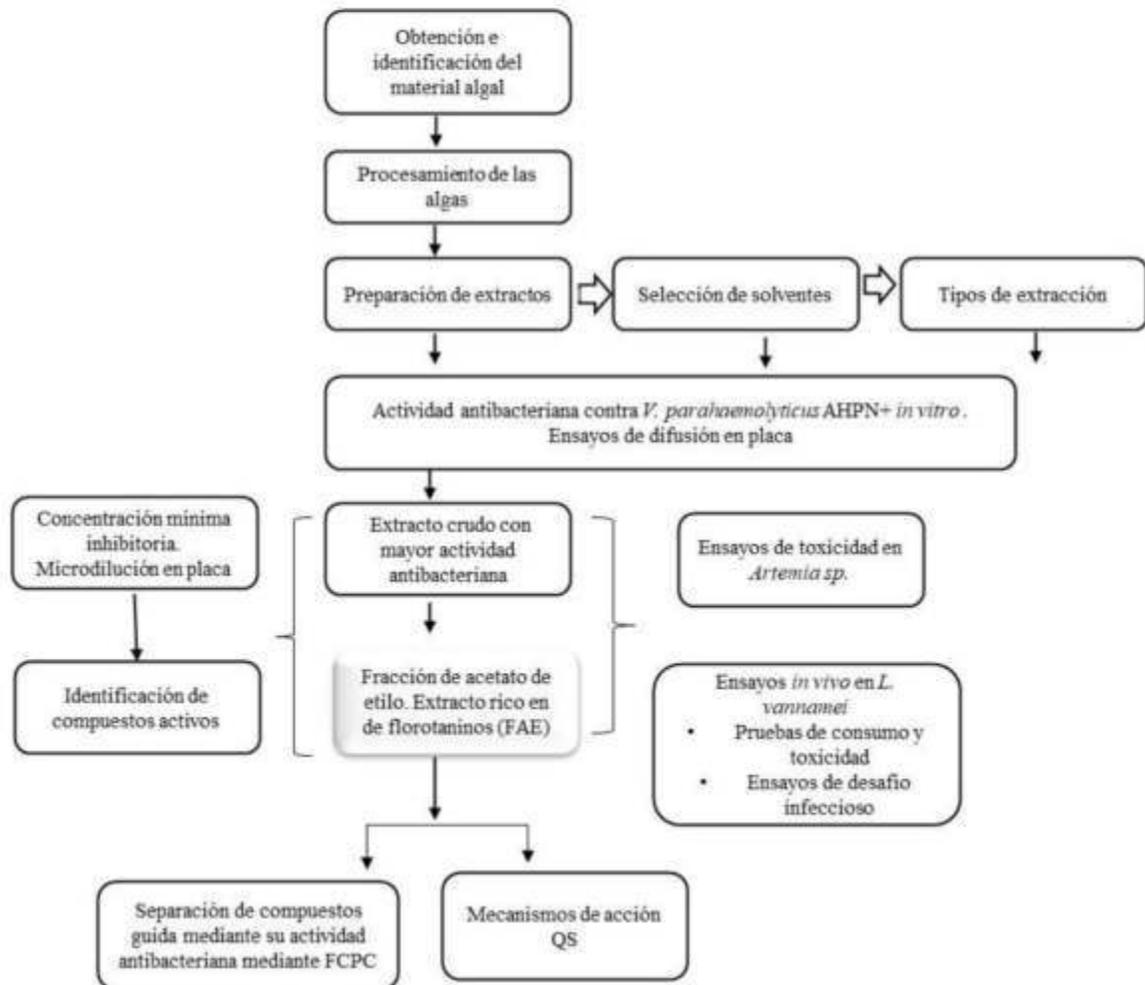


Fig 5.-Esquema general de procedimientos seguidos en la investigación.

### 6.1.- Recepción, identificación y procesamiento de las algas marinas

Las algas marinas fueron proporcionadas por la empresa Baja Kelp. La colecta fue realizada en la Escalera, Baja California, México (31°30' 59.1" N-116°38' 51.1" W) (Fig.6) entre los meses de diciembre del 2014 y enero del 2015, el método de cosecha se realizó a mano, utilizando sólo ejemplares adultos y usando podas selectivas para cada especie de alga (tabla 4).



**Fig.6.-** Sitio de estudio: Costa de Baja California

**Tabla 4.-** Método de cosecha de las especies de algas evaluadas

<b>Alga</b>	<b>Colecta</b>
<i>Ecklonia arborea</i>	El corte solo se hace en ejemplares adultos y en 1 de las 2 frondas, por incisión sobre la horquilla de bifurcación.
<i>Macrocystis pyrifera</i>	El corte solo se hace en ejemplares adultos, cortando desde el arranque de la fronda y respetando el estipe liso sin láminas.
<i>Egregia menziesii</i>	El corte solo se hace en ejemplares adultos, de longitud superior 5m cortando hasta 2m desde la punta hacia la base. Se dejan intactos aquellos ejemplares con presencia de soros maduros
<i>Silvetia compressa</i>	El corte se realiza cortando solo el penacho sobresaliente. Se evitan las plantas que contengan conceptáculos
<i>Pterygophora californica</i>	El corte solo se hace en ejemplares adultos, desde la base. Se dejan intactos los ejemplares con presencia de soros maduros
<i>Cystoseira osmundacea</i>	El corte solo se hace en ejemplares adultos, desde la base.

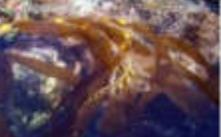
Las algas fueron enjuagadas con agua de mar para eliminar residuos de arena o conchas, posteriormente, se inspeccionaron para erradicar toda forma de epibiontes y fauna asociada al entorno natural de la planta. El secado se llevó a cabo al aire libre y posteriormente las algas fueron empacadas en sacos de polipropileno y enviadas a Monterrey, Nuevo León por paquetería. Se clasificaron con el lote: **A.PCH-431740-12/14**. Las algas fueron cortadas en tamaños de entre 2-3 cm de largo, posteriormente fueron molidas en molino (Pulvex 2000, México) a un tamaño de partícula de  $\approx 500 \mu\text{m}$ . Fueron empacadas en bolsas de plástico al vacío y almacenadas a temperatura ambiente hasta su uso (Fig. 7)



**Fig. 7.-** Procesamiento de algas en laboratorio de Maricultura

Las características morfológicas y anatómicas (tabla 5) de todas las especies de algas secas enteras fueron observadas en el estereoscopio (Leica-TS1232W26, México). Basado en las características morfométricas y el patrón de distribución ecológica, la identificación taxonómica de los especímenes fue realizada con la ayuda del Dr. Sergio M. Salcedo del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL usando como referencias claves taxonómicas escritas por Gabrielson (2006).

**Tabla 5.-** Identificación de las algas de estudio por el Dr. Sergio Salcedo

Muestra	Manual de Referencia	Fuente: Algbase	Nombre Científico
			<i>Cystoseira osmundacea</i> / <i>Stephanocystis osmundacea</i> (Turner) (C. Agardh 1820)
			<i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) (C. Agardh 1820)
			<i>Pelvetia compressa</i> / <i>Silvetia compressa</i> (J. Agardh) (De Toni 1985)
			<i>Eisenia arborea</i> / <i>Ecklonia arborea</i> (Areschoug 1876)
			<i>Pterygophora californica</i> (Ruprecht, 1852)
			<i>Egregia menziesii</i> (Turner) (Areschoug 1876)

## 6.2.- Obtención de extractos crudos de algas

### 6.2.1.- Selección de solvente

Con la finalidad de seleccionar el mejor solvente para la obtención del extracto más activo, se usaron los siguientes solventes de diferente polaridad: acetona, etanol, acetato de etilo, éter de petróleo, diclorometano/metanol (1:1) para cada una de las 6 algas. Para ello, se pesaron 10 g de cada alga molida en matraces de 200 ml y se agregaron 40 ml de solvente, siguiendo la relación de 1:4 p/v descrita por Saritha et al. (2013), la extracción se realizó durante 24 h con agitación constante y a temperatura ambiente usando un baño de agua

(Shak-R-Bath, Lab- Line, M 3582). Posteriormente los extractos fueron filtrados usando papel Whatman No. 541 y concentrados al vacío en un rotavapor (Heidolph, BO2000).

### **6.2.2- Selección de método de extracción**

Una vez seleccionado el mejor solvente en base a las pruebas antibacterianas, se evaluaron dos métodos de extracción (extracción fría y extracción caliente) con la finalidad de elegir el método que permitiera obtener el extracto con mayor actividad antibacteriana.

#### **6.2.2.1.- Extracción fría**

Se llevó a cabo una extracción por contacto a temperatura ambiente a mayor escala, para obtener mayor cantidad de extracto para pruebas antibacterianas. Cada una de las 6 algas fue extraída por separado 3 veces, utilizando 200 g de alga molida y acetona al 100% en una relación 1:10 p/v, durante 2 h con agitación a 200 rpm (CG-1965 20 L, Chemglass). Se utilizaron 2.5 L de acetona en la primera extracción y 2 L en la segunda y tercera extracción. Los extractos fueron agrupados y filtrados al vacío, posteriormente la acetona fue evaporada en un equipo de rotavapor (Caframo, BO2000).

#### **6.2.2.2- Extracción caliente**

La extracción fue llevada a cabo usando un equipo Soxhlet, se utilizó un cartucho de papel filtro (Whatman No. 541) conteniendo 50 g de alga molida. Se usaron 200 ml de acetona al 100 % para la extracción a una temperatura de entre 50-55°C durante 2 h, posteriormente el extracto fue filtrado al vacío y la acetona fue eliminada en un rotavapor. Los extractos concentrados fueron almacenados en frascos protegidos de la luz a 4 °C hasta su uso.

### **6.3- Evaluación de extractos crudos de las algas**

#### **6.3.1-Actividad antibacteriana**

La actividad de los extractos obtenidos con diferentes solventes se determinó mediante ensayo de difusión en discos y la actividad de los extractos obtenidos con diferentes métodos de extracción se determinó mediante ensayo de difusión en discos y en pozos.

##### **6.3.1.1.- Bacteria de prueba y método de criopreservación**

Para la realización de todas las pruebas microbiológicas y desafíos bacterianos se utilizó la cepa M09-04 de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND, la cual fue donada por

el Dr. Bruno Gómez Gil, responsable de la Colección de microorganismos de importancia acuática del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C. Unidad Mazatlán. Esta cepa fue aislada de camarones enfermos de AHPND y clasificada con alta virulencia según el estudio conducido por Soto-Rodríguez et al. 2015. La bacteria se mantuvo en criopreservación (-80°C) hasta su uso. Con la finalidad de preservar la cepa proporcionada por el CIAD, para su utilización en los posteriores experimentos de la investigación, se llevó a cabo la producción de biomasa y la criopreservación de la misma. Para ello, cuentas de vidrio de aproximadamente de 2 a 5 mm de diámetro, fueron lavadas y sumergidas en ácido clorhídrico al 2% durante 2 horas. Con el objetivo de eliminar la alcalinidad de las cuentas, nuevamente fueron lavadas hasta obtener un pH neutro y secadas en estufa a 37 °C. Las cuentas fueron transferidas a tubos eppendorf (0.5 ml) de manera individual, previamente llenados con 100 µl de TSB (Becton Dickinson and Company, NJ, EE. UU) al 2.5 % de NaCl, adicionado con glicerol al 15 %. Posteriormente los tubos fueron esterilizados y una vez atemperados fueron inoculados con una asada de biomasa de la cepa M09-04, previamente inoculada en TSA al 2.5 % de NaCl. Después de inocular, se homogenizó y se llevó a incubación a 30 °C por 24 h. Una vez observada turbidez en el medio, los tubos fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

#### **6.3.1.2.- Activación de la cepa *V. parahaemolyticus* M09-04**

Antes de realizar cualquiera de las pruebas microbiológicas o desafíos bacterianos la cepa criopreservada fue activada. La activación consistió en tomar una cuenta de vidrio, una vez que el medio fue temperado, posteriormente se adicionó a un tubo con 10 ml de caldo TSB con 2.5 % de NaCl, y se mantuvo a 28 °C con agitación constante (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Germany) por 24 h.

#### **6.3.1.3.-Ensayo de difusión en discos**

La actividad antibacteriana de los diferentes extractos fue determinada mediante el método modificado de Bauer et al. (1966). Se prepararon cajas petri vertiendo 20 ml de agar Muller Hinton + 2.5 % de NaCl (MHB; Becton Dickinson and Company, NJ, EE. UU.). El inóculo fue estandarizado usando 100 µL de suspensión bacteriana a una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/ mL, la cual fue homogenizada en la superficie del agar con un hisopó estéril. Se utilizaron discos estériles de papel filtro de 6 mm de diámetro,

impregnados con 10  $\mu\text{L}$  de cada extracto, a una concentración de 30 mg/mL, una vez evaporado el solvente, se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto nuevamente y así sucesivamente hasta llegar a 100  $\mu\text{L}$ . Los discos se colocaron en la superficie del medio con pinzas estériles y se presionó suavemente para asegurar el contacto con la superficie del agar. Como control positivo se usó enrofloxacin (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y como control negativo el solvente con el que fue preparado el extracto, las placas inoculadas se incubaron a 30 ° C durante 24 h. La zona de inhibición fue observada y medida en milímetros con la ayuda de un Vernier digital (CD-6" CS, Mitotuyo Corp., JPN). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

#### **6.3.1.4.-Ensayo de difusión en pozos**

Se llevo a cabo siguiendo la metodología modificada de Selvin y Lipton (2004), la capa inferior fue preparada con 10 ml de Agar-Agar. Penicilindros estériles de acero inoxidable fueron distribuidos en la capa inferior, a continuación, se adicionaron 15 ml de Agar Muller-Hinton, el cual previamente fue inoculado con 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana a una concentración de  $10^8$  UFC/mL, posteriormente los penicilindros fueron removidos con pinzas estériles, los pozos resultantes fueron llenados con 100 $\mu\text{l}$  de extracto a una concentración de 30 mg/mL. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. El solvente utilizado para la disolver el extracto fue añadido como control, y la enrofloxanina (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se usó como control positivo. Las placas fueron incubadas por 24 h a 30 °C, posteriormente el diámetro de inhibición fue medido con un Vernier el valor reportado fue el promedio de los replicados (3 mediciones). Los diámetros de inhibición se analizaron utilizando el software SPSS (versión 20 para Windows). Se uso el análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía), posteriormente una prueba de comparación múltiple mediante Tukey y Duncan, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

#### **6.3.1.5.- Ensayo de microdilución en placa**

Una vez establecida la actividad antibacteriana del extracto crudo fabricado con el mejor solvente (acetona) del alga con mayor actividad (*E. arborea*) se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) capaz de inhibir al patógeno V.p AHPND + y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante el método de Sarker et al. (2007) con algunas modificaciones. El extracto crudo se disolvió en DMSO al 5% adicionado con

0.75 % de Tween 20, para obtener una solución a una concentración de 12 mg/mL. A partir de la solución (stock) se prepararon 8 concentraciones de prueba, en un rango de 0.38 a 3 mg/mL. En cada pozo, de una microlpaca de 96 pozos de poliestireno estéril (3370 Costar®, Kennebunk ME, EE. UU.), se adicionaron 100  $\mu$ L de TSB al 2.5 % de NaCl, 50  $\mu$ l de cada dilución y posteriormente 50  $\mu$ l de la suspensión bacteriana a una concentración de  $10^6$  UFC/mL. El DMSO/ Tween 20 se usó como control negativo, la mezcla de todas las soluciones excepto la bacteria se usó como blanco y la enrofloxacin a 30  $\mu$ g/mL como control positivo. Las pruebas fueron realizadas por triplicado. Las microplacas fueron envueltas en film para evitar deshidratación e incubadas a 30 °C por 18 h. Después del tiempo de incubación, 10  $\mu$ l de la solución indicadora de resazurin 0.1% de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) fueron adicionados a cada pozo. Posteriormente las placas se incubaron 4 horas más a la misma temperatura. El cambio de color se evaluó visualmente. Cualquier cambio de color de púrpura a rosa o incoloro se registró como crecimiento bacteriano positivo. La concentración más baja que produjo un cambio de color se tomó como el valor CMI (Zhao and Stevens, 1998).

La concentración mínima bactericida (CMB) (definida como la concentración mínima del extracto a la cual no se observa ningún crecimiento bacteriano después del periodo de incubación (24 h)) se determinó inoculando 100  $\mu$ l del contenido de los pozos de la microplaca de la CMI (en los cuales no hubo crecimiento o el resazurin no generó cambio de coloración) en agar TCBS (Oxoid LTD, Hampshire, Inglaterra) y sembrando por extensión. Las cajas fueron incubadas a 30 °C por 24 h. La CMB se registró cuando se inhibió el 100 % del crecimiento bacteriano.

#### **6.4.-Evaluaciones *in vivo* del Extracto Crudo (EC) del alga seleccionada**

##### **6.4.1.-Ensayo de toxicidad en nauplios de *Artemia***

La toxicidad de los extractos que presentaron actividad antibacteriana contra *Vp. AHPND+* del alga seleccionada se evaluó en el Programa Maricultura, en nauplios de *Artemia sp.* siguiendo el método modificado de Solis et al. (1993). Se eclosionaron quistes secos en agua marina sintética (35 ppm de NaCl) a una temperatura de 27-30 °C con aireación abundante y un continuo régimen de luz, en un contenedor de vidrio acondicionado con un área oscura para fotoperíodo. Aproximadamente 72 h después de

la eclosión, los nauplios fototrópicos fueron colectados con micropipeta y fueron concentrados en un vial. Grupos de 15 nauplios de artemias por tratamiento con 4 réplicas, fueron expuestos a 7 concentraciones (900,810,720,630,540,450,360  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) del EC. La toxicidad fue determinada a las 24 h de exposición contando el número de sobrevivientes y calculando el porcentaje de mortalidad. Se usó agua destilada como control negativo. Los nauplios que no exhibieron movimiento alguno durante la observación fueron considerados como muertos. El ensayo fue realizado 2 veces (ensayo 1 y 2). La dosis letal media o  $\text{LC}_{50}$  fue definida como la concentración requerida del extracto para producir 50% de mortalidad de los nauplios, y fue calculada por regresión lineal. En acuerdo con Meyer et al. (1982) y Ohikhen et al. (2016) el criterio de toxicidad para extractos de origen natural usado fue el siguiente: el extracto que muestra valores de  $\text{LC}_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  se considera no tóxico, valores de  $\text{LC}_{50} \geq 500 \mu\text{g}/\text{mL}$  pero no mayores a  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  se considera de toxicidad baja, mientras que aquellos que tienen valores de  $\text{LC}_{50} < 500 \mu\text{g}/\text{mL}$  se consideran tóxicos.

#### **6.4.2.- Bioensayos en camarón con EC del alga seleccionada**

Los experimentos en camarón fueron diseñados con la finalidad de evaluar el efecto de diferentes concentraciones del EC del alga seleccionada en parámetros de consumo, toxicidad (Bioensayo 1), crecimiento (Bioensayo 2), histología (Bioensayo 3) y sobrevivencia de camarones desafiados (Bioensayo 4). Los bioensayos 1 y 2 fueron realizados en las instalaciones del Programa Maricultura y los bioensayos 3 y 4 en la sala de bioensayos del Ciad de Mazatlán.

##### **6.4.2.1.-Condiciones experimentales generales en los bioensayos realizados en Programa Maricultura**

###### **6.4.2.1.1.- Sala de bioensayos**

La Sala de bioensayos del programa Maricultura consta de un sistema de recirculación de agua marina sintética ( $8 \text{ m}^3$ ), está equipada de 4 tanques de pre engorda de 500 L cada uno con doble fondo y un sistema de aireación y recirculación ("air lift"), dos tanques colectores que funcionan a manera de tanques de sedimentación de 1500 L que se encuentran en la parte inferior del sistema, un tanque de succión que se encuentra entre los dos colectores y recibe el agua de ellos; en la parte superior del sistema se encuentran

dos tanques equipados con un sistema de regulación de temperatura por intercambio y que suministran de agua al sistema por medio de gravedad, un filtro (contactor) biológico, filtros de carbón activado, filtros de cartucho de 50 micras, y espumadores. La sala cuenta con acuarios de 60 y 120 L y se mantiene un recambio de agua promedio de 10 veces al día para mantener la calidad del agua estable. El agua marina se prepara en un tanque con capacidad de 500 L que cuenta con 4 airlifts para la difusión de aire. El tanque se llena con agua dulce de la llave y se añaden 20 L de Fritz® Supersalt concentrado y 36 kg de sal DEPSA, posteriormente el agua se agita y se deja reposar por 3 días, esto con la finalidad de obtener una completa disolución de las sales presentes, seguido se diluye con agua dulce y se distribuye en los diferentes tanques de la sala para lograr una salinidad final de  $36.25 \text{ g/L} \pm 0.88$ , la cual es medida mediante un refractómetro.

#### **6.4.2.1.2.- Calidad de agua**

Los parámetros fisicoquímicos como amonio, nitritos, nitratos, pH, y salinidad, se monitorean semanalmente mediante kit comercial NUTRAFIN. La concentración (ppm) fue determinada tomando lecturas de absorbancia (espectrofotómetro DeNovix DS-11) a una longitud de onda de 645 nm que corresponde a amonio libre, 545 nm para nitratos y 540 nm para nitritos. Se utilizan curvas de calibración previamente establecidas para determinar la concentración.

#### **6.4.2.1.3.-Animales experimentales**

Los camarones usados en los bioensayos fueron juveniles de la especie *Litopenaeus vannamei* proporcionados por la compañía Fitmar de Mazatlán, Sinaloa, México. Los camarones fueron enviados por avión al aeropuerto de Monterrey. A la llegada, cada lote de camarones fue aclimatado en los tanques rectangulares de fibra de vidrio de 500 L de capacidad, removiendo agua paulatinamente (cada 15 min/ 2 L) de las bolsas plásticas de empaque y adicionando agua del tanque hasta lograr igualar las condiciones de temperatura, salinidad y pH de la sala de bioensayos. Los camarones aclimatados fueron mantenidos en los tanques de reserva hasta su distribución según el diseño de cada bioensayo. En ese periodo de adaptación los camarones fueron alimentados tres veces al día (9:00 am, 12:00 pm y 4:00 pm) con una dieta comercial (LECS 742-R-577-01

Nutrimar, Sinaloa, México). Adicionalmente, los restos de heces y alimento se removieron diariamente con un sifón.

#### **6.4.2.1.4.- Distribución de los camarones al inicio de los bioensayos**

Para cada ensayo se realizó una biometría preliminar de 100 camarones con el objetivo de conocer la distribución de los pesos de los camarones disponibles y mantener una distribución homogénea de organismos en los grupos experimentales. Para ello se registró el peso de cada uno de los organismos, después de eliminar el exceso de agua con un lienzo húmedo. Los pesos promedio de cada acuario al inicio de cada bioensayo fueron comparados entre tratamientos mediante un análisis de varianza de una vía seguidos por la prueba Tukey post-hoc (software STATISTICA, Versión 5.0). La distribución inicial se consideró homogénea cuando el análisis mostró ausencia de diferencias significativas entre los acuarios y entre los tratamientos asignados aleatoriamente.

#### **6.4.2.1.5.-Tiempo de adaptación previo a los bioensayos de desafío**

Al inicio de cada bioensayo los camarones fueron transferidos a las unidades experimentales y se dio un tiempo de adaptación de 24 h antes del inicio del ensayo. En este periodo los camarones muertos fueron reemplazados por otros de la misma talla. Los camarones fueron sometidos a un ayuno 24 h antes del inicio de cada experimento, esto para asegurar un mayor consumo del alimento suplementado.

#### **6.4.2.2.- Bioensayo 1: efecto en consumo y toxicidad (72h)**

La organización United States Environment Protection Gency o USEPA por sus siglas en inglés (2002), menciona que cuando se desconoce el origen de la muestra, es necesario llevar a cabo un ensayo preliminar para obtener el rango de toxicidad del producto, usando concentraciones logarítmicas o diluciones del rango de 100, 10, 1, 0.1 y 0 % por un tiempo de 24 h, sin embargo, Ramírez y Mendoza (2008) sugieren para el caso de postlarvas una duración de 72 h. En base a estas recomendaciones se llevó a cabo un ensayo para evaluar el efecto de 5 dosis de EC del alga seleccionado que fue *E. arborea* (0,1,10,100,1000 mg de EC /kg de biomasa de camarón) sobre el consumo y toxicidad medida en términos de sobrevivencia en un periodo de 72 h.

Como alimento control se utilizó el alimento comercial peletizado (LECS 742-R-577-01 Nutrimar, Sinaloa, México). El contenido de humedad y cenizas del alimento se determinó

mediante los procedimientos establecidos 930.15 y 942.05 AOAC (1997) respectivamente. La proteína total (%) se cuantificó mediante el método AOAC 930.03 utilizando un analizador de nitrógeno (Truspec CHN, Leco Corporation, St. Joseph, MI, EE. UU). El alimento de prueba fue preparado usando como alimento base la dieta LECS 742, el alimento medicado fue suplementado con el EC, a partir de dos soluciones madre a una concentración de 1 y 100 mg EC/ ml de acetona, respectivamente (tabla 6). Los pellets impregnados con el extracto fueron mezclados durante 1 min para asegurar una homogenización completa. En seguida se secaron en horno a 60<sup>0</sup>C hasta eliminar por evaporación cualquier residuo de acetona y finalmente se cubrieron con aceite de pescado (2%) para evitar pérdidas por lixiviación del extracto.

**Tabla 6.-** Descripción de la cantidad de EC de *E. arborea* requerida para preparar los distintos tratamientos

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis por Kg de camarón</b>	<b>Dosis por Kg de alimento</b>	<b>mg de extracto requerido para preparar una ración diaria de alimento (10% de biomasa (0.3 g))</b>
<b>T1</b>	1 mg	20 mg	0.018 mg
<b>T10</b>	10 mg	200 mg	0.18 mg
<b>T100</b>	100 mg	2000mg	1.8 mg
<b>T1000</b>	1000 mg	20000 mg	18 mg

El bioensayo se desarrolló con 150 camarones juveniles *L. vannamei* de peso promedio de 300 mg que fueron distribuidos aleatoriamente (10 camarones por acuario, tres replicados por tratamiento) en esferas de vidrio conteniendo 1.5 L de agua marina sintética con un recambio manual diario del 100 %, aireación continua y condiciones naturales de fotoperiodo. Para mantener una temperatura constante las esferas fueron instaladas al interior de un tanque de 500L llenado con agua marina y conectado al sistema de recirculación de la sala (Fig.8). La temperatura promedio del agua de las esferas y la calidad del agua. El alimento fue preparado diariamente como se mencionó previamente. Los camarones fueron alimentados con una ración equivalente al 10% de la biomasa dividida en tres horarios al día. Se registró mortalidad y consumo a las 0, 12 y cada 24 h, hasta cumplir las 72 h del ensayo. La concentración letal media o LD<sub>50</sub> fue calculada mediante una prueba Probit usando el software SPSS (Versión 20 para Windows).



**Fig 8.-** Sistema de acuarios de esfera de vidrio para bioensayo 1 de consumo y toxicidad del extracto crudo

#### **6.4.2.3.-Bioensayo 2: efecto en crecimiento (28 días).**

Una vez finalizado el ensayo de consumo y toxicidad, los mismos camarones fueron seleccionados, pesados y transferidos a tanques de 60 L de capacidad para realizar un bioensayo de crecimiento de 4 semanas evaluando las mismas dietas con 0,1,10,100,1000 mg de EC/kg de biomasa. El alimento fue preparado diariamente como se menciona en bioensayo 1. Se trabajó con 10 camarones juveniles *L. vannamei* por acuario con un peso promedio de 316 mg. Los tratamientos fueron evaluados por triplicado y asignados al azar en 3 bloques de 5 acuarios. Los camarones fueron alimentados a saciedad iniciando con un 10% de la biomasa presente en cada acuario. La tasa de alimentación fue ajustada hasta encontrar la menor cantidad de restos de alimento. Se calculó diariamente el porcentaje de restos de alimento conforme a los residuos y se registró el número de camarones por acuario. Se registraron los siguientes parámetros zootécnicos:

Peso individual: fue medido a los 0, 14 y 28 días del experimento. Los camarones fueron pesados individualmente en una balanza digital con precisión de un miligramo después de haber sido ligeramente secados.

Biomasa del acuario: es la suma de los pesos individuales de los camarones presentes en un acuario. Esta variable refleja los efectos en conjunto del crecimiento y de la sobrevivencia.

Porcentaje de ganancia en peso individual (%): es el incremento en peso con respecto al peso individual promedio inicial. Esta variable fue calculada para cada acuario a partir del

peso promedio inicial y del peso promedio final. Ganancia en peso individual = [(peso individual promedio final - peso individual promedio inicial) / peso individual promedio inicial] X 100.

Tasa de sobrevivencia: el número final de camarones en cada acuario en porcentaje del número inicial. Tasa de sobrevivencia = (Número final/Número inicial) X 100

Consumo: el consumo individual fue estimado cada día a partir de la cantidad de alimento suministrado en cada acuario, del porcentaje de restos de alimento estimado al día siguiente y del número de camarones presentes ese día en el acuario. Para cada acuario el consumo reportado fue la suma del consumo individual diario estimado a lo largo de los 28 días de bioensayo. Consumo individual = (consumo en el acuario al día / número de camarones al día).

Tasa de conversión alimenticia (TCA): es el alimento consumido por unidad de peso ganado. TCA= consumo individual estimado/incremento en peso individual promedio.

Para validar la homogeneidad en los replicados de cada tratamiento, el peso individual inicial y el peso promedio de cada replicado fue analizado mediante un análisis de varianza. Los parámetros evaluados por acuario (biomasa final, tasa de crecimiento, sobrevivencia, consumo y tasa de conversión alimenticia) fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía y un análisis de medias por el método de Tukey para establecer diferencias entre los tratamientos.

#### **6.4.2.4.- Bioensayo 3: preliminar a bioensayo de desafío, efecto histológico de dosis alta (1000mg de EC/ Kg de biomasa de camarón)**

Este ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del CIAD unidad Mazatlán con la intención de realizar un desafío, camarones (*L.vanammei*) fueron proporcionados por la empresa FITMAR, estos fueron distribuidos en 4 tanques de 600 L inmediatamente después del arribo, y alimentados durante 3 días *ad libitum* con una dieta comercial con 35 % de proteína y 9% de lípidos (Bumper crop) para completar el proceso de aclimatación o adaptación a la sala. Después del periodo de aclimatación, los organismos fueron distribuidos nuevamente en 3 tanques (tanques de alimentación) de 600 L con 240 organismos cada uno, donde fueron alimentados durante 5 días con las dosis de 0,1,10,100

y 100 mg de EC/Kg de camarón. Al sexto día se seleccionaron 20 organismos por replica de cada tratamiento de un rango de peso entre 1.1 y 1.9 gr y fueron transferidos a las UE donde fueron alimentados durante 2 días más con los objetivos de completar el periodo de 7 días de alimentación y de aclimatar a los organismos a las UE. Posteriormente al 8vo día se llevó a cabo la infección, cada tratamiento contaba con 4 réplicas c/u con 7 camarones de un peso promedio de 12.1 g. Al terminar el ensayo se comprobó mediante histología que el estado de salud inicial de los camarones no era apto, ya que estos camarones presentaban daños histológicos producidos por una infección previa, por lo que el ensayo fue anulado. Pero, se pudo determinar el efecto del consumo de 6 camarones analizados mediante histología, al consumir durante 7 días el alimento con la dosis más alta de EC (1000 mg de EC/ Kg de biomasa de camarón).

La sala de bioensayos del CIAD unidad Mazatlán (Fig.9) cuenta con 4 tanques de 600 L (tanques de alimentación), 20 acuarios para desafío circulares de capacidad 60 L (UE), además cuenta con sistema de circulación de flujo abierto y aireación individual, el agua marina es tratada mediante una serie de filtros mecánicos, pasando inicialmente por un filtro de arena sílica, posteriormente por un filtro de cartucho de tamaño de poro de 10  $\mu\text{m}$  seguido de uno de tamaño de 5  $\mu\text{m}$ . Las UE son llenadas con 40 L y tienen un recambio de 7 veces su volumen (280 L/día), el agua de estas unidades es tratada con lámpara de luz ultravioleta (UV) para mantenerla libre de microorganismos.



**Fig 9.-** Instalaciones de la sala de desafíos pertenecientes al CIAD unidad Mazatlán.

El procesamiento de las muestras y el diagnóstico fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología-CIAD-Mazatlán por el MVZ. Rodolfo Lozano Olvera. Todos los organismos se inyectaron y se mantuvieron en solución Davidson durante 36 h, posterior a este tiempo se sustituyó la solución por alcohol al 70 %. Cada organismo se cortó

longitudinalmente por la línea media para su deshidratación e inclusión en parafina siguiendo lo recomendado por Bell y Lightner (1988). De cada muestra se obtuvieron cortes de 5 µm, los cuales fueron teñidos con la tinción de hematoxilina-eosina-floxina según lo recomendado por Luna (1968). Los cortes histológicos de cada camarón se observaron en un microscopio compuesto Olympus CX31 para identificar y describir los daños patológicos presentes en los tejidos.

#### **6.4.2.5.- Bioensayo 4: desafío dosis de 100 mg EC de *E. arborea* /Kg de biomasa de camarón**

Este ensayo de desafío por baño con Vp M0904 AHPND+ se llevó a cabo en las instalaciones del CIAD unidad Mazatlán siguiendo la metodología de Soto-Rodriguez et al. 2015. Durante el desafío se evaluó el efecto del extracto crudo (EC) de *E. arborea* a la dosis de 100 mg EC /Kg de biomasa de camarón en términos de sobrevivencia. Los camarones juveniles de *L. vanammei* para este experimento fueron proporcionados por la empresa FITMAR transportados vía terrestre y a su llegada al CIAD fueron distribuidos en 4 tanques de 600 L y alimentados durante 3 días *ad libitum* con el alimento comercial Bumper crop (35 % de proteína y 9% de lípidos) para completar el proceso de aclimatación o adaptación. Posteriormente los organismos fueron redistribuidos en 3 tanques (tanques de alimentación) de 600 L a razón de 240 organismos por tanque. Cada grupo fue alimentado con los alimentos experimentales del bioensayo 1 y con alimento Bumper crop usado como alimento testigo en experimentos del CIAD (tabla 7) durante 5 días.

**Tabla 7.-** Descripción de dietas experimentales.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
<b>T1</b>	Alimento LECS 742 + dosis 100 mg extracto (EC) /Kg de biomasa de camarón
<b>Control</b>	Alimento LECS 742
<b>Testigo</b>	Alimento Bumper crop

Al sexto día, se seleccionaron 20 organismos por réplica de cada tratamiento, de un rango de peso de 1.1 a 1.9 g, se distribuyeron en las UE de acuerdo al diseño experimental mostrado en la tabla 8 y se alimentaron con la misma dieta durante 2 días más, con los

objetivos de completar el periodo de 7 días de alimentación y aclimatar los organismos a las UE.

**Tabla 8.-** Diseño experimental de tratamientos para evaluación en desafío

<b>Tratamiento</b>	<b>Réplicas/ No. De organismos</b>	<b>Infección</b>
<b>T1+</b>	4/20	+
<b>T1-</b>	4/20	-
<b>C+</b>	4/20	+
<b>C-</b>	4/20	-
<b>Test +</b>	4/20	+

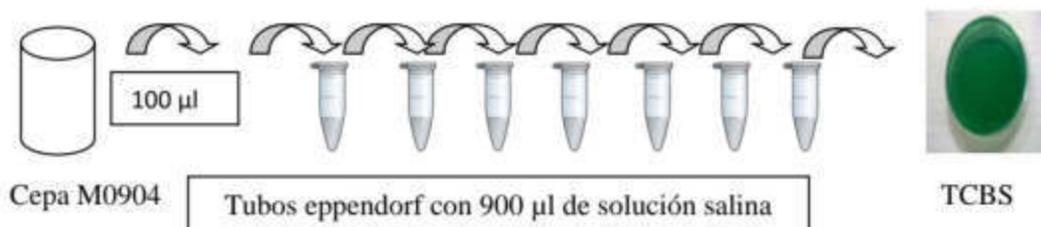
En la etapa de infección (día 8), la inoculación de las unidades experimentales asignadas con tratamientos infectados se llevó a cabo vertiendo 3 mL (medidos con una micropipeta de 1000 µL utilizando puntillas estériles) de biomasa del inóculo ( $6.5 \times 10^9$  UFC/mL) obtenido (como se explica abajo) después de 15.5 h de incubación. Los tratamientos control negativo se inocularon con caldo estéril (sin bacteria). Los organismos fueron monitoreados después de la infección durante 7 días, registrando tiempo y número de organismos muertos o moribundos, desarrollo de signos clínicos propios de la enfermedad (letargia, palidez, nado errático etc.), consumo de alimento (se alimentaba a los organismos sobrevivientes a una relación de 2 pellets por organismo en dos raciones), y presencia de mudas y heces.

Los daños histológicos fueron determinados mediante análisis de tejidos de camarones por lo que se tomaron muestras de camarones que fueron alimentados con el tratamiento (100mg EC/Kg de biomasa de camarón) después de 7 días alimentación (12 organismos por tratamiento) y durante la infección se fijaron los hepatopáncreas de camarones moribundos. Al finalizar el desafío (102 horas post-infección (h. p. i.)) se colectaron todos los organismos sobrevivientes de cada tratamiento.

Los parámetros de calidad de agua (amonio, nitritos, nitratos, pH, alcalinidad y dureza) fueron monitoreados durante los periodos de alimentación, en los tanques de 600 L y en las unidades experimentales antes y después de la infección, mediante colorimetría con un kit de tiras reactivas (Instanttest).

Se analizaron los pesos de los organismos distribuidos al inicio del ensayo mediante un análisis de comparación de medias, realizando una prueba de Anova de una vía seguido de una prueba Tukey, utilizando el paquete estadístico SPSS Versión 20; adicionalmente se realizaron pruebas no paramétricas post-infección con el objetivo de realizar un análisis de la sobrevivencia mediante la prueba de Kaplan-Meier, y para la comparación entre tratamientos se realizó una prueba de Holm-Sidak utilizando el paquete estadístico Statistica 8.

**Preparación del inóculo.** La activación de la cepa Vp M0904 AHPND+ se realizó como se indica en el punto 6.3.1.2. Una vez obtenido el inóculo con crecimiento, se adicionaron 100µL de la cepa a un matraz con 60 ml de caldo de soya tripticasa (TSB) al 2 % de NaCl, posteriormente se incubó a 30°C con una agitación de 150 rpm durante 15 horas y 30 min. Adicionalmente se tomó muestra 1 mL para determinar la cantidad de células contenidas en el inóculo mediante qPCR. Se realizó una cuenta viable realizando diluciones seriadas 1:10, para ello, 100 µl de la cepa (biomasa) se adicionaron a un tubo eppendorf con 900 µl de solución salina estéril, se agitó durante 5s (Vortex) y se continuó con las demás diluciones hasta llegar a la octava dilución como se muestra en la Figura 10. De las dos últimas diluciones se tomaron 100 µl y se realizó una siembra por extensión en agar TCBS realizando movimientos circulares constantes para asegurar la correcta dispersión de las colonias en el medio. Finalmente se incubó a 30 °C durante 24 h y se realizó el conteo de colonias para obtener la concentración de bacterias viables



**Fig 10.-** Representación de diluciones seriadas 1:10

## 6.5.-Caracterización de compuestos del EC del alga seleccionada (*E. arborea*)

### 6.5.1.- Análisis fitoquímico preliminar del EC de *E. arborea*

El EC del alga seleccionada se analizó para detectar la presencia de: insaturaciones, ácidos carboxílicos, carbohidratos totales, funcionalidad carbonilo de la cetona o aldehído,

esteroides y triterpenos, cumarinas, lactonas, saponinas, alcaloides, taninos, flavonoides y quinonas mediante los procedimientos estándares (Kadam et al. 2012; Nanna et al. 2013; Rodríguez-Garza et al. 2011).

### **6.5.2.-Análisis proximal y contenido de compuestos fenólicos totales en el EC del alga seleccionada (*E. arborea*)**

El contenido total de lípidos del alga fue determinado por el método Bligh and Dyer descrito por de Zhang et al. (2014). El contenido de carbohidratos se determinó mediante el método de antrona como lo describe Yemm y Willis (1954). El contenido total de proteína y minerales (ceniza) fue medido usando métodos establecidos por AOAC 930.03 y 930.15 respectivamente y el contenido de fenólicos totales fue determinado usando el método de Folin-Ciocalteu. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

### **6.5.3.- Identificación y cuantificación de compuestos del EC de *E. arborea***

Este procedimiento fue llevado a cabo en el Centro de Biotecnología-FEMSA, del Tecnológico de Monterrey. La cuantificación de los compuestos principales en el EC de *E. arborea* se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC-DAD). El equipo se acopló con un detector de rayos UV / VIS (serie Agilent Technologies 1200, Santa Clara, CA, EE. UU.). El análisis se llevó a cabo usando una columna Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm, Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido) a un flujo de 1 ml/min (volumen de inyección de 10 µl). La fase móvil consistió en (A) agua (acidificada con 1% de ácido fórmico) y (B) 100% de metanol. La elución se realizó de la siguiente manera: 0-20 min 100% A, 20-30 min 70% A, 20-35 min 40% A y 35-40 min 100% A, a 40 °C. Los datos espectrales de todos los picos se acumularon en el rango de 230-550 nm y los cromatogramas se registraron a 270 nm. Los datos cromatográficos se recopilaron utilizando el software HP-Agilent para LC (Copyright Agilent Technologies, 1990-2003). Se utilizó fluoroglucinol como estándar para cuantificar los compuestos bioactivos mediante regresión lineal. La concentración de compuestos bioactivos (n = 3) se expresó como µg de equivalentes de floroglucinol por g de extracto, utilizando la siguiente curva de calibración:  $y = 1.7075x + 0.9881$  (R<sup>2</sup> = 0.9994).

Las mismas condiciones cromatográficas descritas anteriormente se utilizaron para identificar compuestos bioactivos en HPLC-MS-TOF (Agilent Technologies 1100, Santa Clara, CA, EE. UU.). Los espectros de masas se recogieron usando una fuente de electropulverización en modo positivo (ESI +) en las siguientes condiciones: rango 100 a 1500 m/z, gas nitrógeno, temperatura del gas 300 °C, con un flujo de gas de secado de 8 L/min, presión del nebulizador 20 psi, capilar el voltaje 4000 V y el voltaje del fragmentador 70 V. Los cromatogramas de iones extraídos se obtuvieron utilizando el software Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.) y considerando la masa precisa de cada uno de los compuestos bioactivos o sus aductos con Na o K con un rango de error de 0.01 unidades. Los espectros de masas se utilizaron para identificar los diferentes compuestos en función de sus patrones de fragmentación y posteriormente se compararon y verificaron con estudios previos (Tierney et al. 2013; Isaza y Torres 2013).

#### **6.5.4.-Obtención de fracción soluble en Acetato de etilo del EC de *E. arborea***

Con la finalidad de aumentar la actividad antibacteriana, debido a que no se observó una mejora en la sobrevivencia en el desafío con el EC de *E. arborea*, el EC (1.22 g) se resuspendió en 100 ml de metanol al 80% y se particionó dos veces con 100 ml de hexano (1: 1, v / v) a temperatura ambiente. La fracción de metanol se recuperó y se evaporó al vacío. El residuo obtenido se suspendió en acetato de etilo y se particionó tres veces con agua destilada (3: 1, v / v). La fase superior (fracción de acetato de etilo) fue recuperada en cada momento y posteriormente fue agrupada. Esta fracción se llevó a sequedad al vacío a 40 °C en un evaporador EZ-2 plus Evaporador (GeneVac Ltd., Ipswich, Reino Unido). El extracto concentrado obtenido fue identificado como fracción soluble en acetato de etilo (FAE). La figura 11 muestra una representación gráfica de la preparación del extracto concentrado (FAE). Se determinó el porcentaje del rendimiento tomando en cuenta el promedio del peso húmedo de las dos extracciones para las fracciones de hexano, FAE y agua. La actividad antibacteriana de las fracciones extraídas con hexano, agua y acetato de etilo fue evaluada mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) siguiendo la metodología previamente descrita en el punto **6.3.1.5**.

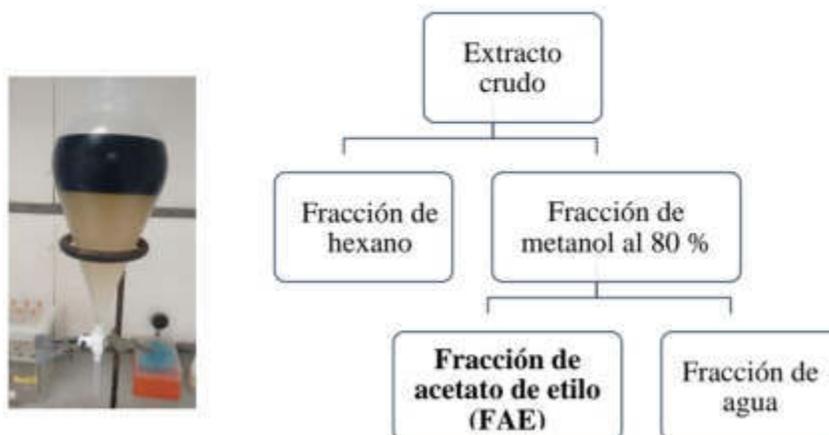


Fig 11.- Obtención de fracción soluble en acetato de etilo a partir del EC

## 6.6.- Evaluación de la fracción extraída en acetato de etilo (FAE) de *E. arborea*

### 6.6.1.- Evaluación de toxicidad en *Artemia* de FAE de *E. arborea*

La evaluación de la toxicidad de la fracción acetato de etilo (FAE) obtenida del fraccionamiento del EC, se llevó a cabo mediante la determinación de la  $LC_{50}$  en *Artemia sp.*, el ensayo se realizó siguiendo la metodología previamente descrita en bioensayo 1 (6.4.1). Se realizaron dos ensayos independientes (ensayo 1 y 2) con 4 réplicas cada uno, y usando como control negativo el solvente en donde se disolvió la FAE (metanol al 5 %).

### 6.6.2.- Bioensayos en camarón con dieta adicionada con FAE de *E. arborea*

Debido a que la fracción del EC soluble en acetato de etilo (FAE) presentó una mayor actividad antibacteriana con respecto al EC y una toxicidad baja en pruebas con *Artemia*, se continuó con su evaluación en dietas para camarón a diferentes dosis. Los experimentos en camarón fueron diseñados con la finalidad de evaluar el efecto de diferentes dosis del extracto en términos de toxicidad (Bioensayo 5), y sobrevivencia de camarones desafiados (Bioensayo 6). La dieta comercial control denominada SI35 R-621 fue utilizada para preparar el alimento suplementado para las posteriores pruebas. El análisis bromatológico del alimento se realizó como se describió previamente en el punto (6.5.2). El alimento medicado se preparó adicionando el extracto de FAE a la superficie del alimento mediante aspersión. La Tabla 9 describe la cantidad de extracto requerida para preparar la dosis de prueba. El extracto se disolvió en 50  $\mu$ l de metanol y se aforó a 5 ml de una solución de gelatina al 4%, la cual fue añadida por aspersión sobre la superficie del alimento control,

(se tomó en cuenta un 10 % de pérdida por manejo y la humedad del extracto del 29 %). Una vez que se homogenizó el alimento se secó a 37 °C durante 45 min y se almacenó en bolsas herméticas en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

**Tabla 9-** Descripción de la cantidad de FAE de *E. arborea* requerida para preparar las distintas dosis de prueba

	Dosis en mg/ Kg de camarón	Dosis en mg/Kg de alimento	mg de extracto requerido para preparar 100 g de alimento
	0.5	10	1.5
<b>Ensayo</b>	1	20	3.1
	2	40	6.2

#### 6.6.2.1.-Bioensayo 5: evaluación de toxicidad en camarones de alimento con FAE del alga *E. arborea*

**Ensayo preliminar:** según las recomendaciones mencionadas en el punto 6.4.2.2 se evaluaron los tratamientos con dosis de 0,1,10,100 y 100 mg de extracto FAE/Kg de camarón, los camarones fueron alimentados a una tasa del 5 % de la biomasa, dividida en tres raciones al día (9:00 am, 12:00 pm y 3:pm), durante 6 días, se registró mortalidad y consumo cada 24 h hasta el término del ensayo

**Ensayo 1:** el bioensayo se llevó a cabo en acuarios de 60 L de la sala de bioensayos del programa Maricultura. Se evaluaron los tratamientos de 0, 0.5, 1 y 2 mg de FAE/kg de biomasa de camarón. Para ello, 10 camarones de peso promedio de  $729 \pm 0.06$  mg fueron alimentados durante 7 días, iniciando con una tasa del 10 % de la biomasa. La evaluación consistió en alimentar con una ración de alimento medicado dividida en tres raciones al día (9:00 am, 12:00 pm y 3:pm), a 10 camarones con 3 réplicas por tratamiento, registrando mortalidad y consumo cada 24 h hasta el término del ensayo. La sobrevivencia fue calculada y se realizaron comparaciones entre tratamientos y control mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidos por una prueba LSD post-hoc (software STATISTICA, Versión 5.0).

#### **6.6.2.2.- Bioensayos de desafío en camarón con dietas suplementadas con FAE**

En base a la experiencia obtenida en estancias en el CIAD de Mazatlán, se implementaron ensayos de desafíos en las instalaciones del Programa Maricultura.

##### **6.6.2.2.1.-Sala de desafíos del Programa Maricultura**

La sala de desafíos (Figura 12) del Programa Maricultura es una habitación aislada de la sala de bioensayos especialmente diseñada para llevar a cabo estos ensayos; la sala cuenta con aislamiento térmico y está equipada con un mini Split y calentadores eléctricos, para mantener la temperatura a  $32 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Se mantiene un fotoperiodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad, además cuenta con un área aislada para toma de muestras. Está equipada con acuarios de plástico con capacidad de 30 L y acuarios de fibra de vidrio de capacidad de 15 L los cuales cuentan con un sistema de aireadores independientes.



**Fig. 12.-** Instalaciones de la sala de desafíos del programa Maricultura

##### **6.6.2.2.2.-Determinación de dosis de biomasa infectiva (volumen de inóculo) para desafío por baño en Programa Maricultura**

Con el objetivo de reproducir la enfermedad de AHPND en camarón en las instalaciones del Programa Maricultura, se llevaron a cabo una serie de ensayos preliminares, hasta obtener mortalidades causadas por Vp M0904 y observar el desarrollo característico de la enfermedad. Uno de los ensayos consistió en evaluar diferentes dosis de biomasa de bacteria con el objetivo de definir la concentración de bacterias necesarias para producir mortalidades, tratando de obtener resultados similares a los obtenidos en ensayos realizados en CIAD, Mazatlán.

Camarones provenientes de la sala de bioensayos, fueron transferidos a las UE de la sala de desafíos donde se instalaron un total de 12 acuarios con 30 L de agua marina, aireación individual, flujo cerrado y recambio manual del 50%; el agua marina usada fue proveniente de la sala de bioensayos donde fue tratada con un filtro biológico de perlas y lámpara de UV. Se distribuyeron 10 organismos por acuario, de un peso promedio de 1.4 g, mismos que fueron aclimatados a las condiciones de prueba durante un 1 día.

Los tratamientos evaluados consistieron en tres dosis diferentes de inóculo de la cepa de Vp M0904 (ver tabla 10)

**Tabla 10.-** Diseño experimental del desafío de selección de dosis infectiva

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Replicas</b>	<b>Infección</b>
T1+	Dosis 0.1 mL/L	3	+
T1-	Dosis 0.1 mL/L	1	-
T5+	Dosis 0.5 mL/L	3	+
T5-	Dosis 0.5 mL/L	1	-
T10+	Dosis 1 mL/L	3	+
T10-	Dosis 1 mL/L	1	-

La infección se llevó a cabo inoculando 3, 15 y 30 mL de biomasa (producida como se indica abajo después de 12 h de incubación) en los 30 L de agua marina de cada UE, usando una micropipeta de 1000 µL y una probeta de 50 mL estéril, agitando la biomasa entre cada toma. Los controles negativos se inocularon con caldo TSB al 2.5 % de NaCl estéril (sin bacteria). Los organismos fueron monitoreados después de la infección durante 7 días, registrando tiempo, número de organismos muertos o moribundos, desarrollo de signos clínicos propios de la enfermedad (letargia, palidez, nado errático etc.), consumo de alimento, así como presencia de mudas y heces. Los datos obtenidos de los pesos promedios de los camarones y la sobrevivencia con los distintos tratamientos fueron analizados como se mencionó previamente en el bioensayo 4.

**Preparación del inóculo.** En este ensayo la activación se llevó a cabo como se menciona en el punto (6.2.2), modificando la temperatura a 29°C, con agitación constante a 180 rpm (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Germany) durante 12 h. Una vez obtenido el inóculo con crecimiento, se adicionaron 200µL de la cepa a tres matraces de 250 mL de

capacidad, conteniendo 60 ml de TSB al 2 % de NaCl cada uno y perlas de ebullición, se incubó a 30°C con agitación constante a 180 rpm durante 12 h, posteriormente se agrupó el inóculo de los tres matraces y se homogenizó con agitación durante 5 minutos, seguido se tomó 1 mL para determinar la cantidad de células contenidas en el inóculo mediante el método de cuenta viable.

#### **6.6.2.2.3.-Bioensayo 6: desafío en camarones alimentados con FAE a dosis de 0.5, 1 y 2 mg de extracto FAE/ Kg de biomasa de camarón**

El alimento suplementado fue preparado como se mencionó previamente, los primeros 5 días los alimentos fueron administrados en los tanques de 120 L y posteriormente en las UE, por lo que se tomó en cuenta la biomasa, para los cálculos de la ración diaria, la alimentación fue dada al 7 % de la biomasa, dividida en tres raciones al día (9:30 am, 1:30 pm y 4:30 pm). Al sexto día, se pesaron los organismos de manera individual, se seleccionaron 15 camarones con peso homogéneo para cada replica de cada tratamiento y se distribuyeron en las UE (acuarios de fibra de vidrio de 20 L que fueron llenados a un volumen de 15 L) de acuerdo al diseño experimental mostrado en la tabla 9, y se alimentaron durante 1 día más con el objetivo de completar el periodo de 7 días de alimentación y aclimatar a los organismos en las UE.

**Ensayo 1:** Camarones de peso promedio  $0.663 \pm 0.36$  g, fueron alimentados durante 7 días con los tratamientos de 0.5, 1 y 2 mg de FAE/ Kg de biomasa de camarón y posteriormente fueron desafiados,

**Ensayo 2:** Los tratamientos evaluados consistieron en el tratamiento 1 (T1) con extracto de FAE a una dosis de 1 mg/kg de biomasa de camarón y un tratamiento control (C) que consistió en la dieta control sin extracto (Tabla 11). Camarones en un rango de peso de 0.5- 1 g fueron distribuidos en 2 tanques de 120 L con 130 organismos cada uno, donde fueron alimentados durante 6 días.

**Tabla 11.-** Descripción de los tratamientos de la evaluación de extracto FAE en desafío

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Replicas/No. de organismos</b>	<b>Infección</b>
<b>T1+</b>	Dosis 1mg de extracto FAE/Kg de biomasa de camarón	4/ 15	+

<b>T1-</b>	Dosis 1mg de extracto FAE/Kg de biomasa de camarón	2/15	-
<b>C+</b>	Alimento control	4/15	+
<b>C-</b>	Alimento control	2/15	-

La infección por inmersión se llevó a cabo al 8avo día inoculando 17 mL de la biomasa (producida como se indica abajo) en las UE, que contenían 15L de agua marina, usando una probeta de 50 mL estéril, agitando la biomasa entre cada toma, en los tratamientos negativos se inoculó la misma cantidad de caldo TSB al 2.5 % de NaCl estéril (sin bacteria).

Se determinó la cuenta viable del patógeno al momento de la infección, recolectando muestras de agua de un acuario por cada tratamiento Durante el desafío se realizó el monitoreo de los organismos, registrando tiempo y número de organismos muertos o moribundos. La sobrevivencia fue calculada para cada tratamiento y los datos fueron analizados como se menciona en bioensayo 4. Los parámetros de calidad del agua fueron monitoreados antes del ensayo y a las 24 h post-infección como fue descrito en el punto **6.4.2.1.2.**

**Preparación del inóculo.** La activación de la cepa para este ensayo fue modificada, la cepa Vp. M09-04 fue sembrada en agar TSA al 2.5 % de NaCl, dispersando el contenido líquido y la cuenta de vidrio por todo el agar, con el objetivo de lograr un crecimiento bacteriano uniforme por toda la caja. Se incubó a 30 °C durante 24 h. Una vez observado el crecimiento bacteriano en la caja con agar TSA fue dividida en 4 partes y con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó la biomasa de una ¼ y posteriormente fue transferida a un tubo con 3 ml de TSB al 2.5 % de NaCl, se incubó por 45 min con el fin de obtener un pre-inóculo, seguido se tomó 1 ml y se adicionó a un matraz con 150 ml de caldo TSB al 2.5 % de NaCl, que contenía perlas de vidrio para ayudar al proceso de agitación, posteriormente se incubó a 29°C a 150 rpm (Unimax 1010, Heidolph), durante 9 h y 30 min, posteriormente se determinó la absorbancia a una longitud de onda 610 nm en el espectrofotómetro (Beckman Du 650), y se realizó la técnica de cuenta viable para conocer la concentración de bacterias.

## **6.7.- Caracterización química de la FAE**

### **6.7.1.-Cuantificación de florotaninos en FAE de *E. arborea* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La cuantificación se llevó a cabo como se menciona en el punto 6.5.3, con modificaciones en el flujo; 0,8 mL / min, y en el modo de elución: 0-10 min 0% B, 10-20 min 30% B, 20-30 min 60% B y 30-35 min 60% B, 35-40 min 0% B (tiempo post) a 40 ° C. De igual manera se utilizó un estándar de HPLC de floroglucinol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los florotaninos se cuantificaron en miligramos (mg) equivalentes de floroglucinol por gramo de extracto, usando la siguiente curva de calibración:  $y = 2.4249 x + 3.1347$  ( $R^2 = 0.9994$ ).

### **6.7.2.-Identificación de florotaninos en FAE de *E. arborea* por cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC / MS-TOF)**

La identificación de los principales compuestos se realizó cómo se menciona en el punto 6.5.3 con variaciones en las condiciones de: rango 150 a 1500 m / z, gas nitrógeno, temperatura del gas 350 °C, velocidad de flujo del gas de secado 11 L / min, presión del nebulizador 50 psi, capilar voltaje 3500 V y voltaje del fragmentador 50 V.

### **6.7.3.-Aislamiento de florotaninos por cromatografía de partición centrífuga preparativa (FCPC)**

#### **6.7.3.1.-Selección del sistema solvente bifásico para cromatografía de partición centrífuga (FCPC)**

Para lograr una separación eficiente de florotaninos de *E. arborea* en FCPC, dos sistemas de solventes bifásicos fueron probados: Sistema A (A), que consistió en n-hexano/acetato de etilo/etanol/agua (1:6:1:6 v/v/v/v), mientras que el sistema B (B) constituido por n-hexano/acetato de etilo/metanol/agua (2:7:3:7 v/v/v/v). Los valores de  $K_d$  de eckol, dieckol, fucofuroeckol e isómeros de fucofuroeckol en los diferentes solventes se calcularon de acuerdo con el siguiente procedimiento: 0.5, 1.0 y 2.0 mg de la fracción FAE fueron pesados en tubos eppendorf (1.8mL) y se adicionó a 0.6 mL de cada fase del sistema de dos fases pre-equilibrado. Posteriormente, para asegurar la completa separación los tubos fueron agitados durante 20s y se permitió la separación de fases durante 10 min. Cada fase (superior e inferior) se evaporó por separado a sequedad bajo

vacío (Evaporador EZ-2 plus, GeneVac Ltd., Reino Unido). El residuo se disolvió en 1 ml de metanol 100% y se analizó por HPLC. El valor de  $K_d$  fue expresado como el área del pico del compuesto de interés en la fase superior dividido entre el área de la fase inferior (Wei et al. 2011).

### **6.7.3.2.- Equipo**

La cromatografía de partición centrífuga preparativa se realizó usando un instrumento de cromatografía centrífuga de partición rápida (FCPC) (Kromaton, Angers, Francia) con un volumen total de celda de 1000 ml. El sistema estaba equipado con una bomba binaria. El equipo FCPC fue operado en modo descendente.

### **6.7.3.3- Preparación del sistema solvente bifásico y la solución muestra**

Las fase superior e inferior del sistema de disolvente seleccionado se equilibraron por separado a temperatura ambiente y luego se mezclaron vigorosamente. Las fases se desgasificaron mediante sonicación (Branson Ultrasonic Co., USA) durante 30 minutos poco antes de su uso. La solución de muestra para FCPC se preparó disolviendo 1.05 g de extracto FEA en 100 ml de fase superior del sistema de solventes seleccionado.

### **6.7.3.4.-Procedimiento de separación por cromatografía de partición centrífuga (FCPC)**

La separación analítica de FCPC se realizó en modo descendente de la siguiente manera: la columna fue llenada por completo con la fase superior del sistema de disolvente y la temperatura fue ajustada a 25 °C. Posteriormente, la fase inferior fue bombeada a la columna a una velocidad de flujo de 2.5 mL / min, mientras el aparato giraba a 850 rpm. Una vez que se estableció el equilibrio hidrostático la solución de muestra fue inyectada. El efluente de la salida de FCPC fue monitoreado a 270 nm y se acopiaron fracciones de 5 mL. En total se colectaron ciento veinte fracciones y se agruparon en grupos de 10 fracciones, de acuerdo con la similitud de sus valores de coeficiente de partición ( $K_d$ ) para facilitar su análisis. Un total de 12 pools se concentraron a sequedad a 40 °C bajo vacío utilizando el Evaporador EZ-2 y fueron almacenados a -20 °C. Las muestras para el

análisis por HPLC se prepararon disolviendo las mezclas secas en metanol al 100% a una concentración adecuada seguido de filtración (membrana de filtro de 0.45  $\mu$ m).

#### **6.7.3.5.-Purificación de eckol**

La purificación semipreparativa del eckol de *E. arborea*, se realizó mediante HPLC-UV equipado con un detector ultravioleta (Agilent, Santa Clara, CA). Los cromatogramas se obtuvieron a 270 nm, después de la inyección de 20  $\mu$ L de muestra, los datos fueron generados por el software Agilent ChemStation. La separación se realizó en una columna semi-preparativa Zorbax SB-C18 (9,4 x 250 mm, 5  $\mu$ m) a 40 °C con un flujo de 2 ml / min. La fase móvil utilizada fue (A) agua con ácido fórmico al 0.1% (Sigma, St. Louis, MO) y (B) metanol al 80%. La separación se logró comenzando con el 40% de B, aumentando hasta el 100% de B hasta los 6 min, se mantuvo el 100% de B hasta los 10 min y luego disminuyendo hasta el 40% de B durante los siguientes 2 min. El pico de eckol se colectó y se concentró en nitrógeno.

#### **6.7.4.-Actividad antibacteriana de los distintos compuestos obtenidos**

Se determinó la concentración mínima bactericida (MBC) contra Vp AHPND+ de los 12 pools obtenidos a partir de fraccionamiento mediante FCPC del compuesto eckol, purificado mediante HPLC, y adicionalmente del extracto comercial rico en dieckol (AG Dieckol®, Aqua Green Tech Co. Jeju, Korea), siguiendo la metodología previamente descrita (6.3.3), las muestras fueron disueltas en metanol al 5 % y éste fue usado como control negativo. Se evaluaron concentraciones de 50-750  $\mu$ g/mL para todas las muestras.

#### **6.8.- Mecanismo de acción de FAE de *E. arborea***

##### **6.8.1.-Inhibición de quórum- sensing**

La cepa reportera *C. violaceum* CV026 se incubó durante la noche se depositaron 100  $\mu$ L de inóculo en caldo luria o LB, posteriormente el cultivo fue añadido sobre la superficie de placas de agar LB. Se realizaron pozos utilizando un sacabocados estéril (0,6 mm de diámetro) sobre placas de agar, seguido se adicionaron 10  $\mu$ L del extracto FAE (1mg/mL) y se incubaron durante 36-48 h. Las placas fueron monitoreadas para observar la formación de color púrpura en la cepa reportera CV026 como indicador de quorum-

sensing. La formación de un halo sin el pigmento indicador se consideró un resultado positivo que indica la presencia de un inhibidor (Chang et al.2017).

### **6.8.2.- Actividad antibiofilm mediante microscopia láser confocal**

Para visualizar el efecto del extracto FAE en la capacidad de formación de biofilm de Vp M0904, la cepa fue activada como se ha descrito anteriormente, posteriormente se tomó una alícuota y se adicionó a cubreobjetos sumergidos en caldo TSB 2 % NaCl que contenía las 3 concentraciones del extracto (1000, 500 y 250  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), se incubó a 30 ° C durante 24 h. El medio sin extracto y metanol actuaron como controles. Los cubreobjetos se lavaron con Buffer de fosfatos, se tiñeron con acridina naranja al 0,1% y se observaron con microscopía de barrido láser confocal

## 7.- RESULTADOS

### 7.1.-Actividad anti *V. parahaemolyticus* (M0904) de extractos crudos obtenidos con diferentes solventes de algas

De los treinta extractos evaluados (obtenidos a partir de las 6 especies de algas extraídas con los 5 diferentes solventes) solamente presentaron actividad contra *V. parahaemolyticus* AHPND+ (M0904) 4 extractos de 3 especies de algas obtenidos con 2 solventes que fueron los siguientes: extractos acetónicos de *Ecklonia arborea*, *Silvetia compressa* y *Cystoseira osmundacea* y el extracto en acetato de etilo de *Ecklonia arborea*. Las zonas de inhibición observadas con los 4 extractos (con el método de difusión en disco) fueron relativamente similares:  $8.3 \pm 0.25$ ,  $7.1 \pm 0.05$ ,  $7.3 \pm 0.24$  mm y  $7.2 \pm 0.20$  mm (Tabla 12). No se observó inhibición con los extractos de ningún alga obtenidos en frío con diclorometano / metanol 1:1 (DCM/ M), etanol (E) o con éter de petróleo (PE). Con esta prueba se reconoció la acetona como el mejor solvente para extraer los compuestos anti Vp AHPND+ de las algas y se seleccionó como el solvente a utilizar para la obtención de ECs en las siguientes fases de investigación.

**Tabla 12.-**Diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de Vp M0904 de extractos fabricados con diferentes solventes de seis algas pardas (Ensayo de difusión en agar con discos). (-) sin halo de inhibición, AE: acetato de etilo A: acetona, DCM / M: diclorometano / metanol 1: 1, E: etanol, PE: éter de petróleo. ( $p > 0.05$ )

Alga	Diámetro zona de inhibición (mm)				
	AE	A	DCM/M	E	EP
<i>E. arborea</i>	$7.2 \pm 0.2$	$8.3 \pm 0.3^a$	-	-	-
<i>E. menziesii</i>	-	-	-	-	-
<i>C. osmundacea</i>	-	$7.3 \pm 0.2^b$	-	-	-
<i>P. californica</i>	-	-	-	-	-
<i>S. compressa</i>	-	$7.1 \pm 0.1^b$	-	-	-
<i>M. pyrifera</i>	-	-	-	-	-
Control (+)	$24.1 \pm 0.5$				

**7.2.- Actividad anti *V. parahaemolyticus* (M0904) de extractos acetónicos de las algas obtenidos con extracción en frío (temperatura ambiente) y con calor evaluados mediante ensayos en discos y en pozos.**

En las tablas 13 y 14 se presentan los diámetros de las zonas de inhibición de los extractos acetónicos de las 6 algas, y de la enrofloxacin obtenidos con extracciones en temperatura ambiente y en caliente en ensayos con discos y en pozo. De manera general, la actividad antibacteriana medida en pozos fue significativamente mayor que la medida con discos, así mismo los extractos fueron significativamente más activos cuando la extracción se realizó en caliente. Las figuras 13y 14 muestran fotos de los halos de inhibición en pozos de los extractos obtenidos mediante extracción caliente.

En los dos experimentos, los extractos de *E. arborea* se confirmaron como los más activos ( $p \leq 0.001$ ) presentando una zona de inhibición en pozos 15.5% mayor (16.5 mm) cuando la extracción fue con calor con respecto a la extracción en frío (12.4 mm) y 15.5 % mayor con el ensayo en caliente en pozo con respecto a ensayo en disco (9.2 mm). El extracto acetónico de *E. arborea* presentó una actividad equivalente al 70% de la actividad del antibiótico usado como control positivo, la enrofloxacin (30  $\mu\text{g/mL}$ ). La mezcla de solventes (DMSO al 5% adicionado con 0.75 % de Tween 20) usada en los ensayos en pozos no produjo halos de inhibición.

En orden descendente, la actividad de los extractos en caliente medida en pozos fue la siguiente: *E. arborea* > *M. pyrifera* > *S. compressa* > *E. menziesii* > *C. osmundacea*. Los extractos de *P. californica* fueron los únicos que en todos los ensayos no presentaron actividad. Se confirmó que el alga con mayor potencial antibacteriano contra Vp AHPND+ fue *E. arborea*; el mejor método de extracción de los compuestos activos fue el método Soxhlet con calor y el ensayo más sensible fue el método de difusión en pozos. Esta alga y estas condiciones de evaluación y de extracción se seleccionaron como estándar para las siguientes etapas de la investigación

**Tabla 13.** - Actividad antimicrobiana (diámetros de halos de inhibición en mm) de extractos acetónicos de algas mexicanas contra *Vibrio parahaemolyticus* M09-04 AHPND + determinado mediante el ensayo de difusión en discos.

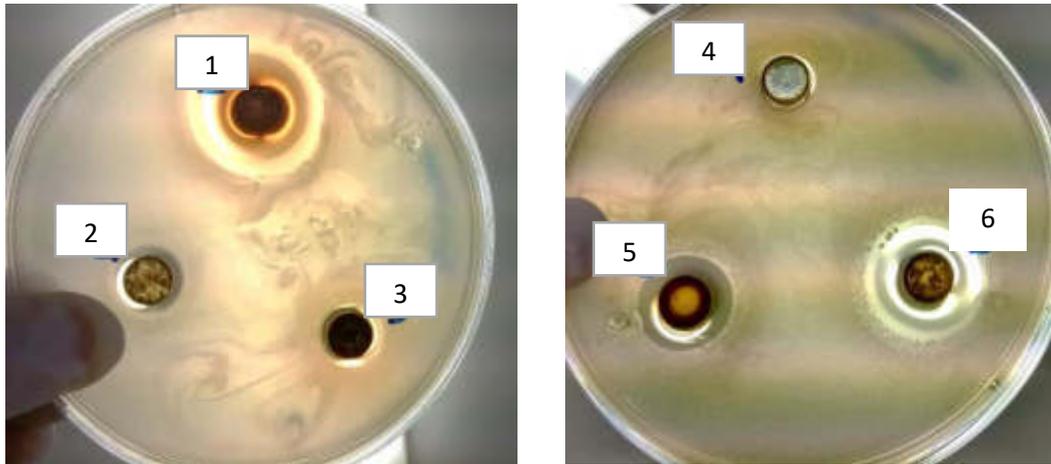
Método de extracción	Especie de alga						ANOVA		
	<i>E. arborea</i>	<i>E. menziesii</i>	<i>C. osmundacea</i>	<i>P. californica</i>	<i>S. compressa</i>	<i>M. pyrifer</i>	Alga	Metódo	Interacción
Fría	8.1 ± 0.5 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	7.7 ± 0.4 <sup>bc</sup>	0 <sup>a</sup>	7.7 ± 0.1 <sup>bc</sup>	0 <sup>a</sup>	p<0.001	p=0.615	p<0.001
Caliente	9.2 ± 0.8 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	6.9 ± 0.1 <sup>b</sup>			
Control positivo Enrofloxacina	19.7 ± 0.3								

Las letras diferentes representan valores con diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ). La mezcla de solventes usada para diluir los extractos no produjo halos de inhibición.

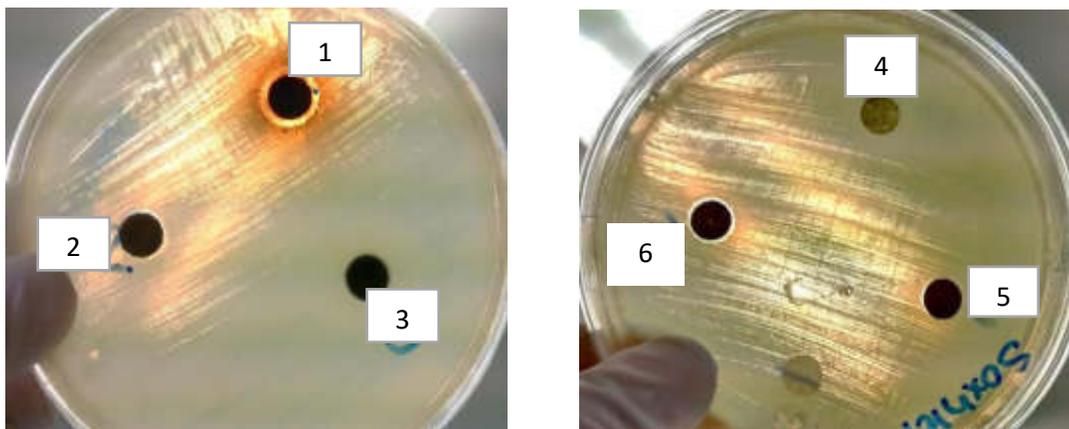
**Tabla 14.** - Actividad antimicrobiana (diámetros de halos de inhibición en mm) de extractos acetónicos de algas mexicanas contra *Vibrio parahaemolyticus* M09-04 AHPND + determinado mediante el ensayo de difusión en pozos.

Método de extracción	Especie de alga						ANOVA		
	<i>E. arborea</i>	<i>E. menziesii</i>	<i>C. osmundacea</i>	<i>P. californica</i>	<i>S. compressa</i>	<i>M. pyrifer</i>	Alga	Metódo	Interacción
Fría	12.4 ± 0.5 <sup>c</sup>	9.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	9.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	9.2 ± 0.7 <sup>b</sup>	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Caliente	16.5 ± 0.9 <sup>f</sup>	9.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	9.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	13.5 ± 0.2 <sup>d</sup>	15.0 ± 0.5 <sup>e</sup>			
Control positivo Enrofloxacina	24.1 ± 0.5								

Las letras diferentes representan valores con diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ). La mezcla de solventes usada para diluir los extractos no produjo halos de inhibición.



**Fig. 13.-** Halos de inhibición determinados mediante ensayo de difusión en pozos de extractos obtenidos con extracción caliente. 1: *E. arborea*, 2: *E. menziessi*, 3: *C. osmundacea*, 4: *P. californica*, 5: *S.compressa*, 6: *M. pyrifer*a



**Fig. 14.-** Halos de inhibición determinados mediante ensayos de difusión con discos de extractos obtenidos con extracción caliente. 1: *E. arborea*, 2: *E. menziessi*, 3: *C. osmundacea*, 4: *P. californica*, 5: *S.compressa*, 6: *M. pyrifer*a

**7.3.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acetónico de *E. arborea***

El EC de *E. arborea* obtenido con acetona mediante extracción con calor, presentó una concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) de 3500 µg/mL contra Vp AHPND+ y un rendimiento de 2.44 % (1220.0±141.42 mg).

#### 7.4.-Evaluaciones del EC de *Ecklonia arborea*

##### 7.4.1.-Ensayo de toxicidad en nauplios de *Artemia* EC de *Ecklonia arborea*

La tabla 15 muestra el porcentaje de sobrevivencia con las distintas dosis evaluadas del EC de *E.arborea*, adicionalmente se determinó la toxicidad del extracto EC mediante la determinación de LC<sub>50</sub> en ensayos con *Artemia* sp., dando como resultado una toxicidad baja, con valores de LC<sub>50</sub> de 744.9 µg/mL ( $y = -0.1153x + 135.89$ ,  $R^2:0.95$ ) para el ensayo 1 y de 747.2.6 µg/mL ( $y = 0.1076x + 130.4.93$ ,  $R^2: 0.87$ ) en el ensayo 2.En base a estos resultados se continuó con la evaluación del EC en dietas para camarón.

**Tabla 15.-** Porcentaje de sobrevivencia de *Artemia* sp, a diferentes concentraciones de EC de *E. arborea*. Los datos en el ensayo 1 y 2 son representados como la media ± la desviación estándar

concentración en µg/mL	Ensayo 1			Ensayo 2		
	Sobrevivencia en %					
900	31.1	±	7.7	43.3	±	6.7
810	35.6	±	3.8	42.2	±	7.7
720	57.8	±	10.2	43.3	±	3.9
630	71.1	±	3.8	51.7	±	3.3
540	73.3	±	6.7	77.8	±	7.7
450	82.2	±	7.7	88.9	±	3.8
360	91.7	±	6.4	91.1	±	3.8
control	98.3	±	0.5	97.5	±	0.1

##### 7.4.2.- Bioensayos en camarón con dieta adicionada con EC de *Ecklonia arborea*

El análisis proximal de la dieta control LECS 742, dio como resultado la siguiente composición en base seca: proteína 44.2±0.51 %, fibra cruda 5.08±0.46%, cenizas 12.16±0.05%, lípidos 8.07±0.12%, los datos están expresados como el promedio de tres replicados.

#### **7.4.2.1.- Bioensayo 1: Prueba de consumo y toxicidad de alimento con extracto EC del alga *E. arborea* (72 horas)**

El peso promedio de los camarones para los distintos tratamientos fue de  $0.303 \pm 0.007$  g. Los camarones alimentados con los tratamientos: 0, 1, 10, 100 y 1000 mg de extracto EC/Kg de biomasa de camarón, presentaron un 100 % de consumo para todos los tratamientos, así mismo, en las 72 h de alimentación no se observó un efecto tóxico, obteniéndose un 100% de sobrevivencia para todos los tratamientos. La calidad de agua de los tratamientos fue monitoreada durante el tiempo de experimentación, presentando valores de: pH  $8.43 \pm 0.01$ , amonio  $3.49 \pm 1.37$  ppm, nitratos  $15.89 \pm 0.91$  ppm, nitritos  $0.30 \pm 0.02$  ppm.

#### **7.4.3.- Bioensayo 2: crecimiento en camarones alimentados con el extracto EC de *E. arborea* (28 días)**

El sistema fue monitoreado registrando diariamente; temperatura ( $31.5^{\circ}\text{C} \pm 1.3$ ), salinidad ( $36.25 \text{ g/l} \pm 0.88$ ) y semanalmente pH ( $8.2 \pm 0.0$ ), amonio ( $0.85 \text{ ppm} \pm 0.74$ ), nitritos ( $1.25 \text{ ppm} \pm 0.05$ ) y nitratos ( $0.56 \text{ ppm} \pm 0.50$ ). A los 15 días ( $P= 0.027$ ) el peso promedio de los organismos que consumieron las dosis de 1 y 10mg de EC/Kg de camarón fue significativamente mayor al peso de los camarones tratados con la dosis de 1000 mg de EC/Kg de camarón. A los 28 días de alimentación, el tratamiento T1000 continuó presentando el peso promedio más bajo (Figura 15).

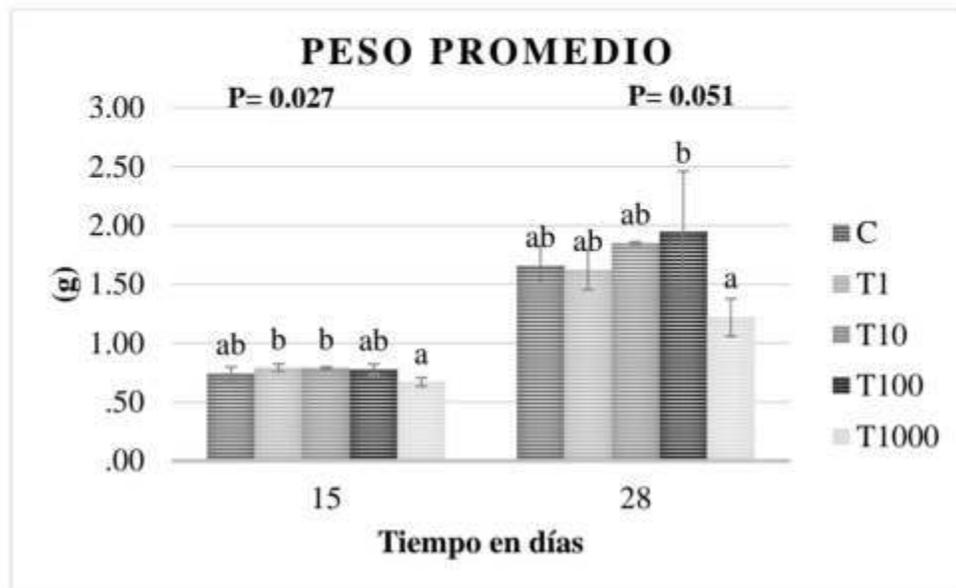


Fig 15.- Peso promedio de *L. vannamei* a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones de EC de *E. arborea*

#### 7.4.3.1.-Biomasa

A los 15 días de alimentación, se encontraron diferencias significativas ( $P= 0.027$ ) en la biomasa promedio de camarones por acuario, sin embargo, a los 28 días estas diferencias se perdieron ( $P=0.962$ ) observándose una gran desviación estándar en los tratamientos T100 y T1000 (Fig. 16). A los 15 días, la biomasa producida con T1000 fue significativamente menor con respecto a T1 y T10, pero igual al control.

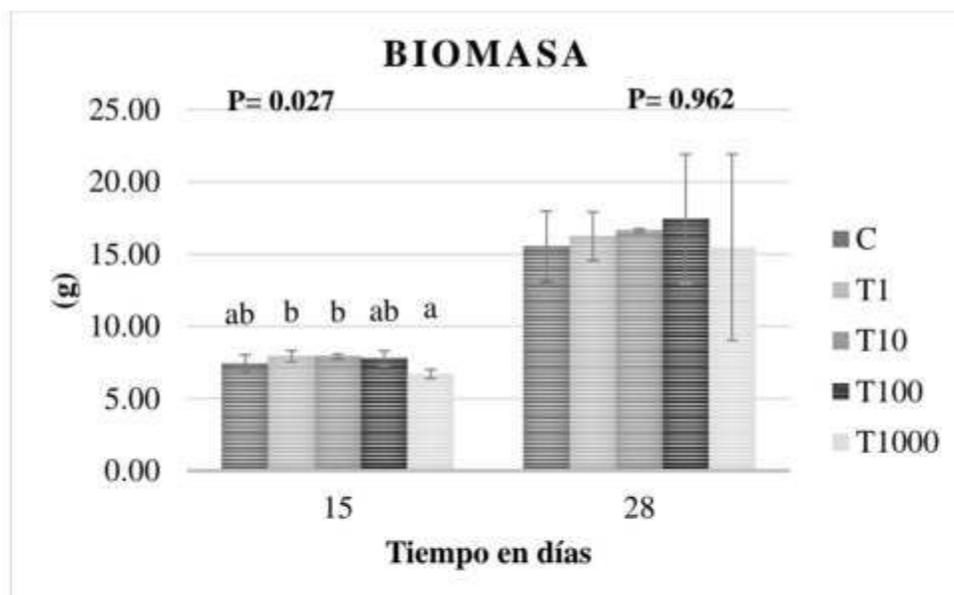


Fig 16.- Biomasa de *L. vannamei* a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones de EC de *E. arborea*

#### 7.4.3.2.-Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento presentó diferencias significativas entre los tratamientos tanto a los 15 ( $p= 0.017$ ) como a los 28 ( $P=0.031$ ) días de experimentación. A los 15 días este parámetro presentó diferencias significativas solo entre las dosis altas y las bajas. (Fig. 17). A los 28 días, solo el T1000 produjo una TC significativamente menor a T10 y T100 pero sin ser diferente al tratamiento control.

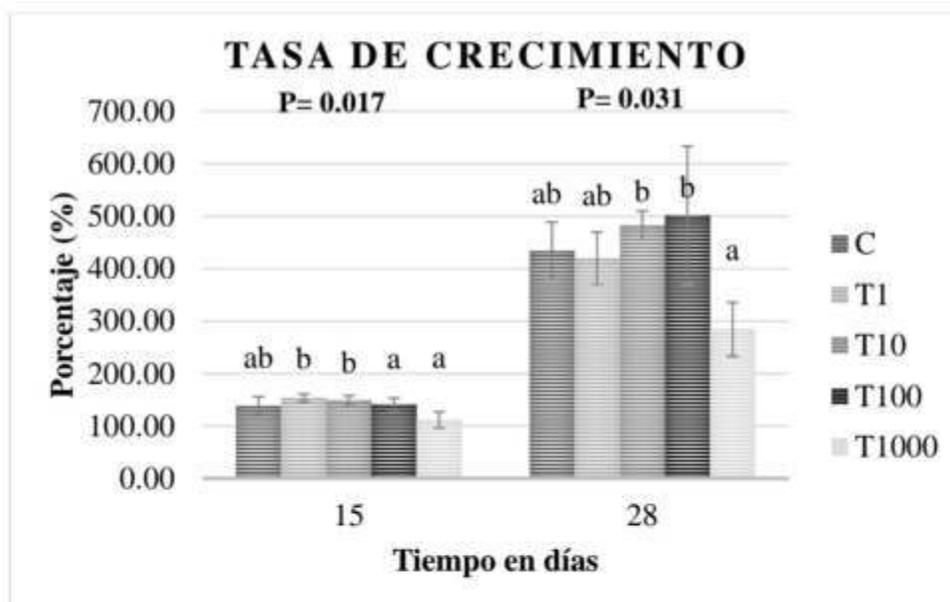


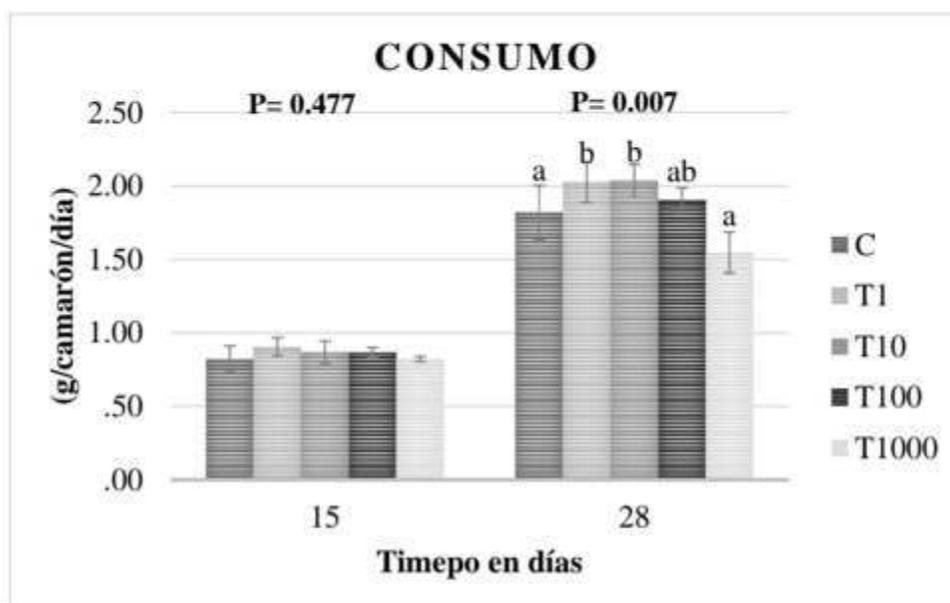
Fig 17.- Tasa de crecimiento de *L. vannamei* a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones de EC de *E. arborea*

#### 7.4.3.3.-Sobrevivencia

Durante los primeros 15 días de alimentación se observó un 100 % de sobrevivencia con todos los tratamientos, a los 28 días la sobrevivencia se mantuvo sin diferencias significativas con valores superiores del 90 % con todos los tratamientos.

#### 7.4.3.4.-Consumo de alimento

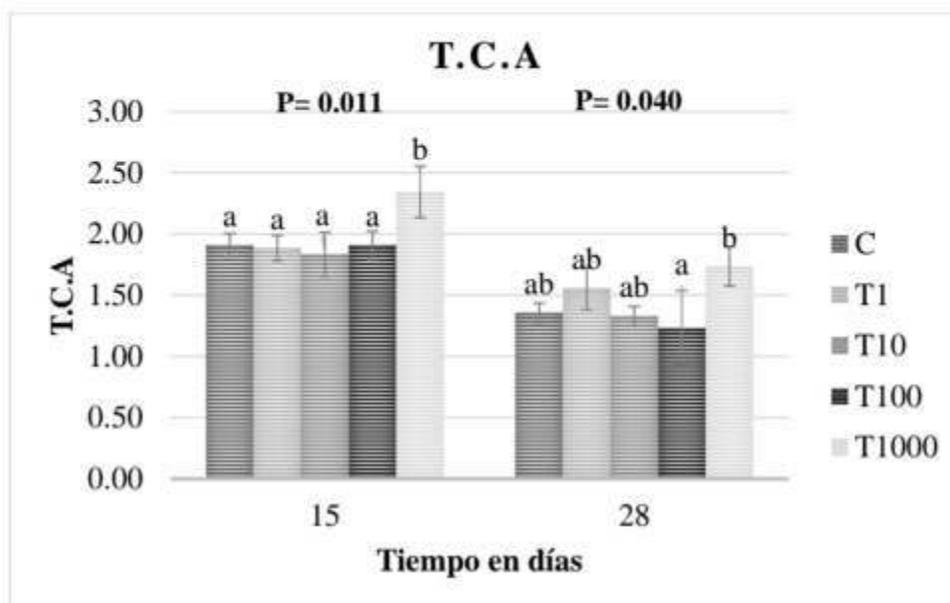
El consumo individual de alimento no presentó diferencias significativas a los 15 días ( $P=0.477$ ) pero si a los 28 días ( $P=0.007$ ) (Fig. 18), siendo T1 y T10 significativamente más consumidos con respecto al control ( $2.03\pm 0.14$  y  $2.04\pm 0.11$  g/camarón/día respectivamente) y T1000 el tratamiento menos consumido ( $1.55\pm 0.14$  g).



**Fig 18.-** Consumo de *L. vannamei* a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones EC de *E. arborea*

#### 7.4.3.5.-Tasa de conversión alimenticia (TCA)

La tasa de conversión alimenticia a los 14 días ( $p=0.011$ ) fue afectada significativamente por los tratamientos evaluados, varió entre  $1.83\pm 0.18$  y  $2.35\pm 0.21$ , siendo T1000 el tratamiento que pesentó el valor más elevado en comparación a los demás tratamientos. A los 28 días, se observaron diferencias significativas ( $p=0.040$ ) (Fig. 19), repitiéndose el comportamiento anterior con T1000 produciendo el valor más alto, pero sin ser diferente a los tratamientos control, T1, T10. Por otro lado, el T100 mostró un menor valor de TCA ( $1.35\pm 0.08$ ), sin presentar diferencias significativas con los tratamientos control, T1, T10.



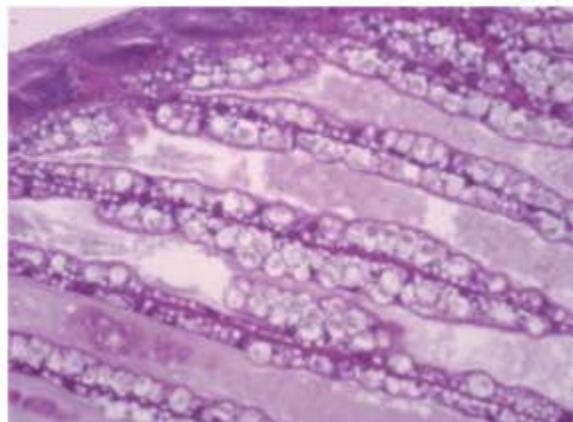
**Fig 19.-** TCA de *L. vannamei* a 15 y 28 días de alimentación con diferentes concentraciones de EC de *E. arborea*.

#### **7.4.4.-Evaluación de dosis de EC de *E. arborea* para ensayos de desafío**

##### **7.4.4.1- Bioensayo 3: Efecto histológico de dosis alta (1000mg de EC/ Kg de biomasa de camarón)**

De los organismos que consumieron la dosis de 1000mg de EC/Kg de biomasa de camarón, el 33.3 % mostró alteraciones en los tejidos de intestino y glándula antenal. Y solo el 16.6 % presentó enterítis hemocítica, necrosis del epitelio de la glándula antenal e infiltración hemocítica y reducción en el tamaño de vacuolas en células R y B en la mayoría de los túbulos. A consecuencia del consumo de esta dosis el 83.3% de los organismos mostraron en hepatopáncreas ligera reducción en el tamaño de vacuolas en células R (figura 20) y formación de estructuras vermiformes en algunos túbulos. Considerando estos resultados y los obtenidos en el ensayo de crecimiento, la dosis de 1000 mg de EC fue descartada en ensayos de desafío y la a dosis de 100 mg de EC/ Kg camarón. Seleccionada para evaluar el efecto protector contra la enfermedad de AHPND.

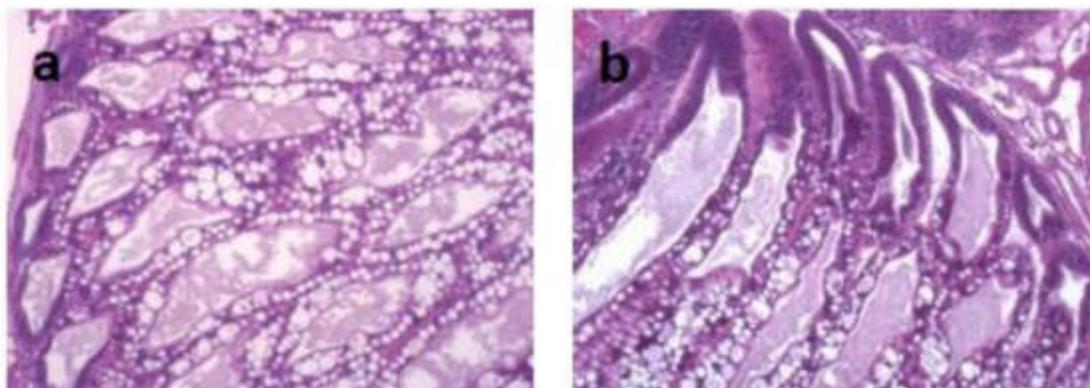
**Fig 20.-** Microfotografías de camarones *L. vannamei* al día 7 de alimentación con dieta experimental (1000 mg de EC). Donde se muestra en túbulos de Hp con ligera reducción de vacuolas en células R y B.



#### **7.4.5.- Bioensayo 4: Desafío bacteriano con Vp M0904 AHPND+ en camarones alimentados con la dosis seleccionada (100 mg EC/Kg de biomasa de camarón) de *Ecklonia arborea***

##### **7.4.5.1.- Condición de salud inicial de los camarones**

Después de 3 días de aclimatación solo se presentó un organismo muerto en uno de los estanques; en general, los organismos mostraron un comportamiento normal, actividad natatoria normal, se observó la presencia de tracto lleno en todos los organismos confirmando un proceso adecuado de alimentación. El análisis histopatológico realizado a los organismos colectados al inicio del ensayo (Día 0), confirmó un buen estado de salud para el 100 % de los organismos analizados, mostraron una estructura tubular normal en hepatopáncreas sin evidencia de lesiones y una gran cantidad de vacuolas en células R y B (Figura 21 a y b).



**Fig 21.-** Microfotografía del hepatopáncreas (Hp) de camarón *L. vannamei* correspondientes al bioensayo EC (100 mg de extracto/kg de biomasa). a y b Túbulos del Hp antes de la alimentación con las dietas (Día 0).

#### **7.4.5.2.-Distribución de los organismos**

Los organismos fueron distribuidos homogéneamente en las UE sin diferencias significativas entre los pesos de los tratamientos, obteniendo un peso promedio de  $1.43 \pm 0.03$  g, y una biomasa final en un rango de 27.6 y 29.4 g por acuario.

#### **7.4.5.3.-Alimentación con dietas experimentales**

Los organismos presentaron una buena aceptación de los tratamientos con un 100% del consumo de cada ración, la ración fue modificada con respecto a los restos obtenidos y fue oscilando entre un 5 y 6.5% de la biomasa. Adicionalmente no se observaron signos de estrés aparentes y no se presentaron mudas durante el periodo de alimentación.

#### **7.4.5.4.-Medición de parámetros fisicoquímicos de calidad de agua**

Durante periodo de alimentación los parámetros fisicoquímicos de calidad de agua se mantuvieron constantes para todos los tratamientos; la temperatura registrada fue entre 27 y 29 °C, el pH fue de 7.5, los valores de amonio, alcalinidad, dureza, nitritos y nitratos fueron 1, 7.5, 120, 180, 0 y 0 ppm respectivamente; durante la aclimatación en las UE, los parámetros (para un acuario por tratamiento fueron: temperatura entre 29 y 31 °C, amonio 3.0 ppm, pH entre 7.0 y 7.5, alcalinidad entre 120 y 180 ppm, dureza 180 ppm, nitritos y nitratos 0 ppm. Durante el desafío, la temperatura se mantuvo en los acuarios ( $29 \pm 2$  °C), el valor de nitritos y nitratos registrado fue de 0 ppm. El pH, alcalinidad y dureza, alcanzaron valores máximos de 8.5, 240 y 240 ppm, respectivamente, mientras que el amonio pasó de un valor de 3 ppm a un valor máximo de  $\geq 6.0$  de ppm.

#### **7.4.5.5.-Cuenta viable (Preparación de inóculo)**

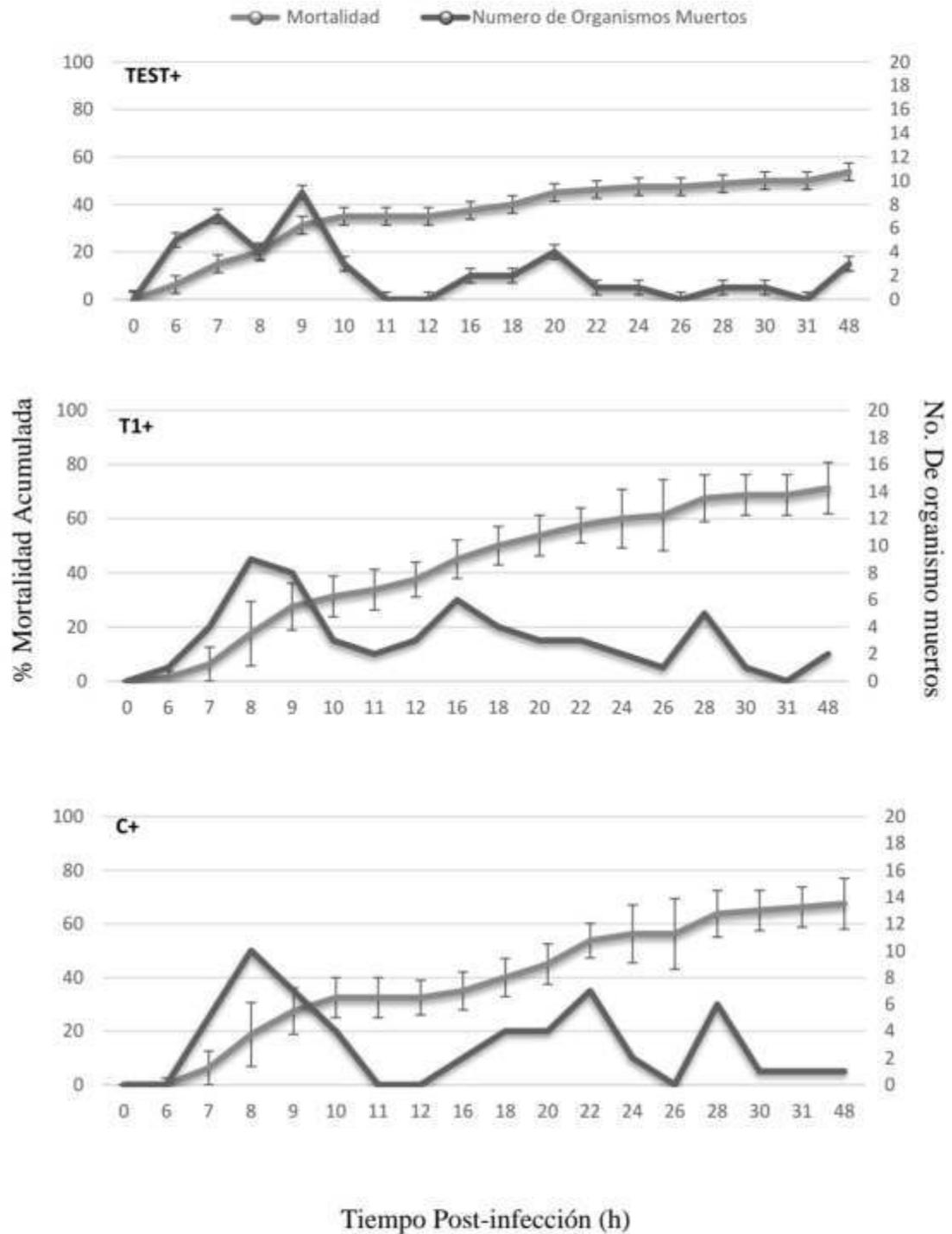
Después de 15.5 h de incubación del inóculo se obtuvo una concentración de células viables mediante conteo en placa de  $6.5 \times 10^9$  UFC/mL; la concentración determinada por reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa o qPCR por sus siglas en inglés fue de  $1.9 \times 10^9$  UFC/mL, la concentración final en las UE fue de  $6.5 \times 10^5$  UFC/mL.

#### **7.4.5.6.-Observaciones y mortalidades del desafío**

Se registró la primera mortalidad a las 6 horas post infección (h.p.i), en los camarones sometidos a los tratamientos T1+ y Test+. A las 7 h.p.i. los organismos de todos los tratamientos excepto el T1- y C- presentaron en general, aletargamiento, nado errático, cromatóforos expandidos, intestino vacío y palidez en el hepatopáncreas. Se ofreció una

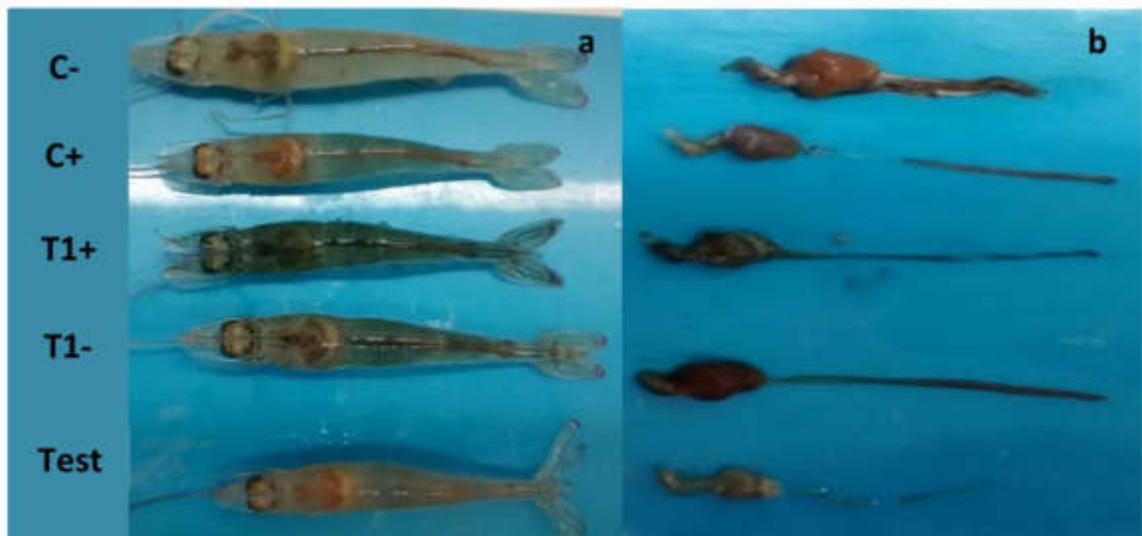
ración de alimento a este tiempo, sin embargo, no se observó consumo. La mayor frecuencia de mortalidad se presentó entre las 7 y 10 h.p.i con los tratamientos, Test+, T1+ y C. De las 16 a las 22 h.p.i, se presentó nuevamente un aumento en la mortalidad, disminuyendo a las 48 h.p.i. Después de este tiempo, se observó una notable recuperación de los organismos sobrevivientes, presentando aumento de actividad natatoria y consumo de alimento.

La figura 22 representa la mortalidad acumulada y el número de organismos muertos por tratamiento y desviaciones estándar de los tratamientos infectados; las curvas de mortalidad presentaron un comportamiento similar, el número de organismos muertos con los tratamientos con 100 mg EC/Kg de biomasa Test+, T1+ y Control + fue de 45, 59 y 55, mientras que el % de mortalidad acumulada fue de 56, 74 y 69 respectivamente, siendo el T1+ el tratamiento con mayor mortalidad.



**Fig 22.-** Gráficas de porcentaje de mortalidad acumulada y número de organismos muertos por tratamiento con respecto al tiempo después de infección con Vp AHPND+.(Test+=alimento testigo, T1+= alimento experimental dosis 100mg EC/Kg de biomasa, C+= alimento experimental sin EC, + organismos infectados)

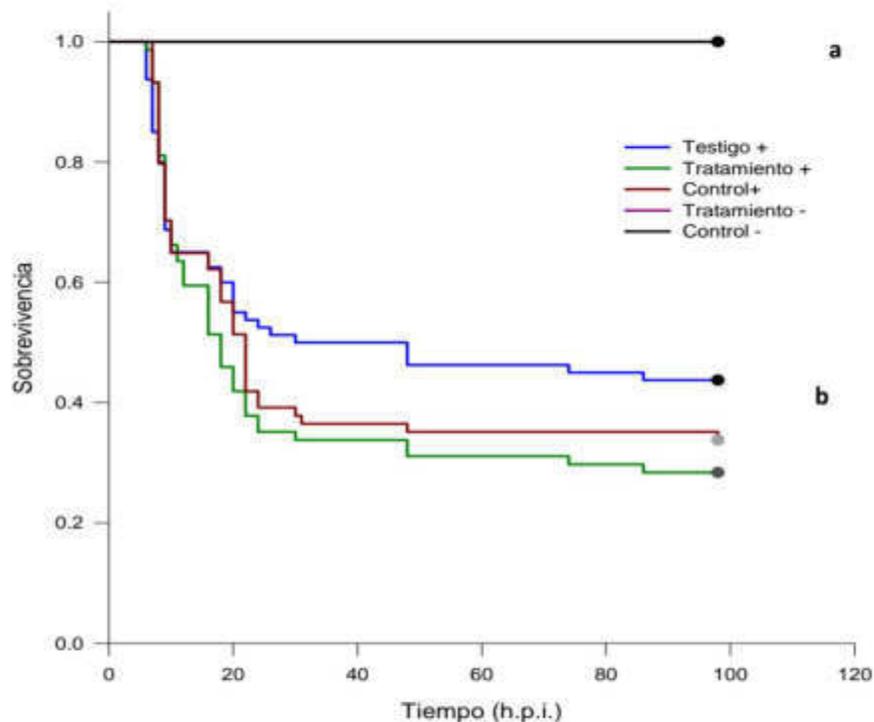
La figura 23, muestra organismos sobrevivientes tomados al azar de cada tratamiento, en donde se observan signos de melanización en cutícula y músculo en todos los organismos. También se observa una notable diferencia en general entre los tratamientos infectados y los no infectados. El organismo del tratamiento C- mostró un HP sano, en contraste, con el HP del tratamiento Test +, donde se observó un notable daño, presentando una reducción de tamaño, color pálido y estructura friable. Para el caso de organismos alimentados con T1, el tracto se encontró completamente vacío y los organismos no infectados adicionalmente mostraron una coloración verdosa en HP y puntos con necrosis.



**Fig 23.-** Organismos al término del ensayo (C= Control, T1=100 mgEC *Eisenia arborea*/Kg de biomasa, Test= testigo, + infectado, - no infectado) (106 h.p.i.) a) organismos completos de cada tratamiento, b) disección de estómago, hepatopáncreas e intestino de cada tratamiento (las fotografías no representan al total de los organismos de cada uno de los tratamientos).

#### **7.4.5.7.-Análisis estadístico.**

La figura 24, muestra los resultados de sobrevivencia de los camarones sometidos a los distintos tratamientos en función del tiempo después de infección. Se presentaron diferencias significativas entre el grupo no infectado y los grupos infectados ( $P \leq 0.001$ ). Sin embargo, a pesar de que se observó una menor sobrevivencia para el T1+, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos infectados T1+, Test+ y C+.

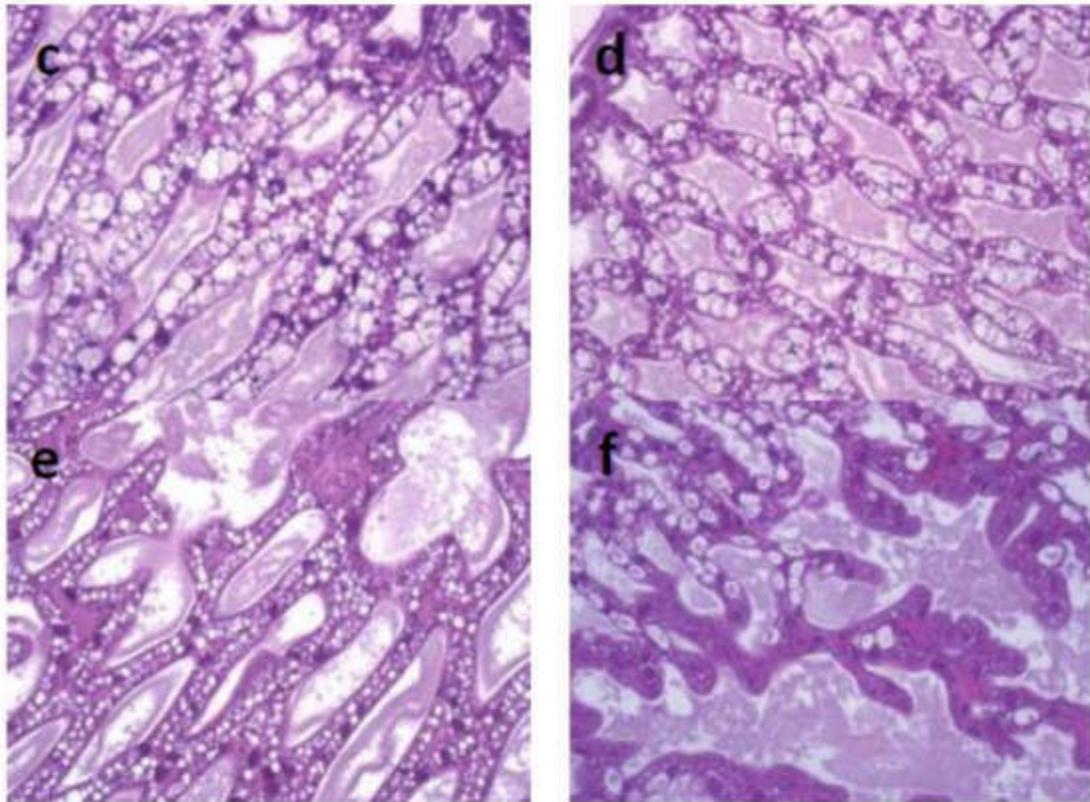


**Fig 24.-** Gráfica de sobrevivencia de los tratamientos (T1+, T1-, Test+ y C+, C-). Análisis Kaplan-Meier (n=4) comparación de medias mediante Holm-Sidak ( $P \leq 0.05$ )

#### 7.4.5.8.- Análisis Histológico

##### 7.4.5.8.1.- Análisis histológico de camarones alimentados durante 7 días con la dosis de 100mg EC de *E. arborea* / Kg de biomasa de camarón.

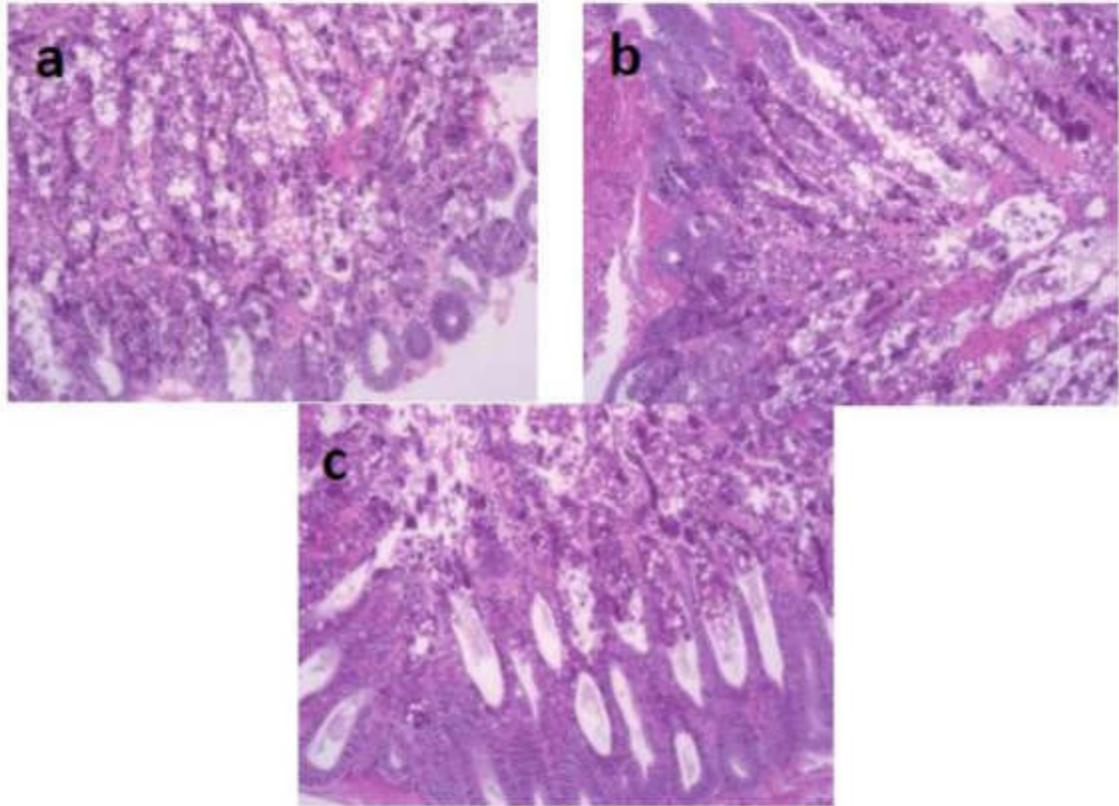
Al día 7 de alimentación con el tratamiento (Test) se observó un ligero aumento en el tamaño de las vacuolas en células R y B del hepatopáncreas en todos los organismos analizados, los cuales exhibieron también una estructura tubular normal sin evidencia de lesiones (Figura 25 c). El 83.3 % de los camarones alimentados con el tratamiento control, presentaron un hepatopáncreas con características similares a las observadas en los organismos al Día 0. Y sólo un organismo mostró una ligera reducción de vacuolas en células R (figura 25d). Caso contrario a los organismos alimentados con el T1 mostrando presencia de células picnoticas en el epitelio tubular de algunos túbulos y diferentes grados de reducción de vacuolas en células R y B (Figura 25 e y f).



**Fig 25.-** Microfotografía del hepatopáncreas (Hp) de camarón *L. vannamei* correspondientes al bioensayo con EC de *E. arborea* **c)** Tratamiento Test al día 7 de alimentación; **d)** Tratamiento C al día 7 de alimentación; **e)** y **f)** Tratamiento T1 (100 mg de EC /kg de biomasa) al día 7, organismos sin infectar.

#### **7.4.5.8.2.- Análisis histológico de camarones alimentados con la dosis de 100mg EC de *E. arborea* / Kg de biomasa de camarón e infectados con Vp. AHPND+**

Los resultados obtenidos a partir de las muestras colectadas durante las mortalidades registradas entre las 9 y 10 h.p.i., arrojaron que el 100 % de los organismos analizados de los tratamientos control, testigo, T1, inoculados con Vp AHPND+ presentaron daños en el HP asociados a AHPND en fase aguda (Figura 26) caracterizados por la pérdida de la estructura tubular debido a la necrosis del epitelio y acumulación de células muertas en el lumen de los túbulos. Todos los camarones de los tratamientos C+ (Figura 26a) y T1+ (Figura 26b) presentaron daños similares entre ellos, coincidiendo con las lesiones observadas en los organismos del tratamiento Test + (Figura 26c).

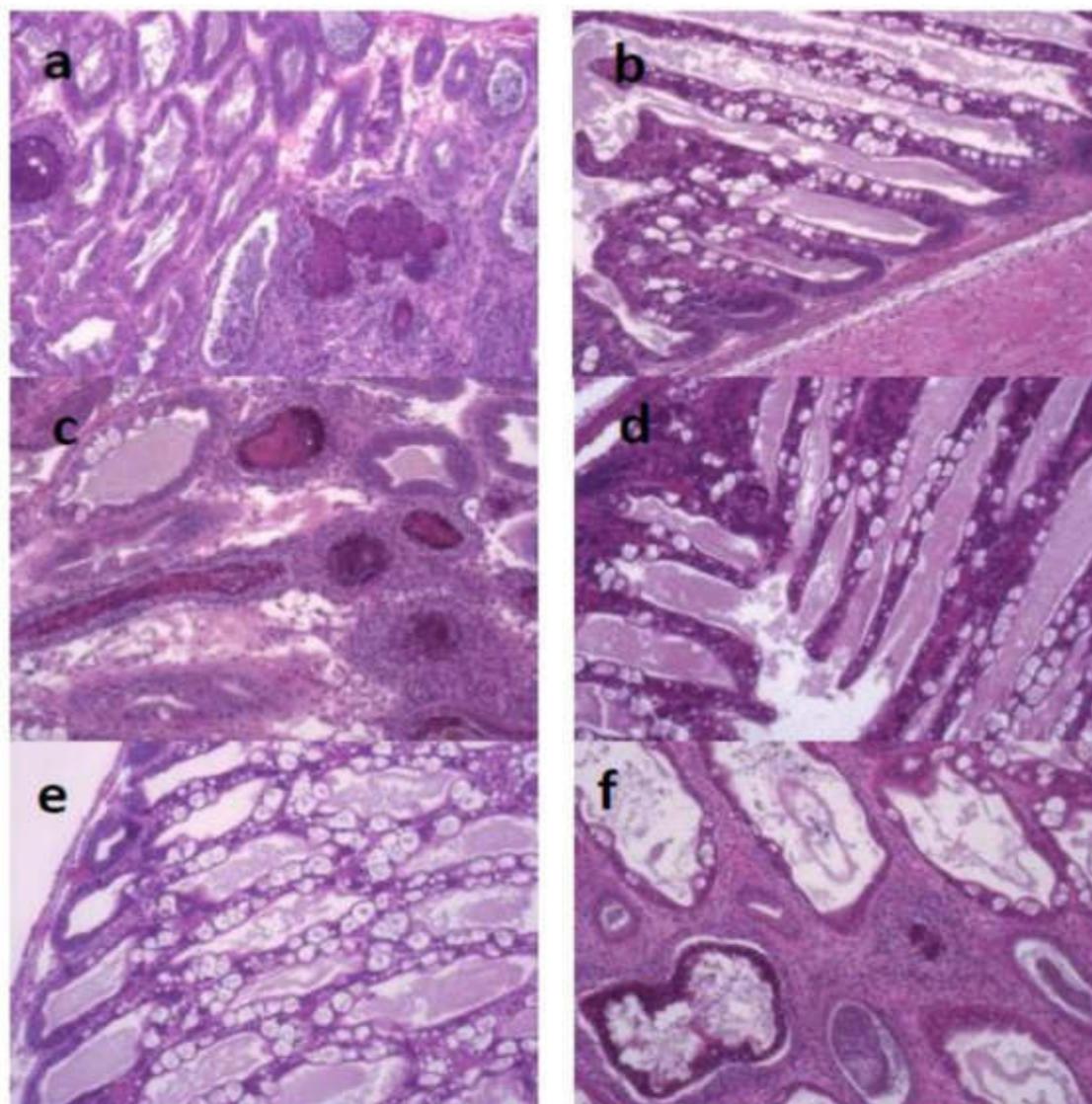


**Fig 26.-** Microfotografía de (Hp) de camarones *L. vannamei* moribundos entre las 9 y 10 h.p.i. en bioensayo EC de *E. arborea* (100 mg EC/Kg de biomasa). **a** Control+ a las 10 h.p.i.; **b** T1(100 mg EC/Kg de biomasa) a las 9 h.p.i.; **c**. Testigo a las 10 h.p.i..

La tabla 16 muestra el porcentaje de prevalencia de las lesiones presentadas por los organismos después de 102 h.p.i, mientras que la figura 21 muestra las microfotografía de las lesiones presentadas; se pueden observar lesiones similares para los tratamientos Test+ y T1+ con necrosis y melanización tubular, presencia de bacterias en el lumen de los túbulos y ausencia de vacuolas en células R y B, reducción de vacuolas en células R. A diferencia de los organismos del tratamiento C+, donde no se observaron lesiones necróticas en el tejido; sin embargo, estos organismos mostraron reducción de vacuolas en células R. Los organismos no infectados del T1- mostraron necrosis y melanización tubular en G1-G3 en todos los organismos. Algunos túbulos de estos organismos mostraron reducción severa de vacuolas en células R y presencia de bacterias en el lumen tubular. En el caso de C- mostraron una reducción de vacuolas en células R y de presencia de células picnóticas (Fig. 27).

**Tabla 16.-** Porcentaje de prevalencia de lesiones de organismos de distintos tratamientos desafiados contra Vp. AHPND+ (Test=testigo, T1=100mgEC/Kg biomasa, C= Control, + infectado, - no infectado)

Lesiones	% de prevalencia				
	Test	T1+	T1-	C+	C-
Melanización tubular	50	50	100	0	0
Presencia de bacterias en lumen de los túbulos	50	50	100	0	0
Reducción en vacuolas de células R	50	50	0	50	66.7
Ausencia de vacuolas en células R y B	50	50	100	0	0
Necrosis	50	50	100	0	0
Células picnóticas	0	0	0	0	66.7



**Fig 27.-** Microfotografía de (Hp) de camarones *L. vannamei* sobrevivientes a las 102 h.p.i. de bioensayo EC *E. arborea* (100 mg EC/Kg de biomasa). **a y b** Tratamiento Test+; **c** Tratamiento T1+; **d** Tratamiento C+; **e** Tratamiento C-; **f** Tratamiento T1-. Tinción hematoxilina eosina-floxina.

## 7.5.- Caracterización y fraccionamiento del extracto crudo (EC)

### 7.5.1.- Análisis fitoquímico preliminar del EC de *E. arborea*

Los resultados del examen fitoquímico del EC de *E. arborea* se presentan en la tabla 17. El análisis fitoquímico reveló la presencia de insaturaciones, ácido carboxílico, carbohidratos, grupo funcional carbonilo de cetonas o aldehídos, esteroides y triterpenos, taninos y flavonoides.

**Tabla 17.-** Análisis fitoquímico preliminar del EC de *E. arborea*.

No	Prueba	EC
1	Insaturaciones	+
2	Ácido carboxílico	+
3	Carbohidratos totales	+
4	Grupo funcional carbonilo de cetonas o aldehídos	+
5	Esteroides y triterpenos	+
6	Cumarinas	-
7	Lactonas	-
8	Saponinas	-
9	Alcaloides	-
10	Taninos	+
11	Flavonoides	+
12	Quinonas	-

+: Presencia; -: Ausencia

### 7.5.2.-Análisis proximal del EC de *E. arborea*

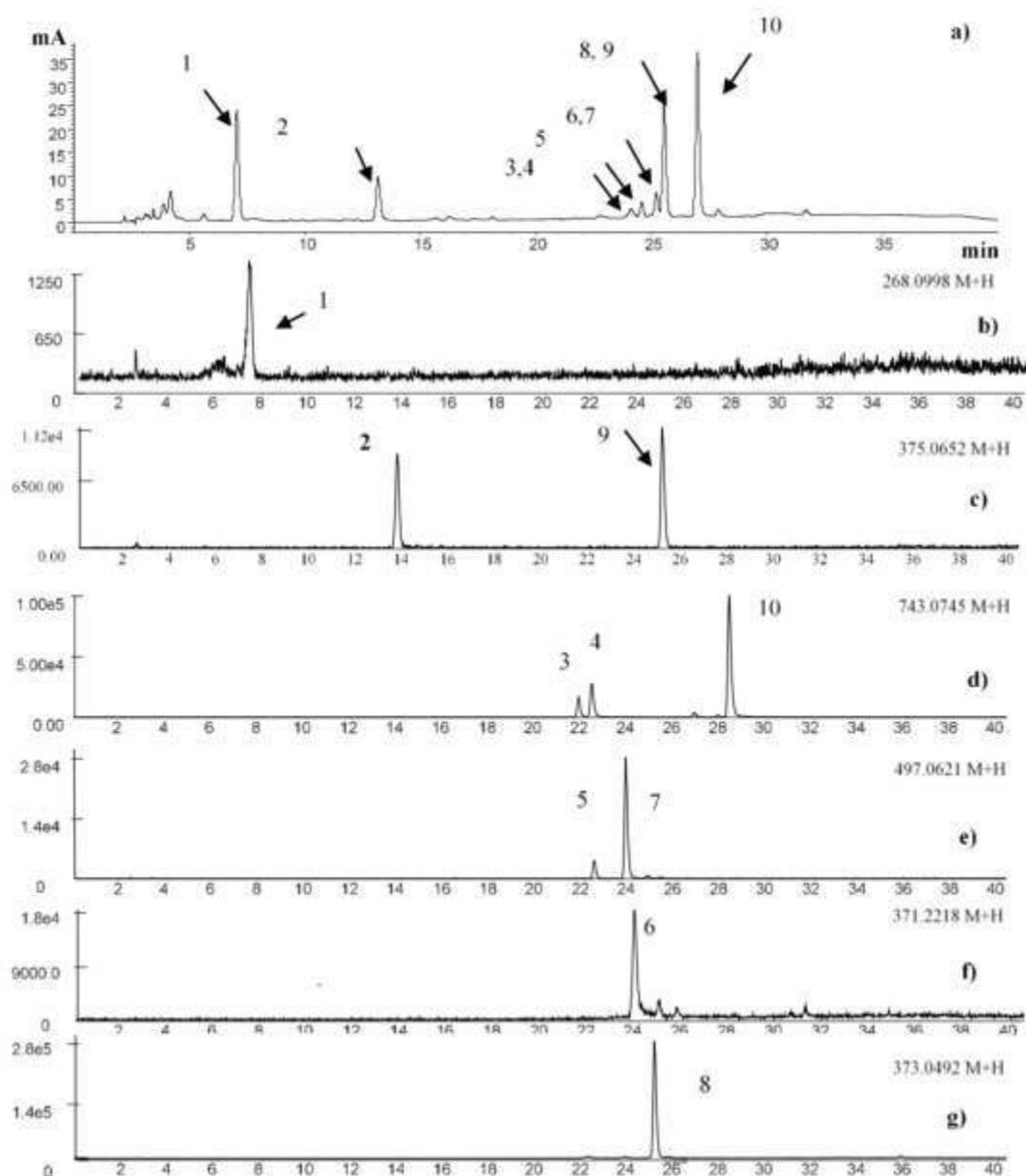
Se determinó la composición química en base seca del EC. Su composición es mayoritariamente de lípidos ( $64.34 \pm 1.94$  %), seguido de compuestos fenólicos ( $31.06 \pm 0.5$  %) y de proteínas ( $18.56 \pm 0.42$  %), y un contenido menor de carbohidratos ( $5.8 \pm 0.17$  %) y cenizas ( $2.7 \pm 0.05$  %).

### 7.5.3.-Caracterización de compuestos en EC de *E. arborea*

#### 7.5.3.1.-Identificación y cuantificación

El cromatograma (Figura 28) obtenido por HPLC-DAD a 270 nm, muestra la presencia de diez tipos diferentes de florotaninos. Utilizando el análisis de modo de ión positivo ESI se identificaron diez componentes principales, los cuales están descritos en la Tabla 18. Bieckol fue el compuesto mayoritario (316.0 ppm) seguido de bifuhanol (211.7 ppm) y eckol/fucofloretole (185.4 ppm). El análisis de HPLC-MS-TOF evidenció la presencia de

diez isómeros de florotaninos en el extracto EC en los iones moleculares seleccionados de 268.0998, 375.065, 743.0745, 497.0621, 371.2218 y 373.0492 m / z respectivamente.



**Fig 28.-** a) cromatograma a 270 nm de extracto crudo de *E. arborea*, DAD. Los picos marcados con números se identificaron mediante HPLC/MS-TOF, y se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18.-** Caracterización de florotaninos mayoritarios en el extracto de acetona de *E. arborea* en HPLC-DAD-MS-TOF utilizando el modo de ión positivo ESI

<i>Pico #</i>	<i>Compuesto bioactivo</i>	<i>λ max (nm)</i>	<i>Masa molar (M)</i>	<i>Fragmentación de aductos (m/z)</i>	<i>Equivalentes de floroglucinol ppm*</i>
1	Bifuhalol	295	267.0925	268.0998 (M+H), 269.1038 (M+H+1)	217.7 ± 22.6
2	Fucophorethol	230, 290	374.0574	375.0652 (M+H), 376.0684 M+H+1, 377.0701 (M+H+2) 397.0459 M+Na, 398.0497 M+Na+1, 413.0194 M+K, 414.0259 M+K+1, 415.0273 M+K+2, 771.1011 2M+Na, 772.1103 2M+Na+1	91.7 ± 10.2
3	Bieckol	230,262, 310	742.067	743.0745 M+H, 744.0786 M+H+1, 745.0811 M+H+2, 746.0813 M+H+3, 765.0557 M+Na, 766.0606 M+Na+1, 767.0678 M+Na+2, 781.028 M+K	33.8 ± 5.0
4	Bieckol		742.0673	743.0745 M+H, 744.0786 M+H+1, 745.0811 M+H+2, 765.0557 M+Na, 766.0606 M+Na+1, 767.0678 M+Na+2, 768.0584 M+Na+3, 1485.137 2M+H, 1486.141 2M+H+1, 1487.141 2M+H+2	
5	Phloroeckol	232, 262, 305	496.0551	497.0621 M+H, 498.0666 M+H+1, 499.0697 M+H+2, 519.0453 M+Na, 520.0491 M+Na+1	28.6 ± 3.3
6	Dioxinodehydroeckol	260, 310	370.2142	371.2218 M+H, 372.2262 M+H+1, 393.2033 M+Na, 394.2073 M+Na+1, 395.2088 M+Na+2, 396.2139 M+Na+3, 409.1772 M+K	41.9 ± 6.4
7	Phloroeckol		496.0556	497.0629 M+H, 498.0662 M+H+1, 499.0694 M+H+2, 500.0718 M+H+3, 519.0451 M+Na, 520.047 M+Na+1, 535.0158 M+K, 536.0213 M+K+1, 1015.099 2M+Na, 1016.102 2M+Na+1, 1017.106 2M+Na+2	
8	Eckol	230, 305 230, 305	372.0418	373.0492 M+H, 374.053 M+H+1, 375.055 M+H+2, 376.0568 M+H+3, 395.0308 M+Na, 396.0337 M+Na+1, 397.0361 M+Na+2, 398.0408 M+Na+3, 411.0047 M+K, 412.0078 M+K+1, 767.071 2M+Na, 768.0742 2M+Na+1, 769.0734 2M+Na+2, 770.0757 2M+Na+3, 771.0778 2M+Na+4	185.4 ± 16.1
9	Fucophloretol		374.0574	375.0652 M+H, 376.0684 M+H+1, 377.0701 M+H+2	
10	Bieckol	230, 270, 310	742.0675	743.0749 M+H, 744.0785 M+H+1, 745.081 M+H+2, 746.0836 M+H+3, 747.0894 M+H+4, 765.0562 M+Na, 766.0604 M+Na+1, 767.0629 M+Na+2, 768.0648 M+Na+3, 1485.14 2M+H, 1486.145 2M+H+1, 1487.152, 2M+H+2, 1488.149, 2M+H+3	316.0 ± 11.3

## 7.6.-Evaluación de la FAE de *E. arborea*

### 7.6.1.- Rendimiento y actividad antibacteriana de las fracciones del EC de *E. arborea*

Con el objetivo de identificar y concentrar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, el EC ( $1220.00 \pm 141.42$  mg (100%)) fue fraccionado por partición, incrementando la polaridad de los solventes. El rendimiento de cada fracción con respecto al alga seca fue: hexano (0.62%), acetato de etilo (1.19%), agua (0.82%). La FAE, exhibió la mayor actividad contra *V. parahaemolyticus* con un incremento del 4.66 % en comparación al EC. En contraste a las fracciones de agua y hexano no mostraron actividad a las concentraciones evaluadas (Tabla 19).

**Tabla 19.-** Concentración mínima bactericida (CMB contra Vp M09-04 y rendimientos de extracción de fracciones obtenidas del alga *Ecklonia arborea*. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar (n = 2).

Extracto	mg/g alga peso húmedo	Rendimiento (%)	CMB ( $\mu\text{g/mL}$ )
Extracto crudo (EC)	$1220.00 \pm 141.42^a$	2.44	3500
Fracción <i>n</i> -hexano	$312.25 \pm 11.66^c$	0.62	>750
Extracto enriquecido de florotaninos (FAE)	$592.85 \pm 6.86^b$	1.19	750
Fracción agua	$440.78 \pm 15.25^{bc}$	0.82	>750

### 7.6.2.-Ensayo de toxicidad en *Artemia* de la FAE de *Ecklonia arborea*

El ensayo de toxicidad en *Artemia* sp. para la FAE obtenida a partir del fraccionamiento del EC de *E. arborea*, arrojó valores de  $LC_{50}$  de  $697.08 \mu\text{g/mL}$  ( $y = -0.0959x + 116.85$ ,  $R^2: 0.96$ ) para el ensayo 1 y de  $690.27 \mu\text{g/mL}$  ( $y = -0.0946x + 115.3$ ,  $R^2: 0.87$ ) para el ensayo 2, correspondientes a una toxicidad baja. Debido a estos hallazgos se continuó con su evaluación en dietas para camarón.

### 7.6.3.- Bioensayos en camarón con dieta adicionada con la FAE de *E. arborea*

#### 7.6.3.1. -Análisis bromatológico del alimento control

El análisis proximal de la dieta base SI35, dio como resultado la siguiente composición en base seca: proteína  $35.65 \pm 0.52$  %, fibra  $5.08 \pm 0.46$  %, cenizas  $11.51 \pm 0.08$  %, lípidos  $8.25 \pm 0.12$  %, los datos están expresados como el promedio de tres réplicas.

### **7.6.3.2.- Bioensayo 5: evaluación de toxicidad en camarones de alimento con FAE del alga *E. arborea* (7días).**

El ensayo preliminar nos mostró que el consumo de dosis altas de 20, 200, 2000 y 20, 000 mg/ Kg de biomasa de camarón, disminuye la sobrevivencia a través del tiempo, por lo que se continuó con la evaluación de dosis más bajas (ANEXO). Los organismos alimentados con las dosis de 0, 0.5, 1 y 2 mg de FAE/ Kg de biomasa de camarón durante 7 días, mostraron una buena aceptación del alimento medicado, no se observaron restos durante el tiempo de alimentación, así mismo, no se observó un efecto tóxico de la FAE de *E. arborea* ya que la sobrevivencia fue del 100 % para todos los tratamientos. La calidad de agua en el tiempo de experimentación fue monitoreada presentando valores de: pH de  $8.43 \pm 0.01$ , amonio  $3.49 \pm 1.37$  ppm, nitratos  $15.89 \pm 0.91$  ppm, nitritos  $0.30 \pm 0.02$  ppm y una salinidad de 35 g / L.

### **7.6.4.- Determinación de dosis infectiva para reproducir la enfermedad de AHPND en las instalaciones del programa Maricultura**

#### **7.6.4.1.- Condiciones del ensayo**

Se utilizaron organismos de un peso promedio de  $1.43 \pm 0.5$ g sin presentar diferencias significativas entre los pesos promedios de los tratamientos ( $P > 0.005$ ). La concentración del inóculo en las unidades experimentales fue 4, 7 y  $10 \times 10^5$  UFC/mL para las dosis T1 (0.1mL/L), T5 (0.5mL/L) y T10 (1 mL/L) respectivamente.

#### **7.6.4.2.- Observaciones y mortalidades durante el desafío.**

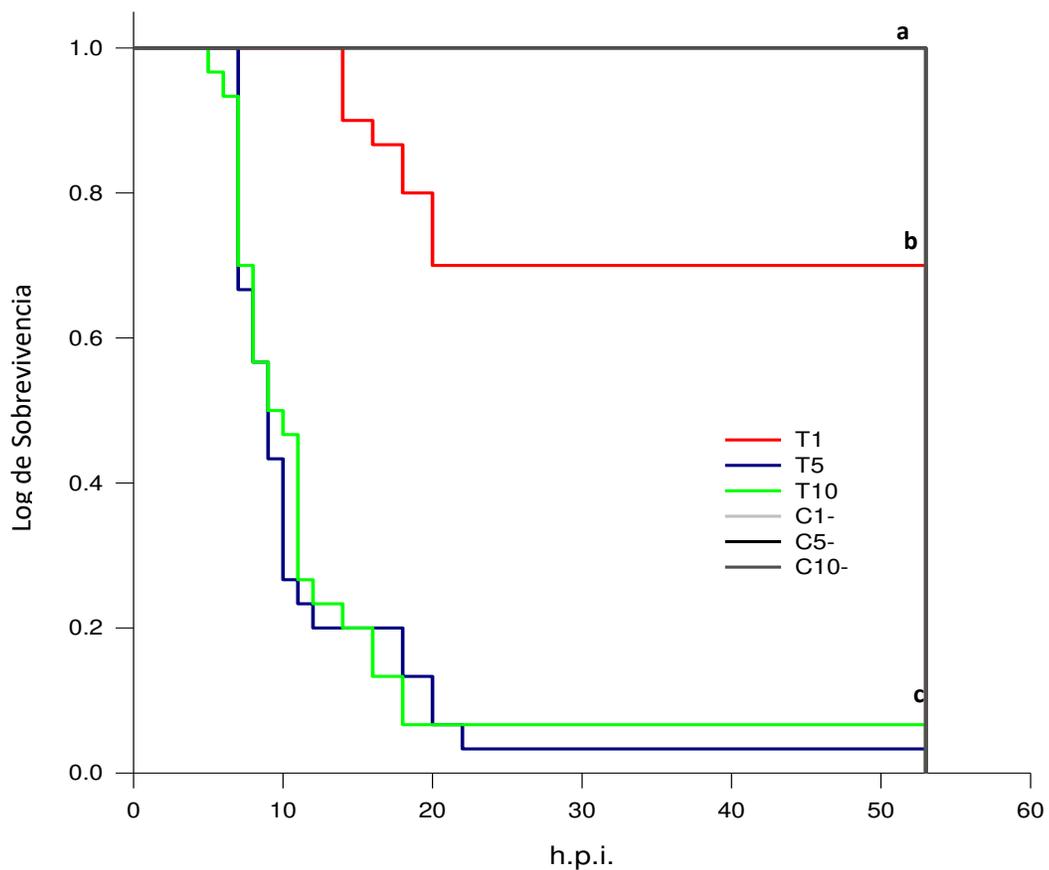
La primera mortalidad se registró a las 5 h.p.i. con la dosis T10+ presentándose la mayor frecuencia de mortalidades a la 7 y 11 h.p.i, con las dosis T5+ y T10+ se observaron signos clínicos propios de la enfermedad como aletargamiento, nado errático, cromatóforos expandidos, intestino vacío palidez en el cuerpo. No se observaron mortalidades después de 24 h.p.i. con ninguna dosis. La mortalidad acumulada para las dosis T5 y T10 fue de 97 y 93 % respectivamente, con un total de organismos muertos de 29/30 y 28/30 respectivamente. La dosis T1 presentó 9/30 organismos muertos y una mortalidad del 30 %. Ninguno de los controles presentó mortalidad.

La figura 29, muestra la sobrevivencia de los camarones sometidos a las distintas dosis en función del tiempo post-infección, observándose diferencias significativas para el caso de

los tratamientos no infectados en comparación a los infectados. La dosis de 0.1 mL/L (T1) promovió una sobrevivencia significativamente ( $P \leq 0.05$ ) mayor con respecto a las demás dosis, sin embargo, entre las dosis de 0.5 y 1 mL/L T5 y T10) no se observaron diferencias significativas.

En base a estos resultados y a que el volumen de biomasa fue menor en la dosis de 0.5 mL de inóculo/L de agua (15 mL en 30 L de agua) esta dosis fue seleccionada para los desafíos de infección.

### Survival Analysis



**Fig. 29.**-Selección de dosis para desafíos de infección en Programa Maricultura. Análisis de sobrevivencia de camarones infectados con 3 dosis de Vp AHPND+ (T1= 0.1mL/L, T5=0.5mL/L, T10=1mL/L) y su respectivo control (medio de cultivo estéril). Kaplan-Meier (n=3) comparación de medias mediante Holm-Sidak ( $P \leq 0.05$ )

### **7.6.5. Bioensayo 6: desafío bacteriano con Vp M0904 AHPND+ en camarones alimentados a dosis de 0.5, 1 y 2 mg de extracto FAE/ Kg de biomasa de camarón**

#### **7.6.5.1.-Condiciones del ensayo**

Los organismos con un peso promedio de  $0.729 \pm 0.165$  g, no presentaron diferencias significativas en pesos promedios entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Después de 9 h y 30 min de incubación del inóculo, se obtuvo una concentración de células viables mediante conteo en placa de  $0.5 \times 10^9$  UFC/mL, con una concentración final en los tratamientos infectados de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

#### **7.6.5.2.-Medición de parámetros fisicoquímicos de calidad de agua**

Durante el periodo de aclimatación en las UE (acuarios de fibra de vidrio de capacidad de 20 L) los parámetros fisicoquímicos de calidad de agua registrados fueron: temperatura de  $33^\circ\text{C}$ , pH  $8.4 \pm 0.4$ , los valores máximos de amonio, nitritos y nitratos fueron 3, 20 y 0.5 ppm respectivamente; durante el desafío (pos-infección) la temperatura bajo a  $31^\circ\text{C}$ , el amonio registró un valor máximo de 6 ppm, pH de 8.8, nitritos y nitratos de 40 y 5 ppm respectivamente.

#### **7.6.5.2.-Observaciones y mortalidad durante el desafío.**

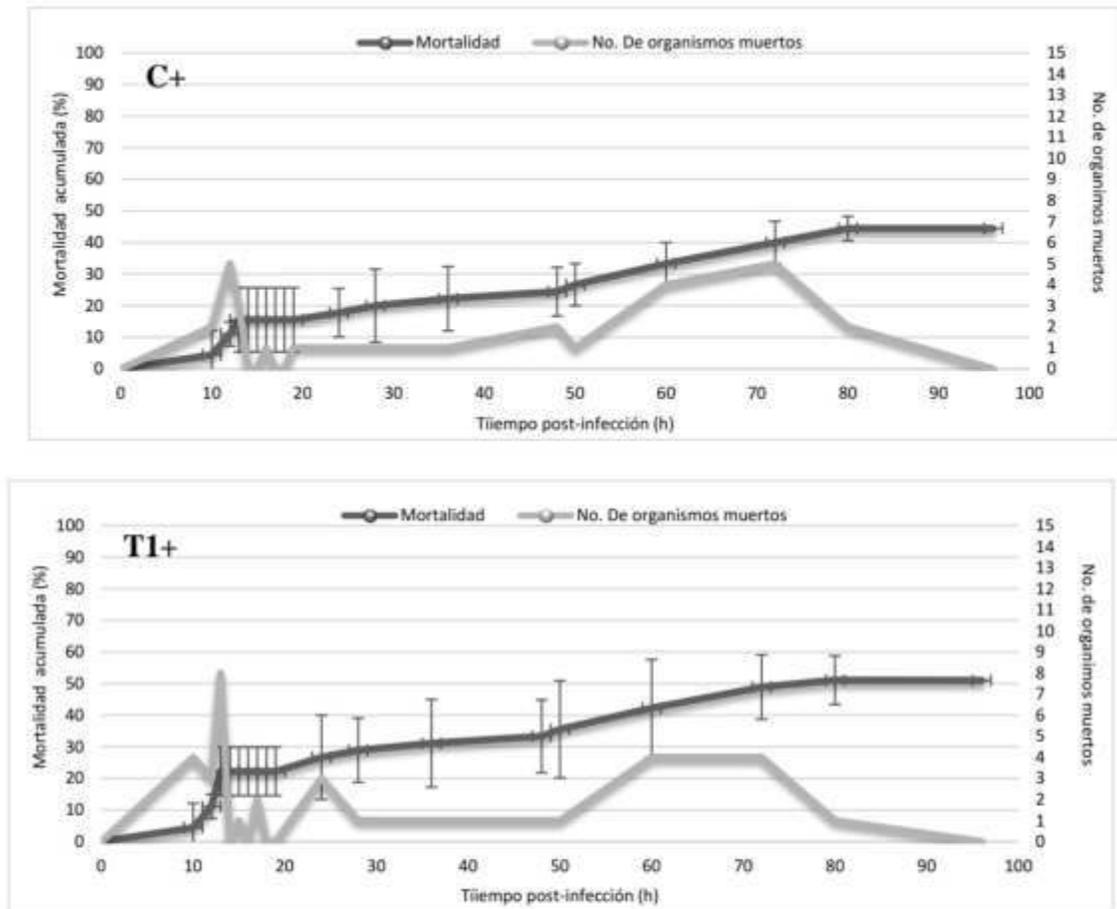
**Ensayo 1:** en este ensayo no se logró obtener mortalidades ocasionadas por el patógeno, debido a que la concentración de bacterias, requeridas para el desarrollo de la enfermedad, se encontró por debajo de lo requerido (concentraciones de  $5.5 \times 10^8$  UFC/mL en una primera infección y en una segunda de  $0.5 \times 10^6$  UFC/mL).

Debido a la falta de disponibilidad de camarones se implementó otro ensayo donde solo se evaluó la dosis de 1 mg de extracto FAE /Kg de biomasa de camarón.

**Ensayo 2:** la mortalidad inició en los tratamientos infectados a las 10 h.p.i, en este tiempo se observó que los organismos presentaban aletargamiento y características típicas de la infección, no consumieron alimento, mientras que en los acuarios no infectados los camarones consumieron la ración de alimento suministrada y no presentaron ningún síntoma de enfermedad. La mayor frecuencia de mortalidad se presentó entre las 12 y 13 h.p.i en los organismos que recibieron los tratamientos C+ y T1+; de las 14 a las 50 h.p.i los organismos de los tratamientos infectados mostraron mortalidades aisladas, sin embargo, entre las 60 y 72 h.p.i se observó un segundo pico de mortalidad; posteriormente

después de las 80 h.p.i. se observó una notable recuperación de los organismos sobrevivientes.

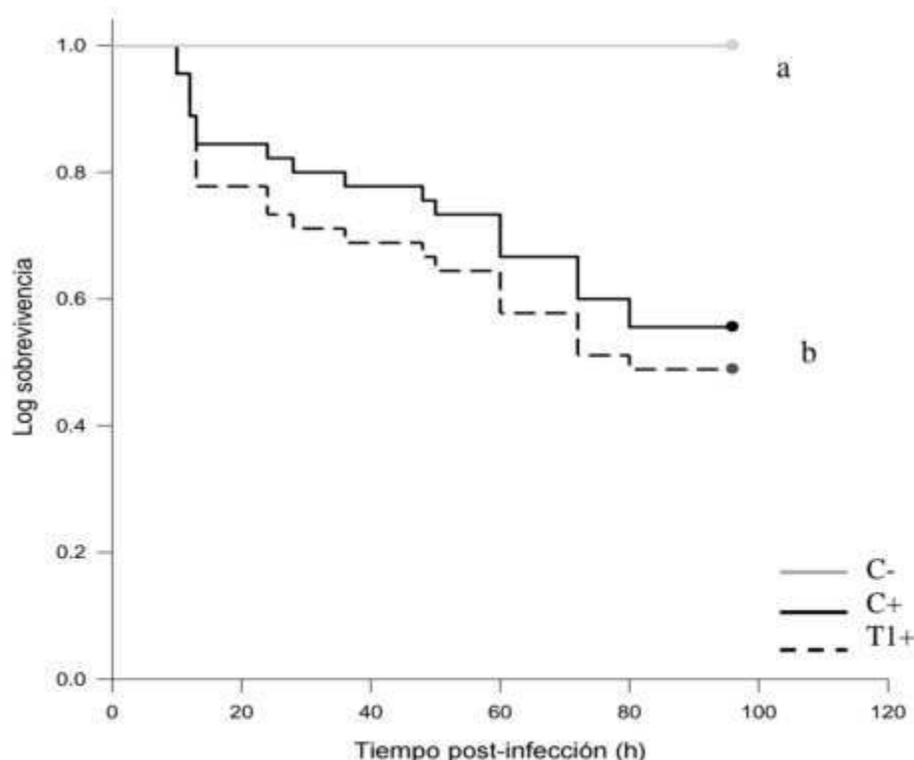
La figura 30 representa la mortalidad acumulada y el número de organismos muertos de los tratamientos infectados, las curvas de mortalidad presentan un comportamiento similar para los tratamientos infectados Control (C+) y con la FAE de *E. arborea* a 1 mg/Kg de biomasa (T1+) con mortalidades de 44 y 51% respectivamente, y con un total de organismos muertos de 29/60 y 34/60 respectivamente. Los controles no infectados no presentaron mortalidad.



**Fig 30.-** Gráficas de mortalidad promedio acumulada y número de organismos muertos por tratamiento en ensayo de infección donde T1 es dieta con 1mg de FAE de *E. arborea* /Kg de biomasa e camarón y C+ es dieta control.

#### 7.6.4.3.4.- Análisis estadístico.

El análisis de supervivencia Kaplan-Meier (Fig.31), muestra diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) entre los tratamientos infectados y no infectados, mientras que no se observaron diferencias significativas ( $P=0.713$ ) en la supervivencia obtenida con los tratamientos T1+ y control C+. Sin embargo, el tiempo medio de supervivencia para el T1+ ( $64.86 \pm 5.36$  h) es ligeramente menor en comparación al control con un tiempo medio de  $71.64 \pm 4.94$  h.



**Fig 31.-** Análisis de supervivencia Kaplan-Meier (n=4) de camarones infectados y no infectados con Vp AHPND+ alimentados con dieta control (C) y dieta suplementada con FAE de *E. arborea* a una dosis de 1 mg FAE / Kg de biomasa, comparación de medias mediante Holm-Sidak ( $P > 0.05$ )

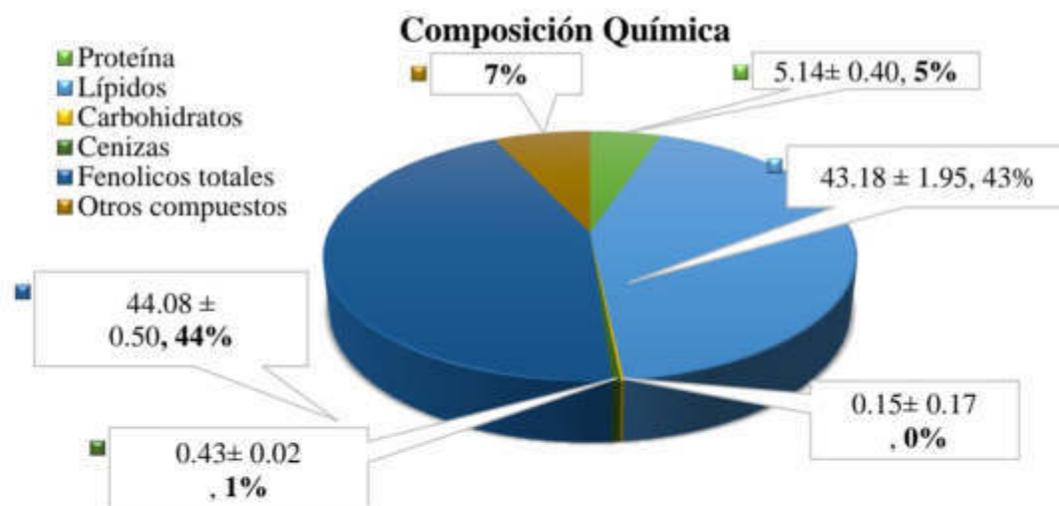
### 7.7.-Caracterización de la FAE de *E. arborea*

#### 7.7.1.- Análisis proximal

La gráfica (Fig. 32) muestra la composición de la FAE, los compuestos fenólicos (44%) son los más abundantes (con un incremento del 29.5% en comparación al EC), seguidos de lípidos (43 %) (decremento del 32.8% en comparación al EC); en menor proporción se encontró la proteína y otros compuestos con valores del 5 y 7 % respectivamente, así mismo en cantidades trazas carbohidratos y cenizas (Tabla 20).

**Tabla 20.-** Comparación de análisis proximal entre EC y FAE de *E. arborea*

%	EC		FAE	
Proteína	18.56	± 0.42	5.14	± 0.4
Lípidos	64.34	± 1.94	43.18	± 1.95
Carbohidratos	5.8	± 0.17	0.15	± 0.01
Ceniza	2.7	± 0.05	0.43	± 0.02
Compuestos fenólicos totales	31.06	± 0.5	44.08	± 0.5

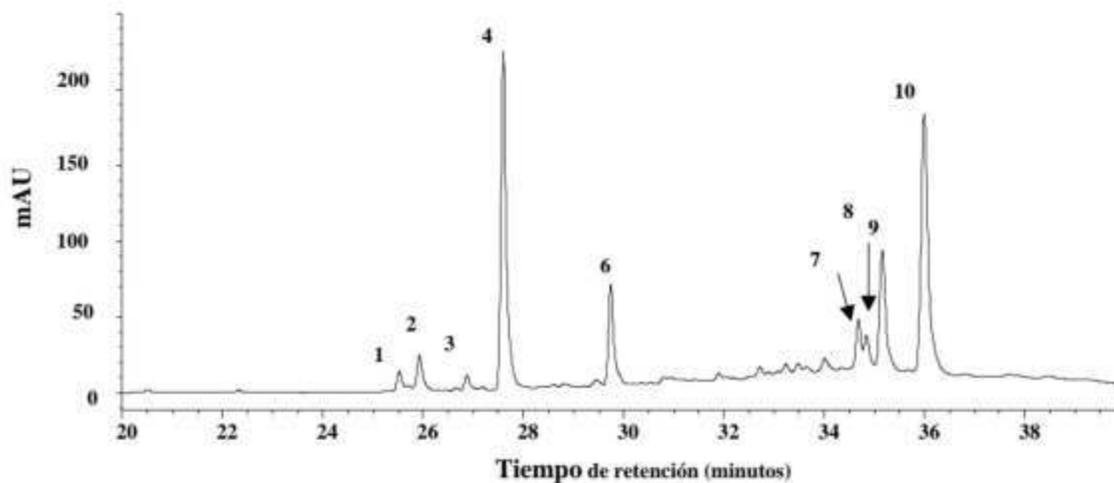


**Fig 32.-** Representación gráfica de la composición química de la FAE de *E. arborea*.

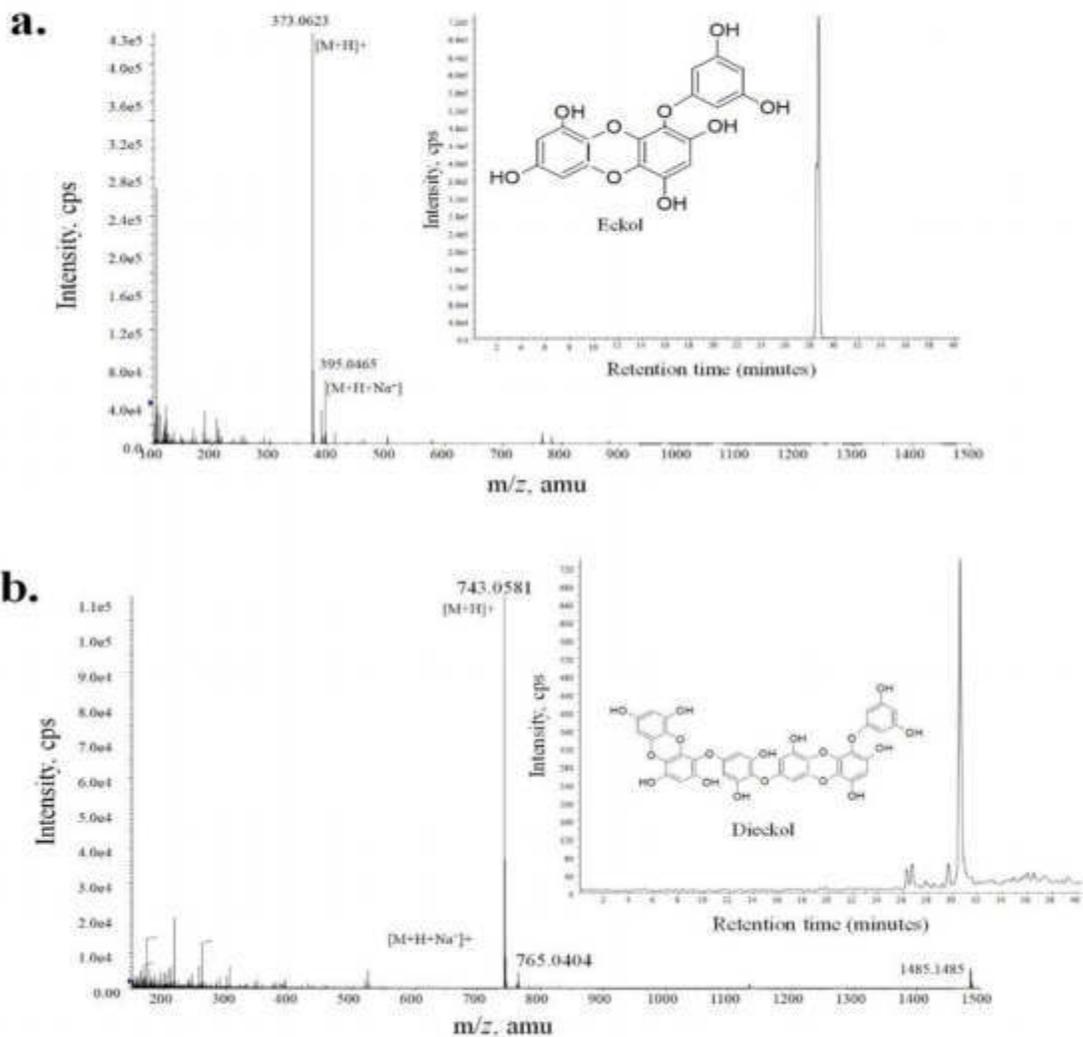
### 7.7.2.-Identificación y cuantificación de los florotaninos de la FAE de *E. arborea* por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se identificaron diez diferentes florotaninos en la FAE (Fig.33). El pico 1 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 233, 287 nm) y el pico 2 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 231, 285 nm) presentaron una  $m/z$  743 [M + H]<sup>+</sup>. Estos compuestos se identificaron como isómeros bieckol (Fig.34). El pico 3 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 231, 292 nm) y el pico 5 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 231, 292 nm) presentaron una  $m/z$  497 [M + H]<sup>+</sup> y se identificaron como isómeros de phloroeckol. El pico 4 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 236, 292 nm) y el pico 6 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 232, 290 nm) se identificaron como eckol y dieckol que presentaban  $m/z$  de 373 [M + H]<sup>+</sup> y  $m/z$  743 [M + H]<sup>+</sup>, respectivamente. El pico 7 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 232, 297 nm) que presentó una  $m/z$  de 371 [M + H]<sup>+</sup> se identificó como dioxinodehidroeckol. Finalmente, los picos 8 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 229, 267, 303 nm), 9 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 229, 267, 303 nm) y

10 ( $\lambda_{\text{max}}$  UV: 215, 263, 296 nm) presentaron am / z de 479 [M + H]<sup>+</sup> y se identificaron como isómeros de fucofuroeckol.



**Fig33.-** Cromatogramas de HPLC-DAD registrados a 270 nm de la FAE de *E. arborea*. Los picos marcados con números se identificaron mediante HPLC/MS-TOF, se muestran en la Tabla 21



**Fig 34.**-Estructura química, cromatograma de iones extraídos y patrón de fragmentación de (A) eckol y (B) dieckol obtenidos mediante análisis de HPLC/MS-TOF (ESI +). Na +: aducto de sodio.

El contenido de florotaninos de la FAE se incrementó de 1.9 a 6.9 veces en comparación con el EC (Tabla 21). Fucofuroeckol y eckol fueron los compuestos más abundantes presentes en el EC y en la FAE. El contenido de eckol aumentó 3.7 veces en la FAE ( $469.28 \pm 5.99 \mu\text{g/g}$ ) en comparación con su contenido en EC.

**Tabla 21.-** Florotaninos presentes en el EC y en la FAE del alga *E. arborea*

N°	Compuesto	Masa precisa	m/z [M+H] <sup>+</sup>	UV λ <sub>max</sub> (nm)	Concentración (µg/g)	
					EC	FAE
1	Bieckol	742.07	743	233, 287	<i>n.d.</i>	28.03 ± 0.9
2	Bieckol isomer	742.07	743	231, 285	8.59 ± 0.30	53.57 ± 8.9*
3	Phloroeckol	496.06	497	231, 292	6.75 ± 2.10	32.89 ± 7.8*
4	Eckol	372.04	373	236, 292	115.9 ± 16.40	469.8 ± 5.9*
5	Phloroeckol isomer	496.06	497	224, 290	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
6	Dieckol	742.07	743	232, 290	48.10 ± 3.10	187.6 ± 7.3*
7	Dioxinodehydroeckol	370.02	371	232, 297	69.16 ± 2.07	135.5 ± 1.9*
8	Fucofuroeckol	478.05	479	229, 267, 303	<i>n.d.</i>	104.1 ± 4.1*
9	Fucofuroeckol (I)	478.05	479	229, 267, 303	47.37 ± 6.00	322.6 ± 32.3
10	Fucofuroeckol (II)	478.05	479	215, 263, 296	195.1 ± 39.3	674.2 ± 62.1

\*Diferencias significativas (prueba de t-student ; p<0.05) comparación con el extracto crudo (EC). *n.d.*: no determinado

### 7.7.3.-Selección del sistema de solventes de dos fases para separación de florotaninos de *E. arborea* utilizando la cromatografía de partición centrífuga rápida (FCPC)

Los valores del coeficiente de partición (Kd) para los cuatro florotaninos más abundantes: eckol (pico 4), dieckol (pico 6), fucofuroeckol (I) (pico 9) y fucofuroeckol (II) (pico 10) en dos sistemas de solventes fueron determinados (Tabla 22). El sistema (A), que consistió en n-hexano/acetato de etilo/etanol /agua (1:6:1:6 v/v/v), dio como resultado valores de Kd superiores a 6 para la separación de los compuestos de interés. El sistema (B) que consistió en n-hexano /acetato de etilo /metanol /agua (2:7:3:7 v/v /v), mostró valores de Kd que oscilaron entre 0.56 y 6 a la concentración de 0.5 mg/mL, el eckol y el dieckol mostraron valores de Kd de 0.56 y 0.80, respectivamente; lo que indica que estos compuestos son más solubles en la fase inferior, mientras que el fucofuroeckol (I) y el fucofuroeckol (II) mostraron valores de Kd mayores que 1, lo que indica que estos compuestos se distribuyeron principalmente en la fase superior. Cuando se aumentó la concentración de 1 mg/mL a 2 mg/mL, aumentaron los valores de Kd de todos los compuestos. Particularmente, el Kd del eckol aumentó de 0.56 a 0.91 a la concentración de 2mg/mL. De la misma manera, el valor de Kd de dieckol se incrementó de 0.80 a 1.17. El sistema de solventes B, permitió obtener los valores de Kd más apropiados para el aislamiento de los florotaninos, ya que, los compuestos mostraron factores de separación

$\alpha$  (relación del valor de Kd entre dos compuestos) mayores que 1.3, lo que indica una separación adecuada entre estos compuestos.

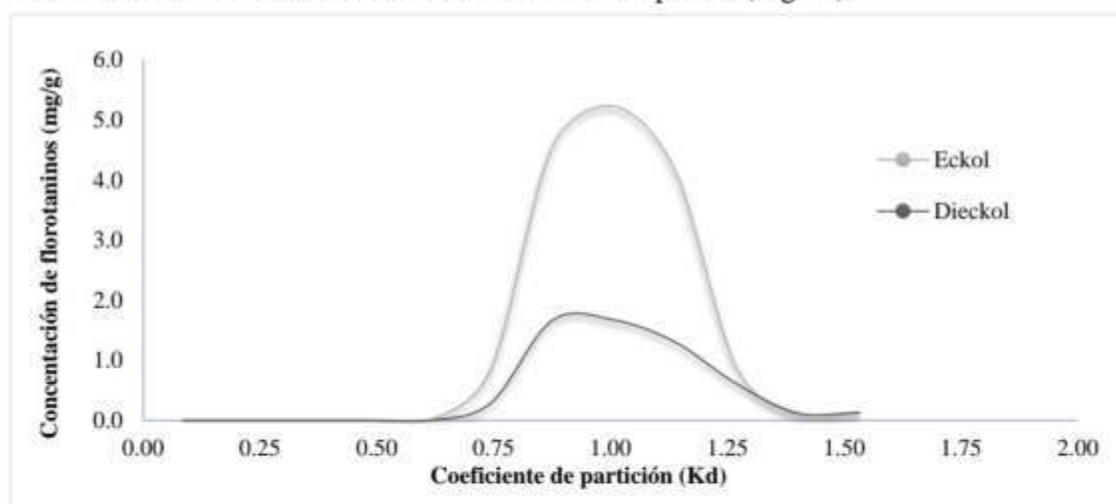
**Tabla 22.** Valores de coeficiente de partición (Kd) de los florotaninos: eckol, dieckol, fucofuroeckol (I), y fucofuroeckol (II) en dos diferentes sistemas de solventes.

Sistema de solventes	Concentración (mg/mL)	Eckol	Dieckol	Fucofuroeckol (I)	Fucofuroeckol (II)
A	0.5	8.80	-	-	18.40
	1	8.50	11.73	19.94	11.46
	2	6.59	6.31	8.35	9.02
B	0.5	0.56	0.80	3.14	4.11
	1	0.84	1.25	3.72	4.40
	2	0.91	1.17	5.35	6.00

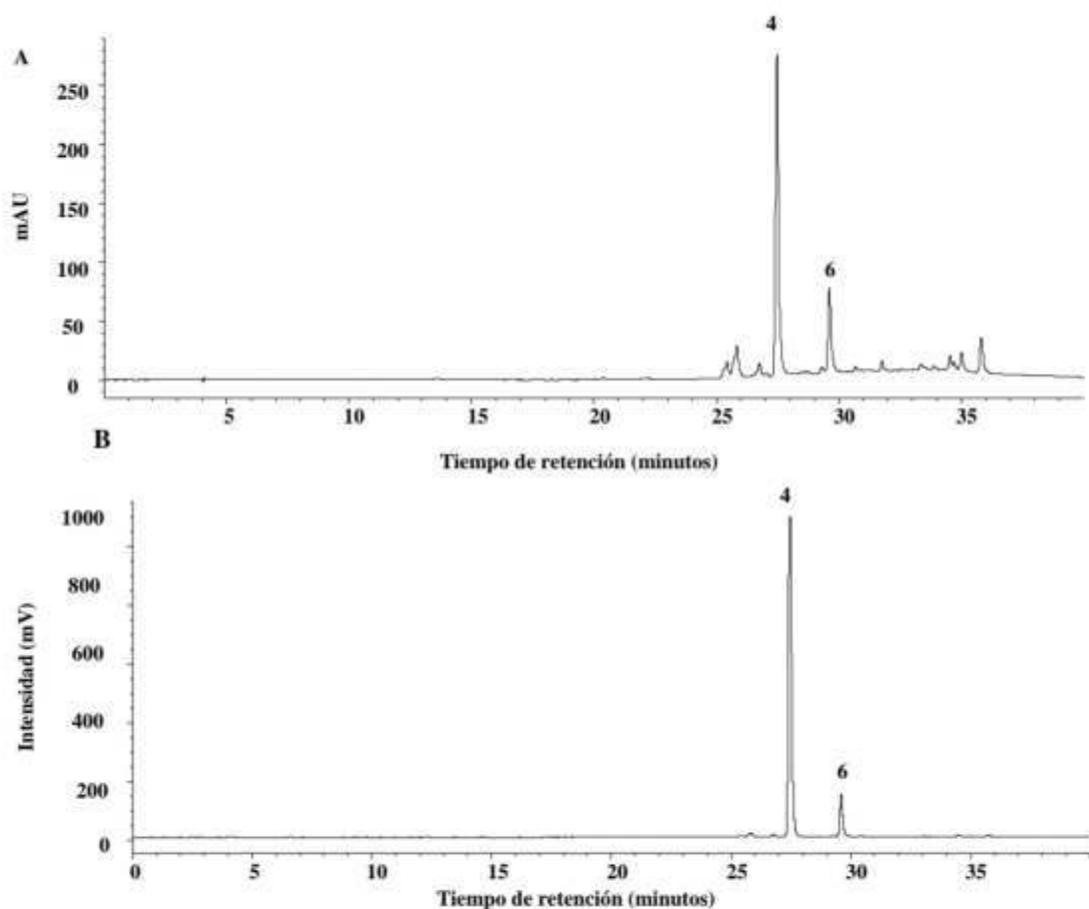
A: *n*-hexano: acetato de etilo: etanol: agua (1:6:1:6, v/v/v/v); B: *n*-hexano: acetato de etilo: metanol: agua (2:7:3:7, v/v/v/v).

#### 7.7.4.-Separación de los florotaninos del alga parda *E. arborea* mediante cromatografía rápida de partición centrífuga (FCPC) y su actividad antibacteriana contra *V. parahaemolyticus* AHPN+

La concentración máxima de eckol y dieckol se detectó después de 80 minutos de elución (pool 8) en modo descendente, recuperando 5.23 mg/g y 1.67 mg/g, respectivamente con valores de Kd entre 0.75 y 1.25 (Fig.35). Los florotaninos fueron los únicos compuestos detectados a 270 nm o con el detector ELSD en el pool 8 (Fig.36).



**Fig 35.-** Coeficiente de partición (Kd) del eckol y dieckol durante el fraccionamiento FCPC de FAE de *E. arborea*.



**Fig 36.-** Cromatogramas de HPLC-DAD registrados a 270 nm (A), cromatogramas de ELSD (B) del pool 8 de FAE obtenido por FCPC.

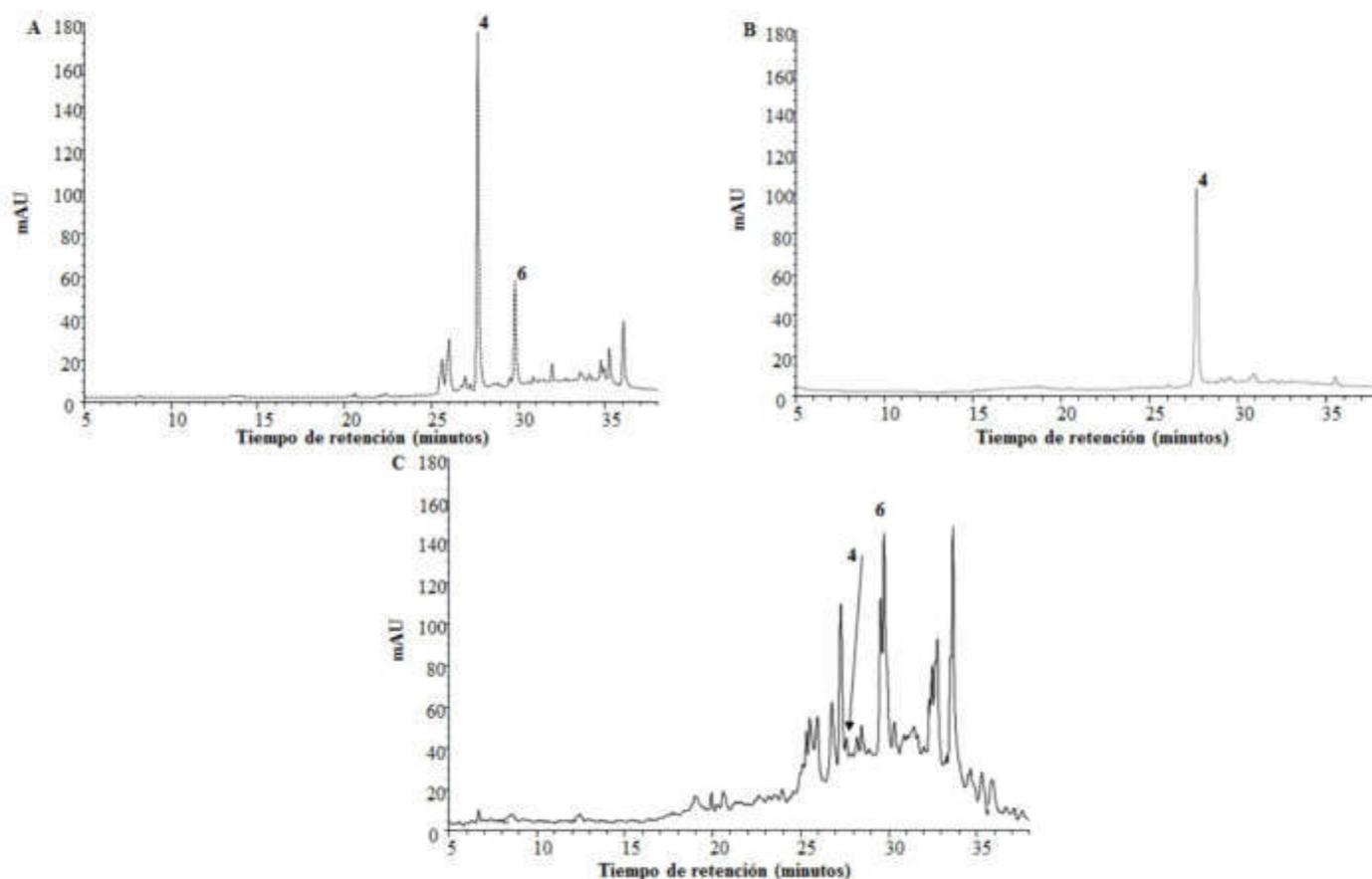
Sorprendentemente, el pool 8 mostró la mayor actividad antibacteriana contra Vp M0904 con una actividad de 10 veces mayor (350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en comparación con el EC. Estos resultados coincidieron con los altos factores de purificación obtenidos para el eckol (45.17) y el dieckol (34.72) en esta fracción. La actividad antibacteriana del pool 8 se comparó con la actividad antibacteriana del compuesto eckol purificado y con un extracto comercial rico en dieckol (AG Dieckol®, Aqua Green Tech Co. Jeju, Corea) con un contenido de dieckol (49.95mg/g) casi 30 veces mayor (Tabla 23 y Figura 37). El eckol purificado no mostró actividad antibacteriana a la concentración de 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, el AG Dieckol® mostró una MBC de 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra Vp AHPND+ con una MBC más alta que el pool 8, pero comparable a la FAE.

**Tabla 23.-** Concentración bactericida mínima (MBC), contenido de eckol y dieckol e incremento de bioactividad de los pools obtenidos por (FCPC) de la FAE de *E. arborea*.

Muestra	MBC ( $\mu\text{g/mL}$ )	mg/g		Incremento de bioactividad *
		Eckol	Dieckol	
Pool 1	>750	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-
Pool 2	>750	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-
Pool 3	>750	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-
Pool 4	>750	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-
Pool 5	>750	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-
Pool 6	450	0.84	0.29	7.8
Pool 7	450	4.54	1.66	7.8
Pool 8	350	5.23	1.67	10.0
Pool 9	400	4.16	1.30	8.8
Pool 10	450	0.88	0.61	7.8
Pool 11	600	0.08	0.12	5.8
Pool 12	600	0.12	0.13	5.8
AG Dieckol®	750	7.16	49.96	4.7
Eckol	>750	910.06	-	-

\*Incremento de bioactividad en comparación con el valor de MBC del EC (3500  $\mu\text{g/mL}$ ). *nd*; no detectad

**Fig 37.-** Cromatogramas de HPLC-DAD registrados a 270 nm de (a) pool 8 obtenidos del fraccionamiento de la FAE por FCPC utilizando el sistema de solvente constituido por n-hexano/acetato de etilo/metanol /agua (2:7: 3:7 v/v /v/v) (b) Eckol purificado por cromatografía semipreparativa y (c) AG dieckol®, producto comercial rico en dieckol. Los picos marcados con los números 4 y 6 fueron identificados tentativamente por HPLC/MS-TOF como eckol y dieckol, respectivamente



## 7.8.- Algunos mecanismos de acción de la FAE de *E. arborea*

### 7.8.1.-Inhibición de quórum- sensing

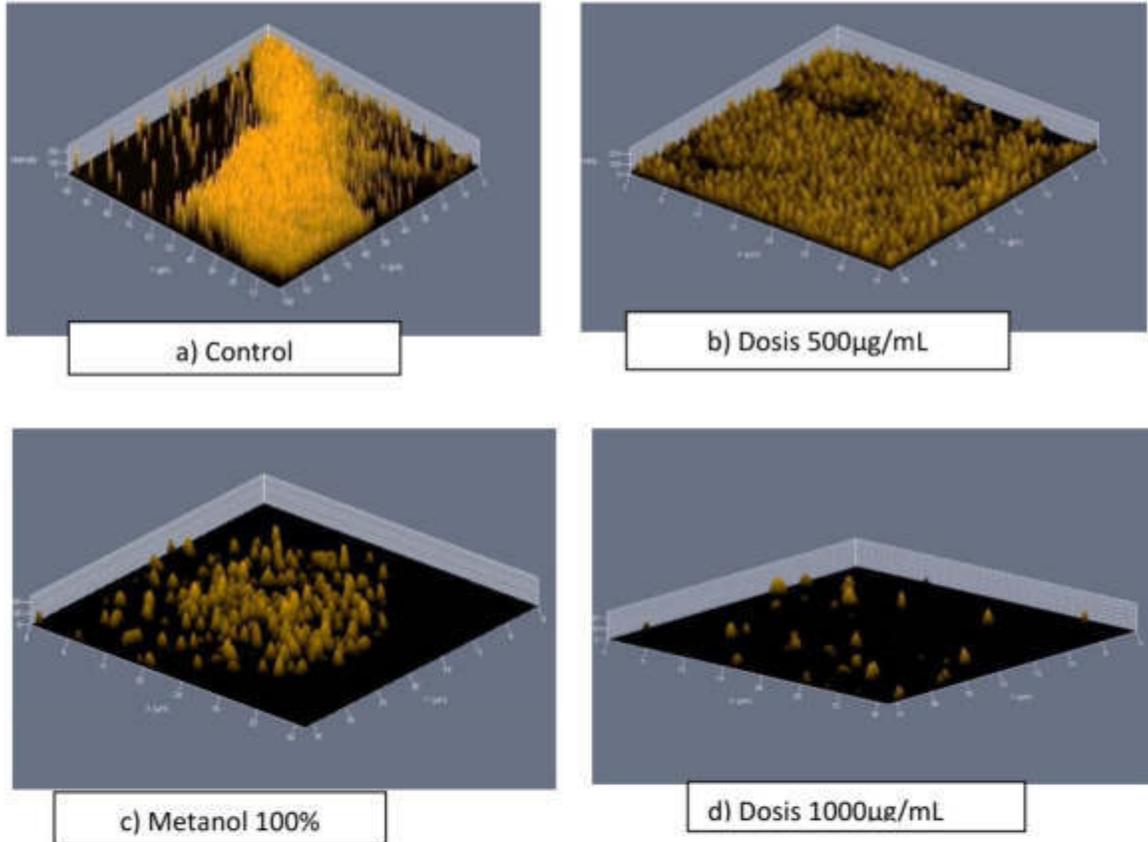
La figura 38 muestra la capacidad de la FAE, de inhibir el quorum-sensing de la cepa reportera CV026, debido a la formación de un halo sin el pigmento indicador (morado), además de inhibir el crecimiento de la misma al producir un halo, indicando la actividad antibacteriana del extracto.



**Fig 38.-** Actividad quorum-sensing de FAE y halo de inhibición de cepa CV026

### 7.8.2.- Ensayos de inhibición de biofilm

Las fotografías obtenidas de la microscopía confocal, muestran la capacidad de formación de biofilm de la cepa Vp M0904 (Fig. 39 a). Al adicionar la FAE de *E. arborea* a las concentraciones de 500-1000  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 39 b y d) se observó una reducción notable de biofilm en comparación al control. Sin embargo, el metanol al 100% (solvente usado para disolver el extracto) también presentó un efecto inhibitor sobre la formación de biofilm (Fig. 39 c), por lo que, es necesario restar la actividad del solvente a la actividad reportada con la FAE.



**Fig 39.-** Imágenes de microscopía láser confocal de biofilm de *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+. a) control, c) metanol 100 %, b y d ) extracto FAE a concentraciones de 500 y 1000 µg / mL, respectivamente.

## 8.-DISCUSIÓN

A consecuencia del uso inapropiado de antibióticos, la resistencia a los antibióticos es un problema generalizado que no solo afecta a la salud pública sino también a diferentes sectores de la producción animal causando pérdidas económicas sustanciales. Se han realizado muchos esfuerzos para descubrir agentes terapéuticos alternativos para el tratamiento de enfermedades bacterianas del camarón como la AHPND. En la literatura hay numerosos informes acerca de actividad antimicrobiana, contra una amplia gama de bacterias, de extractos de algas de todo el mundo (Eom and Kim, 2012; Lee et al. 2014; Nagayama et al. 2002), incluyendo algas de aguas mexicanas (Muñoz-Ochoa, 2010; Aguilar- Ramírez et al. 2012). Sin embargo, en esta investigación, se analizó por primera vez, la capacidad antimicrobiana de extractos de 6 algas mexicanas recolectadas en Baja California (México) para inhibir el crecimiento de una cepa de Vp AHPND+.

Se sabe que las algas marinas son una fuente existente de metabolitos con actividad antibacteriana (Dashtiannasab y Yeganeh 2017; Pérez et al. 2016). Por ejemplo, extractos de algas pardas recolectadas de países como Marruecos, Korea y Japón han demostrado capacidad de inhibir distintos patógenos entre los que se encuentran: *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *V. parahaemolyticus* (Abourriche et al. 1999; Lee et al. 2014; Nagayama et al. 2002). El efecto antibacteriano de extractos de algas contra vibrios de importancia en acuicultura fue revisado por Vatsos y Rebours (2014); ellos reportan que los tres grupos de algas (rojo, verde y pardas) exhiben propiedades antimicrobianas, pero hay géneros que parecen exhibir un rango más amplio de actividad son *Asparagopsis* spp. (roja) y *Sargassum* spp. (parda). Sin embargo, la comparación de la efectividad entre especies es difícil, ya que hay muchos factores pueden afectar las propiedades antimicrobianas; una misma especie de alga puede exhibir diferentes propiedades dependiendo de la estación o el área geográfica. El método de extracción también es un factor importante que puede afectar la eficacia de los extractos producidos. Estos autores también reportan que los solventes orgánicos son mas eficaces en la extracción de antimicrobianos que el agua.

En las costas de México, se ha confirmado el potencial antibacteriano (contra bacterias de importancia medica) de extractos etanólicos de especies pardas como *Macrocystis pyrifera*, *Eisenia arborea*, *Egrecia menziesii*, *Cystoseira osmundacea* (Villarreal-Gómez

et al. 2010; Muñoz-Ochoa 2010; Tenorio-Rodriguez 2018). Sin embargo, este es el primer estudio en el que se evalúa el potencial antibacteriano de extractos de algas pardas contra Vp AHPND+ en este caso específicamente de extractos de *E. arborea*, *C. osmundacea*, *P. californica*, *P. compressa*, *E. menziesi* y *M. pyrifera*, colectadas en Baja California.

En el presente estudio, aunque todas las especies evaluadas excepto *P. californica* presentaron actividad, el alga *E. arborea* fue la que presentó la mayor actividad antiVpAHPND+. Esto concuerda con los reportes de otras especies del género *Ecklonia* distribuidas en Asia como: *E. kurome*, *E. bicyclis*, *E. cava*, *E. stolonifera* que presentan importante actividad antibacteriana atribuida principalmente a sus florotaninos (Nagayama et al. 2002; Li et al. 2011; Eom et al. 2011; Eom et al. 2012; Choi et al. 2014; Lee et al. 2014; Kim et al. 2018)

Los extractos acetónicos de *E. arborea* presentaron los inhibidores más activos contra Vp AHPND+ con CMI y CMB de 3.5 mg/mL. La acetona ha sido reportada como un buen solvente para la extracción de antibacterianos (particularmente ricos en florotaninos) de diferentes algas marinas (Wefky y Ghobrial, 2008; Fareed y Khairy, 2008; Elanwar et al. 2010; Qiao 2010, Rosaline et al. 2012; Oumaskour et al. 2012; Thirunavukkarasu et al. 2014; Moorthi y Balasubramanian, 2015). Se cree que la acetona inhibe las interacciones entre florotaninos y proteínas durante la extracción (rompe los puentes de hidrógeno en complejos florotanino-proteína) incrementando el rendimiento total de la extracción (Lopes et al 2012, Lopes 2014).

Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la actividad antibacteriana de los extractos de algas cuando la acetona se usó como solvente de extracción, la composición del EC muestra que, la acetona extrae una mezcla de componentes antimicrobianos de naturaleza fenólica y lipofílica. Cox et al. (2010) reportan florotaninos, ácidos grasos y fucoxantina como antimicrobianos en otras especies de algas.

También se ha encontrado que los extractos con solventes orgánicos presentan una actividad antimicrobiana más consistente que los extractos acuosos (Parekh et al. 2005). Los solventes de polaridad media a baja son más selectivos que el metanol acuoso para extraer los compuestos antimicrobianos más potentes de las algas (Tan et al. 2012). La polaridad del solvente de extracción afecta profundamente la manera en que el extracto va

a interactuar con los grupos funcionales en superficies bacterianas. Por ejemplo, dependiendo de la polaridad del solvente utilizado, los grupos funcionales extraídos pueden ser hidrófilos polares o lipófilos no polares. Esto influye en la capacidad del extracto de algas para actuar sobre la membrana celular y otros componentes de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Shanon y Abu-Ghannam 2016).

En otras investigaciones, los extractos con cloroformo/metanol, etanol y metanol de algunas algas fueron más activos en inhibir el crecimiento de bacterias patógenas incluyendo *Vibrio* (Bansemir et al. 2006; Muñoz-Ochoa 2010; Thirunavukkarasu et al. 2014). Sin embargo, para el caso de nuestra cepa de Vp AHPND+ los compuestos solubles en diclorometano/metanol, éter de petróleo y etanol, no inhibieron su crecimiento; se sabe que la estructura y la solubilidad de los compuestos antibacterianos de las algas, así como la sensibilidad de las bacterias, varían de especie a especie.

La extracción caliente realizada mediante soxhlet fue el método más eficiente de extracción. Este resultado puede deberse a que la temperatura de extracción aumenta la permeabilidad de la membrana celular y facilita el paso del solvente, lo que aumenta la cantidad de los compuestos extraídos (Mendes et al. 2013). Un aumento en la temperatura de extracción produce una disminución en la viscosidad y en la tensión superficial de los solventes de extracción; la tasa de extracción es mejor al aumentar tanto la tasa de transferencia de masa como la solubilidad del analito (Naczka and Shahidi 2006).

El ensayo en pozos fue más sensible ( $p \leq 0,001$ ) para detectar actividad antibacteriana, que el ensayo en discos de papel filtro. Ramírez-Aristizabal y Marín (2012) atribuyen este resultado a la capacidad limitada de difusión que tienen los compuestos activos en el papel. "La técnica con sensidiscos presenta varias desventajas; una de ellas es la composición del papel filtro Whatman el cual se compone de celulosa (uniones b-(1-4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar; los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar. Esto puede explicar en parte la mayor sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente

en pozo” (Ramírez y Marin Castaño 2009). A pesar de que los ensayos de difusión en agar no permiten determinar la concentración mínima inhibitoria o bactericida (CMI o CMB) (Balouiri et al. 2016; Klančnik et al. 2010), estas técnicas son ampliamente utilizadas para tamizaje preliminar de extractos con actividad antibacteriana (Ncube et al 2008; Selvin et al. 2004; Vatsos y Rebours 2015)

Los EC obtenidos con acetona presentaron un valor de CMI y CMB de 3500 µg/mL que, de acuerdo a lo establecido, sería catalogado como inhibidor débil (extractos naturales con CMI por encima de 1000 µg/mL) (Kanjana et al. 2011). Existen antecedentes de CMI de 1400-1600 µg/mL de un extracto crudo del alga verde *Acrosiphonia orientalis* contra patógenos del género *Vibrio* como *V. harvey* y *V. parahaemolyticus* (Manilal et al. 2012). Cabe señalar que los valores de CMI y CMB pueden ser afectados por diferencias en la estructura de las bacterias, ya que una mayor CMI es requerida para penetrar en las especies gram-negativas comparado con gram-positivas (Shannon y Abu Ghannam 2016). Otra variante es el tipo de cepa de *V. parahaemolyticus* utilizada; por ejemplo, en la investigación realizada por Taguri et al. (2004), al comparar la actividad antibacteriana de extractos naturales contra diferentes cepas del género de *Vibrio*, las cepas patógenas presentaron una menor susceptibilidad o una mayor resistencia.

Debido a la naturaleza no específica de los métodos de extracción y / o solventes, los extractos crudos están generalmente compuestos de una mezcla de algunas sustancias no deseadas como azúcares, ácidos orgánicos, pigmentos de clorofila y otros componentes de la pared celular. Además, los compuestos extraídos también pueden existir como complejos con carbohidratos, proteínas y otros componentes de la planta, lo que resulta en una posible interferencia con la bioactividad de los compuestos objetivo (Shahidi y Naczk, 1995, 2003). Con la acetona se extraen compuestos lipofílicos, ácidos grasos, polifenoles, florotaninos y carotenoides, en algas hay reportes de actividad antibacteriana en todos estos compuestos.

Debido a la variedad de compuestos que contienen los extractos crudos, se requiere realizar ensayos que demuestren la inocuidad del extracto para el modelo animal. El ensayo en *Artemia* sp ha sido ampliamente utilizado como un ensayo preliminar confiable indicador de toxicidad en extractos de algas marinas (Ayesha et al. 2010; Kanjana et al.

2011). El EC de *E. arborea* mostró una toxicidad baja con una  $LC_{50}$  de 746.05  $\mu\text{g/mL}$ . De Lara-Isassi et al 2000, evaluaron la toxicidad de extractos fabricados con acetona y etanol, y el 72 % de las especies de algas marinas mexicanas evaluadas presentó un efecto tóxico de moderado a letal. Ara et al. 1999, reportan que la mayoría de los extractos orgánicos de algas pardas que evaluaron presentaron toxicidad en *Artemia salina*.

En nuestro estudio el EC de *E. arborea* al ser adicionado en dietas para camarón a dosis de 1000  $\text{mg Kg}^{-1}$  de biomasa de camarón, en el ensayo de crecimiento de 28 días, produjo una disminución significativa en el peso promedio, en la tasa de crecimiento y en el consumo. Este efecto podría deberse a la presencia en exceso de compuestos deterrentes como los terpenoides y florotaninos que son producidos por las algas pardas como un mecanismo de defensa contra los herbívoros (Haavisto, et al. 2010; Smit 2004). Este efecto repelente también lo reportaron Manilal y colaboradores en el 2012, al alimentar durante 21 días a juveniles de *P. monodon* con alimento suplementado con extracto de *Asparagopsis* en dosis de 1450 y 1750  $\text{mg Kg}^{-1}$  camarón. En contraste, Omont et al, 2019 al evaluar el efecto de la inclusión de extractos metanólicos de *Eisenia* sp en dietas para camarón *L. vanammei* a niveles de 50-150  $\text{g/ Kg}^{-1}$  de alimento reportan un efecto positivo en peso final, ganancia de peso, tasa de crecimiento específico, consumo de alimento y sobrevivencia. Estas diferencias pueden asociarse entre otros al solvente usado en la extracción, la forma de aplicación en el alimento y a la estacionalidad del alga.

En nuestro estudio, la dosis 100  $\text{mg EC /kg}^{-1}$  de camarón que no mostró toxicidad fue usada en desafío con Vp AHPND+, esta dosis no produjo una mejora significativa en la sobrevivencia con respecto al control. Este resultado contrasta con estudios previos donde se demostró el potencial de extractos crudos de algas marinas, como *Gracilaria fisheri*, *Ulva fasiacta* y *Laurencia snyderiae*, como agentes terapéuticos en dietas para camarones capaces de controlar las infecciones causadas por distintas especies patógenas de *Vibrios* (Dashtiannabs and Yeganeh, 2017; Kanjana et al. 2011; Krishnamoorthy et al. 2014; Manilal et al 2012). Aunque el EC fue adicionado a las dietas siguiendo las recomendaciones usadas exitosamente por el Dr. Selvin, es posible que los compuestos activos del EC de *E. arborea* hayan perdido su actividad al adicionarse en las dietas por causas como oxidación o por interferencia con algún ingrediente del alimento, por

lixiviación o durante la digestión. Con la idea de eliminar compuestos tóxicos y aumentar la actividad de los extractos para observar actividad protectora en los bioensayos de desafío, se dio prioridad a la estrategia de la purificación de los compuestos activos y desafortunadamente no se comprobó antes de realizar los desafíos la presencia de actividad antibacteriana en los pellets suplementados con los extractos.

Por otro lado el efecto negativo observado en el análisis histológico de hepatopáncreas de camarones alimentados durante 7 días con el tratamiento con EC a la dosis  $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$  de biomasa de camarón, es una prueba de que algunos compuestos del extracto si fueron consumidos. Cabe mencionar que los esteroides, triterpenos, taninos y flavonoides presentes en extractos de algas han sido reportados por poseer actividades citotóxicas como anticancerígenas, antitumorales y antiproliferativas (Vinayak et al. 2010)., Asi mismo, los terpenoides extraídos con acetona de algas pardas mexicanas, han sido reportados como ictiotóxicos además de alguicidas, fungicidas e insecticidas (De Lara-Isassi et al. 2000). Estos compuestos, presentes en el EC de *E. arborea*, podrían ser los causantes de la toxicidad observada en nuestro estudio. Por ello, fraccionación del EC, se utilizó como estrategia para avanzar en la identificación de los compuestos activos y en el desarrollo del nutracéutico.

La caracterización la FAE de *E. arborea* demostró la presencia de florotaninos, siendo los más abundantes el bieckol, bifuhalol, eckol y fucofloreto. Estos compuestos han sido previamente reportados como antibacterianos contra una gama amplia de patógenos entre ellos *Vibrio parahaemolyticus* (Choi et al. 2014; Nagayama et al. 2002).

La FAE fue la única fracción obtenida del EC de *E. arborea* que presentó actividad antibacteriana contra V.p. AHPND+ (MBC  $750 \mu\text{g/mL}$ ). Esta actividad fue 4.6 veces mayor a la encontrada en el EC, indicando que los compuestos activos se concentran en ese solvente. Esto coincide con los resultados obtenidos por Choi et al. (2010), quienes al fraccionar un EC de *Ecklonia cava* con hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol, agua solo encuentran actividad en la FAE. Así mismo, la FAE obtenida del extracto crudo de *Eisenia bicyclis* fue reportada con actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *V. parahaemolyticus* (Choi et al. 2014).

Por otro lado, Nagayama et al. (2002) también han reportado que la FAE de *Ecklonia kurome* tiene actividad antibacteriana contra *V. parahaemolyticus* con un valor de MBC de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Las diferencias entre los valores de MBC en estos diferentes estudios pueden deberse al tipo de cepa de *V. parahaemolyticus* utilizados. La cepa causante de AHPND M09-04 usada en nuestro estudio es clasificada como altamente virulenta y resistente (Soto et al. 2015; Peng et al. 2017).

En términos de toxicidad la FAE de *E. arborea* en nuestro estudio mostró una toxicidad baja en nauplios de *Artemia* sp con una  $\text{IC}_{50}$  de  $693 \mu\text{g/mL}$ , por lo que el extracto de FAE fue seleccionado para continuar con su evaluación *in vivo*.

La dosis de 1 mg de FAE/ Kg de camarón, evaluada en desafío por inmersión contra V.p AHPND+ a la concentración de  $10^6$  UFC/mL no mejoró significativamente la sobrevivencia con respecto al control. Esto contrasta con estudios en donde el extracto de té verde adicionado a los tanques de camarón una dosis de  $1 \text{ mL/ L}^{-1}$  (Kongchum et al. 2016) y el extracto de proteína del alga *Gracilaria fisheri* administrado en Artemias a dosis de 10 a  $100 \mu\text{g mL}$  seguido de usarse como alimento para camarón (Boonsr et al. 2016) mostraron ser fuentes naturales de productos suplementarios en dietas para camarón capaces de controlar la enfermedad AHPND aumentando la sobrevivencia en camarones que fueron alimentados

Un factor importante al evaluar el efecto protector de extractos de algas marinas en camarones contra distintos patógenos es el modo de aplicación ya los compuestos activos se pueden degradar, lixiviar o se pueden neutralizar con otros compuestos presentes en el alimento. Los florotaninos se pueden oxidar y pueden requerir ser encapsulados para protegerlos y conservar su actividad. Cabe mencionar que la naturaleza y consistencia de nuestro extracto no se disuelve en agua haciendo difícil su manejo.

Los principales compuestos antibacterianos presentes en la FAE de *E. arborea* son compuestos medio-altamente polares. Los compuestos solubles en acetato de etilo en algas pardas son predominantemente polifenoles del tipo florotaninos (Lee et al. 2008; Choi et al. 2010) y específicamente la actividad antibacteriana de las algas pardas se relaciona con su contenido de florotaninos (Eom et al. 2012). La FAE posee la mayor concentración de florotaninos, principalmente eckol con  $469.28 \pm 5.99 \mu\text{g g}^{-1}$ , seguido por fucofuroeckoles

y dieckol. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, la fracción de acetato de etilo o FAE se seleccionó para realizar el fraccionamiento preparativo utilizando el FCPC.

La selección del sistema de solventes fue basada en determinar el coeficiente de partición ( $K_d$ ) del extracto FAE, probando los sistemas: Sistema A (A), que constó de n-hexano / acetato de etilo / etanol / agua (1:6: 1: 6 v / v / v), mientras que el sistema B (B) estaba constituido por n-hexano / acetato de etilo / metanol / agua (2: 7: 3: 7 v / v / v). Estos sistemas de solventes, en investigaciones previas, han mostrado elevados rangos de separación y purificación de florotaninos (Lee et al. 2013) El sistema de solventes compuesto por n-hexano/acetato de etilo/metanol /agua (2:7:3:7, v/v/v/v) mostró la separación más eficiente de los florotaninos, principalmente eckol y dieckol. La concentración también fue un factor importante a considerar, ya que al modificar la concentración de la FAE en el sistema A y B, modificó los valores de  $K_d$  y el porcentaje de recuperación de los compuestos de interés en cada fase.

Después del fraccionamiento preparativo por FCPC, se analizó el perfil fitoquímico de doce pools (constituidos por diez fracciones cada uno), así como su actividad antibacteriana contra *V. parahaemolyticus*. El análisis (HPLC) detectó que los compuestos principales eran eckol y dieckol, y estos compuestos se detectaron desde el pool 6 al pool 12. Es interesante destacar la correlación entre el contenido de eckol y dieckol presente en el pool y su actividad antibacteriana, resultando el pool 8 con 5.23 mg/g de eckol y 1.67 mg/g de dieckol, con la mayor actividad antibacteriana (MBC 350 $\mu$ g/mL), aumentando su actividad 10 veces con respecto a el extracto crudo. Los florotaninos como el eckol, el dieckol y el 8,8'-bieckol ya se han sido reportados como compuestos antibacterianos (Nagayama et al. 2002; Lee et al. 2008; Choi et al. 2010). Se ha reportado que el Dieckol es 4 veces más activo como agente antibacteriano contra *V. parahaemolyticus* que el eckol (Nagayama et al. 2002), mientras que el valor de CMI de florotaninos de bajo peso (LMP) contra *V. parahaemolyticus* se ha determinado en 900  $\mu$ g/ml (Wei et al. 2015).

Con el fin de determinar si el contenido de eckol o dieckol eran los responsables de elevada actividad antibacteriana observada en el pool 8, se evaluó la actividad antibacteriana del eckol purificado y un extracto comercial rico en dieckol (AG Dieckol®). Sorprendentemente, el eckol purificado no presentó actividad bactericida

contra *V. parahaemolyticus*, solo se observó una ligera reducción en su crecimiento. En contraste a lo reportado por Nagayama et al. (2002), quienes informaron que el valor de MBC del dieckol y bieckol contra *V. parahaemolyticus* fue cuatro veces mayor que el valor de eckol purificado. A pesar de que la concentración de eckol en el pool 8 fue mayor que la del dieckol, la actividad bactericida mostró una mejor correlación con el aumento del contenido de dieckol. Esto puede ser atribuido al grado de polimerización, ya que los efectos bactericidas de los florotaninos tienden a aumentar con la polimerización del floroglucinol, siendo más activos aquellos florotaninos con estructuras complejas que varían tanto en el número de monómeros como en las posiciones en las que están unidos (Heffernan et al. 2015).

De acuerdo con estas consideraciones, en este estudio, la actividad bactericida del pool 8 puede atribuirse al contenido de dieckol, un hexámero de fluoroglucinol, más que al contenido eckol (compuesto mayoritario) un trímero de floroglucinol. En la investigación realizada por Hermund et al. (2018) se demostró que la bioactividad de los florotaninos depende más del número de grupos hidroxilo disponibles que de su grado de polimerización, lo que indica que la actividad bactericida observada en el pool 8 puede atribuirse a la molécula con mayor número de grupos hidroxilo disponibles, siendo en este caso el dieckol. En contraste con lo esperado, el extracto rico en dieckol (AG Dieckol®) mostró una actividad bactericida más baja que el pool 8, pero comparable con la actividad de la FAE. Este comportamiento podría explicarse por la interacción con otros compuestos, principalmente a través de reacciones de oxidación que causan la formación de enlaces intermoleculares e intramoleculares, limitando el número de grupos funcionales disponibles (Kirke et al. 2017; Poncet-Legrand et al. 2010).

En cuanto a los posibles mecanismos de acción estudiados, la expresión del pigmento morado (violacein) de *C. violaceum* CV026 está regulado por N-hexanoil-L (HSL) y las homoserina lactonas aciladas (acil HSL), involucradas en la formación de la biopelícula (Borchardt et al. 2001). La FAE del alga *E. arborea* presenta inhibidores del quorum sensing y a su vez produce la inhibición del crecimiento de la cepa reportera y tiene un efecto inhibitor en la formación de la biopelícula de *V.p* AHPND + . Estos efectos ya se han reportado con otros extractos de macroalgas (Carvalho et al.2016; Bhavanath et al.

2013). Por ejemplo, se ha atribuido a las furanonas halogenadas producidas por el alga roja marina *Delisea pulchra* por interferir en el sistema regulador de la homoserina lactona N-acilada (AHL) en varias bacterias gramnegativas (Kjelleberg et al. 1997). Furanonas sintéticas y naturales han sido correlacionadas al producir un efecto negativo al producir la inhibición de quórum de la cepa reportera *C. violaceum* CV026 además de inhibir el crecimiento de la misma, este efecto podría ser asociado a la toxicidad general; y se debe tener en cuenta que los compuestos activos del quórum-sensing tienen un efecto no lineal, los inductores pueden actuar como inhibidores y los inhibidores pueden ser capaces de activar o mejorar quórum-sensing, en función de la estructura química y niveles de concentración (Chong-Lek et al. 2013). En otro estudio con el alga parda *Laminaria digitata*, se demostró que los antimicrobianos halógenos oxidados reaccionan rápidamente con las 3-oxo-acil HSL en concentraciones diluidas, y la presencia de bromoperoxidasa en una reacción redox da como resultado la formación de ácido hipobromoso (HOBr), compuesto altamente tóxico para los microorganismos, producido por las algas como un mecanismo de defensa que controla la formación de la biopelículas mediante un mecanismo biocida o por oxidación, también desactiva la señalización de 3-oxohexanoilhomoserina lactona por oxidación, afectando la capacidad de comunicación de célula a célula (Borchardt et al. 2001). La capacidad de inhibir la formación de biofilm y de quorum sensing de Vp AHPND+ encontrada en la FAE de *E. arborea* refuerza la probabilidad de poder obtener un nutracéutico protector contra la enfermedad, pero se requieren más estudios para comprobarlo.

## 9.- CONCLUSIONES

- De las 6 algas pardas evaluadas, el extracto crudo (EC) de *Ecklonia arborea* obtenido con acetona y el método soxhlet resultó tener la mayor actividad antibacteriana contra Vp. M0904 AHPND+
- El EC de la muestra de *E. arborea* evaluada presenta insaturaciones, ácido carboxílico, carbohidratos, grupo funcional carbonilo de cetonas o aldehídos, esteroides y triterpenos, taninos y flavonoides. y está constituido principalmente por compuestos fenólicos, lipídicos, y proteicos. Se identificaron diez tipos diferentes de florotaninos
- El EC de la muestra de *E. arborea* evaluada contiene compuestos tóxicos y deterrentes que disminuyen el consumo, el crecimiento, y la sobrevivencia de los camarones a dosis de 1000 mg de EC/Kg de biomasa además producen daños en el hepatopáncreas a nivel celular.
- En las condiciones experimentales usadas, la dosis no tóxica de 100 mg de EC de *E. arborea* /Kg de camarón no presentó efecto nutracéutico o protector contra AHPND, ya que el EC no mejoró la sobrevivencia de los camarones desafiados con respecto al control.
- La FAE obtenida por partición del EC concentró los compuestos fenólicos y los florotaninos y aumentó la actividad anti Vp M0904 AHPND+ 4.6 más con respecto al extracto EC.
- A la dosis de 1 mg / Kg de biomasa de camarón, la FAE no afectó el consumo y la sobrevivencia, pero tampoco aumento la sobrevivencia en camarones desafiados.
- Al ser fraccionada la FAE mediante cromatografía de partición centrifuga (FCPC) se obtuvo una fracción que presentó una actividad antibacteriana (MBC) 10 veces mayor que el EC, identificando al eckol y dieckol como compuestos mayoritarios. El compuesto mayoritario eckol purificado mediante HPLC, presentó una menor actividad antibacteriana; por lo que la actividad antibacteriana del extracto de *E. arborea* puede estar relacionada al contenido de dieckol.

- Los efectos inhibidores de biofilm y de quorum sensing de los compuestos anti Vp M0904 encontrados con la FAE del alga *E. arborea* refuerzan la posibilidad de encontrar un extracto con efecto protector contra AHPND.
- La evaluación del efecto nutracéutico de FAE y de los florotaninos de *E. arborea* contra AHPND en camarones requiere de más estudios principalmente a nivel de estabilidad y biodisponibilidad al ser adicionada en el alimento.

## REFERENCIAS

- Abourriche, A., Charrouf, M., Berrada, M., Bennamara, A., Chaib, N., Francisco, C. (1999). Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Fitoterapia*, 70, 611–614.
- Abu-Ghannam, N., & Rajauria, G. (2013). Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.2.287>
- Águila-Ramírez, R.N., Arenas-González, A., Hernández-Guerrero, C.J., González-Acosta, B., Borges-Souza, J.M., Véron, B., Hellio, C. (2012). Actividades antimicrobiana y anti-incrustante obtenidas de los extractos de algas marinas del Golfo de California, México. *Hidrobiológica*, 22(1), 8–15.
- Aguilar-Rosas, R., Espinoza-Avalos, J., Aguilar-Rosas, L.E. (1998). Uso de las algas marinas en México. *Ciencia y Desarrollo*, XXIV, 65–73.
- Airanthi, M. K. W.-A., Hosokawa, M., Miyashita, K. (2011). Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *Journal of Food Science*, 76(1), C104–11. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01915.x>
- Anderson, J. L., Valderrama, D. Jory, D. E. (2019). GOAL 2019: Global shrimp production review. *Responsible Seafood Advocate*, 4 November 2019 ([globalseafood.org/advocate/goal-2019-global-shrimp-production-review](http://globalseafood.org/advocate/goal-2019-global-shrimp-production-review))
- Andrade, P. B., Barbosa, M., Matos, R. P., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T., Valentão, P. (2013). Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1819–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.081>
- Ara J, Sultana V, Ehteshamul-Haque S, Qasim R, Ahmad VU. (1999). Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (brine shrimp). *Phytother Res*, 13(4):304–307. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199906)
- Ayesha, H., Sultana, V., Ara, J., Ehteshamul-Haque, S. (2010). *In vitro* cytotoxicity of seaweeds from Karachi coast on brine shrimp. *Pakistan Journal of Botany*, 42(5), 3555–3560.
- Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., Domínguez, H. (2013). *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1764–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K. (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., & Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252(1), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.051>
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45:493–496
- Bell, T.A. y Lightner D.V. (1988). A handbook of normal shrimp histology. Special Publication No.1. Baton Rouge LA, World Aquaculture Society, 106-112 pp.
- Borchardt, SA, Allain, EJ, Michels, JJ, Stearns, GW, Kelly, RF, McCoy, WF. (2001). Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl Environ Microbiol*, 67:3174-3179
- Boonsri, N., Rudtanatip, T., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2017). Protein extract from red seaweed *Gracilaria fisheri* prevents acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection in shrimp. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1597–1608. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0969-2>
- Brower, V. (1998) Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the healthcare market? *Nat Biotechnol*. 1998;16:728-731
- Cardoso, S., Carvalho, L., Silva, P., Rodrigues, M., Pereira, O., & Pereira, L. (2014). Bioproducts from seaweeds: a review with special focus on the Iberian peninsula. *Current Organic Chemistry*, 18(7), 896–917. <https://doi.org/10.2174/138527281807140515154116>
- Carvalho, A. P. (2016). Extracts of seaweeds as potential inhibitors of quorum sensing and bacterial growth. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1014-1>
- Cavallo, R. A., Acquaviva, M. I., Stabili, L., Cecere, E., Petrocelli, A., & Narracci, M. (2013). Antibacterial activity of marine macroalgae against fish pathogenic *Vibrio* species. *Central European Journal of Biology*, 8(7), 646–653. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0181-6>
- Chang, H., Zhou, J., Zhu, X., Yu, S., Chen, L., Jin, H., & Cai, Z. (2017). Strain identification and quorum sensing inhibition characterization of marine-derived *Rhizobium*. *Royal Society Open Science*, 4, 170025. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rsos.170025>
- Chaweepack, T., Muenthaisong, B., Chaweepack, S., & Kamei, K. (2015). The potential of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) extract against the pathogens that cause White Feces Syndrome and Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *International Journal of Biology*, 7(3), 8–17. <https://doi.org/10.5539/ijb.v7n3p8>

- Chong-Lek, K., Choon-kook, S., Wai-fong, Y., Li Ying, T., Thiba, K., Yee Meng, C., & Kok-Gan, C. (2013). Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors*, *13*, 6217–6228. <https://doi.org/10.3390/s130506217>
- Choi, J.-G., Kang, O.-H., Brice, O.-B., Lee, Y.-S., Chae, H.-S., Oh, Y.-C., Kwon, D.-Y. (2010). Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. *Foodborne Pathogens and Disease*, *7*(4), 435–441.
- Choi, J.-S., Lee, K., Lee, B.-B., Kim, Y.-C., Kim, Y. D., Hong, Y.-K., Choi, I. S. (2014). Antibacterial activity of the phlorotannins dieckol and phlorofucofuroeckol-A from *Ecklonia cava* against *Propionibacterium acnes*. *Botanical Sciences*, *92*(3), 425–431. <https://doi.org/10.17129/botsci.102>
- Comision Nacional de Acuacultura y Pesca (2018). Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2018. [www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2018/ANUARIO\\_2018.pdf](http://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2018/ANUARIO_2018.pdf)
- Cox, S., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*, *17*(1), 205–220.
- Cruz-Ayala, M. ., Casas-Valedez, M. M., & Ortega-García, S. (1998). Temporal and spatial variation of frondose benthic seaweeds in la Paz Bay, B.C.S., México. *Botanica Marina*, *41*, 191–198.
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., & Taengchaiyaphum, S. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, *2*, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002>
- Dashtiannasb, A., & Yeganeh, V. (2017). The effect of ethanol extract of a macroalgae *Laurencia snyderia* on growth parameters and vibriosis resistance in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *16*(1), 210–221.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. (2010). Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLoS Pathog* , [doi: 10.1371/journal.ppat.1000989](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000989).
- De Lara-Isassi, G., Álvarez-Hernández, S., & Collado-Vides, L. (2000). Ichthyotoxic activity of extracts from Mexican marine macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, *12*(1), 45–52. <https://doi.org/10.1023/A:1008103609841>
- Elanwar, M., Osman, H., Abushady, A. M., & Elshobary, M. E. (2010). *In vitro* screening of antimicrobial activity of extracts of some macroalgae collected from Abu - Qir bay Alexandria , Egypt. *African Journal of Biotechnology*, *9*(12), 7203–7208. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1242>

- Eom, S., Kang, Y., Park, J., Yu, D., Jeong, E., Lee, M., & Kim, Y. (2011). Enhancement of polyphenol content and antioxidant activity of brown alga *Eisenia bicyclis* extract by microbial fermentation. *Fisheries and Aquatic*, 14(July), 192–197.
- Eom, S., & Kim, S. (2012). Phlorotannins as Potential Antibacterial Agents from Marine Brown Algae. In Se-Kwon Kim (Ed.), *Marine Pharmacognosy: Trends and Applications*, 29–135 CRC Press; 1 edition.
- FAO (2013). Culprit behind massive shrimp die-offs in Asia unmasked – Bacterium responsible of Early Mortality Syndrome of shrimp – Crucial first step in finding effective ways to combat the disease. Food and Agriculture Organization of the United Nations (fao.org/news/story/en/item/175416/icode/)
- Fareed, M. F., & Khairy H. M. (2008). *In vitro* antimicrobial activities of seaweeds collected from Abu-Qir Bay Alexandria, Egypt. *World Appl Sci J*, 5(4): 389-396.
- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 166-173. doi: 10.4161/rna.7.2.11184
- Freile-Pelegrin, Y., & Morales, J. L. (2004). Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatán, México. *Botanica Marina*, 47, 140–146.
- Friedman, M., Henika, P. R., Mandrell, R. E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot*, 65, 1545–1560.
- Gabrielson, P. W. (2006). Keys to the benthic marine algae and seagrasses of British Columbia, Southeast Alaska, Washington and Oregon (Phycological Contribution series, Number 4). University of British Columbia, Vancouver, Canadá. 187pp.
- Ganesan, A. R., Tiwari, U., & Rajauria, G. (2019). Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.08.001>
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4), 600–609. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.07.004>
- Haavisto, F., Välikangas, T., & Jormalainen, V. (2010). Induced resistance in a brown alga: Phlorotannins, genotypic variation and fitness costs for the crustacean herbivore. *Oecologia*, 162(3), 685–695. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1494-7>
- Han, J. E., Mohny, L. L., Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., & Lightner, D. V. (2015). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute

- hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports*, 2, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.04.003>
- Heffernan, N., Brunton, N., FitzGerald, R., & Smyth, T. (2015). Profiling of the molecular weight and structural isomer abundance of macroalgae-derived phlorotannins. *Marine Drugs*, 13(1), 509–528. <https://doi.org/10.3390/md13010509>
- Huang, X., Zhou, H., & Zhang, H. (2006). The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(5), 750–7. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.09.008>
- Immanuel, G., Vincybai, V. . C., Sivaram, V., Palavesam, A., & Marian, M. . P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236(1–4), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.033>
- Instituto Nacional de Pesca (2000). Carta Nacional Pesquera. Acuerdo por el que se da a prueba la carta nacional pesquera. Diario oficial, México, 17 de Agosto del 2000, 268 p.
- Isaza Martinez, J. H., & Torres Castañeda, H. G. (2013). Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. *Journal of Chromatographic Science*, 51(8), 825–838.
- Janssen, A.M., Scheffer, J. J. C., and Baerheim Svendeaen, A. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–86 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica* 53, 395–398.
- Jha, R. K., Babikian, H. Y., Babikian, H. Y., Khoa, L. Van, Wisoyo, D., Srisombat, S., & Jiaravanon, B. (2017). Efficacy of natural herbal formulation against Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) causing *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus vannamei*. *Veterinary Medicine - Open Journal*, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.17140/VMOJ-1-109>
- Joung, E. J., Lee, M. S., Choi, J. W., Kim, J. S., Shin, T., Jung, B. M., Kim J. L., Kim, H. R. (2012). Anti-inflammatory effects of phlorofucofuroeckol B-rich ethyl acetate fraction obtained from *Myagropsis myagroides* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells and mouse edema. *International Immunopharmacology*, 14(4), 471–480. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.08.021>.
- Jun, J. W., Han, J. E., Tang, K. F. J., Lightner, D. V., Kim, J., Seo, S. W., & Park, S. C. (2016). Potential application of bacteriophage pVp-1: Agent combating *Vibrio parahaemolyticus* strains associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Aquaculture*, 457, 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.018>

- Kadam, S. S., Tambe, S. T., Grampurohit, N. D., & Gaikwad, D. D. (2012). Review article on : chemical importance of Brady's reagent. *International Journal of Research and Chemistry*, 2(4), 1086–1092.
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.016>
- Kjelleberg, S., Steinberg, P., Givskov, M., Lone, G., Manefield, M., & de Nys, R. (1997). Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 85–93.
- Kim, H. J., Dasagrandhi, C., Kim, S. H., Kim, B. G., Eom, S. H., & Kim, Y. M. (2018). In vitro antibacterial activity of phlorotannins from edible brown algae, *Eisenia bicyclis* against streptomycin-resistant *Listeria monocytogenes*. *Indian Journal of Microbiology*, 58(1), 105–108. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0693-x>
- Kim, S. M. Shang, Y. F., Um, B.-H. (2011). A preparative method for isolation of fucoxanthin from *Eisenia bicyclis* by centrifugal partition chromatography. *Phytochemical Analysis* 22(4). 322-329. <https://doi: 10.1002/pca.1283>.
- Kiran, G. S., Priyadharshini, S., Dobson, A. D. W., Gnanamani, E., & Selvin, J. (2016). Degradation intermediates of polyhydroxy butyrate inhibits phenotypic expression of virulence factors and bio film formation in luminescent *Vibrio* sp . PUGSK8. *Nature Publishing Group*.<https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.2>
- Kirke, D. A., Smyth, T. J., Rai, D. K., Kenny, O., & Stengel, D. B. (2017). The chemical and antioxidant stability of isolated low molecular weight phlorotannins. *Food Chemistry*, 221, 1104-1112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.050>
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S. (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts, *Journal of Microbiological Methods*, 81(2),121-126. <https://doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Koh, C., Sam, C., Yin, W., Tan, L. Y., Krishnan, T., Chong, Y. M., & Chan, K. (2013). Plant-Derived Natural Products as Sources of Anti-Quorum Sensing Compounds. *Sensors*, 13, 6217–6228. <https://doi.org/10.3390/s130506217>
- Koivikko, R. (2008). Brown algal phlorotannins: Improving and applying chemical methods. University of Turku Finland, pp 1-52. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-29-3503-1>
- Kongchum, P., Chimtong, S., Chareansak, N., & Subprasert, P. (2016). Effect of green tea extract on *Vibrio Parahaemolyticus* inhibition in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 11, 117–124.

<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.020>

- Kongrueng, J., Mitraparp-arhorn, P., Bangpanwimon, K., Robins, W., Vuddhakul, V., & Mekalanos, J. (2017). Isolation of *Bdellovibrio* and like organisms and potential to reduce acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Dis Aquat Org*, 124, 223–232.
- Krishnamoorthy, S., Sudalayandi, K., Masilamani, D., Prasanna, K. P. (2014) Evaluation of marine macroalga, *Ulva fasciata* against bio-luminescent causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 803-813. <http://doi: 10.5897/ajmr2013.6233>
- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. Te, Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichak, R., Chang, S. H., Yeh, M. D., Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguchi, H. O., Lo, C. F., Aoki, T., & Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2), 1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>
- Lee, D.-S., Kang, M.-S., Hwang, H.-J., Eom, S.-H., Yang, J.-Y., Lee, M.-S., Kim, Y.-M. (2008). Synergistic effect between dieckol from *Ecklonia stolonifera* and  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(6), 758–764. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0162-9>
- Lee, J.-H., Eom, S., Lee, E.-H., Jung, Y., Kim, H., Jo, M.-R., Kim, Y.-M. (2014). *In vitro* antibacterial and synergistic effect of phlorotannins isolated from edible brown seaweed *Eisenia bicyclis* against acne-related bacteria. *Algae*, 29(1), 47–55. <https://doi.org/10.4490/algae.2014.29.1.047>
- Li, Y.-X., Wijesekara, I., Li, Y., & Kim, S.-K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46(12), 2219–2224. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.015>
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Tang, K. F. J., Noble, B. L., Schofield, P., Navarro, S. A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006>
- Lim, S. Y., Loo, K. W., & Wong, W. L. (2019). Synergistic Antimicrobial Effect of a Seaweed-Probiotic Blend Against Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)-Causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09616-8>
- Lopes, G., Sousa, C., Silva, L. R., Pinto, E., Andrade, P. B., Bernardo, J., Valentão, P. (2012). Can phlorotannins purified extracts constitute a novel pharmacological alternative for microbial infections with associated inflammatory conditions? *Plos One*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031145>

- Lopes, G. (2014). Seaweeds from the portuguese coast: chemistry, antimicrobial and anti-inflammatory capacity. PhD thesis Universidad do Porto, Portugal. *ProQuest dissertations Publishing* 10596402.
- Luna, L. (1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. (p 65-88). McGraw-Hill Book Company, New York,
- Maldonado-Muñiz, M., Luna, C., Mendoza-Reséndez, R., Barriga-Castro, E. D., Soto-Rodriguez, S., Ricque-Marie, D., ... Cruz-Suarez, L. E. (2020). Silver nanoparticles against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp and their depuration kinetics. *Applied Phycology*, 32, 2431–2445.
- Manilal, A., Selvin, J., & George, S. (2012). *In vivo* therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 165–75. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.12.003>
- Martinelli, D., Grossmann, G., Séquin, U., Brandl, H., & Bachofen, R. (2004). Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiology*, 4(25), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-25>
- Maschek, J.A., & Baker, B. J. (2008). The chemistry of algal secondary metabolism. In: Amsler, C. D. (eds) *Algal Chemical Ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74181-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74181-7_1)
- Mendes, M., Pereira, R., Sousa Pinto, I., Carvalho, A. P., & Gomes, A. M. (2013). Antimicrobial activity and lipid profile of seaweed extracts from the North Portuguese Coast. *International Food Research Journal*, 20(6), 3337–3345.
- Meyer, B. ., Ferrigni, N. ., Putnam, J. ., Jacobsen, L. ., Nichols, D. ., & McLaughlin, J. . (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Herbs and Ethnomedicine*, 45, 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Michalak, I., & Chojnacka, K. W. (2014). Algal extracts: technology and advances. *Engineering in Life Science* 14, 581-591. *Doi: 10.1002/elsc.201400139*
- Michalak, I., & Chojnacka, K. W. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Science* 15, 160-176. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400191>
- Moorthi, P.V., & Balasubramanian, C. (2015). Antimicrobial properties of marine seaweed, *Sargassum muticum* against human pathogens. *J. Coast. Life Med*, 3, 122–125.

- Muñoz-Ochoa, M. (2010). Potencial Farmacológico De Algas Marinas De Baja California Sur, México. [Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, Baja California, México].
- Muñoz-Ochoa, M., Murillo-Álvarez, J. I., Zermeño-Cervantes, L. A., Martínez-Díaz, S., & Rodríguez-Riosmena, R. (2010). Screening of extracts of algae from Baja California Sur, Mexico as reversers of the antibiotic resistance of some pathogenic bacteria. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 14(9), 739–747.
- Naczki, M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1523–1542.
- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., & Nakamura, T. (2002). Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(6), 889–893. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf222>
- Nanna, R. S., Banala, M., Pamulaparthi, A., Kurra, A., & Kagithoju, S. (2013). Evaluation of phytochemicals and fluorescent analysis of seed and leaf extracts of *Cajanus cajan* L. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 22(1), 11–18.
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African J Biotechnol* 7(12), 1797-1806. <https://doi: 10.4314/ajb.v7i12.58804>
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(1), 81–86. <https://doi.org/10.3354/dao02776>
- Ohikhen, F. U., Wintola, O. A., & Afolayan, A. J. (2016). Toxicity assessment of different solvent extracts of the medicinal plant, *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle on Brine Shrimp (*Artemia salina*). *International Journal of Pharmacology*, 12(7), 701–710. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.701.710>
- Omont, A., Quiroz-Guzman, E., Tovar-Ramirez, D., & Peña-Rodríguez, A. (2019). Effect of diets supplemented with different seaweed extracts on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1443. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1667-z>
- Ortega, M. M., Godinez, J. L., Oliva, M. G., & Vileclara, G. (1997). Uso tradicional de las algas marinas de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 3(2), 161–163.
- Oumaskour, K., Boujaber, N., Etahiri, S., Assobhei, O. (2012). Screening of antibacterial

- and antifungal activities in green and brown algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida, Morocco). *African Journal of Biotechnology*, 11(104), 16831-16837. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3761>
- Parekh, J., Jadeja, D. & Chanda, S. (2005). Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turkish J. Biol.* 29, 203–210
- Pedroche, F. F., & Sentíes-G., A. (2003). Ficología marina mexicana . Diversidad y problemática actual. *Hidrobiológica*, 13(1), 23–32.
- Peng, L., Kich, L. N., Ray, A., Ankur, B. D., Cong, Q., Nunan, L. M., Camilli, A., Grishin N. V., Salomon, D., Orth, K. (2017). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial Type VI Secretion System with versatile effector repertoires. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.00737-17>
- Pérez, M. J.; Falqué, E.; Domínguez, H. (2016). Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Mar. Drugs*, 14, 52. <https://doi.org/10.3390/md14030052>
- Perumal, S., Pillai, S., Cai, L. W., Mahmud, R., & Ramanathan, S. (2012). Determination of minimum inhibitory concentration of *Euphorbia hirta* (L.) extracts by tetrazolium microplate assay. *Journal of Natural Products*, 5(2).
- Pinoargote, G., & Ravishankar, S. (2018). Evaluation of the efficacy of probiotics *in vitro* against *Vibrio parahaemolyticus*, causative agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Shrimp. *Journal of Probiotics & Health*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000193>
- Poncet-Legrand C, Cabane B, Bautista-Ortín AB, Carrillo S, Fulcrand H, Pérez J, Vernhet A (2010) Tannin oxidation: intra-versus intermolecular reactions. *Biomacromolecule* 11(9), 2376-2386. <https://doi.org/10.1021/bm100515e>
- Qiao, J. (2010). Antibacterial effect of extracts from two Icelandic algae (*Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata* ).(tesis de pregrado). University of Akureyri, Iceland.
- Ramírez Aristizabal, L. S., & Marín, D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia et Technica*, (50), 152-156.
- Ramírez, L. S., & Marín-Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, (42), 263–268.
- Ramírez-Romero, P., & Mendoza-Cantú, A. (2008). Ensayos toxicológicos para la

evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia de México, Primera edición, SEMARNAT, D.F. México.

- Reantaso, M. B. & Gómez-Gil, B. (2013). Early Mortality -syndrome (EMS) in Shrimp. *Tercer foro economico de Pesca y Acuicultura* (foroeconomico.conapesca.gob.mx/history/historial/2013/ponencias/03\_Panel\_1\_Bruno\_Gomez.pdf)
- Rios, J. L., Recio, M. C. & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23, 127–149.
- Rodríguez-Garza, R. ., González-González, G. ., Verde-Star, M. J., Morales-Rubio, M. ., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Treviño-Neávez, J. (2011). Bioprospección de la actividad antimicótica de extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoibeyanus* y *Ariocarpus retusus*. *Polibotánica*, 143–155.
- Romero, J., Feijoó, C. G., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture – Use , abuse and alternatives. *Health and Environment in Aquaculture*,159-184. <https://doi:10.5772/28157>
- Rosaline, X. D., Sakthivelkumar, S., Rajendran, K., Janarthanan, S. (2012). Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1) Supplement, S140-S146. [https://doi:10.1016/S2221-1691\(12\)60145-2](https://doi:10.1016/S2221-1691(12)60145-2)
- Santiago H., M. L., Espinosa P., A., & Bermúdez A., M. del C. (2009). Use of antibiotics in culture shrimp. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 40(3), 22–32.
- Saritha, K., Mani, A. E., Priyalaxmi, M., & Patterson, J. (2013). Antibacterial activity and biochemical constituents of seaweed *Ulva lactuca*. *Global Journal of Pharmacology*, 7(3), 276–282. <https://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2013.7.3.75156>
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods (San Diego, Calif.)*, 42(4), 321–4. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., & Ansquer, D. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191(1–3), 133–144. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00423-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00423-3)
- Selvin, J., Joseph, S., Asha, K. R. T., Manjusha, W. A., Sangeetha, V. S., Jayaseema, D. M., Denslin Vinitha, A. J. (2004). Antibacterial potential of antagonistic *Streptomyces* sp. isolated from marine sponge *Dendrilla nigra*. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.06.007>

- Selvin, J., & Lipton, A. P. (2004). Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. *Journal of Marine Science and Technology*, 12(1), 1–6.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (1995). Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Switzerland: Technomic Publishing Company: Basel.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (2003). Phenolics in food and nutraceuticals: sources, applications and health effects. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Shannon, E. and Abu-ghannam, N. (2016) Antibacterial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14, 81. <http://doi:10.3390/md14040081>.
- Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K., & Nakamura, T. (2004). Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology* 16(4), 291–296. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047781.24993.0a>
- Shibata, T., Ishimaru, K., Kawaguchi, S., Yoshikawa, H., & Hama, Y. (2008). Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *Journal of Applied Phycology*, 20(5), 705–711. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9254-8>
- Smit, A. J. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, 16(4), 245–262. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047783.36600.ef>
- Solis, P., Wright, C., Anderson, M., Gupta, M., & Phillipson, J. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Medica*, 59(03), 250–252. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959661>
- Song, C., Ma, H., Zhao, Q., Song, S., & Jia, Z. J. (2012). Inhibition of quorum sensing activity by ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, S7(01), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.S7-001>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1689–1699. <https://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>
- Sugiura, Y., Matsuda, K., Yamada, Y., Nishikawa, M., Shioya, K., Katsuzaki, H., ... Amano, H. (2007). Anti-Allergic Phlorotannins from the Edible Brown Alga, *Eisenia arborea*. *Food Science and Technology Research*, 13(1), 54–60.

<https://doi.org/10.3136/fstr.13.54>

- Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I. (2004) Antimicrobial Activity of 10 Different Plant Polyphenols against Bacteria Causing Food-Borne Disease. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(12) 1965—1969
- Targett, N. M., Boettcher, A. A., Targett, T. E., & Vrolijk, N. H. (1995). Tropical marine herbivore assimilation of phenolic-rich plants. *Oecologia*, 103(2), 170–179. <https://doi.org/10.1007/BF00329077>
- Targett, N. M., & Arnold, T. M. (2001). in Marine Herbivores. In *Marine Chemical Ecology* (CRC Press, pp. 391–411).
- Tan, S. P., O’Sullivan, L., Prieto, M. L., Gardiner, G. E., Lawlor, P. G., Leonard, F., Duggan, P., McLoughlin, P. & Hughes, H. (2012). Extraction and bioautographic-guided separation of antibacterial compounds from *Ulva lactuca*. *J. Appl. Phycol.* 24(3), 513–523
- Tenorio Rodríguez, P. A. (2018). *Compuestos polifenólicos de macroalgas marinas: actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana*. [Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.] Retrieved from [https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/949/1/tenorio\\_p.pdf](https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/949/1/tenorio_p.pdf)
- Thadtapong, N., Segundo-Salinas, M.B., Charoensawan, V., Saksmerprome, V., & Chaturongakul, S. (2020). Genome characterization and comparison of early mortality syndrome causing *Vibrio parahaemolyticus* *pirAB*<sup>vp-</sup> mutant from Thailand with *V. parahaemolyticus* *pirAB*<sup>vp+</sup> AHPND isolates. *Front. Mar. Sci.*, 28 April 2020. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00290>
- Thirunavukkarasu, R., Pandiyan, P., Subaramaniyan, K., Balaraman, D., Manikkam, S., Sadaiyappan, B., & Jothi Gnana, G. E. (2014). Screening of marine seaweeds for bioactive compound against fish pathogenic bacteria and active fraction analysed by gas chromatography– mass spectrometry. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(5), 367–375. <https://doi.org/10.12980/JCLM.2.2014J48>
- Tierney, M. S., Soler-Vila, A., Rai, D. K., Croft, A. K., Brunton, N. P., & Smyth, T. J. (2014). UPLC-MS profiling of low molecular weight phlorotannin polymers in *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata* and *Fucus spiralis*. *Metabolomics*, 10(3), 524–535.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & 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. <https://doi.org/10.3354/dao02621>

- USEPA (2002). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms, Third edition, Pennsylvania, pag 38.
- Vatsos, I. N., & Rebours, C. (2015). Seaweed extracts as antimicrobial agents in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 2017–2035. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0506-0>
- Villarreal-Gómez, L. J., Soria-Mercado, I. E., Guerra-Rivas, G., & Ayala-Sánchez, N. E. (2010). Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45, 267–275. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572010000200008>
- Vinayak, R. C., Sabu, A. S., & Chatterji, A. (2010). Bio-evaluation of two red seaweeds for their cytotoxic and antioxidant activities *in vitro*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 7(1). <https://doi.org/10.2202/1553-3840.1444>
- Wanasundara, U., & Fedec, P. (2002). Centrifugal partition chromatography (CPC): Emerging separation and purification technique for lipid and related compounds. *INFORM - International News on Fats, Oils and Related Materials*. 13. 726-730.
- Wefky S. & Ghobrial M. (2008). Studies on the bioactivity of different solvents extracts of selected marine macroalgae against fish pathogens. *Res J Microbiol*. 3(12): 673-682.
- Wei, Y. X., Liu, Q., Xu, C. J., Yu, J., Zhao, L., & Guo, Q. (2015). Damage to the membrane permeability and cell death of *Vibrio parahaemolyticus* caused by phlorotannins with low molecular weight from *Sargassum thunbergii*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, (March 2015), 150127101003008. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.851757>
- Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers II*, 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>
- Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, 57(3), 508–514. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>
- Zhang, X.-L., Guo, Y.-S., Wang, C.-H., Li, G.-Q., Xu, J.-J., Chung, H. Y., Wang, G.-C. (2014). Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chemistry*, 152, 300–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.153>
- Zou, Y., Qian, Z.-J., Li, Y., Kim, M.-M., Lee, S.-H., & Kim, S.-K. (2008). Antioxidant effects of phlorotannins isolated from *Ishige okamurae* in free radical mediated oxidative systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7001–

<https://doi.org/10.1021/jf801133h>

## PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusiones presentados en esta tesis, sería de sumo interés para poder terminar el desarrollo de un posible nutraceutico para el control de la AHPND en camarones cultivados a partir del alga *E. arborea*, realizar estudios complementarios sobre la estabilidad de los compuestos de la FAE y de su actividad al ser adicionados al alimento. En caso de ser necesario implementar una técnica para proteger el extracto para aumentar su biodisponibilidad y la estabilidad de los compuestos activos y entonces evaluar diferentes dosis del extracto FAE además de tomar muestras histológicas para descartar un daño en tejido a causa del consumo del extracto durante la infección.

Otro punto relevante, es que esta investigación sustenta la premisa del potencial de los compuestos extraídos de algas marinas cosechadas en las costas de México, además de promover el aprovechamiento de los recursos disponibles. Sin embargo, la extracción de compuestos puros de algas marinas con actividad antibacteriana a partir de las técnicas presentadas, es una actividad poco sustentable; por lo tanto se requieren tecnologías de cultivo rentables, de procesamiento previo de la biomasa para aumentar la bioaccesibilidad y de tecnologías de extracción más ecológicas y respetuosas con el medio ambiente para recuperar estas moléculas activas de la biomasa de algas y estudiar la posibilidad de sintetizar las moléculas activas.

Sería interesante evaluar el efecto nutraceutico contra AHPND de florotaninos comerciales como el Dieckol®

Se observó la citotoxicidad del pool 8 en *Artemia* sp y en la línea celular HepG2 (resultados no mostrados), por lo que sería interesante evaluar los florotaninos presentes en el pool 8 como compuestos con actividad anticancerígena, ya que son metabolitos secundarios producidos por el alga y existen antecedentes de esta actividad en extractos de algas de este género.

Los ensayos exhaustivos en camarones y los estudios de intervención nutricional son requisitos previos para declarar al alga *Ecklonia arborea* como una excelente materia prima para usos nutracéuticos.

Es necesario diseñar más estudios para explorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de estos compuestos bioactivos al adicionarlos en el alimento para obtener efectos beneficiosos a largo plazo.

Sería interesante evaluar la FAE rica en florotaninos y el pool 8 para otras actividades reportadas para estos compuestos (antioxidante, inmunoestimulante, desinflamatoria, antidiabética), y contra otras bacterias de interés veterinario, médico y alimenticio. Y también evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos lipídicos de la FAE que son los segundos más presentes en la fracción.

## ANEXO

### Evaluación de toxicidad en camarones de alimento con FAE del alga *E. arborea*

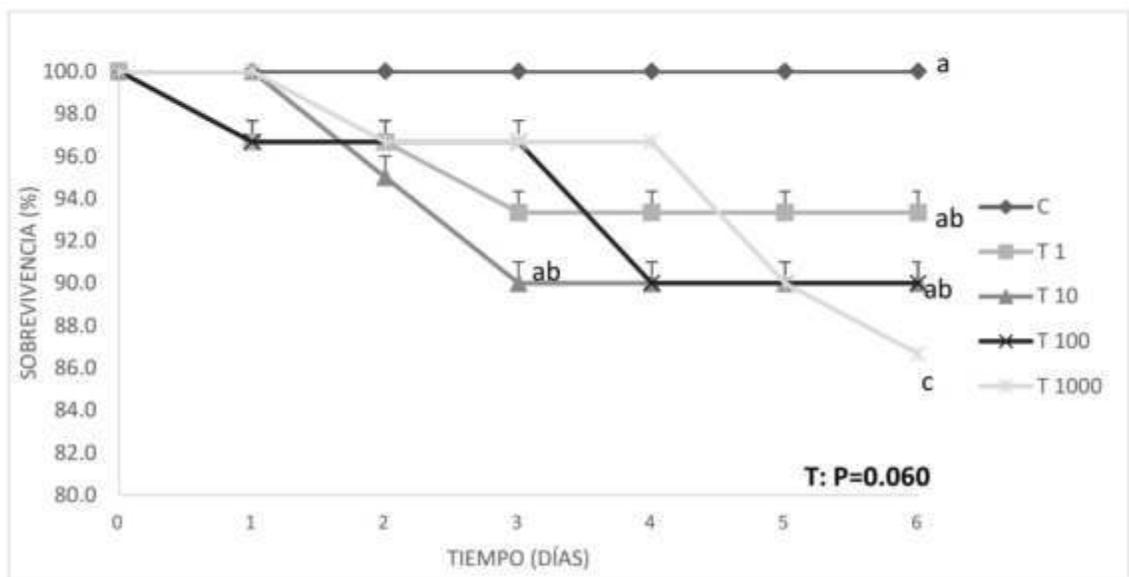
#### Ensayo 1:

La elaboración de alimento medicado consistió en preparar tres soluciones madres del extracto seco FAE a una concentración de 1, 10 y 100 mg/mL, de las cuales se tomó una alícuota (extracto requerido para ración diaria) para preparar la concentración correspondiente a cada tratamiento (Tabla 1), posteriormente se ajustó el volumen a 3 ml de una solución de gelatina al 4 % (gelatin, Sigma), y se adicionó a la superficie del alimento control, se llevó a secar en una plancha de calentamiento a 50 °C. La ración de alimento fue preparada diariamente.

**Tabla 1-** Descripción de la cantidad de extracto FAE requerido para preparar las distintas dosis de prueba del ensayo 1.

	Dosis por Kg de camarón	Dosis en mg por Kg de alimento	Ración diaria	Extracto requerido para ración diaria
<b>Ensayo 1</b>	1	20	1.56 g	36 µl de una solución de 1mg/mL
	10	200	1.54 g	37 µl de una solución de 10 mg/mL
	100	2000	1.55 g	37.5 µl de una solución de 100 mg/mL
	1000	20,000	1.53 g	366 µl de una solución de 100 mg/mL

Los camarones presentaron un consumo de 95% con los tratamientos de dosis de 1, 10, 100 mg/ Kg de biomasa de camarón, sin embargo, el consumo disminuyó con la dosis de 1000 mg/ Kg de biomasa de camarón a un consumo del 85 %. El porcentaje de sobrevivencia fue de 93,90,90 y 86.6 para las dosis de 1, 10,100 y 1000 mg/ Kg de biomasa de camarón respectivamente, después de 6 días de alimentación, el extracto FAE en la dosis de 1000 mg / Kg de biomasa de camarón redujo significativamente ( $p = 0.06$ ) la sobrevivencia a través del tiempo; por esta razón se recomendaron dosis más bajas. Los parámetros de calidad de agua fueron: temperatura de 30° a 32 ° C, pH 8.1, amonio, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> de 0.88, 0.23, 83.92 mg / L respectivamente y la salinidad se mantuvo en 35 g / L



**Fig. 1.-**Gráfica de sobrevivencia de la evaluación de toxicidad del extracto de FAE de *E. arborea* en camarón *L. vannamei* de las dosis de 1(T1), 10 (T10), 100 (T100), 1000 (T1000) mg/Kg de biomasa de camarón dosis T1=