



**Secretaría de Educación Pública**

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Aprovechamiento del bagazo de *Agave lechuguilla* Torrey  
como aditivo alimenticio para el crecimiento y  
fortalecimiento inmunológico de camarón blanco**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestra en ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.B.Q. Jazmín García Luján

Asesores:

Dr. José Alberto Monroy Rivera †

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado

H. Veracruz Ver.

Noviembre 2018

## DEDICATORIA

A Saúl, mi amorosa motivación.  
A mis padres, por todo su amor para con nosotros.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios mi creador, por no dejarme sola en ningún momento, por poner en mi camino personas amorosas, pacientes y honestas.

A mis padres Ubaldo García Esteban, y Oliva Eva Luján Guzmán por sus consejos, por escucharme en todo momento, por alentarme y por su amor incondicional.

A mi director de tesis, Dr. José Alberto Monroy Rivera †, gracias por abrirme las puertas al mundo de la investigación, por no tener prejuicios y enseñarme el diamante que hay en mí. Dios lo tenga en su Santa Gloria.

A mi codirectora externa, Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado, por todo su apoyo otorgado durante mi estancia en el CIBNOR, facilitando siempre los recursos materiales para la experimentación, también por sus correcciones constructivas a lo largo de todo el proyecto, por acompañarme a encontrar una escuela para Saúl y determinar la logística clave en todo el periodo de la estancia con respecto a mi maternidad.

A la empresa Biorganix S.A de C.V. por permitirme formar parte de este proyecto, por el estándar otorgado y la disposición de la materia prima.

A mis revisores, la Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jiménez y el Dr. Andrés Acosta Osorio que en todo momento me corrigieron, aconsejaron y aportaron a la estructura y desarrollo de esta tesis, gracias por su tiempo y su paciencia.

A los doctores del CIBNOR, por sus conocimientos compartidos durante el bioensayo, así mismo los recursos otorgados que hoy me permiten titularme. Así también al Dr. Alberto Peña Rodríguez y su esposa la Dra. Regina Elizondo Gonzalez; por su hospitalidad mostrada durante mi estancia y adicionar espacios para la recreación de Saúl y mía. Al Dr. Eduardo Quiroz, por proporcionar cepa ATCC 17802 de *Vibrio parahaemolyticus* y la Dra. Christina Escobedo por sus conocimientos específicos en histología.

A las técnico, Sandra de la Luz y Carmen Rodríguez por compartir sus experiencias, ofrecer su ayuda durante la realización del bioensayo.

A la Dra. Ángela Suarez Quiroz, del CIATEJ unidad Noreste, por su paciencia, los recursos materiales para la identificación de los compuestos y su tiempo en fin de semana para concluir la experimentación. Así mismo al Dr. Valerio Alfaro quién fue el contacto clave para poder estar con la Dra. Ángela.

Al maestro Javier de la Cruz Medina y los doctores Zorba Josué Hernández Estrada y Claudia Yuritzí Figueroa Hernández por su apoyo otorgado para la formación de este honorable jurado para examen de grado.

A mi hijo, Saúl Aquino García, quién vivió junto a mí los cambios de humor que se suscitaban durante toda la maestría, quien me motiva cada día para superarme, gracias por verme como un superhéroe.

A mis amigos del laboratorio de Físicoquímica, Lupita, Dana, Mellisa y Alfonso por escucharme, aconsejarme y apoyarme cuidando de Saúl. A mis viejos amigos Christina, Christopher, Javier y Salma por integrarme al laboratorio cuando recién llegaba. Y al doctor Sandro, por su asesorarme siempre que tenía dudas.

A mis dos grandes amigas que nacieron de esta aventura, Viviana Prada y Lucía Jiménez, gracias por su tiempo, su ayuda, las risas, los abrazos y ser prácticamente unas hermanas. Dios las bendiga siempre.

A Olguita y Reinita, por el amor que tenían para conmigo y Saúl, gracias por todas esas muestras de afecto que hoy atesoro en el corazón.

A los chicos de servicio social que siempre estuvieron dispuestos a ayudar y hacer ameno el ambiente en el laboratorio Diana, Rita, Karina, Joss, Carlos, José Miguel, Pedro y Deysi.

A doña Julia y Lizz que son ya una madre y una hermana para mí. Siempre dispuestas a ayudar.

A Cecilia Vazquez y su familia, por su disposición siempre a ayudar, por estar presente en cada etapa de esta maestría, por su apoyo aquí en el puerto de Veracruz, en la Paz y también en Monterrey. Gracias por ser un ángel en mi vida personal y profesional. Dios la bendiga siempre.

A Marcela Isabel, Luis Pérez, Paloma y Víctor por ser mano derecha durante mi estancia en La Paz, Baja California Sur, fue un placer haberlos conocidos y convivir con ustedes.

A don Luis, doña Tomi, e Imelda, porque esperaba buenos vecinos pero termine encontrado amigos y también familia, por hacerme fuerte cuidando de Saúl, aconsejándome y escuchándome.

A Gabi Salas, por su ayuda profesional en este último año, gracias por la paciencia y por enseñarme a ver la vida de un modo distinto.

A la maestra Rosa María Lagrave Balbuena y Blanca García por su apoyo otorgado en todo momento para la educación básica de Saúl que facilito mi movilidad durante la maestría.

## RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirme realizar mi proyecto de maestría en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), así también por el apoyo otorgado durante la estancia de investigación en el CIBNOR con la beca mixta; para así culminar la presente tesis: “Aprovechamiento del bagazo de *Agave lechuguilla* Torrey como aditivo alimentario para el crecimiento y fortalecimiento inmunológico de camarón blanco”.

Al programa de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales 2017 por el financiamiento en el proyecto: “Biomoléculas para la nutrición animal a partir de residuos vegetales: Aprovechamiento integral de Lechuguilla”.

## RESUMEN

García Luján, Jazmín. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Octubre de 2018. **“Evaluación del extracto de *guishe* de *Agave lechuguilla* Torrey como aditivo alimenticio para juveniles de camarón blanco”** Asesores: Dr. Monroy Rivera José Alberto<sup>†</sup>, Dra. Reyes Alvarado Ana Gisela.

El *Agave lechuguilla* Torrey es una especie de planta suculenta distribuida principalmente en el noreste de México. Se utiliza principalmente para la extracción de fibras de *ixtle* mediante el tallado de las hojas, de donde resulta 15% de *ixtle* y 85% de *guishe* como subproducto de desecho. Estudios recientes, indican que el *guishe* contiene moléculas con características nutricionales. Por otro lado la camaronicultura en México requiere cultivos resistentes a enfermedades, que sean cosechados antes de tiempo con una ganancia de peso mayor. Este trabajo evaluó el efecto de dos extractos de *guishe* incluidos como aditivo alimenticio en dietas para camarón blanco. Primero se identificó de manera cualitativa por MS-HPLC, la presencia de saponinas en los extractos, tales como: diosgenina, esmilagenina, gentrogenina, yucagenina, clorogenina, y flavonoles como: quercitina y kampferol. Después, se realizó un bioensayo dosis-respuesta preliminar, para evaluar el efecto de dos diferentes extractos de *guishe* sobre el crecimiento del camarón blanco. Los extractos evaluados fueron: un extracto crudo, obtenido del prensado mecánico de *guishe* y un extracto tratado térmicamente a 80° C. El extracto crudo se evaluó en cuatro niveles de inclusión; 0 %, 0.1 %, 0.2 % y 0.3 %, y el extracto tratado en dos, 0% y 0.3%. Los camarones se alimentaron dos veces al día con una dieta experimental adicionada con los diferentes tratamientos, y hubo diferencias significativas entre los tratamientos, los resultados mostraron un efecto positivo en el crecimiento de los camarones con la adición de 0.3% del extracto crudo sobre el extracto tratado. Finalmente, se realizó un bioensayo adicional para evaluar la

efectividad del extracto crudo sobre los parámetros zootécnicos, fisiológicos e inmunomodulantes de los camarones alimentados con la dieta experimental adicionada con 0.1%, 0.3% y 0.6%. Los resultados muestran que la adición de 0.3% de extracto crudo de *guishe* incrementa en aproximadamente 10% la ganancia en peso de los camarones con respecto al control y que la adición de 0.6% de extracto crudo disminuye en aproximadamente 10% la ganancia en peso de los camarones con respecto al control.

## ABSTRACT

García Luján, Jazmín. Master of Science in Biochemical Engineering. Technological Institute of Veracruz. Food Research and Development Unit. October 2018. **"Evaluation of guishe extract of Agave lechuguilla Torrey as a food additive for juveniles of white shrimp"** Advisors: Ph. D. Monroy Rivera José Alberto<sup>†</sup>, Ph. D. Reyes Alvarado Ana Gisela.

*Agave lechuguilla* Torrey is succulent plant species, mainly distributed in northeast of Mexico and southern of United States of America. It is part of the 295 agave species in Mexico. The main use for this plant is the tampico fibers extraction, resulting in 15% of fibers and 85% of a by-product waste named *guishe*. The *lechuguilla* collectors normally incinerate the *guishe*, thus causing environmental contamination. However, recent studies showed that *guishe* contains molecules with nutritional characteristics, such as steroidal saponins, flavonoids and sugars, among others. Therefore, in this work we evaluated the effect of two different *guishe* extracts as food additive in whiteleg shrimp diets: a crude extract, obtained from the mechanical pressing of *guishe* and an 80°C heat-treated extract. According to that, both extracts were analyzed by MS-HPLC. The spectra showed the presence of saponins such as diosgenin, smilagenin, gentrogenin, yucagenin, chlorogenin, and the flavonols, quercitin and kampferol. After chemical analysis, a first dose response bioassay was conducted to evaluate the effect of the two *guishe* extracts on the growth of whiteleg shrimp. The crude extract was included in four levels; 0%, 0.1%, 0.2% and 0.3%, and the heat-treated extract in two different levels, 0% and 0.3%. The results show significant differences effect on growing with the addition of 0.3% of crude extract. Final results showed that the addition of 0.3% crude extract increases by about 10% the weight gain of the assayed shrimps, with respect to the control batch. Thus, valorization of *guishe* with the nutritional molecules extraction for the formulation of shrimp fed additives is the main conclusion of the work.



## CONTENIDO

RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN .....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Agave lechuguilla Torrey.....	3
1.2. Guishe.....	4
1.3. Compuestos fenólicos .....	7
1.4. Saponinas .....	8
1.5. Camarón Blanco del Pacífico .....	9
1.6. Glándula digestiva del camarón blanco.....	10
1.7. Mecanismos de inmunidad del camarón blanco.....	12
1.7.1. Hemolinfa.....	13
1.7.2. Sistema Profenoloxidasa .....	14
1.8. Dietas experimentales estudiadas en camarón blanco. ....	15
1.9. Biopelículas en la camaronicultura.....	21
2. SINTESIS DE ANTECEDENTES.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. General .....	24
3.2. Específicos.....	24

4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
4.1. Extractos de guishe .....	26
4.2. Caracterización de los fitoquímicos en los extractos.....	26
4.3. Evaluación biológica del aditivo alimenticio en el camarón. ....	28
4.3.1. Preparación de las dietas.....	29
4.3.2. Distribución de los experimentos del bioensayo preliminar.....	31
4.3.3. Bioensayo preliminar con camarón blanco del pacífico.....	32
4.3.4. Infección experimental .....	35
4.3.5. Parámetros biológicos de la hemolinfa. ....	37
4.3.6. Histología .....	38
4.3.7. Determinación de nitritos, nitratos y amonio .....	40
4.4. Análisis Estadístico .....	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	42
5.1. Caracterización de los fitoquímicos presentes en el guishe .....	42
5.2. Evaluación del efecto de los extractos de guishe como aditivo alimenticio ..	45
5.3. Evaluación del potencial de absorción de contaminantes de los extractos ..	50
5.4. Segundo bioensayo.....	55
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	59
BIBLIOGRAFÍA .....	60

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1 Análisis fisicoquímico del <i>guishe</i> en dos comunidades distintas en Marzo y Junio. Adaptado de Siller et al., 2015.....	6
TABLA 2 Mecanismo de inmunidad en los camarones. ....	12
TABLA 3 Funciones de los hemocitos, tomado de Suárez Gómez, 2008. ....	13
TABLA 4 Resultados zootécnicos de Ayala Borboa en 2015. ....	15
TABLA 5 Diseño experimental utilizado por Peña Rodríguez y colaboradores para camarón marrón juvenil en presencia o ausencia de la macroalga <i>Ulva Clathrata</i> . ..	16
TABLA 6 Resultados zootécnicos obtenidos por Peña Rodríguez y colaboradores .	17
TABLA 7 Resultados zootécnicos obtenidos por Peña Rodríguez y colaboradores .	18
TABLA 8 Resultados de concentración de nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal total después de 16 semanas reportados por Martínez Córdova y colaboradores .....	19
TABLA 9 Valores medios zootécnicos reportados por Martínez Córdova y colaboradores al finalizar su bioensayo de 16 semanas. ....	19
TABLA 10 Resultados obtenidos por Asiain y colaboradores en 2012 .....	20
TABLA 11 Lista de masa/carga de los compuestos de interés. ....	28
TABLA 12 Perfil nutricional de la dieta utilizada. ....	30
TABLA 14 Composición de la solución Davidson.....	39
TABLA 15 Valores calculados y experimentales de m/z de las moléculas de interés. ....	43
TABLA 15 Pesos promedio de los camarones durante el primer bioensayo.....	45
TABLA 17 Criterios para asignación de valor numérico. ....	54

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Distribución natural de <i>Agave Lechuguilla</i> . .....	3
FIGURA 2 Fibras de ixtle (Tomado de Sánchez, 2017). .....	4
FIGURA 3 Esquema de obtención del extracto de guishe. Imágenes adaptadas de INIFAP, 2005 y Siller Juárez, 2012. ....	5
FIGURA 4 Tipos de flavonoides (Tomado de Bacca Erazo, 2012). ....	7
FIGURA 5 Tipos de Sapogeninas (Sparg <i>et al.</i> , 2004).....	8
FIGURA 6 Ciclo de vida del camarón peneido (Tomado de Treece & Yates, 1993). 10	
FIGURA 7 Ubicación de la glándula digestiva del camarón. Adaptada de Bell y Lightner, 1988 .....	11
FIGURA 8 Estimulación de la PFO. Adaptado de Vargas-Albores <i>et. al.</i> , 1998.....	14
FIGURA 9 Metodología general .....	25
FIGURA 10 Liofilización de los extractos de guishe. ....	27
FIGURA 11 Cromatógrafo líquido acoplado a analizador de tiempo de vuelo. ....	27
FIGURA 12 Determinación de humedad de los extractos de guishe. ....	29
FIGURA 13 Extrusor utilizado para comprimir el alimento. ....	31
FIGURA 14 Esquema experimental para el bioensayo preliminar. ....	32
FIGURA 15 Disposición de los estanques 61-72 durante el bioensayo preliminar....	33
FIGURA 17 Distribución de los estanques durante el reto microbiano.....	36
FIGURA 18 Espectrofotómetro multiescaneo.....	37
FIGURA 19 Inyección de solución Davidson al camarón. ....	38

FIGURA 20 Conservación en Davidson hasta su preparación para histología. ....	39
FIGURA 21 Fragmentos de diosgenina del estándar en el minuto 9.6.....	43
FIGURA 22 Espectro de masas del extracto crudo hasta los 10.5 minutos .....	44
FIGURA 23 Fragmentos de quercitina en el estándar en el minuto 5. ....	45
FIGURA 24 Consumo total por organismo por tratamiento.....	46
FIGURA 25 Ganancia en peso promedio por tratamiento.....	47
FIGURA 26 Tasa de crecimiento específico por tratamiento.....	48
FIGURA 27 Tasa de conversión alimenticia.....	49
FIGURA 28 Supervivencia promedio de cada tratamiento .....	50
FIGURA 29 Oscurecimiento progresivo del estanque 103 durante el bioensayo.....	50
FIGURA 30 Color inicial y final del agua en el estanque 62 durante el bioensayo....	51
FIGURA 31 Concentración semanal de amonio.....	52
FIGURA 32 Concentración en la primera y última semana de nitritos .....	52
FIGURA 33 Concentración en la primera y última semana de nitratos .....	53
FIGURA 33 Corte longitudinal de glándula digestiva (tratamiento C3,20X). ....	54
FIGURA 34 Efecto de la dieta en la glándula digestiva.....	55
FIGURA 35 Distribución de los tratamientos para el bioensayo final. ....	56
FIGURA 36 Ganancia en peso al final de 35 días.....	56
FIGURA 38 Tasa de crecimiento específico del segundo bioensayo .....	57
FIGURA 38 Resultados del consumo total por organismo en el segundo bioensayo	58
FIGURA 41 Resultados de expresión de fenol y profenol oxidasa .....	58

## INTRODUCCIÓN

México es conocido por sus agaves, sobre todo el *Agave tequilana* que es utilizado para la fabricación de tequila, bebida representativa de nuestro país, sin embargo existen también otros géneros de agaves para la producción de pulque (*Agave samilana*) y mezcal (*Agave weberi*). De la misma manera, también se aprovechan los agaves para la obtención de fibras, ejemplo de estos, son el *Agave fourcroydes*, cultivado principalmente en la península de Yucatán y Quintana Roo, del cual se obtiene henequén, una fibra dura utilizada para fabricar cordones y alfombras; y el *Agave lechuguilla* Torrey del cual se obtiene ixtle, una fibra que se exporta para la fabricación de cepillos industriales en países como Alemania, Estados Unidos, Holanda, Suiza, Japón y Gran Bretaña (Siller Juarez *et al.*, 2014). Con respecto a la obtención de ixtle y para cubrir su demanda; en diferentes municipios de los estados de Coahuila, Durango, Nuevo León y Zacatecas se dedican al aprovechamiento del *Agave lechuguilla*, tallando manual o mecánicamente sus hojas. Esta actividad genera un subproducto de aproximadamente 80% del peso de las hojas de lechuguilla y recibe el nombre de guishe. El guishe de lechuguilla ha dejado de ser considerado un subproducto sin uso biotecnológico, debido a que se han aislado fitoquímicos con valor farmacéutico (Sidana, *et al.*, 2016; Carmona *et al.*, 2017).

Entre las moléculas más atractivas para el sector industrial reportadas en el guishe se encuentran las saponinas, que son metabolitos secundarios que poseen una estructura anfipática, donde la parte hidrofílica la conforma una o más cadenas de azúcares y la aglicona (genina) lipofílica llamada sapogenina. La sapogenina es un precursor esteroidal. Además, las saponinas poseen aplicación como espumante, bactericida, aditivo alimenticio para la ganancia de peso en rumiantes y peces, así como su actividad para remover metales y otros contaminantes del agua (Romero González *et al.*, 2006). El guishe es una materia prima económica, para la cual es necesario encontrar aplicaciones de uso integral en la industria, ya que ordinariamente, el desecho de guishe es considerado tóxico debido al

crecimiento bacteriano producto de la fermentación del bagazo, y por su contenido de saponinas (Podololak *et al.*, 2010).

Adicionalmente, en estudios recientes se reportó que el guishe tiene capacidad antioxidante debido a la presencia de fenoles. La búsqueda de compuestos fenólicos en el *Agave lechuguilla* se inició debido a la presencia de estas moléculas en otras agaváceas como *A. sisalana*, *A. durangensis*, *A. americana* entre otras (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013).

Por tal motivo, considerando el valor nutricional de las moléculas contenidas en el residuo, el presente proyecto de maestría evaluó el efecto del extracto de guishe en el sector acuícola, específicamente como aditivo alimenticio para camarón blanco (*Litopenaeus vanamei*), esta especie de camarón es la más utilizada para la camaronicultura por su adaptabilidad a salinidades y temperaturas variables. Así pues se buscó una utilidad al extracto guishe en el sector acuicultor, específicamente la camaronicultura, para incrementar la calidad, salud y peso de los cultivos. Adicionalmente, con base a los reportes que existen de las saponinas para la mejora de la calidad de agua, y conociendo que están en el residuo, se analizó la calidad de agua en el cultivo de camarones como efecto del extracto adicionado.

## 1. ANTECEDENTES

Las Agaváceas son una especie de plantas monocotiledóneas características de nuestro país, se han registrado 288 especies, 166 de las cuales son magueyes, agrupados en el género *Agave*. En México se han encontrado 125 especies de agaves, que representan el 75% del total mundial. Se desarrollan sobre todo en suelos semiáridos y en función de su uso pueden ser utilizados para la fabricación de bebidas fermentadas (pulque), para la producción de bebidas destiladas (mezcal) y para la producción de fibras como son el henequén y el ixtle (Cervantes Ramírez, 2002).

### 1.1. *Agave lechuguilla* Torrey

El *Agave lechuguilla* Torrey, normalmente tiene altura de 70 cm y ancho de 40 cm, con raíces de 8 a 12 cm de profundidad. En los estados de Durango, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, San Luis Potosí e Hidalgo se aprovecha para la obtención de ixtle, una fibra de alta resistencia que se exporta a países como Estados Unidos, Suiza, Japón, Holanda, Alemania y Gran Bretaña, en donde se usa para la fabricación de cepillos industriales y brochas para maquillaje o la manufactura de artesanías como sandalias, bolsas, etc (Reyes Agüero *et al.*, 2000).



FIGURA 1 Distribución natural de *Agave Lechuguilla*.



El proceso de obtención del ixtle implica la selección y corte de las hojas de lechuguilla por los campesinos, el tallado de las hojas puede ser de manera manual o mecánica y de ello resulta un 15% de ixtle y el 85% restante es un subproducto de desecho llamado guishe. En el año 2009 se obtuvieron aproximadamente 147 mil toneladas de este subproducto a nivel nacional (Integradora de ixtleros de Zacatecas S.A. de C.V., 2009).

## **1.2. Guishe**

La palabra guishe también conocida por su origen otomí como guixi o guizo (Santamaría, 1992); alude al jugo crudo de la lechuguilla. El escozor que provoca el guishe es debido principalmente a la presencia de oxalato de calcio (Varela Maldonado *et al.*, 2006), aunque también se atribuye a la presencia de saponinas en la planta, estas saponinas anfipáticas debido a su propiedad detergente causan daños en la piel. (Cervantes Dueñas, 2016) Sin embargo, el indicio de la presencia de saponinas ha hecho que al guishe ya no sea considerado un desecho peligroso, sino una fuente de precursores esteroidales, con propiedades anti fúngicas, bioadsorbentes, anticancerígenas y también como aditivo alimentario (Sidana *et al.*, 2016).



FIGURA 2 Fibras de ixtle (Tomado de Sánchez, 2017).

## ANTECEDENTES

Las saponinas no son los únicos compuestos de interés que se encuentran en las hojas, pues también se han encontrado compuestos fenólicos en el extracto del guishe y el residuo con menor proporción. Los compuestos fenólicos le confieren actividad antioxidante. Con todo esto, se puede decir que en los agave se encuentran, triterpenos, precursores de esteroides (Ontiveros Floriano *et al.*, 2017), flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas volátiles, azúcares reducidos (Ahumada Santos *et al.*, 2013). Además de que se ha hecho un desglose de los 24 fenoles encontrados en las hojas de *Agave lechuguilla*, de los cuales se reportaron siete flavonoles (mayoritariamente quercitina-3-O-glicosidos, pero también un kaempferol-3-O-glicosido); además de una flavona; siete dihidroflavonoides; y cinco ácidos fenólicos (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013).

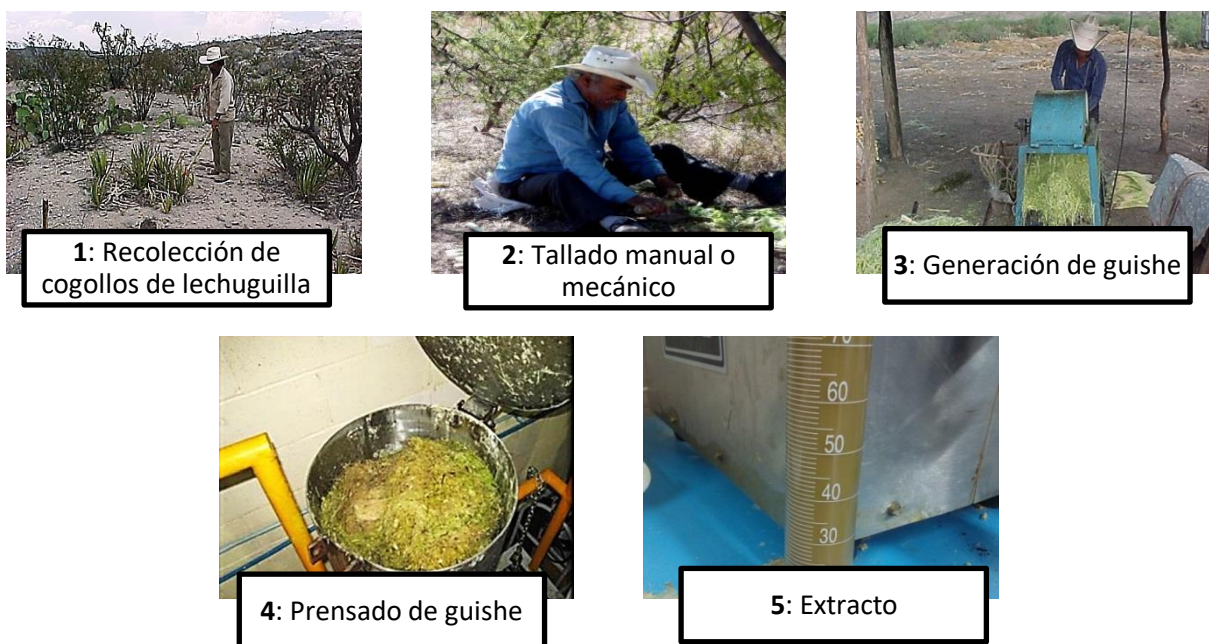


FIGURA 3 Esquema de obtención del extracto de guishe. Imágenes adaptadas de INIFAP, 2005 y Siller Juárez, 2012.

## ANTECEDENTES

Siller y colaboradores recolectaron muestras de guishe en el Ejido El Porvenir, Parras de la Fuente (PF) y en el Ejido Buñuelos, Saltillo (BS) en los meses de Marzo y Junio; ellos realizaron un prensaron y obtuvieron el extracto líquido de guishe, en la tabla 1 se presentan los resultados del análisis fisicoquímico realizado a las muestras.

Los resultados mostraron que la humedad disminuye en el mes de junio debido a que el clima es más seco; Así mismo la humedad de las muestras es proporcional a la concentración de carbohidratos, debido a que los azúcares son solubles en agua. El contenido de saponinas en los extracto fue mayor en los meses de Junio, el mes más seco, El Porvenir presentó una concentración de saponinas en el mes de junio de 98.43 g/L y Buñuelos una concentración de 23.76 g/L.

TABLA 1 Análisis fisicoquímico del *guishe* en dos comunidades distintas en Marzo y Junio. Adaptado de Siller et al., 2015

Parámetros (%)	PF Marzo	PF Junio	B Marzo	B Junio
Total de materia seca	21.58	29.78	26.23	37.43
Humedad	78.42	70.22	73.77	62.57
Cenizas	3.93	4.68	6.25	7.22
Fibra cruda	1.64	1.47	1.94	1.64
Extracto etéreo	0.5	0.51	0.29	0.37
Proteína	0.57	0.49	0.44	0.52
Carbohidratos	24.88	15.83	9.52	7.52

### 1.3. *Compuestos fenólicos*

Los flavonoides son un grupo de fitoquímicos que se han reportado presentes en el guishe, formados por dos anillos aromáticos unidos mediante una cadena de tres átomos de carbono (compuestos  $C_6C_3C_6$ ), su biosíntesis parte del ácido shikímico y de la acetil-coenzima A vía malonil-CoA.

Son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto libres como o-glicósidos o c-glicósidos, éstos últimos son los responsables de muchas coloraciones de las flores, frutos y hojas, además pueden presentar actividades biológicas de importancia.

Los flavonoides, son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto; de donde, el anillo A proviene de la ruta de la malonil-CoA y el anillo B proviene de la ruta del ácido shikímico. Un tricétido se cicla y se condensa en una molécula de ácido p-cumárico, véase figura 4. La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonil-CoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavononas.

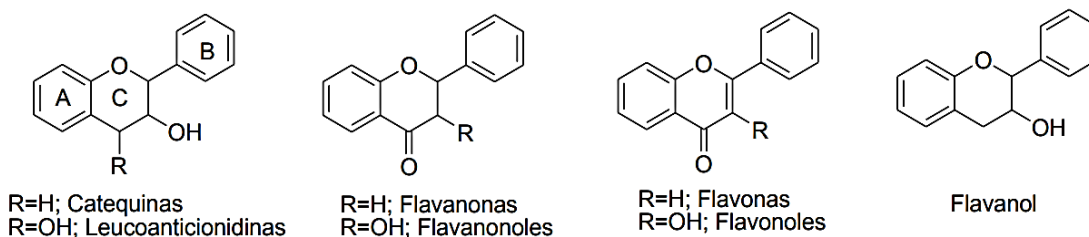


FIGURA 4 Tipos de flavonoides (Tomado de Bacca Erazo, 2012).

### 1.4. Saponinas

Los compuestos de mayor interés que se han encontrado en el guishe son las saponinas, que son glicósidos de alto peso molecular que pueden tener más de una cadena de azúcares unidas a una aglicona o sapogenina que a su vez puede ser triterpénica o esteroidea. Algunos de los monosacáridos más comunes son glucosa, galactosa, ácido D-glucorónico, D-galacturónico (GalA), L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-fucosa (Özlem y Mazza, 2007). Los agaves utilizan las saponinas para protegerse de los depredadores como gusanos o insectos. Con respecto a su uso industrial son precursoras de hormonas esteroidales, además de ser utilizada en la biorremediación de aguas, como biocidas o para mejorar la ganancia de peso de animales rumiantes o marinos (Carmona *et al.*, 2017).

En la figura 5 se muestran los distintos tipos de sapogeninas; a) esteroidales espirostanos, b) esteroidales furostanos y, c) saponinas triterpenoides. La letra R indica un grupo azúcar (Sparg *et al.*, 2004). En las hojas de *Agave lechuguilla* se pueden encontrar saponinas esteroidales tipo espirostanos y furostano.

Debido a que las saponinas son compuestos polares, deben ser extraídas de la matriz vegetal con compuestos igualmente polares, algunos de los solventes más utilizados son etanol, metanol y metanol acuoso (Santos Zea *et al.*, 2016).

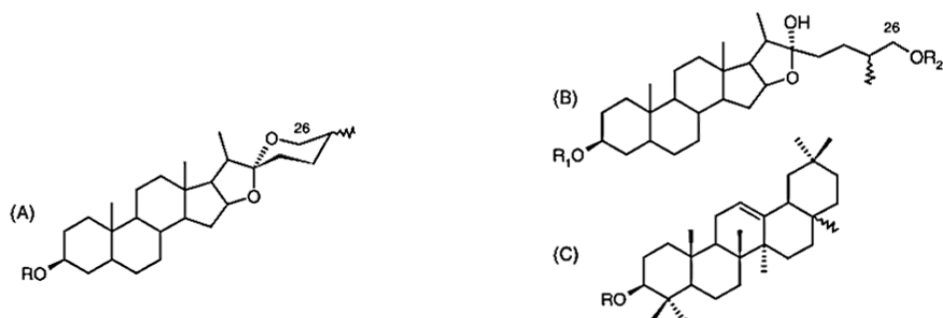


FIGURA 5 Tipos de Sapogeninas (Sparg *et al.*, 2004).

## ANTECEDENTES

Algunas de las plantas para alimentación humana que contienen saponinas son: soya, chícharos, cacahuates, frijoles, lentejas espinacas, avena, espárragos, ajo, pimientos, papas, tomates y cebollas, entre otros. Las saponinas son ricas en propiedades farmacéuticas y recientemente muchos estudios se centra en la capacidad de las saponinas para aumentar la respuesta inmune y la posesión de propiedades antibacterianas, antioxidantes, anticancerígenas, antidiabéticas y anti obesidad (Siller Juárez, 2012).

En 1962 Wall y colaboradores identificaron que las siguientes saponinas; esmilagenina, gitogenina, manogenina y hecogenina. La esmilagenina fue la saponina sobresaliente debido a que puede obtenerse de ella cortisona, que es una horma esteroideal que se utiliza como antiinflamatorio y en el tratamiento de la artritis.

### **1.5. Camarón Blanco del Pacífico**

En México la acuicultura tuvo en los años de 1970 a 1987 un desarrollo cualitativo y cuantitativo con la inserción de nuevas tecnologías y la transición de la etapa de extensionismo a la utilización de sistemas de cultivo intensivos y semi-intensivos. La camaronicultura a gran escala creció en México a finales de los 90's con camarón azul del Pacífico (*Litopenaeus stylirostris*); sin embargo entre 1998-99, una cepa mutante del Síndrome de Taura Virus (TSV) afecto gravemente las granjas de camarón. Por tal motivo se optó por cultivar camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, que en México tiende a ser más tolerante a infecciones TSV (Camproduce a.c., 2009). En la figura 6 se presenta el ciclo de vida del camarón blanco, en su estado de postlarva los camarones peneidos tiene mayor resistencia a los cambios de temperatura y salinidad de su medio, así el estado de postlarva es la mejor edad para someterlos a un régimen de dieta experimental, además, puede conocerse en menor tiempo su tendencia de crecimiento, a diferencia de la etapa adulta, donde la ganancia de peso es más lenta (FAO, 1988).

## ANTECEDENTES

Para realizar el estudio adecuado del camarón blanco en estanques controlados es necesario conocer los parámetros físicos óptimos en los que se desarrollaran. De tal manera que no se vea afectado el experimento por su ambiente y los resultados de la experimentación sean solo consecuencia de la dieta. Las condiciones de óptimas para el crecimiento del camarón son: temperatura 28°C, fotoperiodos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, los niveles de nitrógeno en el medio deben ser de muy bajos a inexistentes. El contenido promedio en el mar es: 0.02-0.04 mg/L (ppm), NH<sub>4</sub>-N = ion amonio (nitrógeno total), 0.01-0.02 mg/L (ppm) NO<sub>2</sub>-N (nitrito), 0.1-0.2 mg/L (ppm) NO<sub>3</sub>-N (nitrato) (Treece G. , 2000).

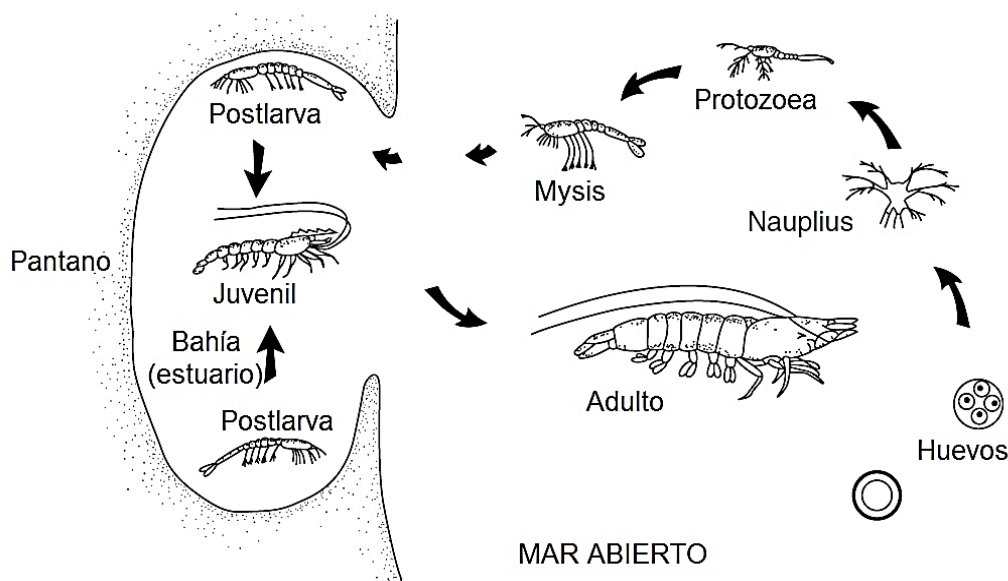


FIGURA 6 Ciclo de vida del camarón peneido (Tomado de Treece & Yates, 1993).

### 1.6. *Glándula digestiva del camarón blanco*

Las funciones del tracto digestivo de los crustáceos son ingestión, transporte de ingesta, digestión, absorción, almacenamiento de nutrientes, transporte de nutrimentos a los vasos circulatorios y finalmente excreción de desecho al medio (Ayala Borboa, 2014).

## ANTECEDENTES

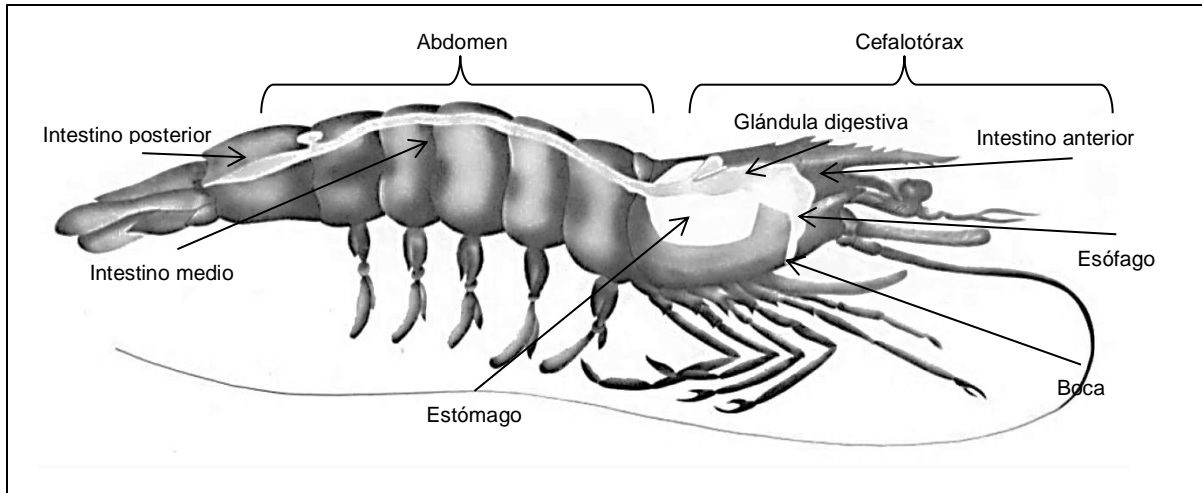


FIGURA 7 Ubicación de la glándula digestiva del camarón. Adaptada de Bell y Lightner, 1988

El tracto se subdivide en cinco partes: boca, esófago, estómago, glándula digestiva e intestino (anterior, medio y posterior) (Ceccaldi, 1989). La glándula digestiva del camarón es conocida también con el nombre de hepatopáncreas y se encuentra en el cefalotórax, en la parte superior de la cabeza, como se muestra en la figura 7. En ella se producen enzimas digestivas, y en los crustáceos, la glándula, reabsorbe los alimentos digeridos (van Weel, 1974). Alrededor de cada conducto de la glándula digestiva hay finas fibras circulares y longitudinales, que son responsables del movimiento del líquido y las células por todo el órgano. Cada conducto, vacía en el estómago las secreciones producidas por la glándula y luego vuelve a llenarse con los alimentos que serán absorbidos. Estas fibras musculares permiten movimientos peristálticos y longitudinales de cada conducto, que tienen lúmenes de pequeñas dimensiones (Ceccaldi, 1989).



**1.7. Mecanismos de inmunidad del camarón blanco**

Los camarones no poseen un sistema inmune como los mamíferos, no poseen inmunoglobulinas, difieren también en que tienen un sistema circulatorio abierto o semi-abierto y se protegen con la ayuda de moléculas efectoras en mecanismos de inmunidad que ocurren en el tejido fluido denominado hemolinfa. (Suárez Gómez, 2008).

En la respuestas inmune de los crustáceos se distinguen efectores celulares y humorales, que actúan en conjunto para proteger al huésped una vez que el invasor ha sobrepasado la barrera fisicoquímica de la cutícula; los mecanismo de inmunidad se resumen en la tabla 2 (Carreño Mejía, 2009).

TABLA 2 Mecanismo de inmunidad en los camarones.

<b>Mecanismos de inmunidad</b>	<b>Tipo de célula que participa</b>	<b>Patógeno que se elimina</b>
Sistema de la profenoloxidasa	Semigranulocitos, hemocitos con gránulos grandes y refráctiles	Bacterias y hongos
Fagocitosis	Hialinocitos Semigranulocitos	Bacterias y microorganismos < de 10 µm
Encapsulación	Semigranulocitos Hemocitos con gránulos	Bacterias y levaduras Organismos > 10 µm grandes y refráctiles (ej. Nematodos)

(Lorena Vázquez, 1998)

### 1.7.1. Hemolinfa

La hemolinfa es la vía por donde se transportan nutrimentos, excretas, oxígeno, hormonas y otras moléculas importantes a los órganos del camarón. Está compuesta por una fracción celular, representada por los hemocitos y por una fracción líquida constituida por el plasma que contiene diferentes factores humorales (Suárez Gómez, 2008).

En el camarón se han reportado tres tipos de hemocitos, tal como se resumen en la tabla 3 (Suárez Gómez, 2008):

- a) Células hialinas: 80% de la hemolinfa. Son pequeñas con un núcleo grande y muy poco citoplasma.
- b) Células semigranulares: 10-13% de la hemolinfa. Más grandes que las hialinas, con presencia de algunos gránulos, sus núcleos son proporcionalmente más pequeños.
- c) Células granulares: 4-10% de la hemolinfa. Son más grandes que las semigranulares y por su gran contenido de gránulos, son más refringentes bajo el microscopio.

TABLA 3 Funciones de los hemocitos, tomado de Suárez Gómez, 2008.

Tipo de hemocito	Función en inmunidad
C. Hialinas	Fagocitosis
C. Semigranulares	Encapsulación Fagocitosis (limitada) Almacenamiento y liberación del sistema PFO Citotoxicidad
C. Granulares	Almacenamiento y liberación del sistema PFO Citotoxicidad

### 1.7.2. Sistema Profenoloxidasa

El sistema de la profenoloxidasa es parte de la respuesta humoral de los crustáceos, específicamente de la melanización, la cual está regulada por una cascada de reacciones enzimáticas que se activa con la presencia de componentes microbianos (Carreño Mejía, 2009).

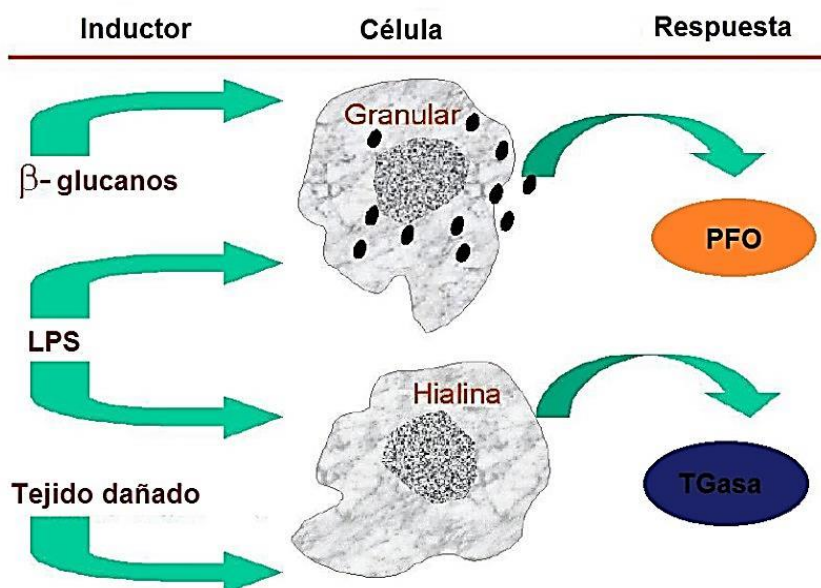


FIGURA 8 Estimulación de la PFO. Adaptado de Vargas-Albores *et. al.*, 1998.

La fenoloxidasa (FO) en los crustáceos está localizada dentro de los hemocitos granulares como una pro-enzima inactiva llamado profenoloxidasa (PFO) y su transformación a de PFO a FO involucra diferentes reacciones que se conocen como activación del sistema PFO, tal como se muestra en la figura 8. En los camarones la PFO se realiza en dos pasos. El primer paso es la degranulación, que ocurre cuando los hemocitos granulares son estimulados por una bacteria, como los lipopolisacáridos o β-glucanos en su membrana, y las formas inactivas de PFO y la enzima serina proteasa son liberadas. El segundo paso requiere la participación de Ca<sup>2+</sup> para la conversión de la forma inactiva de serina proteasa a su forma activa, y

## ANTECEDENTES

entonces transformar la PFO a la forma activa de PO. Esto sucede in vivo solo después de la degranulación por estimulación externa. (Vargas Albores *et al.*, 1998).

### 1.8. Dietas experimentales estudiadas en camarón blanco.

Debido a que la acuicultura está muy poco tecnificada, ya que de lo contrario los costos comerciales aumentarían, se ha buscado que los cultivos sean beneficiados en su crecimiento e inmunidad durante la alimentación; por ello se han realizado diferentes estudios cambiando los ingredientes en la dieta para los camarones, desde cambiar la fuente de proteína hasta agregar adicionalmente una fuente extra para la alimentación del camarón.

TABLA 4 Resultados zootécnicos de Ayala Borboa en 2015.

	HP	HL
Supervivencia	99.4 %	99.4 %
Peso final	2.66 g	4.05 g
Ganancia en Peso	2.40 g	3.94 g
Alimento Ingerido	127.3 g	171.5 g
FCA	1.80	1.61

En 2015 Ayala Borboa alimentó camarón blanco adicionando a una dieta tradicional harina de langostilla (*Pleuoncodes planipes*); ella realizó un bioensayo de crecimiento con camarones con peso promedio inicial de 0.25 g, los cuales fueron alimentados durante 31 días con dos alimentos: un alimento control con harina de pescado y una alimento con harina de langostilla como sustituto de harina de pescado, los resultados zootécnicos del bioensayo se muestran en la tabla 4.

En 2016 Peña Rodríguez y colaboradores evaluaron cinco dietas experimentales con 40% de proteínas y 11% de lípidos en camarón marrón con un peso inicial de 0.12 g (*Farfantepenaeus californiensis*) durante 8 semanas; la primera dieta (FM) se formuló con un 10% de harina de pescado y sin aceite de pescado, la segunda dieta (FO)

## ANTECEDENTES

contenía 0.5% de aceite de pescado, mientras que la harina de pescado se reemplazó totalmente con harina de subproductos de aves de corral; las dietas tercera (DHA) y cuarta (LO) reemplazaron respectivamente el aceite de pescado con 0.5% de aceite de microalga y 0.5% de aceite de linaza, la quinta dieta (SLO) utilizó harina de soya y gluten de maíz como fuentes principales de proteínas, con un 0.5% de aceite de linaza. Además, una dieta de tipo comercial (Ctrl) incluía 36% de harina de pescado y 1.4% de aceite de pescado (36% de proteína y 7.5% de lípidos).

TABLA 5 Diseño experimental utilizado por Peña Rodríguez y colaboradores para camarón marrón juvenil en presencia o ausencia de la macroalga *Ulva Clathrata*.

Tratamiento	% ración de dieta	Presencia de <i>Ulva</i>
Ctrl A	100	No
Ctrl B	50	Si
FM	50	Si
FO	50	Si
DHA	50	Si
LO	50	Si
SLO	50	Si
UC	0	Si

El diseño experimental se muestra en la tabla 5; en total ellos aplicaron ocho tratamientos de alimentación: camarones alimentados con una dieta Ctrl a saciedad (100% de ración de alimento granulado: Ctrl A); camarones alimentados a saciedad con una proporción del 50% de la dieta Ctrl (Ctrl B), FM, FO, DHA, LO o SLO en presencia de una macroalga, *Ulva* fresca (*Ulva clathrata*); y finalmente, camarones alimentados solo con macroalga (UC).

Los resultados zootécnicos de peso final, ganancia de peso, velocidad específica de crecimiento, tasa de conversión alimenticia, tasa de eficiencia proteica y

## ANTECEDENTES

supervivencia se muestran en las tablas 6 y 7, donde puede verse la necesidad de administrar a los camarones un alimento formulado, ya que al tratamiento que fue alimentado únicamente con la macroalga tuvo el menor crecimiento de los organismos, además de tener el menor porcentaje de supervivencia para dicho tratamiento.

TABLA 6 Resultados zootécnicos obtenidos por Peña Rodríguez y colaboradores

Tratamiento	FW (g)	WG (%)	SGR (%/día)
Ctrl A	1.83 ± 0.19 <sup>d</sup>	1401 ± 151 <sup>d</sup>	4.83 ± 0.18 <sup>de</sup>
Ctrl B	1.72 ± 0.10 <sup>cd</sup>	1328 ± 84 <sup>cd</sup>	4.74 ± 0.10 <sup>cde</sup>
FM	1.74 ± 0.21 <sup>cd</sup>	1342 ± 165 <sup>d</sup>	4.76 ± 0.21 <sup>cde</sup>
FO	1.43 ± 0.12 <sup>b</sup>	1076 ± 83 <sup>b</sup>	4.40 ± 0.13 <sup>bc</sup>
DHA	1.48 ± 0.11 <sup>bc</sup>	1119 ± 90 <sup>bc</sup>	4.46 ± 0.13 <sup>bcd</sup>
LO	1.34 ± 0.16 <sup>b</sup>	1011 ± 120 <sup>b</sup>	4.29 ± 0.19 <sup>b</sup>
SLO	1.88 ± 0.15 <sup>d</sup>	1458 ± 129 <sup>d</sup>	4.90 ± 0.14 <sup>e</sup>
UC	0.47 ± 0.09 <sup>a</sup>	284 ± 81 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.40 <sup>a</sup>

El control A, que era solo alimentado con una dieta comercial tuvo muy buenos resultados, esto indica que una dieta a base de pellets con las vitaminas, minerales y proteínas necesarias es suficiente para una ganancia de peso favorable; sin embargo, la dieta que presento mayor ganancia de peso fue la que tuvo 50% de macroalga y 50% de un alimento con harina de soya y gluten de maíz (SLO); esto significa que adicionar a la dieta un prebiótico como es el caso de la macroalga provoca un efecto positivo.

ANTECEDENTES

TABLA 7 Resultados zootécnicos obtenidos por Peña Rodríguez y colaboradores

Tratamiento	FCR	PER	Supervivencia (%)
Ctrl A	1.83 ± 0.19 <sup>d</sup>	1.55 ± 0.05 <sup>a</sup>	93 ± 6
Ctrl B	0.98 ± 0.06 <sup>ab</sup>	2.87 ± 0.08 <sup>c</sup>	87 ± 12
FM	0.96 ± 0.12 <sup>ab</sup>	2.66 ± 0.11 <sup>c</sup>	90 ± 10
FO	1.20 ± 0.11 <sup>cd</sup>	2.1 ± 0.03 <sup>b</sup>	93 ± 12
DHA	1.15 ± 0.10 <sup>bcd</sup>	2.2 ± 0.18 <sup>b</sup>	90 ± 10
LO	1.28 ± 0.15 <sup>d</sup>	2.0 ± 0.18 <sup>b</sup>	93 ± 6
SLO	0.86 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.10 <sup>c</sup>	93 ± 6
UC	-	-	87 ± 12

Por otro lado, no existen estudios sobre dietas alimenticias para camarón blanco con extracto de agave lechuguilla Torrey, sin embargo, Martínez Córdova y colaboradores en 2007 presentaron un estudio realizado en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), donde adicionaron un extracto comercial de *Yucca schidigera*, esta planta al igual que el agave lechuguilla Torrey pertenece a la familia de las asparagáceas.

Martínez Córdova y colaboradores utilizaron un extracto con el nombre comercial de BioAqua®, evaluaron parámetros de calidad de agua (OD, pH, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub>, NAT y MO) y zootécnicos (crecimiento, supervivencia, biomasa y FCA). El bioensayo duró 16 semanas en estanques de 4.2 m<sup>3</sup> con 100 juveniles por estanque, el peso inicial fue de 2 ± 0.2 g, utilizaron un sistema de bajo recambio de agua, administraron el alimento dos veces al día, ajustando la ración de acuerdo al consumo aparente.

ANTECEDENTES

TABLA 8 Resultados de concentración de nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal total después de 16 semanas reportados por Martínez Córdova y colaboradores

	0 g/kg	1 g/kg	2 g/kg	3 g/kg
N-NO <sub>2</sub> (mg/L)	0.011 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.010 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.012 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.006 ± 0.001 <sup>a</sup>
N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	0.99 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.16 <sup>a</sup>
TAN (mg/L)	0.135 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.033 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.035 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.013 ± 0.008 <sup>a</sup>

El equipo de investigación de Martínez no encontró diferencias significativas en la concentración final de nitritos y nitratos para ningunos de los tratamientos, sin embargo, con respecto al nitrógeno total encontraron una concentración alta para el tratamiento testigo, tal como se muestra en la tabla 8.

TABLA 9 Valores medios zootécnicos reportados por Martínez Córdova y colaboradores al finalizar su bioensayo de 16 semanas.

	0 g/Kg	1 g/kg	2 g/kg	3 g/kg
Peso final (g)	13.1 ± 1.0 <sup>ab</sup>	12.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	14.9 ± 0.5 <sup>b</sup>	11.7 ± 1.4 <sup>a</sup>
Peso ganado (g)	11.6 ± 1.3 <sup>ab</sup>	11.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	13.50 ± 0.26 <sup>b</sup>	10.5 ± 1.2 <sup>a</sup>
Supervivencia (%)	62 ± 17 <sup>a</sup>	71 ± 21 <sup>bc</sup>	67 ± 6 <sup>ab</sup>	95 ± 5 <sup>c</sup>
Alimento consumido (kg)	1907 ± 131 <sup>ab</sup>	1965 ± 90 <sup>ab</sup>	2078 ± 26 <sup>b</sup>	1738 ± 17 <sup>a</sup>
Biomasa final (kg)	819 ± 282 <sup>a</sup>	877.4 ± 228 <sup>a</sup>	1001 ± 49 <sup>a</sup>	1117 ± 151 <sup>a</sup>
FCA	2.32 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.23 ± 0.6 <sup>b</sup>	2.07 ± 0.2 <sup>ab</sup>	1.55 ± 0.2 <sup>a</sup>

Los resultados de los parámetros zootécnicos terminadas las 16 de semanas se muestran en la tabla 9, el mejor tratamiento fue el que tuvo un 0.2% de extracto de *Yucca schidigera*, el porcentaje de supervivencia de los cuatro tratamientos es aceptable para las granjas de tipo comercial.



## ANTECEDENTES

La concentración de 0.3 % presentó una disminución del crecimiento de los camarones, debido a que es el tratamiento que presenta mayor supervivencia puede asumirse que los camarones dejaron de consumir su alimentos posiblemente por cuestiones de palatabilidad del alimento, lo que resulta en un menor crecimiento del cultivo.

Otro experimento realizado con extracto comercial BIOAQUA® fue utilizado para alimentación de mojarra tilapia (*Oreochromis niloticus* Stirling) por Asiain y colaboradores en 2012, ellos utilizaron dos tanques de concreto de 12 m de diámetro para sembrar 50 organismos por metro cúbico, durante siete meses alimentaron un estanque con alimento comercial y otro con ese mismo alimento enriquecido con 2 kg de BIOAQUA ® por tonelada de alimento. Se alimentaron a saciedad tres veces al día.

TABLA 10 Resultados obtenidos por Asiain y colaboradores en 2012

<b>Parámetro productivo</b>	<b>Control</b>	<b>BIOAQUA</b>
Biomasa total ganada, kg tanque <sup>-1</sup>	3,102	3,510
Sobrevivencia, %	77	87
Meses para cosecha total	8	7
Alimento consumido, kg tanque <sup>-1</sup>	5,388	5,480
A= Costo total del alimento, MX\$ •tanque <sup>-1</sup>	38,793.60	40,004
Precio de venta del pescado, MX\$ • kg <sup>-1</sup>	36.00	36.00
B= Ingresos por ventas, MX\$ •tanque <sup>-1</sup>	149,472.00	167,760.00
B-A= Utilidad bruta asociada al uso del alimento sin considerar otros costos de producción, MX\$ •tanque <sup>-1</sup>	110,678.40	127,756.00
Beneficio económico, MX\$ •tanque <sup>-1</sup>	0.00	17,077.60

## ANTECEDENTES

Los resultados para este bioensayo se presentan en la tabla 10, donde la ganancia de peso es mayor en el estanque al que se le adicionó BIOAQUA® a la dieta, ellos también presentan el beneficio económico de la utilización del producto comercial, que resulta en aproximadamente 17 mil pesos mexicanos.

### **1.9. Biopelículas en la camaronicultura**

El presente estudio contempló dos niveles de recambio de agua, estos es el volumen de agua que deberá retirarse diariamente y sustituirse por volumen de agua de mar filtrada limpia. Estos recambio de agua son indispensables para eliminar niveles de altos de nitrógeno amoniacal; sin embargo podría pensarse que un recambio total de agua sería más eficiente para mantener la limpieza de los estanques, pero no es así, porque realizar grandes recambios de agua diariamente implica un gasto mayor en el consumo de agua de mar filtrada, bombeo y mantenimiento. Por otro lado, un menor recambio de agua permite el crecimiento de microorganismos en las paredes de los estanques, como microalgas, bacterias, protozoarios y hongos, pudiendo tener efectos positivos o negativos, a este crecimiento en las paredes de los estanques se le conoce como biopelícula (Ramesh, *et. al.*, 1999).

Se han reportado que las biopelículas pueden contener hasta un 30% de proteínas y lípidos que incluyen ácidos grasos como HUFA y PUFA, además de ácidos grasos de cadena corta que biocontrolan contra agentes patógenos debido a la producción de polihidroxibutirato que sirve a los camarones como inmunoestimulante (Martínez Córdova, *et al.*, 2011).

La formación de una biopelícula consta de cuatro fases: (1) adsorción de compuestos químicos disueltos (macromoléculas) a las paredes de los estanques; (2) colonización bacteriana, (3) colonización por eucariontes unicelulares y (4)

## ANTECEDENTES

colonización por eucariontes multicelulares (Ciudadano de Whal, 1989 en Martínez Córdova, *et al.*, 2011).

Las bacterias y microalgas de una biopelícula pueden utilizar el alimento no consumido por los camarones del cultivo, por lo que existe un mejor aprovechamiento del alimento y además, disminuye las concentraciones de nitrógeno. Por otro lado se sabe que las biopelículas contienen agentes probióticos que incrementan la actividad de varias enzimas relacionadas con el crecimiento (Martínez Córdova, *et al.*, 2011).

## 2. SINTESIS DE ANTECEDENTES

México es un país productor de fibra lechuguilla (ixtle), el tallado de esta fibra deja toneladas del residuo de sus hojas llamado guishe, recientemente se ha encontrado en el guishe moléculas de interés comercial como saponinas, flavonoides y azúcares. México es también debido a sus amplias costas un país acuicultor, destaca por el cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), debido a que es una especie que se adapta a salinidades y temperaturas fluctuantes, además de presentar una mayor resistencia a diversas enfermedades. Sin embargo, debido a la poca tecnificación de la camaronicultura aún existen pérdidas de cultivos por enfermedades, además de que toda persona dedicada al cultivo del camarón, buscará que estos crezcan más rápido en menos tiempo, a fin de cosechar más veces por año ó vender camarones de mayor tamaño que implican mayor ganancia económica. Convergen entonces, la necesidad de encontrar un uso para el guishe generado por la producción de ixtle y la necesidad de mejorar los cultivos de camarón blanco con muy poca inversión.

Existe en el mercado un extracto de *Yucca Schidigera* con el nombre de BioAqua® que ha sido probado en cultivos de camarón blanco y mojarra tilapia, mostrando efectos positivos durante el cultivo de ambos organismos, generando ganancias económicas para el acuicultor.

Este proyecto estudió el efecto de un extracto de guishe en la ganancia de peso e inmunoestimulación al ser agregado en una dieta tradicional para camarón blanco del Pacífico. Así mismo el cultivo de los camarones se hizo con recambio de agua altos y bajos para conocer sí el extracto en el alimento tiene un efecto sobre la concentración de nitritos, nitratos y amino en los estanques.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. General**

Evaluar el efecto del extracto de guishe como aditivo alimenticio sobre el crecimiento e inmunomodulación en juveniles de camarón blanco.

#### **3.2. Específicos**

- Confirmar la existencia de compuestos de interés en los extractos de guishe usando cromatografía de líquidos acoplada a masas con análisis de tiempo de vuelo.
- Evaluar el efecto de los extractos de guishe en una dieta experimental sobre los parámetros zootécnicos e inmunomodulación del camarón blanco del pacífico.
- Evaluar el efecto de los extractos de guishe en una dieta experimental para camarón blanco sobre la concentración de nitritos, nitratos y amonio.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

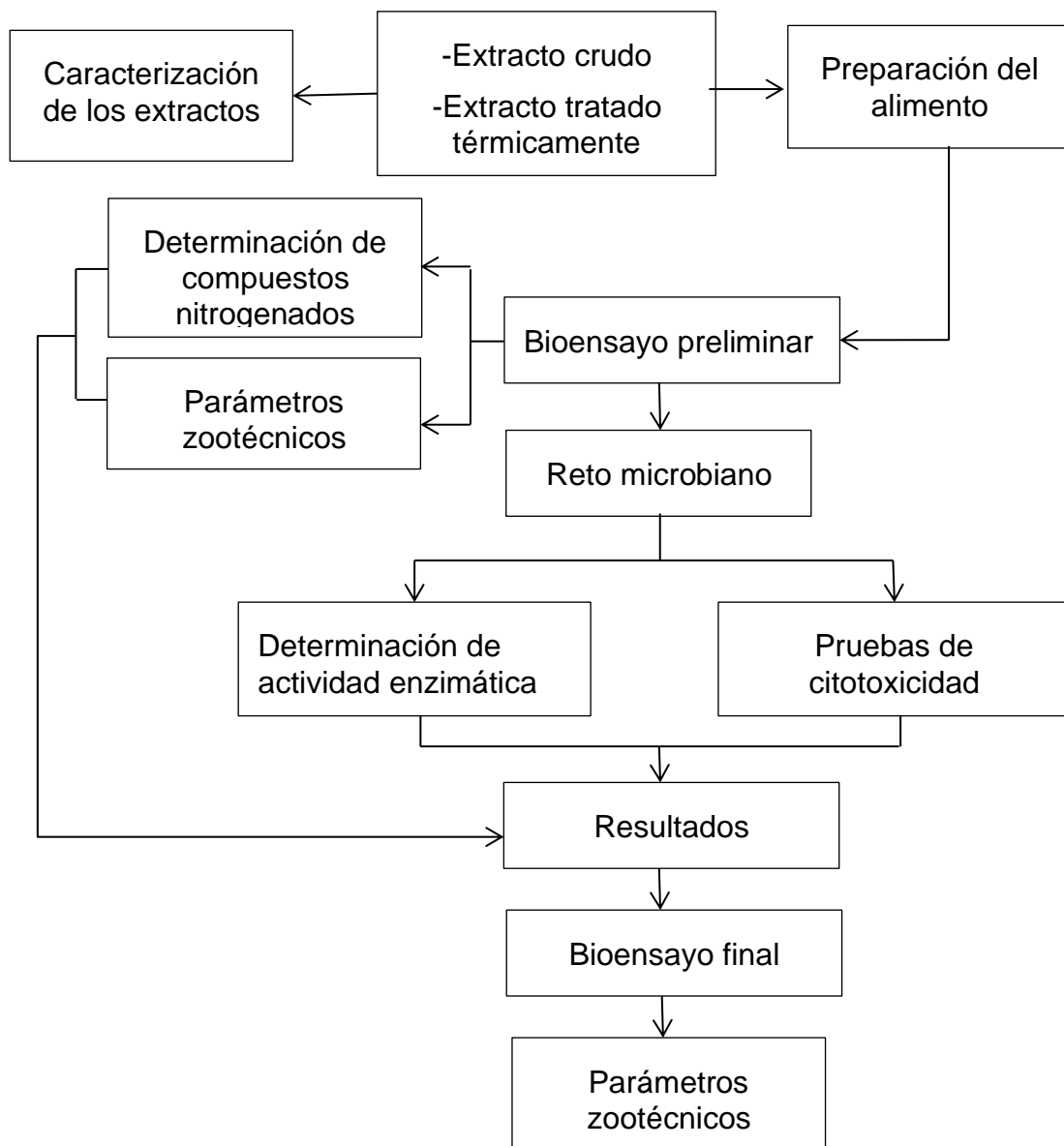


FIGURA 9 Metodología general

#### **4.1. Extractos de guishe**

La empresa Biorganix Mexicana S.A de C.V., proporcionó dos extractos de guishe para el bioensayo. El primer extracto de guishe; es un extracto crudo que se obtuvo por prensado mecánico, a este extracto se asignó la letra C, y el segundo extracto recibió un calentamiento a 80°C por 10 min, a este extracto se le asignó la letra F (extracto final). Ambos extractos se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

#### **4.2. Caracterización de los fitoquímicos en los extractos.**

Para la determinación de compuestos fue necesario preparar las muestras antes de ser medidas al departamento de Tecnología Alimentaria CIATEJ, A.C (Unidad Nuevo León). Los extractos fueron filtrados dos veces, primero, se filtró al vacío con filtro Whatman 52, después en filtros de jeringa de 0.45 µm HPLC.

El primer filtro utilizado para cada uno de los extractos fue sumergido en 10 mL de metanol por 10 horas en refrigeración a 4° C, para posteriormente ser filtrados con filtros jeringas de 0.45 µm. Una vez que se terminó de filtrar el extracto crudo y tratado, se sumergieron en 10 mL de metanol los filtros Whatman con los remanentes sólidos contenidos encima. Posteriormente la extracción metanólica de los sólidos en los filtros Whatman fueron filtrados con filtros jeringa de 0.45 µm. Finalmente se obtuvieron cuatro extractos (extracto crudo; extracto tratado, metanol-extracto crudo, metanol-extracto tratado). .

Las muestras se congelaron a -35° C por 96 h en ultracongelador REVCO, posteriormente se liofilizaron los extractos por 72 en un equipo de liofilización LABCONCO de 2.5 L como se muestra en la figura 10.

## MATERIALES Y MÉTODOS



FIGURA 10 Liofilización de los extractos de guishe.

Los extractos en polvo se caracterizaron en un equipo de cromatografía de líquidos con espectrometría de masas acoplado a análisis de tiempo de vuelo, UHPLC Agilent Technologies 1290 Infinity, y 6530 True High Definition Q-TOF, como se muestra en la figura 11.



FIGURA 11 Cromatógrafo líquido acoplado a analizador de tiempo de vuelo.

Para identificar las moléculas de interés en el espectro de masas, se realizó un resumen como se muestra en la tabla 11; donde se indica el nombre de la molécula y la fórmula química, la  $m/z$  (masa/carga) se calculó con el software *Isotope Distribution Calculator* de Agilent. Además, para conocer los tiempos de retención de los compuestos de interés se contó con dos estándares, diosgenina y quercitina, la diosgenina se utilizó para conocer el rango de tiempo en que aparecerían las saponinas, mientras que la quercitina se utilizó para conocer el rango de tiempo de



los flavonoles. Para la identificación de saponinas se utilizó polaridad negativa, mientras que para los fenoles se utilizó polaridad positiva.

TABLA 11 Lista de masa/carga de los compuestos de interés.

<b>Molécula</b>	<b>Formula química</b>	<b>m/z calculada</b>
Diosgenina diglucosida	$C_{39}H_{62}O_{13}$	739.4263
Diosgenina	$C_{27}H_{42}O_3$	415.3212
Dioscina	$C_{45}H_{72}O_{16}$	869.4899
Progenina III	$C_{39}H_{62}O_{12}$	723.432
Deltonina	$C_{45}H_{72}O_{17}$	885.4848
Progenina II	$C_{39}H_{62}O_{12}$	723.4314
Protodioscina	$C_{51}H_{84}O_{22}$	1031.5427
Esmilagenina	$C_{27}H_{44}O_3$	417.3363
Manogenina	$C_{27}H_{42}O_5$	447.3105
Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	291.0863
Agavegenina	$C_{28}H_{48}O_6$	481.3524
Quercitina	$C_{15}H_{10}O_7$	301.0359

#### **4.3. Evaluación biológica del aditivo alimenticio en el camarón.**

La evaluación biológica del aditivo alimenticio en el camarón se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. (CIBNOR). El bioensayo de crecimiento se realizó durante 29 días para evaluar el efecto de dos extractos de guishe en su crecimiento, uno de los extractos denominado extracto crudo se obtuvo mediante prensado, y el segundo extracto tuvo adicionalmente un tratamiento térmico por 10 minutos 70° C. Se realizaron pruebas en la glándula digestiva y se midió la concentración de compuestos nitrogenados en los estanques durante los 29 días. Para el análisis de los resultados al finalizar el bioensayo se determina la ganancia en peso, conversión alimenticia, velocidad específica de crecimiento (SGR) y la tasa de supervivencia. Para conocer si el extracto añadido en el alimento ocasiona daños en los camarones se realizan estudios de histología en la glándula digestiva, se realizará al finalizar el bioensayo de crecimiento una prueba de reto

microbiano con *Vibrio parahaemolyticus* durante 92 horas para conocer los efectos inmunomoduladores derivados de la alimentación con los extractos.

### 4.3.1. Preparación de las dietas

El alimento para el camarón fue preparado utilizando los porcentajes reportados por Peña-Rodríguez *et al.* (2016). En la primera fase de la preparación de las dietas, se determinó el peso seco del aditivo de los dos extractos de bagazo de guishe.

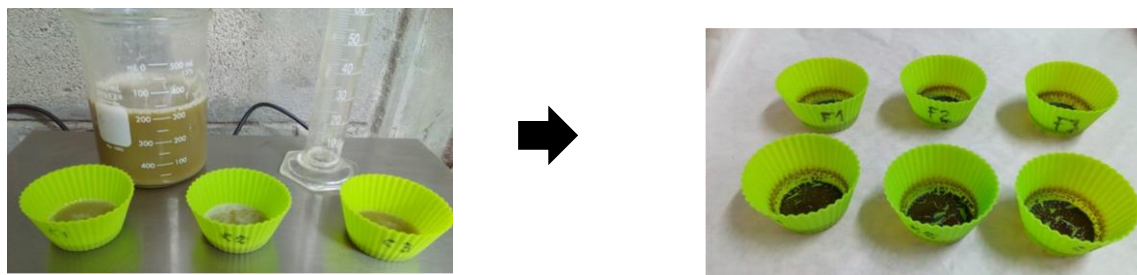


FIGURA 12 Determinación de humedad de los extractos de guishe.

La determinación se hizo por triplicado, se secaron 10 mL de cada uno de los concentrados para la conversión a peso seco. Una vez determinado el volumen con respecto al peso seco determinado; se prepararon 5 dietas experimentales, incluyendo la dieta testigo, los códigos que se presentan en la tabla 12 se explican a continuación, además se agregan al final las letras A ó B que indican un alto recambio de agua (40%) o un bajo recambio de agua (10%) durante el bioensayo de crecimiento respectivamente, estos códigos serán mencionados a lo largo del trabajo: T0 (Alimento control, sin aditivo añadido), C1 (Alimento con 0.1% del extracto de guishe prensado), C2 (Alimento con 0.2% del extracto de guishe prensado), C3 (Alimento con 0.3% del extracto de guishe prensado), F3 (Alimento con 0.3% de extracto tratado térmicamente para inactivación enzimática).

TABLA 12 Perfil nutricional de la dieta utilizada.

<b>Ingredientes (g)</b>	<b>T0</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>F3</b>
Harina de trigo	320	319.2	318.4	397	397
Harina de pescado	160	160	160	200	200
Harina de soya	253.04	253.04	253.04	316.3	316.3
Aceite de pescado (Sardina 69%)	20	20	20	25	25
Lecitina de soya	28	28	28	35	35
Vitaminas y minerales premezcladas.	4.24	4.24	4.24	5.3	5.3
Carboximetilcelulosa CMC	12	12	12	15	15
Vitamina C	0.8	0.8	0.8	1	1
Antioxidante BHT	0.32	0.32	0.32	0.4	0.4
Colina	0.8	0.8	0.8	1	1
Fosfato mono sódico	0.8	0.8	0.8	1	1
Extracto crudo de guishe	0	0.8	1.6	3	
Extracto tratado enzimáticamente	0	0	0	0	3
<b>Total</b>	<b>800</b>	<b>800</b>	<b>800</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

La preparación del alimento para los camarones se hizo en el siguiente orden:

- 1) Tamizado de las harinas (trigo, pescado y soya) en una malla de 425  $\mu\text{m}$  (N°40).
- 2) Pesado de cada uno de los ingredientes como se muestra en la tabla 12.
- 3) Homogenización; empezando con los macro ingredientes (harinas) en una mezcladora de cocina Kitchen Aid MR, St. Joseph, MI, USA.
- 4) Adición de los micro ingredientes; vitaminas, minerales, antioxidante y el ligante (carboximetilcelulosa).
- 5) Después de 15 minutos se mezcló la emulsión compuesta por lecitina, aceite de pescado, extracto de guishe (C ó F) y agua. Estos ingredientes no se agregaron de forma separada al contenedor con la harina para hacer más fácil su manejo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- 6) La masa resultante del mezclado se sometió a extrusión en un molino de carne (Torrey, MJ12, Monterrey, NL., México) con un dado de 2 mm. Como se muestra en la figura 13.



FIGURA 13 Extrusor utilizado para comprimir el alimento.

- 7) La pasta obtenida para los diferentes tratamientos se secó en un horno de calentamiento durante 18 horas a 40°C.

### **4.3.2. Distribución de los experimentos del bioensayo preliminar**

Se evaluaron dos aspectos en esta prueba experimental, primero el crecimiento, utilizando las cinco diferentes dietas (testigo, crudo al 0.1 %, 0.2 % y 0.3 %) y el segundo fue la limpieza de los estanques durante todo el experimento, para ello se utilizó un recambio de agua del 10% (recambio bajo) mientras que en los otros estanques se utilizó un recambio del 60% (recambio alto). Todos los tratamientos se hicieron por triplicado. El esquema de distribución se muestra en la figura 14.

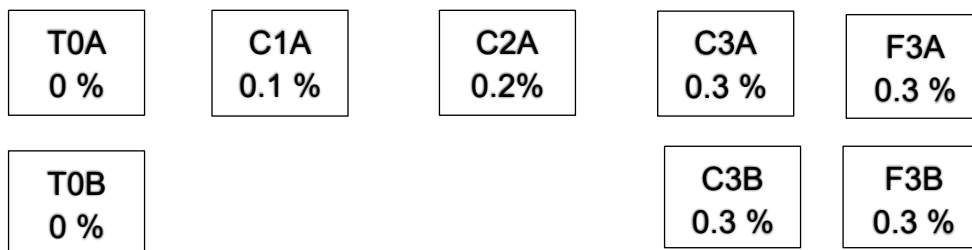


FIGURA 14 Esquema experimental para el bioensayo preliminar.

#### 4.3.3. Bioensayo preliminar con camarón blanco del pacifico

Para el bioensayo de crecimiento preliminar se utilizaron 24 estanques de fibra de vidrio de dimensiones 50x55x38 cm y volumen de 60 litros como se muestra en la figura 15. Cada estanque se equipó con un calentador sumergible de 200 W y malla mosquitera para evitar la fuga de los organismos. Los estanques se abastecieron con agua de mar filtrada y con valores de oxígeno disuelto entre 5 a 6 mg/L. El fotoperiodo artificial fue de 13 horas de luz y 11 horas de oscuridad, controlado por un reloj automático.

Para el bioensayo, se utilizaron juveniles de camarón de la especie *Litopenaeus vannamei* provenientes de la granja Acuicultores de la Península (APSA) ubicada al Norte de la ciudad de La Paz, B.C.S. Antes del bioensayo, se mantuvieron los juveniles por cuatros meses a 20 °C en el Laboratorio de Nutrición Experimental. Al momento del bioensayo, se tomaron camarones aleatoriamente con pesos de entre 0.5 a 0.8 gramos para su correcta distribución en los estanques.



FIGURA 15 Disposición de los estanques 61-72 durante el bioensayo preliminar.

Los camarones fueron alimentados dos veces al día, por la mañana a las 9:00 h y por la tarde a las 14:30 h. Durante el bioensayo, se realizaron tres biometrías, al inicio (para la selección del rango de peso de los camarones), en la etapa media (a las dos semanas) y al finalizar el experimento (cuatro semanas). Una vez terminado el bioensayo se calculó la ganancia de peso. Además de que los camarones fueron transportados en cubetas de 20 L al laboratorio externo de microbiología para las pruebas de reto microbiano (infección experimental).

La forma de calcular los restos diarios de alimento dentro de cada estanque se hizo por observación, se asignaron tres valores según la cantidad de sobras; 0%, 10% y 20%; donde el ideal de restos de alimento a observar era el 10% (valor que indica que el camarón no se ha quedado con hambre), un valor de 0% indicaba que debe aumentarse la dosis de alimento para el siguiente día y un valor de 20% indicaba que la dosis debía disminuir porque los organismos estaban siendo sobrealimentados.

Para evaluar los resultados al final del bioensayo se midieron los siguientes parámetros (Cortés Jacinto, 1998) :

**Tasa de crecimiento absoluta (TCA):** Es el método más simple para reportar crecimiento: se define como el incremento en peso por unidad de tiempo (Hopkins 1992). Se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$TCA = \frac{(P_f - P_i)}{t} \quad (1)$$

donde,

Pf = Peso final.

Pi = Peso inicial.

t = Período de tiempo del cultivo experimental.

Frecuentemente se utiliza la regresión lineal de peso (g) contra tiempo (días) para estimar la velocidad de crecimiento en función de la pendiente en línea.

**Ganancia de peso:** Definido como el aumento de peso que se generó durante el bioensayo. Se obtiene de la siguiente forma

$$Ganancia\ en\ peso = P_f - P_i \quad (2)$$

donde

P<sub>f</sub> = Peso final del camarón.

P<sub>i</sub> = Peso del camarón al inicio del bioensayo.

**Tasa de crecimiento específica (TCE):** La tasa de crecimiento de un animal es un índice sensitivo a la frecuencia alimenticia, denota el crecimiento promedio por día en términos de porcentaje y supone que el incremento en peso es de forma exponencial. Se calcula de la siguiente formula:

$$TCE = \frac{\ln P_t - \ln P_i}{t} \times 100 \quad (4)$$

donde

lnP<sub>t</sub> = logaritmo natural del peso a un tiempo t.

lnP<sub>i</sub> = logaritmo del peso inicial.

**Biomasa (B):** Definido a partir del número de organismos y el peso promedio  $\omega$  (g) de la muestra.

$$B = (\text{No. de organismos}) \times (\varpi) \quad (5)$$

**Tasa de conversión alimenticia:** Definido como la cantidad de alimento (g) seco necesario para que el camarón aumente un gramo en peso húmedo.

$$TCA = \frac{\text{Consumo total (g)}}{\text{Ganancia en peso(g)}} \quad (6)$$

**Tasa de supervivencia:** Es el porcentaje de organismos vivos en un tiempo dado:

$$TS = \frac{\text{Número final de camarones}}{\text{Número inicial de camarones}} \times 10 \quad (7)$$

#### 4.3.4. Infección experimental

Terminadas las cuatro semanas del bioensayo de crecimiento se inició la infección de los camarones con la cepa ATCC 17802 de *Vibrio parahaemolyticus* que fue proporcionada de la colección bacteriana del laboratorio de genómica del Dr. Eduardo Quiroz Guzmán.

Por cuestiones de espacio se realizó el reto con los primeros 4 tratamientos de alto recambio: T0A, C1A, C3A y F3A, posteriormente se infectaron los camarones de los tratamientos C2A, T0B, C3B y F3B, tal como se muestra en la figura 17, que fueron los tratamientos con mayor población al finalizar los 28 días de bioensayo para crecimiento. Se utilizaron 14 camarones por tratamiento, de los cuales 12 fueron infectados y dos camarones fueron testigos sanos.

El tiempo de exposición fue de 96 horas, y se llevó a cabo en el camper aislado del laboratorio de genómica, los camarones estuvieron distribuidos por tratamiento en estanques especializados de 4 y 2 litros de agua de mar filtrada y desinfectada con cloro (posteriormente neutralizada con tiosulfato de sodio anhidro), con 4 y dos camarones respectivamente. Los estanques se acondicionaron previamente a una temperatura de 29°C dentro de una tarja a baño maría con calentadores de agua



## MATERIALES Y MÉTODOS

sumergibles de 200 W, con aeración proporcionada por bombas de acuario pequeñas. Se vació dentro de cada uno de los estanques una solución del microorganismo a una concentración de  $1 \times 10^4$ , en los estanques de 4 litros se vaciaron 30 mL, mientras que en los estanques de 2 litros se vaciaron 15 mL.

Una vez distribuidos e infectados los camarones en sus estanques se alimentaron con un pellet una vez al día para evitar muerte por exceso de nitrógeno generado por los desechos, durante estas 96 horas se monitoreo diariamente la temperatura de los estanques; no hubo recambio de agua, solamente se retiraron las exuvias y camarones muertos.



FIGURA 16 Distribución de los estanques durante el reto microbiano.

Esta se realizó para evaluar la inmunomodulación de los camarones. Debido al espacio pequeño dentro del laboratorio se realizó la infección en dos lotes distintos; primero se infectaron los grupos de camarones que tuvieron menor tasa de supervivencia, que fueron T0A, C1A, C3A y F3A. El segundo grupo se infectó una semana después con los grupos T0B, C2A, C3B y F3B respectivamente, los cuales presentaron una mayor tasa de supervivencia.

#### 4.3.5. Parámetros biológicos de la hemolinfa.

Al terminar las 96 horas de la infección experimental se extrajo la hemolinfa de los camarones con jeringas que contenían anticoagulante (Para una solución de 200 mL: 1.58 g de citrato de sodio, 4.49 g de cloruro de sodio, 4.14 g de glucosa disueltos en 150 mL de agua Milli Q, ajustando el pH a 7.5 y llevando a 200 mL). En seguida se centrifugó y se mantuvo en congelación hasta su uso para la determinación de proteína total, fenol oxidasa y profenol oxidasa.

La determinación de la actividad específica de la fenoloxidasa (FO) se realizó de la siguiente manera:

- 1) Se colocaron 20  $\mu$ L de plasma de camarón y 250  $\mu$ L de L-DOPA (1 mg/mL agua destilada).
- 2) Se dejó incubar por 20 min y leer a 490 nm
- 3) Los valores de absorbancia obtenidos se normalizaron con los valores de proteína.

La determinación de la actividad específica de la profenoloxidasa (PFO) se realizó de la siguiente manera:

- 1) Preparación de solución de tripsina (1 mg/mL agua destilada, "pH 7.0")
- 2) Preparación de microplaca con 20  $\mu$ L de solución de tripsina en cada pozo y dejar secar entre 12 y 24 horas.



FIGURA 17 Espectrofotómetro multiescaneo

## MATERIALES Y MÉTODOS

- 3) Después de secada la tripsina, se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de plasma de camarón y 250  $\mu\text{L}$  de L-DOPA (1 mg/mL agua destilada).
- 4) Se dejó incubar por 20 min y leer a 490 nm.
- 5) Los valores de absorbancia obtenidos se normalizaron con los valores de proteína.

### 4.3.6. Histología

Se realizaron análisis histológicos para conocer el efecto del alimento durante el bioensayo y la infección con la bacteria patógena en los camarones durante el reto microbiano. Para llevar a cabo la fijación se sigue la metodología basada en Howard *et al.*, (2004). Para ello primero se realizó la fijación de los organismos, para evitar la descomposición de los órganos y tejidos; la fijación se realizó inyectando solución Davidson detrás de la cabeza, en el segmento entre el cefalotórax y el abdomen, así como se muestra en la figura 19.



FIGURA 18 Inyección de solución Davidson al camarón.

La composición de la solución se detalla en la tabla 5. Se utilizó una solución Davidson con agua marina sin ácido acético, para la preservación de los camarones, ya que los organismos no se lavaron con alcohol durante las siguientes 48 horas, debido a que debían reunirse las muestras de organismos sanos y enfermos para ser analizadas en un solo lote.

TABLA 13 Composición de la solución Davidson.

Reactivo	Volumen mL
Glicerina	400
Formaldehído al 37-40%	800
Alcohol etílico 96%	1200
Agua de mar filtrada	1200

Los camarones fueron sumergidos en la misma solución Davidson como se muestra en la figura 20 al terminar de inyectarlos, a fin de que se conservaran los tejidos hasta iniciar los cortes histológicos.

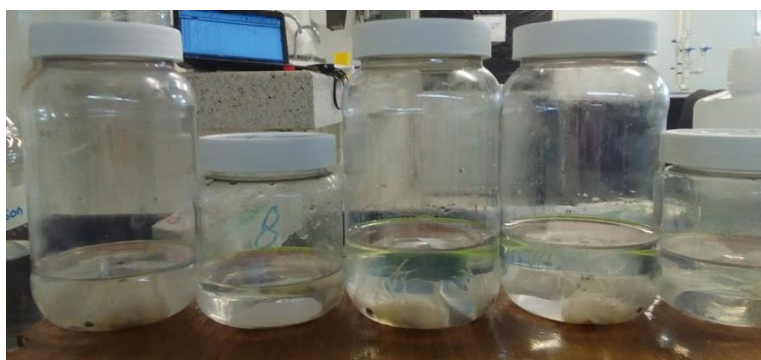


FIGURA 19 Conservación en Davidson hasta su preparación para histología.

Después un lavado sucesivo con alcohol al 70 y 80%, se esperan más de 48 horas para iniciar la inclusión en parafina para ello fue necesario deshidratar los organismo con diferentes grados de alcohol. Para la deshidratación se utilizó un procesador de tejidos de vacío automatizado Leica ASP200-S.

El procesador de tejidos fue programado por el laboratorio de histología e histoquímica para una duración de 9.5 horas como se presenta continuación:

1. Dos lavados continuos en alcohol etílico (I y II) al 70°, 30 minutos con cada uno para un total de una hora.
2. Una hora en alcohol etílico al 80°.

## MATERIALES Y MÉTODOS

3. Una hora en alcohol etílico al 90°.
4. Dos lavados continuos en alcohol etílico al 96°, I y II respectivamente, una hora en cada uno.
5. Tres lavados consecutivos con alcohol etílico 100°; I, II, III, una hora en cada uno.
6. Mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol (1:1) 20 minutos.
7. Xilol absoluto (100 %) 5-10 minutos.

### **4.3.7. Determinación de nitritos, nitratos y amonio**

La determinación de nitritos, nitratos y amonio se hizo siguiendo el manual de procedimientos técnicos para la determinación de nitratos disueltos en aguas del laboratorio de Análisis Químicos de Aguas con base en las normas mexicanas: NMX-AA-115-SCFI-2015; Análisis de agua – criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos, y NMX-AA-154-SCFI-2011 (Análisis de agua – determinación de nitrógeno de nitritos en aguas naturales, residuales, residuales tratadas y marinas– método de prueba) y . Las soluciones y equipos para la determinación fueron proporcionados por el laboratorio. La medición por colorimetría se hizo en un autoanalizador de iones, marca Lachat Instruments, modelo QC8000 compuesto de los siguientes instrumentos: Automuestreador aleatorio, bomba peristáltica de múltiples canales, unidad de reacción o manifold con controladores de temperatura, unidad de calentamiento, detector colorimétrico, sistema de cómputo para la captura de datos y generación de informes.

Se realizaron las respectivas diluciones de las muestras de agua de los estanques cuando la concentración estas se salían del rango de la curva de calibración.

#### **4.4. Análisis Estadístico**

Se realizó el análisis estadístico de los resultados con el método Duncan debido a la distribución desbalanceada del experimento y la diferencia del número de organismos por tratamiento.

Los resultados zootécnicos fueron analizados con el método Duncan en el programa IBM® SPSS® Statistics versión 24, utilizando un nivel de significancia estadística de 0.05. Por otro lado, resultados histológicos para camarones sanos e infectados con *Vibrio parahaemolyticus* se realizaron con el método de Kruskal Wallis para pruebas no paramétricas, con el programa IBM® SPSS® Statistics versión 24, y se complementaron con el programa Minitab 17 Statical Software.

Una vez observadas las diferencias en el primer bioensayo se procedió a realizar un segundo bioensayo, descartando los tratamientos que no tuvieron un efecto positivo en los camarones. La repetición del bioensayo se realizó para realizar mejoras en el cuidado del cultivo experimental, pudiendo presentar así información científica en revistas de acuicultura.

El análisis de los resultados de concentración de nitrititos, nitratos y amonio se hizo también con el método de Duncan con significancia estadística de 0.05; las gráficas de estos resultados al igual que los parámetros zootécnicos se realizaron en el programa de Excel.

Los resultados del análisis enzimático no se presentan para los organismos infectados y tampoco fue repetido un bioensayo de reto microbiano, sin embargo en el segundo bioensayo se hacen pruebas para el análisis de fenol y profenol oxidasa en organismo sanos, observando así, sí hay o no efecto de estrés ocasionado por la alimentación de los camarones con el extracto de guishe.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

A continuación se presentan los resultados de la caracterización cualitativa de los dos extractos, así también los parámetros zootécnicos que se obtuvieron con el registro durante los 29 días del bioensayo, el reto microbiano que se realizó en dos semanas, el análisis de aguas y la expresión enzimática. Por último se presentan los resultados del segundo bioensayo, que se realizó con respecto a los resultados obtenidos previamente.

### **5.1. Caracterización de los fitoquímicos presentes en el guishe**

La identificación de los compuestos de interés se realizó con estándares de diosgenina y de quercitina para conocer los tiempos de retención y el tamaño de los fragmentos. Los fragmentos de saponinas se presentaron en un tiempo de 9 a 10 minutos y el fragmento de quercitina tuvo un tiempo de retención de 5 minutos. En la tabla 6 se muestran los valores de m/z experimentales que se observaron en ambas muestras de guishe, tanto en el extracto crudo, como en el extracto que tuvo tratamiento térmico (extracto final). No se repitieron en la tabla de búsqueda m/z moléculas de sapogeninas que presentaran fórmula molecular similar, debido a que no podría conocerse a cuál de las dos moléculas hacía referencia sin un estándar para cada una de ellas.

Se identificaron las siguientes sapogeninas; diosgenina, esmilagenina, gentrogenina, yucagenina y clorogenia; además de diosgenina diglucosida. Se encontraron los flavonoles quercita y kaempferol. La diosgenina fue la sapogenina que mostró los picos más intensos seguidos de la esmilagenina.

TABLA 14 Valores calculados y experimentales de m/z de las moléculas de interés.

Molécula	Formula molecular	m/z calculada	m/z experimental	Tolerancia	Autor
Diosgenina	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>	415.3212	415.321	20 PPM	Yan <i>et al.</i> , 2014
Diosgenina diglucosida	C <sub>39</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	739.4263	739.4274	20 PPM	Yan <i>et al.</i> , 2014
Esmilagenina	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	417.3363	417.3761	20 PPM	
Gentrogenina	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	429.2299	429.3096	20 PPM	
Yucagenina	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	431.3156	431.3332	20 PPM	
Clorogenina	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	433.3312	433.3203	20 PPM	
Quercitina (-)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301.1	301.084	20 PPM	

El estándar de diosgenina mostró su fragmento más intenso con un fragmento de 415.3181, como se muestra en la figura 21, mientras en la figura 22 se presenta el espectro de masas del extracto crudo de guishe, donde se encontró diosgenina, el pico más alto, que indica mayor concentración pertenece a la diosgenina, con un tiempo de retención de 9.6 minutos.

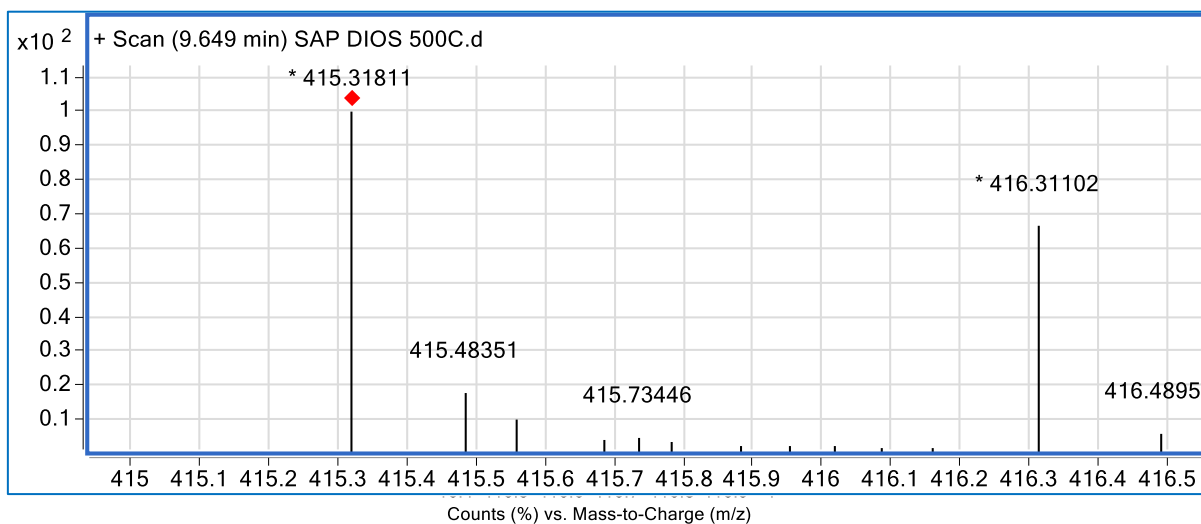


FIGURA 20 Fragmentos de diosgenina del estándar en el minuto 9.6.



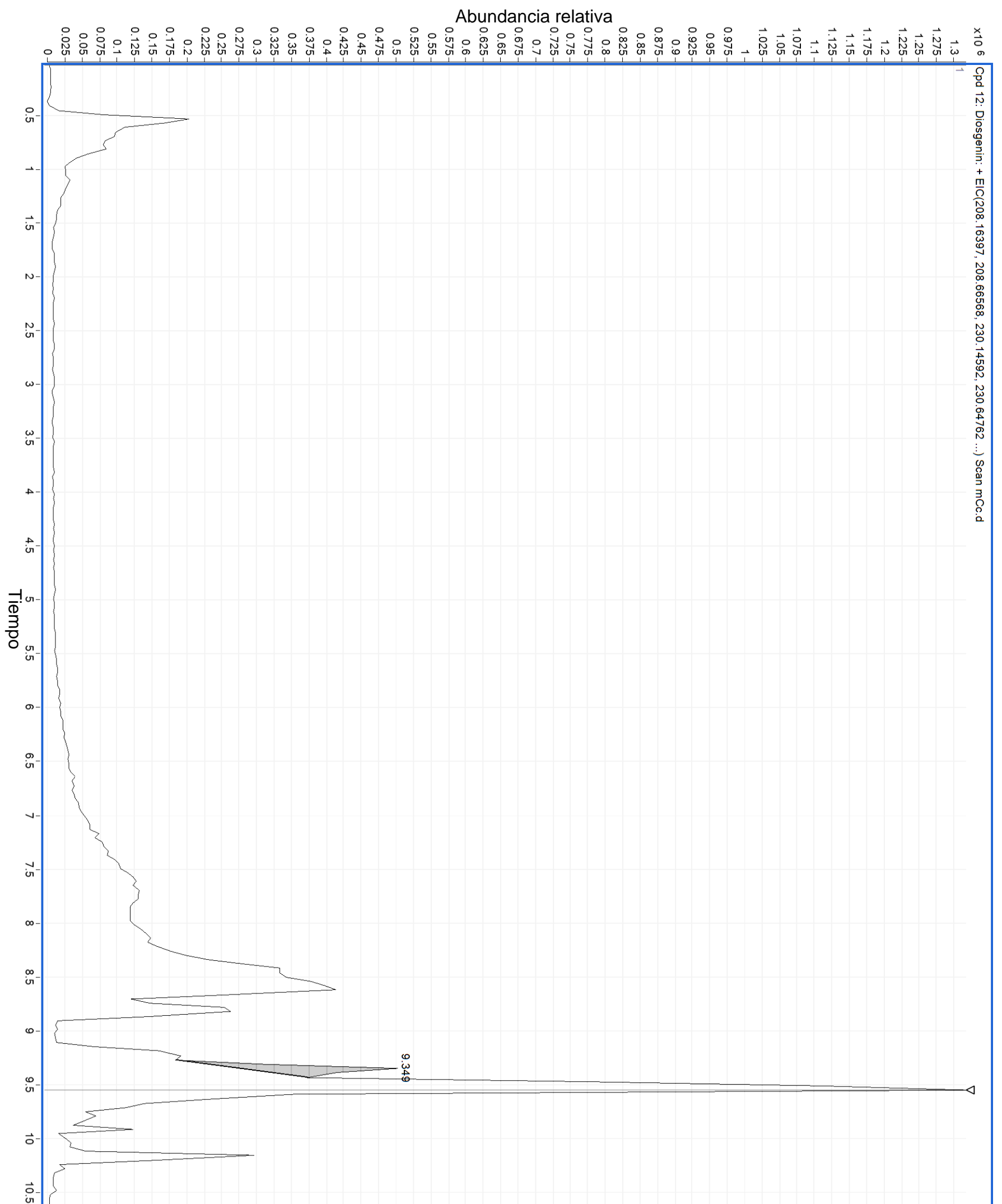


FIGURA 21 Espectro de masas del extracto crudo hasta los 10.5 minutos

El estandar de quercitina se fragmentó con un metodo de polaridad negativa, y presento su fragmento más grande de 301.04 a los cinco minutos (figura 23). Todos los extractos tuvieron presencia de quercitina.

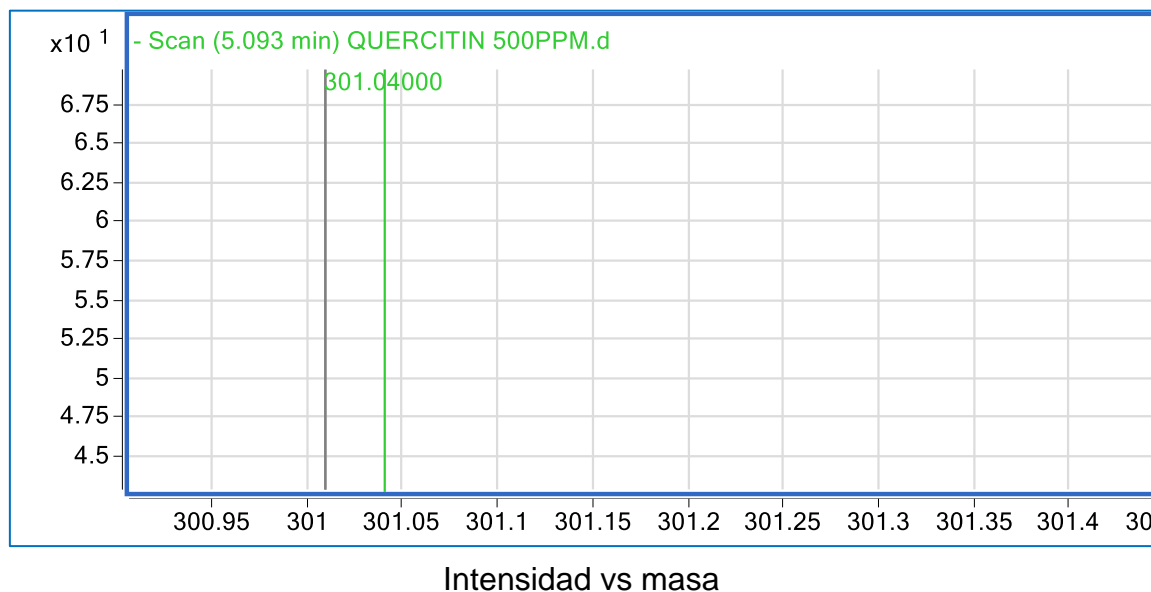


FIGURA 22 Fragmentos de quercitina en el estándar en el minuto 5.

## 5.2. Evaluación del efecto de los extractos de guishe como aditivo alimenticio

Los pesos promedio de cada tratamiento con sus respectivas replicas se obtuvieron pesando los camarones al inicio del bioensayo, a los quince días del bioensayo y al finalizar los 29 días, los resultados promedio del primer bioensayo se concentran en la tabla 15. En la tabla se observa que los tratamientos C3B, F3B y C1A tuvieron una mayor ganancia de peso.

TABLA 15 Pesos promedio de los camarones durante el primer bioensayo

Tratamientos	T0	C1A	C2A	C3A	F3A	T0B	C3B	F3B
Tiempo	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
Semana 0	0.66	0.65	0.65	0.65	0.64	0.65	0.65	0.65
Semana 2	1.90	2.00	1.96	1.92	1.97	1.95	2.02	1.93
Semana 4	3.66	4.13	3.92	3.88	3.89	3.95	4.36	4.26

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

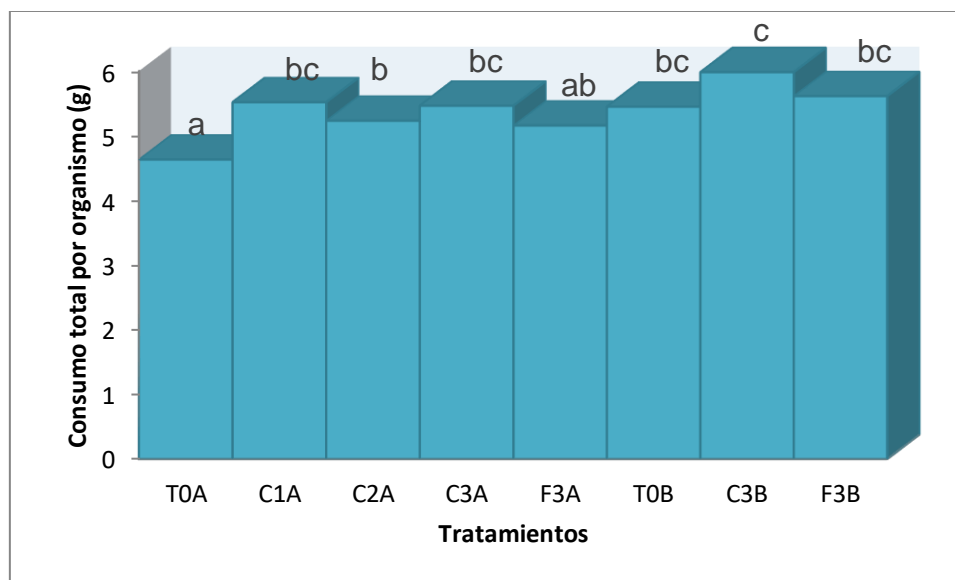


FIGURA 23 Consumo total por organismo por tratamiento.

La prueba *Duncan* utilizada para este bioensayo preliminar como método de comparación múltiple, arrojó diferencia significativa, el tratamiento T0A tuvo menor consumo; seguido de este, se presentó el tratamiento F3A, siendo estos tratamientos los de menos consumo. Luego el tratamiento C2A, seguido de los tratamientos C1A, C3A, T0B y F3B. Por último el tratamiento que presentó mayor consumo fue C3B, esto puede verse en la figura 24.

El hecho de que el tratamiento testigo con un recambio alto presentó un menor consumo de alimentos indica el efecto positivo que tiene la presencia de los extractos de guishe. Por otro lado los tratamientos con bajo recambio incluyendo el tratamiento sin extracto indica el efecto probiótico que tiene la formación de biopelículas producidas en los estanques, por ello, este bioensayo preliminar sugirió no volver a utilizar recambios bajos en el siguiente experimento para así conocer el efecto de únicamente los extractos de guishe sobre el crecimiento del camarón blanco.

Los tratamientos con extracto con tratamiento térmico (F) fueron quienes estuvieron en segundo lugar después de los tratamientos testigos, tanto en alto y bajo recambio de agua, por lo cual no es recomendable utilizarlo en la alimentación de los camarones, dejando para el segundo bioensayo solamente el extracto crudo de

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

guishe, el cual fue obtenido por prensado mecánico. Esto debido a que durante el calentamiento pudo disminuir la microbiota del extracto que tuviera un efecto probiótico en los camarones, así mismo el calentamiento del extracto "F" pudo generar inactivación enzimática de proteínas que tuvieran un efecto positivo en la alimentación de los cultivos.

Los resultados de ganancia de peso por otro lado, no presentaron tres grupos de diferencia significativa, como se mostraron en la gráfica de la estimulación del apetito en el consumo alimenticio. La figura 25 (abajo) muestra los resultados obtenidos para la ganancia de peso, en los cuales los tratamientos C3B y F3B obtuvieron los mejores resultados en cuanto a peso de los camarones, este peso sobresaliente en los camarones es consecuencia del crecimiento de la biopelícula microbiana en las paredes de los estanques.

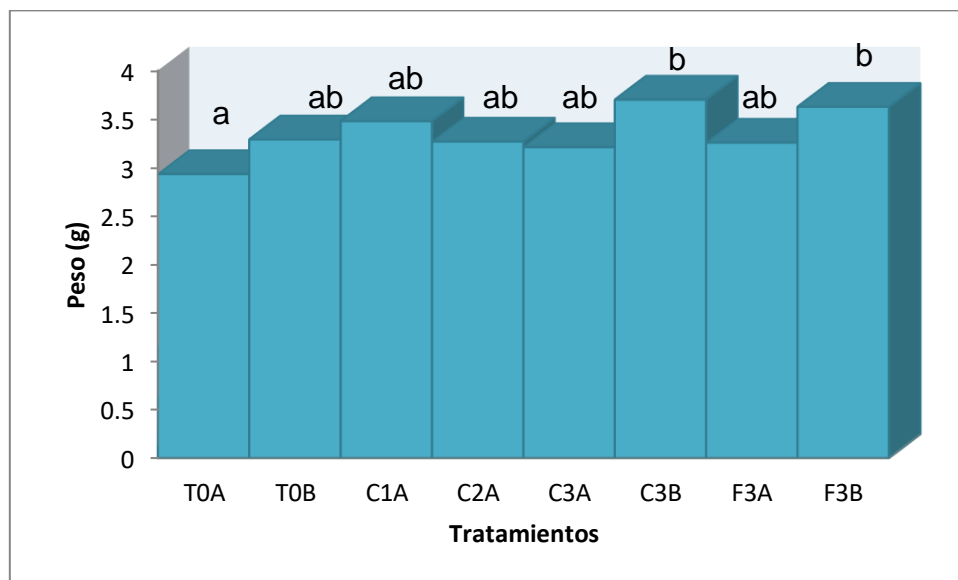


FIGURA 24 Ganancia en peso promedio por tratamiento.

El tratamiento T0A, que es el tratamiento testigo, fue el que presentó una menor ganancia de peso, con este resultado se sustenta también lo mostrado en la figura 24, que los extractos de guishe presentan un efecto positivo al ser adicionados a la

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

dieta de los camarones; los demás extractos, T0B, C1A, C2A, C3A y F3A se posicionaron en el mismo rango con respecto a la ganancia de peso.

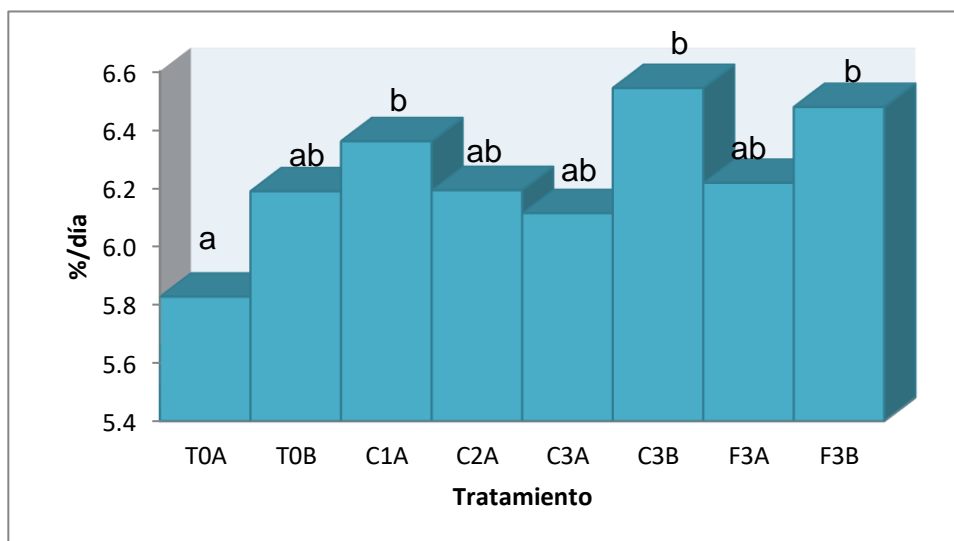


FIGURA 25 Tasa de crecimiento específico por tratamiento.

La tasa de crecimiento específico al igual que el consumo alimenticio y ganancia de peso es muy baja para el tratamiento T0A, como puede verse en la figura 26, de igual manera el bajo porcentaje de crecimiento en comparación con los demás tratamientos se debe a la ausencia de extracto agregado. Los tratamientos T0B, C2A, C3A, y F3A son el grupo siguiente que se forma con una similar tasa de crecimiento específico; y como era de esperarse comparando con los resultados anteriores, los grupos que presentan una mayor tasa de crecimiento específico son los tratamientos con bajo recambio de agua a 0.3% de extracto tanto crudo como tratado, sin embargo, puede notarse que sobresale el tratamiento C1A. Por lo tanto, la concentración de 0.1% con recambio alto de agua se propone seguir utilizando para la prueba de bioensayo final.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

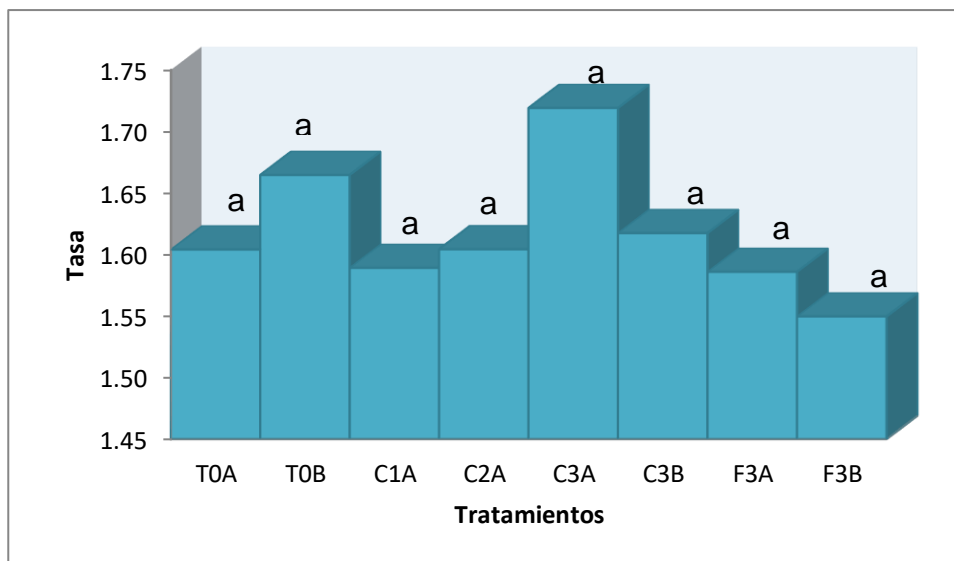


FIGURA 26 Tasa de conversión alimenticia

La tasa de conversión alimenticia, véase figura 27, no mostró diferencia significativa entre los tratamientos, ni siquiera del tratamiento testigo, la tasa de conversión alimenticia indicó que el alimento fue aprovechado de igual manera por todos los organismos, la tasa de conversión alimenticia puede verse afectada por la mortalidad de organismos en el cultivo, por una baja alimentación de los camarones y por la competencia que existe entre ellos por los alimentos; este tipo de situaciones podría afectar en una tasa de crecimiento poco óptima. Por ello una sugerencia que surge de este bioensayo preliminar es el aumento de dosis de alimentación de dos a tres veces por día.

Por último, la evaluación de la supervivencia, véase figura 28, no mostró diferencia significativa para ninguno de los tratamientos con el análisis de Duncan, con o sin adición de extractos, con bajo o alto recambio, la supervivencia mínima es del 80%, esto significa que el alimento no es tóxico para los cultivos. Las barras de la figura 28 que muestran mayor supervivencia son los tratamientos C2A, C3A, T0B y F3B.

El tratamiento con menor supervivencia fue el F3A, con un total medio por las tres réplicas de 87, por lo cual se observa un efecto negativo con el extracto que tiene tratamiento térmico, además de no tener en el estanque la biopelícula o tapete

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

microbiano, debido a los recambios altos. El siguiente tratamiento con menor supervivencia, fue el tratamiento T0A con el 90% de organismos supervivientes.

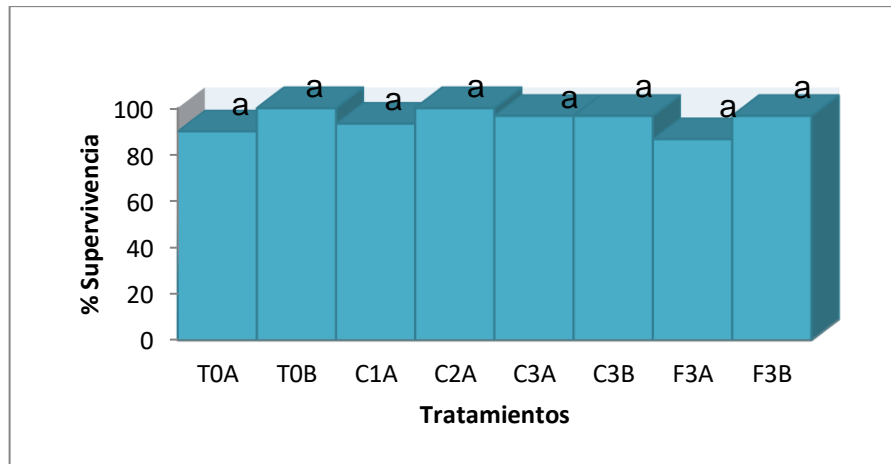


FIGURA 27 Supervivencia promedio de cada tratamiento

### 5.3. Evaluación del potencial de absorción de contaminantes de los extractos

La figura 29 muestra el progreso de la turbidez del agua en el estanque 103 durante el bioensayo, este estanque era un T0B, que indicaba un nivel de recambio de agua bajo y una dieta con alimento testigo, sin extracto de guishe.



FIGURA 28 Oscurecimiento progresivo del estanque 103 durante el bioensayo.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Un ejemplo del cambio al inicio y al final del bioensayo es el estanque 62 (figura 30) con el tratamiento C1A, tomando en cuenta que es un tratamiento con alto recambio de agua, la turbidez del agua es menor que un estanque con un tratamiento de recambio bajo.

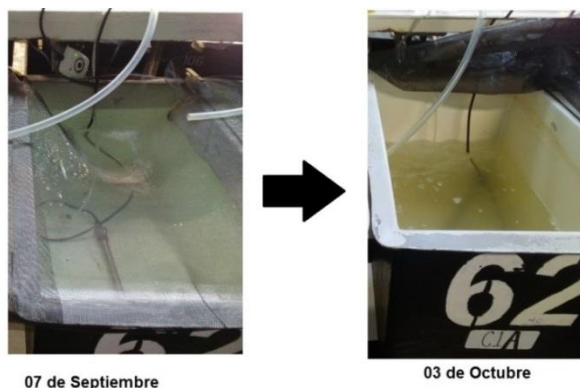


FIGURA 29 Color inicial y final del agua en el estanque 62 durante el bioensayo.

Para las pruebas de nitritos, nitratos y amonio en agua se congelaron las muestras hasta su análisis por colorimetría, realizado en un autoanalizador de iones. Se tomaron en cuenta los tres parámetros de la semana 1 y la semana 4 del bioensayo.

Los resultados que se obtienen del análisis estadístico para la concentración de amonio son más bajos en los tratamientos F3A y C3A debido a que son los tratamientos con un recambio alto y además una mayor concentración de los extractos.

Los resultados de concentración de nitritos y amonio son proporcionales a la gráfica presentada anteriormente, por lo que puede confirmarse que la concentración utilizada para la preparación de las dietas de los camarones no tuvo influencia en la disminución de compuestos nitrogenados en los estanques.



RESULTADOS Y DISCUSIONES

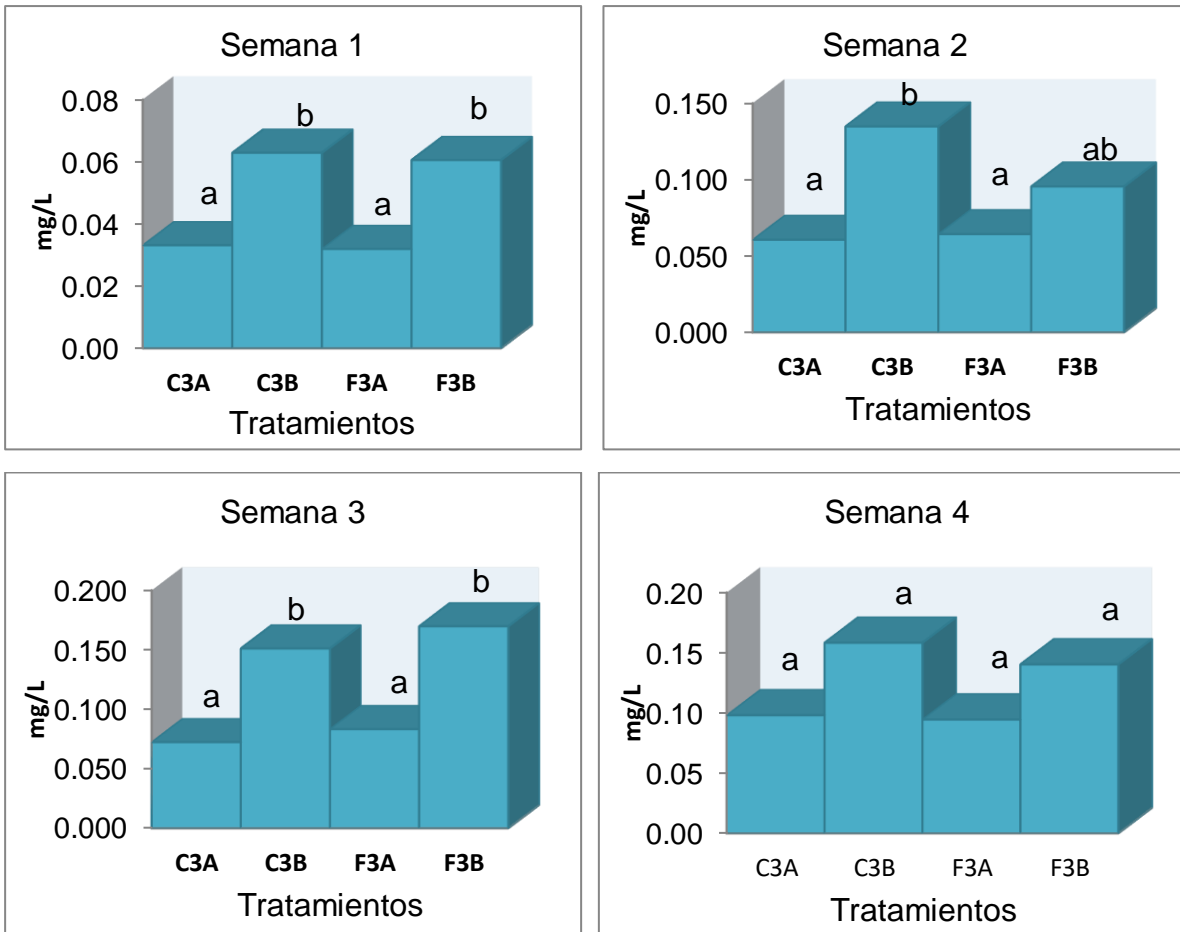


FIGURA 30 Concentración semanal de amonio

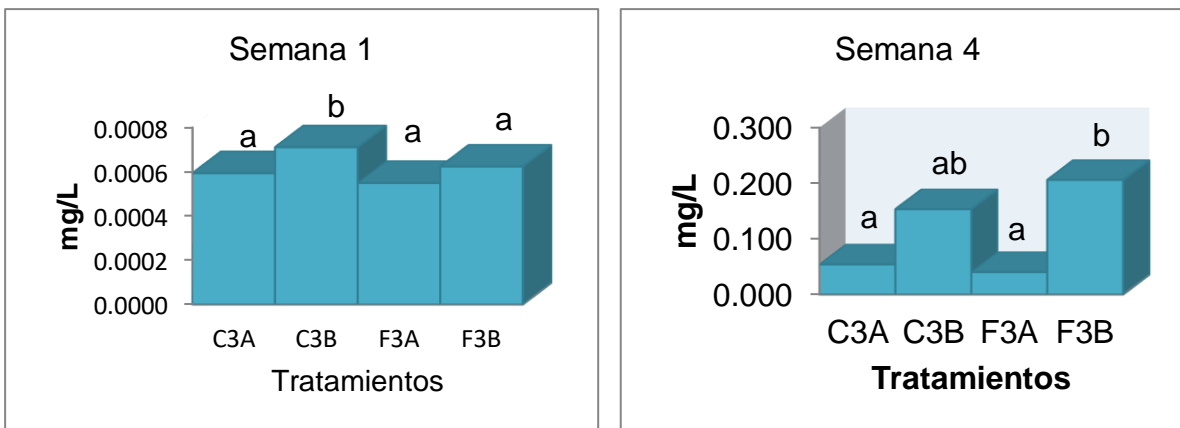


FIGURA 31 Concentración en la primera y última semana de nitritos

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

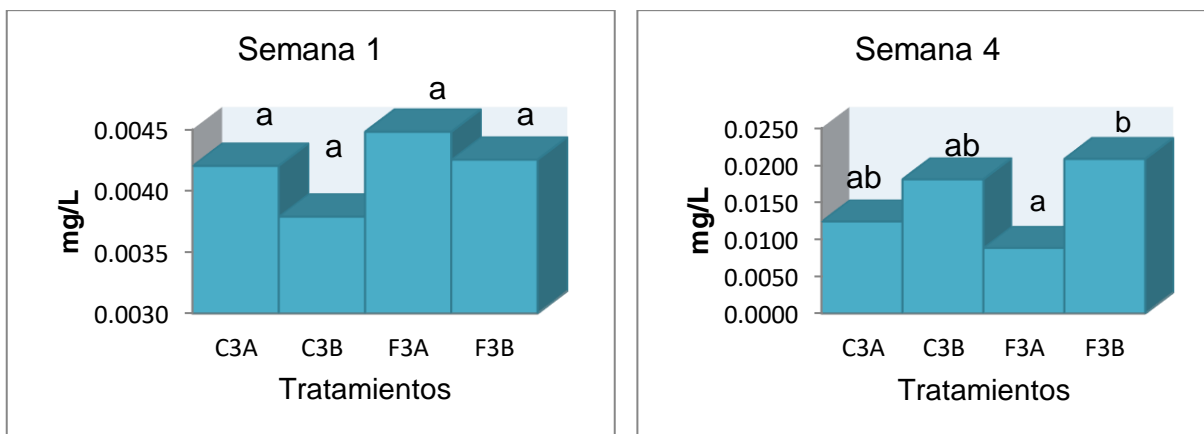


FIGURA 32 Concentración en la primera y última semana de nitratos

Debido a que los extractos no tienen influencia en la turbidez del agua y tampoco en la concentración de nitritos, nitratos y amonio, se descartó el uso de recambios bajos en el próximo bioensayo, utilizando solamente recambios altos para conocer el efecto exclusivo de la dieta en los camarones.

### **Análisis histológico para conocer el efecto del aditivo en la glándula digestiva.**

El análisis histológico de los tejidos de la glándula digestiva se hizo asignando un valor numérico a los daños observados en sus túbulos. Estos criterios cuantitativos (TABLA 16) fueron tomados de un estudio previo realizado también con camarón blanco en Baja California, México (Olivas Valdez, Cáceres Martínez, & Vásquez Yeómans, 2011) por el Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

TABLA 16 Criterios para asignación de valor numérico.

Grado de severidad	Apariencia de los túbulos en la glándula digestiva
0	Paredes uniformes sin arrugas ni hinchamientos y abundantes vacuolas de lípidos.
1	Paredes arrugadas y onduladas, puede haber una ligera estrangulación y una menor cantidad de lípidos.
2	Estrangulación de 2 a 5 túbulos por preparación. Engrosamiento del epitelio y menor cantidad de lípidos.
3	Estrangulaciones en más de 5 túbulos por preparación y más de una estrangulación por túbulo. Hay mayor engrosamiento del epitelio de los túbulos, menor cantidad de lípidos y algunos túbulos vacíos.
4	Delgados de color café, necrosados con granulomas en el lumen. Es común una textura blanda y edematosa.

A continuación; se muestra en la figura 33, un ejemplo de un corte con grado de severidad cero (0) en un tratamiento C3, según la tabla antes presentada. Para este proyecto se analizaron de tres a cuatro cortes de diferentes camarones por estanque.

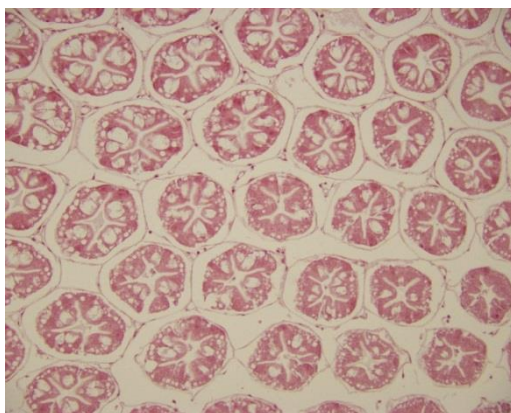


FIGURA 33 Corte longitudinal de glándula digestiva (tratamiento C3,20X).

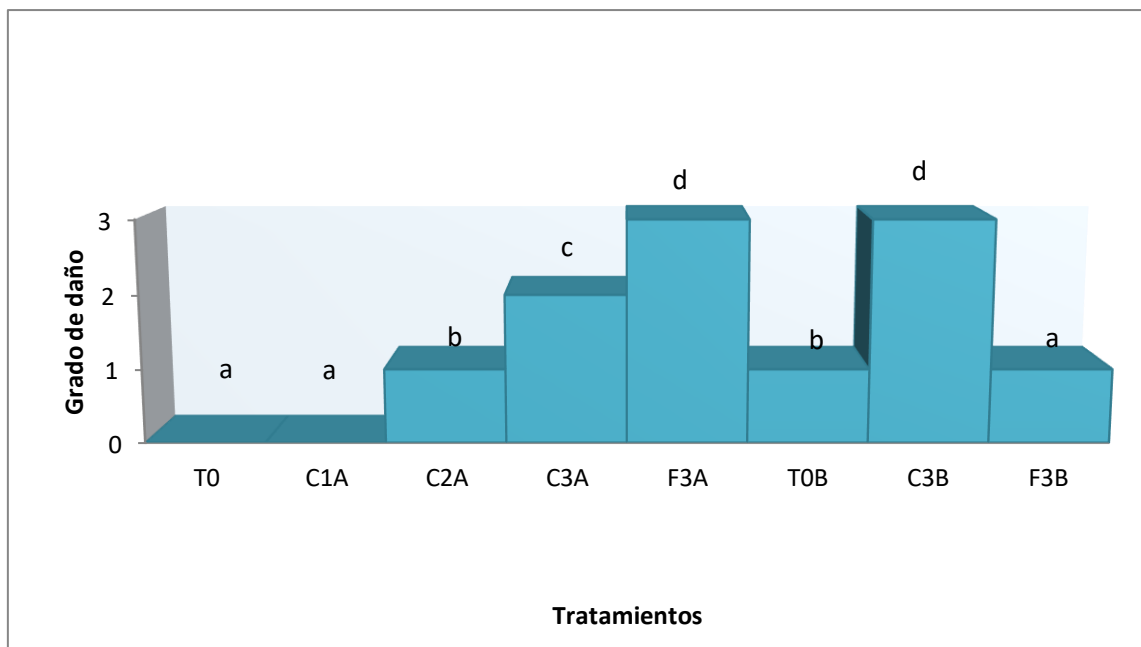


FIGURA 34 Efecto de la dieta en la glándula digestiva.

La figura 34 muestra que el daño histológico presentado no llegó a nivel cuatro, sucedió solo a nivel dos, lo cual indica que los extractos son inocuos y que además se puede trabajar con una concentración mayor a la utilizada para este bioensayo preliminar. El daño histológico que presentaron los tejidos puede tener diversas causas; por ejemplo, el estrés al que son sometidos los camarones antes de ser fijados con solución Davidson, los niveles altos de nitritos, nitratos y amonio en los estanques, estrés por inanición antes de ser fijados y posiblemente por el alimento. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la supervivencia de los camarones al terminar el bioensayo de reto es aceptable, por lo que se realiza un segundo bioensayo con base a estos resultados preliminares.

#### 5.4. Segundo bioensayo

El segundo bioensayo tuvo una duración de 35 días, en donde de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera fase, se utiliza la siguiente distribución

## RESULTADOS Y DISCUSIONES



FIGURA 35 Distribución de los tratamientos para el bioensayo final.

experimental (figura 35), concentraciones de 0, 0.1, 0.3 y 0.6 % de extracto crudo prensando con únicamente recambio alto para evaluar el efecto de las dietas sobre los parámetros zootécnicos y su expresión de fenol y profenolxidasas como indicador de estrés ocasionada por el alimento.

Los resultados zootécnicos indican que la ganancia de peso mayor se obtuvo con el tratamiento con 0.3 % de concentración de extracto, con un consumo de alimento por camarón de  $2.13 \pm 0.01$ , lo cual indica que la ganancia de peso obtenido no requiere mayor inversión en el consumo de los organismos.

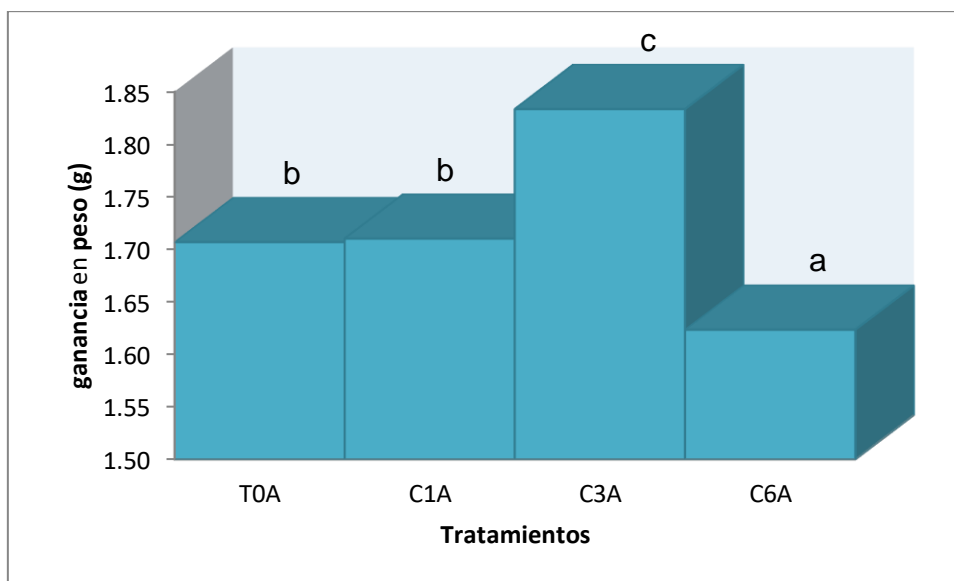


FIGURA 36 Ganancia en peso al final de 35 días

En la figura 36, el tratamiento C6A con concentración 0.6 % se observa una ganancia de peso menor con respecto a los demás tratamientos, este efecto indica que la concentración de metabolitos a este nivel de inclusión es contraproducente

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

para los camarones. Por otro lado el tratamiento que tiene un mejor efecto en el cultivo es el tratamiento con una concentración del 0.3%.

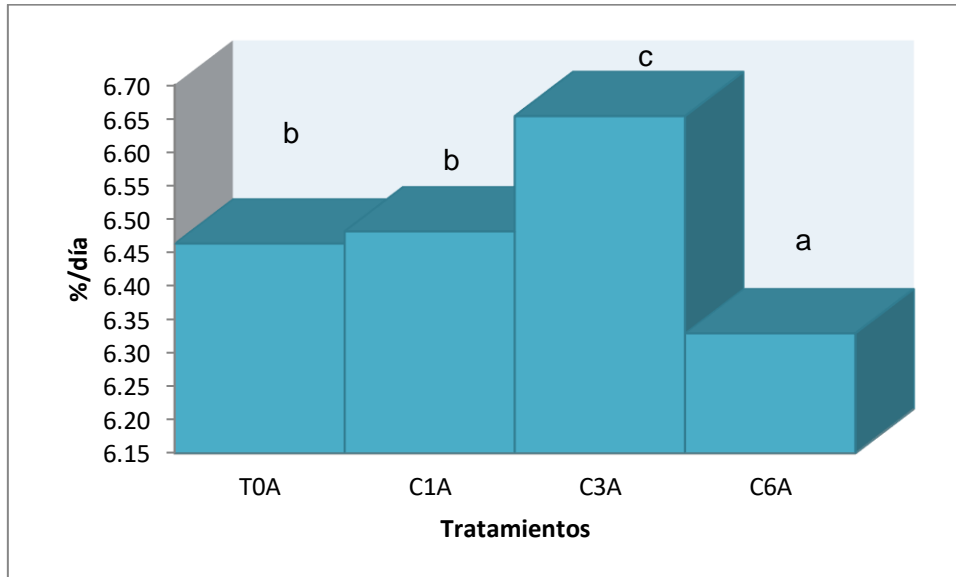


FIGURA 37 Tasa de crecimiento específico del segundo bioensayo

La tasa de crecimiento específico al igual que la ganancia de peso presenta resultados similares por lo que se puede confirmar que el tratamiento C6A tiene un efecto negativo en el cultivo mientras que el mejor tratamiento es el C3A.

El consumo total por organismo que se presenta en la figura 38 no muestra diferencia entre tratamientos con el análisis de Duncan, esto es algo conveniente para la camaronicultura ya que se obtienen camarones con mayor peso sin incrementar la administración de alimento, lo que implica que no habrá un gasto adicional en la alimentación de los camarones.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

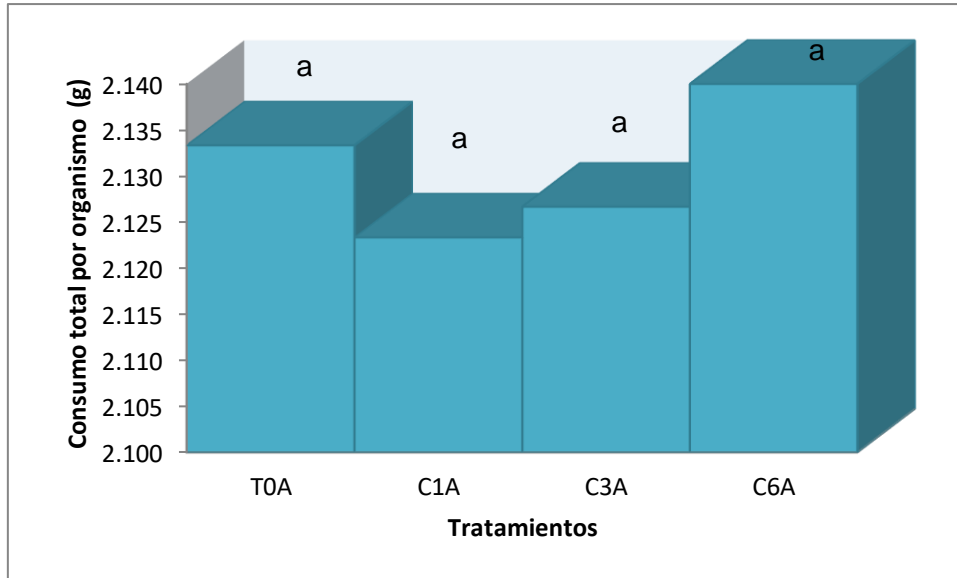


FIGURA 38 Resultados del consumo total por organismo en el segundo bioensayo

La expresión de fenol y profenol oxidasa no mostro diferencia significativa durante la alimentación con los extractos en camarones sanos, lo que indica que el alimento no provoca estrés en los camarones.

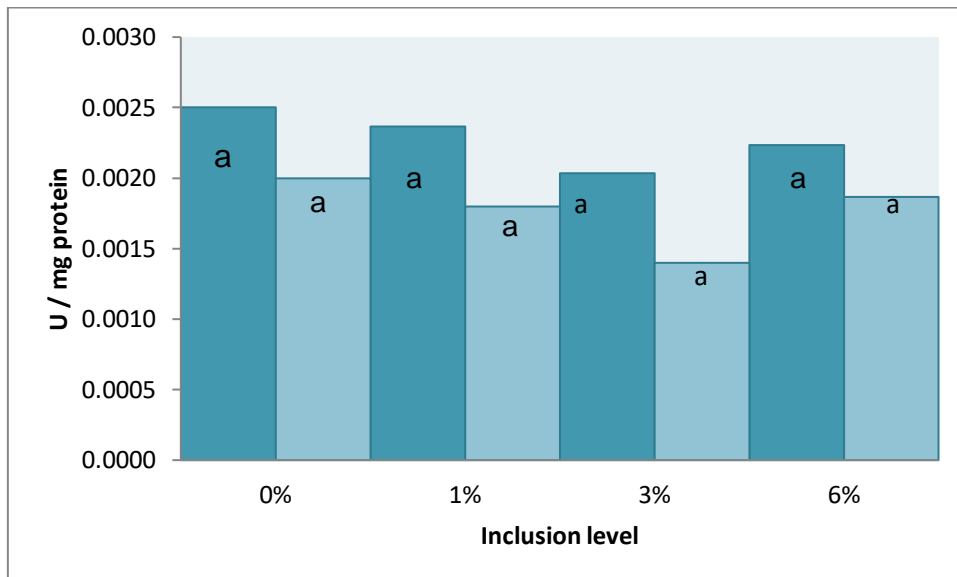


FIGURA 39 Resultados de expresión de fenol y profenol oxidasa

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se comprueba la presencia de saponinas en los extractos de guishe, sin embargo es necesario conocer las concentraciones de saponinas y flavonoides en los extractos, tanto del extracto crudo como el extracto con tratamiento térmico a fin de conocer el motivo de los efectos negativos a concentraciones mayores de extracto en el alimento.

El extracto crudo de guishe, que se obtiene mediante prensado mecánico tuvo un efecto positivo sobre el extracto que tuvo adicionalmente un tratamiento térmico, la dieta con concentración de extracto crudo de 0.3 % de guishe, resultó en una ganancia de peso mayor en los cultivos de camarones.

Los extractos incluidos en la dieta no tienen efecto sobre la concentración de nitritos, nitratos y amonio; esto debido a que el extracto es aprovechado al 100% en la alimentación para los camarones, por lo que es necesario hacer un estudio donde el extracto líquido tenga contacto directo con los estanques.

Los análisis histológicos y la expresión de fenol y profenol oxidasa indican que el alimento con los extractos no generan daño en la glándula digestiva.

Es necesaria un nuevo experimento de reto microbiano con las concentraciones del segundo bioensayo para conocer los efectos de los extractos sobre la inmunoestimulación.



## BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada Santos, Y. P., Montes Avila, J., Uribe Beltrán, M., Díaz Camacho , S., López Angulo, G., Vega Aviña, R., . . . Delgado Vargas, F. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products*, 143-149.
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Ávila-Reyes, J. A., Uribe-Soto, J. N., & González-Valdez, L. S. (12 de Mayo de 2013). The Phenols of the Genus Agave (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, IV, 9-16.
- Ayala Borboa, E. G. (Mayo de 2014). EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE HARINA DE LANGOSTILLA (Pleuroncodes planipes) EN EL ALIMENTO SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA EN EL INTESTINO DEL CAMARÓN BLANCO (Litopenaeus vannamei). *Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales)*. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., . . . Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.
- Bacca Erazo, D. J. (Noviembre de 2012). Tesis. *ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL JUGO DE FIQUE DE LAS ESPECIES NEGRA COMÚN (Furcrea gigantea) Y UÑA DE ÁGUILA (Furcrea macrophylla) DE LOS MUNICIPIOS DE EL TAMBO Y GUAITARILLA (NARIÑO)*. San Juan de Pasto, Nariño, Colombia.
- Bell, T., & Lightner, D. V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. Tucson, Arizona.: Allen Press, Inc.

- Burbano Gallardo, E., Imués Figueroa, M. A., Gonzalez Legarda, E., Otavio Brito, L., Olivera Galvez, A., & Vinatea Arana, L. A. (Agosto de 2015). Supervivencia de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* sometidas a la prueba de estrés osmótico y su relación con el estado de muda. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50(2), 323-329.
- Camproduce a.c. (2009). *Estudio de la infraestructura logística para la exportación del camarón blanco a algunas ciudades de Estados Unidos y Canadá*. México: SAGARPA.
- Carmona, J. E., Morales Martínez, T., Mussatto, S. I., Castillo Quiroz, D., & Ríos González, L. J. (2017). Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 100-122.
- Carreño Mejía, A. (Enero de 2009). Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Tesis que para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias*. Ciudad de México, México.
- Ceccaldi, H. (1989). Anatomy and physiology of digestive tract of Crustacean Decapods reared in aquaculture. *Advances in tropical aquaculture*, 243-259.
- Cervantes Dueñas, A. (2016). Presencia de saponinas en *Agave* spp. de México. *BIOZ. Revista electrónica de Biología, Universidad Autónoma de Zacatecas*, 1(1), 2-5.
- Cervantes Ramírez, M. C. (2002). *IV. LOS AGAVES (AGAVE SPP.)*. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México, Instituto de Biología.
- Cortés Jacinto, E. (Octubre de 1998). Frecuencia y distribución alimenticia en el cultivo intensivo de juveniles del camarón blanco *Penaeus vannamei*. *Tesis que para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Manejo de Recursos Marinos*. La Paz, Baja California Sur, México: IPN. CICIMAR.

- El Universal. (09 de Julio de 2017). *Ixtle, ideal para artesanías*. (L. Sánchez, Editor) Recuperado el Noviembre de 2018, de El Universal Querétaro: <http://www.eluniversalqueretaro.mx/tierra-de-emprendedores/09-07-2017/ixtle-ideal-para-artesantias#imagen-1>
- FAO. (Agosto de 1988). *Food and Agriculture Organization*. Obtenido de Biología de camarones peneidos: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB466S/AB466S00.htm#TOC>
- Güçlü-Üstündağ, Ö., & Mazza, G. (16 de Marzo de 2007). Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 231-258.
- Hai-Hong, H., Xiao-Lin, L., Jian-Hai, X., & Ping, W. (2013). Immune response of *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 115-120.
- INIFAP. (2005). *Recolección, extracción y uso de la fibra de lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.) en el estado de Coahuila*. México: INIFAP.
- Integradora de ixtleros de Zacatecas S.A. de C.V. (2009). *Estudio orientado a identificar los mercados y canales de comercialización internacionales para la oferta de productos de ixtle con valor agregado*. Zacatecas: SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Johnson, S. (1995). *Handbook of Shrimp Diseases*. Texas: Texas A&M University.
- Lorena Vázquez, C. S. (Noviembre-Diciembre de 1998). Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia*, 23(6), 344-348.
- Martínez Córdova, L., Campaña Torres, A., Bringas Alvarado, L., & Porchas Cornejo, M. (Enero de 2008). Efectos de la inclusión dietaria de *Yucca schidigera*, en los parámetros de calidad del agua y producción del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). (R. d. Zapata, Ed.) *INVESTIGACIÓN Y CIENCIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES*(40), 4-10.

- Martínez Córdova, L., Campaña Torres, A., Bringas alvarado, L., & Porchas, Cornejo, M. (Enero de 2008). Efectos de la inclusión dietaria de *Yucca shidigera*, en los parámetros de calidad del agua y producción del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). (R. Zapata, & S. Ruiz Guerra , Edits.) *Investigación y Cienciam de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*(40), 4-10.
- Moghimpour, E., & Handali, S. (2014). Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. *Annual Research & Review in Biology*, 5(3), 208-220.
- Olivas Valdez, J., Cáceres Martínez, J., & Vásquez Yeómans, R. (2011). REDVET. *Patógenos que afectan el cultivo de Litopenaeus vannamei en ambiente marino y dulceacuícola en el estado de Baja California, México.*, 11. Ensenada, Baja California, México.
- Ontiveros Floriano, D., Sandoval Palacios, P., Ávila Damián, M., de la Fuente Salcido, N., Linaje Treviño, M., & Valencia Castro, C. (2017). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y PERFIL FITOQUÍMICO DEL Agave lechuguilla Torrey. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2, 217-22.
- Osbourn, A., Goss, R., & Field, R. (2011). The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological. *Natural Product Reports*, 28, 1261-1268.
- Peña Rodríguez, A., Elizondo González, R., Nieto López, M. G., Ricque Marie, D., & Cruz Suárez, L. (2016). Practical diets for the sustainable production of brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis*, juveniles in presence of the green macroalga *Ulva clathrata* as natural food. *Journal of Applied Phycology*.
- Pérez, A., Calle, J., Simonet, A., Guerra, J., & Stochmal, A. (2013). Bioactive steroidal saponins from *Agave offoyana* flowers. *Phytochemistry*, 95, 298-307.
- Podololak, I., Galanty, A., & Sobolewska, D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 425-474.

- Reyes Agüero, J. A., Aguirre Rivera, J. R., & Peña Valdivia, C. B. (2000). Biología y Aprovechamiento de Agave Lechuguilla Torrey. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75-88.
- Romero González, J., Peralta Videa, J., Rodríguez, E., Delgado, M., & Gardea Torresdey, J. (2006). Potential of Agave lechuguilla biomass for Cr(III) removal from aqueous solutions: Thermodynamic studies. *Bioresource Technology*, 178-182.
- Santamaría, F. J. (1992). *Diccionario de mejicanismos* (Tercera ed.). México: Porrúa.
- Santos Zea, L., Leal Díaz, A. M., Jacobo Velázquez, D. A., Rodríguez Rodríguez, J., García Lara, S., & Gutiérrez Uribe, J. (2016). Characterization of concentrated agave saps and storage effects on browning, antioxidant capacity and amino acid content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 113-120.
- Setiawati, M., Jusadi, D., Laheng, S., & Suprayudi, M. (2016). The enhancement of growth performance and feed efficiency of Asian catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* fed on *Cinnamomum burmannii* leaf powder and extract as nutritional supplementation. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation - International Journal of the Bioflux Society*, 9, 1301-1309.
- Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P. (2016). Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 22-46.
- Siller Juárez, D. (Diciembre de 2012). Tesis. *Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*. Saltillo, Coahuila, México.
- Siller Juarez, D., Flores López, M. L., Sánchez-Robles, J., De la Cerda Suárez, P., Rodríguez Charles, A. V., & Díaz Jiménez, L. (Diciembre de 2014). Variability of Saponins Concentration in Guishe Collected in Different Geographical Areas and Weather Conditions. *Journal of Chemistry and Biochemistry*, 2(2), 105-115.

- Sparg, S., Light, M., & van Standen, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 219-243.
- Suárez Gómez, C. E. (Enero de 2008). Cuantificación y caracterización molecular de bacterias de hemolinfa de camarones *Litopenaeus vannamei* durante brotes del síndrome de mancha blanca y evaluación de sensibilidad a cinco productos antibacterianos. *Trabajo de grado para optar al título de Microbiólogo industrial*. Bogotá, D.C.
- Tesis. (Diciembre de 2012). *Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*. Saltillo, Coahuila, México.
- Thompson, F. L., Abreu, P. C., & Wasielesky, w. (2002). Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 264-278.
- Treece, G. (2000). SHRIMP CULTURE. En R. Stickney, *Encyclopedia of Aquaculture* (págs. 798-868). Bryan, Texas: John Wiley & Sons, Inc.
- Treece, G., & Yates, M. (1993). *Manual de laboratorio para el cultivo de Larvas de Camarón Peneido*. Texas, Estados Unidos de America: Texas A&M University.
- van Weel, P. (1974). "HEPATOPANCREAS"? *Comparative Biochemistry & Physiology*, 1-9.
- Varela Maldonado , M. E., Lugo Cervantes, E., & Cardador Martínez , A. (2006). IV CONGRESO INTERNACIONAL XV CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA. *Actividad antioxidante en jugo y extractos de las hojas de Agave lechuguilla Torrey* (pág. 8). Morelia, Michoacan: COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS A.C.
- Vargas Albores, F., Hernández López, J., Gollas Galván, T., Montaña Pérez, K., Jiménez Vega, F., & Yepiz Plascencia, G. (1998). Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. *Advances in shrimp biotechnology*, 161-166.

- Vincken, J.-P., Heng, L., de Groot, A., & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68, 275-297.
- Yang, C.-R., Zhang, Y., Jacob, M., Khan, S., Zhang, Y.-J., & Li, X.-C. (2006). Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1710-1714.
- Yang, C.-R., Zhang, Y., Jacob, M., Khan, S., Zhang, Y.-J., & Xing-Cong, L. (s.f.). *Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins*.
- Yoong Cheok, C., Karim Salman, H., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.