UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE ACUACULTURA

SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE CONCENTRACIONES DE EXTRACTOS NATURALES CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANTE E INMUNOESTIMULANTE SOBRE EL CAMARON *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*"

MARÍA GABRIELA AGURTO RODRÍGUEZ

2011

MACHALA – EL ORO – ECUADOR

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE ACUACULTURA

TESIS SOMETIDA A CONSIDERACIÓN DEL HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS COMO REQUISITO PREVIO PARA OPTAR AL GRADO DE

INGENIERO ACUACULTOR

TEMA:

SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE CONCENTRACIONES DE EXTRACTOS NATURALES CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANTE E INMUNOESTIMULANTE SOBRE EL CAMARON *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*

MARÍA GABRIELA AGURTO RODRÍGUEZ

2011

MACHALA – EL ORO – ECUADOR

Esta tesis ha sido aceptada en la forma presente por el tribunal de grado nominado por el Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, como requisito parcial para optar al grado de

INGENIERO ACUACULTOR

_____

Ing. Leonor Rivera Intriago

Director Sugerido

_____

Ph D. Jenny Rodríguez León

Co-Directora

_____

Dr. Patricio Rentería Minuche

Profesor Miembro

_____

Dra. Matilde Velasco Mayor

Profesor Miembro

AGRADECIMIENTO

Por la grandiosa protección, guía en mi cotidiano vivir a mi Dios, a mi Santísima Virgen.

A todos quienes de una u otra forma me han dado apoyo y ánimos para seguir adelante en mi superación profesional.

A mi familia por siempre apoyarme en cada decisión que he tomado, por estar siempre a mi lado ayudándome en lo que ha estado a su alcance a mis padres Martha y José porque nunca tuvieron un "no" ante lo que me proponía, porque siempre confiaron en que podría con el compromiso de nunca olvidar el resto de mis obligaciones.

A quien comparte momentos junto a mi desde hace muchos años, porque nunca hemos dejado de ser amigas desde que nos conocimos y siempre me ayudado en lo que ha podido, mi hermana Andreina.

A mi segunda madre y la vez tía Erika porque siempre ha tenido un consejo, cariño y apoyo para mí.

A mis Tíos Marcelo y Alicia, por ayudarme y apoyarme en lo que han podido.

A todos quienes dirigen CENAIM, por brindarme la oportunidad de ingresar a este centro a realizar mi Tesis.

De manera especial y sincera a mi Directora quien ha sido mi maestra y amiga la Ph.D. Jenny Rodríguez por cada enseñanza y consejo durante el lapso de mi tesis, por su apoyo y confianza para seguir incursionando en el mundo de la investigación.

De la misma manera al Mg. Ricardo Cedeño porque en el poco tiempo compartido junto a él fue también un gran maestro y amigo que compartió sus enseñanzas conmigo.

A mis maestros y amigos de corazón para quienes nunca existió un "NO" en su vocabulario ante una pregunta o petición de ayuda mía, a ustedes Rosita Malave, Cecilia Tomala y

Cristóbal Domínguez porque sin ustedes el entrenamiento de técnicas e inicio de mi tesis hubiera sido muy duro.

A la Dra. María Herminia Cornejo por su amistad y porque gracias a su ayuda llegue a este centro a realizar mi tesis aprender y a conocer grandiosas personas.

A quienes a más de ser mi compañeros de estancia han sido grandiosos amigos en el trayecto de mi tesis en CENAIM a Wilfrido Arguello y José Luis Vélez.

A lindas personas, buenos amigos y profesionales del centro a la Dra. Bonny, la Oceanógrafa Irma Betancourt, a María, Jessenia, Cindy, Rubén, Luis, Sandrita, Doris, Enma, Pascual, Solanda, Víctor, Fanny, y a Tito y su familia

A mis compañeros de estancia, amigos con quienes compartí tiempo, costumbres, vocabularios, experiencias de diario vivir y profesionales; a Catalina, Carlos, Ruth, Henry, Jessica, Daniela, MeyLin, Cony, José Luis, Silvana y Estefanía.

En mi universidad; a mi Directora la Ing. Leonor Rivera por su apoyo y colaboración, a los profesores miembros de mi Directorio el Dr. Patricio Rentería y a la Dra. Matilde Velasco al Director de Escuela Ing. Cesar Valarezo por confiar en mí y darme concejos para seguir adelante en mi tesis.

A mi amiga Pilar Sánchez por siempre ayudarme en lo que ha estado a su alcance en los papeleos dentro de la universidad, muchas gracias.

A todos y cada uno de ustedes gracias por ser parte del transcurso de mi Tesis.

DEDICATORIA

Porque son mi razón de superación cada día, porque cada obstáculo o caída desapareció debido a que siempre me inculcaron la palabra Superación.

A quien a amo y extraño y que ya desde el cielo me guía y protege mi mamita Regina.

A mis padres Martha y José

A mi hermana Andreina.

A mi segunda madre mi Tía Erika y su niña que es una hermanita más, Pauleth.

A mi viejito Benito Rodríguez.

Dedico este trabajo y esfuerzo a ustedes, ustedes que siempre estuvieron a mi lado y significan todo para mí, vida, fuerza, entusiasmo, fortaleza, inspiración.

ÍNDICE

Tema **páginas**

1. INTRODUCCIÓN 1

2. REVISIÓN DE LITERATURA 5

2.1 SISTEMA INMUNE 5

2.1.1. HEMOCITOS 6

2.1.2. REACCIONES INMUNOCELULARES 6

2.1.3. SISTEMA DE COAGULACIÓN 7

2.1.4. CASCADA PROTEOLÍTICA: SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PRO-FENOL OXIDASA (proPO) 8

2.1.5. PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) 9

2.1.6. DEFENSAS ANTIVIRALES 10

2.1.7. MECANISMOS LÍTICOS Y DEGRADATIVOS 11

2.2. DESARROLLO DE BACTERIAS EN CULTIVOS DE CAMARÓN 12

2.2.1. GÉNERO VIBRIO 13

2.2.2. GÉNERO PSEUDOMONAS 15

2.2.3. AEROMONAS 15

2.3. ACUICULTURA ORGÁNICA 15

2.3.1. EXTRACTOS NATURALES EN ACUICULTURA 16

2.3.2. EFECTO ANTIBACTERIALES DE PRODUCTOS NATURALES 16

2.3.3. EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE PRODUCTOS NATURALES 17

2.3.4. EFECTO ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS NATURALES 17

2.3.5. BIO-PRODUCTOS 18

2.3.5.1. Ajo (*Alliumsativum*) 18

2.3.5.2. Noni (*Morindacitrifolia*) 20

2.3.5.3. Orégano (*Oreganumvulgare*) 22

2.3.5.4. Té Verde (*Camelliasinensis*) 23

2.3.5.5. Arándano (*Vacciniummyrtillus*) 24

2.3.5.6. Astrágalus (*Astragalusmembranaceus*) 25

2.3.5.7. Propóleo 26

3. MATERIALES Y MÉTODOS 29

3.1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO 29

3.2. METODOLOGÍA 29

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO 29

3.2.1.1 Extractos Naturales 29

3.2.1.2. Cepas Bacterianas 31

3.2.1.3 Animales 32

3.2.2. EQUIPOS UTILIZADOS 32

3.3. MÉTODOS 33

3.3.1. Métodos de Análisis de Laboratorio 33

3.3.1.1. Evaluación de la Capacidad Antibacteriana de los Extractos 33

3.3.1.2. Evaluación de la Actividad Antioxidante e Inmunoestimulante de los Extractos 35

3.3.2. Métodos de Análisis Estadísticos 38

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39

4.1. Resultados 39

4.1.1. Resultados de Obtención de Extractos 39

4.1.2. Ensayos Antibacterianos 43

4.1.2.1. Concentración Mínima Inhibitoria 43

4.1.2.2. Concentración Mínima Bactericida 44

4.1.3. Ensayos Inmunitarios 44

4.1.3.1. Cuantificación del Anión Superóxido (O_2^-) por Reducción del NBT 44

4.1.3.2. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) 51

4.2. Discusión 55

5. CONCLUSIONES 61

6. RESUMEN 63

7. SUMMARY 65

8. BIBLIOGRAFÍA 67

9. ANEXOS 77

ÍNDICE DE CUADROS

Nº Cuadros **páginas**

1. Tipo de Hemocitos y sus características 6
2. Péptidos Antimicrobianos y su Actividad Antimicrobiana 10
3. *Vibrios* y sus características 14
4. Compuestos azufrados del Ajo y su actividad biológica 20
5. Bioquímica del Noni y su actividad biológica 21
6. Bioquímica del Orégano y su actividad biológica 23
7. Bioquímica del Té Verde y su actividad biológica 24
8. Bioquímica del Arándano y su actividad biológica 25
9. Bioquímica del Astrágalus y su actividad biológica 26
10. Bioquímica del Propóleo y su actividad biológica 27
11. Concentración de cada sustancia para neutralizar el producto 31
12. Bacterias y sus Características de aislamiento 31
13. Concentraciones de los productos a las que fueron evaluados 34
14. Concentraciones mínimas de los productos ensayados, que inhiben el crecimiento bacteriano (CMI). En ppm (extractos preparados como peso seco/volumen). En porcentajes productos que no han sufrido deshidratación previa 43
15. Concentración mínima bactericida de los productos ensayados. En ppm (extractos preparados como peso seco/volumen). En porcentajes productos que no han sufrido deshidratación previa 44

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº Figura **páginas**

1. Extractos de ajo. En a) Ajo en Solución Alcohólica; b) Ajo en Solución Acuosa (en movimiento) 40
2. Antibiograma con Arándano contra *V. Harveyi*. En a) Arándano en solución alcohólica; b) Arándano en solución acuosa 40
3. Extracto de Noni cocinado y Noni descongelado 41
4. Antibiogramas contra *V. Harvey*. En a) Halos de inhibición utilizando Orégano en solución acuosa y alcohólica, se puede observar que los halos son más extensos en la solución acuosa; b) Halos de inhibición utilizando Té verde en solución acuosa y alcohólica. Se puede observar que los halos son más extensos en la solución alcohólica 42
5. Antibiogramas contra V. Harvey utilizando propóleo. En a) el producto se colocó en discos de papel filtro; En b) El propóleo fue colocado en pocitos 42
6. Producción de Anión Superóxido con Ajo. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base 46
7. Producción de Anión Superóxido en presencia de noni. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base 47
8. Producción de Anión Superóxido en presencia de orégano. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base 48
9. Producción de Anión Superóxido en presencia de té verde. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base 49

10. Producción de Anión Superóxido en presencia de arándano. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base 50
11. Producción de Anión Superóxidoen presencia de Astrágalus. Además del Astrágalus se ensayó el β-glucano comercial MacroGard® 51
12. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Ajo 52
13. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Noni 52
14. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Orégano 53
15. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Té Verde 53
16. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Arándano 54
17. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Astrágalus 54

1. INTRODUCCIÓN

Durante siglos se han reportado enfermedades en los animales acuáticos, la mayoría de estas de origen no infeccioso o causadas por patógenos endémicos comunes (principalmente parásitos y bacterias). Sin embargo, debido al aumento del movimiento mundial de los animales acuáticos y sus productos, el crecimiento de la acuicultura interna y diversas fuentes de estrés antropogénico a los ecosistemas acuáticos, han dado lugar a la aparición de muchas nuevas enfermedades en camarones y peces. (Meter y James, 2010).

Las enfermedades infecciosas de origen bacteriano están entre las principales causas de mortalidad y pérdidas económicas en el cultivo de camarón y peces, de ahí que en el pasado se utilizaron varios antibióticos como agentes químicos para combatirlas. Sin embargo, su uso indiscriminado en la industria agropecuaria, acuicultura e inadecuados tratamientos clínicos humanos han originado un aumento de la prevalencia de la resistencia microbiana. Por otro lado, debido al incremento de la resistencia de las bacterias patógenas a los antibióticos se ha reducido la eficacia a los tratamientos dando como resultado que los productores apliquen dosis cada vez más elevadas. Esta resistencia también puede ser transmitida a otras bacterias ambientales, y a bacterias patógenas humanas.

La principal preocupación que existe desde la perspectiva de la salud humana está en el riesgo del desarrollo y transferencia de resistencia a los antibióticos, de bacterias patógenas presentes en los animales cultivados hacia los humanos. Este potencial riesgo ha originado que la mayoría de los antibióticos conocidos sean prohibidos por gobiernos y agencias internacionales, quedando su uso para acuicultura restringido a unos pocos.

En ese contexto existe gran interés por el cultivo de camarones y peces libres de químicos sintéticos, lo que ejerce presión sobre los productores para encontrar alternativas a los antibióticos. Esto a su vez genera un potencial económico para la producción y utilización de productos alternativos para acuicultura.

Un campo de creciente interés científico es el de los bioproductos de origen vegetal, de gran aceptación en la población debido a sus propiedades. El uso de productos naturales y/o

extractos de plantas para tratar enfermedades en acuicultura es limitado. En la literatura se ha reportado el uso del Ajo (*Allium sativum*) para el tratamiento efectivo de parásitos en peces, aliviando trichodiniasis en anguila (*Anguilla angilla)* y helmitis en carpa (*Cyprinus carpio*) (Madsen *et al*, 2000). La adición del extracto de hoja de *Ocimum sanctum* (Albaca morada)en peces mejoró su resistencia a *Aeromonas hydrophila* (Logambal *et al*, 2000). Jian y Wu (2003) reportaron un efecto inmunoestimulante e incremento en la resistencia a *Vibrio alginolyticus* en peces alimentados con balanceado conteniendo extracto de las raíces *Radix astragalin seu Hedysari* y *Radix angelicae sinensis*. Chansue *et al* (2000) reportaron un incremento de la respuesta inmune de Tilapia *Oreochromis niloticus* y una mayor resistencia a infecciones con *Aeromonas hydrophila* al ser tratados con el compuesto C-UPIII encontrando en diversas hierbas chinas. Cambell *et. al* (2001) investigaron la actividad fungicida de varios productos naturales contra hifas del hongo patogénico *Aphanomycetes invadens* encontrado en peces. Entre los productos ensayados se encontró que el extracto de la semilla de Neem (*Azadirachta siamensisi*) inhibía no solo el crecimiento de hifas, sino también la motilidad de las zooesporas, en concentraciones que no resultaron tóxicas para el pez silver barb (*Barbodes gonionotus*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

La actividad antiviral de 18 hierbas tailandesas tradicionales contra los virus patogénicos IHNV (Virus de la Necrosis Infecciosa Hematopoyética), OMV (Oncorhynchus Mosaic Virus) e IPNV (Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa) encontrados en peces fue demostrado en el trabajo de Direkbusarakom *et al* (1996). En la literatura también se reporta la eficiencia de hierbas medicinales con actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas de camarones del género *Vibrio sp*. Lográndose con su uso mejores supervivencias y crecimiento en juveniles de *Penaeus indicus*, y larvas de *Penaeus monodon*. La actividad antiviral de 5 hierbas medicinales *Phyllanthus* spp. Sobre el virus de la cabeza amarilla (YHV) en camarones *P. monodon* también fue investigada por Direkbusarakom *et al* (1996), encontrado inhibición de YHV en concentraciones de 0.1 a 1 mg/L respectivamente para las hierbas *Phyllanthus amarus* y *Phyllanthus urinaria* sin efectos de toxicidad sobre post-larvas de camarón en estos niveles.

Ciertos compuestos en la harina de maca (*Lepidium peruvianum*) tienen un efecto que mejora el crecimiento de los juveniles de trucha arco iris (*O. mykiss)*. Estos tienen una capacidad antioxidante que puede aumentar la resistencia contra el estrés y/o enfermedades (Kyeons-Jun Lee *et al.*, 2005).

Hierbas tales como *Cynodon dactylon*, *Longum piper*, *Phyllanthus niruri*, *Procumbens tridax* y *Zingiber officinalis* fueron extraídos, y ensayados contra el patógeno *Vibrio harveyi* aislado del Mero (*Epinephalus taurina)*; las dietas a base de estas hierbas incrementaron de forma significativa ($P < 0,05$) la supervivencia, el crecimiento y la respuesta inmune en comparación con el grupo control que no fue sometido a la dieta (Punitha *et al.*, 2008). Un estudio reveló que la alimentación con jengibre (*Zingiber officinale*) aumentó significativamente la tasa de crecimiento de la trucha arco iris (*O. mykiss*) y le dió resistencia contra *A. hydrophila.* (E J Nya y B Austin, 2009).

Algunos de los géneros vegetales mencionados por ser ricos en compuestos fitoquímicos que poseen amplia actividad antibacterial, antioxidante e inmunoestimulante se encuentran en Ecuador (*A. sativum, Phyllanthus, Morinda citrifolia)* y pueden ser ensayados *in vitro* e *in vivo*. Si bien muchos de ellos han sido ensayados en los humanos y en producción animal su aplicación en los cultivos es un campo aún por explorar a pesar de la creciente literatura sobre el efecto de productos fitoquimicos en especies bioacuaticas (Chakraborty y Hancz, 2011).

El propósito de esta investigación fue evaluar *in vitro* las propiedades Antibacteriales, Antioxidantes e Inmunoestimulantes de extractos de plantas (*A. sativum, M. citrifolia,* Propóleo, *Vaccinium myrtillus, Astragalus membranaceus, Origanum vulgare, Camellia sinensis*), para el tratamiento efectivo contra bacterias patógenas y/o incrementar los mecanismos de defensa del camarón. La información obtenida contribuirá al desarrollo de una "acuicultura orgánica", brindando una ventaja competitiva para el país en los mercados con crecientes demandas de seguridad alimentaria

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar y Evaluar concentraciones de extractos naturales con potencial actividad antibacterial, antioxidante e inmunoestimulante sobre el camarón *Litopenaeus vannamei*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Clasificar extractos naturales (en base a la literatura y a la disponibilidad local) según su actividad sobre bacterias patógenas y respuesta inmune de camarón *L. vannamei*.

2.- Evaluar y determinar *in vitro* las concentraciones adecuadas de los extractos naturales con actividad antibacterial sobre cepas bacterianas patógenas características en cultivos de *L. vannamei*.

3.- Evaluar y determinar *in vitro* las concentraciones adecuadas de los extractos con propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes en hemocitos de camarón

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Según un resumen de la revisión de Barracco *et al.,* (2008) en el ambiente natural acuático encontramos gran diversidad de microorganismos y múltiples virus, por lo que los crustáceos están en constante contacto con ellos y pueden transformarse en una gran amenaza para su supervivencia. Poseen un sistema inmune innato el cual puede protegerlos de la invasión de patógenos. La principal defensa que poseen los crustáceos es el exoesqueleto, el cual es una barrera fisicoquímica protectora; también poseen una capa quitinosa que reviste además todo el tracto digestivo. Este último tiene un ambiente ácido y lleno de enzimas el cual es capaz de inactivar y digerir la mayoría de los microorganismos invasores. Cuando estas barreras son traspasadas y no puede impedirse la penetración de los patógenos se desencadenan una serie de reacciones inmunitarias complejas con el objetivo de neutralizar y eliminar los agentes invasores.

2.1. SISTEMA INMUNE

En los crustáceos se ha identificado solamente un sistema inmune innato. Además poseen un sistema circulatorio de tipo abierto o semi-abierto; por el que circula un fluido denominado hemolinfa el cual transporta continuamente nutrientes, excretas, oxigeno, hormonas y otras moléculas importantes para los diferentes órganos; además de contener todos los componentes del sistema inmune.

La hemolinfa está compuesta por una fracción celular, representada por células circulantes o hemocitos y por una fracción liquida que es el plasma el cual contiene diferentes factores humorales. Los principales sistemas de defensa actualmente reconocidos en los crustáceos son:

a) coagulación de la hemolinfa;

b) melanización mediada por el sistema Pro-fenol oxidasa (proPO);

c) reconocimiento y aglutinación celular mediados por las lectinas;

d) sistemas antibacterianos, antifúngicos y antivirales mediados por los péptidos antimicrobianos, RNA de interferencia y por proteínas de reconocimiento patrón;

e) producción de formas reactivas de oxígeno y nitrógeno; y

f) sistema fagocítico y de encapsulamiento.

2.1.1. HEMOCITOS

Los hemocitos participan básicamente en las respuestas inmuno celulares de los crustáceos, como son la fagocitosis de microorganismos, formación de cápsulas y nódulos alrededor de los agentes invasores; además están involucrados en los mecanismos citotóxicos y/o degradativos intracelulares, los que degradan y eliminan a los patógenos. Dentro de las vesículas o gránulos de ciertos tipos de hemocitos se almacenan muchas moléculas microbicidas, mientras que otras son liberadas en la hemolinfa para actuar en las cascadas inmunológicas.

Los hemocitos también participan en la reparación de heridas, esclerotización de la cutícula y se cree que también intervienen en el metabolismo y el transporte de carbohidratos (Jiravani chpaisal *et al*., 2006).

En los crustáceos usualmente se reconocen y describen tres tipos de hemocitos:

Cuadro 1. Tipo de Hemocitos y sus características.

Tipos de Hemocitos	Características
Hemocitos hialinos	-Principales células fagocitarias
Hemocitos semi-granulares	-Formación de capsulas
Hemocitos granulares	-Participan en el sistema de almacenamiento y la liberación de la Profenoloxidasa y la citotoxicidad

2.1.2. REACCIONES INMUNO CELULARES

Al darse una invasión por microorganismos los hemocitos migran al foco de infección y participan en las reacciones inmuno celulares, como son:

- *Fagocitosis*; el agente extraño es envuelto dentro de un fagosoma, el cual es fusionado con las vesículas/gránulos que se encuentran en el citoplasma. Dada la fusión se liberan en las vacuolas fagociticas una variedad de compuestos degradativos y antimicrobianos.

Cuando la fagocitosis no puede ser posible debido a que se ha dado una invasión masiva de agentes extraños o por patógenos de gran tamaño, se desencadena la formación de nódulos y capsulas celulares.

- F*ormación de capsulas* consiste en la agregación de varias capas de hemocitos alrededor del patógeno de gran tamaño, promoviendo que sea atrapado en los tejidos del hospedero para su destrucción.
- F*ormación de nódulos* se da alrededor de una gran cantidad de microorganismos invasores, los que también son capturados dentro de agregaciones celulares tal como las capsulas.

La formación de capsulas y de nódulos limitan las respuestas inmunes solamente en la zona invadida, lo que ayuda a proteger los tejidos del huésped de daños causados por las moléculas tóxicas y degradativas producidas durante el proceso inflamatorio.

2.1.3. SISTEMA DE COAGULACIÓN

La coagulación de la hemolinfa es un mecanismo inmune esencial para la supervivencia. Ella previene tanto la pérdida de la hemolinfa, como la diseminación de los patógenos por la cavidad corporal del animal. Son reconocidos dos diferentes mecanismos de coagulación (Theopold *et al.,* 2004; Jiravani chpaisal *et al.,* 2006).

El primero es una cascada proteolítica activada por componentes microbianos, como LPS y β-1,3-glucanos (Kawabata *et al.,* 1996); y el segundo es una reacción de coagulación dependiente de la enzima transglutaminasa (TGasa).

Un componente clave en el proceso de la gelificación del plasma es la proteína de coagulación (CP) que forma coágulos estables por medio de una reacción de unión cruzada entre sus moléculas.

2.1.4.CASCADA PROTEOLÍTICA: SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PRO-FENOL OXIDASA (proPO).

La formación de nódulos y capsulas hemociticas es acompañada por una reacción denominada melanización la cual es observada en la cicatrización de heridas, donde la coagulación de hemolinfa y migración de hemocitos a la zona de lesión forman un tapón celular hasta que se reconstituye una nueva cutícula.

La biosíntesis de la melanina comprende una seria de reacciones químicas en cascada, denominadas "sistema de activación de la Pro-fenol oxidasa o sistema proPO", reconocida como la principal respuesta inmunoefectora desencadenada por componentes de la superficie de microorganismos como los LPS de bacterias Gram-negativas y los β1,3-glucanos de hongos (Cerenius y Söderhäll, 2004).

Estos compuestos durante las infecciones se unen a receptores presentes en los hemocitos granulares directamente o a través de PRPs (del inglés, pattern-recognition proteins), plasmáticas e inducen una degranulación o exocitosis regulada, con la liberación de varias moléculas inmuno efectoras, entre las cuales están las moléculas del sistema proPO. Una vez liberadas, ocurre la activación de este sistema por los propios componentes de los microorganismos presentes en el hemocele.

La activación de la forma inactiva o proPO hacia la enzima activa o fenol oxidasa (PO), ocurre por la acción de serino-proteasas denominadas enzimas activadoras de la proPO (del inglés, proPO-activating-cascade enzymes o PPAEs), iniciando una cascada proteolítica cuyo producto final es la melanina. La ppA es sintetizada y mantenida como un zimógeno (pro-ppA) en los hemocitos, siendo activada luego de su exocitosis, como consecuencia de una lesión o infección microbiana. Su activación ocurre por un clivaje proteolítico, por parte de una proteasa aún desconocida (Cerenius y Söderhäll, 2004).

El sistema proPO genera transitoriamente moléculas altamente toxicas, como las quinonas, hemiquinonas y radicales libres de oxígeno, como las propias ROIs, una vez que ocurre consumo de oxigeno molecular y llevan a la destrucción de los patógenos invasores.

La melanina parece tener una actividad fungistática (Cerenius y Söderhäll, 2004) y puede además funcionar como "scavenger" de radicales libres (Nappi y Vass, 1993; Nappi y Ottaviani, 2000), minimizando así los efectos deletéreos de estas moléculas altamente tóxicas para el organismo del hospedero.

La melanina no es la molécula inmunoefectora más importante durante la activación del sistema proPO, siendo los compuestos citotóxicos intermedios los más efectivos (Nappi y Vass, 1993).

2.1.5. PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (AMPs).

Los AMPs son componentes esenciales del sistema inmune innato. Son sintetizados en los hemocitos y almacenados en sus gránulos (Bachère *et al.,* 2004).

Los diferentes AMPs, caracterizados hasta el momento, tienen una actividad inhibitoria rápida y potente contra un amplio espectro de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos filamentosos, levaduras, y en algunos casos también contra virus y protozoarios (Bachère *et al.,* 2004; Reddy *et al*., 2004).

Gran parte de ellos se destacan por sus características anfipáticas, presentando una región altamente catiónica y una región hidrofóbica, lo que facilita su interacción e inserción en los fosfolípidos aniónicos presentes en la cara externa de las membranas de muchos microorganismos (Bulet *et al*., 2004).

También pueden insertarse en la bicapa lipídica, formando grandes poros lo que llevan a un flujo descontrolado de solutos y extravasación del contenido citoplasmático, resultando en la muerte del microorganismo.

En camarones penaeidos, tres familias de AMPs han sido descritas y caracterizadas a partir de los hemocitos:

- ✓ Peneidinas (Destoumieux *et al.,* 1997),
- ✓ Crustinas (Gross *et al*., 2001; Bartlett *et al*., 2002),
- ✓ Factores anti-lipopolisacáridos (ALFs) (Gross *et al.,* 2001; Supungul *et al.,* 2002).

Cuadro 2. Péptidos Antimicrobianos y su Actividad Antimicrobiana

Péptido Antimicrobiano	Actividad Antimicrobiana
Factores anti-lipopolisacaridos	Bacterias Gram negativas y Gram positivas
Crustina	Hongos filamentosos Bacterias Gram negativas y Gram positivas
Peneidinas	Bacterias Gram positivas Hongos filamentosos

2.1.6. DEFENSAS ANTIVIRALES

Los crustáceos poseen un sistema inmune innato, por lo que se encuentran desprovistos de una línea celular linfocítica, siendo así pueden contar con los siguientes mecanismos antivirales:

a) sistema interferón (IFN). Son simples proteínas con la capacidad de interferir en la replicación viral y en inducir un estado antiviral en el hospedero; estas proteínas del sistema IFN eran consideradas moléculas presentes desde los cordados inferiores hasta los mamíferos (Krause y Pestka, 2005). Robalino *et al.* (2004) demostraron que la inyección de secuencias inespecíficas de dsRNA en camarones, causaba un aumento significativo de su resistencia a la infección de dos virus el TSV y el WSSV. La inducción de un estado antiviral inespecífico, independiente de la secuencia de dsRNA inyectada es semejante al estado antiviral por los IFNs de mamíferos.

Westenberg *et al*. (2005) demostraron que pequeños RNAs de doble cadena de interferencia (siRNA: del inglés, small interference RNA) eran capaces de inducir una protección antiviral

b) *sistema RNA de interferencia* (RNAi). El mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes, conocido por RNA de interferencia o RNAi (Hannon, 2002, Robalino *et al*., 2007a); representa un mecanismo de defensa natural contra virus y transposones, presente en los diferentes seres vivos (Hannon, 2002). La protección antiviral basada en la vía RNAi puede ser inducido experimentalmente tanto por inyección de dsRNA, como por suministro vía oral o por expresión transgénica (Grishok, 2005).

2.1.7. MECANISMOS LÍTICOS Y DEGRADATIVOS

En la fagocitosis además de desarrollarse la reacción inmune celular se da la producción y liberación de moléculas muy tóxicas que ayudan en la muerte y degradación de los agentes invasores. Aquí ocurre un gran aumento del consumo de oxígeno a nivel intracelular conocido como choque respiratorio, que da como resultado la producción de radicales intermediarios altamente reactivos tanto de oxigeno (en inglés ROIs) como de nitrógeno (en inglés RNIs). (Anderson, 1996; Roch, 1999 y Bogdan *et al.*, 2000).

Los ROIs, radicales de oxigeno poseen electrones libres o no pareados en su órbita más externa, esto les confiere una elevada capacidad de reaccionar con las estructuras y compuestos próximos, como las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos.

La producción de esos radicales está ligada a la activación de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase), el que es activado por componentes microbianos, tales como los lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas de bacterias y β-glucanos de hongos (Bogdan *et al.*, 2000). La activación de la NADPH oxidasa resulta en la reducción del oxígeno molecular al anión superóxido (O_2^-), que puede dismutarse, espontáneamente o a través de la enzima intracelular superóxido dismutasa (SOD), en peróxido de hidrogeno (H_2O_2) el cual es un compuesto igualmente tóxico (Warner, 1994). El O_2^- puede también ser convertido en otros componentes citotóxicos, como el radical hidroxilo (OH^-) y en aniones hidroxilo (OH^-) por la reacción de Haber-Weiss o, luego de la dismutación en H_2O_2, en ácido hipocloroso (HOCl), singlet de oxigeno ($^1O_2$) y en cloraminas por la acción de la mieloperoxidasa (MOP) (Bogdan *et al.*, 2000).

Los RNIs, como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (ONOO-) que resultan de la reacción entre el NO y el anión superóxido (Anderson, 1996; Murphy *et al*., 1998), son altamente citotóxicos y microbicidas (Kröncke *et al*., 1997). La producción de estas moléculas para la destrucción de los patógenos invasores también puede provocar graves daños a los tejidos; es por eso que el hospedero cuenta básicamente con tres mecanismos de protección o defensa antioxidantes.

Los primeros incluyen la presencia de enzimas intracelulares como las enzimas antioxidantes SOD, catalasa y la glutotiona peroxidasa, capaces de degradar/neutralizar a las ROIs, también las enzimas de reparación que pueden restablecer los daños provocados por las ROIs en el DNA, membranas y proteínas del hospedero (Warner, 1994).

El otro mecanismo es la acción de compuestos antioxidantes de origen exógeno, como el ácido ascórbico (vitamina C), la glutationa y el α-tocoferol (vitamina E), que pueden interactuar directamente con los radicales libres neutralizándolos o interactuando directamente con ellos (Warner, 1994).

2.2. DESARROLLO DE BACTERIAS EN CULTIVOS DE CAMARÓN.

En un estanque de cultivo existen factores ambientales como son: temperatura, salinidad, oxigeno, pH, nutrientes orgánicos e inorgánicos, los cuales influyen en las comunidades bacterianas presentes en los estanques, ya que estas son susceptibles a las fluctuaciones ambientales en el cultivo, dando como resultado en muchas ocasiones un aumento en el número de bacterias o haciendo que proliferen patógenos provocando mortalidades en los organismos cultivados.

Es necesario mantener los parámetros óptimos para que las poblaciones bacterianas se mantengan estables, así como también es indispensable la aplicación correcta de alimentación y el mantenimiento del florecimiento de algas para una buena calidad del agua y de fondos.

En los cultivos de camarón en el continente americano una de las principales enfermedades que afectan son las de origen bacteriano, siendo las Gram negativas las que predominan en el ambiente marino. Estas son localizadas principalmente en el tracto digestivo, branquias y cutícula de camarones penaeidos y ocasionalmente en hemolinfa. En presencia de otros factores estresantes, pueden desencadenar el desarrollo de infecciones en los organismos. Este tipo de bacterias causa infecciones letales al interactuar con factores nutricionales, bióticos, abióticos, genéticos e inmunitarios. Entre las especies causantes de altas mortalidades en camaroneras se encuentran las del genero *Vibrio*: *Vibrio parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. harveyi,* y *Photobacterium daunselae, Protobacterium damsela, V.splendidus,Vibrio* sp., y *V. fluvialis.*

Otras bacterias causantes de enfermedades son las bacterias de género *Pseudomonas* y la bacteria *Aeromonas.*

2.2.1. GÉNERO VIBRIO

Son de forma recta o barras curvas, 0.5-0.8 µm de ancho y 1,4-2.6 µm de longitud. Gram negativas. Móviles por uno o más flagelos polares que están encerrados en una vaina continua con la membrana externa de la pared celular.

Anaerobios facultativos. Quimioorganotrofas, teniendo un tipo respiratorio y del metabolismo fermentativo. La temperatura óptima varía considerablemente, crecen a 20°C, y tienen más crecimiento a 30°C. Se encuentran en hábitats acuáticos, con una amplia gama de salinidades. Muy común en la superficie de ambientes marinos estuarinos, además en el contenido intestinal de los animales marinos. Algunas especies también se encuentran en el agua dulce. Algunas especies son patógenas para los seres humanos, y varias especies son patógenas para los vertebrados e invertebrados marinos (Bergey 1994)

Cuadro 3. *Vibrios* y sus características

Características	***V. harveyi***	***V. parahaemolyticus***	***V. vulnificus***
3-12 flagelos polares	-	-	-
Flagelos laterales en medios sólidos	+	+	-
Barras rectas	+	+	-
Acumulación de PHB	-	-	-
Pigmento	-	-	-
Dihidrolasa Arginina	-	-	-
Oxidasa	+	+	+
Reducción de Nitrato	+	+	+
Luminiscencia	d	-	-
D-Glucosa,gas	-	-	-
Acetoína y/o la producción de diacetileno	-	-	-
Na necesario para el crecimiento	+	+	+
Requerimiento de factor de crecimiento orgánico	-	-	-
Crecimiento 4ºC	-	-	-
Crecimiento 30ºC	+	+	+
Crecimiento 35ºC	+	+	+
Crecimiento 40ºC	d	+	+

+ 90% o más de las cepas son positivas

- 90% o más de las cepas son negativas

d 11-89% de las cepas son positivas

v la inestabilidad de tensión (no equivale a "d")

D reacciones diferentes en los diferentes taxones (especies de un género o géneros de la familia)

2.2.2. GÉNERO PSEUDOMONAS.

Son de forma recto o ligeramente curvos, pero no helicoidales 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm. Gram negativas. La motilidad se produce por uno o varios flagelos polares, rara vez son inmóviles. En algunas especies flagelos laterales de menor longitud de onda también se pueden formar. Son Aeróbicas, pero en algunos casos puede utilizar el nitrato como aceptor alternativo d oxígeno lo que las hace de crecimiento anaerobio. Gran parte de las especies crecen en condiciones de acidez (pH 4.5). La mayoría de las especies no requieren factores de crecimiento orgánico. Algunas especies son quimiolitotrofos facultativos, capaces de usar H2 o CO como fuentes de energía. Ampliamente distribuido en la naturaleza. Algunas especies son patógenas para los seres humanos, animales o plantas (Bergey 1994).

2.2.3. AEROMONAS.

Son barras rectas con los extremos redondeados, acercándose a una forma esférica, 0,3 a 1,0 µm de diámetro y 1,0 -3,5 µm de longitud. Se presentan solas, en parejas o cadenas cortas. Gram negativas. Por lo general móviles por un único flagelo polar. Anaerobios facultativos. Quimioorganotrofas, teniendo una respiración y un tipo de metabolismo fermentativo. La temperatura óptima es de 22-28º C, la mayoría de las especies se desarrollan bien a 37º C, pero algunas cepas no. Están presentes en agua dulce y aguas residuales. Algunas especies son patógenas para las ranas, peces y seres humanos (Bergey 1994)

2.3. ACUICULTURA ORGÁNICA.

Debido a que las personas consumen productos orgánicos bajo la creencia de que son seguros y buenos para la salud humana y ambiente, el mercado de los productos orgánicos tiene un crecimiento rápido (Milstein y Lev, 2004); y por ende la producción orgánica es una tendencia en la producción de alimentos, a esto se une la disminución de las capturas pesqueras, el incremento del consumo de alimentos de origen acuático lo que ha inducido a la intensificación de la acuicultura orgánica.

Según las proyecciones de FAO (Citado por Lockwood *et al*., 2005) indican que la producción de la acuicultura orgánica para el año 2030, se incrementará 230 veces. Por lo cual se debe prestar mayor interés a la acuicultura orgánica ya que tiene un gran potencial de

desarrollo debido al interés de los consumidores en alimentos producidos y procesados de forma segura y amigable con el ambiente.

En la actualidad, países como Estados Unidos, Japón, Unión Europea y Canadá vienen estableciendo estándares para la producción de la acuicultura orgánica. En tanto los países que viene produciendo y certificando productos de la acuicultura orgánica son Australia, Canadá, Chile, Ecuador, Indonesia, Nueva Zelanda, Perú, Tailandia y Vietnam (El-Hage y Hattam, 2003).

2.3.1. EXTRACTOS NATURALES EN ACUICULTURA

El sector acuícola y los productores de alimento desde algunos años atrás han recurrido al uso de productos naturales; demanda que se hace cada vez mayor conforme el tiempo pasa, ya que su uso es más seguro para la producción. La variedad de productos naturales es cada vez más amplia y sus derivados cumplen y satisfacen las necesidades de los productores y consumidores, ya que se ofrece un producto seguro que contribuye a la salud animal, a la seguridad alimentaria y a una acuicultura orgánica. Los productos naturales presentan diferentes propiedades beneficiosas, entre las cuales en la presente investigación se analizara las propiedades antibacteriales, inmunoestimulantes y antioxidantes.

2.3.2. EFECTO ANTIBACTERIALES DE PRODUCTOS NATURALES.

Las enfermedades infecciosas constituyen un factor importante que limita considerablemente el potencial productivo y comercial de la industria acuícola (Torreola JJ. 1998). La quimioterapia se utiliza ampliamente para el control de las enfermedades infecciosas parasitarias, bacterianas y micóticas. Fitomedicamentos de origen vegetal son una gran promesa en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Actualmente se emplean plantas medicinales que incluyen gran variedad de algas tanto de agua dulce como de ambientes marinos(Lima *et al., 2002)*.Se ha demostrado que las algas marinas de diferentes especies poseen alto efecto bactericida contra *Alteromonas macleodii, A. rubra, Amundina, Chromobacterium, Flavobacterium* spp, *Pseudomonas* spp, y *Vibrio* spp (Austin & Billaud. 1990).

Otros extractos obtenidos de algas han demostrado potente efecto sobre el crecimiento y supervivencia bacteriana, asi como propiedades antimicrobianas contra patogenos de organismos acuaticos (Immanuel *et al.,2004*).

Entre las plantas superiores con propiedades antibacteriales se han mencionado las especies *Allium*, noni (*M. citrifolia*), tomillo (*Thymus vulgaris*), romero (*Rossmarinus officinalis*), salvia (*Salvia officinalis*), bálsamo de limón (*Melissa officinalis*), albahaca (*Ocinimum basilicum*), milenrama (*Achillea millefolium*), clavo (*Syzygium aromaticum*), granada (*Punica granatum*), jambolan (*Syzygium cumini*), y guayaba (*Psidum guajaba*), asi el extracto crudo del pimiento rojo (*Capsicum frutescens*), limón (*Citrus limon*), y pera (*Opuntia vulgaris)*(Garcia y Herrera, 2007;Yanine, 2005;Nascimento, *et al.*, 2002.; Mtambo *et al.*, 2002).

2.3.3. EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE PRODUCTOS NATURALES.

En la acuicultura se han utilizado inmunoestimulantes como coadyuvantes del sistema inmune de los crustáceos (Villarreal, 2000). Las sustancias inmunoestimulantes tienen la cualidad de alertar al sistema inmune no específico y son por regla general patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) extraídas de las paredes de microorganismos, como bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos "LPS"), bacterias Gram positivas (péptidosglicanos) y de hongos, levaduras, algas (ß-glucanos), y plantas. Por lo tanto estas moléculas se consideran naturales por su procedencia, además de tener la característica de activar las respuestas: humoral (sistema proPO, proteínas antimicrobianas y lectinas), y la celular (la fagocitosis, la nodulación y la encapsulación (Raa, 2003).

Entre las especies de plantas que poseen efectos inmunoestimulantes según la literatura encontramos *Astragalus radix* (Guojun Yin *et al., 2005), M. citrifolia* (Hirazumi, *et al.*, 1996).

2.3.4. EFECTO ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS NATURALES.

Se ha sugerido que la energía alimentaria se dirige hacia la muda, crecimiento y con prioridad hacia la supervivencia (Gore, 1985). La presencia de antioxidantes naturales en las dietas de crustáceos debe actuar como estimuladora del crecimiento al disminuir la concentración de radicales libres y los trastornos que se derivan de su presencia en el organismo.

Entre los antioxidantes naturales más importantes se encuentran las vitaminas E y C y los carotenoides. Los minerales selenio, zinc y cobre también juegan un importante papel por su función como cofactores de las enzimas que participan en los procesos de oxidación-reducción.

Varios estudios sobre la actividad antioxidante de aceites esenciales han reportado que algunas plantas ricas en timol y carvacrol tienen efecto antioxidante entre las cuales se describe el Oregano (*O. vulgare),* Tomillo real *(Satureja hortensis L.),* Hisopillo (*Satureja montana L*)., Tomillo aguja (*Thymbra spicata*)(Montoya., *et al* 2007)*;* también las frutas del género *Vaccinium* (*Vaccinium meridionale*) tienen una amplia aceptación y demanda por sus propiedades antioxidantes y compuestos fenólicos (Sheng Su., *et al* 2006).

2.3.5. BIO-PRODUCTOS.

Gracias a la literatura encontrada en publicaciones de artículos científicos podemos describir algunas especies vegetales que tienen potenciales actividades antibacterianas, antioxidantes e inmunoestimulantes que pueden ser utilizadas en los cultivos de camarón.

2.3.5.1. Ajo *(Allium sativum)*

Clasificación Científica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Amaryllidaceae

Subfamilia: Allioideae

Tribu: AllieaeGénero: *Allium*

Especie: *A. sativum*

Su nombre botánico *A. sativum* procede de la palabra celta *all*, que significa caliente o ardiente y *sativum*, término latino que significa cultivado. Esta planta es originaria de Asia

Central, desde allí se extendió hacia el Este hasta alcanzar China y hacia el Oeste en dirección a Europa.

Composición química del ajo: El análisis de la composición química de la parte comestible del ajo arroja una riqueza importante en hidratos de carbono (cerca del 30%) y proteínas (aproximadamente 6%), su riqueza mineral está constituida por potasio, fosforo, magnesio, zinc, yodo, y dentro del contenido vitamínico se destacan las vitaminas del grupo B, como la B1, B3, B6, con cantidades pequeñas de vitamina C y E. Además están contenidas sales de selenio, azucares, lípidos, saponosidos, terpenos, enzimas, flavonoides y otros compuestos fenólicos (García y Sánchez, 2000).

Las cualidades químicas características del ajo y sus propiedades saludables se deben en realidad a 33 compuestos organosulfurados que podrán depender de la zona donde se cultiven (Ngo *et al.,* 2007), entre los cuales se destaca la aliina, la cual por si misma constituye hasta un 0.24% del peso global del ajo. Esta sustancia es poco olorosa y con mínimos efectos terapéuticos, sin embargo, cuando se corta o machaca el ajo, la aliina entra en contacto con la enzima alinasa (alrededor del 1% del diente de ajo) (Block, 1985; Santoyo), dando como resultado la Alicina la cual muestra un amplio espectro bactericida contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

El aceite esencial del ajo que se obtiene por arrastre de vapor no posee propiedades bactericidas o antitrombóticas, pero si propiedades antioxidantes (García y Sánchez, 2000).

Bioquímica del Ajo: Los efectos antimicrobianos del ajo son conocidos desde la antigüedad. La sustancia activa más importante es la alicina, la cual tiene efectos inhibitorios potentes sobre ciertas enzimas como las cistein-proteinasas y alcohol-deshidrogenasas, las cuales cumplen papeles importantes en las infecciones por hongos, bacterias y virus (García y Sánchez, 2000).

Cuadro 4. Compuestos azufrados del Ajo y su actividad biológica

Compuesto	Posible actividad biológica
Aliína	Hipotensora, hipoglucemiante
Ajoeno (ajocisteína)	Previene la formación de coágulos, ayuda a disolverlos.
	Anti-inflamatorio, vasodilatador, hipotensor, antibiótico.
Alicina y Tiosulfinatos	Antibiótica, antifúngica, antiviral
Alil mercaptano	Hipocolesterolemiante, previene la aterosclerosis, antitumoral, antidiabética, hipotensora.
Sulfuro de dialilo y afines	Hipocolesterolemiante. Aumenta la producción de enzimas desintoxificantes. Anticancerígeno. Previene los daños químicos del DNA.
S-alil cisteína y compuestos al y-glutámico	Hipocolesterolemiantes, antioxidantes, quimioprotectores frente al cáncer. Favorecen la acción desintoxicante del hígado frente a sustancias químicas.

2.3.5.2. Noni (*Morinda citrifolia*)

Clasificación Científica

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Gentianales
Familia: Rubiaceae
Subfamilia: Rubioideae
Tribu: Morindeae
Género: *Morinda*Especie: *M. citrifolia*

Composición química del Noni: Se han identificado varios componentes principales en el Noni entre los que se encuentran el ácido octoanoico, potasio, vitamina C, terpenoides, alcaloides, antraquinonas tales como el nordamnacantal, la morindona, la rubiadina, la rubiadina-1-metil éter y el glicósido de antraquinona. Entre sus componentes también se incluyen el betasitosterol, el caroteno, la vitamina A, ácido linoleico, alizarina, aminoácidos, acubina, L-asperulósido, ácido caproico, ácido caprílico, ácido ursólico, rutina y una posible proxeronina (Levant *et al.*,1979; Heinicke, 1985).

Un grupo de investigación en la Universidad de Rutgers, EE.UU., ha reportado la identificación en las hojas del Noni, de varios nuevos glucósidos del flavonol y un glucósido iridoide, así como un éster trisacárido de ácido graso y un ácido asperulosídico en el fruto (Wang *et al.*, 1999; Wang *et al*., 2000).

Cuadro 5. Bioquímica del Noni y su actividad biológica.

Compuesto	Posible actividad biológica
Terpenos	Rejuvenecimiento celular
Norepinefrina (derivado de la Adrenalina)	Estimula el sistema nervioso simpático
Damnacanthal	Combate el cáncer
	Estimula la actividad del sistema inmune
Proxeronina	Da mayor energía física y mental
	Previene o mejora males que afectan y aumenta la vitalidad
Escopoletina	Actividad antihipertensiva, antiinflamatoria y antihistamínica
Fitonutrientes y Selenio	Protectores antioxidantes contra radicales libres

2.3.5.3. Orégano *(Origanum vulgare)*

Clasificación Científica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Tribu: Mentheae

Género: Origanum

Especie: lippi alba

Nombre binomial: *Origanum vulgare*

O. vulgare, comúnmente orégano, es una herbácea perenne aromática del género *Origanum*, muy utilizada en la cocina mediterránea. Son las hojas de esta planta las que se utilizan como condimento tanto secas como frescas, aunque secas poseen mucho más sabor y aroma.

Química del Orégano: Entre los compuestos químicos del Orégano, se han identificado: compuestos fenólicos (Sahin F. *et al*., 2004; Chun S. *et al.*, 2005), flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En *O. vulgare* se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, r-hidroxibenzóico y vainillínico. Los aceites esenciales de especies de Lippia contienen limoneno, β-cariofileno, r-cimeno, canfor, linalol, a-pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo.

Los principales quimiotipos de la especie *O. vulgare* son el carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) y el timol (5-metil-2-isopropilfenol) cada una con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis.

Cuadro 6. Bioquímica del Orégano y su actividad biológica

Compuesto	**Actividad biológica**

Aglicona, Aceites esenciales, ácido caféico y rosmarínico, carvacrol.	Actividad antioxidante
Aceite esencial, carvacrol, timol	Actividad antimicrobiana
Aceite esencial	Efecto antiparasítico
Flavonoides	Acción estrogénica
Aceite esencial (carvacrol y timol)	Actividad insecticida

2.3.5.4. Té Verde *(Camellia sinensis)*

Clasificación científica

Reino: PlantaeDivisión: Magnoliophyta

Clase: MagnoliopsidaOrden: EricalesFamilia: Theaceae

Tribu: Theeae

Género: *Camellia*

Especie: *C. sinensis*

Química del Té Verde: La composición química del té verde es compleja: las proteínas (15-20% peso seco), cuyas enzimas constituyen un importante fracción, aminoácidos (1-4% del peso seco) como teanina o 5-N-ethylglutamine, ácido glutámico, triptófano, glicina, serina, ácido aspártico, tirosina, valina, leucina, treonina, arginina, lisina y, hidratos de carbono (5-7% del peso seco), como la celulosa, pectinas, glucosa, fructosa y sacarosa, sales minerales y oligoelementos (5% peso seco), tales como calcio, magnesio, cromo, manganeso, hierro, cobre, zinc, molibdeno, selenio, sodio, fósforo, cobalto, estroncio, níquel, potasio, flúor y aluminio, y pequeñas cantidades de lípidos (ácidos linoleico y a-linolénico), esteroles (estigmasterol), vitaminas (B, C, E), bases xánticas (cafeína, teofilina), pigmentos (clorofila, carotenoides), y compuestos volátiles (aldehídos, alcoholes, ésteres, lactonas, hidrocarburos).Además, hay ácidos fenólicos como los ácidos gálico y características aminoácidos como la teanina presente

El té verde contiene polifenoles, que incluyen los flavonoides, flavandiols, flavonoides y ácidos fenólicos, los cuales compuestos pueden representar hasta el 30% de la seca de peso. La mayoría de los polifenoles del té verde (GTPs) son flavonoles, comúnmente conocidos

como catequinas. Productos derivados del té verde son principalmente los extractos de té verde en forma líquida o en polvo, que varían en la proporción de polifenoles (45-90%) y el contenido de cafeína (0.4 a 10%). Los principales flavonoides del té verde son las catequinas diferentes, que se encuentran en mayores cantidades en el té verde. (Chacko *et al.*, 2010)

Cuadro 7. Bioquímica del Té Verde y su actividad biológica

Compuesto	Actividad biológica
Polifenoles	Actividad antioxidante, anticancerígena e incluso antibiótica, y previene enfermedades cardíacas y del hígado.
Minerales y vitaminas	Potencial antioxidante, previene cáncer

2.3.5.5. Arándano *(Vaccinium myrtillus)*

Clasificación Científica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: MagnoliopsidaOrden: EricalesFamilia: EricaceaeSubfamilia: Vaccinioideae

Tribu: Vaccinieae

Género: *Vaccinium*

Especie: *V. myrtillus*

Arbusto de 0.30 a 0.60 m con tallos ramosos verdes; flores blancas o rosas; el fruto es una baya de color rojo que al madurar se vuelve azul oscuro; rizoma en red muy densa. Crece, en bosques húmedos y montes silíceos de Europa central y septentrional, Asia y América del Norte, frecuentemente en masa sin dejar lugar a la concurrencia de otras especies vegetales.

Composición Química del Arándano: Varios componentes activos se han aislado de las vallas y las hojas de la planta de arándano, incluyendo flavonoides antocianósidos (antocianinas), vitaminas, azúcares y pectinas, que se encuentran en las vallas, y quercetina, catequinas, taninos, iridoides, y ácidos (Alternative Medicine Review). Los antocianósidos

son considerados los más importantes de los componentes farmacológicamente activos. La concentración de antocianósidos en la fruta fresca es aproximadamente de 0,1 a 0,25 %.3

Cuadro 8. Bioquímica del Arándano y su actividad biológica

Compuesto	Actividad biológica
Antocianósidos	Actividad vasoprotectora, Antioxidante
Taninos	Acción astringente
Quercetina	Anticancerígeno

2.3.5.6. Astrágalus *(Astragalus membranaceus)*

Clasificación Científica

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Fabales
Familia: Fabaceae
Subfamilia: Faboideae
Tribu: Galegeae
Género: *Astragalus*
Especie: *A. propinquus*
Sinónimos:

- *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge
- *A. membranaceus* var. mongholicus (Bunge)P.K.Hsiao
- *A. propinquus* Schischkinvar. glabraVydr.
- *Phacamembranácea*

El astrágalo es una planta perenne nativa del norte de China. En todo el mundo existen aproximadamente unas 2000 variedades distintas, pero la oriunda de China es la que se ha estudiado más exhaustivamente. La porción utilizada en la fito-farmacopea es la raíz de cuatro a siete años de edad la misma que debe ser cosechada en primavera y desecada.

Composición Química del Astrágalus: Los principales componentes de la raíz del Astrágalus son las saponinas y polisacáridos. Han sido aislados una serie de polisacáridos;

dos de ellos formados únicamente por D-glucosa, astragalano II y astragalano III, mientras que el astragalano I está compuesto de D-glucosa, D-galactosa y D-arabinosa. Además se han identificado α-glucanos y dos heterosacáridos

Otros compuestos son: glúcidos (sacarosa), esterpóles (β-sitosterol), isoflavonas (formononetina, calicosina y su derivado 7-glucósido, entre otros) y pterocarpanos (Vanaclocha 2003).

Cuadro 9. Bioquímica del Astrágalus y su actividad biológica

Compuesto	Actividad biológica
Polisacáridos	Acción Inmunomoduladora
Flavonoides	Acción Inmunomoduladora
Beta sitoesteroles	Anorexígeno, Antibacteriano, Antiedematoso, Antiestrogénico, Antimutagénico
Betaína	Antigastrítico, Antimioatrófico, Hepoatoprotector, Pesticida
Calcio	Antialérgico, Anti-ansiedad, Antidepresivo, Atihiperkinético, Hipotensor

2.3.5.7. Propóleo

El propóleo es una sustancia resinosa de árboles y arbustos silvestres, que las abejas extraen con el fin de sellar herméticamente su colmena e impedir que se forme dentro de ella cualquier tipo de infección.

Composición química del Propóleo: El propóleo está constituido por una gran variedad de compuestos químicos, su composición no es estable y varía según la fuente de procedencia, se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos,30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% granos de polen.

Algunos autores plantean la existencia de alrededor de 18 componentes y se señala que entre estos, los principales son compuestos del tipo flavonoide, tales como, las flavonas, flavones y las flavononas. Se han reportado alrededor de 38 flavonas,12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinamílico y el ácido cinámico, 12componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles,7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos.

Una de las propiedades más importante del propóleo es su actividad antimicrobiana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides. (Tolosa y Cañizares. 2004).

Cuadro 10. Bioquímica del Propóleo y su actividad biológica.

Compuesto	**Actividad biológica**
Flavonoides	Capacidad antiviral, antimicrobiana
Ácidos benzoico, oxibenzoico, metoxibenzoico, caféico, ferúlico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente la galangina)	Capacidad antimicrobiana, bacteriostática y bactericida.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO

La investigación se realizó en los Laboratorios de Microbiología y de Inmunología del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL), en la comuna de "San Pedro" de la parroquia Manglaralto de la Provincia de Santa Elena. A 170 Km de Guayaquil; Latitud 1º57'' y Longitud Este 80º43''.

3.2.METODOLOGÍA

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1.1. Extractos naturales

Se realizaron ensayos in vitro para determinar la actividad antibacteriana, antioxidante e inmunoestimulante de los extractos de *A. sativum* (Ajo), *M. citrifolia* (Noni), *O. vulgare (*Orégano), *C. sinensis* (Te verde), Propóleo, *Astrágalus sp*, Arándano sp.

Las especies vegetales se seleccionaron en base a la literatura, disponibilidad en el mercado, precio e inocuidad probada en el humano.

- **Métodos de preparación de Extractos**

Se realizaron diferentes preparaciones de extractos en base a las características de los productos y a la literatura encontrada. Las preparaciones fueron en solución alcohólica, solución acuosa, con temperatura baja, temperatura alta, con movimiento y sin movimiento; y a diferentes porcentajes peso/volumen (p/v). El mejor protocolo de preparación de los extractos se seleccionó en base a resultados de antibiograma por zona de inhibición. Se dio preferencia a los acuosos.

El Ajo, esta hortaliza según la literatura y a sus características se probó en solución alcohólica, solución acuosa, con movimiento y sin movimiento a distintos tiempos de maceración. Se pesó 10g previamente pelado, se maceró, se colocó en un recipiente en 20 ml de agua destilada. Se dejó en movimiento por 12horas (sin temperatura por que el producto pierde su actividad a elevadas temperaturas).

El Noni, una fruta muy jugosa por lo cual se probó la extracción sometiendo a cambios de temperatura; se realizó con temperatura alta (cocinado) y con temperatura baja (congelado) para luego ser descongelado ya que al congelarse las células de la fruta aumentan de volumen y por ende estas se rompen. Se escogió la preparación que consistía en cortarla fruta en trozos y congelo, luego se procedió a descongelar para con la ayuda de una jeringuilla tomar el jugo de la fruta.

El Té Verde producto comercial, por su presentación la cual fue hojas secas se probó en solución acuosa, solución alcohólica, con temperatura alta, sin temperatura, con movimiento y sin movimiento a distintos tiempos y concentraciones; con el orégano se evaluó las mismas preparaciones debido a que su presentación fue en hojas secas.

Se pesó 1g del producto (Te verde, Orégano) en 10ml de Agua destilada; se los colocó en el Baño María cuando este estaba a una temperatura de 60ºC por el lapso de una hora (recipiente tapado de forma que no se evapore en su totalidad).

El Arándano (GNC Natural Brand) y Astrágalus (GNC Nature's Fingerprint)estos dos productos comerciales fueron evaluados en solución alcohólica y acuosa, con movimiento y sin movimiento a distintos tiempos. De los cuales se preparó 1g de Arándano en 10ml de Agua destilada, se dejó en movimiento por 12 horas, mientras que el Astrágalus se preparó 25 mg en 1,25 ml de Agua destilada, dando movimiento para una mejor dilución del producto, se dejó 10 min en suspensión y tomo solo el sobrenadante.

El propóleo producto comercial, debido a su característica principal la cual es ser una resina fue evaluado en solución acuosa, solución alcohólica, con movimiento y sin movimiento a distintos tiempos y concentraciones. Se trabajó dilución acuosa y alcohólica de 100 mg de la pastilla macerada, se dejó en movimiento por 12 horas. Una vez preparado el extracto fue evaluado por el método de Antibiogramas por halos de inhibición, colocando los discos previamente secados con el producto ya, y colocando el producto en el disco ya colocado en la placa de agar.

Neutralización de productos: Antes de analizar la actividad antibacteriana se procedió a neutralizar los extractos vegetales con Hepes a 1 M concentración final, se ajustó la osmolaridad y se añadió medio de cultivo.

Cuadro 11. Concentración de cada sustancia para neutralizar el producto

PRODUCTOS	PRODUCTO	HEPES	AGUA DESTILADA	MEDIO TSB 5X
Ajo	50%	2,50%	27,50%	20%

Noni	50%	2,50%	27,50%	20%
Orégano	50%	2,50%	27,50%	20%
Té Verde	50%	2,50%	27,50%	20%

3.2.1.2 Cepas Bacterianas

Se emplearon las siguientes cepas bacterianas obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología del CENAIM-ESPOL:

Cuadro 12. Bacterias y sus Características de aislamiento

Bacteria	Característica
V. harveyi	Cepa L29, aislada local.
Aeromonas sp.	Aislado local, patógenas en anfibios, reptiles, peces y humanos
V. parahaemolyticus	Cepa ATCC 27969, aislada de colección transmitida al humano por consumo de especies marinas contaminadas.
V. vulnificus	Cepa 53, aislado local de larvas que presentaron el Síndrome de "Bolitas.
P. aeruginosa	Cepa ATCC 27853, aislada de colección es un patógeno oportunista en humanos, animales y plantas.

3.2.1.3 Animales

Se trabajó con hemocitos de camarones juveniles *P. vannamei*, la hemolinfa fue extraída de los animales siguiendo metodología descrita por Muñoz (1996).

Extracción de Hemolinfa

Para esto se utilizaron jeringuillas de 1 ml. (Insulin Syringe 26 G 1/2) cargadas con un volumen de 100 µl de solución anticoagulante (citrato de sodio al 10%). Las muestras de

hemolinfa fueron mantenidas en hielo, manteniendo condiciones de asepsia. Luego de la extracción, la hemolinfa diluida V/V con anticoagulante fue transferida a microtubos (0,5 ml virgin polyprop, Cambridge Scientific, Co.).

3.2.2 EQUIPOS UTILIZADOS

-Microscopio de contraste de Fases OLYMPUS

-Hemocitómetro (Cámara de Neubauer)

-Autoclave LLAMATO Sterilizer SN510

-Incubadora LLAMATO Incubator IC 602

-Balanza Analítica METTLER AE 240

-Balanza OHAUS

-Cámara de Flujo Laminar AIR TECH

-Cámara de Flujo LABCAIRE

-Secador de material ADVANTEC FP-300 LABORATORY GLASSWERE DRYER

-Refrigerador SANYO

-Lector de Microplaca MULTISKA EX

-Baño María VWR 18

-Centrifuga Eppendorf regrigerada

-Congelador -20 REVCO

3.2 MÉTODOS

3.2.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO

3.2.1.1 Evaluación de la Capacidad Antibacteriana de los Extractos

Se evaluará *in vitro* los ensayos de:

- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)
- Concentración Mínima Bactericida (CMB)
- Antibiograma

➢ **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):**

Se siguió el protocolo descrito por Leiva J. (1999) con ligeras modificaciones.

-Se prepararon cultivos de 18 horas de las bacterias a ensayos en Agar TSA (2% NaCl).

-Se inoculó 3-4 colonias en caldo tripticasa soja 2% NaCl (TSB) y se incubó a 28-30ºC hasta que la turbidez fue visible (2-5 horas). Se ajustó la turbidez con solución salina (2%NaCl) hasta una turbidez equivalente al estándar de 0,5 escala McFarland ($1x10^8$ UFC/ml).

-Se realizó una dilución al 1/100 de este inoculo. Obteniendo así un inóculo de aproximadamente $1x10^6$ UFC/ml.

-Se preparó por separado la solución stock (solución "madre") del producto a la concentración máxima deseada del producto a evaluar.

-Los productos se evaluaron a las siguientes concentraciones

Cuadro 13. Concentraciones de los productos a las que fueron evaluados.

ORÉGANO Y TÉ VERDE											
40 000 ppm	30 000 ppm	27 500 ppm	25 000 ppm	21 250 ppm	16 250 ppm	15 000 ppm	8 750 ppm	4 500 ppm	2 250 ppm	2 500 ppm	250 ppm
AJO											
20 %	15%	13,75%	12,5%	10,62%	8,12%	7,5%	4,37%	2,25%	1,12%	1,25%	0,12%

NONI											
40%	30%	27,50%	25%	21%	16%	15%	9%	5%	2%	3%	0,30%

-La bacteria en todos los pozos tuvo la misma concentración de $1x10^6$ UFC/ml; obteniéndose como volumen final en cada pozo de 200 µL.

-Se incubó las microplacas durante 15 horas a 28-30ºC.

-Se determinó visualmente la presencia de turbidez en cada una de las placas y se registró.

Interpretación de resultados: Se consideró como CMI la correspondiente a los pocillos con menor concentración de antibiótico ó producto donde no ha habido desarrollo bacteriano, demostrado por la ausencia de turbidez.

- **Protocolo para la Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB):**

Se siguió el protocolo descrito por Leiva J. (1999) con ligeras modificaciones.

-A partir de los pocillos que no registraron crecimiento bacteriano (turbidez) se realizó la siembra en Agar TSA 2% NaCl utilizando 100 µL de inóculo.

-Se incubó 15 horas a 28-30ºC.

-Las diluciones sembradas que no presentaron crecimiento bacteriano indicaron que se ha alcanzado la CMB.

Interpretación de resultados: Se considera como CMB la menor concentración de antibiótico (o producto) cuyo subcultivo en placas de agar produce un número de colonias menor al 0,1% del inóculo original.

- **Antibiograma**

El antibiograma o determinación de la sensibilidad de una bacteria es una interpretación de la concentración mínima inhibitoria; este protocolo se lo realizo con ligeras modificaciones:

-Se preparó Agar TSA 2% NaCl en cajas petri.

-Se inoculó 3-4 colonias en caldo tripticasa soja 2% NaCl (TSB) y se incubó a 28-30ºC hasta que la turbidez fue visible (2-5 horas). Se ajustó la turbidez con solución salina (2%NaCl) hasta una turbidez equivalente al estándar de 0,5 escala McFarland ($1x10^8$ UFC/ml).

-Se colocó 1 ml de la suspensión bacteriana y se repartió por toda la superficie del agar en la caja.

-Luego de algunos minutos, se eliminó el exceso de líquido con una pipeta y se permitió que se seque durante 5 min. no más de 30 min.

-Se preparó previamente los discos con el producto, se los colocó en una caja petri con 100 µL cada uno y dejo secar pero no por completo.

-Se aplicó los discos con una pinza estéril, flameada y ya fría a la superficie inoculada presionando suavemente hacia abajo. Se colocó los discos a una gran distancia el uno de otro.

-Se incubó las placas durante toda la noche a 28-30ºC

3.2.1.2 Evaluación de la Actividad Antioxidante e Inmunoestimulante de los Extractos

Se evaluaron *in vitro* los ensayos de:

- Cuantificación del Anión Superóxido (O_2^-) por reducción del NBT
- Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO)

- **Cuantificación del Anión Superóxido (O_2^-) por Reducción del NBT**

Este radical de oxígeno se cuantificó por medio de la técnica de reducción del NBT, siguiendo el protocolo optimizado por Muñoz *et al*. (2000).

-En una microplaca de tipo ELISA (96 pozos), se depositó 50 µL de hemolinfa por pozo, se llenaron por triplicado para la actividad de Base (AB) y triplicado para la Estimulación (St), dando un total de 6 pozos, es decir un volumen de 300 µL por muestra.

-Luego se realizó un cultivo primario adicionando 50 µL de Solución de Hank's (Gibco) 3X a todos los pozos, a 25 °C por 45 min.

-Transcurrido el tiempo de incubación, las células se habrían fijado en el fondo de los pozos y se retiró suavemente el sobrenadante mediante una pipeta multicanal.

-Se adicionó 50 µL de las distintas diluciones de Hank's 2X con el producto a analizar, en todos los pozos del cultivo primario.

-Al triplicado para Actividad Base se le agregó 50 µL de Solución de Hank's 3X.

-Al triplicado para St se le agregó 50 µL de una solución de Zymosan ($1{,}43 \times 10^8$).

-A todos los pozos se les adicionó una solución de NBT al 0,30% en Hank's 1X, y se dejó incubar por 2 h, cubiertos y protegidos de la luz.

-Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante y se procedió a realizar 3 lavados:

- el primero con 200 µL de metanol al 100%, dejó por 3 minutos, retiró
- el segundo con 200 µL de metanol al 70%, dejó por 3 minutos, retiró
- el tercero con 200 µL de metanol al 70%, dejó por 3 minutos, retiró

-Se dejó secar la microplaca por aproximadamente 30 minutos, para luego adicionar 140 µL de Dimetil Sulfoxide DMSO en cada pocillo.

-Se colocó 120 µL de Hidróxido de potasio KOH 2M en cada pocillo (se tornó de color turquesa los pocillos debido a la disolución del formazán)

-Finalmente, la placa se llevó al lector de microplacas y realizó la lectura a $\lambda = 620$ nm.

La producción de O_2^- es expresada en tasas. La tasa se obtiene dividiendo el valor promedio de la absorbancia de la muestra estimulada para el valor promedio de la absorbancia de la misma muestra sin estimulación.

Las soluciones de Hank's 3X, 2X y 1X se refieren a las concentraciones de Mg y Ca, (26 mM de Cloruro de Magnesio y 12 mM de Cloruro de Calcio, 13mM de Cloruro de Magnesio y 6 Mm de Cloruro de Calcio, Hanks balanced salt solution, Sigma)) respectivamente.

- **Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO)**

Se realizó el hemograma según el método descrito por Muñoz (1996), para facilitar el conteo en caso de que existan muchos hemocitos en la muestra, mantenerlos con un buen aspecto morfológico y evitar la agregación celular, se diluyó 10ul de hemolinfa total en 10ul de formaldehído al 37%.

Se colocó 10 µl de la muestra tratada con formaldehido en el hemocitómetro (Cámara de Neubauer, Erma), y se determinó el número y los tipos hemocitarios en un microscopio óptico, provisto de un dispositivo de contraste de fases (Olympus BH2, objetivo A20 PL).

Esta actividad se detectó mediante el protocolo descrito por Echeverria (1998).

Esta técnica se fundamenta en incubar una muestra de extracto hemocitario con laminarína (β-glucano solubles, Sigma), en presencia de calcio (Ca^{++}). Producto de esta interacción la enzima inactiva proPO presente en los hemocitos pasa a una enzima activa PO, que en presencia del sustrato cromogénico L-3,4-dihidroxifenil-alanina (L-Dopa), produce un metabolito de coloración café llamado Dopacromo. Luego de 10 minutos de reacción se realiza la lectura en un lector de microplacas con un filtro de 490 nm.

Se cuenta la concentración de hemocitos en la muestra, seguidamente se centrifuga la hemolinfa por 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm) y a 5ºC. Se resuspende el precipitado a razón de $10x\ 10^6$ $cel.ml^{-1}$ en tampón cacodilato de sodio (Cac.) 10 milimolar y se centrifuga por 3 minutos a 12000 g a 5ºC. El sobrenadante resultante se almacena a -20ºC por no más de una semana, hasta su análisis

-Se distribuye por triplicado 50 µl del líquido sobrenadante (contenido celular de hemocitos) en cada hoyo de una microplaca de 96 hoyos. Un triplicado con Laminarina y un triplicado sin Laminarina.

-Seguidamente se adicionó 50 µl de solución del producto, para las soluciones sin Laminarina constituida por:

-Cacodilato de Na 10 mM, pH 7;

- Cl_2Ca 1M;

-Agua destilada

-Producto a analizar

Para las soluciones con Laminarina:

-Cacodilato de Na 10 mM, pH 7;

- Cl_2Ca 1M;

-Agua destilada

-0,2% de Laminarína.

-Producto a analizar

-Se dejó incubar por 77 minutos a Temperatura ambiente

-Se adicionó 50 µl de L-Dopa (3 mg de L-Dopa en 1 ml de tampón Cacodilato 10 mM) y se incubó nuevamente por 10 minutos a temperatura ambiente protegida de luz.

-La concentración del metabolito resultante se determinó mediante la absorbancia leída en el lector de microplacas a una longitud de onda 490 nm.

3.2.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para detectar las diferencias entre las diferentes concentraciones ensayadas de los extractos analizados y el control. Encontrando las diferencias significativas se utilizó como prueba de contraste la prueba de Tukey a un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para los análisis Inmunológicos.

Con respecto al análisis de los resultados microbiológicos no se pudo realizar un análisis de varianza ya que fueron valores que iban de 0 a 1000.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

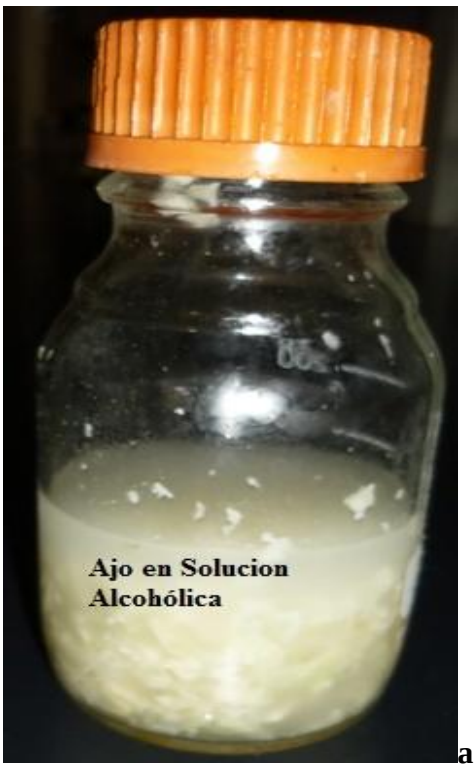
4.1. RESULTADOS

Siete productos fueron evaluados a fin de determinar sus propiedades microbicidas e inmunomoduladoras, la primera fase fue la obtención de los extractos. En una siguiente fase se evaluaron sus propiedades antibacterianas contra 5 cepas de bacterias. En una segunda fase, considerando que la mayoría de biomoléculas tienen actividad redox, se evaluó su efecto sobre dos parámetros inmunitarios que involucran la generación de radicales de oxígeno.

4.1.1. RESULTADOS DE OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.

Se probaron diversas formas de obtener los extractos, seleccionando solamente una por producto para los ensayos microbiológicos e inmunológicos. Se dio preferencia a las soluciones acuosas para evitar la presencia de alcohol.

-Ajo, con esta hortaliza se obtuvieron resultados similares en solución acuosa y alcohólica, Por lo tanto para los ensayos se seleccionó a la solución acuosa.

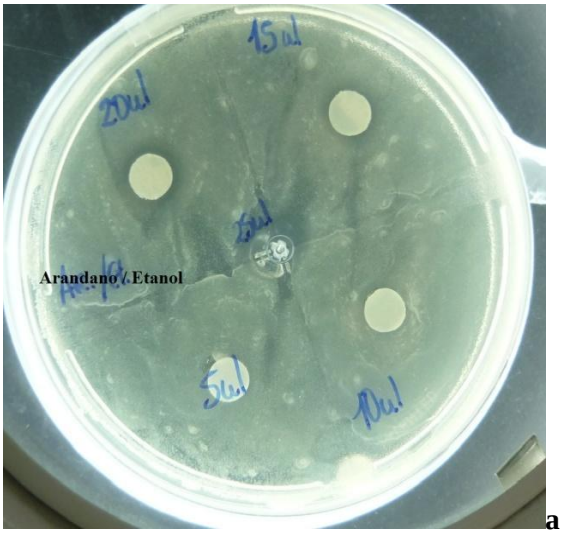


a

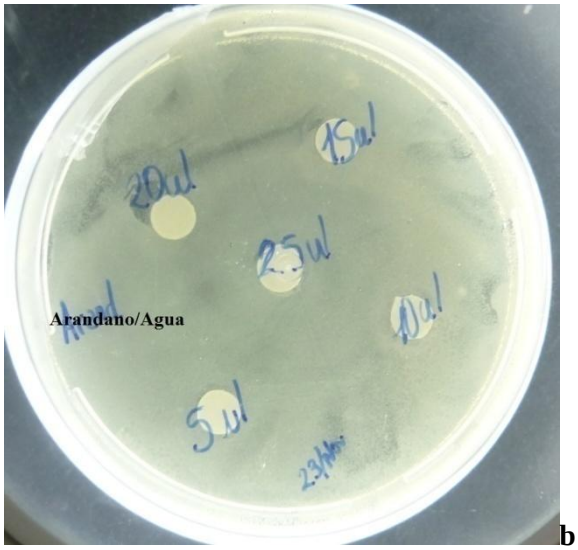
b

Figura 1. Extractos de ajo. En a) Ajo en Solución Alcohólica; b) Ajo en Solución Acuosa (en movimiento).

-Arándano y Astrágalus, no presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias ensayadas y solo fueron usados en solución acuosa en las pruebas inmunológicas.



a



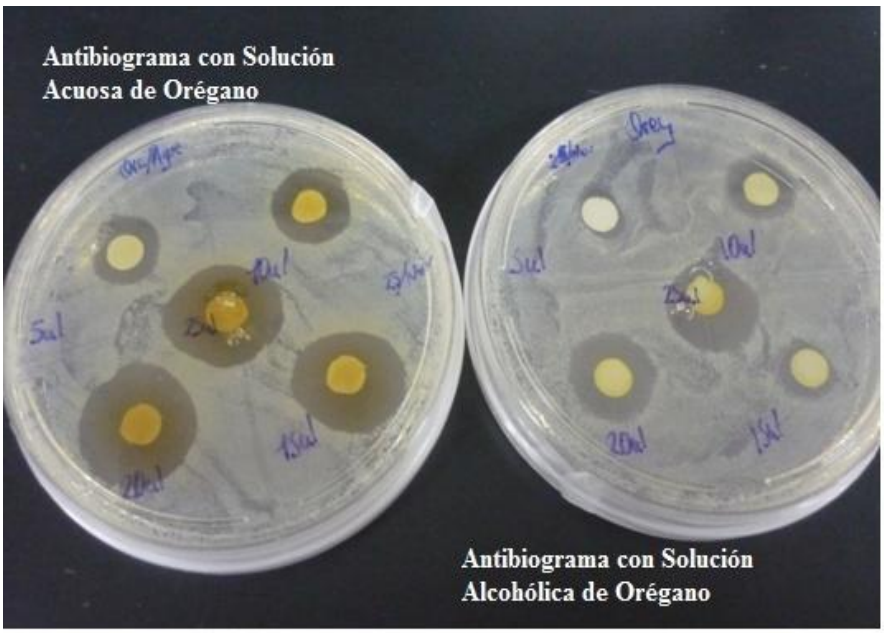
b

Figura 2. Antibiograma con Arándano contra *V. harveyi*. En a)Arándano en solución alcohólica; b)Arándano en solución acuosa.

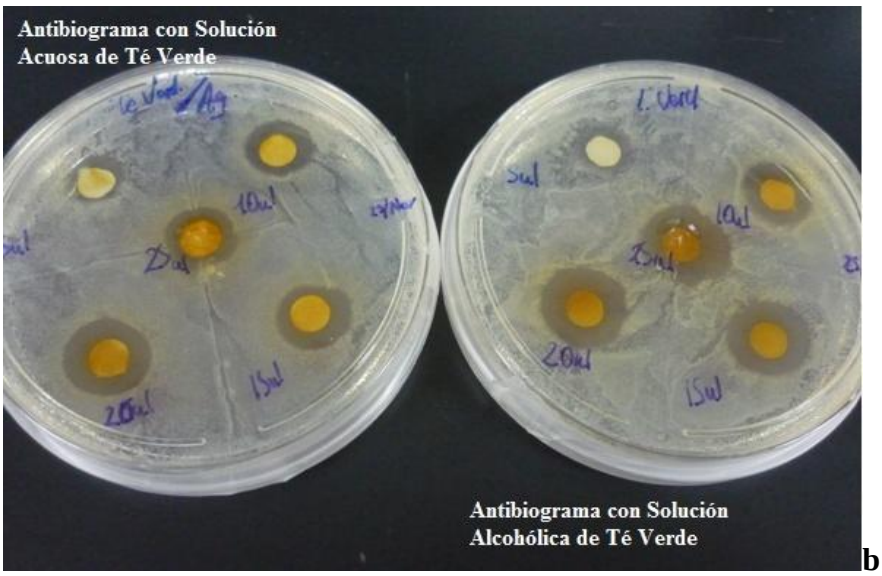
-Noni, se usó el método de congelación – descongelación para obtener los extractos, debido al mayor volumen obtenido con este procedimiento.

Figura 3. Extracto de Noni cocinado y Noni descongelado

-Orégano y Te Verde; no existieron diferencias evidentes entre soluciones acuosas y alcohólicas, por lo que se prefirió la solución acuosa.



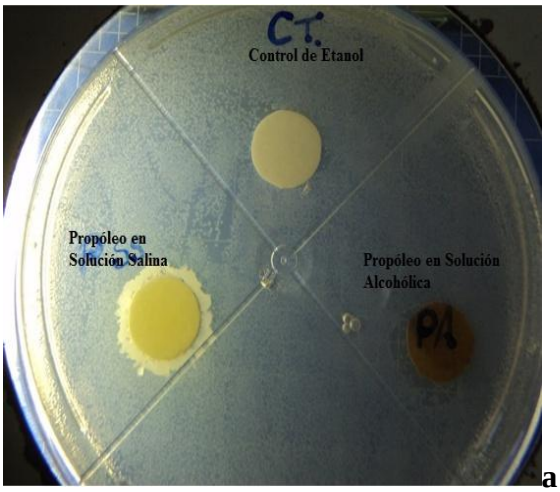
a



b

Figura 4. Antibiogramas contra *V. harvey*i. En a) Halos de inhibición utilizando Orégano en solución acuosa y alcohólica, se puede observar que los halos son más extensos en la solución acuosa; b) Halos de inhibición utilizando Té verde en solución acuosa y alcohólica. Se puede observar que los halos son más extensos en la solución alcohólica.

-Propóleo, Se ensayaron diversas formas de obtener los extractos. Los resultados obtenidos con propóleo no fueron consistentes ni reproducibles en los antibiogramas, por lo que no se continuó con la evaluación de este producto.



a

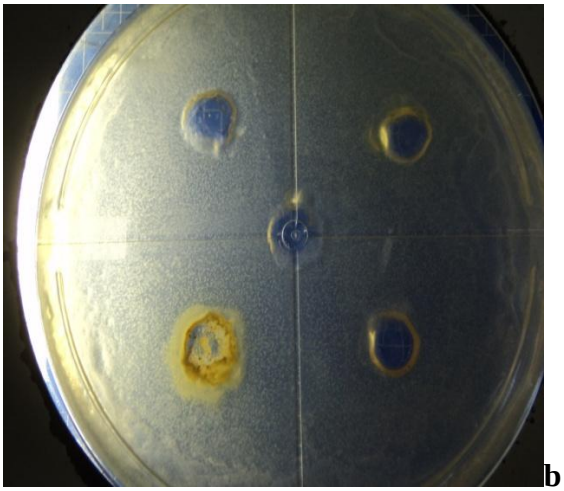

b

Figura 5. Antibiogramas contra *V. harveyi* utilizando propóleo. En a) el producto se colocó en discos de papel filtro; En b) El propóleo fue colocado en pocitos.

4.1.2. ENSAYOS ANTIBACTERIANOS

4.1.2.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

En esta prueba se confrontaron los productos a distintas diluciones contra las bacterias ensayadas. Se consideró a la CMI como la menor concentración de producto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, demostrado por la ausencia de Turbidez. Los productos evaluados fueron el Ajo, Noni, Orégano, y Te Verde.

Como se puede ver en la Tabla 1, la concentración mínima inhibitoria fue la misma para todas las bacterias en el caso del Ajo. Para el Noni la CMI fue menor para *V. harveyi* incrementándose en *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* mientras que para *P. aeruginosa* y Aeromonas fue aún mayor.

El Orégano presento cero turbidez a la menor concentración contra el *V. harveyi*, seguido por *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* a mayor concentración y la más alta concentración de la CMI fue contra Aeromonas y *P. aeruginosa*

Para el Té verde no se pudo observar cero turbidez contra ninguna bacteria debido a que este extracto por naturaleza tiene alta turbidez, lo cual impidió la visualización. Como no se pudo determinar la CMI, se sembraron en agar todos los pozos, lo cual dio como resultado que la CMB fue igual a la CMI.

Cuadro 14. Concentraciones mínimas de los productos ensayados, que inhiben el crecimiento bacteriano (CMI). En ppm (extractos preparados como peso seco/volumen). En porcentajes productos que no han sufrido deshidratación previa.

PRODUCTO	**BACTERIAS**				
	Importantes en Acuicultura		**Enteríticas**		**Clínicas**
	V. harveyi	**Aeromonas**	***V. parahaemolyticus***	***V. vulnificus***	***P. aeruginosa***
ORÉGANO	8750 ppm	40000 ppm	21250 ppm	15000 ppm	40000 ppm
AJO	2,25%	2,25%	2,25%	2,25%	2,25%
TE VERDE	40000 ppm	40000 ppm	40000 ppm	40000 ppm	40000 ppm
NONI	21%	28%	25%	25%	28%

4.1.2.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

En el caso del ajo, la concentración mínima bactericida (donde resultó 0 crecimiento de bacterias en agar) fue similar contra los tres vibrios, se incrementó para, Aeromonas siendo alta para *P. aeruginosa*. Con el Noni solo contra *V. harveyi* se pudo determinar la CMB (al 40 %). Para las otras bacterias no tuvo efecto bactericida pues existió crecimiento bacteriano en agar. El Orégano dio cero crecimientos a menor concentración contra *V. vulnificus* seguido por *V. harveyi* y luego *V. parahaemolyticus*, no se detectó actividad bactericida para Aeromonas ni *P. aeruginosa*. La menor MBC para el Té Verde se presentó a menor concentración contra *V. vulnificus* (8750 ppm), una concentración menor a la CMI para la misma bacteria, seguida contra *V. Harvey*, luego por *V. Parahaemolyticus*. Para *P. aeruginosa* la concentración fue mayor aún, mientras que para Aeromonas no se detectó actividad bactericida.

Cuadro 15. Concentración mínima bactericida de los productos ensayados. En ppm (extractos preparados como peso seco/volumen). En porcentajes productos que no han sufrido deshidratación previa.

PRODUCTO	BACTERIAS				
	Importantes en Acuicultura		Enteritis		Clínicas
	V. harveyi	**Aeromonas**	***V. parahaemolyticus***	***V. vulnificus***	***P. aeruginosa***
ORÉGANO	16250 ppm	CB	30000 ppm	8750 ppm	CB
AJO	2,25%	7,5%	2,25%	2,25%	10,6%
TE VERDE	16250 ppm	CB	21250 ppm	8750 ppm	40000 ppm
NONI	40%	CB	CB	CB	CB

CB: Crecimiento bacteriano.

4.1.3. ENSAYOS INMUNITARIOS

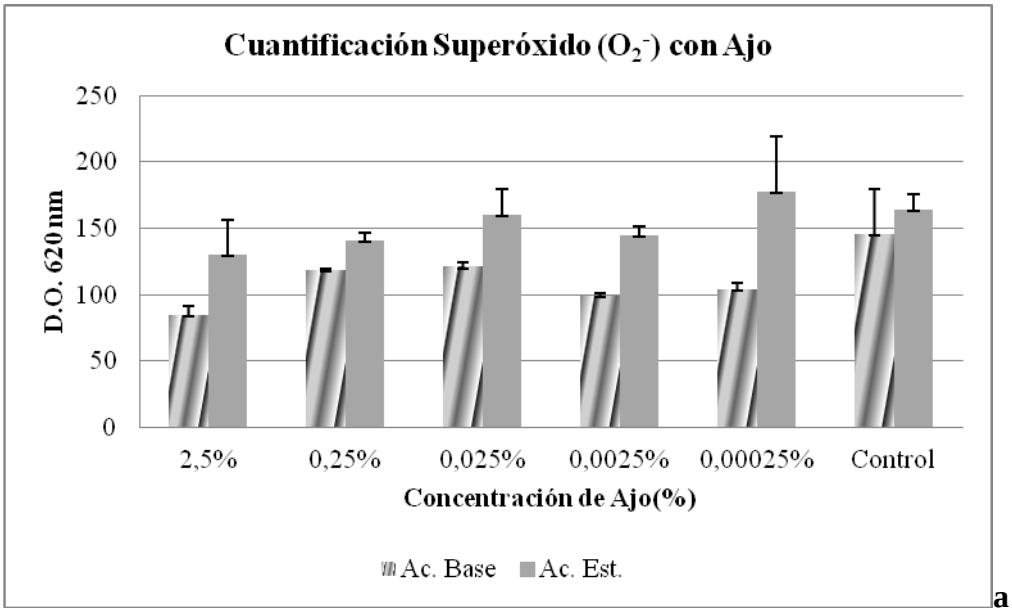
4.1.3.1. CUANTIFICACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO (O_2^-) POR REDUCCIÓN DEL NBT

En este análisis se cuantificó la cantidad de Superóxido (O_2^-) producido por los Hemocitos *P. vannamei* como Actividad Metabólica Basal y Actividad Estimulada (en presencia de un

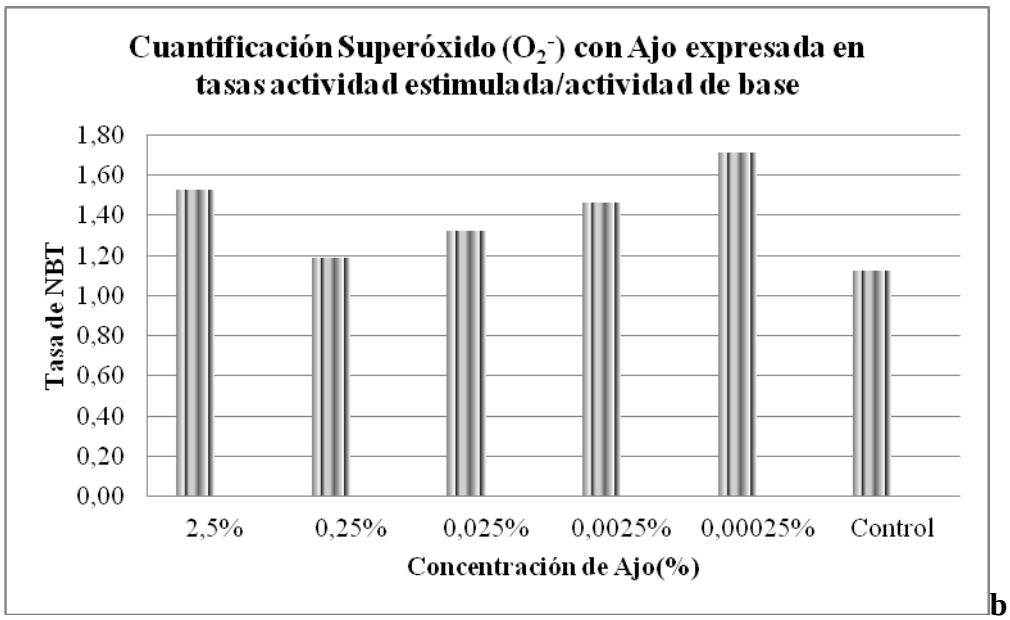
inmunoestimulante, en este caso el zymosán). Los productos que se evaluaron por su capacidad de inhibir la producción de Superóxido basal y la actividad estimulada fueron Ajo, Orégano, Te Verde, Noni, Astrágalus y Arándano.

Como se puede observar en la Figura 6, con respecto a la actividad basal el ajo mostró actividad antioxidante en todas las concentraciones ensayadas, disminuyendo significativamente ($p < 0,05$) la generación basal de superóxido a las concentraciones de 0,00025, 0,0025 y 0,25 %. Esto dio como resultado altas tasas. A pesar de no observarse incrementos significativos ($p > 0,05$) en actividad inmunoestimulada con respecto al control, si hubo diferencias significativas entre actividad de base y estimulada en todas las concentraciones de ajo.

Figura 6. Producción de Anión Superóxido con Ajo. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base.



a

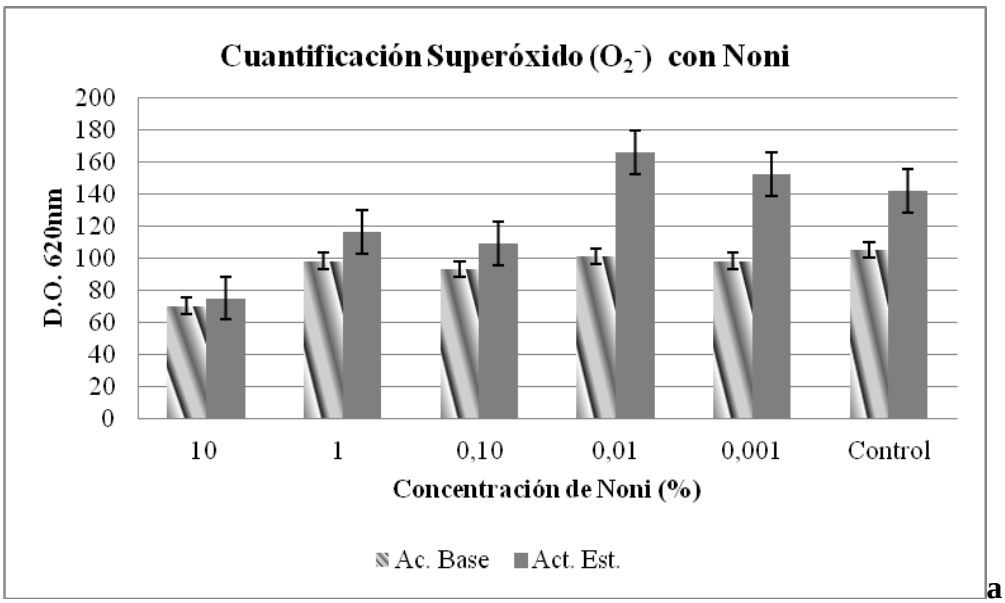


b

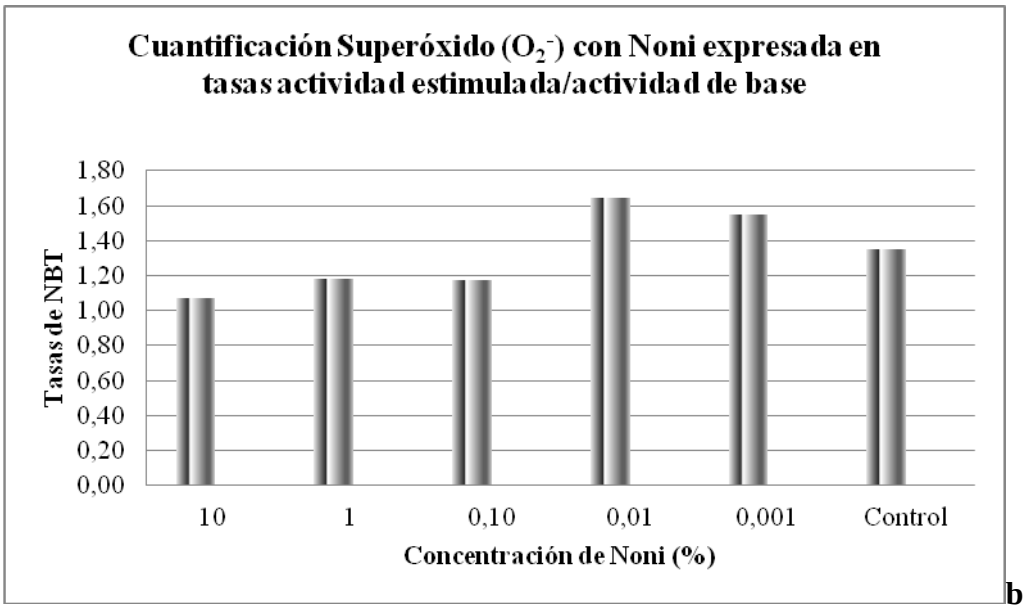
En la Figura 7, que ilustra los resultados obtenidos con el noni sobre la generación de superóxido, se observa que las mayores concentraciones (0,10 a 10 ppm) ejercen un efecto negativo sobre la actividad estimulada, no observándose diferencias ($p > 0,05$) significativas entre esta y la actividad de base a estas concentraciones. Sin embargo este efecto antioxidante del noni sobre la actividad estimulada, no se manifestó a las menores concentraciones (0,01 y 0,001 ppm), a estas concentraciones se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre

actividad estimulada y actividad de base, obteniéndose altas tasas de generación de superóxido a 0,01 % del producto.

Figura 7. Producción de Anión Superóxido en presencia de noni. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base.



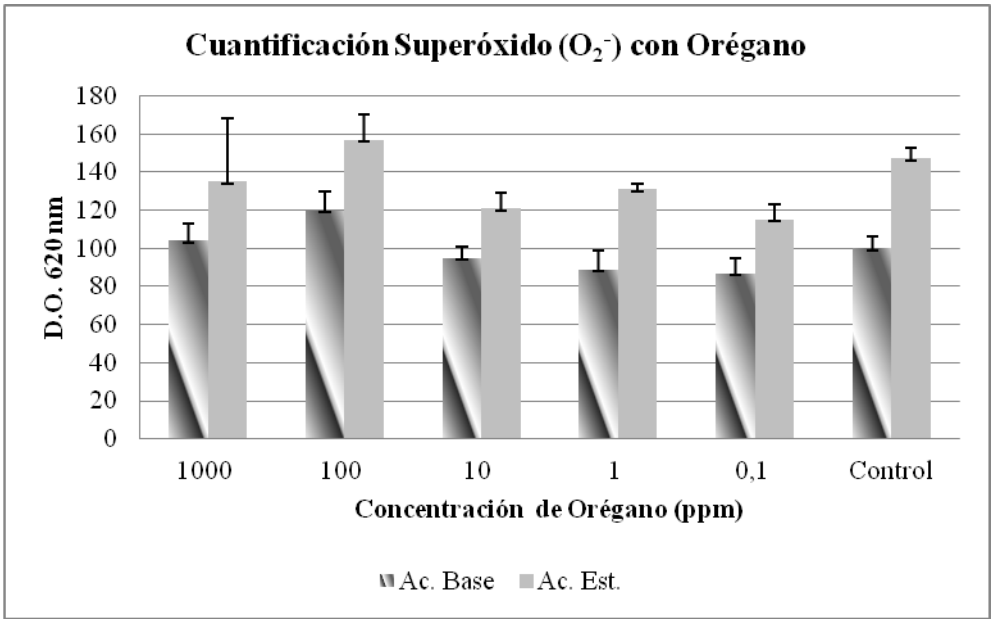
a



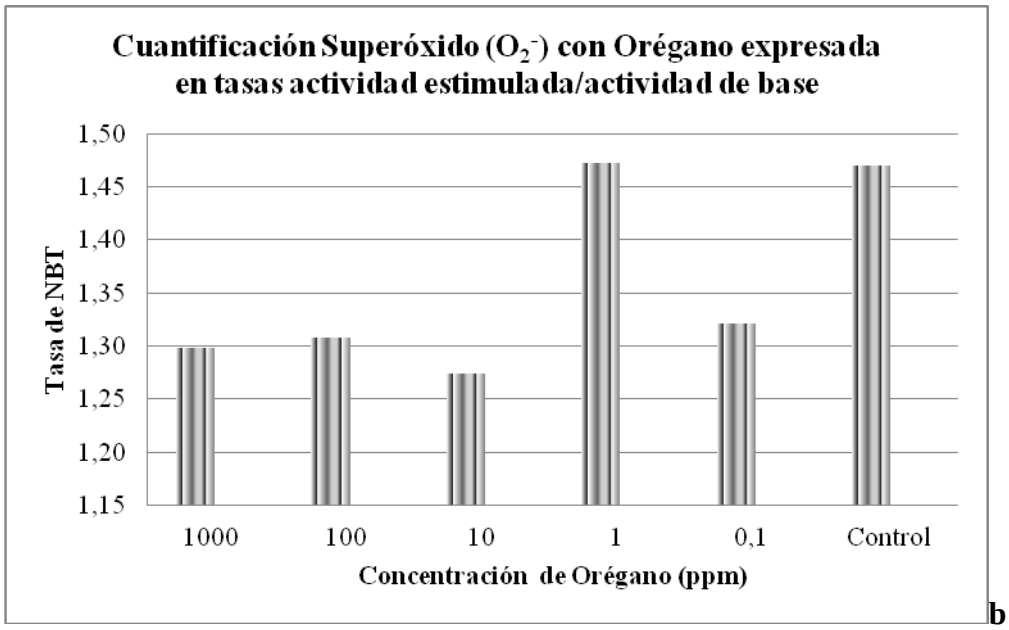
b

En el caso del orégano como se ve en la figura 8, existe un efecto negativo sobre la generación de superóxido estimulado a las concentraciones más bajas (10 a 0,1 ppm). La concentración que disminuye la generación basal de superóxido sin afectar de manera significativa la actividad estimulada es 1 ppm. De 0,1 a 100 ppm se encontró diferencias significativas entre actividad de base y actividad estimulada.

Figura 8. Producción de Anión Superóxido en presencia de orégano. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base.



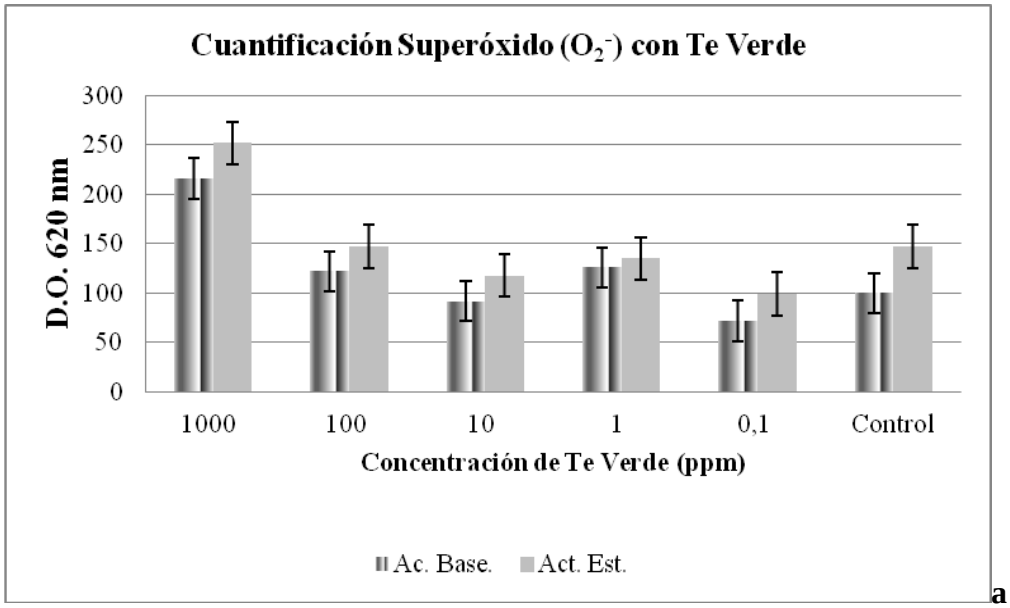
a



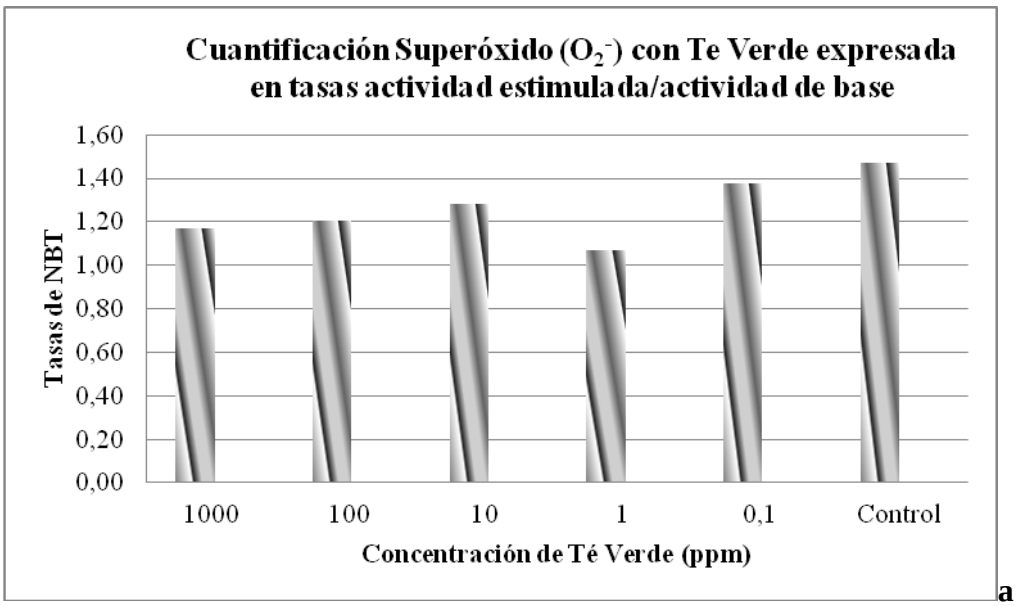
b

En la Figura 9 se puede observar que el efecto antioxidante del Té Verde se incrementa a las menores concentraciones. Tanto en 0,1; 1 y 100 ppm se mantienen las diferencias significativas entre actividad de base y actividad estimulada ($p < 0,05$).

Figura 9. Producción de Anión Superóxido en presencia de té verde. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base.



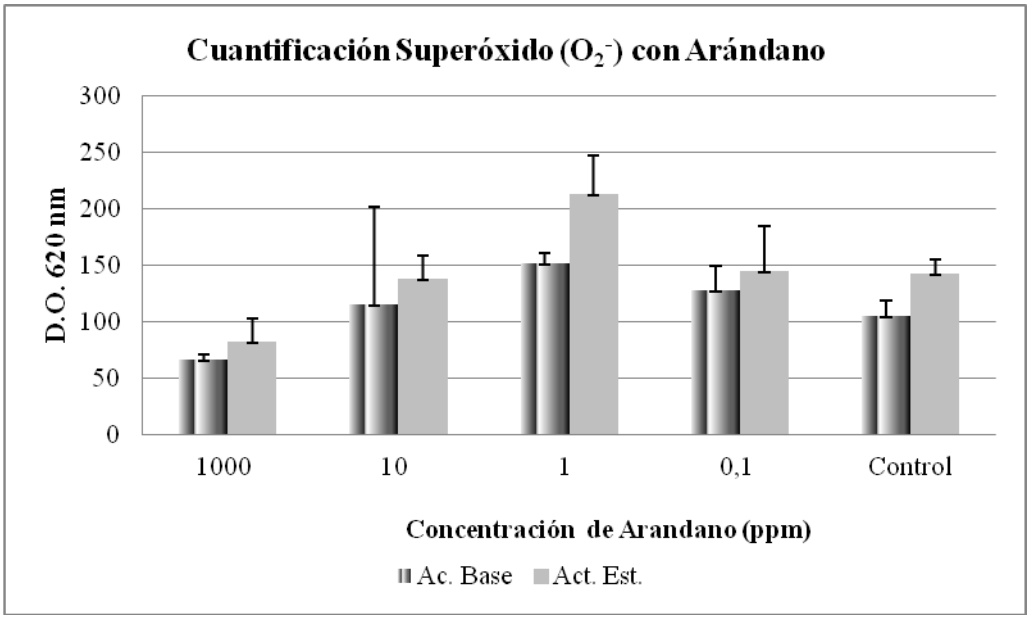
a



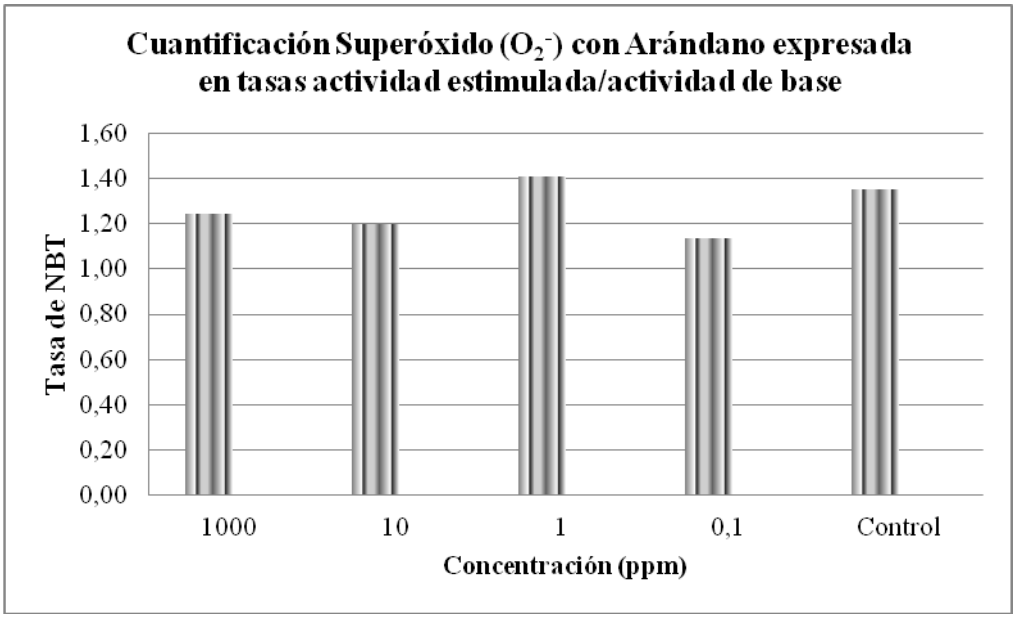
a

El arándano presentó mayor actividad antioxidante a la concentración más alta (Figura 10). A ninguna concentración se observaron diferencias significativas entre actividad de base y actividad estimulada ($p < 0,05$).

Figura 10. Producción de Anión Superóxido en presencia de arándano. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base.



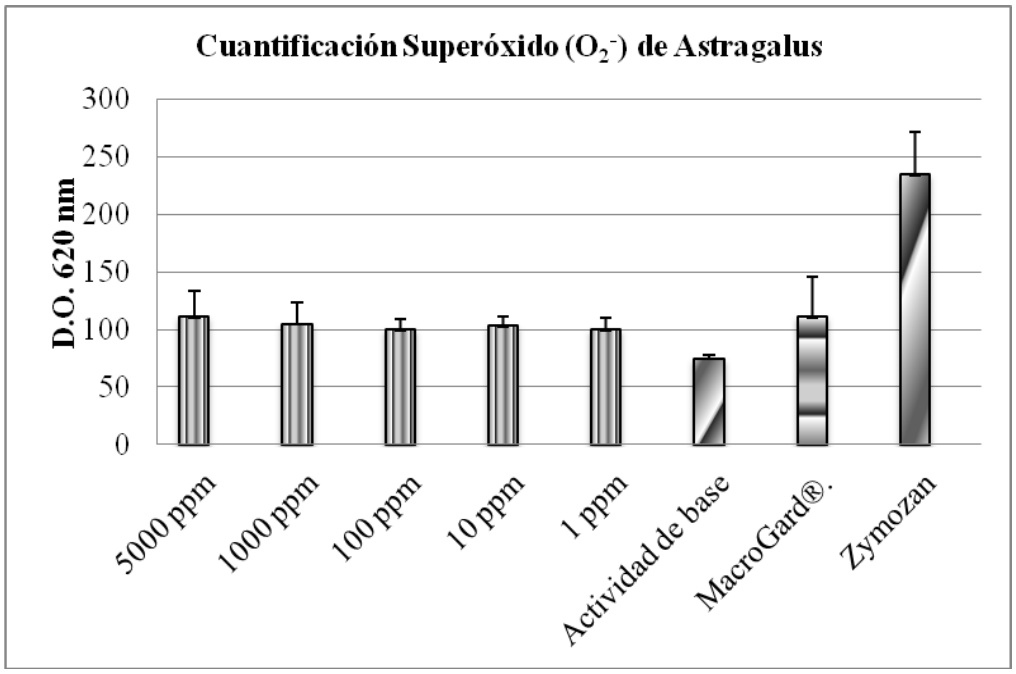
a



b

En el astrágalus no se buscó su cualidades antioxidantes, el objetivo fue determinar sus propiedades inmunoestimulantes para el camarón, por lo que se usó un control adicional el MacroGard®, como inmunoestimulante a base de β-glucanos de uso común en acuicultura. En todas las concentraciones empleadas el astrágalus dio resultados equivalentes a los obtenidos con el MacroGard®. En todos los casos hubo diferencias significativas entre actividad de base y actividad estimulada, pero no entre las distintas dosificaciones de astrágalos (Figura 11).

Figura 11. Producción de Anión Superóxido en presencia de Astrágalus. Además del astrágalus se ensayó el β-glucano comercial MacroGard®.

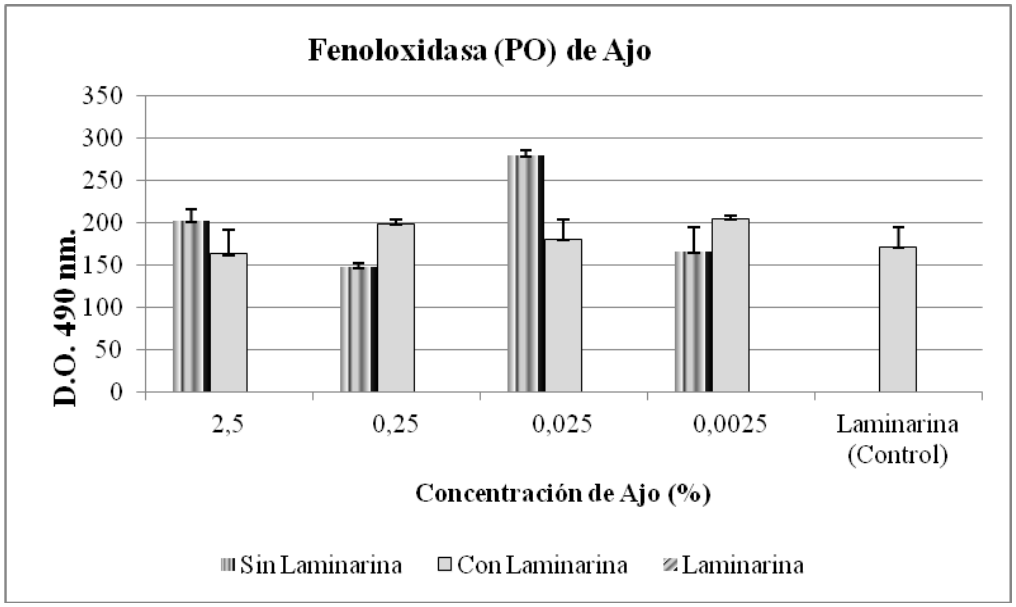


4.1.3.2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FENOLOXIDASA (PO).

La segunda prueba inmunológica que se realizó para evaluar los productos fue la detección de actividad Fenoloxidasa. La estrategia consistió en medir el producto de la reacción el dopacromo en presencia de los productos con y sin laminarína.

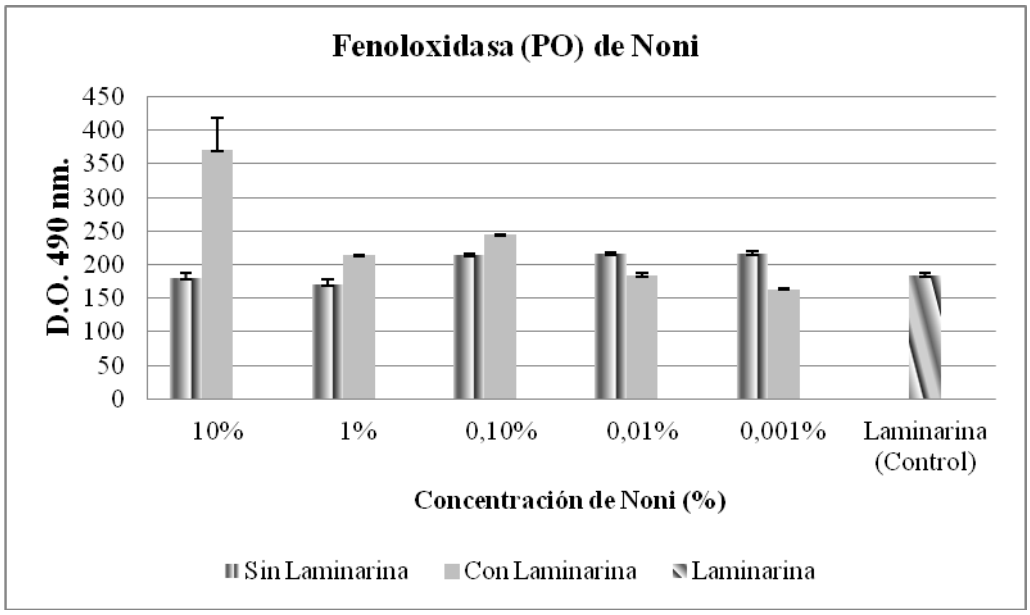
Los resultados obtenidos con el ajo en actividad PO no obedecieron a ningún patrón. Incluso A 0,025 % sin laminarína los resultados fueron mayores al control ($p < 0,05$), (Figura 12).

Figura 12. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Ajo



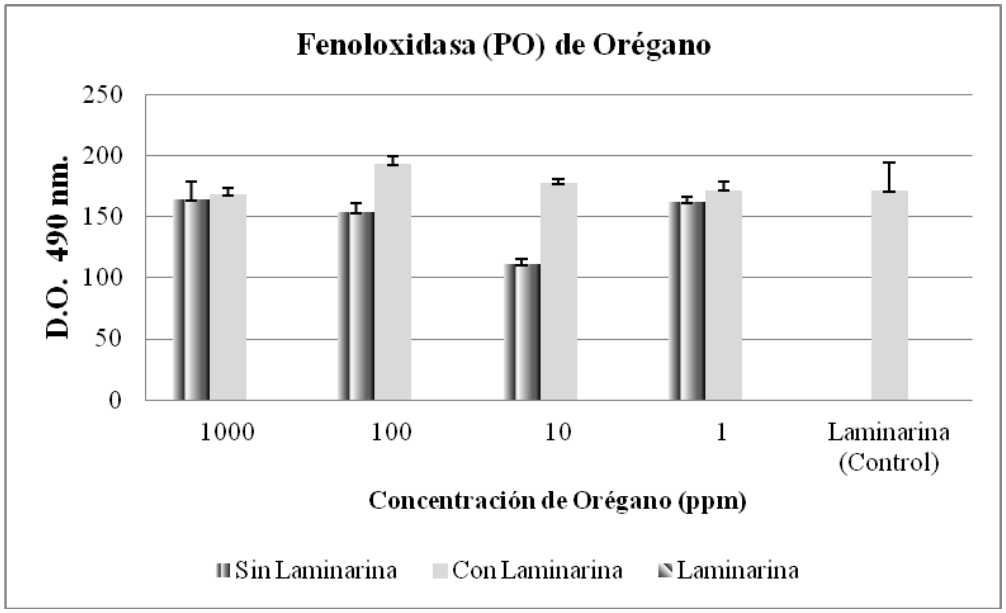
En presencia de Noni (Figura 13) se produjo una mayor estimulación de la Actividad Fenoloxidasa a las mayores concentraciones (0,1; y 10 %), ($p < 0,05$), mientras que con Laminarína fue mayor al control a las concentración de 0,10 y 10% ($p < 0,05$). Sin estimulante la Actividad Fenoloxidasa fue alta a las concentraciones más bajas (0,1; 0,1; 0,001).

Figura 13. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Noni



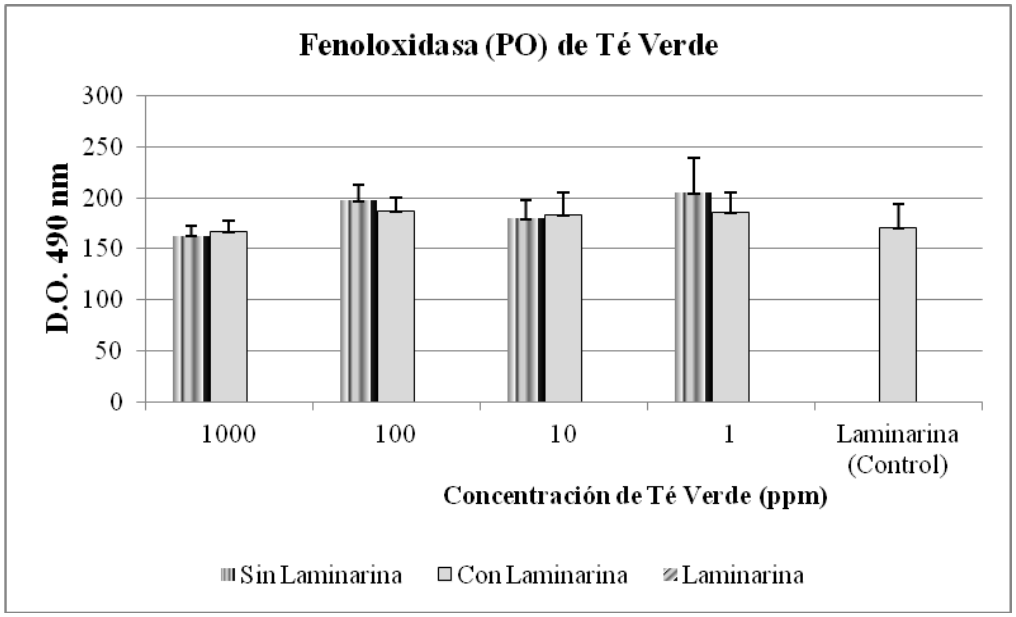
El Orégano sin Laminarína a 10 ppm produce una reducida Actividad Fenoloxidasa a la del control Laminarína. En tanto que a 10 y 100 ppm en presencia de laminarían la actividad PO fue alta (Figura 14).

Figura 14. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Orégano



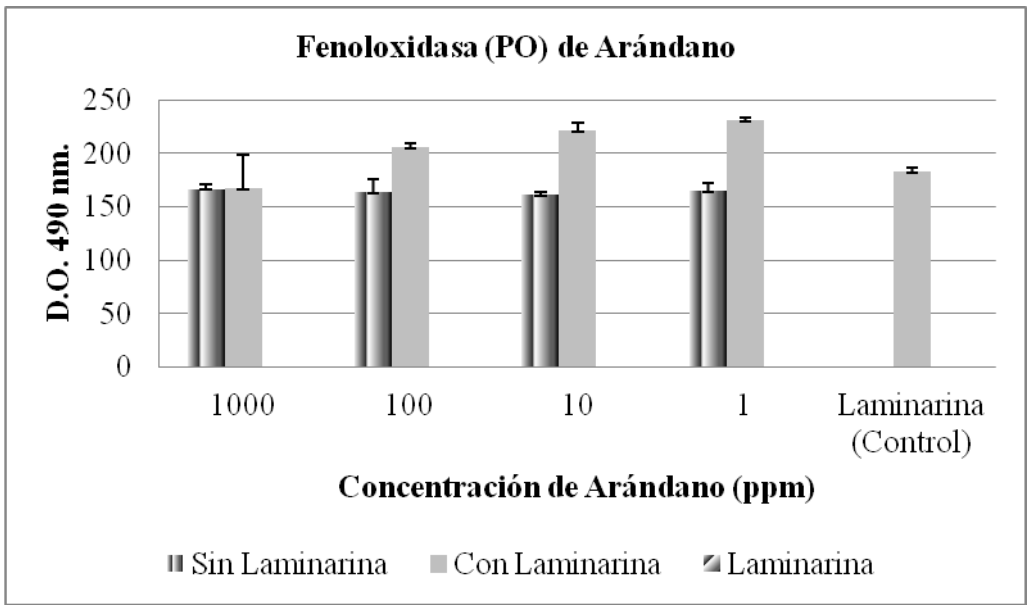
El Té Verde con Laminarína produce una Actividad Fenoloxidasa equivalente a la del control. Sin laminarína la actividad PO fue alta (Figura 15).

Figura 15. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Té Verde



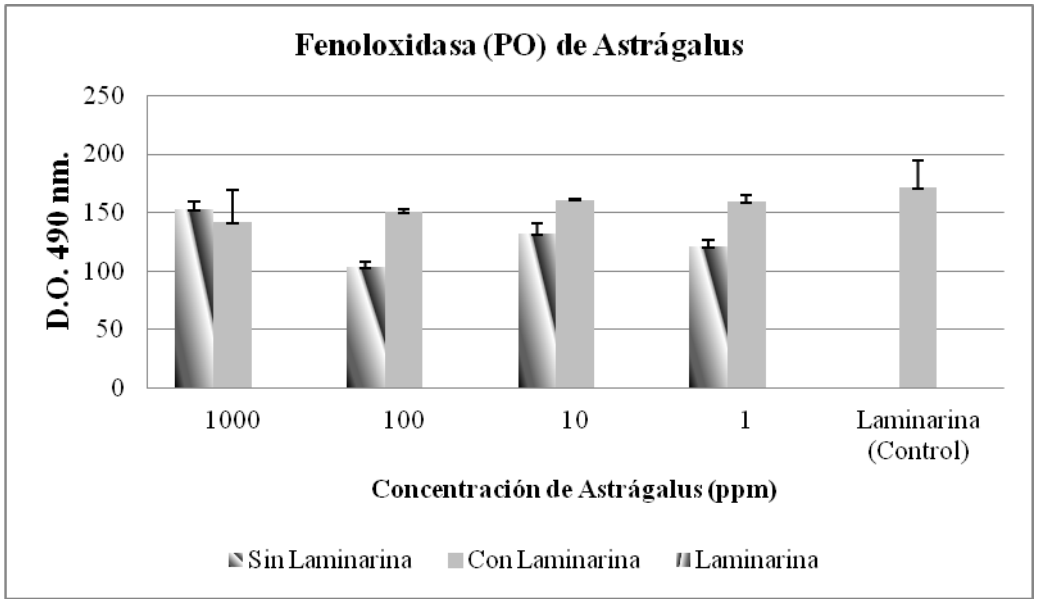
En ausencia de laminarían, el arándano reduce la Actividad Fenoloxidasa con respecto al control. Con Laminarína ($p < 0,05$) la actividad PO es estimulada a las menores concentraciones siendo significativamente más alta que el control a 1 ppm (Figura 16).

Figura 16. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Arándano



Para Actividad Fenoloxidasa sin Laminarína El Astrágalus produjo valores inferiores ($p < 0,05$) al control a las concentraciones de 1, 100 ppm (Figura 17).

Figura 17. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO) en presencia de Astrágalus



4.2. DISCUSIÓN

Los 7 extractos naturales que se evaluaron contra las 5 bacterias patógenas (2 importantes en la acuicultura, 2 enteríticas y una clínica) demostraron en algunos casos un efecto bactericida, mientras que en otros solamente fueron bacteriostáticos. Los análisis inmunológicos indicaron a sí mismo las propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de gran parte de ellos.

La información sobre compuestos fitoquímicos para contrarrestar enfermedades, por sus efectos bactericidas, antioxidantes o inmunoestimulantes es amplia en seres humanos, pero con respecto a especies acuáticas, tales como, el *P. vannamei* es muy escasa. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los extractos naturales pueden representar un gran aliado en la producción de esta especie y otras especies acuícolas.

En base a las propiedades antibióticas señaladas por la literatura, Villamar (2000) preconizó el uso de *A. sativum* en los cultivos de camarón, señalando "Si los antibióticos de uso humano eran considerados apropiados para usarlos en el camarón, así como otros químicos, ¿por qué no lo serían los productos naturales?". Villamar fue uno de los primeros productores en explorar alternativas amigables para combatir patologías en camarón. En años recientes se ha observado una creciente literatura sobre el efecto benéfico de compuestos bioactivos derivados de plantas, microrganismos o invertebrados (Chakraborty y Hancz, 2011).

En este estudio, las bacterias contra las cuales fueron confrontados los extractos se seleccionaron en base a distintos criterios de patogenicidad. *V. harveyi* y Aeromonas son patógenas para camarón y tilapia. *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son bacterias que pueden afectar a quien consuma camarones contaminados por estas bacterias. En tanto, *P. aeruginosa* es una bacteria oportunista que afecta a animales, plantas y a seres humanos

En este trabajo el extracto acuoso de Ajo resulto ser bactericida contra *V. harveyi* (bacteria importante en acuicultura) *V. parahaemolyticus y V. vulnificus*. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores contra vibrios (Vaseeharan *et al.*, 2010; Sharma y Patel 2009), indicando la utilidad del ajo para tratar problemas de vibriosis muy comunes en acuicultura. A nuestro conocimiento, en este estudio es la primera vez que se reporta un efecto del ajo contra *V. vulnificus*. La eficiencia del ajo contra *V. parahaemolyticus* y *V. vulnifucus* (bacterias enteríticas) señala su potencial uso para preservar alimentos y/o prevenir enfermedades gastrointestinales provocadas por ingestión de productos marinos contaminados. Para *P. aeruginosa* el efecto bactericida fue a concentraciones más altas, esta es una bacteria oportunista, patógena humana que por las características de su pared es muy

resistente a los antibióticos (Breidenstein *et al*., 2011). Estas características explicarían la mayor CMB.Sin embargo, el ajo no solo tendría un efecto bactericida, la literatura señala que puede interferir con el quorum sensing aumentando la sensibilidad de la biopelículas de pseudomonas a los antibióticos (Bjarnsholt *et al*., 2005). En cuanto a su efecto sobre Aeromonas, la CMB también fue alta. Al respecto, la literatura señala que el ajo es muy eficaz para controlar *Aeromonas hydrophila* en trucha (Nya y Austin., 2009) incluso a bajas concentraciones, pero Nya y Austin trabajaron con porcentajes de peso seco y cabe suponer que en realidad utilizaron un producto más concentrado que el utilizado en este estudio.

Además de sus propiedades antimicrobianas el ajo es una planta selenifera (Rivlin 2009), posee compuestos fenólicos, 33 compuestos organusulfurados (Ngo *et al*., 2007) entre ellos el Diallylsulfide que le confieren importantes características antioxidantes (Abdullah *et al.*, 1988; Lee *et al*., 2009). Además posee pectinas y fructanos (oligosacáridos y polisacáridos) con propiedades inmunoestimulantes (Wilson *et al*., 2000). Estas moléculas influyen sobre el sistema inmune, así Nya y Austin (2009) han reportado el efecto estimulante del ajo sobre fagocitosis y choque respiratorio en la trucha. Las pruebas inmunitarias realizadas; detección de superóxido y actividad Fenoloxidasa, constituyen procesos redox, desencadenados por inmunoestimulantes. El estudio se realizó con el objetivo de encontrar dosis adecuadas que disminuyan la generación basal de redicales de oxígeno, pero que favorezcan la respuesta a la inmunoestimulación. Los resultados encontrados, principalmente en superóxido indican que el ajo posee potentes propiedades antioxidantes en todas las concentraciones ensayadas. Estas propiedades no interfirieron con la inmunoestimulación a ninguna concentración, sin embargo las mejores tasas de generación de superóxido se encontraron a las concentraciones más bajas del producto. El conjunto de resultados encontrados en las pruebas antimicrobianas e inmunitarias indicarían que las dosis a utilizarse in vivo deben manejarse con cuidado a fin de aprovechar las propiedades bactericidas y antioxidantes del ajo

- Scot y Craig (2006) han reportado que la actividad antibacterial del noni se debe a la presencia de antraquinones y triterpenoides. El extracto obtenido del fruto del Noni al ser confrontado contra 4 de las cepas utilizadas resultó tener solo un efecto bacteriostático ya que no se obtuvo la CMB, excepto contra *Vibrio harveyi;* Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Zaidan *et al*., (2005) quienes en su evaluación *in vitro* contra *P. aeruginosa* no tuvieron actividad de inhibición. Jayamarán *et al*., (2008) tampoco obtuvieron resultados antibacterianos contra Aeromonas, *P. aeruginosa* y *V. harveyi*. Las diferencias de resultados podrían explicarse por la metodología para obtener los extractos, tanto Zaidan y

colaboradores, como Jayamar y colaboradores prepararon extractos alcohólicos. Por otra parte Rajarajan *et al*., (2009) obtuvo una CMI contra *V. parahaemolyticus* a concentraciones menores a las obtenidas en este trabajo, este autor trabajó con licuados del fruto. Analizando la literatura y nuestros resultados se podría concluir que el noni es básicamente bacteriostático siendo posiblemente más activo como producto fresco.

Un reporte de Scot y Craig (2006) señala que la actividad antioxidante del noni se debe a la presencia de Lignanos/Neolignanos (americanin, morindolin y otros), en tanto que la presencia de polisacáridos confiere a este fruto actividad inmunoestimulante. La evaluación de los parámetros inmunitarios *in vitro* en presencia de Noni indicó fuerte actividad antioxidante del extracto sobre los hemocitos de camarón, especialmente a las concentraciones más altas, coincidiendo con Wang *et al*., (2009) y Blanco e*t al*., (2005) quienes describen que el noni tiene actividad antioxidante. A esas concentraciones la actividad antioxidante interfirió con la generación de superóxido bajo estimulación. A las menores concentraciones evaluadas resultó ser Antioxidante sin interferir con la generación de superóxido estimulado. El extracto de noni estimuló la actividad fenoloxidasa, sin embargo en este estudio no se determinó si este efecto se debió a los polisacáridos o a la presencia de quinones en el extracto.

- El extracto de Orégano resulto ser bactericida contra *V. harveyi*, no se ha podido encontrar publicaciones que se refieran al efecto inhibidor o bactericida del orégano contra este vibrio, siendo por lo tanto este el primer reporte sobre el tema. Se obtuvo la CMB a 3% (30000 ppm) para *V. parahaemolyticus* y a 0,87% (8750 ppm) para *V. vulnificus*; Paredes *et al*. (2007)con su extracto de orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) el cual fue obtenido a partir de orégano pulverizadoobtienen una CMB a 2,5% para *Vibrio parahaemolyticus* y a 2% para *Vibrio vulnificus.* No se pudo observar efecto bactericida contra Aeromonas ni *P. aeruginosa*; estos resultados no coincidieron con los de Souza *et al*., (2006) quienes obtuvieron una CMI contra *Aeromonas hidrophyla* y *P. aeruginosa* a 40 µl/ml, sin embargo estos autores utilizaron aceites esenciales.

En la evaluación inmunológica el extracto se mostró antioxidante a las menores concentraciones analizadas se rebeló antioxidante, reduciendo la generación de superoxido a las concentraciones entre 0,1 a 10 ppm afectando la actividad estimulada solamente a 1 ppm. El Orégano, además de poseer propiedades microbicidas posee actividad antioxidante debido a la presencia de los aceites esenciales, timol y carvacrol (Lagauri *et al*., 1993 y Montoya *et al.,* 2007). Sahin *et al*., y Chun*et al*.,(2004) describen que extractos alcohólicos de *Oreganum*

vulgare tienen efecto antioxidante ya que la presencia de fenoles es más alta al obtener el extracto de esta manera.

- El extracto de Té Verde demostró un efecto bactericida contra los 3 vibrios a los cuales fue confrontado; para *P. aeruginosa* fue bactericida a la mayor concentración usada, en tanto que para Aeromonas no tuvo efecto. Moromi *et al*., (2009) concluyen en su trabajo que el Té verde puede evitar la formación de placa bacteriana. Entre los compuestos que le confieren estas propiedades se encuentra taninos y flavonoides (Moromi *et al.*, 2009) A nuestro conocimiento por la literatura encontrada no hay reportes de efecto inhibidor ni bactericida del Té Verde, contra las bacterias a las cuales se confronto en este estudio al extracto.

Las evaluaciones inmunológicas del extracto de Té verde mostraron sus propiedades Antioxidantes a concentraciones bajas (0,1 y 10 ppm), provocando la disminución de generación de superóxido de forma tan fuerte que no permitió incrementar la generación de O_2^- de la actividad estimulada. Tawwab *et al*., (2010) evaluaron el té verde en un desafío bacteriano contra tilapia (*O. niloticus*) determinando que puede ser un prometedor inmonestimulante mejorando la salud de los peces. En los resultados de su trabajo Gupta *et al*., (2002) describen que el Té verde debido a sus compuestos polifenólicos son los responsables de sus propiedades antioxidantes.

- El extracto de Arándano fue analizado únicamente por sus propiedades antioxidantes. Dando como resultado inhibición de la generación de superóxido, a la concentración más alta. Laplaud *et al*., (2009) reportan en su trabajo sobre el potencial antioxidante *in vitro* de este extracto en humanos debido a la presencia de compuestos polifenólicos como los flavonoides. En cambio Aragón *et al*., (1998) relacionan la actividad antioxidante del Arándano a la presencia de antocianósidos ya que posee la capacidad de eliminar radicales hidroxilo a partir de 50 mg/ml.

- Con respecto a la evaluación del Astrágalus, el objetivo fue directamente estudiar la actividad inmunoestimulante. Por eso se usó como control otro inmunoestimulante comercial (MacroGard®) usado en camarón. Los resultados no mostraron mucha diferencia en las distintas concentraciones evaluadas, ni se observó diferencia con el control del inmunoestimulante. La única diferencia observada fue contra el control de actividad base. En una monografía de *A. membranaceus* publicada en amr® (Alternative Medicine Review)

describen que la acción inmunomoduladora se debe a la presencia de polisacáridos, entre los cuales se han identificado glucanos y otros como heteropolysacaridos.

- En cuanto el Propóleo; Farré *et al.*, (2004) resaltan que la actividad bacteriostática y bactericida del propóleo puede variar de una región a otra, ya que su presencia se asocia en parte a las resinas que las abejas recogen de las plantas presentes en el entorno; Tolosa y Cañizares (2002) en su evaluación de la actividad antimicrobiana del propóleo describen que la acción bactericida de los propóleos depende del solvente que se use, la procedencia y de la bacteria a la que es confrontado. Entre las bacterias evaluadas por estos autores estuvo la *P. aeruginosa*, la cual fue inhibida con la menor concentración de propóleo. Los resultados pobres obtenidos se las atribuimos al origen del propóleo, el cual es desconocido, pero principalmente a la difícil difusión de la resina en el agar.

La literatura sobre biomoléculas antimicrobianas y antioxidantes beneficiosas en seres humanos es muy extensa, existiendo muy pocos reportes en especies acuáticas como en el caso del camarón *P. vannamei*. Con la extensa literatura de resultados en humanos pudimos tener una guía para el desarrollo del presente trabajo, con el cual obtuvimos resultados muy prometedores. Los productos naturales pueden ayudar en los cultivos tanto en infecciones bacterianas como al desarrollo de un animal con un eficiente sistema inmunitario; dando como resultado un camarón de cultivo libre de quimicos. Para el control de enfermedades el estudio se puede extender a otras especies acuáticas como la tilapia. Por otra parte nos ha permitido planificar nuevos análisis que implican el uso de cada uno de los productos para tratar biopelículas, desinfección de alimento de uso acuícola, tratamiento de alimentos de origen marino. Cabe recordar que en nuestro país podemos encontrar gran biodiversidad vegetal poco explorada y aún menos explotada. Estas especies vegetales nativas posiblemente posean compuestos bioactivos de gran utilidad en salud humana y producción animal

5. CONCLUSIONES

1. Los extractos por su actividad fueron clasificados y evaluados, para los análisis antibacteriales: Ajo, Noni, Orégano, Té Verde y Propóleo y para los análisis inmunológicos: Ajo, Noni, Orégano, Té Verde, Arándano y Astrágalus.
2. Los extractos que resultaron tener efecto contra las bacterias fueron:

- ✓ El ajo a todas las concentraciones evaluadas fue bactericida contra todas las bacterias.
- ✓ El Noni fue bactericida solo para *V. harveyi.*
- ✓ El Orégano fue bactericida solo para *V. harveyi, V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus.*
- ✓ El Té Verde fue bactericida para todas las bacterias excepto para Aeromonas.

3. Los extractos que resultaron tener efecto antioxidante e inmunoestimulante fueron:

- ✓ El Ajo a todas las concentraciones resultó antioxidante
- ✓ El Noni a las concentraciones más altas resultó antioxidante
- ✓ El Orégano a las concentraciones más bajas resultó antioxidante
- ✓ El Té Verde a las concentraciones más bajas resultó antioxidante
- ✓ El Arándano a la concentración más alta resultó ser antioxidante y a las concentraciones más bajas inmunoestimulante.
- ✓ El Astrágalus a todas las concentraciones resultó inmunoestimulante.

6. RESUMEN

El propósito de esta Investigación es proyectarse hacia una Acuicultura orgánica, por lo que conforme a la literatura y a la disponibilidad en nuestro territorio se seleccionaron plantas con compuestos bioactivos beneficiosas para las especies acuícolas.

Siendo las bacterias causantes de muchas pérdidas económicas en acuicultura, los productos con actividad antibacteriana fueron evaluados contra bacterias que afectan sistemas de cultivo (*Vibrio harveyi*, Aeromonas), sin descartar bacterias enteríticas presentes en crustáceos (*Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*) y una bacteria clínica (*Pseudomonas aeruginosa*).

Se evaluó concentraciones de extractos naturales de Ajo (*Allium sativum)*, Noni *(Morinda citrifolia)*, Orégano (*Oreganum vulgare*), Te Verde (*Camellia sinensis*), Arándano (*Vaccinium myrtillus*), Astrágalus (*Astragalus membranaceus*) y Propóleo; con potencial actividad antibacteriana, antioxidante e inmunoestimulante sobre el camarón *Litopenaeus vannamei.*

Los métodos microbiológicos que se siguieron para evaluar estas actividades fueron Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI);la cual fue determinada mediante Turbidez. Obteniendo cero turbidez para todas las bacterias a diferentes concentraciones de los productos.

Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Para el *V. harveyi* todos los productos fueron bactericidas. Para Aeromonas solo el Ajo fue bactericida. Para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* el Ajo, Orégano y Te verde fueron bactericidas, mientras que el Noni no tuvo efecto bactericida contra *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, P.*

aeruginosa y Aeromonas. Debido a la turbidez del producto la CMI del Té verde fue igual a la CMB.

La capacidad Antioxidante e Inmunoestimulante de los extractos se evaluaron sobre Hemocitos y extracto de Hemocitos de *P. vannamei*, utilizando dos ensayos inmunológicos que involucran procesos redox. Con la Cuantificación del Anión Superóxido (O_2^-) por Reducción del NBT, se analizó la actividad antioxidante e inmunoestimulante. El Ajo mostro actividad antioxidante en todas las concentraciones evaluadas, mientras que el Noni mostro actividad antioxidante a las mayores concentraciones. El Arándano presento actividad antioxidante e inmunoestimulante, el Orégano y el Té Verde fueron antioxidantes a las menores concentraciones, el Astrágalus demostró ser un inmunoestimulante a todas las concentraciones, sin observarse diferencia entre las dosis.

Este trabajo demuestra que los compuestos bioactivos presentes en los extractos de plantas pueden ser beneficiosos en animales acuícolas.

7. SUMMARY

The objective of this research is evaluated the efficacy of some natural substances in the aquaculture growth, to highlight the use of organic products. For this reason it was selected a group of plant substances, for their easy access and their good properties reported in some studies.

Some Bacteria are responsible for economic loss in mariculture industry. Consequently it was evaluated the antimicrobial activity against (Aeromonas *Vibrio harveyi*), intestinal flora of crustaceans (*Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*) and a clinical bacterium (*Pseudomonas aeruginosa*).

The plant substances evaluated were garlic (*Allium sativum),* Noni *(Morinda citrifolia),* Oregano (*Oreganum vulgare*), Green tea (*Camellia sinensis*), Bilberry (*Vaccinium myrtillus*), Astrágalus (*Astragalus membranaceus*) and Propoleo, using different concentration of each substance. All of these have antibacterial activity, antioxidant activity and inmunostimulant activity in prawns (*Litopenaeus vannamei*.)

The microbiological methodologies used were Determination of Minimum inhibitory concentrations (MICs) for turbidity, obtaining as result zero turbidity for all bacteria and all concentrations of substances. Because the MICs value in Green tea was equal to the minimum bactericidal concentrations (MBCs). The second methodology was the Determination of the Minimum bactericidal concentrations (MBCs). It was observed a bactericidal activity of *V. harveyi* against all bacteria. Only the substances of the garlic presented a bactericidal activity against *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus.* Finally *garlic,* oregano and Green tea showed some bactericidal activity in contrast to Noni, that has not any bactericidal effect.

The inmunostimulant and antioxidant capacity of the plant substances was evaluated in different concentration, with hemocytes and hemocytes extracts of *Penaeus vannamei and* immunological test of redox reactions were realized to quantify the superoxide (O_2^-) formation, by the reduction of NBT. In this test was observed that garlic substances presented antioxidant activity in all concentrations, noni substances only in higher concentrations, oregano and green tea only in lower concentrations. Bilberry substances showed an antioxidant activity. Astrágalus substances had an inmunostimulant activity in all concentrations.

In conclusion this research has shown that the bioactive compounds of plant extracts could have a positive effect in animals of aquaculture growth.

8. BIBLIOGRAFÍA

ABDULLAH T., KANDIL O., ELKADI A., and CARTER J. 1988. GARLIC REVISITED: THERAPEUTIC FOR THE MAJOR DISEASES OF OUR TIMES?.Journal of the national medical association, vol. 80, no. 4, 1988.

AGIS Phytochemical Database. 1998. US National Agricultural Library Phytochemical database. Disponible en: http://www.probe.nalusda.gov.8300/cgi-bin/browse/phytochemicals.

ANDERSON, R.S. 1996. Production of reactive oxygen intermediates by invertebrate hemocytes: immunological significance. In SÔDERHÂLL, K., IWANAGA, S.; VASTA G.R.; (eds). New Directions in Invertebrate Immunology.Fair Haven, SOS Publication. pp. 109-129.

ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW a journal of clinical therapeuticas. *Vaccinium myrtillus*.Monographs. Volumen 6, Number 5. Issue Date: 2000-12-01. http://altmedrev.com.

ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW a journal of clinical therapeuticas. *Astragalus membranaceus*.Monographs. Volumen 8, Number 1. Issue Date 2002-12-03. http://altmedrev.com

ARAGÓN S., BASABE B., BENEDÍ J., VILLAR A. 1998. Antioxidant action of *Vaccinium myrtillus L*.

BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; DE LORGERIL, J., GAMIER, J.; ROMESTAND, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster Crassostrea gigas. Immunological Reviews, 198: 149-168.

BARRACCO M;, PERAZZOLO L. M;ROSA R.D. 2008. Guía Técnica. Patología e Inmunología de Camarones Peneaidos. *In* Inmunología del Camarón, p. 199-198.

BARTLETT, T.C.; CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S.; WARR, G.W. 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, Litopenaeus vannamei and Litopenaeus setiferus. Marine Biotechnology NY, 4: 278-293.

BJARNSHOLT T., JENSEN P., RASMUSSEN T., CHRISTOPHERSEN L.,CALUM H., HENTZER M., HOUGEN H., RYGAARD J., MOSER C., EBERL L., HØIBY N. and GIVSKOVM. 2005. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapidclearing of pulmonary Pseudomonas aeruginosainfections. Microbiology, 151, 3873–3880.

Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. 1994. pag. 190-193 264,268,270.

BLANCO Y., VAILLANT F., PEREZB A., REYNESC M., BRILLOUETC J., BRATC P. 2005. The noni fruit (Morinda citrifolia L.): A review of agricultural research,nutritional and therapeutic properties. Journal of Food Composition and Analysis 19 (2006) 645–654.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Current Opinion in Immunology, 12: 64-76.

BREIDENSTEIN E., NÙÑEZ C. and HANCOCK R. 2011. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. Trends in Microbiology xx 1–8.

BULET P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological Reviews, 198: 169-184.

CAMBELL, R. E., J. H. LILLEY, TAUHID, V. PANYAWACHIRA and S. KANACHANAKHAN. 2001. In vitro screening of novel treatments for *Aphanomyces invadens*. Aquaculture Research, Vol. 32, No. 3.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. 2004.The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunological Reviews, 198: 116-126.

CHACKO S., THAMBI P., KUTTAN R., NISHIGAKI I. 2010. Beneficial effects of green tea: A literature review. Chinese Medicine 5:13. http://www.cmjournal.org/content/5/1/13

CHAKRABORTY S. and HANCZ C. 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. Reviews in Aquaculture. Volume 3, Issue 3, pages 103–119

CHANSUE, N., A. PONPORNPISIT, M. ENDO, M SAKAI and S. YOSHIDA. 2000. Improved immunity of tilapia *Orechromis niloticus* by C-UP III, a herb medicine. Fish Pathology, Vol. 35, No. 2.

CHUN S., VATTEM D., LIN Y. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against Helicobacter pylori. - Process Biochemistry.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; VAN DORSSELAER, A.; RODRÍGUEZ, J.; BACHÈRE, E.1997. Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp Penaeus vannamei (Decapoda). The Journal of Biological Chemistry, 272: 28398-28406.

DIREKBUSARAKOM, A. HERUNSALEE, M. YOSHIMIZU, and S., Y. EZURA. 1996. Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against fish pathogenic viruses. Fish Pathology, Vol. 31, No. 4.

DIREKBUSARAKOM SATAPORN, HERUNSALEE ANGKANA and YOSHIMIZU MAMORU. 1996. Antiviral Activity of Several Thai Traditional Herb Extracts against Fish Pathogenic Viruses.

FARRÉ R., FRASQUET I., SÁNCHEZ A. 2004. El própolis y la salud. Propolis and human health. Ars Pharmaceutica, 45:1; 21-43,

GRISHOK, A. 2005. RNAi mechanisms in Caenorhabditis elegans. FEBS Letters, 579: 5932-5939.

GROSS, P.S.; BARTLETT, T.C.; BROWDY, C.L.; CHAPMAN, R.W.; WARR, G.W. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, Litopenaeus vannamei, and the Atlantic White Shrimp, L. setiferus. Developmental and Comparative Immunology, 25: 565-577.

GUPTAA S., HALDERA N., SRIVASTAVAA S., TRIVEDIA D., JOSHIA S., S. VARMA D. 2002. Green Tea (Camellia sinensis) Protects against Selenite-Induced Oxidative Stress in Experimental Cataractogenesis. Ophthalmic Research.Journal for Research in Experimental and Clinical Ophthalmology.Vol. 34, No. 4. http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=ShowAbstract&ProduktNr=223858&Ausgabe=228499&ArtikelNr=63881

HANNON, G.J.; 2002.RNA interference. Nature, 418: 244-251

HEINICKE R. 1985. The pharmacologically active ingredient of Noni.Bulletin of the National Tropical Botanical Garden.

HEINECKE RM. 1985. The Pharmacologically Active Ingredient of Noni. Pacific Trop Bot Garden Bull;15:10-4

HIRAZUMI A, FURUSAWA E. 1999.An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of Morinda citrifolia (noni) with antitumor activity. Phytother Res;13(5):380-7.

JAYARAMAN S. MANOHARAN M. y ILLANCHEZIAN S. 2008. Antibacterial, Antifungal and Tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. Antimicrobial & Antitumor Activity of *Morinda citrifolia.* International Journal of Integrative Biology . Vol. 3, No. 1, 44

JIAN, J. and WU, Z. 2003. Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson).Aquaculture Vol. 218.

JIRAVANI CHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology, 211: 213-236.

KAWABATA, S.I.; MUTA, T.; IWANAGA, S. 1996. The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of the horseshoe crab In: SÖDERHÄLL, K.; IWANAGA, S.; VASTA, G.R. (eds). New Directions in Invertebrate Immunology.SOS Publications, Fair Haven. pp. 255-283

KRAUSE, C.D.; PESTKA, S. 2005.Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. Pharmacology and Therapeutics, 106: 299-346.

KRÖNCKE, K.D.; FEHSE, K.; KOLB-BACHOFEN, V. 1997. Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection –how, why, when, and where? Nitric Oxide, 1: 107-120

KYEONG-JUN LEE, HONRAD DABROWSKI, MANUEL SANDOVAL & MARK J. S. MILLAR. 2005. Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal. Their antioxidant antivities and effects on growth, feed utilization, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles.

PM LAPLAUD, A. LELUBRE, MJ CHAPMAN. 2009. Antioxidant action of Vaccinium myrtillus extract on human low density lipoproteins in vitro: initial observations. Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique Issue. Fundamental & Clinical Pharmacology.Volume 11, Issue 1, pages 35–40, January-February 1997

LEE Y., GWEON O., SEO Y., IM J., KANG M., KIM M. and KIM J. 2009. Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2diabetes mellitus. ⓒ2009 The Korean Nutrition Society and the Korean Society of Community Nutrition. Nutrition Research and Practice (2009), 3(2), 156-161

LEVAND O, LAR SON HO. 1979. Some chemical constituents of Morinda citrifolia. Planta Med; 36:186-7.

LOGAMBAL, S.M., VENKATALAKSHMI, S. and DINKARAN-MICHAEL, R. 2000. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn in *Oreochromis mossambicus* (Piters). Hydrologia, Vol. 430.

LAGOURI V., BLEKAS G., TSIMIDOU M., KOKKINI S., BOSKOU D. 1993. Compossition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece.

METER J. WALTER & JAMES R. WINTON. 2010. Emerging viral diseases of fish and shrimp.

MADSEN, H., BUCHMANN, K. AND MELLERGAARD, S. 2000. Treatment of trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation systems in Denmark: alternatives to formaldehyde. Aquaculture, Vol. 186.

MONTOYA G., LONDOÑO J., YASSIN L., VASQUEZ G., ROJAS M., RAMÌREZ R. 2007. MONOTERPENOS AROMÁTICOS TIMOL Y CARVACROL: APROXIMACIONES DE SU POSIBLE PAPEL EN PROCESOS CLAVES DE LA PATOLOGIA CARDIOVASCULAR. Scientia Et Technica, abril, año/vol. XIII, número 003. pp. 27-32.

MOROMI H., CADILLO E., PERFECTO D. 2009. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Odontología Sanmarquina 12(1): 25-28.

MURPHY, M.P.; PACKER, M.A.; SCARLETT, J.L.; MARTIN, S.W. 1998. Peroxynitrite: A Biologically Significant Oxidant. General Pharmacology, 31: 179-186.

NAPPI, A.J., OTTAVIANNI, E. 2000.Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. Bioassays, 22: 469-480.

NAPPI, A.J.; VASS, E., 1993.Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. Pigment Cell Research, 6: 117-126.

NGO S., WILLIAMS D., COBIAC L., and. HEAD R. 2007. Does Garlic Reduce Risk of Colorectal Cancer?.The Journal of Nutrition.Nutrition and Disease. 137: 2264–2269.

NYA E. and AUSTIN B. 2009. Use of garlic, Allium sativum, to control Aeromonas hydrophila infection in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 32, 963–970.

NYA E. & AUSTIN B.. 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an inmunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).

PAREDES M., GATÉLUM M., VASQUEZ R. 2007. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ORÈGANO MEXICANO (LIPPIA BERLANDIERI SCHAUER) Y DE SU ACEITE ESENCIAL SOBRE CINCO ESPECIES DEL GENERO VIBRIO. Revista Fitotecnia Mexicana, año/vol. 30, número 003. Sociedad Mexicana de Fitogenética. pp. 261-267.

S. RAJARAJAN, NISHA K JOHN, SHANTHI. S. 2009. IN VITRO BACTERICIDAL ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM RIPE AND UNRIPE FRUIT OF 'NONI'.P.G & Research Department of Microbiology & Biotechnology.

REDDY, K.V.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. International Journal of Antimicrobial Agents, 24: 536-547.

RIVLIN R. 2009. Can garlic reduce risk of cancer?.Am J Clin Nutr 2009;89:17–8. Printed in USA. _ 2009 American Society for Nutrition

ROCH, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate. Aquaculture, 172, 125-145

ROBALINO, J.; BROWDY, C.L.; PRIOR, S.; METZ, A.; PARNELL, P.; GROSS, P.; WARR, G. 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. Journal of Virology, 78: 10442-10448.

ROBALINO, J.; BARTLETT, T.C.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S.; BROWDY, C.L.; WARR, G.W. 2007a. Doublestranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. Developmental and Comparative Immunology, 31: 539-547.

SAHIN F., GULLUCE M., DAFERERA D., SOKMEN A. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control 2004.

SHARMA A. and PATEL V. 2008. In Vitro Screening of the Antibacterial Activity and

Identification of Bioactive Compounds From Plants against Selected Vibrio spp. Pathogens. Bacteriology Laboratory, Department of Post Graduate Studies and Research in Biological Sciences.137-144.

PUNITHA S., BABU M., SIVARAM V., SHANKAR V., DHAS S., MAHESH T., IMMANUEL G. & CITARASU T. 2008. Immunostimulating inluence of herbal biomedicinas on nonspecific immunity in Grouper *Epinephelus taurina* juvenile against *Vibrio harveyi* infection.

SOUZA E., STAMFORD T., LIMA E. 2006. SENSITIVITY OF SPOILING AND PATHOGEN FOOD-RELATED BACTERIA TO ORIGANUM VULGARE L. (LAMIACEAE) ESSENTIAL OIL. Brazilian Journal of Microbiology (2006) 37:527-532.

SUPUNGUL, P.; KLINBUNGA, S.; PICHYANGKURA, R.; JITRAPAKDEE, S., HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (Penaeus monodon). Marine Biotechnology, 4: 487-494

TAWWAB A., AHMAD M., SEDEN M., and SAKR, S. 2010.Use of Green Tea, Camellia sinensis L., in Practical Diet for Growth and Protection of Nile Tilapia, Oreochromis niloticus (L.), against Aeromonas hydrophila Infection.Journal of the World Aquaculture Society, 41: 203–213.

http://aquahoy.com/index.php/es/images/flash/index.php?option=com_content&view=article&id=11483:egipto-uso-del-te-verde-como-inmunoestimulante-para-la-tilapia-en-cultivo&Itemid=100018&lang=pt.

THEOPOLD, U.; SCHMIDT, O.; SÖDERHÄLL, K.; DUSHAY, M.S., 2004. Coagulation in arthropods: defense, wound closure and healing. Trends in Immunology, 25: 378-388.

TOLOSA L. y CAÑIZARES E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica, 43:1-2; 187-204.

VANACLOCHA B. 2003. Fitoterapia. VADEMÉCUM DE PRESCRIPCIÓN. pág. 131.

VASEEHARAN B., PRASAD G., RAMASAMY P. and BRENNAN G. 2010. Antibacterial activity of Allium sativum against multidrug-resistant Vibrioharveyi isolated from black gill–diseased Fenneropenaeus indicus. Biomedical and Life Sciences.Aquaculture International. Volume 19, Number 3, 531-539. http://www.springerlink.com/content/m11395w023684303/

VILLAMAR C. 2000. Acuicultura orgánica-ecológica: Aplicación de productos naturales en sustitución de químicos en los procesos de cría de camarones en cautiverio.Artículo publicado en la Revista AquaTIC nº 10.WANG M, KIKUZAKI H, CSISZAR K, BOYD CD, MAUNAKEA A, FONG SF, et al. 1999. Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of Morinda citr ifolia (Noni). J Agric Food Chem; 47: 4880-2.

WANG M, KIKUZAKI H, JIN Y, NAKATANI N, ZHU N, CSISZAR K, et al. 2000. Novel glycosides from noni (Morinda citrifolia) . J Nat Prod; 63: 1182-3.

WANG M., LUTFIYYA M., WEIDENBACHER-HOPER V., ANDERSON G., SU C. and WEST B. 2009. Antioxidant activity of noni juice in heavy smokers. Chemistry Central

Journal 2009, 3:13.This article is available from: http://journal.chemistrycentral.com/content/3/1/13

WARNER, H.R.; 1994.SUPEROXIDE DISMUTASE, AGING, AND DEGENERATIVE DISEASE. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, 3: 249-258.

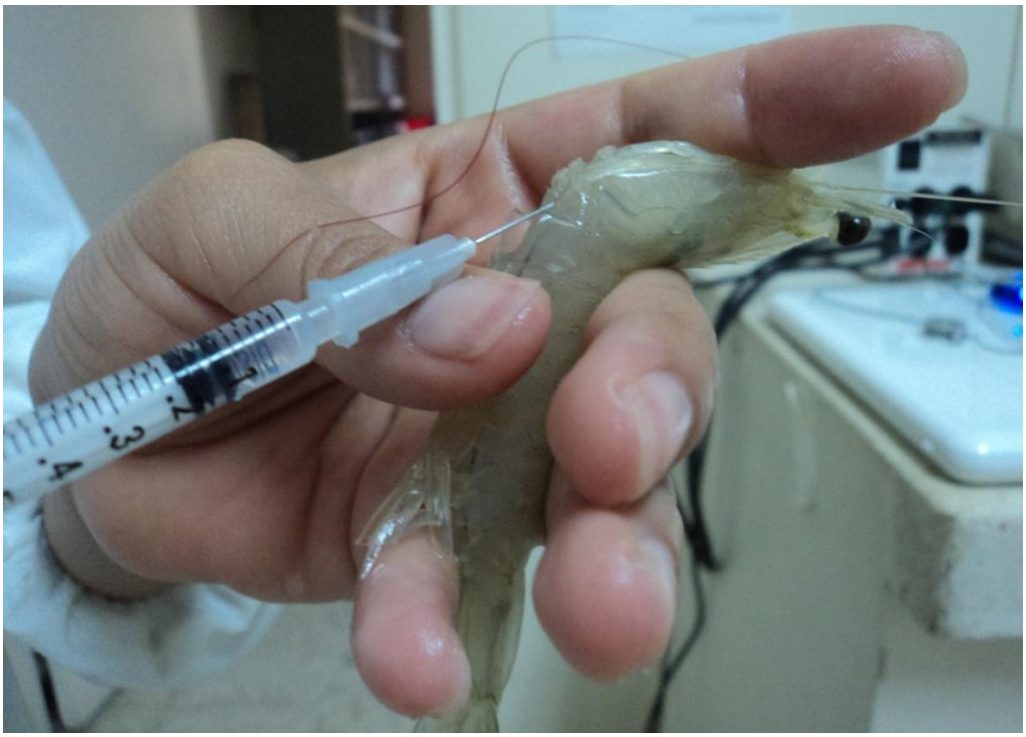
WESTENBERG, M.; HEINHUIS, B.; ZUIDEMA, D.; BLACK J.M. 2005. siRNA injection induces sequenceindependent protection in Penaeus monodon against white spot syndrome virus. Virus Research, 114: 133-139.

WILSON R., SMITH A., KAC˘URA´KOVA´ M., SAUNDERS P.,WELLNER N., and WALDRON K. 2000. The Mechanical Properties and Molecular Dynamics ofPlant Cell Wall Polysaccharides Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy1. Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UA, United Kingdom.Plant Physiology, September 2000, Vol. 124, pp. 397–405, www.plantphysiol.org © 2000 American Society of Plant Physiologists.

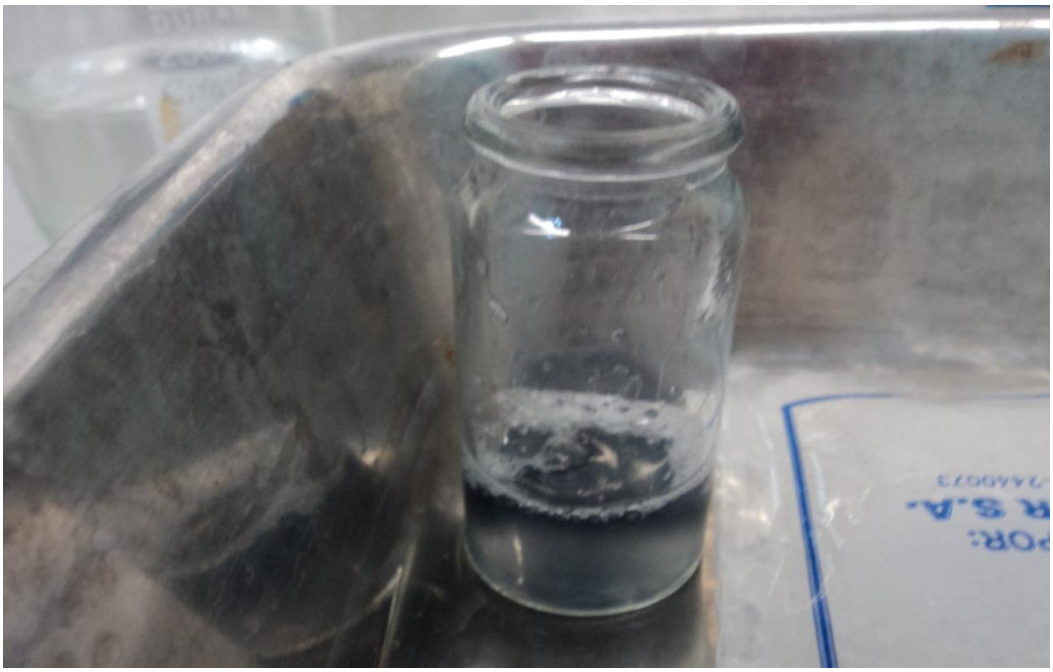
ZAIDAN, M.R.S., NOOR RAIN, A., BADRUL, A.R., ADLIN, A., NORAZAH, A. & ZAKIAH, I. 2005. *Invitro* screening of five local medicinal plants forantibacterial activity using disc diffusion method. Tropical Biomedicine 22(2): 165–170.

ANEXOS

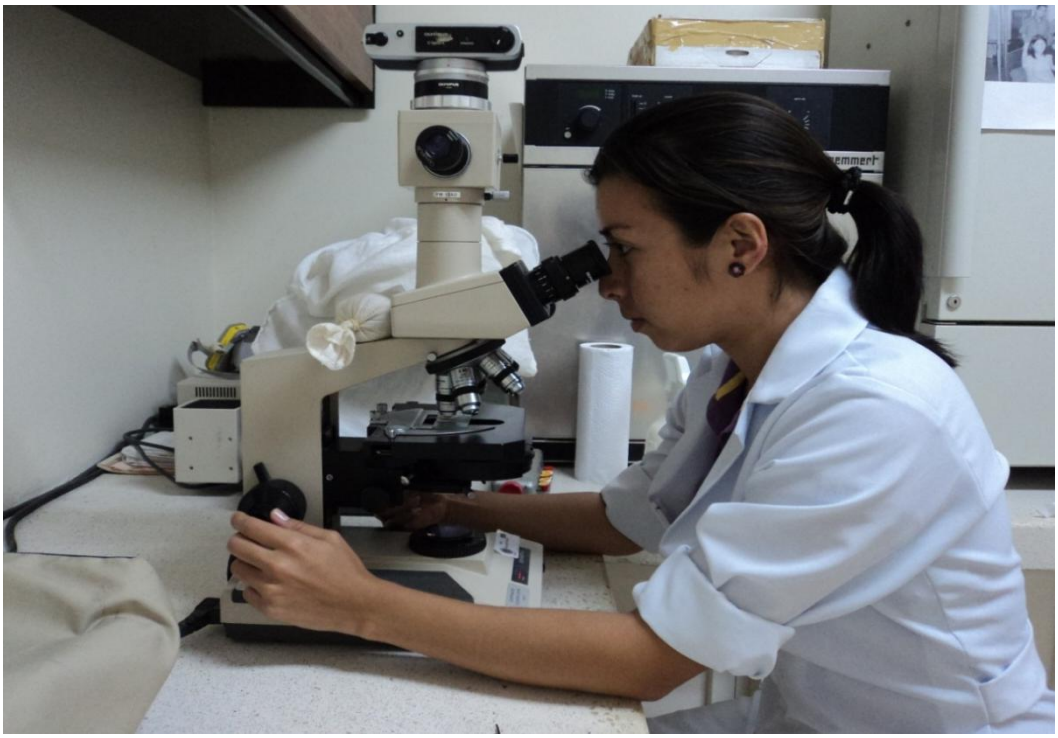
Anexo 1. Toma de muestra de Hemolinfa con Jeringuilla de 1 cc. cargada con Citrato de Sodio al 10%



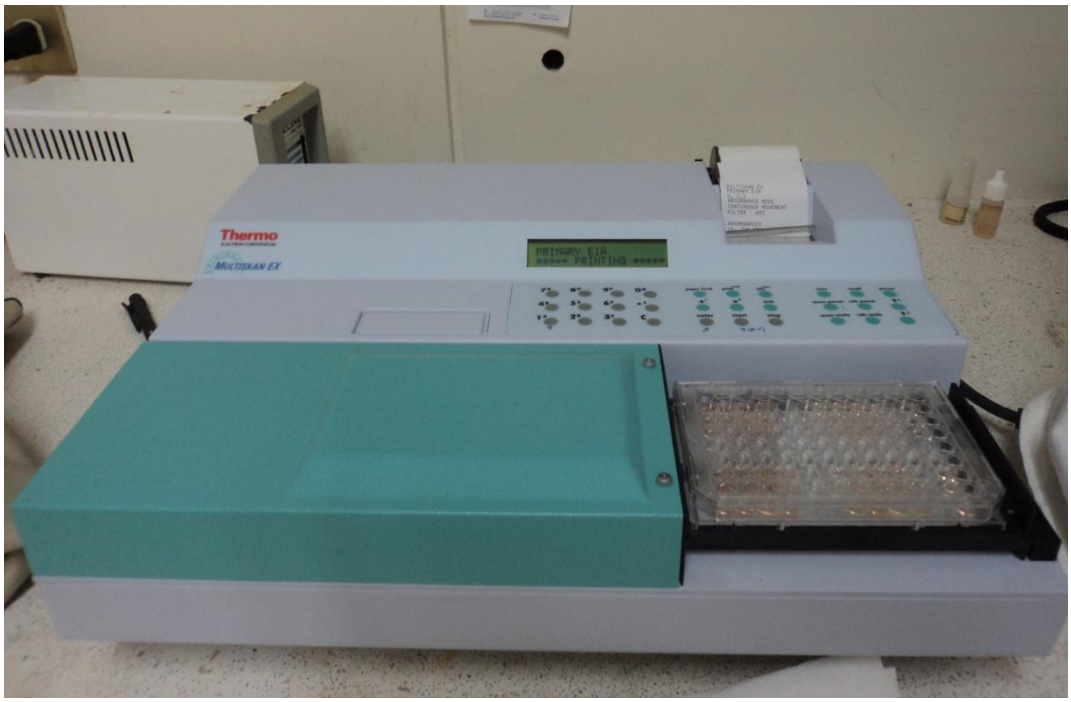
Anexo 2. Hemolinfa igualada con Citrato para ser distribuida en Eppendorf.



Anexo 3. Hemograma, cuantificación de Hemocitos en la Cámara de Neubahuer en el Microscopio de Contraste de Fases.



Anexo 4. Lectura de Microplaca con el Lector de Microplaca.



Anexo 5. Medios para neutralizar los extractos naturales

PREPARACIÓN DE MEDIOS PARA NEUTRALIZAR LOS EXTRACTOS NATURALES	
MEDIOS	**METODOLOGÍA**
Hepes	5,95g/25ml de Agua destilada (1M), se neutraliza con NaOH
Medio TSB 5X	X g de medio TSB 5 veces más sin adicionar ClNa.

ANEXO 5. Tablas de resultados de Concentración Mínima Inhibitoria contra las Bacterias con los productos, medido por Turbidez (+) y Cero Turbidez (-)

AJO					
CONCENTRACIÓNMÍNIMA INHIBITORIA					
ppm	**BACTERIAS**				
	Importantes en Acuicultura		**Enteríticas**		**Clínicas**
	V. harveyi	**Aeromonas**	***V. parahaemolyticus***	***V. vulnificus***	***P. aeruginosa***
200000	-	-	-	-	-
150000	-	-	-	-	-
137500	-	-	-	-	-
125000	-	-	-	-	-
106250	-	-	-	-	-
81250	-	-	-	-	-
75000	-	-	-	-	-
43750	-	-	-	-	-
22500	-	-	-	-	-
11250	+	+	+	+	+
12500	+	+	+	+	+
1250	+	+	+	+	+

NONI					
CONCENTRACIÓNMÍNIMA INHIBITORIA					
%	**BACTERIAS**				
	Importantes en Acuicultura		**Enteríticas**		**Clínicas**
	V. Harveyi	**Aeromonas**	***V. parahaemolyticus***	***V. vulnificus***	***P. aeruginosa***
40	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-
25	-	+	-	-	+
21	-	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
0,3	+	+	+	+	+

ORÉGANO					
CONCENTRACIÓNMÍNIMA INHIBITORIA					
ppm	BACTERIAS				
	Importantes en Acuicultura		Enteríticas		Clínicas
	V. harveyi	Aeromonas	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*	*P. aeruginosa*
40000	-	-	-	-	-
30000	-	+	-	-	+
27500	-	+	-	-	+
25000	-	+	-	-	+
21250	-	+	-	-	+
16250	-	+	+	-	+
15000	-	+	+	-	+
8750	-	+	+	+	+
4500	+	+	+	+	+
2250	+	+	+	+	+
2500	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+

TE VERDE					
CONCENTRACIÓNMÍNIMA INHIBITORIA					
ppm	BACTERIAS				
	Importantes en Acuicultura		Enteríticas		Clínicas
	V. harveyi	Aeromonas	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*	*P. aeruginosa*
40000	+	+	+	+	+
30000	+	+	+	+	+
27500	+	+	+	+	+
25000	+	+	+	+	+
21250	+	+	+	+	+
16250	+	+	+	+	+
15000	+	+	+	+	+
8750	+	+	+	+	+
4500	+	+	+	+	+
2250	+	+	+	+	+
2500	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+

Anexo 6. Tablas de resultados de Concentración Mínima Bactericida contra las Bacterias con producto, sembrados a partir de donde había Cero Turbidez. Medido por número de bacterias (x= a concentraciones no sembradas).

AJO					
CONCENTRACIÓNMÍNIMA BACTERICIDA					
ppm	**BACTERIAS**				
	Importantes en Acuicultura		**Enteríticas**		**Clínicas**
	V. harveyi	**Aeromonas**	***V. parahaemolyticus***	***V. vulnificus***	***P. aeruginosa***
200000	0	0	0	0	0
150000	0	0	0	0	0
137500	0	0	0	0	0
125000	0	0	0	0	0
106250	0	0	0	0	0
81250	0	0	0	0	1
75000	0	0	0	0	2
43750	0	42	0	0	Incontables
22500	0	Incontables	0	0	Incontables
11250	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
12500	X	X	X	X	X
1250	X	X	X	X	X

NONI					
CONCENTRACIÓNMÍNIMA BACTERICIDA					
%	**BACTERIAS**				
	Importantes en Acuicultura		**Enteríticas**		**Clínicas**
	V. Harveyi	**Aeromonas**	***V. parahaemolyticus***	***V. vulnificus***	***P. aeruginosa***
40	0	Incontables	173	45	Incontables
30	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
28	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
25	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
21	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
16	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
15	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
9	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
5	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
2	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
3	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
0,3	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables

ORÉGANO					
CONCENTRACIÓNMÍNIMA BACTERICIDA					
ppm	BACTERIAS				
	Importantes en Acuicultura		Enteríticas		Clínicas
	V. harveyi	Aeromonas	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*	*P. aeruginosa*
40000	0	Incontables	0	0	Incontables
30000	0	Incontables	0	0	Incontables
27500	0	Incontables	Incontables	0	Incontables
25000	0	Incontables	Incontables	0	Incontables
21250	0	Incontables	Incontables	0	Incontables
16250	0	X	X	0	Incontables
15000	1	X	X	0	Incontables
8750	23	X	X	0	Incontables
4500	X	X	X	X	X
2250	X	X	X	X	X
2500	X	X	X	X	X
250	X	X	X	X	X

TE VERDE					
CONCENTRACIÓNMÍNIMA BACTERICIDA					
ppm	BACTERIAS				
	Importantes en Acuicultura		Enteríticas		Clínicas
	V. harveyi	Aeromonas	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*	*P. aeruginosa*
40000	0	Incontables	0	0	0
30000	0	Incontables	0	0	Incontables
27500	0	Incontables	0	0	Incontables
25000	0	Incontables	0	0	Incontables
21250	0	Incontables	0	0	Incontables
16250	0	Incontables	Incontables	0	Incontables
15000	17	Incontables	Incontables	0	Incontables
8750	174	Incontables	Incontables	0	Incontables
4500	200	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
2250	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
2500	X	X	X	X	X
250	X	X	X	X	X

Anexo 7. Tablas de Resultados de ANOVA de CUANTIFICACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO (O2-) POR REDUCCIÓN DEL NBT; NBT_B = Actividad Base, NBT_E= Actividad Estimulada, NBT_ = Tasa

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) T_NBTAJO	(J) T_NBTAJO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
NBT_B_AJ	.00	2.50	42.0000*	11.63329	.033	2.9247	81.0753
		25.00	47.3333*	11.63329	.015	8.2580	86.4086
		250.00	25.3333	11.63329	.314	-13.7420	64.4086
		2500.00	27.0000	11.63329	.258	-12.0753	66.0753
		25000.00	60.6667*	11.63329	.002	21.5914	99.7420
	2.50	.00	-42.0000*	11.63329	.033	-81.0753	-2.9247
		25.00	5.3333	11.63329	.997	-33.7420	44.4086
		250.00	-16.6667	11.63329	.709	-55.7420	22.4086
		2500.00	-15.0000	11.63329	.785	-54.0753	24.0753
		25000.00	18.6667	11.63329	.611	-20.4086	57.7420
	25.00	.00	-47.3333*	11.63329	.015	-86.4086	-8.2580
		2.50	-5.3333	11.63329	.997	-44.4086	33.7420
		250.00	-22.0000	11.63329	.451	-61.0753	17.0753
		2500.00	-20.3333	11.63329	.529	-59.4086	18.7420
		25000.00	13.3333	11.63329	.853	-25.7420	52.4086
	250.00	.00	-25.3333	11.63329	.314	-64.4086	13.7420
		2.50	16.6667	11.63329	.709	-22.4086	55.7420
		25.00	22.0000	11.63329	.451	-17.0753	61.0753
		2500.00	1.6667	11.63329	1.000	-37.4086	40.7420
		25000.00	35.3333	11.63329	.085	-3.7420	74.4086
	2500.00	.00	-27.0000	11.63329	.258	-66.0753	12.0753
		2.50	15.0000	11.63329	.785	-24.0753	54.0753
		25.00	20.3333	11.63329	.529	-18.7420	59.4086
		250.00	-1.6667	11.63329	1.000	-40.7420	37.4086
		25000.00	33.6667	11.63329	.108	-5.4086	72.7420
	25000.00	.00	-60.6667*	11.63329	.002	-99.7420	-21.5914
		2.50	-18.6667	11.63329	.611	-57.7420	20.4086
		25.00	-13.3333	11.63329	.853	-52.4086	25.7420
		250.00	-35.3333	11.63329	.085	-74.4086	3.7420
		2500.00	-33.6667	11.63329	.108	-72.7420	5.4086
NBT_E_AJ	.00	2.50	-14.0000	18.38578	.969	-75.7564	47.7564
		25.00	18.3333	18.38578	.910	-43.4231	80.0897
		250.00	3.3333	18.38578	1.000	-58.4231	65.0897
		2500.00	22.6667	18.38578	.813	-39.0897	84.4231
		25000.00	33.6667	18.38578	.483	-28.0897	95.4231
	2.50	.00	14.0000	18.38578	.969	-47.7564	75.7564
		25.00	32.3333	18.38578	.523	-29.4231	94.0897
		250.00	17.3333	18.38578	.927	-44.4231	79.0897
		2500.00	36.6667	18.38578	.398	-25.0897	98.4231
		25000.00	47.6667	18.38578	.173	-14.0897	109.4231
	25.00	.00	-18.3333	18.38578	.910	-80.0897	43.4231
		2.50	-32.3333	18.38578	.523	-94.0897	29.4231
		250.00	-15.0000	18.38578	.959	-76.7564	46.7564
		2500.00	4.3333	18.38578	1.000	-57.4231	66.0897
		25000.00	15.3333	18.38578	.955	-46.4231	77.0897
	250.00	.00	-3.3333	18.38578	1.000	-65.0897	58.4231
		2.50	-17.3333	18.38578	.927	-79.0897	44.4231
		25.00	15.0000	18.38578	.959	-46.7564	76.7564
		2500.00	19.3333	18.38578	.891	-42.4231	81.0897
		25000.00	30.3333	18.38578	.585	-31.4231	92.0897
	2500.00	.00	-22.6667	18.38578	.813	-84.4231	39.0897
		2.50	-36.6667	18.38578	.398	-98.4231	25.0897
		25.00	-4.3333	18.38578	1.000	-66.0897	57.4231
		250.00	-19.3333	18.38578	.891	-81.0897	42.4231
		25000.00	11.0000	18.38578	.989	-50.7564	72.7564
	25000.00	.00	-33.6667	18.38578	.483	-95.4231	28.0897
		2.50	-47.6667	18.38578	.173	-109.4231	14.0897
		25.00	-15.3333	18.38578	.955	-77.0897	46.4231
		250.00	-30.3333	18.38578	.585	-92.0897	31.4231
		2500.00	-11.0000	18.38578	.989	-72.7564	50.7564

NBT_AJ	.00	2.50	-.5600	.20437	.137	-1.2465	.1265
		25.00	-.3133	.20437	.652	-.9998	.3731
		250.00	-.1700	.20437	.956	-.8565	.5165
		2500.00	-.0233	.20437	1.000	-.7098	.6631
		25000.00	-.3533	.20437	.540	-1.0398	.3331
	2.50	.00	.5600	.20437	.137	-.1265	1.2465
		25.00	.2467	.20437	.826	-.4398	.9331
		250.00	.3900	.20437	.442	-.2965	1.0765
		2500.00	.5367	.20437	.164	-.1498	1.2231
		25000.00	.2067	.20437	.905	-.4798	.8931
	25.00	.00	.3133	.20437	.652	-.3731	.9998
		2.50	-.2467	.20437	.826	-.9331	.4398
		250.00	.1433	.20437	.978	-.5431	.8298
		2500.00	.2900	.20437	.716	-.3965	.9765
		25000.00	-.0400	.20437	1.000	-.7265	.6465
	250.00	.00	.1700	.20437	.956	-.5165	.8565
		2.50	-.3900	.20437	.442	-1.0765	.2965
		25.00	-.1433	.20437	.978	-.8298	.5431
		2500.00	.1467	.20437	.976	-.5398	.8331
		25000.00	-.1833	.20437	.940	-.8698	.5031
	2500.00	.00	.0233	.20437	1.000	-.6631	.7098
		2.50	-.5367	.20437	.164	-1.2231	.1498
		25.00	-.2900	.20437	.716	-.9765	.3965
		250.00	-.1467	.20437	.976	-.8331	.5398
		25000.00	-.3300	.20437	.605	-1.0165	.3565
	25000.00	.00	.3533	.20437	.540	-.3331	1.0398
		2.50	-.2067	.20437	.905	-.8931	.4798
		25.00	.0400	.20437	1.000	-.6465	.7265
		250.00	.1833	.20437	.940	-.5031	.8698
		2500.00	.3300	.20437	.605	-.3565	1.0165

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Superóxido (O_2^-) de Ajo

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) TIEMPO	(J) TIEMPO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
NBT_BOR	.00	.10	13.3333	6.70820	.402	-9.1990	35.8657
		1.00	11.3333	6.70820	.562	-11.1990	33.8657
		10.00	5.6667	6.70820	.953	-16.8657	28.1990
		100.00	-19.6667	6.70820	.101	-42.1990	2.8657
		1000.00	-4.0000	6.70820	.989	-26.5323	18.5323
	.10	.00	-13.3333	6.70820	.402	-35.8657	9.1990
		1.00	-2.0000	6.70820	1.000	-24.5323	20.5323
		10.00	-7.6667	6.70820	.854	-30.1990	14.8657
		100.00	-33.0000*	6.70820	.004	-55.5323	-10.4677
		1000.00	-17.3333	6.70820	.175	-39.8657	5.1990
	1.00	.00	-11.3333	6.70820	.562	-33.8657	11.1990
		.10	2.0000	6.70820	1.000	-20.5323	24.5323
		10.00	-5.6667	6.70820	.953	-28.1990	16.8657
		100.00	-31.0000*	6.70820	.006	-53.5323	-8.4677
		1000.00	-15.3333	6.70820	.271	-37.8657	7.1990
	10.00	.00	-5.6667	6.70820	.953	-28.1990	16.8657
		.10	7.6667	6.70820	.854	-14.8657	30.1990
		1.00	5.6667	6.70820	.953	-16.8657	28.1990
		100.00	-25.3333*	6.70820	.025	-47.8657	-2.8010
		1000.00	-9.6667	6.70820	.704	-32.1990	12.8657
	100.00	.00	19.6667	6.70820	.101	-2.8657	42.1990
		.10	33.0000*	6.70820	.004	10.4677	55.5323
		1.00	31.0000*	6.70820	.006	8.4677	53.5323
		10.00	25.3333*	6.70820	.025	2.8010	47.8657
		1000.00	15.6667	6.70820	.252	-6.8657	38.1990
	1000.00	.00	4.0000	6.70820	.989	-18.5323	26.5323
		.10	17.3333	6.70820	.175	-5.1990	39.8657
		1.00	15.3333	6.70820	.271	-7.1990	37.8657
		10.00	9.6667	6.70820	.704	-12.8657	32.1990
		100.00	-15.6667	6.70820	.252	-38.1990	6.8657
NBT_EOR	.00	.10	32.3333	12.37830	.167	-9.2444	73.9111
		1.00	15.6667	12.37830	.797	-25.9111	57.2444
		10.00	26.0000	12.37830	.348	-15.5777	67.5777
		100.00	-9.6667	12.37830	.966	-51.2444	31.9111
		1000.00	12.0000	12.37830	.919	-29.5777	53.5777
	.10	.00	-32.3333	12.37830	.167	-73.9111	9.2444
		1.00	-16.6667	12.37830	.756	-58.2444	24.9111
		10.00	-6.3333	12.37830	.995	-47.9111	35.2444
		100.00	-42.0000*	12.37830	.047	-83.5777	-.4223
		1000.00	-20.3333	12.37830	.589	-61.9111	21.2444
	1.00	.00	-15.6667	12.37830	.797	-57.2444	25.9111
		.10	16.6667	12.37830	.756	-24.9111	58.2444
		10.00	10.3333	12.37830	.955	-31.2444	51.9111
		100.00	-25.3333	12.37830	.373	-66.9111	16.2444
		1000.00	-3.6667	12.37830	1.000	-45.2444	37.9111
	10.00	.00	-26.0000	12.37830	.348	-67.5777	15.5777
		.10	6.3333	12.37830	.995	-35.2444	47.9111
		1.00	-10.3333	12.37830	.955	-51.9111	31.2444
		100.00	-35.6667	12.37830	.110	-77.2444	5.9111
		1000.00	-14.0000	12.37830	.859	-55.5777	27.5777
	100.00	.00	9.6667	12.37830	.966	-31.9111	51.2444
		.10	42.0000*	12.37830	.047	.4223	83.5777
		1.00	25.3333	12.37830	.373	-16.2444	66.9111
		10.00	35.6667	12.37830	.110	-5.9111	77.2444
		1000.00	21.6667	12.37830	.528	-19.9111	63.2444
	1000.00	.00	-12.0000	12.37830	.919	-53.5777	29.5777
		.10	20.3333	12.37830	.589	-21.2444	61.9111
		1.00	3.6667	12.37830	1.000	-37.9111	45.2444
		10.00	14.0000	12.37830	.859	-27.5777	55.5777
		100.00	-21.6667	12.37830	.528	-63.2444	19.9111

NBT_O R	.00	.10	.1367	.17071	.962	-.4367	.7101
		1.00	-.0233	.17071	1.000	-.5967	.5501
		10.00	.1867	.17071	.875	-.3867	.7601
		100.00	.1500	.17071	.945	-.4234	.7234
		1000.00	.1667	.17071	.917	-.4067	.7401
	.10	.00	-.1367	.17071	.962	-.7101	.4367
		1.00	-.1600	.17071	.929	-.7334	.4134
		10.00	.0500	.17071	1.000	-.5234	.6234
		100.00	.0133	.17071	1.000	-.5601	.5867
		1000.00	.0300	.17071	1.000	-.5434	.6034
	1.00	.00	.0233	.17071	1.000	-.5501	.5967
		.10	.1600	.17071	.929	-.4134	.7334
		10.00	.2100	.17071	.815	-.3634	.7834
		100.00	.1733	.17071	.904	-.4001	.7467
		1000.00	.1900	.17071	.867	-.3834	.7634
	10.00	.00	-.1867	.17071	.875	-.7601	.3867
		.10	-.0500	.17071	1.000	-.6234	.5234
		1.00	-.2100	.17071	.815	-.7834	.3634
		100.00	-.0367	.17071	1.000	-.6101	.5367
		1000.00	-.0200	.17071	1.000	-.5934	.5534
	100.00	.00	-.1500	.17071	.945	-.7234	.4234
		.10	-.0133	.17071	1.000	-.5867	.5601
		1.00	-.1733	.17071	.904	-.7467	.4001
		10.00	.0367	.17071	1.000	-.5367	.6101
		1000.00	.0167	.17071	1.000	-.5567	.5901
	1000.00	.00	-.1667	.17071	.917	-.7401	.4067
		.10	-.0300	.17071	1.000	-.6034	.5434
		1.00	-.1900	.17071	.867	-.7634	.3834
		10.00	.0200	.17071	1.000	-.5534	.5934
		100.00	-.0167	.17071	1.000	-.5901	.5567

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Superóxido (O_2^-) de Orégano

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) T NBT NN	(J) T NBT NN	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
NBT_B_NN	.00	.00	2.3333	18.83300	1.000	-60.9252	65.5919
		.01	7.0833	15.75681	.997	-45.8426	60.0092
		.10	12.6667	16.84474	.971	-43.9135	69.2468
		1.00	7.6667	16.84474	.997	-48.9135	64.2468
		10.00	35.6667	16.84474	.340	-20.9135	92.2468
	.00	.00	-2.3333	18.83300	1.000	-65.5919	60.9252
		.01	4.7500	17.86655	1.000	-55.2623	64.7623
		.10	10.3333	18.83300	.993	-52.9252	73.5919
		1.00	5.3333	18.83300	1.000	-57.9252	68.5919
		10.00	33.3333	18.83300	.517	-29.9252	96.5919
	.01	.00	-7.0833	15.75681	.997	-60.0092	45.8426
		.00	-4.7500	17.86655	1.000	-64.7623	55.2623
		.10	5.5833	15.75681	.999	-47.3426	58.5092
		1.00	.5833	15.75681	1.000	-52.3426	53.5092
		10.00	28.5833	15.75681	.492	-24.3426	81.5092
	.10	.00	-12.6667	16.84474	.971	-69.2468	43.9135
		.00	-10.3333	18.83300	.993	-73.5919	52.9252
		.01	-5.5833	15.75681	.999	-58.5092	47.3426
		1.00	-5.0000	16.84474	1.000	-61.5802	51.5802
		10.00	23.0000	16.84474	.746	-33.5802	79.5802
	1.00	.00	-7.6667	16.84474	.997	-64.2468	48.9135
		.00	-5.3333	18.83300	1.000	-68.5919	57.9252
		.01	-.5833	15.75681	1.000	-53.5092	52.3426
		.10	5.0000	16.84474	1.000	-51.5802	61.5802
		10.00	28.0000	16.84474	.578	-28.5802	84.5802
	10.00	.00	-35.6667	16.84474	.340	-92.2468	20.9135
		.00	-33.3333	18.83300	.517	-96.5919	29.9252
		.01	-28.5833	15.75681	.492	-81.5092	24.3426
		.10	-23.0000	16.84474	.746	-79.5802	33.5802
		1.00	-28.0000	16.84474	.578	-84.5802	28.5802
NBT_E_NN	.00	.00	18.0000	26.41296	.981	-70.7191	106.7191
		.01	-34.2500	22.09867	.642	-108.4777	39.9777
		.10	33.3333	23.62447	.721	-46.0194	112.6861
		1.00	26.0000	23.62447	.872	-53.3527	105.3527
		10.00	66.6667	23.62447	.121	-12.6861	146.0194
	.00	.00	-18.0000	26.41296	.981	-106.7191	70.7191
		.01	-52.2500	25.05754	.355	-136.4163	31.9163
		.10	15.3333	26.41296	.991	-73.3857	104.0524
		1.00	8.0000	26.41296	1.000	-80.7191	96.7191
		10.00	48.6667	26.41296	.477	-40.0524	137.3857
	.01	.00	34.2500	22.09867	.642	-39.9777	108.4777
		.00	52.2500	25.05754	.355	-31.9163	136.4163
		.10	67.5833	22.09867	.082	-6.6444	141.8110
		1.00	60.2500	22.09867	.140	-13.9777	134.4777
		10.00	100.9167*	22.09867	.007	26.6890	175.1444
	.10	.00	-33.3333	23.62447	.721	-112.6861	46.0194
		.00	-15.3333	26.41296	.991	-104.0524	73.3857
		.01	-67.5833	22.09867	.082	-141.8110	6.6444
		1.00	-7.3333	23.62447	1.000	-86.6861	72.0194
		10.00	33.3333	23.62447	.721	-46.0194	112.6861
	1.00	.00	-26.0000	23.62447	.872	-105.3527	53.3527
		.00	-8.0000	26.41296	1.000	-96.7191	80.7191
		.01	-60.2500	22.09867	.140	-134.4777	13.9777
		.10	7.3333	23.62447	1.000	-72.0194	86.6861
		10.00	40.6667	23.62447	.544	-38.6861	120.0194
	10.00	.00	-66.6667	23.62447	.121	-146.0194	12.6861
		.00	-48.6667	26.41296	.477	-137.3857	40.0524
		.01	-100.9167*	22.09867	.007	-175.1444	-26.6890
		.10	-33.3333	23.62447	.721	-112.6861	46.0194
		1.00	-40.6667	23.62447	.544	-120.0194	38.6861

NBT_NN	.00	.00	.1900	.32568	.990	-.9039	1.2839
		.01	-.3700	.27249	.750	-1.2853	.5453
		.10	.2433	.29130	.955	-.7351	1.2218
		1.00	.2533	.29130	.947	-.7251	1.2318
		10.00	.3567	.29130	.817	-.6218	1.3351
	.00	.00	-.1900	.32568	.990	-1.2839	.9039
		.01	-.5600	.30897	.493	-1.5978	.4778
		.10	.0533	.32568	1.000	-1.0406	1.1473
		1.00	.0633	.32568	1.000	-1.0306	1.1573
		10.00	.1667	.32568	.995	-.9273	1.2606
	.01	.00	.3700	.27249	.750	-.5453	1.2853
		.00	.5600	.30897	.493	-.4778	1.5978
		.10	.6133	.27249	.284	-.3019	1.5286
		1.00	.6233	.27249	.270	-.2919	1.5386
		10.00	.7267	.27249	.154	-.1886	1.6419
	.10	.00	-.2433	.29130	.955	-1.2218	.7351
		.00	-.0533	.32568	1.000	-1.1473	1.0406
		.01	-.6133	.27249	.284	-1.5286	.3019
		1.00	.0100	.29130	1.000	-.9685	.9885
		10.00	.1133	.29130	.999	-.8651	1.0918
	1.00	.00	-.2533	.29130	.947	-1.2318	.7251
		.00	-.0633	.32568	1.000	-1.1573	1.0306
		.01	-.6233	.27249	.270	-1.5386	.2919
		.10	-.0100	.29130	1.000	-.9885	.9685
		10.00	.1033	.29130	.999	-.8751	1.0818
	10.00	.00	-.3567	.29130	.817	-1.3351	.6218
		.00	-.1667	.32568	.995	-1.2606	.9273
		.01	-.7267	.27249	.154	-1.6419	.1886
		.10	-.1133	.29130	.999	-1.0918	.8651
		1.00	-.1033	.29130	.999	-1.0818	.8751

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Superóxido (O_2^-) de Noni

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) T_NBT_TV	(J) T_NBT_TV	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
NBT_B_TV	.00	.10	28.6667	21.09239	.749	-42.1810	99.5143
		1.00	-25.3333	21.09239	.828	-96.1810	45.5143
		10.00	8.0000	21.09239	.999	-62.8477	78.8477
		100.00	-21.3333	21.09239	.905	-92.1810	49.5143
		1000.00	-115.3333*	21.09239	.002	-186.1810	-44.4857
	.10	.00	-28.6667	21.09239	.749	-99.5143	42.1810
		1.00	-54.0000	21.09239	.181	-124.8477	16.8477
		10.00	-20.6667	21.09239	.916	-91.5143	50.1810
		100.00	-50.0000	21.09239	.240	-120.8477	20.8477
		1000.00	-144.0000*	21.09239	.000	-214.8477	-73.1523
	1.00	.00	25.3333	21.09239	.828	-45.5143	96.1810
		.10	54.0000	21.09239	.181	-16.8477	124.8477
		10.00	33.3333	21.09239	.625	-37.5143	104.1810
		100.00	4.0000	21.09239	1.000	-66.8477	74.8477
		1000.00	-90.0000*	21.09239	.011	-160.8477	-19.1523
	10.00	.00	-8.0000	21.09239	.999	-78.8477	62.8477
		.10	20.6667	21.09239	.916	-50.1810	91.5143
		1.00	-33.3333	21.09239	.625	-104.1810	37.5143
		100.00	-29.3333	21.09239	.732	-100.1810	41.5143
		1000.00	-123.3333*	21.09239	.001	-194.1810	-52.4857
	100.00	.00	21.3333	21.09239	.905	-49.5143	92.1810
		.10	50.0000	21.09239	.240	-20.8477	120.8477
		1.00	-4.0000	21.09239	1.000	-74.8477	66.8477
		10.00	29.3333	21.09239	.732	-41.5143	100.1810
		1000.00	-94.0000*	21.09239	.008	-164.8477	-23.1523
	1000.00	.00	115.3333*	21.09239	.002	44.4857	186.1810
		.10	144.0000*	21.09239	.000	73.1523	214.8477
		1.00	90.0000*	21.09239	.011	19.1523	160.8477
		10.00	123.3333*	21.09239	.001	52.4857	194.1810
		100.00	94.0000*	21.09239	.008	23.1523	164.8477
NBT_E_TV	.00	.10	47.6667*	13.15435	.032	3.4822	91.8511
		1.00	12.0000	13.15435	.936	-32.1844	56.1844
		10.00	28.6667	13.15435	.313	-15.5178	72.8511
		100.00	.3333	13.15435	1.000	-43.8511	44.5178
		1000.00	-104.6667*	13.15435	.000	-148.8511	-60.4822
	.10	.00	-47.6667*	13.15435	.032	-91.8511	-3.4822
		1.00	-35.6667	13.15435	.144	-79.8511	8.5178
		10.00	-19.0000	13.15435	.702	-63.1844	25.1844
		100.00	-47.3333*	13.15435	.033	-91.5178	-3.1489
		1000.00	-152.3333*	13.15435	.000	-196.5178	-108.1489
	1.00	.00	-12.0000	13.15435	.936	-56.1844	32.1844
		.10	35.6667	13.15435	.144	-8.5178	79.8511
		10.00	16.6667	13.15435	.797	-27.5178	60.8511
		100.00	-11.6667	13.15435	.943	-55.8511	32.5178
		1000.00	-116.6667*	13.15435	.000	-160.8511	-72.4822
	10.00	.00	-28.6667	13.15435	.313	-72.8511	15.5178
		.10	19.0000	13.15435	.702	-25.1844	63.1844
		1.00	-16.6667	13.15435	.797	-60.8511	27.5178
		100.00	-28.3333	13.15435	.324	-72.5178	15.8511
		1000.00	-133.3333*	13.15435	.000	-177.5178	-89.1489
	100.00	.00	-.3333	13.15435	1.000	-44.5178	43.8511
		.10	47.3333*	13.15435	.033	3.1489	91.5178
		1.00	11.6667	13.15435	.943	-32.5178	55.8511
		10.00	28.3333	13.15435	.324	-15.8511	72.5178
		1000.00	-105.0000*	13.15435	.000	-149.1844	-60.8156
	1000.00	.00	104.6667*	13.15435	.000	60.4822	148.8511
		.10	152.3333*	13.15435	.000	108.1489	196.5178
		1.00	116.6667*	13.15435	.000	72.4822	160.8511
		10.00	133.3333*	13.15435	.000	89.1489	177.5178
		100.00	105.0000*	13.15435	.000	60.8156	149.1844

NBT_IV	.00	.10	.0767	.20042	.999	-.5965	.7498
		1.00	.2167	.20042	.880	-.4565	.8898
		10.00	.1867	.20042	.931	-.4865	.8598
		100.00	.2600	.20042	.781	-.4132	.9332
		1000.00	.3000	.20042	.673	-.3732	.9732
	.10	.00	-.0767	.20042	.999	-.7498	.5965
		1.00	.1400	.20042	.979	-.5332	.8132
		10.00	.1100	.20042	.993	-.5632	.7832
		100.00	.1833	.20042	.935	-.4898	.8565
		1000.00	.2233	.20042	.866	-.4498	.8965
	1.00	.00	-.2167	.20042	.880	-.8898	.4565
		.10	-.1400	.20042	.979	-.8132	.5332
		10.00	-.0300	.20042	1.000	-.7032	.6432
		100.00	.0433	.20042	1.000	-.6298	.7165
		1000.00	.0833	.20042	.998	-.5898	.7565
	10.00	.00	-.1867	.20042	.931	-.8598	.4865
		.10	-.1100	.20042	.993	-.7832	.5632
		1.00	.0300	.20042	1.000	-.6432	.7032
		100.00	.0733	.20042	.999	-.5998	.7465
		1000.00	.1133	.20042	.992	-.5598	.7865
	100.00	.00	-.2600	.20042	.781	-.9332	.4132
		.10	-.1833	.20042	.935	-.8565	.4898
		1.00	-.0433	.20042	1.000	-.7165	.6298
		10.00	-.0733	.20042	.999	-.7465	.5998
		1000.00	.0400	.20042	1.000	-.6332	.7132
	1000.00	.00	-.3000	.20042	.673	-.9732	.3732
		.10	-.2233	.20042	.866	-.8965	.4498
		1.00	-.0833	.20042	.998	-.7565	.5898
		10.00	-.1133	.20042	.992	-.7865	.5598
		100.00	-.0400	.20042	1.000	-.7132	.6332

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Superóxido (O_2^-) de Té Verde

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependie	(I) T_NBT_AR	(J) T_NBT_AR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza a 95%	
						Límite inferior	Límite superior
NBT_B_AR	.00	1.00	-45.6667	36.19454	.718	-164.7859	73.4525
		10.00	-10.0000	36.19454	.998	-129.1192	09.1192
		100.00	-111.3333	36.19454	.070	-230.4525	7.7859
		1000.00	39.6667	36.19454	.805	-79.4525	58.7859
	1.00	.00	45.6667	36.19454	.718	-73.4525	64.7859
		10.00	35.6667	36.19454	.856	-83.4525	54.7859
		100.00	-65.6667	36.19454	.417	-184.7859	53.4525
		1000.00	85.3333	36.19454	.204	-33.7859	04.4525
	10.00	.00	10.0000	36.19454	.998	-109.1192	29.1192
		1.00	-35.6667	36.19454	.856	-154.7859	83.4525
		100.00	-101.3333	36.19454	.106	-220.4525	17.7859
		1000.00	49.6667	36.19454	.657	-69.4525	68.7859
	100.00	.00	111.3333	36.19454	.070	-7.7859	30.4525
		1.00	65.6667	36.19454	.417	-53.4525	84.7859
		10.00	101.3333	36.19454	.106	-17.7859	20.4525
		1000.00	151.0000*	36.19454	.013	31.8808	70.1192
	1000.00	.00	-39.6667	36.19454	.805	-158.7859	79.4525
		1.00	-85.3333	36.19454	.204	-204.4525	33.7859
		10.00	-49.6667	36.19454	.657	-168.7859	69.4525
		100.00	-151.0000*	36.19454	.013	-270.1192	-31.8808
NBT_E_AR	.00	1.00	-70.6667	22.90657	.069	-146.0541	4.7207
		10.00	3.6667	22.90657	1.000	-71.7207	79.0541
		100.00	4.6667	22.90657	1.000	-70.7207	80.0541
		1000.00	60.3333	22.90657	.137	-15.0541	35.7207
	1.00	.00	70.6667	22.90657	.069	-4.7207	46.0541
		10.00	74.3333	22.90657	.054	-1.0541	49.7207
		100.00	75.3333	22.90657	.050	-.0541	50.7207
		1000.00	131.0000*	22.90657	.001	55.6126	06.3874
	10.00	.00	-3.6667	22.90657	1.000	-79.0541	71.7207
		1.00	-74.3333	22.90657	.054	-149.7207	1.0541
		100.00	1.0000	22.90657	1.000	-74.3874	76.3874
		1000.00	56.6667	22.90657	.173	-18.7207	32.0541
	100.00	.00	-4.6667	22.90657	1.000	-80.0541	70.7207
		1.00	-75.3333	22.90657	.050	-150.7207	.0541
		10.00	-1.0000	22.90657	1.000	-76.3874	74.3874
		1000.00	55.6667	22.90657	.184	-19.7207	31.0541
	1000.00	.00	-60.3333	22.90657	.137	-135.7207	15.0541
		1.00	-131.0000*	22.90657	.001	-206.3874	-55.6126
		10.00	-56.6667	22.90657	.173	-132.0541	18.7207
		100.00	-55.6667	22.90657	.184	-131.0541	19.7207
NBT_AR	.00	1.00	-.0067	.26980	1.000	-.8946	.8813
		10.00	.2433	.26980	.890	-.6446	1.1313
		100.00	.7433	.26980	.114	-.1446	1.6313
		1000.00	.2067	.26980	.935	-.6813	1.0946
	1.00	.00	.0067	.26980	1.000	-.8813	.8946
		10.00	.2500	.26980	.880	-.6379	1.1379
		100.00	.7500	.26980	.110	-.1379	1.6379
		1000.00	.2133	.26980	.928	-.6746	1.1013
	10.00	.00	-.2433	.26980	.890	-1.1313	.6446
		1.00	-.2500	.26980	.880	-1.1379	.6379
		100.00	.5000	.26980	.398	-.3879	1.3879
		1000.00	-.0367	.26980	1.000	-.9246	.8513
	100.00	.00	-.7433	.26980	.114	-1.6313	.1446
		1.00	-.7500	.26980	.110	-1.6379	.1379
		10.00	-.5000	.26980	.398	-1.3879	.3879
		1000.00	-.5367	.26980	.336	-1.4246	.3513
	1000.00	.00	-.2067	.26980	.935	-1.0946	.6813
		1.00	-.2133	.26980	.928	-1.1013	.6746
		10.00	.0367	.26980	1.000	-.8513	.9246
		100.00	.5367	.26980	.336	-.3513	1.4246

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Superóxido (O_2^-) de Arándano

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) T_NBT_AS	(J) T_NBT_AS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
NBT_B_AS	.00	1.00	134.7500*	25.97528	.001	52.1996	217.3004
		10.00	94.2500*	25.97528	.020	11.6996	176.8004
		100.00	134.7500*	25.97528	.001	52.1996	217.3004
		1000.00	130.2500*	25.97528	.001	47.6996	212.8004
		5000.00	124.2500*	25.97528	.002	41.6996	206.8004
	1.00	.00	-134.7500*	25.97528	.001	-217.3004	-52.1996
		10.00	-40.5000	25.97528	.633	-123.0504	42.0504
		100.00	.0000	25.97528	1.000	-82.5504	82.5504
		1000.00	-4.5000	25.97528	1.000	-87.0504	78.0504
		5000.00	-10.5000	25.97528	.998	-93.0504	72.0504
	10.00	.00	-94.2500*	25.97528	.020	-176.8004	-11.6996
		1.00	40.5000	25.97528	.633	-42.0504	123.0504
		100.00	40.5000	25.97528	.633	-42.0504	123.0504
		1000.00	36.0000	25.97528	.735	-46.5504	118.5504
		5000.00	30.0000	25.97528	.852	-52.5504	112.5504
	100.00	.00	-134.7500*	25.97528	.001	-217.3004	-52.1996
		1.00	.0000	25.97528	1.000	-82.5504	82.5504
		10.00	-40.5000	25.97528	.633	-123.0504	42.0504
		1000.00	-4.5000	25.97528	1.000	-87.0504	78.0504
		5000.00	-10.5000	25.97528	.998	-93.0504	72.0504
	1000.00	.00	-130.2500*	25.97528	.001	-212.8004	-47.6996
		1.00	4.5000	25.97528	1.000	-78.0504	87.0504
		10.00	-36.0000	25.97528	.735	-118.5504	46.5504
		100.00	4.5000	25.97528	1.000	-78.0504	87.0504
		5000.00	-6.0000	25.97528	1.000	-88.5504	76.5504
	5000.00	.00	-124.2500*	25.97528	.002	-206.8004	-41.6996
		1.00	10.5000	25.97528	.998	-72.0504	93.0504
		10.00	-30.0000	25.97528	.852	-112.5504	52.5504
		100.00	10.5000	25.97528	.998	-72.0504	93.0504
		1000.00	6.0000	25.97528	1.000	-76.5504	88.5504

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Superóxido (O_2^-) de Astrágalus

Anexo 7. Tablas de Resultados de ANOVA de CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FENOLOXIDASA (PO); F_SL = Sin Laminarina, F_CL= Con Laminarina.

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) T_F_AJO	(J) T_F_AJO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
F_SL_AJO	.00	25.00	-23.3333	8.91939	.140	-52.6878	6.0211
		250.00	-136.6667*	8.91939	.000	-166.0211	-107.3122
		2500.00	-4.6667	8.91939	.983	-34.0211	24.6878
		25000.00	-59.6667*	8.91939	.000	-89.0211	-30.3122
	25.00	.00	23.3333	8.91939	.140	-6.0211	52.6878
		250.00	-113.3333*	8.91939	.000	-142.6878	-83.9789
		2500.00	18.6667	8.91939	.294	-10.6878	48.0211
		25000.00	-36.3333*	8.91939	.015	-65.6878	-6.9789
	250.00	.00	136.6667*	8.91939	.000	107.3122	166.0211
		25.00	113.3333*	8.91939	.000	83.9789	142.6878
		2500.00	132.0000*	8.91939	.000	102.6455	161.3545
		25000.00	77.0000*	8.91939	.000	47.6455	106.3545
	2500.00	.00	4.6667	8.91939	.983	-24.6878	34.0211
		25.00	-18.6667	8.91939	.294	-48.0211	10.6878
		250.00	-132.0000*	8.91939	.000	-161.3545	-102.6455
		25000.00	-55.0000*	8.91939	.001	-84.3545	-25.6455
	25000.00	.00	59.6667*	8.91939	.000	30.3122	89.0211
		25.00	36.3333*	8.91939	.015	6.9789	65.6878
		250.00	-77.0000*	8.91939	.000	-106.3545	-47.6455
		2500.00	55.0000*	8.91939	.001	25.6455	84.3545
F_CL_AJO	.00	25.00	-33.6667	16.29451	.304	-87.2932	19.9599
		250.00	-9.0000	16.29451	.979	-62.6266	44.6266
		2500.00	-27.0000	16.29451	.498	-80.6266	26.6266
		25000.00	8.6667	16.29451	.982	-44.9599	62.2932
	25.00	.00	33.6667	16.29451	.304	-19.9599	87.2932
		250.00	24.6667	16.29451	.577	-28.9599	78.2932
		2500.00	6.6667	16.29451	.993	-46.9599	60.2932
		25000.00	42.3333	16.29451	.144	-11.2932	95.9599
	250.00	.00	9.0000	16.29451	.979	-44.6266	62.6266
		25.00	-24.6667	16.29451	.577	-78.2932	28.9599
		2500.00	-18.0000	16.29451	.801	-71.6266	35.6266
		25000.00	17.6667	16.29451	.811	-35.9599	71.2932
	2500.00	.00	27.0000	16.29451	.498	-26.6266	80.6266
		25.00	-6.6667	16.29451	.993	-60.2932	46.9599
		250.00	18.0000	16.29451	.801	-35.6266	71.6266
		25000.00	35.6667	16.29451	.258	-17.9599	89.2932
	25000.00	.00	-8.6667	16.29451	.982	-62.2932	44.9599
		25.00	-42.3333	16.29451	.144	-95.9599	11.2932
		250.00	-17.6667	16.29451	.811	-71.2932	35.9599
		2500.00	-35.6667	16.29451	.258	-89.2932	17.9599

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Fenoloxidasa (PO) de Ajo

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependie	(I) T_F_NN	(J) T_F_NN	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza a 95%	
						Límite inferior	Límite superior
F_SL_NN	.00	.00	-7.8333	7.31840	.884	-32.4153	16.7486
		.01	-7.5833	6.12302	.811	-28.1501	12.9834
		.10	-6.3333	6.54578	.920	-28.3201	15.6534
		1.00	38.0000*	6.54578	.001	16.0132	59.9868
		10.00	28.3333*	6.54578	.010	6.3466	50.3201
	.00	.00	7.8333	7.31840	.884	-16.7486	32.4153
		.01	.2500	6.94285	1.000	-23.0705	23.5705
		.10	1.5000	7.31840	1.000	-23.0819	26.0819
		1.00	45.8333*	7.31840	.000	21.2514	70.4153
		10.00	36.1667*	7.31840	.004	11.5847	60.7486
	.01	.00	7.5833	6.12302	.811	-12.9834	28.1501
		.00	-.2500	6.94285	1.000	-23.5705	23.0705
		.10	1.2500	6.12302	1.000	-19.3167	21.8167
		1.00	45.5833*	6.12302	.000	25.0166	66.1501
		10.00	35.9167*	6.12302	.001	15.3499	56.4834
	.10	.00	6.3333	6.54578	.920	-15.6534	28.3201
		.00	-1.5000	7.31840	1.000	-26.0819	23.0819
		.01	-1.2500	6.12302	1.000	-21.8167	19.3167
		1.00	44.3333*	6.54578	.000	22.3466	66.3201
		10.00	34.6667*	6.54578	.002	12.6799	56.6534
	1.00	.00	-38.0000*	6.54578	.001	-59.9868	-16.0132
		.00	-45.8333*	7.31840	.000	-70.4153	-21.2514
		.01	-45.5833*	6.12302	.000	-66.1501	-25.0166
		.10	-44.3333*	6.54578	.000	-66.3201	-22.3466
		10.00	-9.6667	6.54578	.684	-31.6534	12.3201
	10.00	.00	-28.3333*	6.54578	.010	-50.3201	-6.3466
		.00	-36.1667*	7.31840	.004	-60.7486	-11.5847
		.01	-35.9167*	6.12302	.001	-56.4834	-15.3499
		.10	-34.6667*	6.54578	.002	-56.6534	-12.6799
		1.00	9.6667	6.54578	.684	-12.3201	31.6534
F_CL_NN	.00	.00	19.8333	15.77157	.800	-36.1898	75.8565
		.01	5.0833	13.19544	.998	-41.7890	51.9557
		.10	-61.1667*	15.77157	.031	-117.1898	-5.1435
		1.00	-30.6667	15.77157	.436	-86.6898	25.3565
		10.00	-186.6667*	15.77157	.000	-242.6898	-130.6435
	.00	.00	-19.8333	15.77157	.800	-75.8565	36.1898
		.01	-14.7500	14.96222	.911	-67.8982	38.3982
		.10	-81.0000*	17.27688	.010	-142.3703	-19.6297
		1.00	-50.5000	17.27688	.123	-111.8703	10.8703
		10.00	-206.5000*	17.27688	.000	-267.8703	-145.1297
	.01	.00	-5.0833	13.19544	.998	-51.9557	41.7890
		.00	14.7500	14.96222	.911	-38.3982	67.8982
		.10	-66.2500*	14.96222	.015	-119.3982	-13.1018
		1.00	-35.7500	14.96222	.254	-88.8982	17.3982
		10.00	-191.7500*	14.96222	.000	-244.8982	-138.6018
	.10	.00	61.1667*	15.77157	.031	5.1435	117.1898
		.00	81.0000*	17.27688	.010	19.6297	142.3703
		.01	66.2500*	14.96222	.015	13.1018	119.3982
		1.00	30.5000	17.27688	.528	-30.8703	91.8703
		10.00	-125.5000*	17.27688	.000	-186.8703	-64.1297
	1.00	.00	30.6667	15.77157	.436	-25.3565	86.6898
		.00	50.5000	17.27688	.123	-10.8703	111.8703
		.01	35.7500	14.96222	.254	-17.3982	88.8982
		.10	-30.5000	17.27688	.528	-91.8703	30.8703
		10.00	-156.0000*	17.27688	.000	-217.3703	-94.6297
	10.00	.00	186.6667*	15.77157	.000	130.6435	242.6898
		.00	206.5000*	17.27688	.000	145.1297	267.8703
		.01	191.7500*	14.96222	.000	138.6018	244.8982
		.10	125.5000*	17.27688	.000	64.1297	186.8703
		1.00	156.0000*	17.27688	.000	94.6297	217.3703

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Fenoloxidasa (PO) de Noni

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) T_F_OR	(J) T_F_OR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
F_SL_OR	.00	1.00	-20.0000	6.93462	.094	-42.8224	2.8224
		10.00	31.0000*	6.93462	.008	8.1776	53.8224
		100.00	-12.0000	6.93462	.459	-34.8224	10.8224
		1000.00	-22.0000	6.93462	.060	-44.8224	.8224
	1.00	.00	20.0000	6.93462	.094	-2.8224	42.8224
		10.00	51.0000*	6.93462	.000	28.1776	73.8224
		100.00	8.0000	6.93462	.776	-14.8224	30.8224
		1000.00	-2.0000	6.93462	.998	-24.8224	20.8224
	10.00	.00	-31.0000*	6.93462	.008	-53.8224	-8.1776
		1.00	-51.0000*	6.93462	.000	-73.8224	-28.1776
		100.00	-43.0000*	6.93462	.001	-65.8224	-20.1776
		1000.00	-53.0000*	6.93462	.000	-75.8224	-30.1776
	100.00	.00	12.0000	6.93462	.459	-10.8224	34.8224
		1.00	-8.0000	6.93462	.776	-30.8224	14.8224
		10.00	43.0000*	6.93462	.001	20.1776	65.8224
		1000.00	-10.0000	6.93462	.617	-32.8224	12.8224
	1000.00	.00	22.0000	6.93462	.060	-.8224	44.8224
		1.00	2.0000	6.93462	.998	-20.8224	24.8224
		10.00	53.0000*	6.93462	.000	30.1776	75.8224
		100.00	10.0000	6.93462	.617	-12.8224	32.8224
F_CL_OR	.00	1.00	-1.0000	9.67471	1.000	-32.8403	30.8403
		10.00	-6.6667	9.67471	.954	-38.5069	25.1736
		100.00	-21.6667	9.67471	.241	-53.5069	10.1736
		1000.00	3.0000	9.67471	.998	-28.8403	34.8403
	1.00	.00	1.0000	9.67471	1.000	-30.8403	32.8403
		10.00	-5.6667	9.67471	.974	-37.5069	26.1736
		100.00	-20.6667	9.67471	.277	-52.5069	11.1736
		1000.00	4.0000	9.67471	.993	-27.8403	35.8403
	10.00	.00	6.6667	9.67471	.954	-25.1736	38.5069
		1.00	5.6667	9.67471	.974	-26.1736	37.5069
		100.00	-15.0000	9.67471	.556	-46.8403	16.8403
		1000.00	9.6667	9.67471	.850	-22.1736	41.5069
	100.00	.00	21.6667	9.67471	.241	-10.1736	53.5069
		1.00	20.6667	9.67471	.277	-11.1736	52.5069
		10.00	15.0000	9.67471	.556	-16.8403	46.8403
		1000.00	24.6667	9.67471	.155	-7.1736	56.5069
	1000.00	.00	-3.0000	9.67471	.998	-34.8403	28.8403
		1.00	-4.0000	9.67471	.993	-35.8403	27.8403
		10.00	-9.6667	9.67471	.850	-41.5069	22.1736
		100.00	-24.6667	9.67471	.155	-56.5069	7.1736

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Fenoloxidasa (PO) de Orégano

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) T_F_TV	(J) T_F_TV	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
F_SL_TV	.00	1.00	-48.6667	15.71835	.068	-100.3971	3.0637
		10.00	-63.6667*	15.71835	.015	-115.3971	-11.9363
		100.00	-34.0000	15.71835	.268	-85.7304	17.7304
		1000.00	-21.0000	15.71835	.677	-72.7304	30.7304
	1.00	.00	48.6667	15.71835	.068	-3.0637	100.3971
		10.00	-15.0000	15.71835	.869	-66.7304	36.7304
		100.00	14.6667	15.71835	.878	-37.0637	66.3971
		1000.00	27.6667	15.71835	.444	-24.0637	79.3971
	10.00	.00	63.6667*	15.71835	.015	11.9363	115.3971
		1.00	15.0000	15.71835	.869	-36.7304	66.7304
		100.00	29.6667	15.71835	.382	-22.0637	81.3971
		1000.00	42.6667	15.71835	.121	-9.0637	94.3971
	100.00	.00	34.0000	15.71835	.268	-17.7304	85.7304
		1.00	-14.6667	15.71835	.878	-66.3971	37.0637
		10.00	-29.6667	15.71835	.382	-81.3971	22.0637
		1000.00	13.0000	15.71835	.916	-38.7304	64.7304
	1000.00	.00	21.0000	15.71835	.677	-30.7304	72.7304
		1.00	-27.6667	15.71835	.444	-79.3971	24.0637
		10.00	-42.6667	15.71835	.121	-94.3971	9.0637
		100.00	-13.0000	15.71835	.916	-64.7304	38.7304
F_CL_TV	.00	1.00	-14.3333	13.68373	.828	-59.3676	30.7009
		10.00	-11.3333	13.68373	.916	-56.3676	33.7009
		100.00	-15.3333	13.68373	.793	-60.3676	29.7009
		1000.00	4.3333	13.68373	.997	-40.7009	49.3676
	1.00	.00	14.3333	13.68373	.828	-30.7009	59.3676
		10.00	3.0000	13.68373	.999	-42.0343	48.0343
		100.00	-1.0000	13.68373	1.000	-46.0343	44.0343
		1000.00	18.6667	13.68373	.661	-26.3676	63.7009
	10.00	.00	11.3333	13.68373	.916	-33.7009	56.3676
		1.00	-3.0000	13.68373	.999	-48.0343	42.0343
		100.00	-4.0000	13.68373	.998	-49.0343	41.0343
		1000.00	15.6667	13.68373	.780	-29.3676	60.7009
	100.00	.00	15.3333	13.68373	.793	-29.7009	60.3676
		1.00	1.0000	13.68373	1.000	-44.0343	46.0343
		10.00	4.0000	13.68373	.998	-41.0343	49.0343
		1000.00	19.6667	13.68373	.620	-25.3676	64.7009
	1000.00	.00	-4.3333	13.68373	.997	-49.3676	40.7009
		1.00	-18.6667	13.68373	.661	-63.7009	26.3676
		10.00	-15.6667	13.68373	.780	-60.7009	29.3676
		100.00	-19.6667	13.68373	.620	-64.7009	25.3676

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Fenoloxidasa (PO) de Té Verde

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) T_F_AR	(J) T_F_AR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
F_SL_AR	.00	1.00	42.3333*	7.50407	.002	17.6368	67.0299
		10.00	46.0000*	7.50407	.001	21.3035	70.6965
		100.00	43.6667*	7.50407	.001	18.9701	68.3632
		1000.00	41.0000*	7.50407	.002	16.3035	65.6965
	1.00	.00	-42.3333*	7.50407	.002	-67.0299	-17.6368
		10.00	3.6667	7.50407	.987	-21.0299	28.3632
		100.00	1.3333	7.50407	1.000	-23.3632	26.0299
		1000.00	-1.3333	7.50407	1.000	-26.0299	23.3632
	10.00	.00	-46.0000*	7.50407	.001	-70.6965	-21.3035
		1.00	-3.6667	7.50407	.987	-28.3632	21.0299
		100.00	-2.3333	7.50407	.998	-27.0299	22.3632
		1000.00	-5.0000	7.50407	.959	-29.6965	19.6965
	100.00	.00	-43.6667*	7.50407	.001	-68.3632	-18.9701
		1.00	-1.3333	7.50407	1.000	-26.0299	23.3632
		10.00	2.3333	7.50407	.998	-22.3632	27.0299
		1000.00	-2.6667	7.50407	.996	-27.3632	22.0299
	1000.00	.00	-41.0000*	7.50407	.002	-65.6965	-16.3035
		1.00	1.3333	7.50407	1.000	-23.3632	26.0299
		10.00	5.0000	7.50407	.959	-19.6965	29.6965
		100.00	2.6667	7.50407	.996	-22.0299	27.3632
F_CL_AR	.00	1.00	-47.6667*	12.20747	.019	-87.8424	-7.4909
		10.00	-38.3333	12.20747	.063	-78.5091	1.8424
		100.00	-22.6667	12.20747	.396	-62.8424	17.5091
		1000.00	16.3333	12.20747	.676	-23.8424	56.5091
	1.00	.00	47.6667*	12.20747	.019	7.4909	87.8424
		10.00	9.3333	12.20747	.935	-30.8424	49.5091
		100.00	25.0000	12.20747	.312	-15.1758	65.1758
		1000.00	64.0000*	12.20747	.003	23.8242	104.1758
	10.00	.00	38.3333	12.20747	.063	-1.8424	78.5091
		1.00	-9.3333	12.20747	.935	-49.5091	30.8424
		100.00	15.6667	12.20747	.707	-24.5091	55.8424
		1000.00	54.6667*	12.20747	.008	14.4909	94.8424
	100.00	.00	22.6667	12.20747	.396	-17.5091	62.8424
		1.00	-25.0000	12.20747	.312	-65.1758	15.1758
		10.00	-15.6667	12.20747	.707	-55.8424	24.5091
		1000.00	39.0000	12.20747	.058	-1.1758	79.1758
	1000.00	.00	-16.3333	12.20747	.676	-56.5091	23.8424
		1.00	-64.0000*	12.20747	.003	-104.1758	-23.8242
		10.00	-54.6667*	12.20747	.008	-94.8424	-14.4909
		100.00	-39.0000	12.20747	.058	-79.1758	1.1758

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Fenoloxidasa (PO) de Arándano

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) T_F_AS	(J) T_F_AS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
F_SL_AS	.00	1.00	21.3333*	5.42423	.019	3.4818	39.1849
		10.00	10.6667	5.42423	.346	-7.1849	28.5182
		100.00	39.3333*	5.42423	.000	21.4818	57.1849
		1000.00	-10.6667	5.42423	.346	-28.5182	7.1849
	1.00	.00	-21.3333*	5.42423	.019	-39.1849	-3.4818
		10.00	-10.6667	5.42423	.346	-28.5182	7.1849
		100.00	18.0000*	5.42423	.048	.1484	35.8516
		1000.00	-32.0000*	5.42423	.001	-49.8516	-14.1484
	10.00	.00	-10.6667	5.42423	.346	-28.5182	7.1849
		1.00	10.6667	5.42423	.346	-7.1849	28.5182
		100.00	28.6667*	5.42423	.003	10.8151	46.5182
		1000.00	-21.3333*	5.42423	.019	-39.1849	-3.4818
	100.00	.00	-39.3333*	5.42423	.000	-57.1849	-21.4818
		1.00	-18.0000*	5.42423	.048	-35.8516	-.1484
		10.00	-28.6667*	5.42423	.003	-46.5182	-10.8151
		1000.00	-50.0000*	5.42423	.000	-67.8516	-32.1484
	1000.00	.00	10.6667	5.42423	.346	-7.1849	28.5182
		1.00	32.0000*	5.42423	.001	14.1484	49.8516
		10.00	21.3333*	5.42423	.019	3.4818	39.1849
		100.00	50.0000*	5.42423	.000	32.1484	67.8516
F_CL_AS	.00	1.00	12.3333	13.17742	.877	-31.0346	55.7013
		10.00	10.6667	13.17742	.922	-32.7013	54.0346
		100.00	20.6667	13.17742	.546	-22.7013	64.0346
		1000.00	29.0000	13.17742	.254	-14.3680	72.3680
	1.00	.00	-12.3333	13.17742	.877	-55.7013	31.0346
		10.00	-1.6667	13.17742	1.000	-45.0346	41.7013
		100.00	8.3333	13.17742	.966	-35.0346	51.7013
		1000.00	16.6667	13.17742	.717	-26.7013	60.0346
	10.00	.00	-10.6667	13.17742	.922	-54.0346	32.7013
		1.00	1.6667	13.17742	1.000	-41.7013	45.0346
		100.00	10.0000	13.17742	.937	-33.3680	53.3680
		1000.00	18.3333	13.17742	.646	-25.0346	61.7013
	100.00	.00	-20.6667	13.17742	.546	-64.0346	22.7013
		1.00	-8.3333	13.17742	.966	-51.7013	35.0346
		10.00	-10.0000	13.17742	.937	-53.3680	33.3680
		1000.00	8.3333	13.17742	.966	-35.0346	51.7013
	1000.00	.00	-29.0000	13.17742	.254	-72.3680	14.3680
		1.00	-16.6667	13.17742	.717	-60.0346	26.7013
		10.00	-18.3333	13.17742	.646	-61.7013	25.0346
		100.00	-8.3333	13.17742	.966	-51.7013	35.0346

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anova de un Factor; Pruebas post hoc; Fenoloxidasa (PO) de Astrágalus