

Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*

L. Elizabeth Cruz-Suárez, Martha Nieto-López, Mireya Tapia-Salazar, Julián Gamboa-Delgado, Maribel Maldonado-Muñiz, David Villarreal-Cavazos,
Denis Ricque-Marie

Cuerpo Académico en Nutrición y Tecnología de Alimentos de Organismos Acuáticos,
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Cd Universitaria
AP F67, San Nicolás de los Garza, NL 66451, México. Tel +fax: +52 8183526380.

E-mail: lucia.cruzs@uanl.edu.mx

Resumen

Las algas marinas constituyen una fuente natural de antimicrobianos, antioxidantes, hepatoprotectores, inmunoestimulantes, minerales y prebióticos, que al ser suplementados (en forma de harina o extracto) como aditivos funcionales en alimentos para camarón pueden ayudar a promover la producción, la salud y aumentar la resistencia a enfermedades durante las diferentes etapas del cultivo (maduración, desarrollo larvario, engorda). El Programa Maricultura a través de su cuerpo académico ha promovido esta línea de investigación durante los últimos 3 años especialmente con el género *Ulva*. El objetivo de este trabajo es presentar una breve revisión de los efectos funcionales que hemos comprobado *in vivo* e *in vitro*, tales como: efecto antibiótico, antioxidante, promotor de maduración y sobrevivencia larvaria, estimulador de respuesta inmune y remediador contra aflatoxicosis y la estimación de contribuciones nutricionales a partir de análisis isotópicos.

Palabras clave: ulvaceas, camarón blanco del Pacífico, nutrición, antioxidante

Introducción

El género *Ulva* (Phylum Chlorophyta, Class Ulvophyceae, Order Ulvales, Family Ulvaceae) fue identificado por Linnaeus (1753) y al inicio incluía una variedad de algas con diferencias morfológicas. En el siglo XIX sus miembros fueron separados en varios géneros. Las algas verdes de forma laminar fueron mantenidos bajo el nombre de *Ulva* y las formas tubulares fueron cambiadas al género *Enteromorpha* (Link, 1820). El género *Ulva* ha sido difícil de clasificar debido a la gran plasticidad morfológica que presentan muchos de sus miembros y a la falta de caracteres confiables para diferenciar el taxa (Silva *et al.*, 2013). De hecho, en 2003, Hayden y colaboradores, con estudios moleculares, muestran que Linnaeus tenía razón y que *Ulva* y *Enteromorpha* son el mismo género, por lo que unifican el nombre a *Ulva* por ser el nombre definido con más antigüedad. Son algas verde brillante cuya morfología es influenciada por las condiciones, edad del talo, y ciclo de vida, lo que hace difícil la identificación de especies solo por características morfológicas.

La identificación de las especies de *Ulva* tradicionalmente se han basado en características morfológicas, anatómicas y citológicas como forma, tamaño, presencia o ausencia de dentado, espesor, dimensiones de la célula y número de pirenoides. Muchos estudios han demostrado que estas características pueden ser muy variables dentro de las especies, variando con la edad, estado reproductivo, exposición a mareas, temperatura, salinidad, luz, y factores biológicos como el pastoreo. En años recientes el desarrollo de patrones en cultivo, detalles reproductivos y capacidad aparente de entrecruzamiento han sido usados para evaluar conceptos de especies basados en características morfológicas y anatómicas. Actualmente hay 568 especies del género *Ulva* reportadas en la “Algaebase”.

Las ulvas presentan un crecimiento rápido con una distribución cosmopolita en diferentes hábitats y ambientes; hay especies marinas, salobres y de agua dulce (incluso se encuentra en hábitats subaéreos húmedos, entre ellos la nieve). Aparecen en ambientes muy ricos en nutrientes que son aprovechados para su proliferación y para acumular en su talo cantidades importantes de macro y micronutrientes; estos componentes varían en su concentración dependiendo del lugar y la época del año. Pueden llegar a ser consideradas como plagas por su desarrollo exacerbado en bahías eutrofizadas.

1. Efecto Vibriocida *in vitro* e *in vivo*

Las macroalgas marinas tienen compuestos bioactivos que pueden ser potencialmente explotados como ingredientes funcionales en aplicaciones de salud animal y humana. Entre ellos presentan compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano de diversos patógenos incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas tanto de cepas patógenas y no patógenas. El estudio de esta actividad antibacteriana en las algas se remonta a 1954 con el estudio de una sola alga (*Ascophyllum nodosum*) hasta la actualidad con un amplio rango de estudios en algas pardas, verdes y rojas (Tan *et al.*, 2011). Esta actividad es generada por metabolitos secundarios de las algas, cuya producción puede variar por diversos factores tales como el crecimiento de la planta que a su vez es afectado por factores ambientales externos como temperatura del agua, irradiación solar y presencia de iones de metales, la estación, el grado de estrés y depredación, la especie de alga, la localización geográfica y temporada así como las condiciones en las que creció y en que fue colectada la muestra (Osman *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011, Trigui *et al.*, 2012).

Los compuestos fenólicos, terpenoides y lipofílicos (ácidos grasos) son algunos de los responsables de la actividad antimicrobiana presente en las algas (Chiheb *et al.*, 2009; Chakraborty *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011; Manilal *et al.*, 2012). Las algas verdes presentan gran variedad de este tipo de compuestos y un rango de acción amplio. En lo particular el género *Ulva* presenta una amplia gama de metabolitos antimicrobianos (solubles en solventes con diferentes polaridades como hexano, etanol, metanol, butanol, diclorometano y agua) que inhiben el crecimiento de vibrios de importancia sanitaria en acuicultura. Las especies *Ulva fasciata*, *rigida*, *lactuca* y *clathrata* comparten esta propiedad *in vitro* (Selvin y Lipton, 2004; Immanuel *et al.*, 2004; Bansemir *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008; Christobel *et al.*, 2011; Priyadharshini *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2014; Campos-Deloya, 2012; Silva *et al.*, 2013; Gonzalez-Colunga *et al.*, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Actividades antivibrio de las algas del género *Ulva* evaluadas *in vitro*

Especie	Patógenos	Referencia
<i>Ulva fasciata</i>	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. fischeri</i>	Selvin and Lipton, 2004
<i>Ulva lactuca</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	Immanuel <i>et al.</i> , 2004
<i>Ulva rigida (Portugal)</i>	<i>V. anguillarum</i>	Bansemir <i>et al.</i> , 2006
<i>Ulva clathrata</i>	Cepa 65 <i>V. anguillarum</i>	Lu <i>et al.</i> , 2008
<i>Ulva fasciata (fresca)</i>	<i>V. fischeri</i> ; <i>V. alginolyticus</i> ; <i>V. harveyi</i>	Christobel <i>et al.</i> , 2011
<i>Ulva fasciata</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Priyadharshini <i>et al.</i> , 2011
<i>Ulva clathrata</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> ; <i>V. vulnificus</i> , <i>V. campbellii</i> ; <i>V. harveyi</i>	Cruz <i>et al.</i> , 2014 (publicación en desarrollo), Campos-Deloya, 2012
<i>Ulva fasciata</i>	<i>V. barasiliensis</i> 113; <i>V. barasilensis</i> 130 <i>V. parahaemolyticus</i> ; <i>V. navarrensis</i>	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Ulva clathrata</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	Gonzalez-Colunga <i>et al.</i> , 2013 POSTER (tesis Doctorado)

Los estudios realizados en nuestro laboratorio con *Ulva clathrata* producida por cultivo en estanques de camarón en México, , muestran resultados prometedores. En 2012, al evaluar la actividad antibacteriana (método de difusión) contra *Vibrio parahaemolyticus*, *V. campbelli*, *V. harveyi* y *V. vulnificus*, con 3 extractos (hexano, diclorometano, etanol) del alga verde *Ulva clathrata*, encontramos que el extracto hexánico fue el único que presentó actividad antibacteriana contra las 4 cepas. Se observaron halos de inhibición de 15, 17, 14 y 16 mm para *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. campbelli* y *V. harveyi* respectivamente, y un MIC de 7.5 mg/ml sobre *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* y de 1.8 mg/ml sobre *V. vulnificus* y *V. campbelli*. Los grupos funcionales y metabolitos secundarios en *Ulva clathrata* encontrados fueron: dobles enlaces, quinonas, carbohidratos, cumarinas, sesquiterpenlactonas, flavonoides, esteroides y triterpenos. Adicionalmente, demostramos en extracto hexánico la presencia de un grupo lactona probablemente una sesquiterpenlactona, metabolito que por sus antecedentes puede ser el responsable de la actividad bactericida (Cruz-Suárez *et al.*, 2014). En 2013, al evaluar la actividad antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus* (misma cepa) en extractos de la misma alga, usando como solventes hexano, agua o cloroformo, además del polisacárido ulvan (extraído de la misma muestra), se demostró que el extracto acuoso y el ulvan no presentan actividad contra *V. parahaemolyticus*. En contraste con los resultados previos, en esta ocasión el extracto en hexano tampoco presentó actividad, mientras que el extracto en cloroformo si mostró actividad vibriocida.

La principal problemática que hemos detectado en esta línea de investigación, es la dificultad de comparar los trabajos realizados por otros grupos y de encontrar resultados repetibles, posiblemente por la falta de estandarización en los métodos microbiológicos utilizados por los diferentes grupos de investigación, así como por la variabilidad en la metodología de extracción y en el contenido de compuestos activos entre las diferentes especies y lotes de algas aun de la misma especie. Actualmente, estamos realizando nuevas investigaciones con la especie *Ulva clathrata* cultivada considerando diferentes solventes, métodos microbiológicos y variables estacionales con la posibilidad de poder elegir la estación de cosecha más apropiada, o generar un estrés artificial que produzca un contenido mayor de metabolitos secundarios antes de la cosecha.

Finalmente vale la pena mencionar que el efecto antimicrobiano de las *Ulvaceas* no se restringe a vibrios de importancia en acuicultura, sino también se ha encontrado efectivo contra otras bacterias (con o sin problemas de resistencia) de importancia en alimentos, salud animal y humana por lo que el impacto de estas aplicaciones puede ser mucho más amplio.

El efecto antivibrio de extractos de *ulvaceas* también se ha evaluado *in vivo* como agente terapéutico en diferente tipo de organismos acuáticos incluyendo los extractos o las algas deshidratadas en alimentos a niveles muy bajos como aditivos.

En estudios exploratorios que hemos realizado con extractos de *Ulva clathrata* adicionados al alimento, hemos encontrado una disminución en la carga bacteriana de vibrios en el hepatopáncreas de los camarones *L. vannamei* que consumieron ese alimento. Esto coincide con los estudios realizados por Selvin *et al.* (2011); Malinal *et al.*, (2012); ellos encuentran que la inclusión de un extracto (diclorometano/metanol) de *Ulva fasciata* a concentraciones de 1g Kg⁻¹ de camarón *Penaeus monodon* mejora significativamente la sobrevivencia en camarones infectados por diversos vibrios. Con ello concluyen que el extracto de *Ulva fasciata* es una excelente alternativa para el desarrollo de alimento terapéutico para el manejo de las enfermedades bacterianas en camarones.

De la misma manera, Immanuel *et al.* (2004) muestran que al enriquecer por 24 hrs *Artemia franciscana* con extractos butanólicos de *Ulva fasciata* encapsulados (400 mg/l) y ser consumidas por *Penaeus indicus* desafiados con *V. parahaemolyticus*, se mejora la sobrevivencia y disminuye el número de UFC presentes en el músculo y hepatopáncreas del camarón, concluyendo que el uso de extractos de alga en el alimento aumenta la resistencia a enfermedades bacterianas. Manilal *et al.* (2012) también demuestran como otra alga verde de la familia de las *Ulvaceas*, *Acrosiphonia orientalis*, también es eficaz como agente terapeuticoterpéutico para contrarrestar problemas de vibriosis en camarones peneidos.

En base a lo anterior varios extractos de *Ulvaceas* y otras algas están siendo evaluados en nuestro laboratorio como agentes profilácticos o terapéuticos prometedores, para contrarrestar problemas de vibriosis (síndrome de muerte temprana) que actualmente está

padeciendo la industria camaronera a nivel mundial, por ejemplo síndrome de muerte temprano, con las consecuentes pérdidas económicas.

2. Efecto de la inclusión de harinas de algas verdes y productos a base de mezcla de algas como aditivo en dietas para camarón *L. vannamei*

Numerosos estudios han demostrado que el uso de harinas de macroalgas como aditivo (menos del 5% de inclusión) en alimento para camarón blanco *Litopenaeus vannamei* mejora la calidad física del alimento, aumenta el consumo de alimento, la ganancia en peso, mejora la utilización del alimento (efecto prebiótico) y la sobrevivencia. Sin embargo, la magnitud de los efectos varía en función de las diferencias de algunos compuestos químicos (polisacáridos entre otros) entre las algas verdes, rojas y pardas (Cruz-Suárez *et al.*, 2009). En el 2013 llevamos a cabo un trabajo cuyo objetivo fue evaluar, en medio controlado, el efecto de harinas de macroalgas verdes individuales y mezclas de macroalgas como aditivo nutricional (2%) en un alimento tipo comercial para engorda de juveniles de *L. vannamei*.

Para ello, se prepararon 5 dietas isoprotéicas (40%) e isolipídicas (7%) suplementando una dieta control (DC) con 2% de dos tipos de harinas de *algas verdes* (AV1) o (AV2), una mezcla comercial de algas (MIX1) o una mezcla experimental de algas pardas y rojas (MIX2). Se determinó la estabilidad de las dietas después de 1 hora de inmersión en agua marina sintética en términos de pérdida de materia seca (PMS), pérdida de proteína (PP) y absorción de agua (ABS). Las dietas fueron suministradas durante 41 días a camarones juveniles de *L. vannamei* (0.64 g). Cada dieta fue evaluada por triplicado en acuarios de 60L con 11 camarones cada uno. Se alimentó a saciedad 3 veces al día. Los parámetros evaluados fueron ganancia en peso (GP), consumo de alimento (CA), sobrevivencia (SOB), tasa de conversión alimenticia (TCA), tasa de eficiencia proteica (PER) y utilización neta de proteína (UNP).

Las dietas AV1 y MIX2 fueron las más estables al disminuir la PMS en un 2.8 y en 7.3% respectivamente, la PP en 15 y 23% y la ABS 2.4 y 0.8% con respecto a la DC (Tabla 2). Así mismo, produjeron los mejores valores de TCA (1.3), PER (1.7) y UNP (0.41 y 0.33 respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 2. Estabilidad de dietas en términos de pérdida de materia seca (PMS), pérdida de proteína (PP) y absorción de agua (ABS).

	DC	AV1	AV2	MIX1	MIX2	Prob. ANOVA
PMS (%)	17.7 ^a ±0.4	17.2 ^a ±1.2	21.5 ^b ±1.2	20.9 ^b ±0.6	16.4 ^a ±0.3	<0.001
PP (%)	14.6 ^b ±1.0	12.4 ^a ±1.3	17.5 ^c ±1.5	16.0 ^{bc} ±1.0	11.2 ^a ±0.3	<0.001
ABS (%)	126 ^a ±16	123 ^a ±9	157 ^b ±7	188 ^c ±12	125 ^a ±1	<0.001

Tabla 3. Comparación del consumo de alimento (CA), Tasa de conversión alimenticia (TCA), Tasa de eficiencia proteica (PER) y Utilización neta de proteína (UNP) (41 días)

Parámetro	DC	AV1	AV2	MIX1	MIX2	Prob. ANOVA
CA (g/org)	6.6 ^a ±0.6	7.0 ^a ±0.4	9.6 ^b ±0.2	9.9 ^b ±0.4	6.7 ^a ±0.3	<0.001
TCA	1.4 ^{ab} ±0.1	1.3 ^a ±0.1	1.6 ^{bc} ±0.1	1.7 ^c ±0.3	1.3 ^a ±0.1	0.012
PER	1.6 ^b ±0.1	1.7 ^b ±0.1	1.3 ^a ±0.1	1.2 ^a ±0.2	1.7 ^b ±0.1	<0.001
UNP	0.2 ^a ±0.07	0.4 ^b ±0.03	0.3 ^a ±0.03	0.3 ^a ±0.05	0.3 ^{ab} ±0.07	0.075

PER= g de peso ganado/ g de proteína ingerida; UNP= incremento en Nitrógeno carcass/ N ingerido

En contraste, las dietas AV2 y MIX1 disminuyeron la estabilidad del alimento, aumentando de forma significativa el consumo de alimento (45 y 50%, $P < 0.001$) y la tasa de conversión alimenticia (14 y 21%, $P = 0.012$), con una disminución del PER con respecto a la DC (19 y 25%, $P < 0.001$). Sin embargo, mejoraron el incremento en peso (Figura 1).

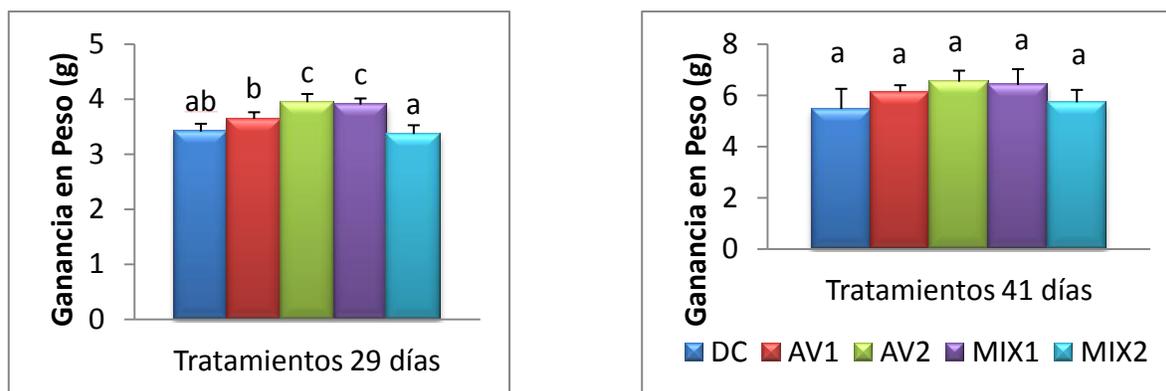


Figura 1.- Comparación de Ganancia en peso entre tratamientos

A los 29 días AV2 y MIX1 mejoraron significativamente la ganancia en peso (20 y 17%, $P < 0.001$), manteniéndose la tendencia a los 41 días aunque se perdió la significancia ($P = 0.160$).

Al final del experimento, la biomasa fue mayor con AV2 y MIX1 con diferencias cercanas a la significancia (Figura 2, $P = 0.058$).

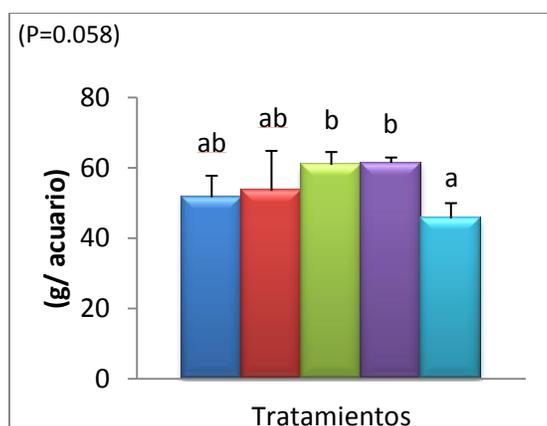


Figura 2. Biomasa 41 días

Entre los 29 y 41 días, la sobrevivencia disminuyó en todos los tratamientos, pero sin generar diferencias significativas entre tratamientos (Figura 3).

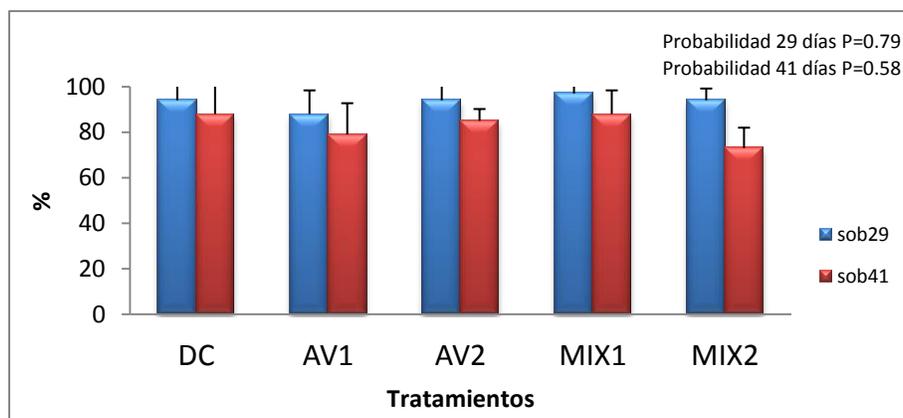


Figura 3. Sobrevivencia a 29 y 41 días

En resumen, la inclusión de 2% del alga verde AV1 y la mezcla de algas MIX2 mejoró la estabilidad de las dietas, así como la TCA y el PER, mostrando mayor capacidad aglutinante, lo cual implica una menor pérdida de nutrientes. Por otro lado, AV2 y MIX1 mejoraron el consumo de alimento (efecto attractante) y con ello el crecimiento y la producción de biomasa. Se recomienda usar estos productos con dosificación adaptada a cada formulación para evitar un aumento indeseado en la TCA y una posible sobre-inmunoestimulación y para aprovechar adecuadamente las propiedades que confiere cada tipo de alga o mezcla de algas en cada formulación.

3. Efecto de la inclusión de algas o sus extractos como inmunoestimulantes

Los crustáceos no poseen un sistema inmune específico ni memoria inmunológica (Berger, 2000), lo que dificulta la utilización de vacunas. No obstante, poseen una respuesta inmune rápida y eficiente en donde se distinguen efectores celulares y humorales, los cuales actúan en conjunto para eliminar los agentes extraños. Dentro de los efectores celulares se han descrito tres tipos de hemocitos: células hialinas, semi-granulares y granulares (Hose *et al.*, 1990), los cuales poseen una capacidad citotóxica y comunicación intercelular que les facilita las funciones de coagulación, reconocimiento, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación (Aguirre-Guzman *et al.*, 2009). El sistema inmune de los

camarones cuenta además con la presencia de varios componentes plasmáticos (péptidos antimicrobianos, histonas, enzimas lisosomales, lipopolisacáridos, proteínas de reconocimiento a glucanos), sistema profenoloxidasa, y la cascada de coagulación que favorecen la destrucción de los patógenos (Chi *et al.*, 2010).

Existen un sin número de estudios en los que se demuestra que el uso de β -glucanos, extractos de plantas, mezclas de nucleótidos, etc. (Ringo *et al.*, 2012) puede conferir protección y/o mejorar la resistencia a las enfermedades en el camarón, una práctica a menudo denominada inmunoestimulación (Smith *et al.*, 2003; Campa-Córdova *et al.*, 2005).

En lo que respecta a la resistencia a enfermedades, varios estudios demuestran que los suplementos dietéticos tanto de harina de algas (pardas y rojas) como de sus extractos, pueden aumentar la respuesta inmune, mejorar la supervivencia y aumentar la resistencia cuando los camarones se ven desafiados por algunas bacterias o virus (Tabla 4), debido a la presencia de ciertos compuestos como son los alginatos, laminarias, carragenatos, fucoidan y otros polisacáridos sulfonados.

Algunas especies de *Ulva* así como sus extractos presentan importantes actividades biológicas que han sido demostradas principalmente en humanos y animales como son la actividad antioxidante (Qi *et al.*, 2006), antihepatotóxica e inmunomoduladora (Raghavendra *et al.*, 2004; Lahaye and Robic, 2007; Leiro *et al.*, 2007) antiinflamatoria, antitumoral (Kaeffer *et al.*, 1999; Barcelo *et al.*, 2000) y antiviral. El alga *Ulva clathrata* es un alga de la familia Ulvaceae que contiene como principal polisacárido sulfatado al ulvan, este tiene como principales componentes disacáridos constituidos de ramnosa y ácido glucurónico o ácido idurónico, o xilosa, todos portadores de grupos sulfatos (Lahaye, 1998; Paradossi *et al.*, 1999).

Los estudios sobre los efectos protectores de las Ulvas en organismos acuáticos son muy escasos, en peces se ha visto que la inclusión de *Ulva* o extractos de esta, incrementan la actividad de los macrófagos al ser incluidos en dietas para rodaballo que contribuye a la

resistencia a enfermedades (Castro *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2006); por otro lado Satoh *et al.* (1987), utilizando 5% de harina de *Ulva pertusa* en dietas para pargo rojo *Pagrus major*, encuentran un aumento en los parámetros de respuesta inmune tales como un aumento en la fagocitosis de los granulocitos al ser infectados con *Pasteurella piscicida*. Así mismo, encuentran que el número de linfocitos se incrementa en los animales alimentados con la dieta suplementada y un aumento en actividades complementarias como la actividad hemolítica espontánea y la actividad bactericida frente a *Escherichia coli*.

Tabla 4. Algunos estudios sobre el efecto inmuno-estimulante, de harina de algas (pardas o rojas), o de sus extractos en los camarones peneidos.

Producto	Especie de camarón / alga	administración	Resultado
Alginato	<i>L. vannamei</i> /Alginato de sodio ¹	inyectado intramuscular (10, 20 o 50 µg/g)	Incrementa significativamente la actividad de la profenoloxidasa, la actividad fagocítica, la limpieza bacteriana cuando los camarones son inyectados. Incrementa la resistencia a infección por <i>V. alginolyticus</i>
Extracto en agua caliente	<i>L. vannamei</i> / <i>Gracilaria tenuistipitata</i> ²	Inmersión (4 o 6 µg/g) Inyectado intramuscularmente	Aumenta el recuento total de hemocitos, la actividad fenoloxidasa y estallido respiratorio y la resistencia a la infección por <i>V. alginolyticus</i> .
Extracto en agua caliente	<i>P. vannamei</i> /Sargassum duplicatum inyectado ³	Inmersión (100, 300 y 500 mg/L) Inyectado Intramuscularmente (2, 6, 10 y 20 µg/g)	Aumenta el recuento total de hemocitos, la actividad fenoloxidasa y estallido respiratorio, así como la resistencia a la infección por <i>V. alginolyticus</i> .
Fucoidan extraído tres veces con 0,05 N HCl a 95 ° durante 12 h	<i>P. monodon</i> / <i>Sargassum polycystum</i> ⁴	Inyectado intramuscularmente	Produce una expresión significativamente mayor (p <0,05) del gen de la proteína ribosomal L26 (RPL26, un gen activador de los macrófagos en <i>P. monodon</i>)
Extracto en agua caliente	<i>Litopenaeus vannamei</i> / <i>Gelidium amansii</i> ⁵	Inmersión (200, 400 y 600 mg/l) Inyectado (4 y 6 mg/g shrimp) Oral (0, 0.5, 1.0 y 2.0 g /kg).	Aumenta la actividad fagocítica, la eficiencia de limpieza de bacterias en hemolinfa, el conteo total de hemocitos, la actividad de la fenoloxidasa la resistencia a la infección por <i>V. Alginolyticus</i>
Extracto en agua caliente	<i>Litopenaeus vannamei</i> / <i>Spirulina platensis</i> ⁶	Inmersión (200, 400, and 600 mg/l) Inyectado Intramuscularmente	Aumenta el recuento total de hemocitos, la actividad fenoloxidasa y estallido respiratorio, así como la resistencia a la infección por <i>V. alginolyticus</i> .

Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

Producto	Especie de camarón / alga	administración	Resultado
		(6, 10, and 20 µg/g)	
Extracto en agua caliente	<i>Litopenaeus vannamei</i> / <i>Gracilaria tenuistipitata</i> ⁷	Oral (0.5, 1.0, and 2.0 g/kg)	Aumenta la resistencia a la infección por <i>V. alginolyticus</i> y WSSV, Aumento en los parámetros de respuesta inmune.
Extracto en agua caliente	<i>Fenneropenaeus indicus</i> / <i>Sargassum glaucescens</i> ⁸	Inmersión (100, 300 and 500 mg/l.)	Aumenta del conteo total y diferencias de hemocitos, aumento de la resistencia a <i>Vibrio harveyi</i>
Fucoidan	<i>Penaeus monodon</i> / <i>Sargassum wightii</i> ⁹	Oral (0.1, 0.2 and 0.3%).	Aumenta en todos los parámetros de respuesta inmune y aumento en la resistencia a la infección con WSSV
Extracto en etanol	<i>Penaeus monodon</i> / <i>Gracilaria fisheri</i> ¹⁰	Inyectado	Aumenta en el número total de hemocitos, aumento en el número de hemocitos semigranulosos y granuloso, aumento en la actividad de la fenoloxidasa y la superoxidodismutasa y una reducción en la mortalidad a la infección con <i>V. harveyi</i>

¹Cheng *et al.*, 2004; ²Hou and Chen, 2005; ³Yeh *et al.*, 2006; ⁴Deachamag *et al.*, 2006; ⁵Fu *et al.*, 2007; ⁶Tayag *et al.* 2010; ⁷Sirirustananun *et al.* 2011 ; ⁸Ghaednia *et al.* 2011 ; ⁹ Immanuel *et al.* 2012 ; ¹⁰Kanjana *et al.*, 2011

En el caso de los camarones existen reportes del uso de diferentes especies de ulvas y/o sus extractos para aumentar la resistencia a patógenos o incrementar los parámetros de respuesta inmune; por ejemplo Selvin *et al.* (2004) incluyen *Ulva fasciata* en la dieta para *P. monodon* y demuestran que su inclusión incrementa los factores de defensa como hemograma, índice de aglutinación, tasa de fagocitosis, remoción de bacterias y actividad bactericida del suero. En otro estudio realizado el mismo año (Felix *et al.*, 2004) se encontró que al incluir a la dieta para *P. monodon* 750 mg/kg de harina de *Ulva lactuca*, se incrementó la actividad de la profenoloxidasa y la sobrevivencia al ser desafiados con *V. parahaemolyticus*. En el 2011, Selvin y colaboradores utilizan un extracto en agua caliente de *Ulva fasciata* incluido a la dieta (0, 0.5, 1 y 1.5 g kg⁻¹ de camarón) y alimentan a *P. monodon* durante 15 días, posteriormente infectan con diferentes vibrios (*V. fisheri*, *V.*

harveyi, *V. alginolyticus* y *Aeromonas sp.*) y observan que la dosis de 1 g kg^{-1} de camarón fue la más eficiente y que la sobrevivencia de los camarones infectados alimentados con la dieta medicada fue significativamente mejorada con respecto al control.

Ulva clathrata

En el caso de la especie *Ulva clathrata* no existen reportes previos de su utilización como inmunoestimulante, nosotros hemos llevado a cabo un bioensayo para tratar de describir los cambios que ocurren en el hemograma, en el contenido de proteína de la hemolinfa y en la actividad de la fenoloxidasa de juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei* como respuesta a una inmunoestimulación oral, utilizando harina de *Ulva clathrata* o ulvan extraído de la misma. Para ello, se llevó a cabo un bioensayo en el que los animales fueron alimentados con una dieta control o con una dieta adicionada con 6% (60 g kg^{-1}) de harina *Ulva clathrata* o una dieta adicionada con un extracto de la misma alga (1 g kg^{-1}) por 15 días; se trabajó con 6 replicados para cada tratamiento y se utilizaron organismos de 2.7 g de peso promedio, posteriormente se obtuvieron muestras de hemolinfa que fueron sometidas a análisis de parámetros de respuesta inmune.

Hemograma

Los animales que recibieron la dieta con *Ulvan*, mostraron un mayor contenido de hemocitos semigranulosos (1.96 y 4.23×10^5 vs 8.32×10^5), hialinos (1.52 y 1.56×10^5 vs 4.10×10^5) y totales (6.88 y 6.93×10^5 vs 1.61×10^6) en comparación con los animales alimentados con las otras dos dietas. Estos resultados concuerdan con varios estudios en los que se ha encontrado que la inclusión de diferentes extractos de algas aumenta el contenido de hemocitos; por ejemplo, Yu-Win *et al.* (2007) encontraron, al adicionar a la dieta un extracto en agua caliente de *Gelidium amansii* ($0, 0.5, 1.0$ y 2.0 g kg^{-1}) y alimentar a *L. vannamei* durante 14 días, un aumento en el conteo total de hemocitos a los 6 días con la dosis de 2.0 g kg^{-1} y a los 14, 21 y 28 días con la dosis de 1.0 g kg^{-1} . En otro estudio realizado por Sirirustananun *et al.* (2011) al suplementar la dieta con un extracto en agua caliente de *Gracilaria tenuistipitata* ($0, 0.5, 1.0, \text{ y } 2.0 \text{ g kg}^{-1}$ por 7-35 días), y alimentar

camarones *L. vannamei*, encontraron que el contenido de hemocitos hialinos (HC) y el contenido total de hemocitos (THC) de los camarones alimentados con dietas suplementadas con 1.0 and 2.0 g kg⁻¹ fue significativamente más alto que el control desde 7 a 35 días; los HC y THC de los camarones alimentados con 0.5 g kg⁻¹ fueron más altos que el control de 14-28 días. Los hemocitos granulares (GC) de los camarones alimentados con 2.0 g kg⁻¹ fueron más altos que los del control de 14 a 35 días y los GC de los animales alimentado con 0.5 y 1.0 g kg⁻¹ fueron significativamente más altos que los del control a los 21 y 28 días. Pero también notaron que los HC, GC y THC de los camarones alimentados con las dietas conteniendo los extractos decrecen lentamente después de 35 días. En otro estudio realizado por Grasian *et al.* (2012) en el que administraron a camarones *Penaeus monodon* por inmersión un extracto en buffer salino de fosfatos del alga *Gracilaria verrucosa* (1, 1.5 y 2ppt), revelaron que todas las dosis provocaron un aumento en el THC significativo con respecto al control, el efecto siendo dosis dependiente.

Proteína en hemolinfa

En lo que respecta al contenido de proteína en la hemolinfa, se encontró que la dieta control era la que presentaba el valor significativamente más elevado seguido por la dieta adicionada con ulvan y finalmente por la dieta adicionada con harina de alga, presentando estas dos últimos valores similares. En general, la concentración de proteína en hemolinfa puede aumentar o disminuir dependiendo del tipo de inmunoestimulante y el tiempo de muestreo (Campa-Córdoba *et al.*, 2005).

Huang *et al.*, en el 2006, realizan un estudio en el que se evaluó la capacidad inmunoestimulante de un polisacárido extraído de *Sargassum fusiforme* (0%, 0,5%, 1,0%, y % 2,0) adicionado a dietas de *Fenneropenaeus chinensis* que fueron alimentados por 14 días, encontrando que la concentración de proteínas de la hemolinfa presentó valores más elevados que el control a 1 y 2% del extracto, observando primero un aumento de la concentración de proteína al incrementar la dosis (0, 0.5 y 1%), siendo el valor más alto en la dosis de 1% de extracto (167 mg ml⁻¹), pero luego a 2% la proteína en hemolinfa disminuyó (156 vs 140mg ml⁻¹ en el control). En otro estudio similar Sánchez-Campos *et*

al. (2010) reportaron que al adicionar un extracto de *Macrocystis pyrifera* al camarón *Litopenaeus vannamei* por inyección o por inmersión antes de infectar con *Vibrio campbellii*, la concentración de proteína en el plasma disminuye las primeras 6 o 12 horas y aumenta después de 24 horas, pero al inyectar solo con el *Vibrio* la concentración de proteína en la hemolinfa fue mucho más baja que en la dieta control.

Actividad enzimática

El efecto inmunoestimulante de algunas especies de algas o sus extractos ha sido bien documentado gracias a la capacidad que poseen de incrementar la actividad de enzimas de respuesta inmune tales como la fenoloxidasa y la profenoloxidasa entre otras (Tabla 4), sin embargo, dentro de los resultados obtenidos en el presente estudio, la actividad de fenoloxidasa total no se vio afectada por la adición de la harina de *Ulva* o por la adición del ulvan.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Felix *et al.* (2004a), quienes utilizan el alga *Ulva lactuca* como inmunoestimulante recubriendo dietas para *Penaeus monodon* (100, 250, 750 y 1000 mg/kg) y alimentando a los camarones los primeros 5 días con los tratamientos y los siguientes 12 días con la dieta control, luego toman muestras de hemolinfa el día 1, 3, 6, 9 y 12 y determinan la actividad de la fenoloxidasa, no encuentran ninguna diferencia entre los tratamientos o días de muestreo excepto para el primer día de muestreo en el que la dieta con 750 mg/kg fue la única que presentó un valor mayor a la dieta control, sin embargo no indican si las diferencias fueron o no significativas. Por su parte Fu *et al.* (2007), alimentaron a *Litopenaeus vannamei* por 14 días con un extracto en agua caliente del alga roja *Gelidium amansii* (0, 0.5, 1.0 and 2.0 g kg⁻¹), encontrando que a los 0, 3 y 6 días de alimentación no hay diferencia en la actividad de la Fenol-oxidasa (PO); a los 9 días las dietas adicionadas con el extracto presentan una actividad significativamente más alta que la control, siendo iguales entre ellas, pero a los 28 días las diferencias son dosis dependiente. Por lo que probablemente la ausencia de diferencias en la actividad de la PO encontradas en nuestro estudio, se puedan deber al tiempo de muestreo que fue solo a los 14 días.

Por otro lado, en lo que se refiere a la actividad de la fenoloxidasa libre si se observaron diferencias entre la dieta control y la dieta adicionada con 6% de alga, siendo mayor significativamente ($p=0.045$) la dieta con la harina del alga; la dieta adicionada con Ulvan no presentó diferencia con la dieta control. Esto concuerda con el estudio de Felix *et al.* (2004b), quienes evaluaron la actividad de la fenoloxidasa en hemolinfa de *Penaeus monodon* alimentados con dietas adicionadas con el alga *Sargassum wightii* (10, 20 y 30 g/kg), los camarones fueron muestreados el día 1, 3, 6, 9 y 12 de alimentación y el valor más alto de actividad de la PO fue registrado los días 9 y 12 con la dieta que contenía 10g/kg de harina del alga.

La ausencia de resultados favorables de aumento en la actividad de la PO al adicionar el Ulvan, se puede deber a que la mayoría de los estudios reportan extractos hechos en agua caliente a diferencia de nuestro ulvan que fue un extracto hidroalcohólico (etanol 78%) hecho a temperatura ambiente; otra causa puede ser la concentración utilizada y/o el tiempo de muestreo ya que como se mencionó, estos factores afectan los valores de actividad enzimática.

4. Efecto de la inclusión de algas para la reducción de aflatoxicosis en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*

Las micotoxinas son sustancias extremadamente estables, permanecen durante largo tiempo activas en los ingredientes y resisten fácilmente las condiciones de procesamiento de los alimentos (Kabak *et al.*, 2006). Existen entre 300 y 400 micotoxinas identificadas, siendo las más importantes por su ocurrencia y toxicidad en especies de producción pecuaria las aflatoxinas, la ocratoxina A, la citrinina (CIT), el deoxinivalenol, la zearalenona, la toxina T2 y otros tricotecenos (Roseanu *et al.*, 2010). La presencia de estos compuestos tóxicos en animales terrestres causa desórdenes gastrointestinales y neurológicos, cambios degenerativos y necrosis en vísceras, cáncer, reducción en el crecimiento, consumo de alimento, hemorragias de estómago e intestino, agrandamiento de riñones, (Carrillo, 2003). En camarón se ha reportado que la presencia de aflatoxinas en forma pura o presentes en

granos contaminados en alimentos reduce el consumo de alimento, la ganancia en peso, causa daños en el hepatopáncreas y a niveles altos puede llegar a reducir la sobrevivencia (Lightner *et al.*, 1982; Boonyaratpalin *et al.*, 2001; Gopinath y Raj, 2009; Tapia-Salazar *et al.*, 2012).

Una ruta secundaria que sigue el metabolismo de las aflatoxinas incluye la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS; Shen *et al.*, 1996) así como la peroxidación de lípidos (Shen *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1995a). El daño/estrés oxidativo resulta cuando el nivel de ROS sobre pasa la capacidad del sistema para neutralizarlos y eliminarlos. El aumento del nivel de ROS por lo general resulta de la falta o la alteración funcional de moléculas antioxidantes, o debido a la sobreproducción de ROS en el entorno (Sohal y Weindruch, 1996). Estudios recientes muestran que las ROS también tienen un papel importante en algunos procesos bioquímicos tales como la apoptosis, la expresión de genes y la activación de cascadas de señalización celular (Hancock *et al.*, 2001).

Las algas marinas son conocidas por contar con una amplia gama de compuestos bioactivos, muchos de los cuales tienen aplicación comercial en la rama de la farmacéutica, médica, cosmética, nutracéutica, alimenticia e industria agropecuaria (Kelman *et al.*, 2012). Abdel- Wahhab *et al.* (2006) observan que la inclusión de extractos de *Laurencia obtusa* y *Caulerpa prolifera* (50 mg kg⁻¹ peso) redujo la hepatotoxicidad causada por la presencia de aflatoxina B1 en ratas. Además estos autores agregaron que al alimentar con los extractos de algas a ratas que estaban anteriormente sometidas a una dieta con AFB1 se observaba una rápida recuperación en la ganancia de peso, además del perfil hemático disminuido por los efectos de las aflatoxinas, concluyendo que los extractos de algas tienen una acción químico-protectora contra la carcinogénesis hepática inducida por la aflatoxina B1 y que además pueden estimular el sistema de defensa antioxidante regenerando las células hepáticas. Manoharan (2008) reporta que la utilización de un extracto acuoso de *Gracilaria corticata* (250 mg Kg⁻¹) en ratas Wistar que fueron alimentadas durante 30 días con una dieta contaminada con aflatoxina B1, contrarrestaron los efectos negativos causados por la

presencia de esta micotoxina dando resultados equivalentes a la dieta control sin contaminar.

Para observar el efecto protector de *Ulva clathrata* contra aflatoxicosis, hemos realizado una serie de experimentos. En un primer experimento, se alimentaron camarones *L. vannamei* (peso promedio de 0.4 g) con una dieta que contenía granos contaminados con aflatoxinas a un nivel de inclusión de 120 ppb durante 42 días y otra conteniendo la misma cantidad de aflatoxinas totales, pero además se le adicionó % 2 de Alga *U. clathrata*. Después de 42 días de experimentación se observó una reducción significativa debido a la presencia de granos contaminados con aflatoxinas en términos de consumo de alimento (Figura 4) y ganancia en peso (Figura 5); además la tasa de conversión alimenticia fue mayor (Figura 6). Al final del experimento la sobrevivencia no fue afectada por las dietas evaluadas. La inclusión de harina de ulva incremento el consumo de alimento en un 28% y produjo una ganancia en peso similar a la dieta sin contaminar. La tasa de conversión alimenticia fue mejorada en un 20%.

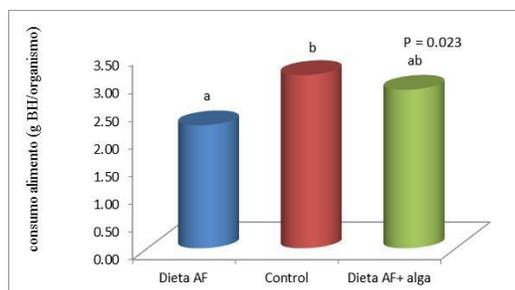


Figura 4. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre el consumo de alimento de juveniles *L. vannamei* durante 42 días.

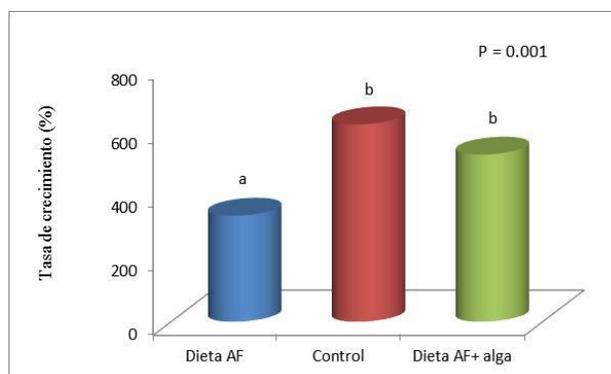


Figura 5 . Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre la ganancia en peso de juveniles *L. vannamei* durante 42 días.

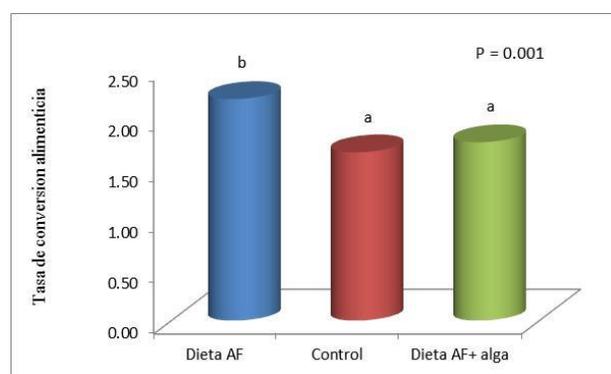


Figura 6. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre la Tasa de Conversión Alimenticia en peso de juveniles *L. vannamei* durante 42 días.

En un segundo experimento, se evaluó el efecto de niveles crecientes de harina de alga *U. clathrata* (0, 2.5, 5.0, 10, 20 y 40 g kg⁻¹) en alimentos que contenían granos contaminados con aflatoxinas totales a un nivel de 80 ppb durante 28 días; al final del experimento el consumo de alimento no fue afectado por las dietas experimentales (Figura 7), mientras que la tasa de conversión alimenticia (Figura 8) fue mejor en un 20% con la Dieta AF + 1% Alga y la ganancia en peso en un 22% (Figura 9). La sobrevivencia no fue afectada por los diferentes tratamientos.

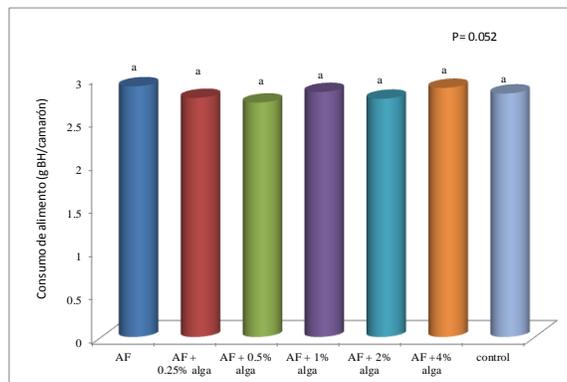


Figura 7. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre el consumo de alimento de juveniles *L. vannamei* durante 28 días.

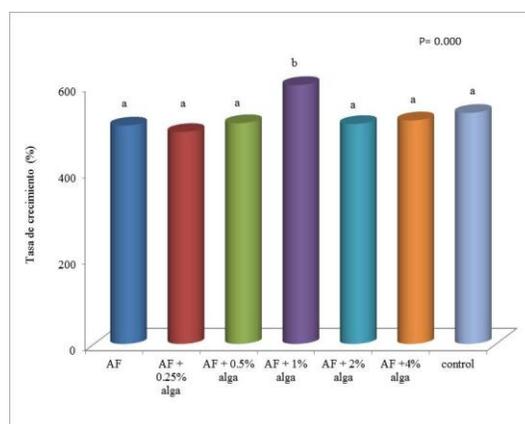


Figura 8. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre la ganancia en peso de juveniles *L. vannamei* durante 28 días.

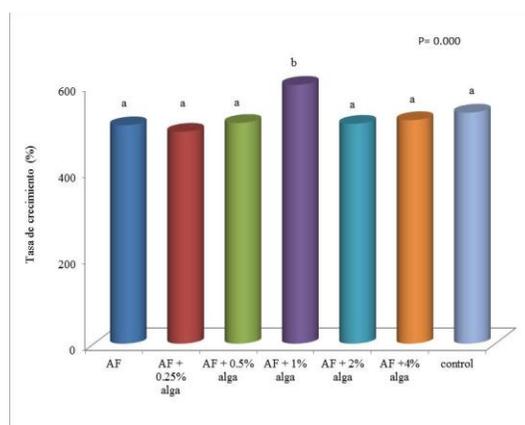


Figura 9. Efecto de la presencia de granos contaminados con aflatoxinas y la inclusión de alga sobre la ganancia en peso de juveniles *L. vannamei* durante 28 días.

Por otro lado, también se cuantificó la capacidad que posee *Ulva clathrata* en forma de harina para absorber aflatoxinas: los resultados muestran que un nivel de inclusión de 2% de alga y una concentración de 3 ppm de aflatoxinas (pH de 8) tiene una capacidad de adsorción de 49% y un porcentaje de desorción (a pH de 6.5) de 23%, poseyendo una eficiencia para secuestrar aflatoxinas de un 25%. A pesar de que se observa una baja capacidad de adsorción los resultados muestran que la inclusión de esta macroalga mejora los parámetros de rendimiento en camarones alimentados con dietas que poseen harinas de granos contaminados con micotoxinas.

Es muy posible que el efecto secuestrante del *Ulva clathrata* así como la presencia de un sin número de compuestos activos, tales como pigmentos, ulvan, polifenoles etc., contribuyan a contrarrestar los efectos negativos causados por la presencia de aflatoxinas.

Heo *et al.* (2005) evaluaron la capacidad antioxidante de siete extractos de algas marinas pardas, los extractos enzimáticos mostraron efectos antioxidantes más elevados para eliminar el peróxido de hidrógeno (aproximadamente 90 %). El Baky *et al.* (2008) reportan que los extractos de *Ulva latutis* poseen una actividad antioxidante y antibacteriana. Seo *et al.* (2013) reporta que un extracto metanólico de *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi inhibe la acumulación de lípidos y la producción de ROS durante un proceso de adipogénesis en células 3T3-L1.

Los beneficios observados con el suplemento de algas en los camarones alimentados con las dietas contaminadas con aflatoxinas pueden deberse al efecto sinérgico de la capacidad secuestrante del producto así como la presencia de compuestos antioxidantes. Actualmente nos encontramos analizando las enzimas relacionadas con el proceso de oxidación celular y sustancias reactivas de oxígeno.

5. Mejora de la capacidad reproductiva y de la calidad de las larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* por la inclusión de un fitogénico en dietas para maduración

El abastecimiento de poslarvas de buena calidad depende del buen manejo de los reproductores y de la calidad del alimento que se suministra durante la maduración. Una deficiencia nutricional en esta etapa influye directamente en la tasa de apareamiento, el desarrollo gonadal, la fertilidad y la calidad del desove, así como en el desarrollo embrionario, y la calidad fisiológica y bioquímica de la progenie resultante (Cahu 2000). Por otro lado, se sabe que el consumo de *algunos fitogénicos* mejora el crecimiento, la tasa de conversión, la respuesta inmune, la resistencia a enfermedades y la pigmentación de camarones juveniles, pero poco se sabe sobre su efecto en dietas para maduración. Por ello, nos propusimos evaluar el efecto de la inclusión de un fitogénico al 2% de una dieta a base de mariscos frescos en reproductores de camarón *Litopenaeus vannamei* provenientes de 2 familias sobre la capacidad reproductiva, y la calidad de las larvas.

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de producción de poslarvas Aquapacific S. A. de C. V.; se utilizó una dieta control a base de mariscos frescos congelados y una dieta experimental con inclusión de 2% del *Ulva* siguiendo las condiciones de alimentación y cultivo propias de la empresa durante 57 días de alimentación. Se utilizaron 4 pilas con 1000 camarones cada una (500 machos y 500 hembras, densidad de 9-10 camarones/m²) en un diseño factorial 2x2, los factores siendo la suplementación fitogénica (*fitogénico* vs control) y la familia de origen de las hembras (familia A vs B), las replicas siendo reportes diarios (n=33). El peso promedio inicial fue de 40 g para machos y 45 g para hembras. Se evaluaron variables de producción e indicadores de calidad de gónadas, huevos y larvas. Los parámetros reproductivos evaluados fueron sometidos a un análisis de varianza factorial bajo la modalidad de modelo lineal general.

Los parámetros físico químicos del agua se mantuvieron en rangos iguales en todas las pilas de maduración: temperatura 26.8±.5 °C, oxígeno disuelto 5 mg/L, salinidad de 30±1 g/L. El

peso final fue de 65 y 68 g para machos y hembras. El consumo del alimento enriquecido con el fitogénico incrementó en 14, 16 y 20% la frecuencia de aparición de los estadios de maduración gonadal I-II, III, y IV respectivamente. Aumentó en un 21% la frecuencia de hembras copuladas (parchadas) y en un 30 % la frecuencia de cortejo; la producción de huevo aumentó 25%; el número de huevos no eclosionados por hembra bajó en un 25%; el porcentaje de eclosión aumentó en un 6% (llegando a 82% de éxito en la eclosión con *el fitogénico*), consiguiendo mejorar en un 34 % la producción total de nauplios; los tiempos de desarrollo larvario se acortaron en 1, 5 y 6 horas para los estadios nauplio V, protozoa III y poslarva V respectivamente, con una disminución significativa de la frecuencia de deformidades y mortalidad. Estos resultados fueron observados tanto en la familia A como en la B, en general sin interacción entre los factores *fitogénico* y familia. En base a los resultados encontrados se considera que el fitogénico actúa de manera sinérgica complementando con sus componentes químicos y funcionales (minerales, pigmentos, vitaminas, ácidos grasos, antioxidantes, polisacáridos prebióticos) el alimento fresco. En conclusión, la adición de 2% del fitogénico en la dieta fresca para maduración mejora la capacidad reproductiva, la calidad de los huevos y de las larvas siendo una estrategia rentable y recomendable para aumentar la producción larval y disminuir los costos de producción.

6. Actividad antioxidante

La oxidación de moléculas consiste en una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante ávido de electrones. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres causando daño en las células. Los camarones en cultivo están expuestos de manera continua a estrés oxidativo causado por variaciones importantes en las condiciones ambientales o por agentes infecciosos, entre otros. Durante el proceso de infección, las células hialinas participan en la fagocitosis produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), activando el complejo enzimático ligado a membrana, NADPH oxidasa, después de la unión de la partícula extraña a la célula. El oxígeno molecular se reduce a anión superóxido (O_2^-), conduciendo a la producción de

Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno simple (O₂) y radicales hidroxilo (OH) (Muñoz *et al.*, 2000).

Los antioxidantes, son compuestos que previenen o retardan el proceso de oxidación, por lo tanto, contar con estos aditivos en el alimento es determinante para reducir el daño oxidativo a nivel celular.

Las algas constituyen una fuente de antioxidantes, ya que son organismos fotosintéticos que se encuentran expuestos a los rayos UV y a altas concentraciones de oxígeno, lo cual favorece la formación de radicales libres. La ausencia de daños oxidativos en sus membranas celulares sugiere que tienen un mecanismo de protección apto para soportar la intensa radiación solar a la que son sometidas. Estos mecanismos pueden estar generados por la capacidad secuestrante de radicales libres, la quelación de metales pro-oxidantes, los mecanismos de donación y aceptación de electrones y la capacidad de interrupción de la peroxidación lipídica presente en las algas (Batista-Gonzalez *et al.*, 2009). Entre los compuestos antioxidantes reportados en las algas se encuentran compuestos lipofílicos como ácidos grasos insaturados, clorofila y carotenos y compuestos hidrofílicos como polifenoles y vitamina C y polisacáridos sulfatados (SPs por sus siglas en inglés). Algunos de los compuestos antioxidantes también se reportan como apolares, (derivados de clorofilas, terpenoides y carotenoides) y polares (polifenólicos como los flavonoides, ácido fenólico y cinámico) (Batista González *et al.*, 2009).

El contenido total de polifenoles y la capacidad antioxidante en las algas varía con la especie, pero se sabe que las algas verdes presentan altas propiedades de eliminación de radicales libres. Shanab (2007) estudió la actividad antioxidante y antibacterial de los extractos etanólicos y diclorometano de las algas *Sargassum dentifolium*, *Laurencia papillosa* y *Jania corniculata*. Estudios espectrofotométricos y cromatográficos revelaron que la capacidad antioxidante y antibacterial podría ser atribuida al contenido de clorofilas, carotenoides y fenoles libres y también al contenido de ácidos grasos de las algas.

Xue *et al.* (2004) reportan que varios polisacáridos sulfatados (SPs) derivados de algas presentan actividades antioxidantes en una suspensión liposomal de fosfatidilcolina y en

solventes orgánicos. Los SPs no solo funcionan como fibra dietaria (prebióticos), si no que también contribuyen con actividad antioxidante de algas marinas. Se ha demostrado que los SPs tienen una alta capacidad antioxidante incluyendo, fucoidan, laminaran y ácido algínico (Rupérez *et al.*, 2002; Rocha de Souza *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Esta capacidad antioxidante de SPs depende del peso molecular; el ulvan de bajo peso molecular proveniente de *Ulva pertusa* presenta mayor actividad antioxidante debido a que éstos SPs pueden incorporarse dentro de la célula y donar el protón más eficientemente que los SPs de alto peso molecular (Qi *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Zubia *et al.* (2007) se encontró que tres especies de algas tropicales (*Obophora variegata*, *Avrainvillea longicaulis* y *Chondria baileyana*) tienen una actividad equivalente a los antioxidantes comerciales. En el caso de género *Ulva* se han detectado altas concentraciones (2.2 mg g^{-1}) de vitamina C (un importante antioxidante) en comparación a distintas especies de algas colectadas en Hawai (McDermid y Stuercke, 2003). El contenido de las moléculas antioxidantes de *Ulva rigida* ha sido reportado por Yildiz *et al.* (2012) (Tabla 5).

Tabla 5.- Contenido de moléculas bioactivas con capacidad antioxidante de *Ulva rigida* en peso húmedo (Yildiz *et al.*, 2012).

ANTIOXIDANTE	UNIDAD	CONTENIDO
CALT	$\mu \text{ mol } \alpha\text{-tocoferol g}^{-1}$	130.91±24.56
CAHT	$\mu \text{ mol } \alpha\text{-ácido ascórbico g}^{-1}$	375.59±61.63
Vitamina E	$\text{mg } \alpha\text{-tocoferol } 100 \text{ g}^{-1}$	147.00±0.28
Vitamina A	μM	0.91±0.47
Vitamina C	$\text{mg } \alpha\text{-ácido ascórbico } 100 \text{ g}^{-1}$	46.00±0.17
Fenoles totales	$\text{mg de ácido gálico } 100 \text{ g}^{-1}$	73.00±0.13
Proteína total	%	52.33±4.51
Carbohidratos totales	%	34.98±20.39
Clorofila-a	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	51.13±25.69

Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutraceutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

Clorofila-b	mg 100 g ⁻¹	43.40±19.32
Carotenos totales	mg 100 g ⁻¹	9.67±3.18

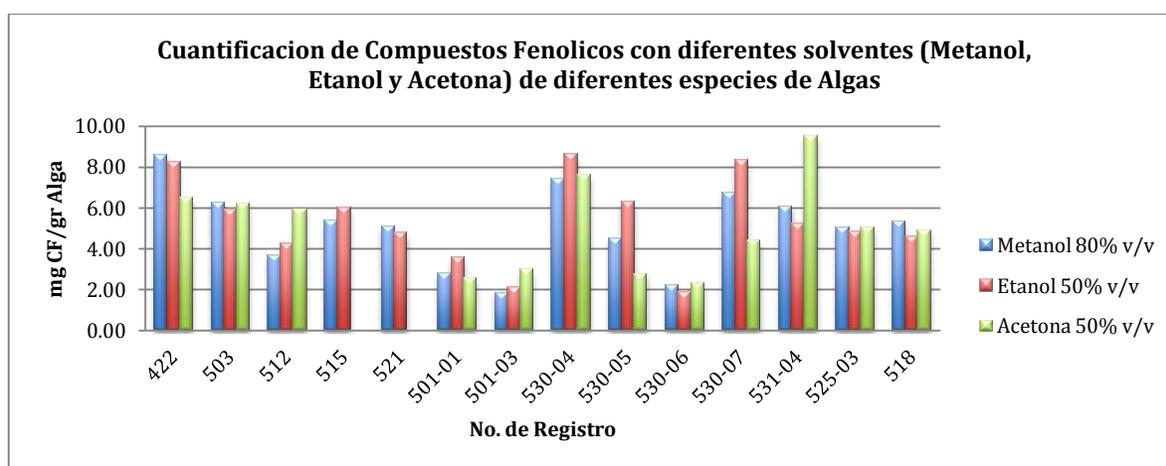
CALT: capacidad antioxidante soluble en agua CAHT: capacidad antioxidante liposoluble.

Se ha encontrado que algunos compuestos antioxidantes de algas, adicionalmente tienen un efecto sobre las enzimas de estrés oxidativo del camarón. Madhumathi, en el 2011 investigó la protección de camarones *Penaeus monodon* frente a virus de la mancha blanca (WSSV). Los animales fueron alimentados con células del alga *Dunaliella salina*, la cual contiene un betacaroteno antioxidante. Se observó un aumento en la actividad de la proPO y una disminución en la actividad de la SOD y catalasa. En este estudio se concluye que la incorporación de *Dunaliella salina* en dietas constituye una alternativa profiláctica contra WSSV.

La capacidad antioxidante evaluada *in vitro* puede usarse como un indicador indirecto de la actividad *in vivo*. La mayoría de los métodos para determinar capacidad antioxidante consisten en acelerar la oxidación en un sistema biológico. La capacidad antioxidante de un producto alimenticio está determinada por interacciones entre diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción. Por esto mismo, la determinación de la capacidad antioxidante de extractos complejos se lleva a cabo usualmente por diferentes métodos complementarios, que evalúen diversos mecanismos de acción. Algunos de los métodos más utilizados, por su simplicidad y reproducibilidad, son FRAP (Poder antioxidante reductor del hierro, por sus siglas en inglés), DPPH (depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ABTS (depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico). El método FRAP se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico al estado ferroso; en esta forma, el ion forma un complejo coloreado con el compuesto 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ). El método FRAP es, por tanto, un método que no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones. Por el contrario, los métodos ABTS y DPPH evalúan la capacidad de la muestra para neutralizar radicales libres modelo. El DPPH• es un radical libre estable soluble en metanol que es neutralizado mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno, principalmente; por otra parte, el

ABTS•+ es generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobina) o electroquímica y su mecanismo de neutralización es principalmente por transferencia de electrones. En el método ABTS, también conocido en la literatura científica como el método TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox, por sus siglas en inglés) se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos; en cambio, el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares. Otra diferencia entre ambos métodos es que el radical ABTS•+ tiene la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm. Existen otras técnicas que miden la capacidad antioxidante como CUPRAC (Capacidad antioxidante reductor de ion cúprico), ABAP (depleción del 2'-azobis (2-amidopropano), DMPO (depleción de óxido N-5,5-dimetil-1-pirrolina), ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno) y TRAP (capacidad antioxidante total), entre otras” (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

En estudios preliminares realizados en el Programa Maricultura de la FCB-UANL se ha encontrado que extractos del alga *Ulva clathrata* y otras algas analizadas presentan concentraciones variables de compuestos fenólicos totales (método de Folin-Ciocalteu) y de actividad antioxidante determinada con el método DPPH (Fig.10).



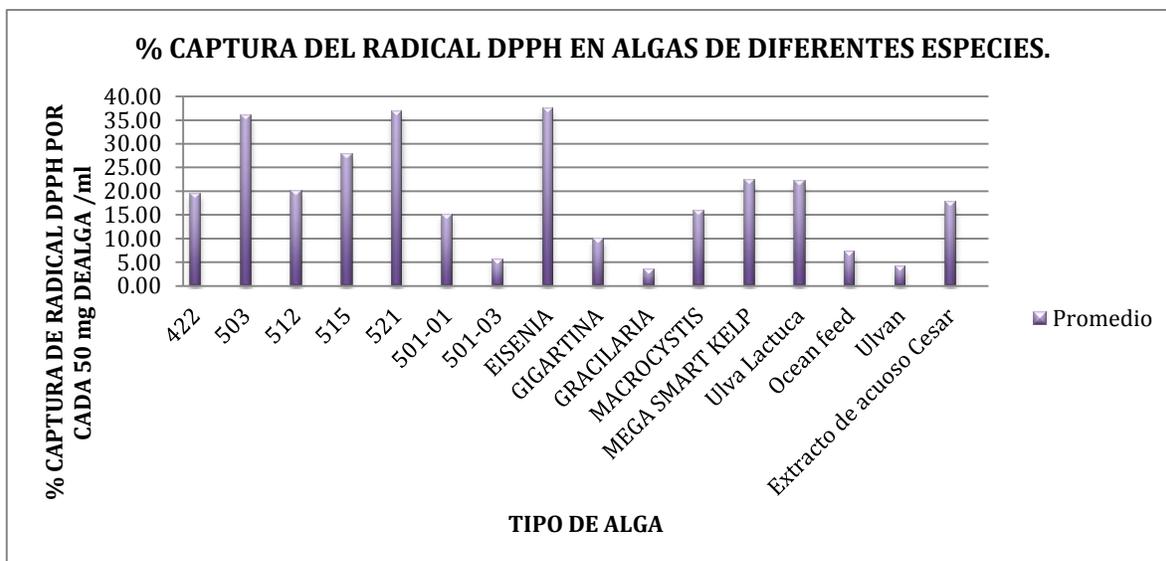


Figura 10.- Concentración de compuestos fenolicos y actividad antioxidante de muestras de *Ulva clathrata* de diferentes lugares y temporadas (422, 503, ...501-3) y otras algas.

La actividad biológica reportada por las macroalgas analizadas, podría deberse no sólo en diferentes mecanismos ejercidos por los compuestos fenólicos que poseen (flavonoides, taninos, quinonas), sino además al efecto sinérgico de su conjunto de metabolitos secundarios; para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de las algas, se está contemplando el uso de otros 2 métodos, así como el aislamiento de las moléculas y finalmente la evaluación *in vivo* en camarones sometidos previamente a un estrés oxidativo.

7. Estimación de contribuciones nutricionales de *Ulva clathrata* a partir de análisis isotópicos

Análisis isotópico de los alimentos y consumidores

Una de las formas más confiables para determinar eficiencias de asimilación es por medio de evaluaciones isotópicas. La mayoría de los elementos con interés biológico tienen dos o más isótopos estables (por ejemplo ^{12}C y ^{13}C para carbono, ^{14}N y ^{15}N para nitrógeno) y usualmente uno de estos isótopos está presente en abundancia mucho mayor que el isótopo “pesado” (Ehleringer y Rundel, 1989). Una vez analizados, los valores isotópicos se

expresan en notación delta (δ) simplemente para indicar que el valor reportado es una proporción de isótopos que se comparó con un estándar. Los isótopos son parte integral natural en los tejidos orgánicos pero también pueden ser adicionados a cierto componente a fin de marcarlo o enriquecerlo isotópicamente. En contraste con los radio-isótopos, los isótopos estables no presentan peligro, no son invasivos y varias estimaciones pueden efectuarse sobre una población, individuo o tejido específico. La disponibilidad de estas técnicas y equipos de laboratorio cada vez más sensibles, ha permitido trazar el destino de estos isótopos dentro de diversos organismos consumidores; por lo tanto, es posible estimar la ingestión, la asimilación y las tasas de recambio metabólico elemental por medio de métodos directos en lugar de las técnicas indirectas usadas tradicionalmente (Verschoor *et al.*, 2005). El uso de proporciones de isótopos estables como trazadores nutricionales se presenta como una poderosa herramienta para estimar procesos, conexiones y flujos de energía dentro de sistemas acuáticos (Michener y Schell, 1994). Esto es posible debido a que la firma isotópica de un organismo consumidor refleja el perfil isotópico del material asimilado y provee información sobre la alimentación en un periodo de tiempo (Peterson y Fry, 1987). La proporción isotópica natural de un elemento puede ser entonces utilizada para evaluar contribuciones dietarias e inferir relaciones tróficas (DeNiro y Epstein 1978, 1981; Van der Zanden *et al.*, 1999). En nutrición acuícola, esta relación se ha utilizado previamente para identificar componentes dietarios contribuyentes al crecimiento de los organismos en estanques acuícolas (Schroeder, 1983; Nunes *et al.*, 1997; Burford *et al.*, 2004; Gamboa-Delgado, 2014) y en sistemas de cultivo larval (Schlechtriem *et al.*, 2004; Jomori *et al.*, 2008; Gamboa-Delgado *et al.*, 2008; Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009b). La estimación de incorporación de nutrientes utilizando isótopos estables tiene también varias aplicaciones prácticas en la estimación del desempeño nutricional que presentan diversos ingredientes propuestos para reducir o sustituir la harina de pescado como fuente de proteína en dietas acuícolas (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009a).

Experimentos en laboratorio

Diversos ensayos en laboratorio han tenido como objetivo evaluar la contribución nutricional del alimento natural y del alimento artificial. Por ejemplo, en el caso de la etapa de cultivo larvario, estos experimentos han demostrado que en larvas y postlarvas de camarones y peces, la incorporación del carbono dietario proveniente de presas vivas (*Artemia* y rotíferos) es significativamente mayor que la incorporación de carbono dietario suministrado por el alimento artificial (Gamboa-Delgado *et al.*, 2008; Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009b). De la misma forma, como se describe a continuación, se ha determinado en camarones juveniles co-alimentados con alimento artificial y biomasa de macroalga viva, que la contribución nutricional de esta última es mucho mayor. Sin embargo, altas cantidades de nutrientes suministrados por la macroalga no producen un aumento rápido de tamaño corporal debido a la restricción de nutrientes en *U. clathrata* (bajo contenido de lípidos y energía) (Gamboa-Delgado *et al.*, 2011).

Evaluación de la incorporación de nutrientes en camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* co-alimentado con biomasa viva de macroalga *Ulva clathrata* y alimento inerte

Con el objetivo de determinar la contribución nutricional del carbono y nitrógeno dietario suministrados por medio de co-alimentación de biomasa viva de macroalga *Ulva clathrata* y alimento inerte, camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* de 0.2 gramos fueron cultivados bajo regímenes de alimentación en los cuales 75, 50 and 25% de la biomasa de macroalga consumida diariamente fue sustituida con alimento artificial. Tratamientos con animales recibiendo solamente alimento artificial (100I) y biomasa de macroalga (100U) también fueron establecidos a fin de obtener controles isotópicos positivo y negativo, respectivamente. El experimento por lo tanto consistió en cinco regímenes de alimentación establecidos por duplicado en acuarios de 60 l conectados a un sistema de recirculación de agua marina artificial y bajo parámetros controlados. La presencia de macroalga fue constante (suministrada entre sustratos plásticos) y el alimento artificial se suplió dos veces por día. Muestras de alimento artificial, macroalga y tejido muscular de camarón fueron colectadas en 6 diferentes tiempos, secadas a 60 °C durante 24 horas y homogeneizadas utilizando un mortero y pistilo. Muestras de 1 mg fueron enviadas para análisis elemental e

isotópico dual (carbono y nitrógeno) a niveles de abundancia natural en el Departamento de Ciencias de las Plantas de la Universidad de California (Davis, CA, EU). A fin de examinar diferencias entre los contenidos elementales de carbono y nitrógeno y sus respectivos valores isotópicos medidos en la macroalga y el alimento artificial, se realizaron comparaciones por medio de pruebas *t* de Student. Por otro lado, pruebas ANOVA fueron aplicadas para detectar diferencias en supervivencia, ganancia de peso y valores isotópicos en los camarones. Comparaciones múltiples por medio de la prueba de Tukey fueron efectuadas cuando fue requerido. Pruebas de bondad de ajuste fueron aplicadas para determinar si la proporción de nutrientes ofrecidos en los regímenes alimenticios fue similar a las proporciones observadas en tejido muscular y cuerpo completos de camarones.

Las mayores tasas de crecimiento fueron observadas en camarones alimentados bajo un régimen 75% alimento / 25% macroalga, seguidos por camarones alimentados solamente con alimento artificial. Animales alimentados solamente con suministro de macroalga mostraron un mínimo crecimiento (Tabla 6).

Tabla 6. Crecimiento, tasa de supervivencia y consumo de alimento estimado (peso seco) por juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei* mantenidos bajo diferentes regímenes de alimentación por 28 días (n= 8-20, valor medio \pm DE).

Régimen	Supervivencia (%)	Peso húmedo (mg)	Incremento en peso (%)	Alimento Inerte consumido (g)	Macroalga consumida (g)
100A	95 \pm 13 ^a	995 \pm 289 ^a	429	0.94	-
75A/25U	93 \pm 11 ^a	1067 \pm 364 ^a	467	0.81	0.40
50A/50U	78 \pm 11 ^{ab}	768 \pm 273 ^{ab}	308	0.43	0.44
25A/75U	60 \pm 21 ^b	424 \pm 207 ^b	125	0.14	0.65
100U*	23 \pm 4 ^c	221 \pm 49 ^c	18	-	1.32

Peso húmedo inicial = 188 \pm 28 mg.

Diferentes letras indican diferencias significativas a un nivel $p < 0.05$.

* Parámetros en animales en régimen 100U fueron estimados en el día experimental 21.

Al final del experimento, los valores isotópicos de carbono y nitrógeno ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) en el tejido de camarón estuvieron fuertemente sesgados hacia los valores isotópicos de la macroalga *U. clathrata.*, de esta forma indicando una alta proporción de carbono y nitrógeno dietario asimilados a partir de esta última (Figura 11).

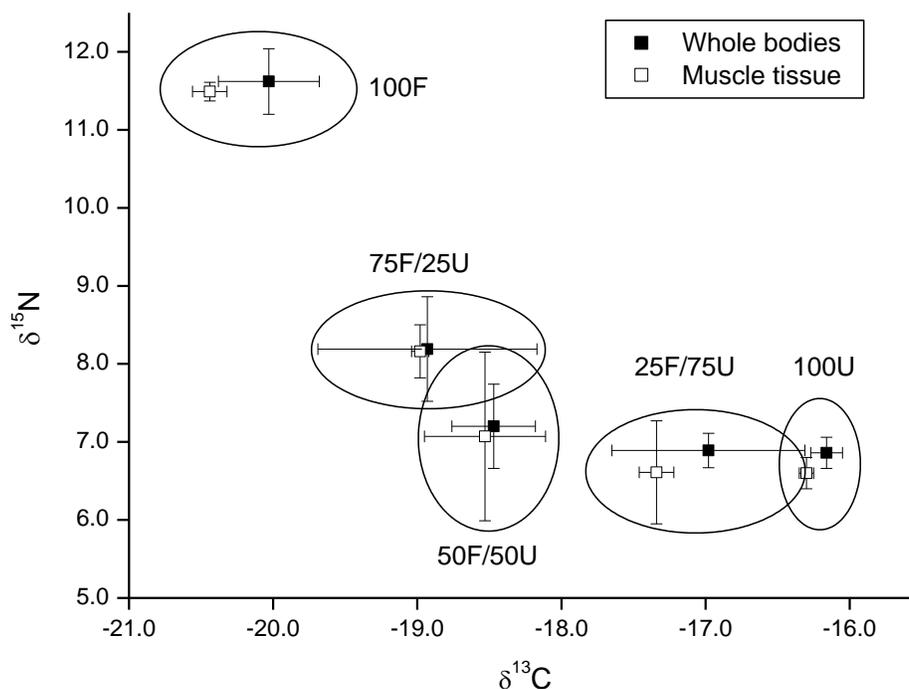


Figura 11. Grafica dual para valores isotópicos (‰) de carbono y nitrógeno en cuerpos completos y tejido muscular de camarón blanco *L. vannamei* alimentados con diferentes proporciones de de alimento inerte y biomasa viva de macroalga *U. clathrata*. 100F y 100U corresponden a los valores isotópicos de camarones alimentados exclusivamente con alimento inerte y macroalga, y por lo tanto son considerados como valores isotópicos corregidos para ambas fuentes nutricionales. Distancias más cercanas a estos puntos representan mayores contribuciones de esa fuente. n= 2-4, valores medios \pm DS.

Resultados a partir de un modelo de mezclado isotópico indicaron que las contribuciones de carbono fueron 52% a partir del alimento inerte y de 48% a partir de la macroalga en los animales alimentados bajo el régimen 75% alimento / 25% macroalga. Animales que recibieron proporciones de alimento inerte de 50% y 25% incorporaron la mayoría de nitrógeno dietario a partir de la macroalga; sin embargo, las altas proporciones de incorporación de nitrógeno dietario a partir de la macroalga no fueron reflejadas en altas tasas de crecimiento en estos últimos tratamientos. El análisis proximal de la biomasa de macroalga reveló un bajo contenido de lípidos (1.5%) y energía, lo cual puede parcialmente

explicar el menor desempeño biológico observado en los camarones alimentados solamente con macroalga o altas proporciones de esta. Se estimaron las tasas de recambio metabólico del nitrógeno y el carbono (datos no mostrados) y ambas fueron muy altas en organismos en el régimen incluyendo solamente macroalga. Este hecho apunta hacia un incremento del metabolismo cuando hay una restricción de nutrientes específicos (menor deposición de carbono y nitrógeno en tejido, mayor uso para mantenimiento de funciones vitales). Los valores isotópicos para carbono y nitrógeno medidos en el alimento artificial ($\delta^{13}\text{C} = -23.0\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 9.7\text{‰}$) y en la macroalga ($\delta^{13}\text{C} = -13.1\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = -3.5\text{‰}$) fueron muy contrastantes. Adicionalmente, ambos tipos de alimento rápidamente reflejaron sus valores isotópicos en el tejido de camarón, por lo tanto, fue posible estimar exitosamente las contribuciones nutricionales al crecimiento.

El fomento y monitoreo constante de la productividad natural de los estanques de cultivo asegura la presencia constante de alimento suministrado por la biota natural. Varios estudios que han utilizado isótopos estables como trazadores indican que al final de los ciclos de cultivo (tanto larvario como de engorda), la mayor parte del nitrógeno y carbono dietario es suministrado por el alimento natural (Gamboa-Delgado, 2014). Sin embargo, a pesar de que el alimento artificial contribuye con menores proporciones al contenido estomacal, su aporte al crecimiento es mayor debido a su comparativamente alta digestibilidad y alto contenido de proteína. Por lo tanto, el alimento artificial representa un excelente suplemento alimenticio en las operaciones de producción tipo semi-intensivo. Los valores isotópicos presentes a niveles de abundancia natural en los camarones y en sus dietas naturales pueden proveer información relevante para elucidar el flujo y la incorporación de nutrientes que contribuyen al crecimiento, definiendo a la vez periodos en los cuales los organismos se encuentran fisiológicamente mejor preparados para ingerir y asimilar nutrientes. Las evaluaciones nutricionales usando isótopos estables proveen una útil herramienta analítica para interpretar la fisiología digestiva de organismos acuáticos, siendo de particular asistencia en estudios de nutrición enfocados a determinar las contribuciones dietarias que ofrecen los diversos elementos de la productividad natural en los estanques de cultivo.

La posibilidad de manipular los perfiles isotópicos de ingredientes, dietas inertes y alimento vivo, presenta una oportunidad adicional para incrementar la resolución en tales estudios. La creciente adopción del uso de análisis isotópicos de compuestos específicos, particularmente para aminoácidos, representa una oportunidad para incrementar el conocimiento actual de la utilización de nutrientes específicos. La disponibilidad comercial de sustratos específicos (aminoácidos, ácidos grasos, colesterol, vitaminas, etc.) pre-marcados hasta con isótopos pesados, aumenta las posibilidades de aplicación en estudios sobre la fisiología nutricional de especies acuáticas.

Conclusión

Las algas marinas del género *Ulva*, en especial *Ulva clathrata* cultivada en México, tienen un amplio potencial para ser utilizadas como aditivos funcionales o nutraceuticos en alimentos para camarón, por su contenido natural de compuestos antimicrobianos, antioxidantes, hepatoprotectores, estimulantes del sistema inmune y antioxidante. Las evidencias presentadas muestran que al suplementar estos aditivos en las dosis apropiadas se promueven diversas funciones como la ingesta, la eficiencia en la utilización del alimento, el crecimiento, y la salud del tracto digestivo. Así mismo, a través de la acción sinérgica de estos productos (antibacteriana y antioxidante) y de su acción estimulante sobre los mecanismos propios de defensa de los camarones (sistema enzimático inmune y antioxidante), se logra un aumento en la resistencia a enfermedades y un efecto protector al estrés oxidativo que puede generar beneficios en las diferentes etapas del cultivo (maduración, desarrollo larvario, engorda). En especial, la amplia capacidad antioxidante de estas algas favorece las diferentes funciones fisiológicas ligadas al metabolismo de lípidos como la maduración y sobrevivencia larvaria, al eliminar o neutralizar los radicales libres generados por factores que producen estrés oxidativo. El análisis de la expresión diferencial por secuenciación masiva de transcriptoma de hepatopáncreas de camarones alimentados con o sin el alga y la demostración de las altas contribuciones nutricionales que genera el consumo del alga a partir de análisis isotópicos, está permitiendo mejorar el entendimiento del modo de acción de estos aditivos. Sin embargo, aun son necesarios estudios para caracterizar productos activos, definir dosis óptimas, desarrollar productos de

actividad constante y definir formas optimas de aplicación; en especial el estudio de la variación estacional del contenido de los compuestos activos permitirá en el caso de la *Ulva clathrata* (producida por acuicultura) cosechar y procesar el alga de la forma más adecuada para explotar de manera más eficiente las propiedades funcionales de este aditivo en la producción de camarón.

Referencias

- Abdel-Wahhab MA, Ahmed HH, Hagazi MM. 2006. Prevention of aflatoxin B₁-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. *Journal of Applied Toxicology*, 26(3), 229-238. doi: 10.1002/jat.1127.
- Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J. G., Campa-Córdova, A. I., Luna-González, A., & Ascencio, F. (2009). Penaeid shrimp immune system. *Thai Journal of Veterinary and Medicine*, 39(3), 205–215.
- Bansemir A, Blume M, Schröder S, Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252(1), 79–84.
- Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvaille JA, Cuber JC, Plaisancie P. 2000. Mucin secretion is modulated by liminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 46: 218-224.
- Batista González A. E., Charles M. B., Mancini-Filho J., Vidal Novoa A. 2009. Las algas marinas como fuente de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 14: 2-4
- Berger, C. (2000) Aportes de la Biotecnología a la alimentación y a la inmunestimulación de camarones peneidos. Asociación Langostina Peruana (ALPE). 102- 110.
- Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakunpiriya V, Suprasert D. 2001. Effects of aflatoxin B₁ on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture Research*, 32, 388-398.
- Burford, M.A., Preston, N.P., Minh, T.H., Hoa, T.T.T., Bunn, S.E., Fry, V.M. (2004) Dominant sources of dietary carbon and nitrogen for shrimp reared in extensive rice-shrimp ponds. *Aquac. Res.* 35, 194-203.
- Cahu, C. (2000). Dietas para reproductores de camarón y su efecto en la calidad larvaria. In Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. Cruz-Suárez L.E. (Ed.), *Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18, 1998* (pp. 65–72). La Paz, B.C.S., México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., Aguirre-Guzmán, G., & Ascencio, F. (2005). Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a inmunostimulantes Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) expos. *Ciencias Marinas*, 31(4), 661–669.
- Campos Deloya M. T. (2012) Actividad antioxidante y bactericida contra Vibrios del extracto de *Ulva clathrata*. Tesis de licenciatura en Biología. 01/02/2013
- Carrillo L. 2003. Microbiología agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Salta: [\(http://www.unsa.edu.ar/matbib\)](http://www.unsa.edu.ar/matbib).(02 06 2008).
- Castro, R., Zarra, I., & Lamas, J. (2004). Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*, 229(1-4), 67–78. doi:10.1016/S0044-8486(03)00401-0

- Castro, R., Piazzon, M. C., Zarra, I., Leiro, J., Noya, M., & Lamas, J. (2006). Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture*, 254(1-4), 9–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.10.012
- Chakraborty K, Lipton AP, Paulraj R, Viajayan KK (2010) Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from south western coast of the Indian Peninsula. *Food Chem* 119: 1399-1408. 12.
- Chakraborty, K., Lipton, A. P., Paulraj, R., & Chakraborty, R. D. (2010). Guaiane sesquiterpenes from seaweed *Ulva fasciata* Delile and their antibacterial properties. *European journal of medicinal chemistry*, 45(6), 2237–44. doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.065
- Cheng, W., Liu, C.H., Yeh, S.T. & Chen, J.C. (2004). The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunology*, 17(1), 41-51.
- Chi, Z.-M., Liu, G., Zhao, S., Li, J., & Peng, Y. (2010). Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1227–41. doi:10.1007/s00253-010-2483-9
- Chiheb, I., Riadi, H., Martinez-Lopez, J., Dominguez-Seglar, J. F., Gomez-Vidal, J. A., Bouziane-Hassan, & Kadiri, M. (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 8(7), 1258–1262. Retrieved from <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/download/60101/48355>
- Christobel J.G., Lipton A.L., Aishwarya M.S., Sarika A.R. and Udayakumar A. 2011. Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of India. *Seaweed Res. Utiln.* 33: 67-75.
- Cruz-Suárez, L. E., *et al.*, (2009). Use of seaweeds for shrimp nutrition: status and potential, The Rising Tide: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming, The World Aquaculture Society. 131-141.
- Cruz Suarez L.E., Campos Deloya M.T., Oranday A., Rivas C., Ricque D., 2014. Vibriocidal activity of *Ulva clathrata* extracts. En preparación.
- Deachamag P., Intaraphad U., Phongdara A., Chotigeat W., 2006. Expression of a Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp *Aquaculture* 255: 165-172.
- DeNiro M.J., Epstein S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotope ratios in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495–506.
- DeNiro M.J., Epstein S. (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 341–351.
- Ehleringer, J.R., Rundel, P.W. (1989) Stable isotopes: History, units and instrumentation. In: Rundel, P.W., Ehleringer, J.R. and Nagy, K.A. (Eds) *Stable Isotopes in Ecological Research*. Springer- Verlag. New York. pp.1-16.
- El-Baky, H.H.A., El-Baz, F.K., Baroty, G.S.E. 2008. Evaluation of Marine Alga *Ulva lactuca* as A Source of Natural Preservative Ingredient. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 3 (3): 434-444.
- Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

- Felix, S., Robins, P. H., & Rajeev, A. (2004a). Pro-PO based assessment of eco-friendly immunostimulation in *Penaeus monodon* (H. Milne Edwards). *Indian J. Fish*, 51(4), 401–405.
- Felix, S., Robins, P. H., & Rajeev, A. (2004b). Immune enhancement assessment of dietary incorporated marine alga *Sargassum wightii* (Phaeophyceae / Punctariales) in tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea / Penaeidae) through prophenoloxidase (proPO) systems. *Indian Journal of Marine Sciences*, 33(December), 361–364.
- Fu, Y.W., Hou, W.Y., Yeh, S.T., Li, C.H., & Chen, J.C. (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 22(6), 673–85. doi:10.1016/j.fsi.2006.08.014
- Gamboa-Delgado J., Cañavate J.P., Zerolo R., Le Vay L. (2008) Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 280, 190-197.
- Gamboa-Delgado J. (2009) Application of natural stable isotopes in aquaculture nutrition. PhD Thesis. University of Wales-Bangor, UK. 180 pp.
- Gamboa-Delgado J., Le Vay L. (2009a) Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture* 291, 115-123.
- Gamboa-Delgado J., Le Vay L. (2009b) *Artemia* replacement in co-feeding regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon stable isotopes. *Aquaculture* 297, 128-135.
- Gamboa-Delgado, J., Peña-Rodríguez, A., Cruz-Suárez, L.E., Ricque, D. (2011). Direct assessment of the nutritional contribution of co-fed live macroalgae *Ulva clathrata* and artificial feed to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Shellfish Research*, Vol. 30, No. 3, 1–10.
- Ghaednia, B., Mehrabi, M. R., Mirbakhsh, M., Yeganeh, V., Hoseinkhezri, P., Garibi, G., & A, G. J. (2011). Effect of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fenneropenaeus indicus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(4), 616–630.
- Gopinath R, Raj RP. 2009. Histological alterations in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius (1798) given aflatoxin B-1-incorporated diets. *Aquaculture Research*, 40(11), 1235-1242. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02207.x
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4), 600–609. doi:10.1016/j.ifset.2011.07.004
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*. 29 (2): 345–350.

- Hayden, H. S., Blomster, J., Maggs, C. A., Silva, P. C., Stanhope, M. J., & Waaland, J. R. (2003). Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *European Journal of Phycology*, 38(3), 277–294. doi:10.1080/1364253031000136321
- Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol.* 2005 Sep;96(14):1613-23.
- Hose, J. E., Martin, G. G., & Gerard, A. S. (1990). A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin*, 178(1), 33. doi:10.2307/1541535
- Hou, W.Y. & Chen, J.C. 2005. The immunoestimulatory effect of the hot- water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 19(2), 127-138.
- Huang, X., Zhou, H., & Zhang, H. (2006). The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & shellfish immunology*, 20(5), 750–7. doi:10.1016/j.fsi.2005.09.008
- Immanuel, G., Vincybai, V., Sivaram, V., Palavesam, A, Marian, M. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236(1-4), 53–65.
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnan, S., & Palavesam, A. (2012). The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish & shellfish immunology*, 32(4), 551–64. doi:10.1016/j.fsi.2012.01.003
- Jomori R.K., Ducatti C., Carneiro D.J., Portella M.C. (2008) Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquaculture Research* 39, 370–381.
- Kabak B, Dobson AD, Var I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(8): 593–619.
- Kaeffer, B., Bernard, C., Lahaye, M., Blottiere, H. M. & Cherbut, C. (1999). Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. *Planta Med.* 65:527–31.
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 389–96. doi:10.1016/j.fsi.2010.11.016
- Kelman D, Posner EK, McDermid KJ, Tabandera NK, Wright PR, Wright AD. 2012. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Marine Drugs* 10(6): 403-416.
- Lahaye, M., & Robic, A. (2007). Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765–1774.

- Lahaye, M., Inizan, F., & Vigouroux, J. (1998). NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan–boron complex formation. *Carbohydrate Polymers*, 36, 239–249.
- Leiro, J. M., Castro, R., Arranz, J. a, & Lamas, J. (2007). Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International immunopharmacology*, 7(7), 879–88. doi:10.1016/j.intimp.2007.02.007
- Lightner DV, Redman RM, Price RL, Wiseman MO. 1982. Histopathology of aflatoxicosis in the marine shrimp *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(2), 279-291. doi: 10.1016/0022-2011(82)90127-6
- Lu K., Lin W. & Liu J. 2008. The characteristics of nutrient removal and inhibitory effect of *Ulva clathrata* on *Vibrio anguillarum* 65. *Journal of Applied Phycology*. 20: 1061-1068.
- Madhumathi, M. (2011). Antioxidant status of *Penaeus monodon* fed with *Dunaliella salina* supplemented diet and resistance against WSSV. *International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)*, 3(10), 7249–7259
- Manilal, A., Selvin, J., Sugathan, S., & Panikkar, M. V. N. (2012). Evaluation of therapeutic efficacy of indian green alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. AGARDH) in the treatment of vibriosis in *Penaeus monodon*, *Thalassas An International Journal of Marine Sciences*, 28(January), 33–46.
- Manoharan N, Sampathkumar P, Dheeba B, Sheikabdulla S, Vinothprasanna G. Vinothkannan R. Kalavathy S, Vijayaanand A, Shanmugasundaram A, 2008. Potential hepatoprotective effect of aqueous extract of *Gracilaria corticata* in AFB1 induced hepatotoxicity in Wistar Rats. *Journal of Biological Sciences* 8 (8): 1352-1355.
- McDermid, K. J., and Stuercke, B. (2003). Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 15(6), 513–524.
- Mercado-Mercado, G., Carrillo, L. de la R., Wall-Medrano, A., López Díaz, J. A., and Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición hospitalaria*, 28(1), 36–46. doi:10.3305/nh.2013.28.1.6298
- Michener, R.H., Schell, D.M. (1994) Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs In: Stable isotopes in ecology and environmental science. Chapter 7. Vol 1 (ed. by Lajtha, K. and Michener, R.H.) Blackwell scientific publications. Oxford, UK. 138-157 pp.
- Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, Van der Knap WPW, Mialhe E, Bachère E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191:89e107.
- Nunes, A.J.P., Gesteira, T.C.V., Goddard, S. (1997) Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 149, 121–136.
- Osman, M., Abu-Shady, A., & Elshobary, M. (2010). The seasonal fluctuation of the antimicrobial activity of some macroalgae collected from Alexandria coast, Egypt. *researchgate.net*. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/233726941_The_Seasonal_Fluctuation_of_the_Antimicrobi

[al Activity of Some Macroalgae Collected from Alexandria Coast Egypt/file/d912f50accd4b99b17.pdf](file/d912f50accd4b99b17.pdf)

- Paradossi, G., F. Cavalieri, L. Pizzoferrato and A.M. Liquori. 1999. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. *International Journal of Biological Macromolecules* 25:309-315.
- Peterson, B.J., Fry, B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 293-320.
- Priyadharshini, S., Bragadeeswaran, S., Prabhu, K., Ran, S. S. (2011). Antimicrobial and hemolytic activity of seaweed extracts *Ulva fasciata* (Delile 1813) from Mandapam, Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S38–S39
- Qi H. Zhang Q, Zhao T, Hu R, Zhang K and Li Z. 2006. *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioor Med Chem.* 16:2441-2445.
- Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z., Zhao, Z., Xing, R. (2006). Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 17(6), 527–534.
- Ringø, E., Erik Olsen, R., Gonzalez Vecino, J. L., & Wadsworth, S. (2011). Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: A Review. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 02(01), 1–22. doi:10.4172/2155-9910.1000104
- Rocha de Souza, M.C., C. Texeira-Masques, C.M. Guerra-Dore, F.R. Ferreira da Silva, H.A. Olivera-Rocha and E. Lisboa-Leite. (2007). Antioxidant activity of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 19: 153–160.
- Roseanu, A., Jecu, L., Badea, M., & Evans, R. W. (2010). Mycotoxins: An overview on their quantification methods. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47(1), 79-86.
- Ruperez, P., Ahrazem, O., Leal, A. (2002). Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 840–845.
- Sánchez Campos, L. N., Díaz, F., Licea, A., Re, A. D., Lizárraga, M. L., Flores, M., Tordoya Romero, C. (2010). Effect of hydrosoluble polysaccharides of *Macrocystis pyrifera* on physiological and metabolic responses of *Litopenaeus vannamei* infected with *Vibrio campbellii*. *Hidrobiologica*, 20(3), 246–255.
- Schlechtriem, C., Focken, U., Becker, K. (2004) Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. *Aquat. Ecol.* 38, 93-100.
- Schroeder, G.L. (1983) Sources of fish and prawn growth in polyculture ponds as indicated by $\delta^{13}\text{C}$ analysis. *Aquaculture* 35, 29–42.
- Selvin, J., Huxley, A. J., & Lipton, A. P. (2004). Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. *Aquaculture*, 230(1-4), 241–248.

- Selvin, J., & Lipton, A. P. (2004). Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea muscliformis* collected from the peninsular coast of India. *Journal of Marine Science and Technology*, 12(1), 1–6.
- Selvin, J., Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S., & Lipton, A. P. (2011). Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases Eficacia del extracto del alga marina verde *Ulva fasciata* sobre el manejo de las enfermedades bacterianas en camarones. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39(2), 197–204. doi:10.3856/vol39-issue2-fulltext-1
- Seo MJ, Choi HS, Lee OH, Lee BY, 2013. *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi, the edible red seaweed, inhibits lipid accumulation and reactive oxygen species production during differentiation in 3T3-L1 cells. *Phytother Res.* 7(5), 655-63. doi: 10.1002/ptr.4765.
- Shanab S. M. M. (2007) Antioxidant and antibiotic activities of some seaweed (Egyptian Isolates). *International J Agric & Biol.*2:220-5.
- Shen HM, Shi CY, Lee HP, Ong CN. 1994. Aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127:145–150.
- Shen HM, Ong CN, Shi CY. 1995. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B₁-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicology* 99:115–123.
- Shen HM, Shi CY, Shen Y, Ong CN. 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B₁. *Free Radical Biology and Medicine* 21:139–146.
- Silva M, Vieira L, Almeida AP, Kijjoa A. (2013). The marine macroalgae of the genus *Ulva*: chemistry, biological activities and potential plications. *Oceanography* 1: 101. doi:10.4172/ocn.1000101
- Silva, G. C., Albuquerque-Costa, R., Oliveira-Peixoto, J. R., Pessoa-Nascimento, F. E., Macedo-Carneiro, P. B. de, & Silva dis Fernandes-Vieira, R. H. (2013). Tropical Atlantic marine macroalgae with bioactivity against virulent and antibiotic resistant *Vibrio*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(1), 183–188.
- Sirirustananun, N., Chen, J.-C., Lin, Y.-C., Yeh, S.-T., Liou, C.-H., Chen, L.-L., Sim, S. S., *et al.* (2011). Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 31(6), 848–55. doi:10.1016/j.fsi.2011.07.025
- Smith, V. J., Brown, J. H., & Hauton, C. (2003). Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology*, 15(1), 71–90. doi:10.1016/S1050-4648(02)00140-7
- Sohal RS, Weindruch R. 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 273 (5271): 59–63.
- Tan, S. P., O’Sullivan, L., Prieto, M. L., Gardiner, G. E., Lawlor, P. G., Leonard, F., Duggan P., McLoughlin P., Hughes, H. (2011). Extraction and bioautographic-guided separation of antibacterial compounds from *Ulva lactuca*. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 513–523. doi:10.1007/s10811-011-9747-3.
- Tapia-Salazar M, García-Pérez OD, Velásquez-Soto RA, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos D, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2012. Growth, feed intake, survival, and histological response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing grains naturally contaminated with aflatoxin. *Cienc. Mar.* 38: 491–504.
- Cruz *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 553-598.

- Tayag, C. M., Lin, Y.-C., Li, C.-C., Liou, C.-H., & Chen, J.-C. (2010). Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 28(5-6), 764–73. doi:10.1016/j.fsi.2010.01.023
- Trigui, M., Gasmi, L., Zouari, I., & Tounsi, S. (2012). Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 319–328. doi:10.1007/s10811-012-9866-5
- Van der Zanden, M.J., Shuter, B.J., Lester N., Rasmussen. J.B. (1999) Patterns of food chain lengths in lakes: A stable isotope study. *Am. Nat.* 154, 406–416.
- Verschoor A.M., Boonstra H., Meijer T. (2005) Application of stable isotope tracers to studies of zooplankton feeding, using the rotifer *Brachionus calyciflorus* as an example. *Hydrobiologia*, 546, 535–5
- Wang L, Piao X L, Kim S W, Piao X S, Shen Y B, Lee H S.(2008). Effects of *Forsythia suspensa* extract on growth performance, nutrient digestibility, and antioxidant activities in broiler chickens under high ambient temperature. *Poultry Science*, 87, 1287-1294.
- Xue, Z., C.H. Xue, Z.J. Li, Y.P. Cai, H.Y. Liu and H.T. Qi. (2004). Antioxidant and hepatoprotective activities of low molecular weight sulfated polysaccharide from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology.*, 16: 111–5
- Yeh ST, Lee CS, Chen JC (2006) Administration of hot-power extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 20:332-345.
- Yildiz, G., Celikler, S., Vatan, O., Dere, S. (2012). Determination of the antioxidative capacity and bioactive compounds in green seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Journal of Food Properties*, 15(6), 1182–1189.
- Zubia, M., Robledo, D., & Freile-Pelegri, Y. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 449–458. doi:10.1007/s10811-006-9152-5