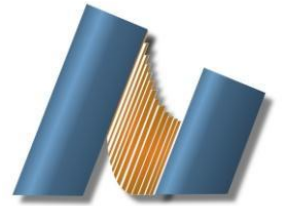




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA  
BIONANOTECNOLOGIA

ENCAPSULACIÓN DE TOCOFEROL EN NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO PARA INHIBIR EL  
ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CAMARÓN BLANCO, *LITOPENAEUS VANNAMEI*

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:  
CERVANTES MILLÁN JAZMÍN ELIZABETH

**DIRECTORA DE TESIS**  
DRA. MARÍA TERESA VIANA CASTRILLÓN

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA A DE 25 DE AGOSTO DE 2022.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

*Encapsulación de tocoferol en  
nanopartículas de quitosano para inhibir  
estrés oxidativo en el camarón blanco,  
**Litopenaeus vannamei***

*Tesis*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN NANOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

*Cervantes Millán Jazmín Elizabeth*

DIRECTORA DE TESIS

*Dra. María Teresa Viana Castrillón*

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.



Cervantes Millan Jazmin Elizabeth

*A mis padres, hermana y tía Aida*

*Los amo.*

# Agradecimientos

El presente trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de mi asesora, la doctora María Teresa Viana Castrillón, gracias a la oportunidad de trabajar con ella pude ampliar mi panorama respecto a las aplicaciones de la nanotecnología. Cabe destacar que mi asesora no solamente fue mi guía en el ámbito académico, sino que también me brindó apoyo emocional, ayudándome en momentos difíciles, y motivándome a continuar, llevándome a reforzar mi amor por la investigación científica.

Por otro lado el doctor Rafael Vázquez Duhalt fue uno de mis principales apoyos a lo largo de este proceso de elaboración de tesis, quien en ningún momento dudó en resolverme dudas, dar consejo, e inclusive facilitarme equipo, reactivos, o tiempo de laboratorio. Sabía que a pesar de su saturada agenda podía contar con él.

Cabe destacar el gran aporte de académicos y técnicos que me brindaron su tiempo para enseñarme nuevas técnicas, guía y consejo para mi proceso de elaboración y escritura de tesis, asimismo como facilitar recursos materiales para el proceso experimental del presente trabajo de tesis. Entre los técnicos y académicos del Centro de Nanociencias y Nanotecnología incluyen a la Dra. Katrin Quester, M. A. Itandehui Betanzo Gutiérrez y la Dra. Ana Rodríguez. Del Instituto de Investigaciones Oceanológicas al Dr. José Antonio Mata Sotres, al Dr. André Braga y quiero dar un especial agradecimiento a Aurora Anahí Tinajero Chávez por su paciencia y apoyo dentro del laboratorio.

El desarrollo académico va aderezado con experiencias de vida, diversión, amistad y amor, por lo que quiero agradecer a todos aquellos que estuvieron ahí y me apoyaron a lo largo de mi desarrollo en la educación superior, gracias a ustedes disfruté la experiencia universitaria. El laboratorio no hubiera sido lo mismo sin mi compañero Daniel Jurado, con quien he compartido toda clase de experiencias desde el servicio social hasta la tesis, mi gran amigo.

Finalmente quiero agradecer al Centro de Nanociencias y Nanotecnología, al laboratorio de bionanotecnología y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por los recursos, tiempo espacio y equipo, sin los cuales esta investigación no se hubiera podido llevar a cabo.

## Resumen

En el presente trabajo se evaluó el ingreso de nanopartículas de quitosano al hepatopáncreas de *L. vannamei*, asimismo como el efecto antioxidante de nanopartículas de quitosano (Ch-NPs) cargadas con tocoferol contra el estrés oxidativo agudo, en comparación con el efecto de tocoferol libre.

Para la evaluación de ingreso al tejido se realizó un ensayo en el cual se alimentaron camarones durante 7 días con dieta control y dieta con nanopartículas de quitosano con Isotiocianato de fluoresceína o FITC (NP-FITC), las cuales fueron sintetizadas por el método de gelación iónica. Las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas por espectroscopia de dispersión de luz dinámica (DLS); el diámetro hidrodinámico resultante fue de 500 nm. Posteriormente a las muestras obtenidas se les extrajo el hepatopáncreas, el cual fue observado por medio de microscopia de fluorescencia en filtros verde, azul y rojo. En el filtro rojo se encontró la presencia de Ch-NP-FITC en la sección de tejido de hepatopáncreas.

Finalmente se evaluó el efecto antioxidante de las Ch-NPs-Tc por medio de un ensayo donde los camarones alimentados con los distintos tratamientos fueron expuestos a un estrés agudo con peróxido de hidrógeno a una concentración de 0.2% durante dos horas. Los camarones fueron se alimentaron durante dos semanas con dietas con tocoferol libre (Tc), NPs vacías, NP con tocoferol a concentración baja (Ch-NPs-bTc) y NP con tocoferol a concentración alta (Ch-NPs-aTc). Las nanopartículas fueron sintetizadas por gelación iónica. Por medio de DLS se encontró un diámetro hidrodinámico promedio de 264.1 nm y se midió el potencial zeta, obteniendo 35.4 mV, valor que representa nanopartículas estables.

Se midió la expresión de genes *cat*, *sod*, *gst* y *gpx* para evaluar el estrés oxidativo, de lo que se obtuvo diferencia significativa en los genes *cat*, *gst* y *gpx*, los cuales codifican para enzimas que actúan directamente sobre peróxido. De este estudio se concluye que las nanopartículas cargadas con tocoferol protegen a los camarones del estrés oxidativo al ser expuestos a un estrés agudo.

## Abstract

In the present work, the internalization of chitosan nanoparticles into the hepatopancreas of *L. vannamei* was evaluated, and the antioxidant effect of chitosan nanoparticles (NPs) loaded with tocopherol against acute oxidative stress was determined and compared to these obtained with free tocopherol.

The tissue internalization of NPs was evaluated. Therefore, a seven-day trial was carried out in which shrimp were fed with a control diet and a diet containing chitosan nanoparticles labeled with fluorescein isothiocyanate, FITC (Ch-NP-FITC), which were synthesized by the ionic gelation method. The synthesized nanoparticles were characterized by dynamic light scattering spectroscopy (DLS); the resulting hydrodynamic diameter was 500 nm. Subsequently, the hepatopancreas was extracted from the samples obtained, which were observed by fluorescence microscopy in green, blue, and red filters. In the red filter, the presence of Ch-NP-FITC was found in the hepatopancreas tissue section.

Finally, the antioxidant effect of the NPs was evaluated utilizing a test where the shrimp were exposed to acute stress with hydrogen peroxide at a concentration of 0.2% for two hours. Shrimp were fed for two weeks with diets containing free tocopherol (Tc), empty Ch-NPs, low-tocopherol NPs (Ch-NPs-bTc) and high-tocopherol NPs (Ch-NPs-aTc). The nanoparticles were synthesized by ionic gelation. Through DLS, an average hydrodynamic diameter of 264.1 nm was found, and the zeta potential was measured, obtaining 35.4 mV, a value representing stable nanoparticles.

The expression of *cat*, *sod*, *gst*, and *gpx* genes was measured to evaluate oxidative stress, from which a significant difference was obtained in the *cat*, *gst* and *gpx* genes, which code for enzymes that act directly on peroxide. From this study, it was concluded that nanoparticles protect shrimp from oxidative stress when exposed to acute stress.



# Contenido

Agradecimientos.....	i
Resumen .....	ii
Lista de figuras .....	vi
Lista de tablas .....	vii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	5
3. Marco teórico.....	7
3.1 <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	7
3.2 Especies reactivas de oxígeno .....	13
3.3 Nanopartículas de quitosano .....	17
3.4 Espectroscopia de dispersión dinámica de luz .....	18
3.5 Microscopía de fluorescencia.....	22
4. Hipótesis .....	25
5. Objetivos.....	25
5.1 Objetivos específicos.....	25
6. Metodología.....	26
6.1 Ensayo preliminar de absorción de nanopartículas en tejido .....	26
6.1.1 Encapsulado de fluoresceína 5 isotiocianato (FITC) en nanopartículas de quitosano.....	26
6.1.2 Caracterización de nanopartículas .....	27
6.1.3 Elaboración de dietas.....	28
6.1.4 Ensayo <i>in vivo</i> .....	30
6.2 Ensayo de estrés oxidativo .....	32
6.2.1 Encapsulado de tocoferol en nanopartículas de quitosano .....	32

6.2.2	Elaboración de dietas.....	34
6.2.3	Ensayo de alimentación con camarones e inducción al estrés oxidativo. ....	34
6.3	Análisis bioquímico de hemolinfa.....	35
6.4	Monitoreo de expresión de genes relacionados con la respuesta a especies reactivas de oxígeno. ....	36
7.	Resultados.....	38
8.	Discusión .....	48
9.	Conclusiones.....	55
	Anexos .....	57
	Anexo 1-A .....	57
	Anexo 1-B .....	58
	Anexo 2-A .....	59
	Anexo 2-B .....	60
	Anexo 2-C .....	61
	Anexo 2-D .....	62
	Referencias .....	63

## Lista de figuras

Figura 3.1. Diagrama de anatomía interna y externa de un camarón peneido.....	8
Figura 3.2. Ubicación de branquias en <i>L. vannamei</i> .....	11
Figura 3.3. Especies reactivas de oxígeno .....	14
Figura 3.4. Diagrama de defensa antioxidante enzimática.....	15
Figura 3.5. Estructura de quitosano.....	17
Figura 3.6. Fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo y sus respectivas funciones de correlación [G(t)].....	20
Figura 3.7. Configuraciones ópticas para mediciones dinámicas de dispersión de luz...21	
Figura 3.8. Reacción de Biuret.....	24
Figura 6.1. Homogeneización de dieta.....	28
Figura 6.2. Tiras resultantes de la extrusión con jeringa sobre una charola plana.....	29
Figura 6.3. Sistema de recirculación.....	30
Figura 6.4. Camarón cortado longitudinalmente.....	32
Figura 7.1. Vial con Ch-NPs-FITC.....	38
Figura 7.2. Pellets de dieta control.....	39
Figura 7.3. Camarón alimentado con dieta control, observado a 492 nm.....	40
Figura 7.4. Microscopía de fluorescencia de los cortes de hepatopáncreas de camarones colectados.....	41
Figura 7.5. Vial con Ch-NPs- $\alpha$ -tocoferol.....	42
Figura 7.6. Muestras de camarón de con diferentes tratamientos.....	43
Figura 7.7. Muestra de camarón tratado con nanopartículas Ch-NP- $\alpha$ -tocoferol de concentración 2.....	44
Figura 7.8 Resultados de análisis bioquímico en hemolinfa extraída.....	46
Figura 7.9. Resultados de expresión promedio de genes característicos del estrés oxidativo.....	47

## **Lista de tablas**

<b>Tabla 3.1. Parámetros fisicoquímicos.....</b>	<b>10</b>
<b>Tabla 3.2. Vida media de algunas especies reactivas de oxígeno.....</b>	<b>14</b>
<b>Tabla 6.1. Primers o sondas utilizadas para RT-PCR, tamaño de amplicón en pares de bases (bp) y eficiencias de reacción (E).....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 7.1 Índice hepatosomático.....</b>	<b>45</b>

# 1. Introducción

La población mundial se encuentra en un constante aumento, al igual que la demanda de alimento, lo que impulsa a la industria alimenticia a innovar y optimizar los procesos de producción. El aumento en la demanda de alimentos se ha visto reflejado en el crecimiento exponencial de la producción acuícola global desde el año 2000. Según datos proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura o FAO por sus siglas en inglés, el cultivo de camarón es uno de los sectores de la acuicultura con mayor crecimiento en Asia y Latinoamérica, en donde México destaca entre los productores (Food and Agriculture Organization, 2009).

En México, esta actividad se incrementó mayormente en Guaymas, Sonora en la segunda mitad de la década de los 80s. Gracias a experimentaciones realizadas por la Universidad de Sonora, surgieron los cultivos comerciales. Posteriormente, estas prácticas se expandieron por la República Mexicana, incrementando la producción, así como la investigación biotecnológica de estos organismos (Instituto Nacional de Pesca, 2018).

El sector pesquero representa el 5% del PIB proveniente de las actividades agropecuarias. Si bien aún no es un sector económicamente importante, en comparación al sector agropecuario, constituye una de las opciones más viables de crecimiento sostenible. El cual ha tenido una tasa promedio de incremento del 6.8% desde 1990 (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura, 2009). Los principales Estados productores de camarón blanco en México están en la zona noroeste del país, representados por Sonora y Sinaloa (Instituto Nacional de Pesca, 2018).

El camarón blanco, aparte de ser nativo de las costas del Pacífico mexicano, es un organismo abundante en México, con un buen crecimiento, y resistente a muchas enfermedades, en comparación a otros organismos marinos. Sin embargo, en condiciones cultivo no óptimas, que ocasione estrés, tales como: cambios en la temperatura o salinidad del agua, así mismo como la presencia de elementos externos tales como contaminantes o altas densidades; los camarones pueden sufrir estrés oxidativo, perder su estado de homeostasis y producirles daño celular (Liang et al., 2016). El estrés oxidativo ocurre cuando existe un desequilibrio celular, donde hay un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) o radicales libres. Estos ROS son moléculas altamente reactivas que producen daño celular al captar electrones de otras moléculas, produciendo una reacción en cadena (Santos et al., 2009). Sin embargo, se ha observado una mayor resistencia al estrés oxidativo de organismos acuáticos al mejorar la calidad de dieta de éstos así como las condiciones de cultivo (Zhang et al., 2012).

Una forma de contrarrestar el efecto de las ROS, son los antioxidantes. Entre los antioxidantes biológicos más importantes se encuentran las enzimas que fungen como defensa natural, las más relevantes son catalasa, superóxido dismutasa, superóxido dismutasa, por mencionar algunas. Las enzimas son parte de un sistema de autodefensa endógeno de las células, sin embargo existen otros antioxidantes que deben de ser ingeridos a través de los alimentos, tales como las vitaminas C y E (esta última conocida como  $\alpha$ -tocoferol). La vitamina E es uno de los antioxidantes más abundantes en la naturaleza, y es ampliamente utilizado en dietas para el camarón blanco (Pal-Yu, 1994). Sin embargo, la vida media de dichos antioxidantes dentro de los alimentos es corta, ya que también se exponen a ser oxidados por factores externos, entre ellos, almacenamiento del alimento, o bien durante la producción de la misma neutralizándose con los ingredientes mismos. Por lo tanto, es

importante poder protegerlos para que cumplan su función. Ésto puede complicarse, ya que por lo general, el alimento puede ser almacenado por tiempos prolongados, o bien, viajar distancias largas sufriendo cambios de temperatura, o humedad resultando en su oxidación. Además de que los cambios antes mencionados pueden representar condiciones idóneas para el crecimiento bacteriano, lo que puede llevar a la destrucción de los antioxidantes, entre otros componentes nutricionales.

Una propuesta para solucionar esta problemática es el uso de nanovehículos para la protección y administración de moléculas de interés. Dentro de los nanovehículos más comunes se encuentran las nanopartículas poliméricas. Éstas son muy variadas, sin embargo para aplicaciones en sistemas biológicos las nanopartículas de quitosano (Ch-NPs) son de las más utilizadas debido a que tiene propiedades que le brindan una gran biocompatibilidad y biodegradabilidad (Racovita et al., 2009).

En el presente trabajo, con el fin de conocer si las nanopartículas de quitosano pueden utilizarse como vehículo de moléculas al ser absorbidas y transportadas dentro del camarón, se utilizó un antioxidante que pudiera ser monitoreado.

Primeramente, para corroborar si las nanopartículas de quitosano eran capaces de ingresar al organismo. Se realizó un estudio previo en donde las nanopartículas de quitosano fueron acopladas con isotiocianato de fluoresceína (FITC), y fueron identificadas por medio del uso de microscopía de fluorescencia en el hepatopáncreas de los organismos alimentados durante 7 días.

Posterior a ésto, se realizó la encapsulación del antioxidante  $\alpha$ -tocoferol en nanopartículas de quitosano. Las nanopartículas fueron sintetizadas por el método de gelación iónica y caracterizadas por medio de dispersión dinámica de la luz para conocer su tamaño y carga

superficial (potencial zeta). Con el fin de confirmar si las nanopartículas fueron capaces de penetrar y proteger el  $\alpha$ -tocoferol, se realizó un ensayo de alimentación (15 días) con cuatro dietas, dos con diferentes concentraciones de nanopartículas con  $\alpha$ -tocoferol; otra con nanopartículas vacías (control ) y la cuarta como referencia, se utilizó el  $\alpha$ -tocoferol libre.

Finalmente se evaluó la acción antioxidante de las nanopartículas de quitosano con tocoferol de los camarones alimentados con las cuatro dietas. Al término de la alimentación, se indujo un estrés oxidativo sometiendo a los camarones en una solución conteniendo peróxido de hidrógeno (0.2%) durante dos horas. Posterior a esto los camarones se sacrificaron y el hepatopáncreas se utilizó para medir la expresión de genes que codifican para enzimas típicas del estrés oxidativo tales como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión s-transferasa y glutatión peroxidasa.



## 2. Antecedentes

El camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, es de gran importancia económica. Se cultiva de manera intensiva y extensiva, en ambos casos utilizando alimento comercial formulado. Al ser un organismo de relevancia económica, uno de los principales objetivos es minimizar la merma del producto maximizando el crecimiento. Sin embargo, los camarones en cultivo se pueden ver expuestos a estrés oxidativo por diferentes factores externos. Diferentes autores, han reportado estrés oxidativo en camarones peneidos al ser expuestos a intervalos inadecuados de pH (Wang et al., 2009), altas o bajas temperaturas (Zhou et al., 2010), contaminantes así como por condiciones de hipoxia (Xu et al., 2018).

Para prevenir o reducir el efecto del estrés oxidativo se adicionan agentes antioxidantes a la dieta de los camarones. Aún a pesar de que los camarones peneidos sintetizan sus propios antioxidantes, ya que cuentan con estrategias primarias de defensa, tanto enzimáticas como no enzimáticas. Sin embargo, Kanazawa (1985) reportó que el camarón tiene una capacidad limitada para sintetizar isoprenoides necesarios para la biosíntesis de biomoléculas como el tocoferol, por lo que entonces dependen de su suministro en la dieta. Liu et al. (2007) estimaron en 99 mg de  $\alpha$ -tocoferol por Kg de alimento, el requerimiento óptimo en la dieta de *L. vannamei* para así asegurar un crecimiento adecuado de los organismos. Por otro lado, dichos autores (Liu et al., 2007), compararon el efecto antioxidante entre dos concentraciones diferentes de  $\alpha$ -tocoferol, concluyendo que no había diferencia significativa entre ambas (600 y 100 mg). Adicionalmente se ha encontrado que la cantidad necesaria de éstos antioxidantes dependerá de la concentración de compuestos oxidados en la dieta, o bien del estrés asociado a la producción, que como se dijo

anteriormente, dependerá de la calidad de los mismos y el tiempo de almacenamiento de las dietas así como de las condiciones de cultivo.

La liberación de fármacos es una tecnología que ha despertado gran interés en la bionanotecnología debido a la posibilidad de obtener terapias dirigidas. Es así que se pueda controlar su liberación, además de mantener su protección contra el medio exterior. Los polímeros han jugado un papel muy relevante en el transporte de fármacos, por medio del diseño de nanopartículas poliméricas. De los polímeros más utilizados para aplicaciones biológicas (debido a una alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, permeabilidad, y propiedades catiónicas, entre otras), se encuentra el quitosano. Método de encapsulación de nanopartículas de quitosano (Ch-NPs) que se realiza por gelación iónica, el cual fue desarrollado por Calvo et al. (1997).

Para ensayos de localización de nanopartículas en diferentes tejidos de organismos se ha recurrido al diseño de nanopartículas fluorescentes. En 2018, el grupo de Vazquez-Duhalt (Koyani et al., 2018) realizó el encapsulamiento de proteína verde fluorescente (GFP), mejorando el encapsulado por medio de la modificación de superficies. Las modificaciones realizadas resultaron en un incremento en las interacciones electrostáticas entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxilo de la proteína. Como resultado, se obtuvieron nanopartículas de quitosano con proteína verde fluorescente (Ch-NPs-GFP) con un diámetro promedio de 18 nm, sin observar cambios morfológicos.

Desde 2019 existen reportes de síntesis de nanopartículas de quitosano con actividad antioxidante (Yan et al., 2019). En donde dichos autores encapsularon las nanopartículas de quitosano con  $\alpha$ -tocoferol, utilizando un protocolo similar al descrito por Calvo et al. (1997) con algunas modificaciones.

### 3. Marco teórico

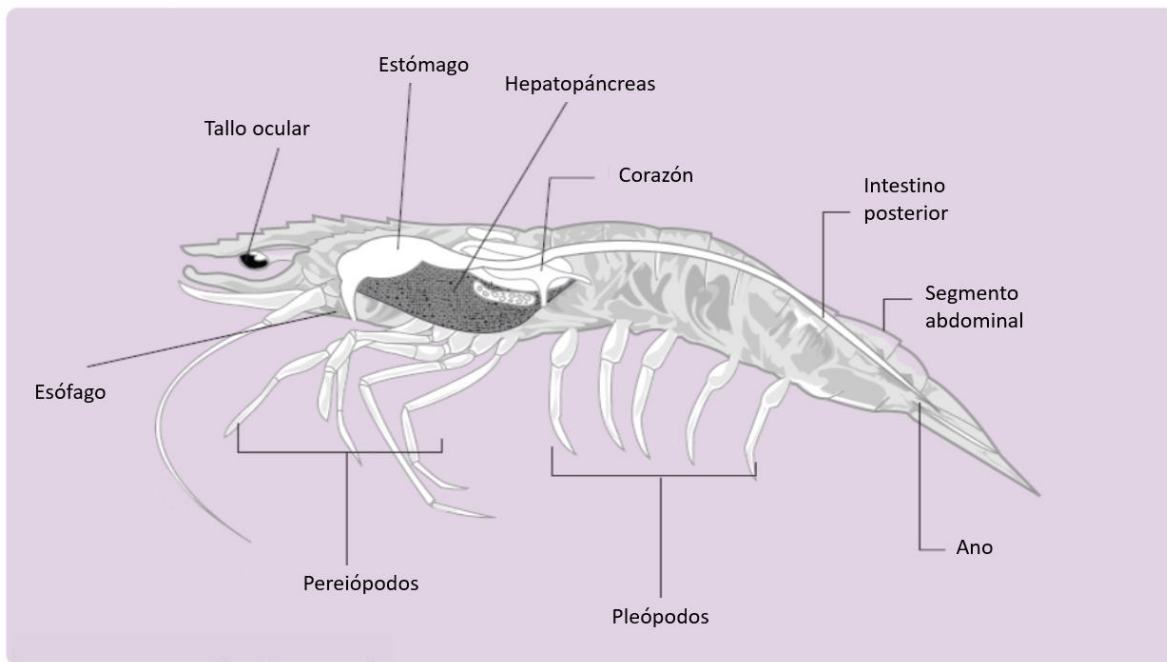
#### 3.1 *Litopenaeus vannamei*

*Litopenaeus vannamei* o también conocido como camarón blanco del Pacífico, es un crustáceo que pertenece a la familia Penaeidae, la cual incluye el 95% de las especies de valor comercial. Los camarones peneidos se caracterizan exteriormente por tener un rostrum bien desarrollado y dentado que se extiende hasta o más allá del borde distal de los ojos. Cuentan con caparazón sin espinas postorbitales y con surcos cervicales cortos, sus últimos 2 pares de pereiópodos bien desarrollados; tercer y cuarto pares de pleópodos birrames (Tavares, 2002).

La *figura 3.1* muestra la anatomía externa e interna de un camarón peneido, en donde se observan elementos importantes del sistema gástrico. El tracto digestivo de *L.vannamei* se divide en tres secciones: intestino anterior, medio y posterior. Primeramente el intestino anterior comienza desde la boca, y termina en el estómago (esófago). El estómago, se divide en dos partes: cámara anterior y la posterior. La cámara anterior sirve como molleja o buche, mientras que la posterior actúa como un tamiz. Aquí las partículas (<1 µg), tanto líquidas como sólidas, pasan hacia la dirección ventral, al hepatopáncreas. Mientras que las partículas más grandes son dirigidas al intestino medio. Éste a su vez, se extiende desde el estómago en el cefalotórax hasta la parte posterior en el sexto segmento del abdomen (pleón). En resumen, esta sección del tracto digestivo está compuesta por el ciego del intestino medio anterior, el medio posterior, el hepatopáncreas (glándula digestiva) y el intestino. El hepatopáncreas cubre una gran parte del cefalotórax y es la glándula digestiva maestra. Las funciones principales de esta glándula son la síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción de nutrientes, metabolismo de lípidos y carbohidratos y absorción de calcio. Finalmente el

alimento pasa por el intestino posterior, que es la parte terminal del tracto digestivo de los camarones, para finalmente excretar el material sobrante a través de la cavidad anal. (Dugassa & Gaetan, 2018).

A)



B)



**Figura 3.1. A) Diagrama de anatomía interna y externa de un camarón peneido. Imagen adaptada y traducida de (FAO, 2001) B) Fotografía de *Litopenaeus vannamei* tomada en Acuario Mazatlán.**

El camarón blanco es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico desde Sonora, México hasta Perú. Habitan de forma natural en sistemas marinos con aguas de 20°C en promedio anual. Los adultos viven en ambientes marinos tropicales y subtropicales con fondos arenosos, mientras que las postlarvas pasan la etapa juvenil y pre-adulta en estuarios y lagunas costeras (Instituto Nacional de Pesca, 2018).

Los camarones peneidos son organismos muy utilizados en el cultivo debido a que presentan características muy favorables, como: ciclo de vida corto, alta fecundidad, baja tasa de mortalidad en el cultivo, crecimiento rápido, respuesta positiva a la suplementación alimenticia, resistencia a cambios ambientales y alto valor comercial.

Por otro lado, estos organismos, al ser osmoconformadores o bien osmoreguladores eurihalinos, toleran altos intervalos de salinidad, entre 2 a 40 unidades prácticas de salinidad (ups) con un óptimo de 35 ups (*ver Tabla 3.1*). Para su cultivo se consideran parámetros físicoquímicos idóneos, con el objetivo de reducir riesgos en la producción y disminuir la incidencia de enfermedades.

**Tabla 3.1. Parámetros fisicoquímicos. Tabla adaptada con información del Instituto Nacional de Pesca (2018).**

<b>Parámetro</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Promedio</b>
Temperatura [°C]	20	35	28
Salinidad [ups]	5	40	35
Oxígeno disuelto [mg/l]	4	10	6
<b>Parámetro</b>	<b>Rangos</b>		
pH	7 a 9		
Nitrito [mg/l]	<0.1		
Nitrato [mg/l]	0.4 a 0.8		
Amonio [mg/l]	0.1 a 1		
Turbidez [cm]	35 a 45		
Alcalinidad [mg/l]	100 a 140		

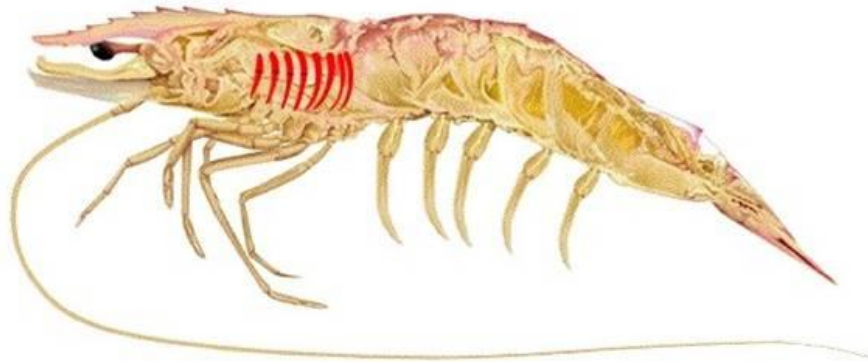
Los crustáceos, como todas las especies de artrópodos, poseen un esqueleto exterior, el cual debe ser cambiado para permitir su crecimiento. Este cambio, o muda, se vuelve cíclico y su frecuencia dependerá de la velocidad de crecimiento. Durante este proceso, el organismo, además de requerir una considerable cantidad de energía, presenta periodos de alimentación y ayuno dependiendo del estadio en el que se encuentre. Debido a la pérdida del exoesqueleto, los organismos pierden la capacidad de manipular e ingerir alimento por periodos de hasta 120 h (Heales et al., 1996).

### **3.1.1 Fisiología de branqueas**

El camarón respira por medio de las branquias, sin embargo para llevar a cabo la respiración se apoya también del recubrimiento de la branquiostega y de los epipoditos, los cuales se encuentran encerrados dentro la cámara branquial, situada a un costado del cefalotórax. Las branquias son sacos alargados de epitelio simple plano, por donde circula la

sangre en sentido opuesto a la del agua, para permitir los intercambios gaseosos medio-ejemplar efectuándose la respiración.

El intercambio respiratorio en el camarón se realiza al pasar el agua de mar por las branquias, las cuales se encuentran en las cámaras branquiales entre las branquiostegas y la pared del cuerpo. En la porción delantera de cada cámara se inicia un canal, en el cual el escafnatito de la segunda maxila se mueve hacia atrás y hacia adelante, provocando la salida del agua por la porción trasera de dicho canal (Raymond, Lucu, Onken, & Weihrauch, 2012).



**Figura 3.2. Ubicación de branquias en *L. vannamei*.**

### **3.1.2 Transporte de membrana de peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es un catalizador químico de amplio espectro con propiedades tanto reductoras como oxidantes. En los sistemas biológicos, el  $H_2O_2$  se conoce desde hace mucho tiempo como una especie reactiva del oxígeno (ROS) con el potencial de dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El peróxido de hidrógeno pertenece al grupo no radical de las ROS con un número de oxidación intermedio y se puede convertir en otras ROS más reactivas por varios medios, incluidas las enzimas. El  $H_2O_2$  es relativamente estable

*in vivo* en comparación con otras moléculas de ROS. La vida media del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los linfocitos es de 1 ms, mientras que la del superóxido (O<sup>2-</sup>) es de 1 μs.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un componente celular vital con diversas tareas en el desarrollo, el metabolismo y la homeostasis. En los sistemas biológicos, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debe ser tan antiguo como la aparición del metabolismo aeróbico. Dado que las concentraciones elevadas son tóxicas para una amplia gama de macromoléculas, la captación o eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debe haberse desarrollado temprano en la evolución.

La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una célula se define por el flujo de entrada y la formación intracelular, así como por la eliminación y el flujo de salida. A menudo se ha creído que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atraviesa libremente las membranas, una explicación adecuada para explicar varios hechos fisiológicos. Contrariamente a esto, estudios recientes señalan que algunas membranas son poco permeables al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto implica que el transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede estar regulado y que esta regulación constituye un factor importante en la determinación de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular. Estas diferencias en la permeabilidad podrían explicarse por cambios en las composiciones de lípidos de la membrana o por proteínas del canal que facilitan la difusión o una combinación de ambos (Bienert, Schjoerring, & Jahn, 2006).



## 3.2 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) o también llamados radicales libres, son moléculas altamente reactivas que causan daño a las células de los organismos. Las ROS pueden formarse a partir del metabolismo de oxígeno, en la cadena de transporte de electrones, en donde las ROS se forman como intermediarios (Li, et al., 2016).

En términos orbitales de electrones, un radical libre es una molécula o un átomo con un electrón desapareado en su órbita externa. Por definición, el oxígeno molecular en sí es birradical, ya que posee dos electrones no apareados, cada uno situado en un orbital  $\pi$  diferente. Cuando el oxígeno oxida otra molécula al aceptar un par de electrones, éstos deben alinearse con espín paralelo. Esta situación desfavorable obliga a la transferencia de electrones de otras moléculas o átomos a ser espines antiparalelos. La restricción de giro parece ventajosa para los organismos aeróbicos porque ralentiza las reacciones de oxígeno. Sin embargo, crea una situación en la que puede ocurrir una transferencia de un electrón, permitiendo la formación de una molécula o un átomo con un electrón no apareado, un radical libre.

La ruta principal habitual para el metabolismo del oxígeno molecular implica su reducción completa a  $H_2O$  al aceptar cuatro electrones. Sin embargo, con la reducción de un electrón, se pueden formar varios radicales libres y  $H_2O_2$ , como se muestra en la *Figura 3.2*.

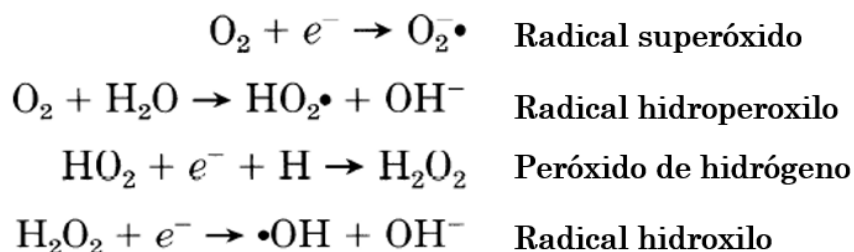


Figura 3.3. Especies reactivas de oxígeno (Imagen tomada de Pal-Yu, 1994).

La alta reactividad de las ROS se puede demostrar al observar la vida corta que tienen, como se muestra en la *Tabla 3.2*. Esta alta reactividad se debe a la inestabilidad de la configuración electrónica de los radicales, los cuales extraen fácilmente electrones de otras moléculas con las que colisionan, que a su vez esta molécula oxidada se convierte en un radical libre capaz de reaccionar. Por tanto, se propaga una reacción en cadena (Pal-Yu, 1994).

Tabla 3.2. Vida media de algunas especies reactivas de oxígeno.

Especie	Vida media a 37 C [s]
Superóxido	$1 \times 10^{-6}$
Hidroxilo	$1 \times 10^{-9}$
Alcoxilo	$1 \times 10^{-6}$
Peroxilo	$1 \times 10^{-2}$
Oxígeno atómico	$1 \times 10^{-6}$
Oxígeno molecular	$> 10^2$

Existe una extensa variedad de ROS, sin embargo, en los sistemas biológicos son limitadas, siendo las más relevantes el anión superóxido, radical hidroxilo, radical peróxido, radical perhidroxilo, radical alcoxilo, peróxido de hidrógeno y oxígeno atómico.

### 3.2.1 Defensa antioxidante

La línea de defensa de la célula ante las ROS se llaman antioxidantes, también llamados captadores de radicales libres, terminadores de cadena o simplemente reductores. Para proporcionar la máxima protección, las células contienen una variedad de sustancias capaces de eliminar muchas especies diferentes de radicales libres, incluidos los peróxidos lipídicos y los radicales libres orgánicos centrados en el carbono. Estos antioxidantes están estratégicamente compartimentados en los organelos. Los antioxidantes extracelulares biológicos más importantes son glutatión, vitamina E, urato, glutatión peroxidasa (gpx), superóxido dismutasa (sod), catalasa (cat), ceruplasmina y transferrina (Pal-Yu, 1994).

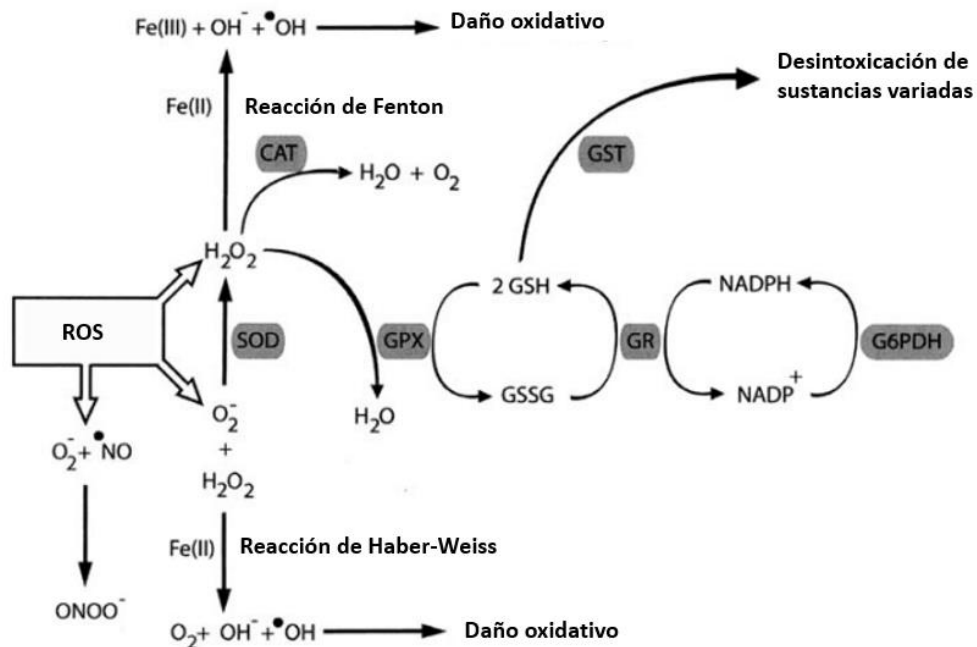


Figura 3.4. Diagrama de defensa antioxidante enzimática, sod, cat, gst, gr, g6pdh corresponden a superóxido dismutasa, catalasa, glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glucosa S- fosfato reductasa. Imagen adaptada de Hermes-Lima, 2005.

### **3.2.2 $\alpha$ -tocoferol**

La vitamina E es un antioxidante ampliamente distribuido en la naturaleza y se puede encontrar en el reino animal y vegetal. El término vitamina E se refiere a una amplia familia de isómeros estructurales de tocoferol, donde el  $\alpha$ -tocoferol es el que ha mostrado la mayor actividad antioxidante (Li et al., 2016). DL-  $\alpha$ -tocoferil acetato es una forma estable del  $\alpha$ -tocoferol, y es la forma más utilizada en alimentación animal. Tras la hidrólisis de este éster,  $\alpha$ -tocoferol se absorbe del intestino junto con las grasas de la dieta. Como antioxidante liposoluble, una función principal de la vitamina E es prevenir la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos y colesterol en las membranas celulares y de organelos. Muchas de las deficiencias encontradas en peces, así como crustáceos, tales como degeneración del hígado, anemia, hemolisis de eritrocitos, hemorragias, reducción de la fertilidad, etc., están relacionadas con el daño provocado a la membrana celular por la peroxidación (He & Lawrence, 1993).

### **3.2.3 Daño celular de ROS**

Durante la respiración, aproximadamente 0.1-0.2% del oxígeno consumido por las células aeróbicas se convierte en ROS que son esenciales para la función normal de las células, como la señalización redox y la resistencia a los patógenos. Sin embargo, en exceso resulta en daño celular (Li et al., 2016). El equilibrio entre la generación y la eliminación de ROS proporciona un estado de homeostasis en el organismo. Sin embargo, en organismos marinos algunos factores ambientales, como el oxígeno disuelto (OD) (Zenteno et al., 2006), temperatura (Qiu et al., 2011), pH (Wang et al., 2009), salinidad (Liu et al., 2007), amoníaco

(Hegazi et al., 2010), metales pesados (Zhang et al., 2012) y la presencia de patógenos (virus y bacterias, entre otros) pueden romper la homeostasis y provocar daño celular.

### 3.3 Nanopartículas de quitosano

El quitosano, derivado de la quitina, es un biopolímero muy utilizado para aplicaciones biotecnológicas como el transporte de fármacos en forma de nanopartículas. Posee características como, alta biodegradabilidad, baja toxicidad buena biocompatibilidad, control de la liberación de agentes activos, producción sin solventes peligrosos, entre otros (Racovita et al., 2009; Buyuk et al., 2020). Este polímero se obtiene por la desacetilación alcalina de quitina, un polisacárido proveniente del exoesqueleto de crustáceos como camarón, cangrejo, langosta, entre otros (Kashappa-Goud, 2016). Después de la desacetilación se obtiene un copolímero compuesto por unidades de N-acetil-d-glucosamina y d-glucosamina como se observa en la *figura 3.3* (Yoksan et al., 2010).

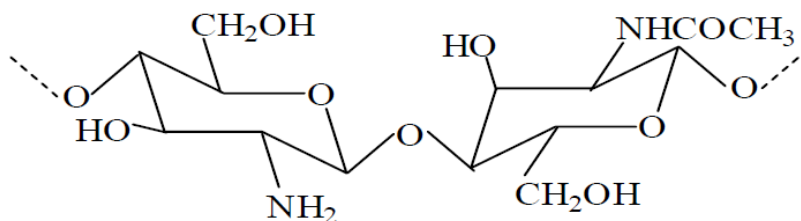


Figura 3.5. Estructura de quitosano (Imagen adaptada de Racovita et al., 2009).

#### 3.3.1 Gelación iónica

El método más común para sintetizar nanopartículas de quitosano es por medio del proceso de gelación iónica desarrollado por Calvo et al. (1997). Este método permite a las nanopartículas de quitosano (QNP) tener alta afinidad a membranas cargadas negativamente

y a moléculas diana específicas. En la gelación iónica se realiza el entrecruzamiento de grupos amino libres en la estructura, lo cual se da gracias a las propiedades catiónicas del quitosano en medio ácido. Para este método, se utilizan agentes entrecruzadores, en donde el de tripolifosfato de sodio (TPP) es el más utilizado (Buyuk et al., 2020). Esta técnica de gelación iónica se basa en las interacciones iónicas entre los grupos amino cargados positivamente del quitosano y los grupos cargados negativamente del polianión TPP. Este proceso de entrecruzamiento físico no sólo evita el uso de agentes de entrecruzamiento químicos y agentes emulsionantes que a menudo son tóxicos para los organismos, sino que también evita la posibilidad de daños a los fármacos (carga) y particularmente a los agentes biológicos (Fan et al., 2011).

### **3.4 Espectroscopia de dispersión dinámica de luz**

Una técnica utilizada para medir el tamaño de partículas menores al orden de los micrómetros es la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) o también es llamada espectroscopía de correlación de fotones o dispersión cuasi-elástica de la luz. Esta técnica mide la radiación electromagnética emitida por las moléculas después de ser sometidas a una iluminación por rayos de una determinada longitud de onda. En donde, posteriormente se realiza el cálculo del coeficiente de difusión, en donde se utilizan filtros apropiados para calcular su intensidad.

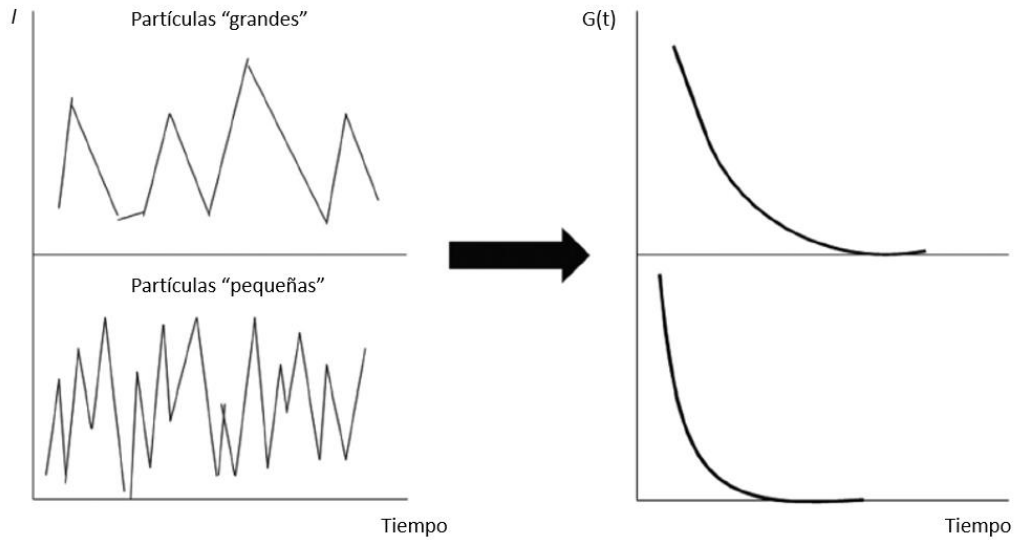
El movimiento browniano es el movimiento de partículas causado por colisiones aleatorias con moléculas de líquido en su entorno. Una característica importante del movimiento browniano con respecto a la técnica DLS es que las partículas pequeñas se mueven más rápido que las grandes. En otras palabras, el coeficiente de difusión traslacional

(D) de las partículas está inversamente relacionado con su tamaño, como lo muestra la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

Ec. 3.1

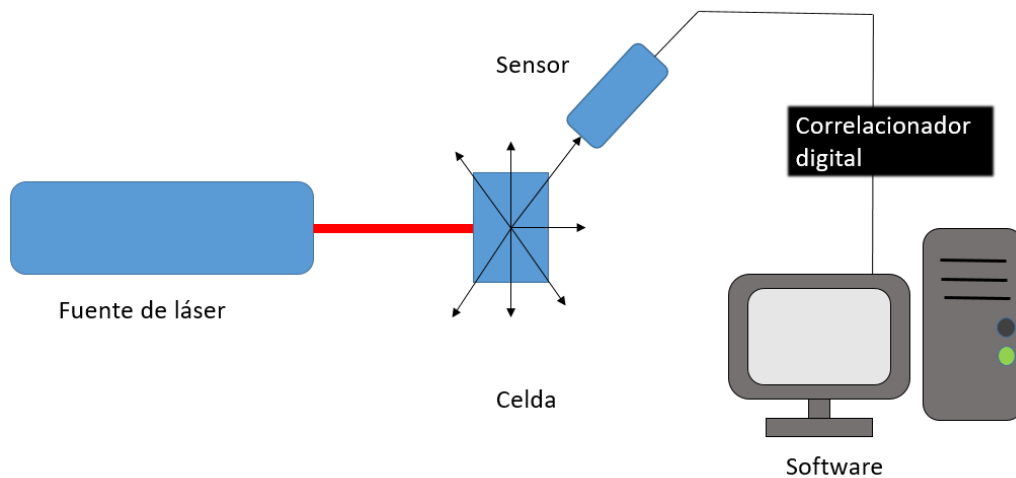
Donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura en grados Kelvin,  $\eta$  es la viscosidad del medio dispersante y  $R_H$  es el radio hidrodinámico de la partícula. Esta ecuación es válida para partículas esféricas que no interactúan entre sí. Debido al movimiento Browniano la distancia entre las partículas varía con el tiempo, lo que crea interferencias en la luz dispersada. Estas fluctuaciones en el tiempo de la intensidad de luz dispersa se pueden convertir en valores para el coeficiente de difusión y el radio de partículas. Para correlacionar las variaciones de intensidad en función del tiempo, el DLS generará una función de autocorrelación  $G(t)$ . Por tanto, la fluctuación de la intensidad de la luz dispersa en función del tiempo revela información sobre la velocidad de los centros de dispersión. Es decir, el coeficiente de difusión traslacional. Las partículas más grandes causarán tasas de fluctuación más pequeñas en la luz dispersa, mientras que las más pequeñas y rápidas darán lugar a tasas de fluctuación más altas, como se muestra en la *figura 3.4*. Estas fluctuaciones en el tiempo de la intensidad de luz dispersa se pueden convertir en valores para el coeficiente de difusión y el radio de partículas (Ramos, 2017).



**Figura 3.6. Fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo y sus respectivas funciones de correlación  $[G(t)]$ . Imagen traducida de Ramos, 2017.**

El acomodo óptico típico de un equipo de DLS se presenta en la *figura 3.5*, en donde se observa que la muestra contenida en una celda es irradiada con un rayo láser. El sensor analiza las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada por las partículas, y esta señal pasa a un correlacionador, el cual mide el grado de similitud entre dos señales o una misma señal a diferentes intervalos. Finalmente la información es procesada para dar los resultados utilizando el procesador de datos del equipo (Malvern instruments).





**Figura 3.7. Configuraciones ópticas para mediciones dinámicas de dispersión de luz (Imagen adaptada del manual de Malvern instruments).**

La mayoría de los instrumentos de DLS utilizan la ecuación de Stokes-Einstein (*Ec. 3.1*) para calcular el radio hidrodinámico de una partícula a partir de los valores del coeficiente de difusión. Los análisis son fáciles de realizar cuando las interacciones y las colisiones entre partículas se minimizan. La cantidad de colisiones y efectos de carga se reducen utilizando muestras altamente diluidas y agregando un electrolito al medio, respectivamente.

El método DLS tiene ventajas tales como menor tiempo de medición, precisión en los resultados de medición, no es invasivo, capacidad de medir muestras diluidas, una variedad de análisis de concentraciones y mediciones más reproducibles (Salame et al., 2018).

### **3.5 Microscopía de fluorescencia**

La microscopía de fluorescencia es una herramienta poderosa para detectar sustancias con autofluorescencia de los organismos vivos. Así mismo nos permite, no solamente visualizar a las células, sino aprender sobre su fisiología. Lo anterior, gracias al poder observar la ubicación de proteínas, su asociación, motilidad, y otros fenómenos como el transporte de iones o procesos metabólicos.

Si la sustancia a medir no posee autofluorescencia, se le puede incorporar un fluoróforo, y así seguir su trayectoria dentro de un ser vivo. La cual será capaz de emitir fluorescencia al ser excitada a cierta longitud de onda. El proceso de fluorescencia implica la absorción de un fotón, seguido por la emisión de otro con menor energía al absorbido. Debido a esta pérdida de energía, la longitud de onda del fotón emitido será mayor, que la del absorbido (conocido como desplazamiento de Stokes; Sanderson et al., 2014).

La microscopia de fluorescencia depende de la obtención de fluoróforos con las propiedades de selectividad adecuadas para teñir específicamente la estructura que se quiere observar. Además se requiere que emitan eficientemente y sean fotoestables una vez incorporados al sistema biológico. Actualmente se cuenta con anticuerpos, cristales semiconductores o proteínas fluorescentes (Acuña & Elguero, 2012).

### 3.6 Métodos colorimétricos

La determinación de biomoléculas tales como proteína total, glucosa, colesterol, etc., puede ser determinada por métodos colorimétricos, los cuales son ampliamente utilizados en química analítica, biología molecular, celular, entre otras disciplinas que requieren la detección de sustancias específicas en medio acuoso. Dentro de los métodos colorimétricos más conocidos se encuentran los ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas o ELISA por sus siglas en inglés, entre otros.

Estos métodos colorimétricos identifican la concentración de determinados compuestos por medio del uso de espectroscopía UV-vis, la cual atiende al principio de la ley de Beer-Lambert. Esta ley establece una relación entre la absorción de luz con la concentración de una muestra determinada, donde la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la solución, expresado matemáticamente correspondería a la ecuación 3.2.

$$A = \varepsilon Cl = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

Ec. 3.2

Donde  $A$  corresponde a la absorbancia,  $\varepsilon$  a el coeficiente de extinción [ $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ ],  $C$  a la concentración [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ], y  $l$  la longitud de la trayectoria de la luz o longitud de la cubeta [cm],  $I_0$  a la intensidad de la luz incidente, e  $I$  a la intensidad de la luz transmitida (Rodger & Sanders, 217).

### 3.6.1 Metodo de Biuret

El método de Biuret es un método colorimétrico específico para enlaces peptídicos, y es ampliamente utilizado para la medición de proteína total en una solución. La reacción de Biuret se ilustra en la figura 3.6, donde el cambio de color azul a morado se da por la modificación del espectro de absorción de los iones de cobre, dando lugar a longitudes de onda más cortas. Este cambio ocurre en medios altamente alcalinos, donde se favorece que los iones de cobre formen complejos multivalentes con los enlaces peptídicos (Dietzen, 2018).

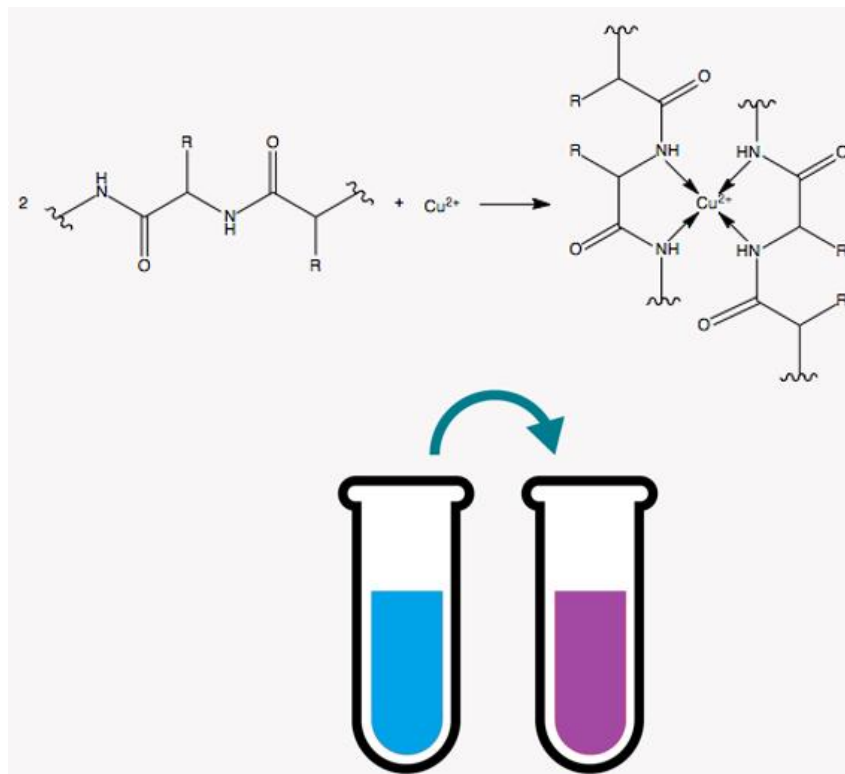


Figura 3.8. Reacción de Biuret. En la parte superior se muestra la reacción de por lo menos dos unidades peptídicas con un ion cobre  $2+$  en medio alcalino, y en la parte inferior el cambio de color que se da con la formación del “complejo de Biuret”.

## 4. Hipótesis

La protección de  $\alpha$ -tocoferol encapsulado dentro de nanopartículas de quitosano y administrado en el alimento, penetrará el tejido del organismo y protegerá de mejor manera a los camarones ante un estrés oxidativo en comparación al  $\alpha$ -tocoferol libre.

## 5. Objetivos

Estudiar la acción antioxidante de  $\alpha$ -tocoferol encapsulado en nanopartículas de quitosano.

### 5.1 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de quitosano con  $\alpha$ -tocoferol (NPch- $\alpha$ -tocoferol) con un diámetro menor a 500 nm, utilizando el método de gelación iónica.
- Caracterizar nanopartículas de quitosano con  $\alpha$ -tocoferol (NPch- $\alpha$ -tocoferol) por Dispersión de luz dinámica (DLS).
- Estudiar las zonas de acumulación interna de nanopartículas en camarones adultos por medio de microscopía óptica con filtros de luz.
- Observar cambios en el aspecto visual después de ingerir dietas elaboradas con dos distintas concentraciones de (Ch-NsP-Tc) y nanopartículas sin  $\alpha$ -tocoferol como control (Ch-NPs), vs.  $\alpha$ -tocoferol libre (Tc). Asimismo como determinar estado de salud de los camarones por medio de indicadores bioquímicos e índice hepatosomático.
- Analizar indicadores de salud tales como bioquímica hemática e índice hepatosomático.

- Analizar la expresión de genes que codifican para enzimas de estrés oxidativo en el hepatopáncreas de los camarones alimentados con los distintos tratamientos después de ser sometidos a una solución de 100 ppm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante dos horas.

## **6. Metodología**

En la siguiente sección se presentarán con detalle los métodos experimentales utilizados, para síntesis de nanopartículas de quitosano con fluorescencia, control y con tocoferol. Asimismo, la caracterización de las nanopartículas, ensayo *in vivo* y los ensayos para medir en estrés oxidativo en las células de hepatopáncreas de los organismos.

### **6.1 Ensayo preliminar de absorción de nanopartículas en tejido**

#### **6.1.1 Encapsulado de fluoresceína 5 isotiocianato (FITC) en nanopartículas de quitosano**

Para realizar la síntesis de nanopartículas de quitosano fluorescentes (Ch-NPs-FITC) se realizó de la siguiente manera:

Primeramente se preparó una solución de quitosano al 0.25%, donde se mezcló 0.25g de quitina en 100 mL de ácido acético al 2%. La mezcla se dejó en agitación 48 hrs o hasta verse completamente homogénea. Posteriormente, y con el fin de eliminar partículas no disueltas, la solución se centrifugó a  $8000 \times g$  durante 15 minutos a 4°C. Entonces, el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a  $11000 \times g$  por 20 minutos a 4°C. Una vez obtenida la solución de quitosano se ajustó el pH de la solución a 4.5 con hidróxido de sodio.

Para eliminar del medio las partículas insolubles, la solución se pasó por un filtro de poro de 1.2  $\mu\text{m}$ , y posteriormente con otro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

La solución de quitosano resultante (5 mL), se agitó a 800 rpm por un mínimo de 10 min. Mientras ésta estaba en agitación, se agregó por goteo 400  $\mu\text{L}$  de FITC, utilizando una jeringa de insulina (1mL). El goteo fue acoplado con un sistema de goteo constante a una velocidad de 0.09 mm/s. Posteriormente con el mismo sistema de goteo y a la misma velocidad se agregó un mL del agente entrecruzador (tripolifosfato; TPP), seguido por 100 mL de glutaraldehído al 2.5%. Una vez añadido el glutaraldehído se dejó la solución en agitación por 1 hora.

Con el fin de eliminar quitosano libre la solución se centrifugó a 26000 x g por 30 min. a 4°C (Sorvall Legend XT, rotor 73006479 Thermo Scientific™). Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 16000  $\times$  g por una hr a 4°C en una Microcentrífuga refrigerada (Sorvall™ Legend Micro 17R-rotor 750036521 Thermo Scientific™). Una vez hechas estas nanopartículas fluorescentes, fueron utilizadas dentro de un alimento para determinar su potencial de absorción a través de la pared intestinal en un estudio previo.

### **6.1.2 Caracterización de nanopartículas**

El diámetro hidrodinámico de las Ch-NPs se midió con la técnica de DLS utilizando el equipo Zetasizer Nano Ns modelo DTS 1060 de Malvern Instruments ®. Para realizar las mediciones en el equipo de DLS se utilizaron soluciones de concentración de 1:1000000 con el propósito de tener soluciones transparentes y homogéneas, para minimizar las interacciones y colisiones entre las partículas.

### 6.1.3 Elaboración de dietas

Se realizaron dos dietas, una dieta a la cual se le añadieron Ch-NPs-FITC y otra la dieta control sin NPs. Primeramente se realizó la formulación de los micronutrientes y macronutrientes adecuados para los organismos, se utilizó como referencia lo reportado por (Cavalheiro-Araújo, et al., 2020). Se utilizó la formulación que se presenta en el *anexo 1-a*.

Se siguieron los protocolos del laboratorio, que en resumen son los siguientes; se pesaron los ingredientes para realizar 200 g de dieta, se mezclaron los micros y los macros en una mezcladora de mesa durante 1 minuto. Una vez homogeneizados los ingredientes secos, como se aprecian en la *figura 6.1*, la gelatina disuelta en 20 mL de agua caliente se agregó a la mezcla, por otro lado el almidón se disolvió en 10 mL de agua y se coció 30 s en un horno de microondas hasta obtener una pasta, la cual fue agregada a la mezcla, finalmente se incorporó el sebo caliente y 50 mL de agua adicional, se continuó mezclando hasta obtener una pasta homogénea.



**Figura 6.1. Homogeneización de dieta. a) Mezcladora de cocina utilizada, b) mezcla de micros y macros homogénea.**

Para obtener los pellets se realizó la extrusión manual en frío. La pasta se hizo pasar a través de jeringas de 10 mL. En charolas planas se acomodaron las tiras extruidas como



se muestra en la *figura 6.2* y se dejaron secar en un horno de secado a 50°C por 24 hrs. Se sacaron del horno y dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, para después ser cortados en un procesador de alimentos, finalmente fueron empaquetados y conservados a 4°C.



**Figura 6.2. Tiras resultantes de la extrusión con jeringa sobre una charola plana.**

Para las dietas de Ch-NPs-FITC se realizó el protocolo de la dieta control hasta el punto en el que se agrega el sebo, ya que una vez que se incorporó el sebo se agregó una solución de 500  $\mu$ L de Ch-NP-FITC en 50 ml de agua tibia, se mezcló y se realizó el extruido de la pasta como se explicó con anterioridad. Para proteger esta dieta de la luz se procuró mantener en espacios sin luz y el recipiente envuelto en papel aluminio. Finalmente para observar si las nanopartículas se encontraban en las dietas se observaron a 490 nm con el equipo iBright FL1000 Thermo Scientific™.

### 6.1.4 Ensayo *in vivo*

Para mantener a los organismos se utilizó un sistema de recirculación previamente montado como el que se muestra en la *figura 6.3*, donde se tiene un reservorio de agua de mar con biofiltro. De ahí el agua se distribuye por 6 cubetas de 20 L con una bomba, donde cada una de las cubetas cuenta con un aireador, a su vez cada cubeta cuenta con un tubo que pasa por el centro y sirve como nivel, este tubo lleva el exceso de agua a un canal que lleva el agua nuevamente al reservorio.



**Figura 6.3. Sistema de recirculación de 6 cubetas de 20 L con camisa de malla y pesas para evitar el salto de organismos entre las cubetas.**

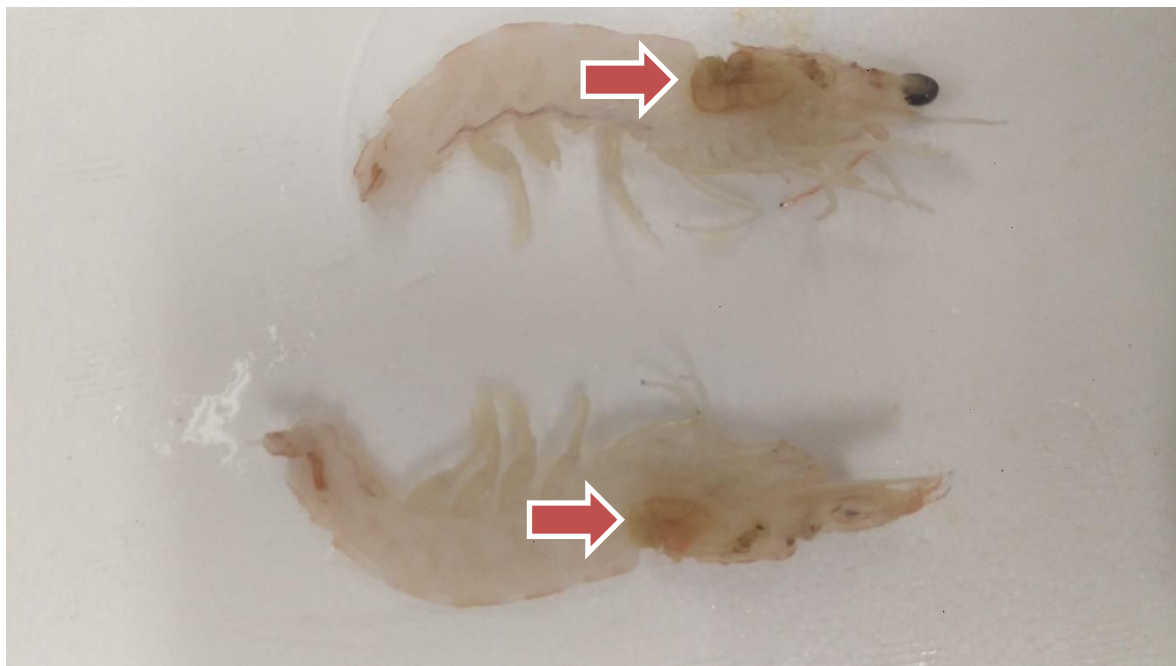
En cada cubeta se tenían 6 camarones, y cada cubeta denominada como unidad experimental, utilizando tres repeticiones por cada tratamiento, tres se alimentaron con dieta control y otras tres con dieta con Ch-Np-FITC. Se alimentaron todos los grupos tres veces al

día en los siguientes horarios: 8 hrs, 13 hrs y 16 hrs a una ración del 5% de su peso corporal al día. Con la intención de evitar fluorescencia en el intestino que causara un error de visualización en la concentración interna, los camarones del grupo con Ch-NPs-FITC se alimentaron sólo por dos días, y los siguientes tres días con dieta control, mientras que las cubetas con dieta control se alimentaron durante 6 días únicamente con la dieta control.

Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron en promedio de la siguiente manera, la temperatura del agua a 28°C, la salinidad a 35 ppm y el oxígeno disuelto a 7 mg L<sup>-1</sup>. Los niveles de amonio y nitritos se midieron cada dos días, presentándose un aumento de amonio por fallas en el biofiltro, sin embargo se solucionó al agregar biofiltro maduro de un tanque de mantenimiento.

Se realizó un muestreo diario de un organismo por cubeta, los organismos fueron sacrificados por hipotermia. A cada organismo se le retiró el exoesqueleto y el intestino, se conservaron los organismos en una solución de formol al 4%, para su posterior análisis y se protegieron de la luz cubriéndolos con papel aluminio, con el fin de no afectar la fluorescencia de las partículas con FITC. Los intestinos también se conservaron en formol en recipientes separados.

Para observar la distribución de nanopartículas en el organismo se realizó un corte longitudinal al organismo como se observa en la *figura 6.4* y se observó a 490 nm en la cámara de luz UV iBright FL1000 Thermo Scientific™.



**Figura 6.4. Camarón cortado longitudinalmente, donde se observa el hepatopáncreas señalado por la flecha roja.**

Finalmente se realizó un corte del hepatopáncreas y se observó con microscopía de fluorescencia en el microscopio LS70 Etaluma®.

## **6.2 Ensayo de estrés oxidativo**

### **6.2.1 Encapsulado de tocoferol en nanopartículas de quitosano**

El  $\alpha$ -tocoferol (Tc) fue recubierto con quitosano para formar nanopartículas (Ch-NsP-Tc), utilizando el método de gelación iónica siguiendo la metodología de Calvo et al. (1997) con algunas modificaciones.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento anteriormente descrito. En resumen, se preparó una solución de quitosano al 0.25%, donde se mezcló 0.25 g de quitina en 100 mL de ácido acético al 2%. La mezcla se dejó en agitación 48 hrs o hasta verse completamente homogénea. Posteriormente, la solución se centrifugó a  $8000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , y a  $11000 \times g$  por 20 minutos más a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de ajustar el pH de la solución a 4.8 con hidróxido de sodio, la solución se pasó por un filtro de poro de  $1.2 \mu\text{m}$ , y posteriormente con otro de  $0.45 \mu\text{m}$  para eliminar las partículas medianas.

La solución de quitosano resultante (5 mL), se agitó a 800 rpm por un mínimo de 10 min. Mientras ésta estaba en agitación, se agregó por goteo, 200  $\mu\text{L}$  de solución de tocoferol disuelto en etanol a una concentración de 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , utilizando una jeringa de insulina (1mL). El goteo de tocoferol fue acoplado con un sistema de goteo constante a una velocidad de 0.09 mm/s. Posteriormente con el mismo sistema de goteo y a la misma velocidad se agregó un mL del agente entrecruzador (tripolifosfato; TPP), seguido por 100 mL de glutaraldehído al 2.5%. Una vez añadido el glutaraldehído se dejó la solución en agitación por 1 hora.

Con el fin de eliminar quitosano y tocoferol libres y no encapsulado la solución se centrifugó a  $26000 \times g$  por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  (Sorvall Legend XT, rotor 73006479 Thermo Scientific™). Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a  $16,000 \times g$  por una hr a  $4^{\circ}\text{C}$  en una Microcentrifuga refrigerada (Sorvall™ Legend Micro 17R-rotor 750036521 Thermo Scientific™).

Para la caracterización de las nanopartículas se realizó la medición del diámetro hidrodinámico por la técnica de DLS, así mismo se determinó el potencial zeta.

## **6.2.2 Elaboración de dietas**

Siguiendo la metodología descrita en la sección 6.1.3 se realizaron las dietas para el ensayo de especies reactivas de oxígeno. La composición de las dietas se presenta en el anexo 1-B en donde se puede apreciar un cambio importante en los micronutrientes, ya que en este caso para evitar ruido por parte de agente externos no se agregó el 1.5% de la mezcla de vitaminas.

## **6.2.3 Ensayo de alimentación con camarones e inducción al estrés oxidativo.**

Con el fin de probar la eficacia del  $\alpha$ -tocoferol contenido en las nanopartículas Ch-NPs-Tc se pusieron a prueba en un ensayo *in vivo*. Se mantuvieron camarones en un sistema de recirculación en 12 tanques, con 8 especímenes en cada uno, con un peso promedio de 35.6 g por organismo. Se alimentaron por un periodo de dos semanas, con cuatro dietas: dieta con tocoferol libre a una concentración de 0.03% (grupo 1), dieta con nanopartículas de quitosano con agua (grupo 2), finalmente dos dietas de Ch-NPs-Tc en dos concentraciones distintas, una baja (grupo 3) y otra alta (grupo 4).

Una vez finalizados los tratamientos con las diferentes dietas, se tomó muestra por duplicado de cada unidad experimental de camarones sin haber sido expuestos a estrés, se les realizó extracción de hemolinfa la cual se puso en congelación en la brevedad y se tomó tejido de hepatopáncreas (aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>), los tejidos se conservaron en una solución de RNA later® (Ambion) para ser posteriormente procesados de forma individual. Después de que los camarones fueron expuestos a un estrés agudo por un periodo de 2 horas en peróxido de hidrógeno al 0.2% de concentración, se realizó el mismo procedimiento anterior con otros dos camarones.

### 6.3 Análisis bioquímico de hemolinfa

Para la determinación de concentración de proteína total, glucosa, colesterol total y triglicéridos se realizaron ensayos colorimétricos con los kits de Valtek.

Se midió la concentración de proteína total en plasma utilizando el kit Valtek Proteína Total (Biuret). Se recuperó el plasma de hemolinfa ( $800 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min) y se mezcló e incubó 20 minutos a temperatura ambiente con el reactivo de Biuret siguiendo las proporciones expuestas en el Anexo 2-A. Una vez concluida la reacción se midió la absorbancia a 540 nm a partir de la cual se calculó la concentración utilizando la Ec. A1.

La glucosa fue determinada con el kit Valtek Glucosa. El plasma recuperado ( $800 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min) se mezcló con el reactivo enzimático como se muestra en el anexo 2-B y se incubó 5 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguido de ello se midió en el espectrofotómetro UV-Vis a 505 nm. La concentración fue calculada utilizando la Ec. A2.

El colesterol fue determinado con el kit Colesterol Total (CHOD-PAP) Valtek. El plasma recuperado ( $800 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min) se mezcló con el reactivo enzimático como se muestra en el anexo 2-C y se incubó 5 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguido de ello se midió en el espectrofotómetro UV-Vis a 505 nm. La concentración fue calculada utilizando la Ec. A3.

Finalmente los triglicéridos fueron determinados utilizando el kit Valtek Triglicéridos (GPO-PAP). El plasma recuperado ( $800 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min) se mezcló con el reactivo enzimático como se muestra en el anexo 2-D y se incubó 5 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguido de ello se midió en el espectrofotómetro UV-Vis a 510 nm. La concentración fue calculada utilizando la Ec. A4.

## **6.4 Monitoreo de expresión de genes relacionados con la respuesta a especies reactivas de oxígeno.**

La extracción de ARN de las muestras de hepatopáncreas se realizó utilizando el kit NucleoSpin® ARN kit (Macherey-Nagel). Se eliminó el ADN genómico mediante digestión con ADNasa en columna a 37°C durante 15 minutos usando rDNasa (libre de ARNasa). El tejido fue homogeneizado utilizando un micropistilo. La cantidad y calidad del ARN se midieron por medio de espectroscopía UV/VIS (Nanodrop® LITE, Thermo Fisher Scientific INC., Wilmington, EE. UU.). Para la cuantificación de la expresión sólo se utilizaron muestras de ARN con relaciones  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  entre 1.90 y 2.10.

El ARN resultante se sometió a un RT-PCR en una reacción de 20  $\mu\text{L}$  utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems; Carlsbad CA, EE. UU.) En un termociclador Verity de 96 pocillos (Applied Biosystems). El programa de transcripción inversa consistió en 10 min a 25°C, 120 min a 37 °C, 5 min a 85 °C y finalmente se mantuvo a 4 °C. Las reacciones de qRT-PCR se realizaron con 1 ng de cebadores de ADNc, sentido y contrasentido (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en 10  $\mu\text{L}$  en MicroAmp® Fast Optical 96 -placas de reacción de pocillos (Applied Biosystems) cubiertas con Película adhesiva óptica MicroAmp® (Applied Biosystems). En la tabla 6.1 se muestra los primers utilizados para las secuencias de cebadores de RT-PCR, los tamaños de amplicón en pares de bases (pb), las eficiencias de reacción (E) y los coeficientes de determinación de Pearson (R<sup>2</sup>).

La cuantificación relativa de genes se calculó mediante el método  $\Delta\Delta\text{CT}$  (Livak & Schmittgen, (2001).

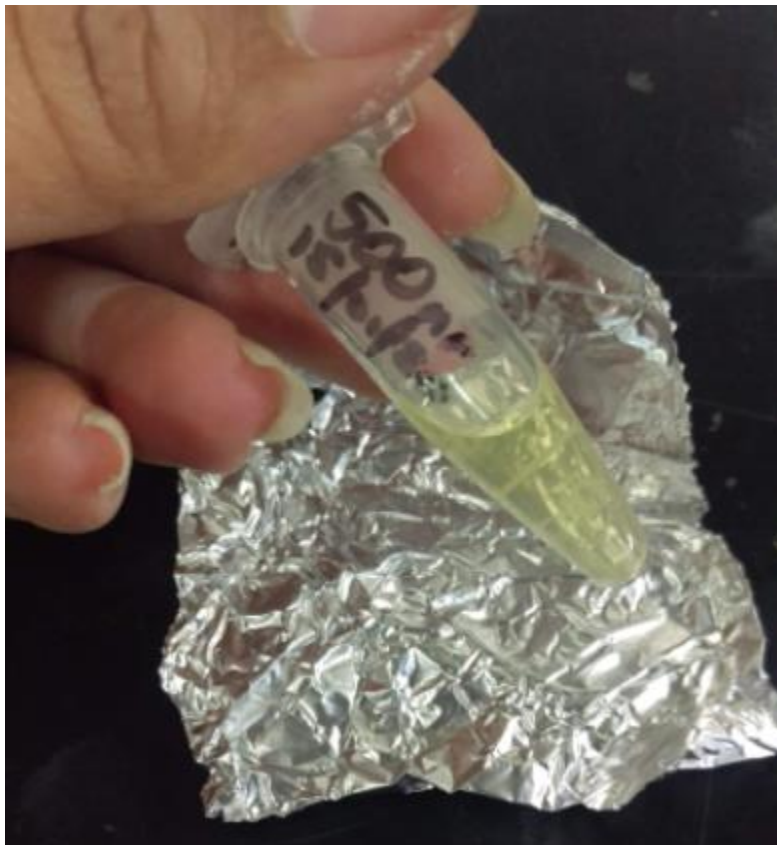


**Tabla 6.1. Primers o sondas utilizadas para RT-PCR, tamaño de amplicón en pares de bases (bp) y eficiencias de reacción (E).**

Gen	Secuencia fwd (5' - 3')	Secuencia rv (5' - 3')	size (bp)	E
<i>cat</i>	GCC CGT ACA AGG AAC TAC CA	TGC CCT ACC TTT ATG AGT AGC C	231	0.90
<i>sod</i>	CCA GGG CTT CCA TTA ACA AC	ATG TTG GGT CCA GAA GAT GG	154	0.91
<i>gst</i>	TGC GAA TAG CCA ACA CTC TG	TGC TCT GCG TTA TCT TCA CG	245	1.03
<i>gpx</i>	TTT TTC CGT GCA AAA AGG AC	TAA TAC GCG ATG CCC CTA AC	239	0.94

## 7. Resultados

Como resultado de la síntesis de Ch-NPs-FITC se consiguió 1.5 mL de nanopartículas suspendidas en buffer de fosfatos a pH de 6. Las características del coloide fueron: alta viscosidad, un tono transparente amarillento característico del FITC. Por medio de DLS se encontró un diámetro hidrodinámico promedio de 500 nm, para las Ch-NPs-FITC. En la *figura 7.1* se muestra la solución final de la síntesis.



**Figura 7.1. Vial con Ch-NP-FITC.**

Para la dieta control del ensayo preliminar de absorción se consiguieron pellets homogéneos con longitudes variables como los que se observan en la *figura 7.2*. En el caso

del alimento con Ch-NPs-FITC fue posible detectar fluorescencia por medio de Thermo Scientific™ a 49 nm, mientras que en las dietas control no había presencia de fluorescencia cuando se analizaron bajo las mismas condiciones.



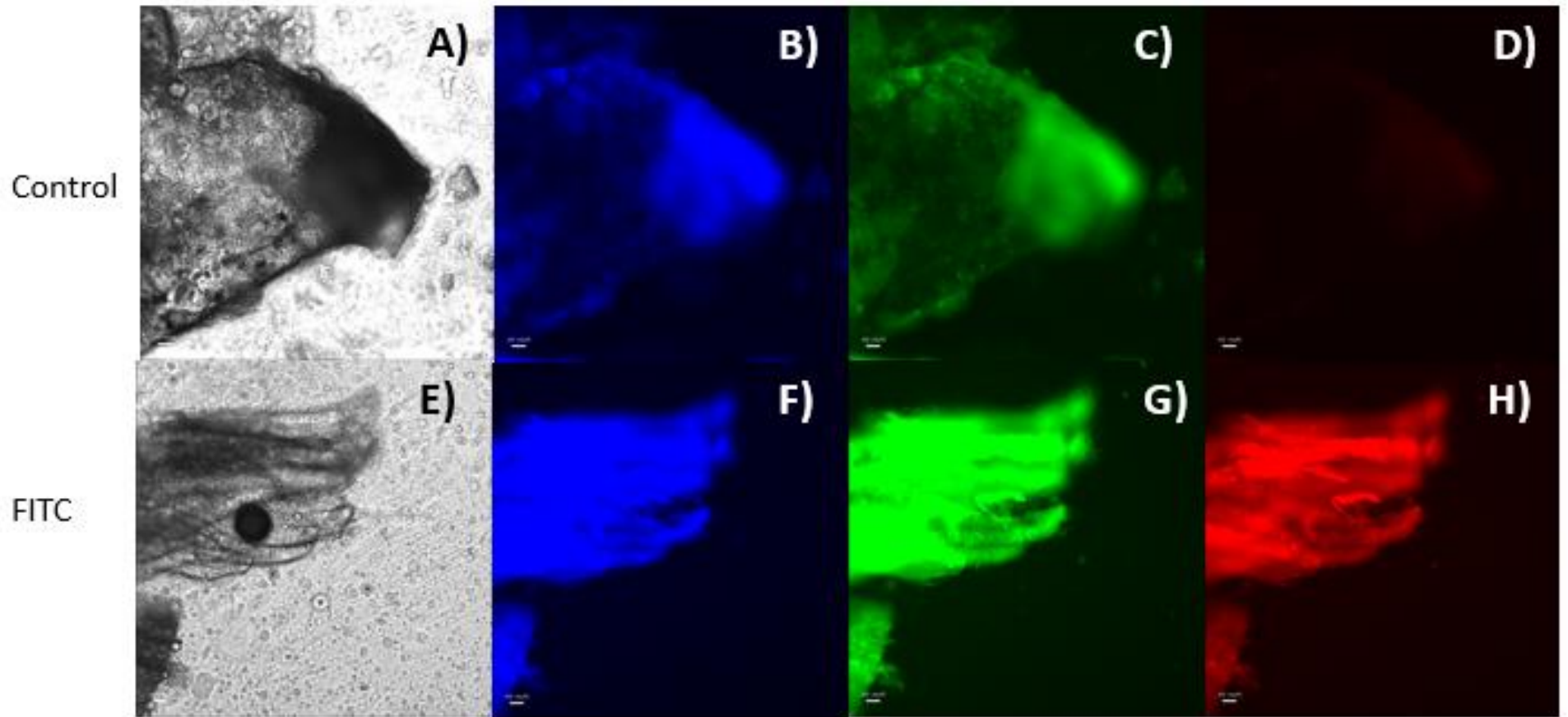
**Figura 7.2. Pellets de dieta control.**

Sin embargo al analizar a los especímenes que habían sido utilizados en el desarrollo experimental de este trabajo de tesis, pudimos observar en la cámara de luz UV, pudimos observar que los organismos control presentaban autofluorescencia. Como se muestra en la *figura 7.3* un camarón alimentado con dieta control mostro fluorescencia al ser excitado a una longitud de 492 nm. Esto imposibilito los posteriores análisis ya que en el caso del fluoroforo utilizado con nuestras nanopartículas, el FITC, se excita con la misma longitud de onda esto da lugar a una falta de contraste entre la fluorescencia del organismo y de la de FITC (R&D Systems a biotechne brand, 2020).



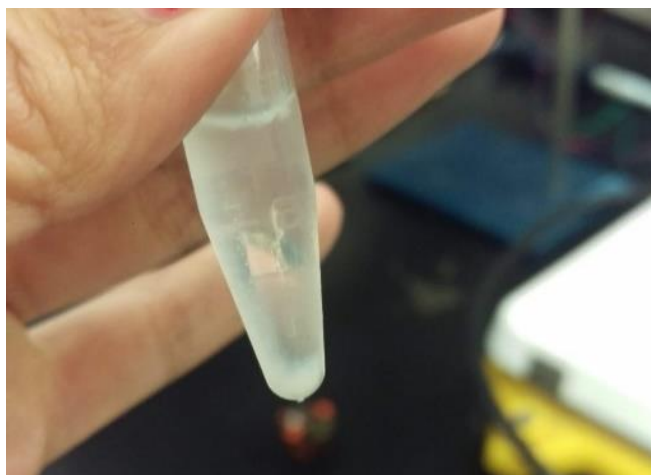
**Figura 7.3. Camarón alimentado con dieta control, observado a 492 nm.**

Al recurrir a la microscopía de fluorescencia, se buscó un filtro en el cual no se produjera autofluorescencia del organismo, y poder observar la fluorescencia de FITC. Ésto se encontró en el filtro rojo el cual excita de 580 a 598 nm y detecta la emisión a 612-680 nm (Etaluma, 2019), en la *figura 7.4* se observa fluorescencia en el control en los filtros azul (excitación 370-410 nm; emisión 429-462 nm) y verde (excitación 473-491 nm; emisión 502-561 nm), mas no en rojo. Ésto brindó un punto de diferenciación entre el tejido y la distribución de las nanopartículas.



**Figura 7.4. Microscopía de fluorescencia de los cortes de hepatopáncreas de camarones colectados en el día 2 del grupo control A-D). A) campo claro, B) filtro azul, C) filtro verde, D) filtro rojo. Microscopía de fluorescencia de cortes de hepatopáncreas de camarones colectados en el día 2 del grupo experimental E-H). E) campo claro, F) filtro azul, G) filtro verde, H) filtro rojo.**

Para el ensayo de estrés oxidativo se sintetizaron nanopartículas de Ch-NPs-Tc, donde se obtuvo un líquido transparente y viscoso. De éste, se obtuvieron 4 mL de nanopartículas suspendidas en agua miliQ como se muestra en la *figura 7.5*. Del estudio de caracterización por medio de DLS se encontró que las nanopartículas tuvieron un diámetro hidrodinámico de 264.1 nm y un potencial zeta de 35.4 mV, medidas obtenidas con el equipo Zetasizer Nano ZS modelo ZEN3600.



**Figura 7.5. Vial con Ch-NP- $\alpha$ -tocoferol.**

Al término del ensayo *in vivo* durante el muestreo se observó una tendencia en el cambio de coloración en los diferentes tratamientos. En la *figura 7.6-A* se observó una coloración azul en los organismos con tratamiento de  $\alpha$ -tocoferol libre en el alimento. Por otro lado, los organismos con tratamiento de nanopartículas de quitosano control mantuvieron la coloración blanquecina típica del *L. vannamei* como se observa en la *figura 7.6-B*. Los tratamientos con nanopartículas de quitosano cargadas con tocoferol en sus concentraciones baja y alta mostraron tonalidades rojizas o café, sin embargo cabe destacar que los camarones tratados con la concentración alta de  $\alpha$ -tocoferol obtuvieron una coloración más intensa.



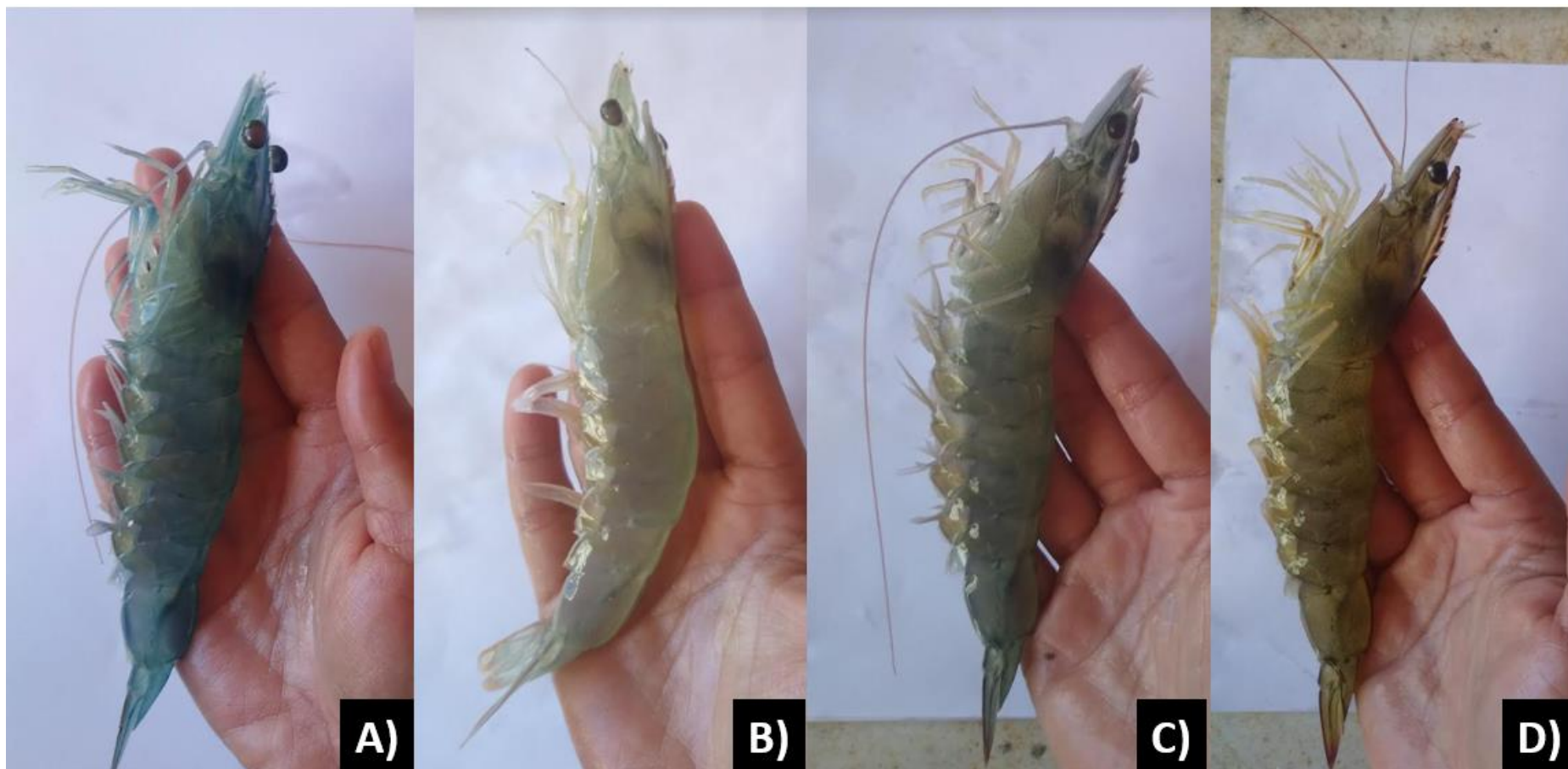
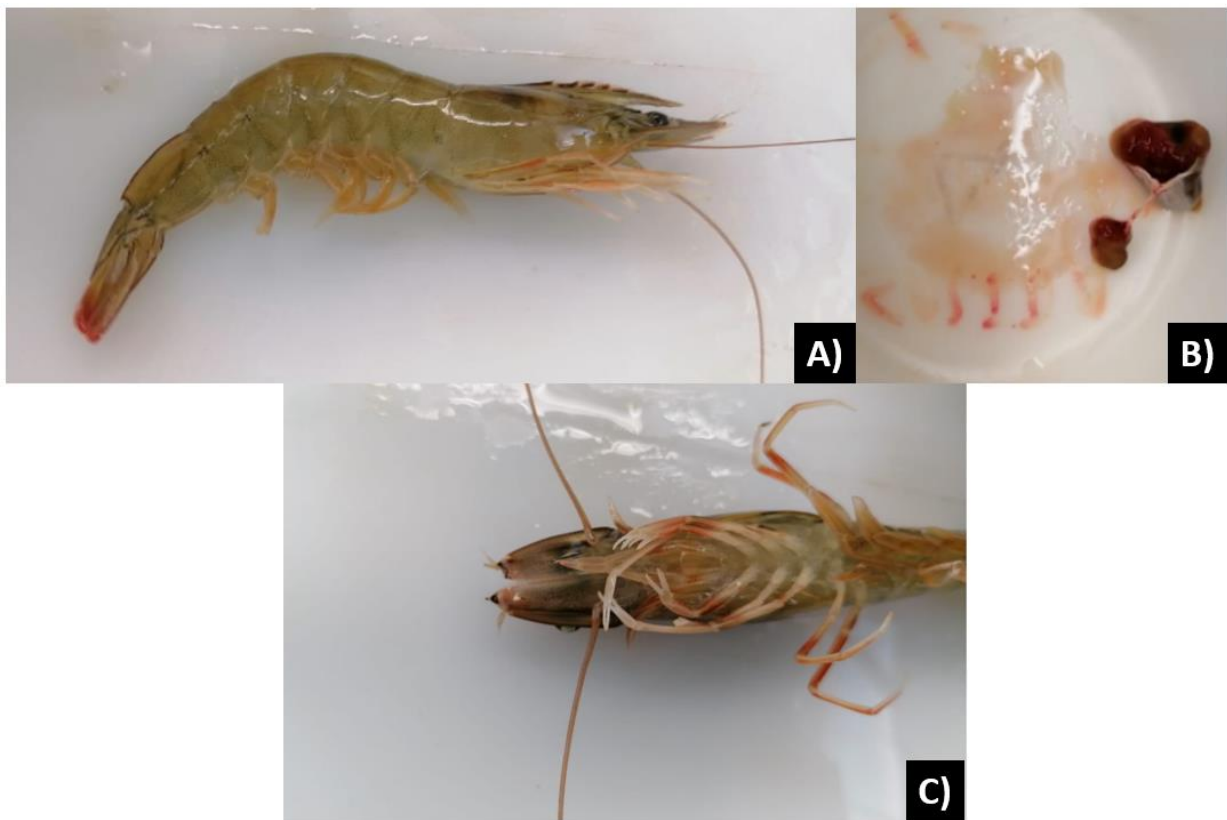


Figura 4.6. Muestras de camarón de tratamiento correspondiente a A) Tocoferol libre, B) Nanopartículas control, C) Nanopartículas Ch-NP- $\alpha$ -tocoferol de concentración 1 y D) Nanopartículas Ch-NP- $\alpha$ -tocoferol de concentración 2.

En la *figura 7.7-A-C* se observa una alta coloración rojiza en las zonas de los extremos tales como los pleópodos, peréipodos y punta de la cola un tono rojo intenso sobretodo en esta última. Al realizar la disección del hepatopáncreas se observó que este tomó un color rojo carmín intenso como se observa en la *figura 7.7-B*, mientras que hepatopáncreas extraídos de organismos de otros tratamientos tenían una coloración café típica de la especie.



**Figura 7.7.** Muestra de camarón tratado con nanopartículas Ch-NP-Tc de concentración 2 A) perfil, B) hepatopáncreas y C) vista inferior de peréipodos.

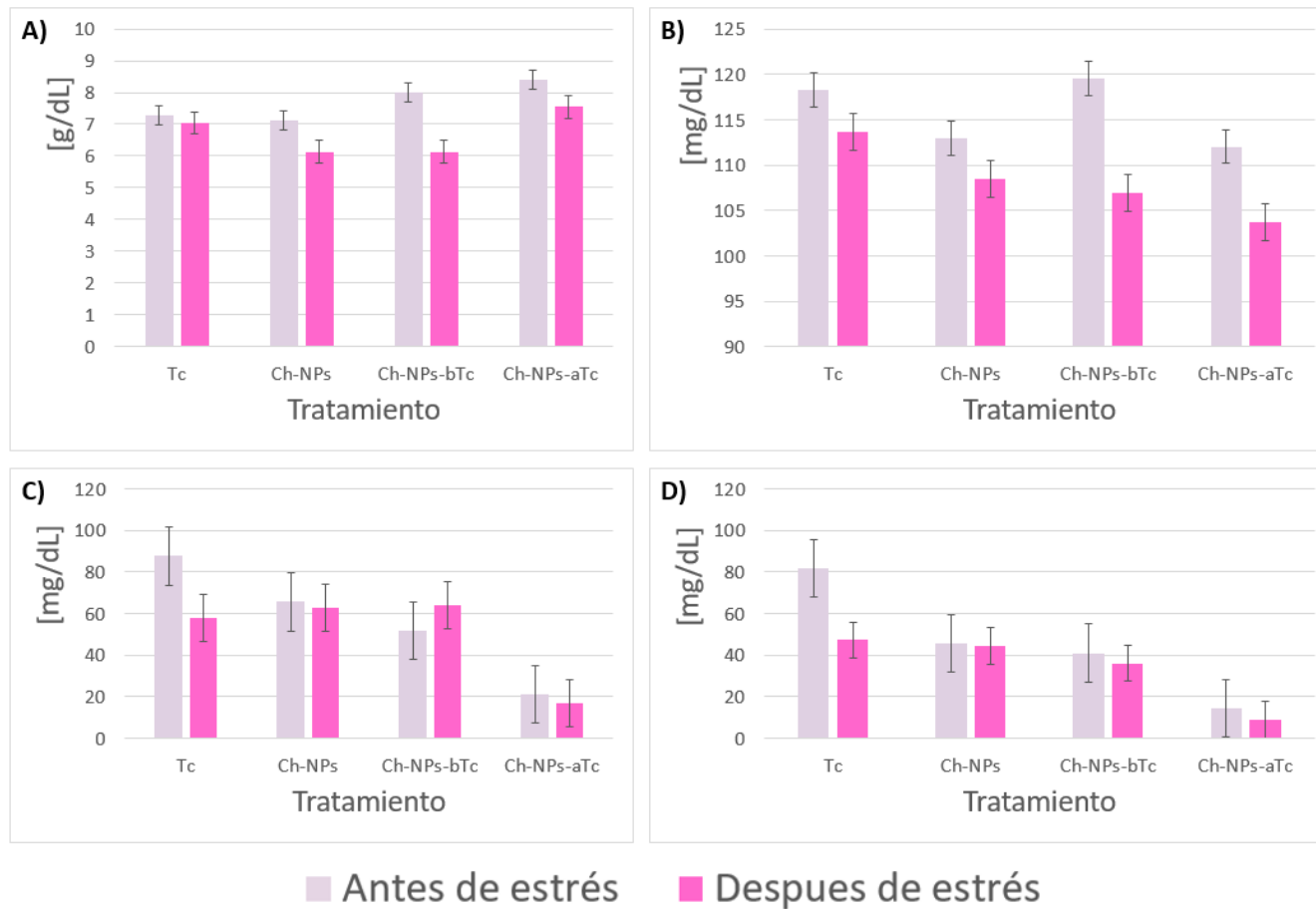


Se realizó la determinación del índice hepatosomático (IHS), en la *tabla 7.1* se presentan los resultados obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar.

**Tabla 7.1. Índice hepatosomático (IHS) correspondiente a los diferentes tratamientos.**

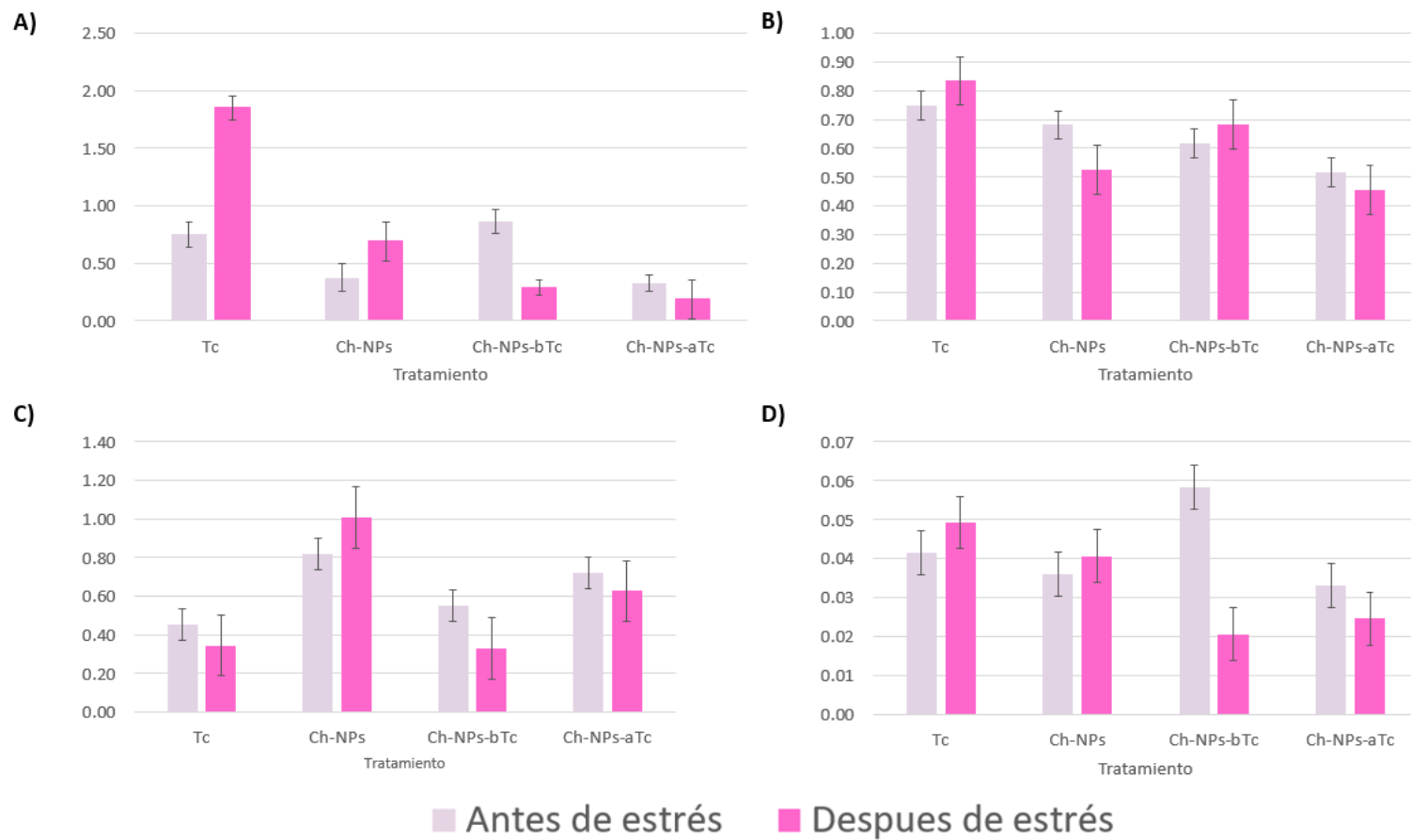
<b>Tratamiento</b>	<b>IHS [%]</b>
Tocoferol libre (Tc)	3.81 ±0.34
Nanopartículas de quitosano (Ch-NP)	3.45 ±0.43
Nanopartículas de quitosano concentración baja (Ch-NPs-bTc )	3.54 ±0.27
Nanopartículas de quitosano concentración alta (Ch-NPs-aTc)	3.09 ±0.28

A continuación en la *figura 7.8* se presentan los valores de la química sanguínea de la hemolinfa antes y después del estrés con peróxido de hidrógeno durante dos horas.



**Figura. 7.8** Resultados de análisis bioquímico en hemolinfa extraída donde A) son proteínas, B) glucosa, C) colesterol y D) triglicéridos.

A continuación en la *figura 7.9* se presenta la expresión promedio de los diferentes genes.



**Figura. 7.9.** Resultados de expresión promedio de genes característicos del estrés oxidativo, donde A) corresponde a catalasa, B) superóxido dismutasa, C) Glutación S- transferasa y D) Glutación peroxidasa.

## 8. Discusión

Primeramente se realizó un estudio preliminar para determinar si las nanopartículas entran al tejido del hepatopáncreas.

Se sintetizaron Ch-NPs-FITC de lo que se consiguió 1.5 mL de nanopartículas suspendidas en buffer de fosfatos a pH de 6, por medio del método de gelación iónica. Las características del coloide fueron: alta viscosidad, un tono transparente amarillento característico del FITC, lo que cualitativamente nos sugiere la presencia de FITC encapsulado en quitosano. En la *figura 7.1* se muestra el resultado final de la síntesis, esta coloración sugiere una encapsulación, de FITC, la cual se confirmó por la fluorescencia de la preparación. Otro parámetro cualitativo a considerar es la alta viscosidad (Wang & Xu, 1994).

Las nanopartículas fueron medidas por medio de DLS, donde se encontró un diámetro hidrodinámico promedio de 500 nm, con una alta variabilidad en tamaños. Lo anterior se debe a que el método de gelación iónica funciona por medio de interacciones electrostáticas, lo que en condiciones no óptimas puede llevar a resultados de tamaño de partícula polidispersos (Calvo, Remuñan-Lopez, Vila-Jato, & Alonso, 1997).

Este tamaño de nanopartícula puede ser considerado grande, sin embargo el radio hidrodinámico polidisperso de las NP muestra la presencia de nanopartículas de menor diámetro. Por otro lado se han reportado resultados de penetración de tejido por parte de partículas de diámetros de 500 nm, Bandi et al. 2020 reportaron ingreso a la mucosa de conejos por parte de nanopartículas con diámetro de 500 nm hasta 1000 nm, si bien el ingreso es del 1% existe y aumenta conforme pasa el tiempo.

Previo a realizar el ensayo *in vivo* con Ch-NP-Tc, se aseguró que las nanopartículas ingresan al tejido de hepatopáncreas, ya que este es primordial para el metabolismo y desintoxicación de xenobioticos de *L. vannamei* (Li, et al., 2008). Ésto fue a través del ensayo previo utilizando las Ch-NPs-FITC integradas en la dieta de los camarones. El marcador FITC, es un fluorocromo ampliamente utilizado en microscopía de fluorescencia. La dieta que se utilizó fue siguiendo las recomendaciones del laboratorio del IIO, con los nutrimentos adecuados para asegurar un crecimiento saludable en los camarones. Los pellets de dieta deben contener todos los requerimientos y ser homogéneos para así reducir un sesgo en el mantenimiento de los mismos. Como se observó en la *figura 7.2* se obtuvieron pellets de dieta homogéneos, lo que nos brinda un mantenimiento adecuado para los ensayos. Los pellets obtenidos presentaron fluorescencia, hecho que sugiere la presencia de las nanopartículas embebidas en la dieta. Este resultado fue contrastado con la dieta control, la cual no presentó fluorescencia, lo que descarta autofluorescencia de la dieta misma.

Con el propósito de observar si hubo penetración de tejido de hepatopáncreas por parte de las NP's, se realizó microscopía de fluorescencia. Como se menciona anteriormente los camarones presentaron autofluorescencia, lo que incitó a buscar un punto de diferenciación entre el tejido y la distribución de las NP. El punto se encontró en el filtro rojo, como se observa en la *figura 7.4* no se presenta fluorescencia en el control al ser expuesto a este filtro. Filtro que excita de 580 a 598 nm (Etaluma, 2019). En la *figura 7.4* donde se observa fluorescencia en el control en los filtros azul y verde, más no en rojo. Esta diferenciación entre filtros nos brindó un punto de diferenciación entre el tejido y la distribución de las nanopartículas. Al poder separar la fluorescencia del camarón de la de las NPs se pudo observar la presencia de FITC en el tejido de hepatopáncreas como se puede

observar en la *figura 7.4*. En donde se tiene un contraste del tejido de un camarón alimentado con dieta control del tejido de hepatopáncreas de un camarón alimentado con dieta experimental con FITC. Esta fluorescencia nos indicó la penetración efectiva de las NPs al tejido de hepatopáncreas.

Una vez llevado a cabo el ensayo preliminar se prosiguió con el ensayo de estrés oxidativo *in vivo*. En éste se realizó una segunda síntesis de nanopartículas de quitosano, pero cargados con  $\alpha$ -tocoferol o Ch-NPs-Tc. Las nanopartículas obtenidas tuvieron un diámetro menor al de la primera síntesis de Ch-NP-FITC, del estudio de caracterización por medio de DLS se encontró un diámetro hidrodinámico de 264.1 nm, este diámetro de partícula es aceptable tomando en cuenta los resultados favorables del ensayo preliminar y resultados de Bandi et al. (2020).

Las nanopartículas dependiendo de su carga superficial tienden a aglomerarse, las partículas con mayor carga tienden a repelerse, por lo tanto entre mayor sea la carga superficial se tiene mayor estabilidad en la solución. Las partículas son consideradas estables a partir de potencial zeta de 30 mV (Clogston & Patri, 2010). El valor de potencial zeta obtenido de las nanopartículas Ch-NP-Tc resuspendidas en buffer de fostatos a pH 6, fue de 35.4 mV, lo que indica una estabilidad media de la suspensión.

Para medir el efecto de las NPs se realizó un ensayo de estrés oxidativo *in vivo*, donde se expuso a un estrés agudo a los organismos durante dos horas, para posteriormente tomar muestras aleatorias de hepatopáncreas, con los cuales se midieron los indicadores de estrés oxidativo. Es decir, se midió la expresión de genes que codifican para las enzimas superóxido

dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa, principales participantes en la defensa antioxidante enzimática.

Adicionalmente para medir el estado de salud de los camarones en los diferentes tratamientos, se calculó el índice hepatosomático y se tomaron muestras de hemolinfa. Con ésta última se realizaron ensayos para detectar la concentración de diferentes biomoléculas que sirvieron como un indicador del estado de salud de los camarones.

El índice hepatosomático es la relación entre la masa del hepatopáncreas y el cuerpo del organismo, este es un indicador de las reservas de glucosa en el organismo y la actividad hepática. En la *tabla 7.1* se muestran los índices hepatosomáticos calculados, donde se encontró diferencia significativa entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). Los camarones con tratamiento de Tc tuvieron altos valores de índice hepatosomático, esto sugiere mayores reservas energéticas, estas bien pueden ser de carbohidratos o lípidos. Una reserva moderadamente mayor puede ser síntoma de interferencia con el metabolismo de carbohidratos y/o lípidos.

Se identificó una disminución moderada en el índice hepatosomático en Ch-NPs-aTc, esto puede explicarse por incremento en la demanda energética en condiciones de estrés y el uso constante de biomoléculas como suministro de energía. Finalmente el índice hepatosomático de los tratamientos de Ch-Np y Ch-Nps-aTc no varían en gran medida, esto puede deberse a que el estado de los camarones se mantuvo dentro de parámetros constantes, donde no hubo una gran demanda de energía o bien una acumulación de ella.

Los ensayos de bioquímica hemática analizaron la concentración de proteína total, glucosa, colesterol y triglicéridos. Primeramente del contenido de proteína total en hemolinfa

se observó que no hay diferencia significativa en la proteína total ( $P < 0.05$ ), esto puede ser debido a que el estrés al que fueron expuestos los organismos fue agudo, y este no afectó el metabolismo de proteínas en los camarones. Niveles bajos de proteína en hemolinfa sugieren una baja ingesta de alimentos o bien una dieta pobre en nutrientes, sin embargo este no es el caso, lo que nos indica que hubo disponibilidad y consumo de alimento con un contenido adecuado de nutrientes.

Un indicador de estrés agudo es el aumento en los niveles de glucosa en la hemolinfa del camarón peneido (Racotta & Palacios, 1998). Sin embargo en el presente estudio no se encontró un aumento en los niveles de glucosa en los camarones expuestos a un estrés agudo. Esto se puede deber a una adaptación o aclimatación al estresor y podría explicar la ausencia de una alta concentración de glucosa en la hemolinfa del camarón estresado. Los camarones expuestos a estrés oxidativo tuvieron una mayor manipulación, además de permanecer durante 2 hrs expuestos a peróxido. Un comportamiento similar fue reportado anteriormente en camarones expuestos a estrés por manipulación (Mercier, et al., 2006).

La concentración de colesterol y triglicéridos en hemolinfa no representa una diferencia significativa, sin embargo se observaron niveles muy bajos de estas biomoléculas en los camarones tratados con Ch-NPs-aTc. Los niveles muy bajos de biomoléculas puede significar una disminución de apetito, o bien poca disponibilidad de alimento, sin embargo en el contenido total de proteína se observa que la disponibilidad de alimento no fue un factor. La baja concentración de lípidos en hemolinfa puede ser debido a problemas metabólicos o bien de absorción de estos, signo que representa en efecto negativo en el estado de salud de los camarones. Por otro lado se observó una concentración bastante alta de triglicéridos en el



grupo tratado con tocoferol libre, los triglicéridos muy elevados pueden indicar una inhibición del metabolismo de lípidos, y estos se ven acumulados en el sistema.

De la medición de expresión genética se obtuvo una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la expresión de los genes CAT y GPX, teniendo una diferencia visible entre la expresión del tratamiento de Tc respecto al resto. Este resultado corresponde con la defensa antioxidante enzimática, ya que son las principales enzimas que degradan a la molécula peróxido (Wang et al., 2012). Otra enzima a considerar es la glutatión S-transferasa, la cual actúa sobre moléculas variadas, expresión de la cual también se obtuvo diferencia significativa, estos indicadores nos muestran que hubo una expresión diferente entre los tratamientos.

Al finalizar el ensayo de estrés oxidativo *in vivo* se observó una tendencia en el cambio de coloración en los diferentes tratamientos. En la *figura 7.6-A* se observó una coloración azul en los organismos con tratamiento de  $\alpha$ -tocoferol libre en el alimento, por otro lado los organismos con tratamiento de nanopartículas de quitosano control mantuvieron la coloración blanquecina típica del *L. vannamei* como se observa en la *figura 7.6-B*. Los tratamientos con nanopartículas de quitosano cargadas con  $\alpha$ -tocoferol en sus concentraciones baja y alta mostraron tonalidades rojizas a café. Sin embargo, cabe destacar que los camarones tratados con la concentración alta de  $\alpha$ -tocoferol obtuvieron una coloración más intensa. Estas coloraciones pueden resultar no deseadas, ya que se pueden relacionar con patologías. Estudios realizados por Klaus et al. (2017) sugieren que el exceso de tocoferol puede llevar a intervenir con la acción antioxidante natural del camarón, lo que puede conducir a un estrés oxidativo, por lo tanto a una pérdida de homeostasis.

La pérdida de homeostasis lleva a disfunción orgánica y a muerte celular, condiciones que facilita el ingreso a microorganismos oportunistas, tales como bacterias del género *Vibrio*, infección común en *L. vannamei* (Hermes-Lima, 2004). Lo anterior podría sugerir una posible infección en los organismos tratados con el tratamiento 1, con  $\alpha$ -tocoferol libre y los tratados con el tratamiento 4 de tocoferol concentrado. Sin embargo, habría que analizar el caso con un mayor detalle antes de dar una conclusión al respecto. En el tratamiento Tc puede que el  $\alpha$ -tocoferol libre se perdiera en el proceso de elaboración de las dietas, o bien se neutralizara con el alimento dentro del aparato digestivo. Por otro lado el tratamiento 4 al ser tan concentrado podría haber interferido con la defensa antioxidante enzimática. En ambos casos pudo haber llegado a un desequilibrio entre la concentración de antioxidantes contra la de ROS.

A pesar del tamaño de las NP fluorescentes obtenidas (500 nm) se obtuvieron resultados favorables del ingreso de estas al tejido, y si bien es un tamaño grande, se han registrado anteriormente resultados positivos con partículas de 500 nm. Por otra parte se obtuvo un efecto ante el estrés oxidativo con las NPs cargadas con  $\alpha$ -tocoferol (con diámetro de 264.1 nm). El ingreso de las NPs al organismo es un signo favorable para su uso como vehículo de biomoléculas de alto interés, ya que estas cápsulas pueden fungir como reactores o bien como protectores de moléculas o compuestos que sean de interés para tratamientos. Esta protección es necesaria para tratamientos en los que se deba de llegar a un tejido específico, o bien que éstas sean delicadas y se degraden antes de llegar a la zona de interés, por otro lado también las NP son útiles para poder utilizar en menor cantidad fármacos, metabolitos o tratamientos que sean de alto valor económico, ya que se protege.

Para obtener partículas de menor tamaño, se sugiere experimentar con las velocidades de agitación y así encontrar la óptima para  $\alpha$ -tocoferol, ya que para cada biomolécula las condiciones de encapsulación varían. Por otro lado cabe mencionar que el goteo se realizó manualmente, por lo que un método de goteo constante en velocidad y volumen ayudaría a obtener NP de menor diámetro hidrodinámico y menos polidispersas. Por otro lado Sawtarie et al. (2017) reportaron el efecto de cloruro de sodio en la síntesis de nanopartículas de quitosano, dando NPs con menor polidispersión y menor diámetro.

Otra ventaja de asegurar el ingreso de las Ch-NP es que estas son más económicas de obtener que otro tipo de nanovehículo, como las VLP, las cuales son altamente eficientes en entrega de fármacos o *drug delivery*, sin embargo la síntesis de éstas es más compleja de escalar que la de las Ch-NP. Las Ch-NP también cuentan con la ventaja de ser altamente biodegradables y biocompatibles.

## 9. Conclusiones

El método de gelación iónica es efectivo para sintetizar nanopartículas de quitosano cargadas con FITC y con  $\alpha$ -tocoferol, caracterizadas a través de DLS, obteniendo un diámetro hidrodinámico de 500 nm y 264 nm.

A través de la microscopía óptica con filtros de luz se encontró la presencia de NP en el hepatopáncreas, lo que indica la que las NP atravesaron el intestino hacia el hepatopáncreas.

Después del ensayo de estrés se concluye que el  $\alpha$ -tocoferol libre es efectivo contra el estrés oxidativo, sin embargo con limitantes, ya que los camarones al ser expuestos a estrés

agudo actuaron sus defensas antioxidantes enzimáticas, lo que indica un desequilibrio entre la existencia de antioxidantes contra ROS.

El  $\alpha$ -tocoferol protegido por las nanopartículas de quitosano resultó ser el mejor medio para ingresar al tejido reduciendo el efecto del estrés oxidativo. Sin embargo, habrá que delimitar la concentración más adecuada para ello.

Los distintos tratamientos, es decir, la forma como se suministró el  $\alpha$ -tocoferol libre tuvo un efecto visual sobre la coloración de los camarones, lo que indica una respuesta diferenciada.

Las NP suministradas a través de pellets fueron un vehículo adecuado para el ingreso del  $\alpha$ -tocoferol al interior del organismo sin que se libere en el intestino, asegurando su protección.

# Anexos

## Anexo 1-A

Tabla A1. Contenido de dieta control de ensayo preliminar.

Ingrediente	Porcentaje
Harina de pescado	12.00
Harina de ave	22.00
Soya 42%	18.00
Harina de trigo	8.00
Gelatina	6.00
Gluten de maíz	7.00
Sebo	2.02
Almidón de maíz	18.65
Rovimix	1.50
Fosfolípidos	1.00
Colesterol	0.500
Nature-DHA 17%	3.00
Benzoato de sodio	0.23
Cloruro de colina	0.09
BHT	0.01

## Anexo 1-B

Tabla B1. Contenido de dieta control de ensayo *in vivo*.

Ingrediente	Porcentaje
Harina de pescado	12.00
Harina de ave	22.00
Soya 42%	18.00
Harina de trigo	8.00
Gelatina	6.00
Gluten de maíz	7.00
Sebo	2.02
Almidón de maíz	18.65
Fosfolípidos	1.00
Colesterol	0.500
Nature-DHA 17%	3.00
Benzoato de sodio	0.23
Cloruro de colina	0.09
BHT	0.01

## Anexo 2-A

Tabla A2. Proporción para determinación de proteína total.

		Blanco	Calibrador	Desconocido
Muestra	(mL)	--	--	0.01
Calibrador	(mL)	--	0.01	--
Reactivo	(mL)	1.0	1.0	1.0
Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C, o 20 minutos a temperatura ambiente (20° a 25° C.). Leer las absorbancias a 540 nm., llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por a lo menos treinta				

$$Factor = \frac{Concentración\ calibrador}{Abs.\ calibrador}$$

$$Proteína\ Total = Factor * Abs.\ muestra$$

Ec. A1

## Anexo 2-B

Tabla B2. Proporción para determinación de proteína total.

		Blanco	Calibrador	Desconocido
Muestra	(mL)	---	---	0.01
Calibrador	(mL)	---	0.01	---
Reactivo	(mL)	1.00	1.00	1.00

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o temperatura ambiente (20° a 25°C). Leer las absorbancias ajustando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por a lo menos treinta minutos.

$$Factor = \frac{Concentración\ calibrador}{Abs.\ calibrador}$$

$$Glucosa\ (mg/dl) = Factor \times Abs.\ muestra$$

Ec. A2



## Anexo 2-C

Tabla C2. Proporción para determinación de proteína total.

	Blanco	Standard	Desconocido
Muestra	(mL) --	--	0.01
Calibrador	(mL) --	0.01	--
Reactivo	(mL) 1.00	1.00	1.00

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o 20 minutos a temperatura ambiente (> 20°C). Leer las absorbancias llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por a lo menos treinta

$$Factor = \frac{Concentración\ Calibrador}{Abs.\ Calibrador}$$

$$Colesterol\ Total\ (mg/dl) = Factor \times Abs.\ Muestra$$

Ec. A3

## Anexo 2-D

Tabla C2. Proporción para determinación de proteína total.

		Blanco	Calibrador	Muestra
Muestra	(mL)	--	--	0.01
Calibrador	(mL)	--	0.01	--
Reactivo	(mL)	1.00	1.00	1.00
Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C temperatura ambiente (20° a 25°C.). Leer las absorbancias llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por a lo menos treinta minutos.				

---

$$Factor = \frac{Concentración\ calibrador}{Abs.\ calibrador}$$

$$Triglicéridos = Factor * Abs.\ muestra$$

---

Ec. A4

## Referencias

- Acuña, U., & Elguero, J. (2012). Histoquímica. *Anales de Química*, 114-118.
- Bandi, S. P., Kumbhar, Y. S., & Venuganti, V. V. (2020). Effect of particle size and surface charge of nanoparticles in penetration through intestinal mucus barrier. *Journal of Nanoparticle Research*.
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 994–1003.
- Buyuk, N., Arayici, P., Derman, S., Mustafaeva, Z., & S., Y. (2020). Synthesis of Chitosan Nanoparticles for Controlled Release of Amiodarone. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 131-138.
- Calvo, P., Remuñan-Lopez, C., Vila-Jato, M., & Alonso, M. (1997). Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines. *Pharmaceutical Research*, 1431-1436.
- Cavalheiro-Araújo, B., Flores-Galvez, K., Massaaki-Honji, R., Magalhães-Barbosa, V., Viana, M. T., Aurora, T., & Mata-Sotres, J. A. (2020). Arachidonic acid effects on the overall performance, fatty acid profile, hepatopancreas morphology and lipid-relevant genes in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 735207.
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2010). Zeta Potential Measurement. En S. McNeil, *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (págs. 63-70). Humana Press.
- Dietzen, D. (2018). Amino Acids, Peptides, and Proteins. En A. R. Nader Rifai, *Principles and Applications of Molecular Diagnostics* (págs. 345-380). Elsevier.
- Dugassa, H., & Gaetan, D. G. (2018). Biology of White Leg Shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 05-17.
- Etaluma. (2019). *Etaluma*. Obtenido de Excitation and Emission Profiles of LS720 filters: <https://etaluma.com/products/lumascope-720/>

- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2011). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21-27.
- FAO. (2001). Crustacean diseases. En M. M. Bondad-Reantaso (Ed.), *The Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper No. 402* (pág. 154). Roma: FAO and NACA.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. (2009). *Situación actual y perspectivas del camarón en México*. Morelia: Nueva época.
- Food and Agriculture Organization. (2009). *Cultured aquatic species fact sheet*. Obtenido de *Penaeus vannamei* : [http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es\\_whitelegshrimp.htm](http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_whitelegshrimp.htm)
- He, H., & Lawrence, A. (1993). Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 245-255.
- Heales, D. S., Vance, D. J., & Loneragan, N. R. (1996). Field observations of moult cycle, feeding behaviour, and diet of juvenile tiger prawns *Penaeus semisulcatus* in Embley River, Australia. *Marine ecology progress series* , 43-51.
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and chemistry: Role of free radicals. En K. B, *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation* (págs. 319-368). Wiley.
- Instituto Nacional de Pesca. (16 de marzo de 2018). *Acuacultura*. Obtenido de Camarón blanco del Pacífico: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-camaron-blanco-del-pacifico>
- Kanazawa, A. (1985). Nutrition of Penaeid Prawns and Shrimps. En Y. Taki, J. Primavera, & Llobrera, *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps* (págs. 123-130). Iloilo : SEAFDEC Aquaculture Department .

- Kashappa-Goud, D. (2016). Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation: An Overview of Recent Advances. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 107–158.
- Klaus, E., Flader, D., Hirche, F., & Brandsh, C. (2002). Excess Dietary Vitamin E Lowers the Activities of Antioxidative Enzymes in Erythrocytes of Rats Fed Salmon Oil. *The Journal of Nutrition*, 3400–3404.
- Koyani, R., Andrade, M., Quester, K., Gaytán, P., Huerta-Saquero, A., & Vazquez-Duhalt, R. (2018). Surface modification of protein enhances encapsulation in chitosan nanoparticles. *Applied Nanoscience*, 1197–1203.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., & Qin, J. G. (2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph, oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 80-86.
- Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., . . . Diao, X. (2016). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 234-240.
- Liang, Z., Liu, R., Zhao, D., Wang, L., Sun, M., Wang, M., & Song, L. (2016). Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 523-528.
- Lui, Y., Wang, W.-N., Wang, A.-L., Wang, J.-M., & Sun, R.-Y. (2007). Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture*, 351–358.
- Malvern instruments. (s.f.). *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*. Technical note.

- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, Á., Tovar-Ramírez, D., Hernández-Herrera, R., & Racotta, I. (2006). Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*, 633-640.
- Pal-Yu, B. (1994). Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiological reviews*, 139-155.
- R&D Systems a biotechne brand. (2020). *R&D Systems a biotechne brand*. Obtenido de FITC: [https://www.rndsystems.com/products/fitc\\_5440](https://www.rndsystems.com/products/fitc_5440)
- Racotta, I. S., & Palacios, E. (1998). Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 351-356.
- Racovita, S., Vasiliu, S., Popa, M., & Luca, C. (2009). Polysaccharides based on micro-and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie*, 709–718.
- Ramos, A. (2017). Dynamic Light Scattering Applied to Nanoparticle Characterization. En A. L. Da Róz, M. Ferreira, F. deLima-Leite, & O. Oliveira, *Nanocharacterization Techniques A volume in Micro and Nano Technologies* (págs. 99-110). Willian Andrew.
- Raymond, H., Lucu, C., Onken, H., & Weihrauch, D. (2012). Multiple Functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in physiology*.
- Rodger, A., & Sanders, K. (217). UV-Visible Absorption Spectroscopy, Biomacromolecular Applications. En *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (págs. 495-502). Coventry: Elsevier.
- Salame, P. H., Pawade, V. B., & Bhanvase, B. A. (2018). Characterization tools and techniques for nanomaterials. En P. H. Salame, V. B. Pawade, & B. A. Bhanvase, *Nanomaterials for Green Energy* (págs. 83-111). Mathew Deans.

- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. (2014). Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 1042-1065.
- Sandhu, R., Singh, N., Dhankhar, J., Gandhi, K., & Sharma, R. (2018). Dynamic light scattering (DLS) technique, principle, theoretical considerations and applications. En *Nanotechnological and Biochemical Techniques for Assessing the Quality and Safety of Milk and Milk Products* (págs. 135-137). ICAR-NDRI.
- Sandri, G., Bonferoni, M.-C., Rossi, S., Ferrari, F., Boselli, C., & Carla, C. (2010). Insulin-Loaded Nanoparticles Based on N-Trimethyl Chitosan: In Vitro (Caco-2 Model) and Ex Vivo (Excised Rat Jejunum, Duodenum, and Ileum) Evaluation of Penetration Enhancement Properties. *AAPS PharmSciTech*, 362–371.
- Santos, C., Tanaka, L., Wosniak, J., & Laurindo, F. (2009). Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation During the Unfolded Protein Response: Roles of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport, and NADPH Oxidase. *Mary Ann Liebert, Inc.*, 2409-2427.
- Sawtarie, N., Caia, Y., & Lapitskyab, Y. (2017). Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110-117.
- Tavares, M. (2002). Shrimps. En K. Carpenter, *The living marine resources of the western central atlantic* (Vol. I, págs. 252-291). Roma: FAO.
- Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., D'Antonio, P., Topoleski, T., & Payne, G. (2001). Enzyme Conjugation to the Polysaccharide Chitosan: Smart Biocatalysts and Biocatalytic Hydrogels. *Bioconjugate Chemistry*, 301-306.
- Wang, D., Li, F., Chi, F., & Xiang, J. (2012). Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. *Cell Stress and Chaperones* , 423–433.

- Wang, D., Li, F., Chi, Y., & Xiang, J. (2012). Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. *Cell Stress and Chaperones*, 423–433.
- Wang, W., & Xu, D. (1994). Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149-152.
- Wang, W.-N., Zhou, J., Wang, P., Tian, T.-T., Zheng, Y., Liu, Y., . . . Wang, A.-L. (2009). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 428–435.
- Wenjing Yan, W. C. (2007). Preparation of  $\alpha$ -tocopherol-chitosan nanoparticles/chitosan/montmorillonite film and the antioxidant efficiency on sliced dry-cured ham. *Food Control*, 132-138.
- Xu, Z., Regenstein, J. M., Xie, D., Lu, W., Ren, X., Yuan, J., & Mao, L. (2018). The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure. *Fish and Shellfish Immunology*, 564-571.
- Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., & Arpo, K. (2010). Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 292–297.
- Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., & Xu, D. (2012). Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 1027-1032.
- Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W., He, W., Wang, A., & Liu, Y. (2010). Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Thermal Biology*, 284-289.