



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas



**Síntesis y caracterización de hidrogeles híbridos para su
potencial aplicación en encapsulados de compuestos
bioactivos en acuicultura**

TESIS

Para obtener el grado de:
Biotechnólogo en acuicultura

Presenta:

Daniela Josaphat González Méndez

Directora: Dra. Marlene Nohemí Cardoza Contreras



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
CAMPUS ENSENADA**



**RELACIÓN DE SINODALES QUE INTEGRAN EL JURADO DE EXAMEN PROFESIONAL
CON LA TESIS**

**“Síntesis y caracterización de hidrogeles híbridos para su potencial aplicación en
encapsulados de compuestos bioactivos en acuicultura”**

**PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Licenciatura en biotecnología en acuicultura
PRESENTA:**

**Daniela Josaphat Gonzalez Mendez
354317**

27 de Octubre de 2023, a las 12:00 horas.

Asimismo, y habiendo revisado la aplicación del Art. 68 del R.G.E.P.E.P., las y los señores profesores fungirán los roles siguientes de acuerdo con lo señalado en el mismo artículo.

**Dra. Marlene Nohemí Cardoza Contreras
PRESIDENTE**

Sam
**Samuel Sánchez Serrano
SECRETARIO**

Natalie
**Natalie Millán Aguiñaga
SINODAL**

**ATENTAMENTE
“Por la Realización Plena del Ser”**

Victor
**DR. VICTOR ANTONIO ZAVALA HAMZ
SUBDIRECTOR**

C.c.p.- Archivo
C.c.p.- Minutario

DEDICATORIA

Para mis padres quienes con su apoyo, soporte y amor incondicional me permiten cumplir mis metas y sueños en la parte académica, laboral y personal.

A mis maestros por el apoyo e instrucción, así como su perseverancia y paciencia.

Para mi perrita Kira quien este año partió pero que la llevo en mi corazón.

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado”*

Albert Szent-Györgyi.

INDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
Características de hidrogeles	10
Salud animal	14
Fitogénicos	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos	19
METODOLOGÍA	19
1. Síntesis de nanopartículas de ZnO	19
1.1 Síntesis de nanovarillas	20
2. Síntesis de hidrogeles	21
2.1 Hidrogel de quitosano	21
2.1.2 Hidrogel híbrido de quitosano con nanovarillas de AgCl_ZnO	21
3. Caracterización de los Hidrogeles	21
3.1 Composición y morfología	21
3.1.2 Capacidad de hinchamiento	22
4. Cargado de los hidrogeles con fitogénicos	23
5. Evaluación de propiedades antimicrobianas de los hidrogeles cargados con fitogénicos y sin cargar	23
5.1 Antibiograma	23
5.1. 2 identificación de concentración mínima inhibitoria (CMI)	24
RESULTADOS	25
Morfología y composición de los hidrogeles	25
Capacidad de hinchamiento	28
Actividad antimicrobiana	31
Antibiograma de los diferentes tratamientos	31
Identificación de concentración mínima inhibitoria (CMI)	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS	37

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de liberación de fármacos de un hidrogel en respuesta a un estímulo del medio (Neamtu et al., 2017).....	10
Figura 2. Desacetilación de la quitina (Nilsen-Nygaard et al, 2015).....	12
Figura 3. Enfermedades con declaración obligatoria para el control de enfermedades, (Håstein,2000).....	15
Figura 4. Gotas de hidrogeles con capa delgada de Au/Pd sobre un trozo de oblea de silicio previo a la visualización de su morfología por SEM.....	24
Figura 5. Imágenes de SEM que muestran: (a-b) nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl; (c-d) gota y porción ampliada de hidrogel de Qs; gota y porción ampliada de hidrogel de Qs_ZnO	25
Figura 6. Espectro de EDS y composición química de los hidrogeles de Qs_ZnO.....	26
Figura 7. % de hinchamiento de los hidrogeles Qs y Qs_ZnO después de 10, 20, y 30 min de estar sumergidos en las soluciones acuosas de diferentes valores de pH. Recuadro inferior izquierdo: hidrogeles hinchados de Qs y Qs_ZnO después de estar inmersos 30 minutos en una solución de pH 2	28
Figura 8. Esquema representativo de la red polimérica de los hidrogeles híbridos de Qs_ZnO.....	29
Figura 9. Halos de inhibición obtenidos para cada tratamiento contra <i>Vibrio harveyi</i> (1.5×10^8 UFC/ml).....	30
Figura 10. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes tratamientos contra <i>Vibrio harveyi</i> . A) sexta dilución en donde se encontró un mínimo crecimiento con el tratamiento de Qs_ZnO; B) quinta dilución donde se obtuvo mínimo crecimiento con el tratamiento de Qs_ZnO_Lc y C) placa con inóculo de la quinta dilución donde se encontró el mínimo crecimiento con el tratamiento de Qs_ZnO_Cx	32
Tabla I. Tabla de relación de tratamientos y con respecto al pH sometido.....	31

RESUMEN

El uso de antibióticos es uno de los problemas actuales con mayor relevancia en la industria acuícola tanto para el bienestar animal como la inocuidad y seguridad alimentaria; por lo que no es de sorprender que sean de los primordiales problemas a tratar. Partiendo de esta premisa en la presente investigación se busca sustituir parcialmente el uso de antibióticos por sustancias menos agresivas e invasivas. La reciente rama de la nanotecnología ha permitido un gran avance en este rubro puesto que por la versatilidad de los componentes en relación al tamaño (nanométrico) lo hacen el agente perfecto para combatir a patógenos sin generar resistencia, así mismo la bioquímica ha permitido la extracción de compuestos bioactivos de plantas, denominados fitogénicos, los cuales poseen capacidades antibacterianas, antifúngicas, prebióticas, y probióticas. La biotecnología ha permitido coadyuvar estas dos vertientes en la elaboración de hidrogeles de quitosano, con el objetivo de generar no solo alternativas profilácticas si no para permitir vehículos para el transporte óptimo de fármacos en medidas terapéuticas. Los hidrogeles aquí trabajados son a base de una matriz polimérica de quitosano afiliados con nanovarillas de ZnO co-dopadas con Ag-Cl. Esta combinación permite una red estable y un comportamiento de hinchamiento mayor a pH ácidos, en específico se obtuvieron mejores resultados en pH 2 y pH 4. Infiriendo que los componentes inmersos dentro de esta matriz sean liberados cuando se encuentren en un ambiente ácido inferior a pH 5. Con lo anterior, se realizaron 3 experimentos, se probó la efectividad antimicrobiana del hidrogel con nanovarillas (Qs_ZnO), también del hidrogel con nanovarillas y Coxsan® (Qs_ZnO_Cx) y finalmente del hidrogel con nanovarillas y Licorol® (Qs_ZnO_Lc); con lo que se obtuvieron las dosis mínimas inhibitorias (MIC) para cada tratamiento. Obteniendo un MIC mayor para los tratamientos con fitogénicos (Licorol® y Coxsan®), con un valor de 12.5 µg/ml en ambos casos, y un valor de 6.25 µg g/ml para el tratamiento con nanovarillas, indicando que los fitogénicos parecieran interferir en la eficacia antibacteriana de las nanovarillas. Sin embargo, en la prueba de inhibición bacteriana el tratamiento que mejor imbibición presentó fue Qs_ZnO_Lc, lo que

parece indicar que hay una gran interacción entre los diferentes componentes de cada tratamiento, afectando el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles.

En conclusión, los hidrogeles de quitosano con nanovarillas de ZnO son funcionales para su potencial empleo; sin embargo, hace falta más investigación sobre la efectividad de liberación de fármacos o agentes profilácticos a emplear, así como del efecto de su aplicación directa en organismos acuícolas.

Palabras clave: Organismos acuícola, tratamiento, antibióticos, nanogeles, nanovarillas, fitogénicos, terapia y profilaxis.

INTRODUCCIÓN

La materia se encuentra constituida naturalmente por partículas, estas se pueden clasificar en base al diámetro que poseen. Las partículas consideradas gruesas se encuentran en un intervalo de entre 10, 000 y 2,500 nm, las finas en un rango que va de 2,500 a 100 nm, mientras que aquellas que se encuentran dentro de un rango de 1 a 100 nm se consideran partículas ultrafinas o se les asigna el prefijo nano. Así como el resto de la materia evidente a simple vista, los nanomateriales poseen propiedades fisicoquímicas únicas que brindan la posibilidad de acción diferente con respecto a sus análogos macroscópicos. Dichas conductas son determinadas por el comportamiento de propiedades cuánticas de cada material (Carrillo-González et al, 2014).

Estas propiedades fisicoquímicas les permiten a los nanomateriales contar una amplia gama de aplicaciones en diversos campos, como, por ejemplo: usos agrícolas (en el campo de biofertilizantes), en el ámbito biomédico, farmacéutico e incluso en el ámbito veterinario. Dentro de las aplicaciones en el ámbito biotecnológico, destaca la capacidad de administración controlada de fármacos y dosificación de enzimas y nutrientes, a través del desarrollo de diversos productos basados en nanomateriales (Nakal-Chidiac et al, 2018). En específico, las nanopartículas reticuladas en redes poliméricas como los *hidrogeles* permiten a los científicos emplearlas en diversas áreas, siendo uno de los más importantes el transporte de diversos compuestos activos para tratamiento de diversas enfermedades tales como el cáncer (Carrillo-González et al, 2014).

Los hidrogeles, son compuestos poliméricos formados generalmente por puentes de hidrógeno entre polímeros que poseen grupos hidrofílicos (Escalona-Rayo & Quintanar-Guerrero, 2014) y/o por interacciones electrostáticas. Los polímeros empleados para la elaboración de estos pueden ser de origen natural o bien de origen sintético (Suárez-Carrillo, 2019), dentro de los primeros se tienen a la quitina, quitosano, albúmina, ácido hialurónico y alginato, entre otros. En cuanto a los

polímeros sintéticos están el poli (N-vinilcaprolactama), poli (N-isopropilacrilamida), poli (ácido N-isopropilacrilamida), etc. (Suárez-Carrillo, 2019).

Una de las características más importantes que poseen los hidrogeles es su capacidad de absorber grandes cantidades de agua lo que permite una dilatación en torno a su estructura, por ello es por lo que han sido empleadas como vehículo para transporte y liberación de fármacos (Ramirez et al., 2016). Los hidrogeles también han demostrado ser biocompatibles debido a la misma característica de poseer una gran cantidad de agua y es esta interacción lo que permite esta biocompatibilidad con organismos vivos (Mauri et al. 2021).

Características de hidrogeles

Los hidrogeles se pueden clasificar en dos grandes grupos acorde al tipo de enlaces que poseen (Escalona-Rayo & Quintanar-Guerrero, 2014):

- a) **Hidrogeles con enlaces no covalentes** (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas) dan pie a una red reticulada reversible.
- b) **Hidrogeles con enlaces covalentes**, se les conoce como hidrogeles químicamente reticulados, estos suelen ser estructuras permanentes

Los hidrogeles pueden ser *sensibles a estímulos*, es decir, el hinchamiento o expansión del material será determinado por un estímulo externo tal como el pH, enzimas, luz, o campos electromagnéticos (Figura 1). Mientras que los hidrogeles no sensibles a estímulos simplemente tienen la capacidad de expandirse por su capacidad de absorción de agua.

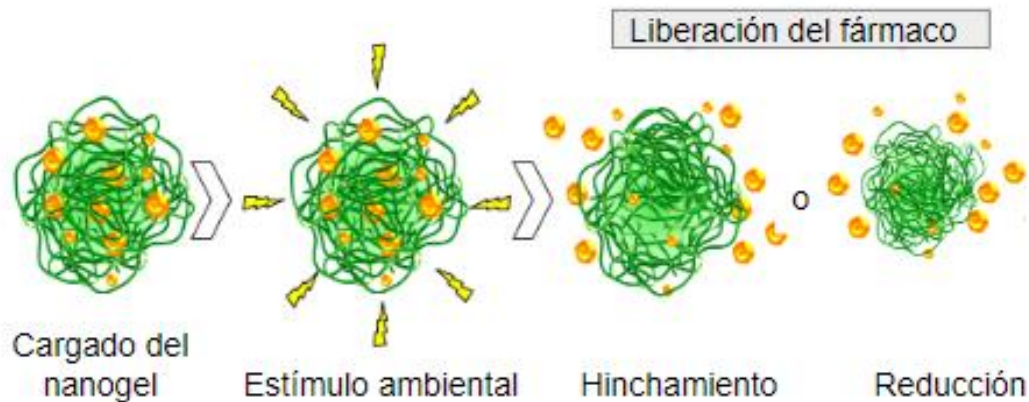


Figura 1. Mecanismo de liberación de fármacos de un hidrogel en respuesta a un estímulo del medio (Neamtu et al., 2017).

Por otro lado, los hidrogeles pueden ser también clasificados por el tipo de carga que poseen en *aniónicos*, *catiónicos* y *anfóteros* (Escalona-Rayo & Quintanar-Guerrero, 2014).

En los últimos años se ha indagado las diversas aplicaciones y configuraciones de los hidrogeles buscando ampliar y potenciar su campo de acción en el área biomédica. Una de las configuraciones de los hidrogeles que tiene mayor potencial son los hidrogeles híbridos (HH). Los HH permiten un ensamblaje entre dos compuestos de naturaleza física diferente, que potencia las características fisicoquímicas de los propios materiales (Ramirez, et al, 2015); es decir que además de la parte polimérica (fase orgánica del hidrogel), se implementa una fase inorgánica que interactúa con la primera permitiendo la sinergia de ambos materiales sin alterar las características individuales de los mismos (Pirela, et al, 2014), esta sinergia se puede dar de forma física o química, en la formación de puentes de hidrógeno o enlaces químicos o bien formando una nueva estructura, lo que permite unir características de los materiales del que está compuesto el hidrogel (Ramirez, et al, 2015).

La forma más común de sintetizar este tipo de materiales es la polimerización por adición, en donde la parte inorgánica en fase acuosa se agrega a la fase orgánica

(Ramírez, et al, 2016). En este mecanismo las moléculas correspondientes a la fase orgánica se ven afectadas por cambios en el medio (presión, temperatura o catalizador) que produce una reacción de ruptura en los dobles enlaces y da pie a que se den uniones entre electrones libres y se formen cadenas poliméricas con los materiales disponibles dentro del medio. Esta propagación termina cuando se combinan dos cadenas con electrones libres o bien cuando se produce una reacción con radicales libres finalizadores. Esta conjunción proporciona propiedades únicas al compuesto, como, por ejemplo, potenciar diversas características como: capacidad de hinchamiento, capacidad de remover metales pesados, cargar con fármacos y liberar de manera controlada estos compuestos hasta al momento de la interacción con otros materiales (Ramírez, et al, 2016). Esta última característica es posible gracias a que al ser híbridos pueden sintetizarse con elementos o grupos químicos que son susceptibles a cambios de pH (grupos ionizables) o termosensibles (susceptibles a modificarse por cambios en temperatura) (Ramírez, et al, 2016).

La capacidad que posea el HH para interactuar con el ambiente va a depender de cómo se entrelaza química y físicamente con el compuesto inorgánico con el que sucede la sinergia. Por ello, el estudio de diversos acoplamientos, su caracterización y descripción morfológica, así como la descripción en torno a su comportamiento en un medio se ha intensificado en el ámbito científico. De hecho, los hidrogeles híbridos son grandes aspirantes a ser materiales teragnósticos, es decir materiales que funcionan como terapia y a la vez pueden realizar algún diagnóstico. Uno de los materiales orgánicos poliméricos más usados dada su naturaleza y maleabilidad en torno a diferentes campos de aplicación es el quitosano, este polímero es el producto de la desacetilación de la quitina (Figura 2). El quitosano es un compuesto más reactivo que la quitina debido a la presencia de grupos hidroxilo y grupos amino en cada unidad desacetilada. Estos grupos reactivos tienen la posibilidad de estar sujetos a modificaciones químicas que pueden a su vez modificar las propiedades físicas y químicas del quitosano. En este sentido, el grupo amino del quitosano puede ser ionizado ($pK_a=6.5$) convirtiendo al quitosano en un polielectrolito catiónico al estar en soluciones ácidas, ya que sus grupos amino son protonados (-

NH₂ a -NH₃⁺). Esto ocasiona que, a diferencia de la quitina, el quitosano sea soluble en soluciones acuosas ácidas. Ácidos orgánicos diluidos como el ácido acético, láctico, fórmico y otros, forman sales solubles con el quitosano, por lo que son ideales para disolverlo (Bautista-Baños, et al, 2017).

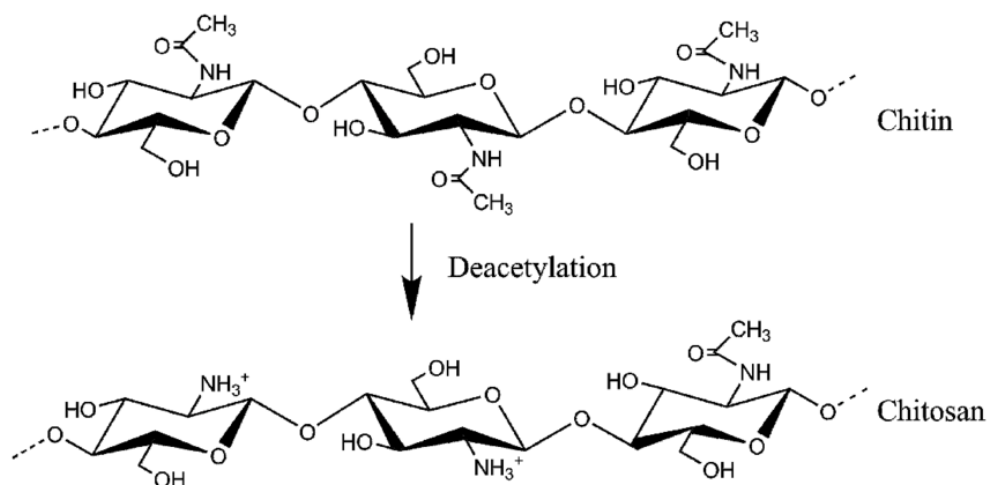


Figura 2. Desacetilación de la quitina (Nilsen-Nygaard et al, 2015).

Además de lo anterior, el quitosano es un material considerado biodegradable y altamente biocompatible, no presenta efectos secundarios ni toxicidad al interactuar con agentes biológicos, por ello es por lo que se ha empleado como agente condensador y liberador inteligente en el transporte activo de fármacos (Nasrollahzadeh et al., 2017). Otra característica positiva del quitosano es que posee propiedades bacteriostáticas y mucoadhesivas (Saeed et al. 2020). Debido a esto, el quitosano es considerado una excelente opción como material para sintetizar hidrogeles con potencial para el transporte de compuestos bioactivos.

Ahora bien, como ya se mencionó anteriormente, generalmente en la síntesis de hidrogeles híbridos además de la parte polimérica (orgánica) también se emplea una parte inorgánica que consiste comúnmente en nanopartículas o

nanoestructuras de materiales inorgánicos. Dentro de los posibles nanomateriales que se pueden emplear para formar el HH, destaca el óxido de zinc (ZnO), ya que ha mostrado tener propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, además, según la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) es una sustancia segura e inocua, y se considera una partícula biocompatible si su tamaño es inferior a 100 nm (Muthuraman, A; Kaur, J, 2017). También ha mostrado poseer propiedades anticancerígenas, antioxidantes, y antiinflamatorias (Jiang, 2018).

Algunos autores proponen que las propiedades antimicrobianas surgen a raíz de las fuerzas electrostáticas que genera el elemento contra la superficie de la membrana microbiana que se posa (Muthuraman, A; Kaur, J, 2017). Otro punto favorable, es que el ZnO tiene la capacidad de ser dopado con otros materiales para potenciar sus características (Cardoza-Contreras et al, 2019). Uno de los elementos dopantes del ZnO puede ser la plata, ya que se ha empleado para tratar afecciones en seres humanos desde antes que se descubrieran los antibióticos como la penicilina (Día, 2018). En avances más recientes, la plata a tamaño nanométrico se ha descubierto que posee características antisépticas, antimicrobianas, antimicóticos, antivirales y no genera resistencia, a diferencia de algunos antibióticos. Todo esto ha llamado la atención para el empleo de estas nanopartículas en tratamientos para ciertas enfermedades (Rai, et al, 2014).

Debido a todo lo anterior, el desarrollo de materiales híbridos biocompatibles que permitan la potencialización de sus efectos antimicrobianos posibilita la introducción de estos en el ámbito biomédico y veterinario para el tratamiento de diversas patologías (Betancur et al, 2016).

Salud animal

En los organismos acuáticos, la mayoría poseen un sistema inmune innato o inespecífico, en donde tienen la capacidad de reconocer al patógeno, pero no de crear una memoria contra este. Sin embargo, hay organismos acuáticos como los peces óseos que cuentan con la capacidad de generar cierta memoria ante

patógenos (Pradipta, et al 2014). Es decir, cuando un agente extraño ataca o se introduce dentro del sistema del organismo, el antígeno provoca que el sistema inmune produzca anticuerpos contra ese agente extraño (Martin & Król, 2017).

En la industria acuícola cada vez más se realizan esfuerzos en los ámbitos de salud animal y alimentación para lograr que ésta sea una actividad sustentable, que no dañe el ambiente y mucho menos la salud del ser humano. Sin embargo, con el aumento de la producción se vienen diversos tipos de prácticas en las cuales se propicia una mayor densidad en cultivos. Estas densidades son causa de aglutinamiento, reducción de oxígeno y situaciones estresantes que generan el desarrollo de ciertas patologías en organismos, estas van desde enfermedades, malnutrición y enfermedades de origen biológico. Los patógenos más peligrosos en acuicultura son aquellos que poseen un alto grado de patogenicidad y tienen la capacidad de ser zoonóticos (capacidad de transmitir la enfermedad de los animales a los seres humanos). Dentro de estos microorganismos se tiene a las diversas especies de los géneros *Aeromonas*, *Vibrios* y *Streptococcus iniae* (Cabello, 2004). Estos son microorganismos que se buscan erradicar o mantener en un nivel controlado para evitar la infección de los organismos de cultivo y con ello provocar no solo pérdidas monetarias, si no afectaciones en la salud pública. Se tienen estimadas pérdidas de 150 millones de dólares anuales por enfermedades causadas por bacterias en la piscicultura a nivel mundial (PROAQUA, 2021). En la figura 3 se muestra un cuadro en donde se estipulan las enfermedades en peces que se tienen que declarar en formato obligatorio por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Virus	Bacterias	Hongos	Parásitos
Virosis del bague de canal	Renibacteriosis <i>Renibacterium salmoninarum</i>	Infección por <i>Branchiomyce</i> spp.	<i>Gyrodactylus</i> spp.
Necrosis hematopoyética epizoótica	Colibacilosis	Síndrome ulcerante epizoótico	Enfermedad renal proliferante
Síndrome del cuerpo de inclusión eritrocítica	Septicemia entérica (<i>Edwardsiella ictaluri</i>)	Infección por <i>Ichthyophonus hoferi</i>	Ligulosis
Herpesvirosis	Infección por <i>Edwardsiella</i> (<i>Edwardsiella tarda</i>)	<i>Saprolegnia</i> spp.	Filometrosis
Necrosis hematopoyética infecciosa	Infección por <i>Aeromonas salmonicida</i> atípicas		<i>Myxobolus cerebralis</i> (enfermedad del tambaleo)
Necrosis pancreática infecciosa	Furunculosis (<i>Aeromonas salmonicida</i> subespecie <i>salmonicida</i>)		Lentosporidiosis
Anemia infecciosa del salmón	Infección por <i>Mycobacterium</i> spp.		Difilobotriosis
Herpesvirosis del salmón <i>masou</i>	Pasteurelisis (<i>Pasteurella piscicida</i>)		<i>Ceratomyxa shasta</i>
Enfermedad del páncreas	Piscirickettsiosis (<i>Piscirickettsia salmonis</i>)		Ictiofiriasis
Infecciones por rhabdovirus	Estreptococosis (<i>Streptococcus</i> spp.)		<i>Henneguya salmincola</i>
Viremia primaveral de la carpa	Vibriosis de aguas frías (<i>Vibrio salmonicida</i>)		<i>Kudoa thyrsites</i>
Necrosis eritrocítica vírica	Vibriosis (<i>Vibrio anguillarum</i>)		<i>Loma salmonea</i>
Septicemia hemorrágica viral	Yersiniosis (enfermedad de la boca roja)		<i>Enterocitoozon</i>
Necrosis nerviosa viral			Lerneosis

Figura 3. Enfermedades con declaración obligatoria para el control de enfermedades

Fuente: (Håstein,2000).

Es por todas estas enfermedades, que en la acuicultura se emplean antibióticos durante la producción y elaboración. Sin embargo, el consumo no intencionado de antibióticos en los residuos de alimentos provoca el desarrollo de resistencia a los mismos en bacterias que son patógenas para los seres humanos; lo que constituye otro problema importante al que no se ha prestado todavía la debida atención (FAO, 2022). Se considera que el desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias patógenas es uno de los riesgos más graves para la salud humana a nivel mundial. Esto dado que las bacterias al adquirir resistencia a los antibióticos a los que antes eran susceptibles provocan la ineficacia de los antibióticos para tratar determinadas enfermedades microbianas en los seres humanos (Balbuena-

Rivarola, et al, 2011). Debido a esto, es necesario detener y eliminar los agentes infecciosos sin propagar el patrón de resistencia de los antibióticos.

Fitogénicos

Existen compuestos llamados inmunoestimulantes, los cuales son sustancias que interfieren en los procesos inmunológicos a nivel celular, permitiendo una mejor respuesta celular al momento de verse en una situación de infección (Martin & Król, 2017). Los inmunoestimulantes son compuestos bioactivos que generan un efecto beneficioso sobre una o más funciones dentro del organismo, estos poseen una influencia en las actividades celulares y fisiológicas tras su ingesta, (Herrera et al., 2014). Estas sustancias son adquiridas de manera natural de los alimentos y en los extractos de ciertas plantas (fitogénicos), generan un aumento en la reacción de la primera línea de defensa no específica en peces protegiéndose así de manera más eficiente en contra de bacterias, virus, hongos y parásitos (Ngo Van, 2015).

Algunos de estos inmunoestimulantes son extractos de plantas que poseen compuestos bioactivos y reciben el nombre de fitogénicos, estos poseen capacidades antiestrés, antioxidantes e inmunoestimuladores (Karizoo, 2021); además de promover el crecimiento y la salud en general del organismo. También se han empleado como elementos complementarios en dietas para la obtención de un óptimo sistema inmunitario en animales (Yang et al., 2015). Así mismo, los esfuerzos de las investigaciones realizadas con diversos compuestos bioactivos han llevado a la combinación de fitogénicos como el extracto de aceite de clavo, carvacrol, aceite de orégano, eugenol, etc. para combatir bacterias como *Vibrio spp*, *Vibrio harveyi*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, etc. (Yang et al., 2015). Sin embargo, aún hay retos en la viabilidad y seguridad para implementar los fitogénicos en alimentos para los organismos acuícolas. Ya que éstos al ser extractos de diversas plantas tienden a interactuar con los compuestos del alimento y a producir olores y sabores que no son atractivos para los animales de cultivo; además, se ha demostrado que en grandes cantidades tienden a ser tóxicos para los organismos, afectando a nivel fisiológico a estos. Es por ello, que

generalmente se emplea una dosis mínima inhibitoria de cada compuesto (Yang et al, 2015).

En acuicultura, el empleo de estos compuestos bioactivos ha sido un gran avance, ya que esta alternativa busca suplir los aditamentos químicos (antibióticos) y permitir un producto más amable con el medio ambiente e inocuo para el consumidor (Tacias-Pascacio et al., 2021).

Una de las posibilidades es emplear hidrogeles con propiedades antimicrobianas para la entrega de fármacos y otros compuestos bioactivos en acuicultura. Esto debido a que poseen características únicas, como la entrega controlada de los compuestos en respuesta a un estímulo; sin embargo, su potencial uso en este ámbito aún no ha sido explorado completamente (Swain, 2014; Yang et al., 2015). Es por todo lo mencionado anteriormente, que en este proyecto de investigación se propone sintetizar y caracterizar hidrogeles híbridos antimicrobianos basados en bionanocompositos de quitosano y nanovarillas (nv's) de ZnO dopadas con Ag y Cl, cargarlos con fitogenéticos y determinar sus propiedades antimicrobianas, para evaluar su posible empleo en el encapsulado de compuestos bioactivos en acuicultura.

HIPÓTESIS

Los hidrogeles basados de quitosano y nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl pueden cargar y liberar fitogénicos de forma controlada al ser sensibles a cambios de pH, además de poseer un gran potencial antimicrobiano.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Sintetizar y caracterizar hidrogeles híbridos basados en quitosano y nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl.

Objetivos específicos

- Caracterizar la morfología, composición y capacidad de hinchamiento de los hidrogeles.
- Cargar los hidrogeles híbridos con fitogénicos.
- Evaluar propiedades antimicrobianas de los hidrogeles híbridos sintetizados sin cargar y cargados con fitogénicos ante bacterias patógenas tipo *Vibrio*.

METODOLOGÍA

1. Síntesis de nanopartículas de ZnO

La síntesis de nanopartículas de ZnO se llevó a cabo bajo el procedimiento descrito por Cardoza-Contreras et al. 2019, en donde se preparó una solución 1 mM de acetato de zinc ($Zn(CH_3COO)_2$) disuelto en 20 mL de 2-Propanol ($CH_3-CH(OH)-CH_3$) con agitación constante a una temperatura de 50 °C. Una vez homogenizada la solución, se adicionaron 230 ml más de 2-propanol a temperatura ambiente. Posteriormente, se vertió gota a gota 20 ml de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 20 mM y finalmente se sometió a baño maría a 60°C durante 60 minutos. (Cardoza-Contreras et al, 2019). Las nanopartículas de ZnO sintetizadas sirvieron

como centros de nucleación en los substratos de PE donde crecieron las nanovarillas de ZnO.

1.1 Síntesis de nanovarillas

Para la síntesis de nanovarillas se llevó a cabo el procedimiento descrito por Cardoza-Contreras 2019, se prepararon substratos de polietileno (PE), previamente tratados en una solución de dodecanotiol al 1% en metanol en baño maría hasta alcanzar los 100 °C por 15 minutos. Los substratos se sumergieron en la solución coloidal de nanopartículas de ZnO en 2-propanol, y después se colocaron sobre vidrios de reloj en una plancha de calentamiento a 150°C para que se evaporara el solvente.

Posteriormente, se preparó una solución precursora equimolar 3 mM de nitrato de zinc hexahidratado ($Zn(NO_3)_2$) y hexametilentetramina ($C_6H_{12}N_4$) en agua destilada. Después se sumergieron dos substratos de PE funcionalizados con np's de ZnO en la solución precursora. Finalmente, la solución precursora con los substratos de PE fue sometida a un tratamiento térmico por microondas en un equipo de marca comercial (modelo WM1311DS, Whirlpool, Apodaca, México) durante 60 minutos a 300W.

Mientras que las nanovarillas de ZnO dopadas con 2% at. de Ag y Cl (porcentaje de átomos del dopante con respecto a los átomos del ZnO) ($AgCl_ZnO$) se sintetizaron incorporando nitrato de plata ($AgNO_3$) y HCl 0.1 N (añadiendo lo suficiente para ajustar a un pH de 5.5 la solución) a la solución precursora antes de someterla al tratamiento por microondas.

2.Síntesis de hidrogeles

2.1 Hidrogel de quitosano

Se preparó una solución de 3.3 μM de quitosano en 20 ml de agua destilada y se adicionó un 2% (v/v) de ácido acético (CH_3COOH) con agitación constante. La solución se continuó agitando hasta la obtención de una solución homogénea y viscosa. Después, se preparó una solución acuosa de tripolifosfato de sodio (TPP) al 0.1% ajustada a un pH de 3 con HCl. La solución de TPP se vierte dentro de la solución viscosa de quitosano con agitación hasta obtener una coloración opalescente. Por último, se vertió gota a gota la solución opalescente obtenida sobre una superficie plana, y se dejó secar al ambiente durante 24 horas.

2.1.2 Hidrogel híbrido de quitosano con nanovarillas de AgCl_ZnO

El procedimiento de HH fue muy similar al de la síntesis del HH de quitosano, con la única diferencia que se agregó un 5% peso de nanovarillas de ZnO con respecto al quitosano en la solución de quitosano antes de añadir el ácido acético.

3.Caracterización de los Hidrogeles

3.1 Composición y morfología

Los hidrogeles sintetizados tuvieron que ser previamente recubiertos con una capa delgada de Au/Pd dentro de una cámara evaporadora al vacío para poder observar su morfología. Posteriormente, los hidrogeles se colocaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo JEOL-JIB 4500. Así mismo, se pudo estudiar la composición de los hidrogeles in situ en el SEM empleando microanálisis de rayos X de dispersión de energía (EDS) en el equipo OXFORD INCA Energy System a una tensión de aceleración de electrones de 15kV.

3.1.2 Capacidad de hinchamiento

Para evaluar que tanta solución acuosa se puede cargar en los hidrogeles sintetizados se realizó el siguiente procedimiento: se prepara una serie de 5 soluciones acuosas con valores ajustados de pH de 2, 4, 6, 7 y 8 (Con NaOH y HCl). Después, se toma una cierta cantidad de cada hidrogel sintetizado y se pesa (esto por triplicado), para posteriormente sumergir cada uno de ellos en las soluciones a diferentes pH previamente preparadas. Posteriormente, se remueve cada hidrogel de las soluciones acuosas (el exceso de agua en la superficie del hidrogel es removida con toallitas secas) y pesado cada 10 minutos hasta alcanzar los 30 minutos. Finalmente, el porcentaje de hinchamiento se determina mediante la siguiente expresión:

$$\text{Swelling \%} = ((W-W_0)/W_0) \times 100$$

Donde:

W: peso del hidrogel

W₀: peso inicial del hidrogel

El análisis estadístico para evaluar la capacidad de cargado de los hidrogeles consistió en un diseño factorial de dos factores (composición del hidrogel y pH) y se aplicó con 2 y 5 niveles respectivamente, en el que se evaluó por triplicado la variable dependiente porcentaje de hinchamiento. Para realizar el análisis se utilizó el software IBM SPSS Statistics 26 y consistió en un ANOVA de dos vías con $\alpha=0.05$; donde los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron corroborados por la prueba de Shapiro Wills y Levene respectivamente. Para verificar las diferencias estadísticas entre los niveles de pH se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey con una significancia de 0.05.

4. Cargado de los hidrogeles con fitogénicos

Para obtener hidrogeles cargados con fitogénicos, al momento de preparar la solución viscosa de quitosano se añadió un 0.1% de fitogénicos. El resto de la síntesis permanece invariable. Los fitogénicos empleados fueron Licorol® (Lc) y Coxsan® (Cx) de Laboratorios Karizoo. Los componentes principales de estos fitogénicos son mentol y eucaliptol para el caso del Lc; carvacrol, timol y alicinina en el caso del Cx.

De tal forma que se obtuvieron los siguientes tratamientos:

- Hidrogel de quitosano (Qs)
- Hidrogel de quitosano cargado con Cx (Qs_Cx)
- Hidrogel de quitosano cargado con Lc (Qs_Lc)
- Hidrogel de quitosano con nanovarillas de AgCl_ZnO (Qs_ZnO)
- Hidrogel de quitosano con nanovarillas de AgCl_ZnO cargado con Cx (Qs_ZnO_Cx)
- Hidrogel de quitosano con nanovarillas de AgCl_ZnO cargado con Lc (Qs_ZnO_Lc)

5. Evaluación de propiedades antimicrobianas de los hidrogeles cargados con fitogénicos y sin cargar

5.1 Antibiograma

El antibiograma para determinar la susceptibilidad de la bacteria *Vibrio harveyi* a los diferentes tratamientos de hidrogeles preparados se realizó mediante el siguiente procedimiento: se preparó el medio de cultivo Mueller Hinton y se colocó el mismo volumen en placas de Petri. Posteriormente en cada placa se sembraron 25 µl de inóculo a una concentración aproximada a de 1.5×10^8 UFC por mililitro o 0.5 en la escala de McFarland de la bacteria *Vibrio harveyi*.

Se colocaron 25 µl de cada tratamiento directamente sobre el medio de cultivo después de la inoculación (una caja para cada tratamiento por triplicado) y se dejaron incubar las placas por 24 h a 35 °C para observar el crecimiento. Para cada tratamiento se evaluó el halo de inhibición con vernier empleando centímetros como unidad de medición.

5.1. 2 identificación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se realizó el siguiente procedimiento para determinar la concentración mínima de cada HH preparado a la cual no hay crecimiento de la bacteria *Vibrio harveyi* después de 24 h de incubación. Se colocaron concentraciones decrecientes de cada HH sintetizado dentro de 10 tubos Eppendorf (dilución seriada), los cuales se encontraban con un volumen inicial de 200 µl de medio Mueller Hinton inoculado con la bacteria *Vibrio harveyi* (1×10^8 CFU/ml) en cada tubo y se colocaron 200 iniciales él cual se fue diluyendo del tubo número 1 al tubo 10 y se incubó por 24 horas. Después de la incubación, se observó la turbidez de cada uno de los tubos y se tomaron 100 µl de los tres tubos previos al tubo en el que se observó mayor turbidez y se colocaron en placas Petri. Las placas fueron incubadas a 35°C por 24 horas. Después de incubar, fueron contadas las UFC de cada placa para determinar la CMI de cada HH. Se colocó un control el cual consistió en sembrar masivamente el inóculo de bacteria sin ningún tratamiento.

RESULTADOS

Morfología y composición de los hidrogeles

La morfología de los hidrogeles pudo ser observada gracias al recubrimiento con Au/Pd de las muestras, debido a que es un material conductor (Figura 5). Se observaron en arreglos de forma aguja formados por varillas con diámetros de 300 nm a 1 μm (Figura 5a y 5b). Mientras que para el caso de los hidrogeles de Qs y Qs_ZnO, resultaron en microgotas semiesféricas con forma irregular (Figure 5c-5f). Las dimensiones de las estructuras en forma de microgotas están en el intervalo de 2-20 μm .

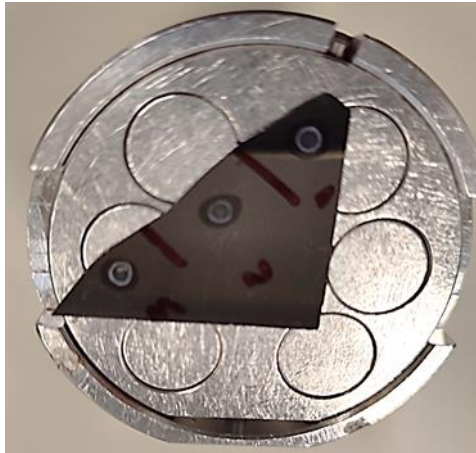


Figura 4. Gotas de hidrogeles con capa delgada de Au/Pd sobre un trozo de oblea de silicio previo a la visualización de su morfología por SEM.

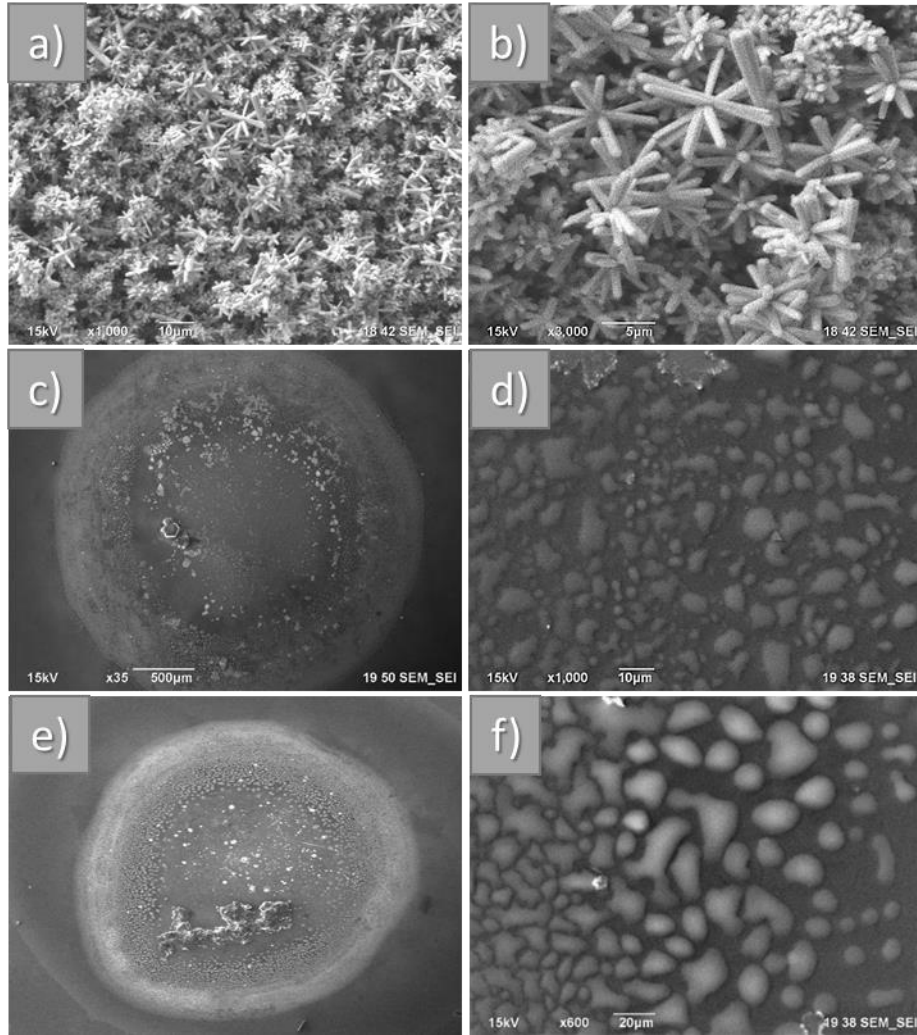


Figura 5. Imágenes de SEM que muestran: (a-b) nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl; (c-d) gota y porción amplificada de hidrogel de Qs; gota y porción amplificada de hidrogel de Qs_ZnO.

En cuanto al análisis de la composición química de los hidrogeles sintetizados, se detectaron elementos como el C, Oxígeno y Zinc, así como otros elementos derivados de su síntesis (Figura 6).

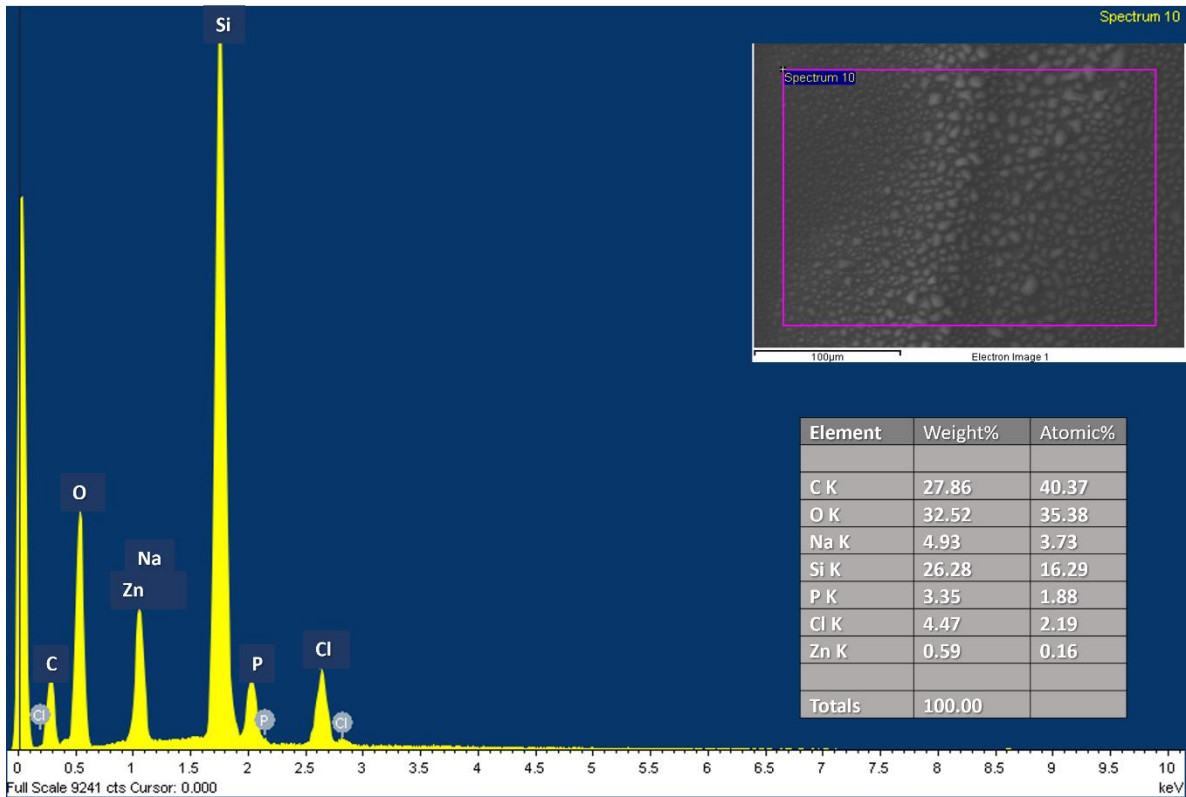


Figura 6. Espectro de EDS y composición química de los hidrogeles de Qs_ZnO

Tanto las imágenes obtenidas del SEM como el análisis por EDS permiten comprobar que dentro de la matriz del hidrogel hay elementos procedentes de las nanovarillas ya que estas están embebidas dentro de dicha matriz polimérica.

Capacidad de hinchamiento

Acorde a los resultados de capacidad de hinchamiento (Figura 7) hay una diferencia significativa entre las medias del porcentaje de hinchamiento a los diferentes valores de pH ($p < 0.05$) para ambas composiciones del hidrogel. De lo anterior destaca que tanto el hidrogel de Qs como el Qs_ZnO pueden retener más solución a pH ácidos. Mientras que las múltiples comparaciones por el método de Turkey arrojaron que la capacidad de hinchamiento a los valores de pH de 6, 7 y 8 no son estadísticamente diferentes ($p > 0.05$). Sin embargo, a soluciones acuosas ácidas (pH de 6, 4 y 2) el hidrogel Qs_ZnO tiene mayor capacidad de hinchamiento que el hidrogel de Qs únicamente. En la figura se esquematiza las interacciones iónicas con los grupos amino que se tienen de las nanovarillas (ZnO) y el quitosano.

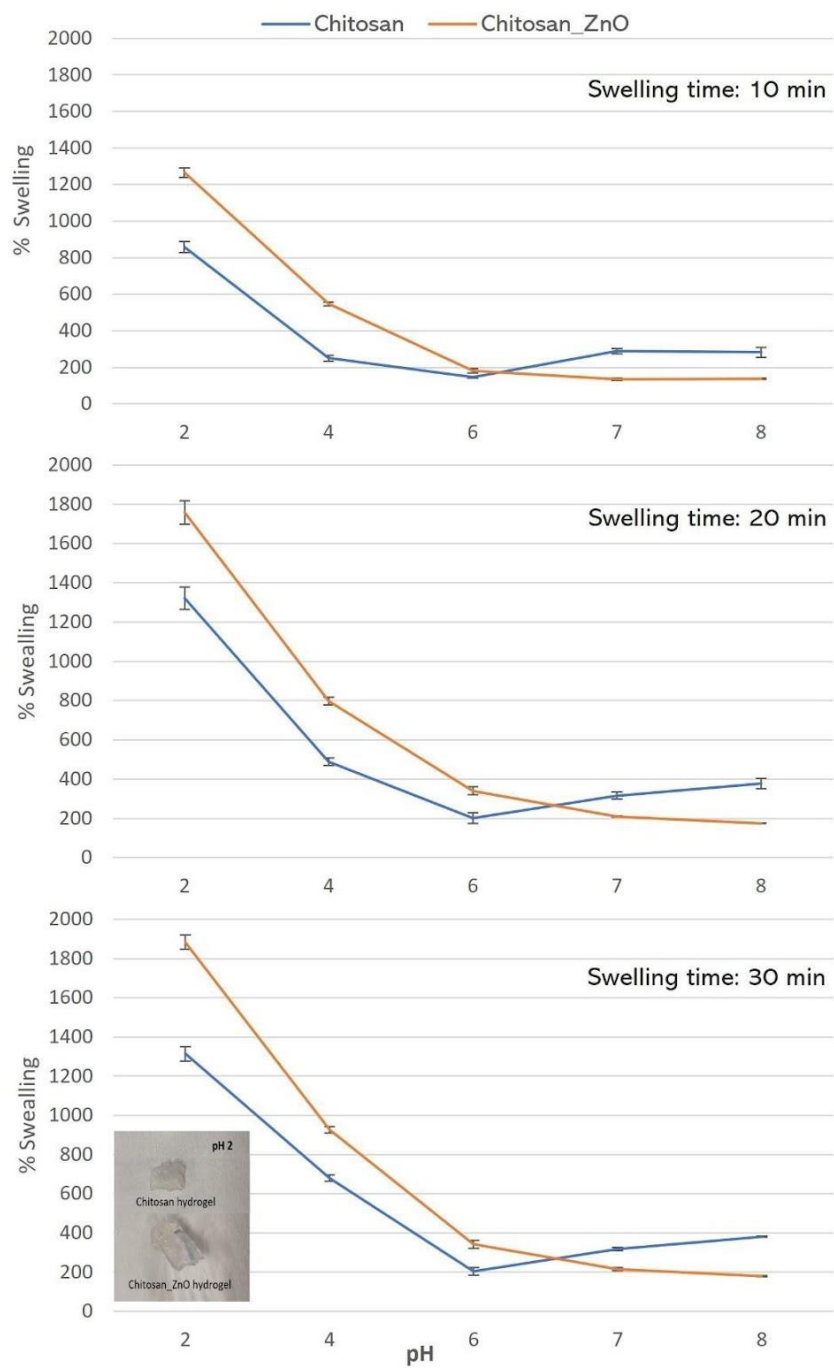


Figura 7. Porcentaje de hinchamiento (% Swelling) de los hidrogeles Qs y Qs_ZnO después de 10, 20, y 30 min de estar sumergidos en las soluciones acuosas de diferentes valores de pH. Recuadro inferior izquierdo: hidrogeles hinchados de Qs y Qs_ZnO después de estar inmersos 30 minutos en una solución de pH 2.

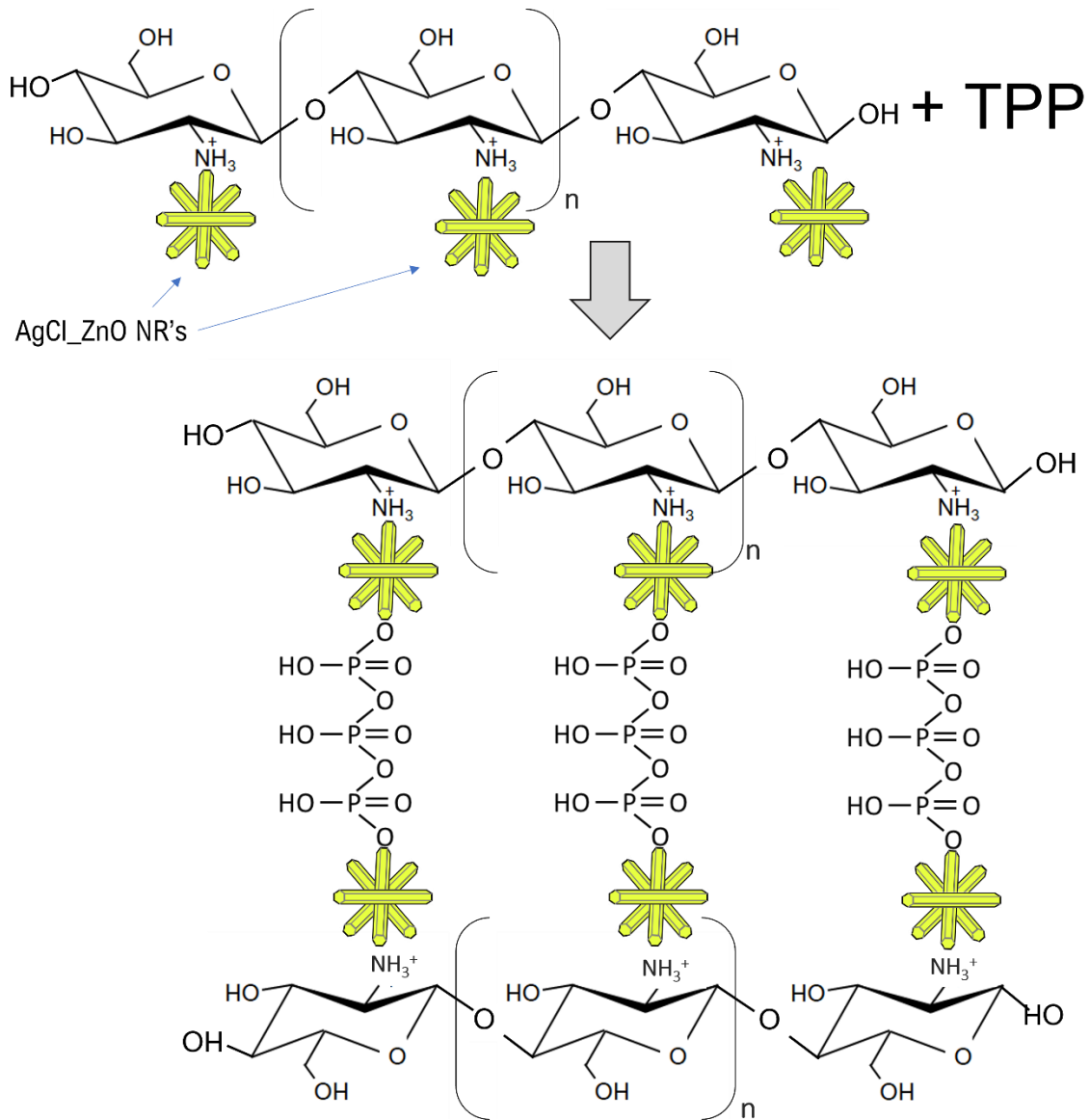


Figura 8. Esquema representativo de la red polimérica de los hidrogeles híbridos de Qs_ZnO.

Actividad antimicrobiana

Antibiograma de los diferentes tratamientos

Este análisis se realizó por réplica en tres diferentes concentraciones de pH y se colocó el tratamiento directamente en el medio, sin la realización de pozo de difusión ni el empleo de discos para antibiogramas, donde se realizó la siembra masiva de la cepa de *Vibrio harveyi* a una concentración de 1.5×10^8 . En la figura 9 se observan los halos obtenidos por cada tratamiento, y el blanco control en el cual no se colocó ninguna otra variable más que la cepa de *Vibrio harveyi*. También se muestra en la tabla I, que el tratamiento con Qs_ZnO_Lc afecta en mayor medida a la capacidad de inhibición del hidrogel de Qs_ZnO que el Qs_ZnO_Cx.

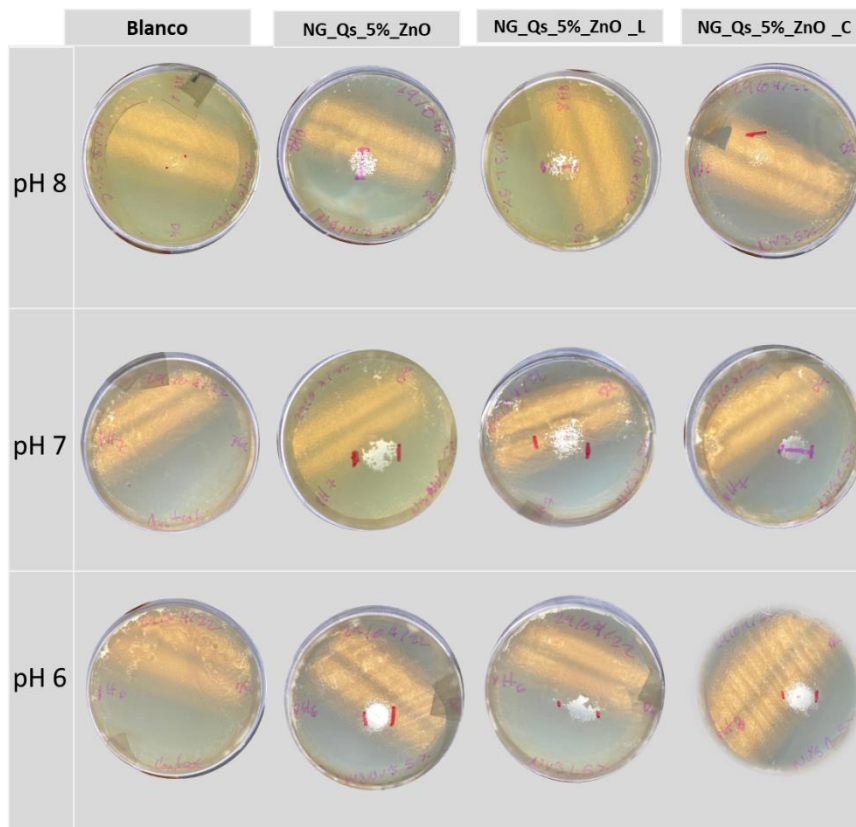


Figura 9. Halos de inhibición obtenidos para cada tratamiento contra *Vibrio harveyi* (1×10^8 UFC/ml).

Tabla I. Tabla de relación de tratamientos y con respecto al pH sometido

Tratamiento	Diámetro de zonas de inhibición (cm)		
	pH 6	pH 7	pH 8
Qs_ZnO	0.90±0.26	1.53±0.15	0.83±0.4
Qs_ZnO_Cx	0.87±0.25	0.83±0.4	0.6±0.30
Qs_ZnO_Lc	1.43±0.06	1.43±0.07	1.33±0.25

Identificación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración más baja de hidrogeles a la que no hay un crecimiento visible de *Vibrio harveyi* se muestra en la Figura 10. Los hidrogeles cargados con fitogénicos fueron efectivos a una concentración mayor de tratamiento, 12,5 µg/ml como se observan en los incisos b y c, mientras que el hidrogel sin cargar fue efectivo a una concentración de 6,25 µg/ml. Esto nos indica que se necesita una concentración menor de tratamiento en Qs_ZnO para que este tenga un efecto bactericida. Estos resultados mostraron que la actividad antimicrobiana de los hidrogeles híbridos Qs_ZnO se ve afectada cuando se cargan con fitogénicos.

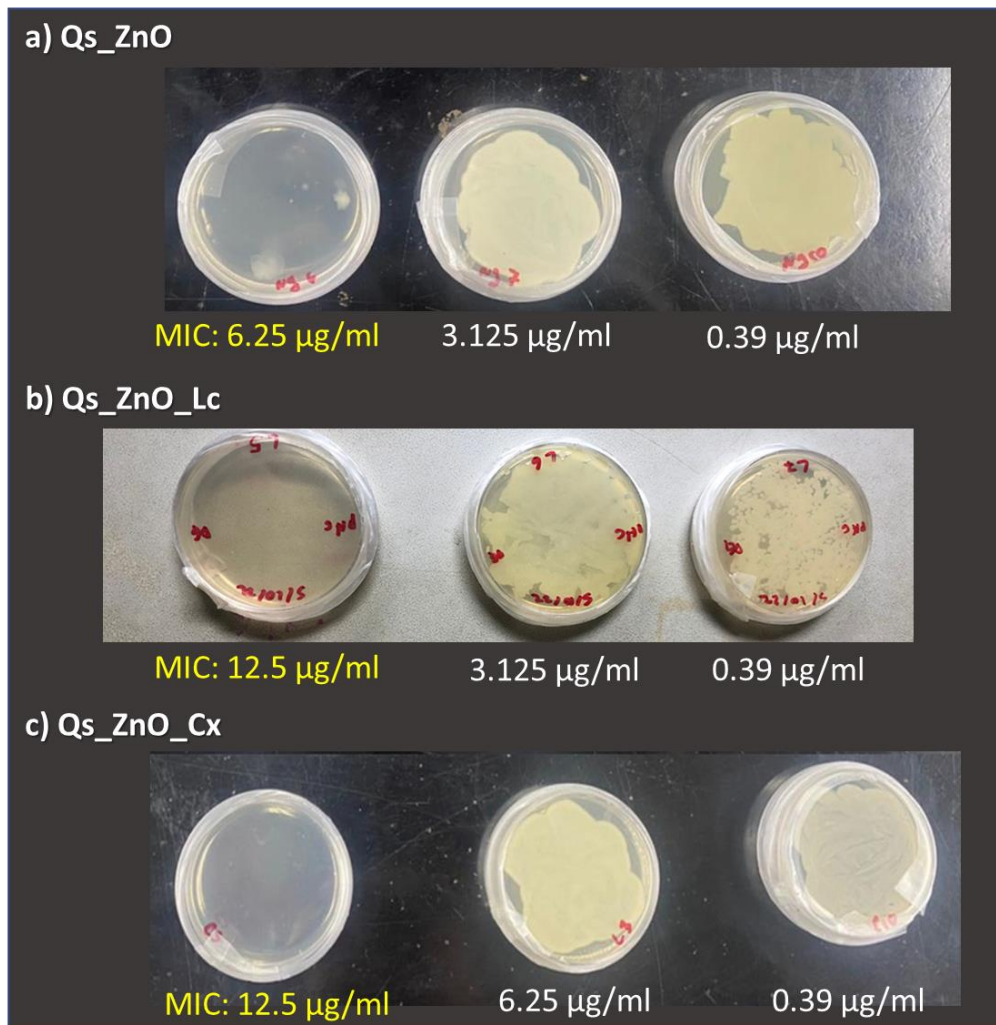


Figura 10. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes tratamientos contra *Vibrio harveyi*. A) sexta dilución en donde se encontró un mínimo crecimiento con el tratamiento de Qs_ZnO; B) quinta dilución donde se obtuvo mínimo crecimiento con el tratamiento de Qs_ZnO_Lc y C) placa con inóculo de la quinta dilución donde se encontró el mínimo crecimiento con el tratamiento de Qs_ZnO_Cx

DISCUSIÓN

La morfología observada del hidrogel (Figura 4) fue muy similar a la obtenida en trabajo previos de Cardoza-Contreras (2020), observando arreglos de varillas en forma de agujas, la figura 5c y 5f se observaron figuras gotas irregulares a escala micrométrica. Por la parte de la capacidad de hinchamiento, los hidrogeles proveen un panorama sobre la fuerza y capacidad de la red polimérica formada por los componentes del hidrogel. El pH del medio en el cual el hidrogel está inmerso puede ocasionar la ionización de varios grupos funcionales en la red polimérica, afectando de esta forma las propiedades del hidrogel. De acuerdo con lo obtenido, hay una diferencia significativa entre las medidas del porcentaje de hinchamiento para los diferentes valores de pH, destaca que tanto el hidrogel de Qs como el Qs_ZnO pueden retener más solución a pH ácidos. Mientras que las múltiples comparaciones por el método de Turkey arrojaron que la capacidad de hinchamiento a los valores de pH de 6, 7 y 8 no son estadísticamente diferentes ($p > 0.05$). Y puede deberse a que la red polimérica del hidrogel de quitosano utiliza TPP como agente de entrecruzamiento y se puede formar debido al entrecruzamiento físico a través de enlaces de hidrógeno y las interacciones dipolo-dipolo entre los grupos éster vecinos y las cadenas de quitosano, entonces en soluciones acuosas ácidas, la repulsión entre grupos amino residuales ionizados adyacentes ($-NH^+$) del hidrogel de quitosano hace que la red polimérica se expanda, lo que genera que el hidrogel pueda capturar más agua (Qu et al, 2000) Este es un resultado deseable si se tiene en cuenta una posible vía de aplicación por ingesta en peces, puesto que el pH del estómago va de 1 a 6 valores mientras el intestino 6,5-8,5 (Borlongan et al, 2002 & Gilannejad et al, 2018) los hidrogeles cargados deben poder soportar valores de pH inferiores a 4 para evitar la desintegración y liberación rápida del compuesto encapsulado en el estómago, para comenzar a disolverse a valores de pH superiores a 5, y solubilizarse a un valor de pH cercano a 7. En este punto, la degradación de los hidrogeles de quitosano será mayor ya que, además del pH del medio, existe la presencia de enzimas capaces de degradar el quitosano (carbohidrasas) en el intestino (Bakke et al, 2010). Además, de la Figura 7 podemos apreciar cómo en soluciones acuosas ácidas (6, 4 y 2) donde el hidrogel Qs_ZnO tiene una mayor capacidad de hinchamiento, lo significa que la incorporación de ZnO co-dopado con Ag-Cl en la síntesis de la red polimérica de quitosano aumenta la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano. Esto podría deberse al entrecruzamiento iónico entre los grupos amino cargados positivamente ($-NH^+$) del quitosano, los iones fosfóricos de TPP y los iones Zn, Ag y Cl de las nanovarillas de ZnO dopadas con Ag-Cl,

formando de esta manera una red más grande con más interacciones y un mejor comportamiento de hinchamiento (Sai Geetha et al, 2021).

En torno a la capacidad inhibitoria, en la figura 9, se observan los halos inhibitorios obtenidos a partir de los antibiogramas realizados, si bien se observó un área de inhibición contra a *V. harveyi*, teniendo que en promedio el tratamiento con Lc afecto en mayor medida *V. harveyi*, en comparación al tratamiento de Cx. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba que el fitogénicos aumentara la capacidad inhibitoria del hidrogel, realmente no se comportó de esa manera puesto que los resultados obtenidos de Qs_ZnO y Qs_ZnO_Lc fueron muy similares. Ahora bien, si tenemos en cuenta que para esta evaluación el pH del medio de cultivo fue cercano a 7 y que, de acuerdo con el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles sintetizados, en estas condiciones los hidrogeles permiten la liberación del compuesto encapsulado (Sai Geetha et al, 2021). Sin embargo, la menor actividad antimicrobiana en los hidrogeles cargados con los fitogénicos puede deberse a la probabilidad de que los componentes químicos de los fitogénicos liberen protones. Lo anterior podría provocar una disminución del pH en el medio de cultivo, y como ya se analizó para los hidrogeles sintetizados, valores bajos de pH favorecen la interacción entre los componentes del hidrogel, creando una red más fuerte que no permite que los fitogénicos escapen con facilidad y por ende no permite contribuir a la actividad antimicrobiana del hidrogel. Además, también es posible que, debido a esta acidez, el hidrogel con el fitogénico Cx tenga menor actividad antimicrobiana que el hidrogel con Lc. Esto considerando que el grupo hidroxilo del fenol presente en los compuestos carvacrol y timol (componentes principales de Cx) es más ácido que el grupo hidroxilo del ciclohexanol en el mentol (un componente de Lc) (Ouellette et al, 2015).

Finalmente, la concentración mínima inhibitoria demostró que a pH 7 el tratamiento que mostro mejor resultado fue Qs_ZnO, puesto que se necesitó de una concentración menor de hidrogel para la inhibición de crecimiento bacteriano (*V. harveyi*), teniendo en cuenta que se realizó dilución seriada se necesito del doble de concentración de tratamiento de con fitogénicos para la obtención de la inhibición bacteriana.

CONCLUSIONES

En este trabajo, se prepararon hidrogeles de quitosano con nanovarillas de ZnO co-dopadas con Ag-Cl sensibles a cambios de pH para su potencial empleo en la encapsulación de fármacos y compuestos bioactivos acuícolas. El comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles preparados mostró que los valores de pH bajos hacen que la red polimérica del hidrogel se expanda y capture más solución acuosa, mientras que los valores de pH neutros y superiores hacen que el hidrogel se encoja. Estas características hacen que los hidrogeles sintetizados sean adecuados no solo para la encapsulación y liberación controlada de fármacos y compuestos bioactivos en acuicultura, sino también para otros animales y humanos. La actividad antimicrobiana de los hidrogeles híbridos cargados con fitogénicos mostraron una buena actividad antimicrobiana contra *Vibrio harveyi*, aunque no mejor que la de los hidrogeles híbridos sin cargar, esto probablemente debido a la liberación de protones por parte de los componentes de los fitogénicos que provocan una encapsulación más fuerte e inhiben la liberación de los fitogénicos. Sin embargo, con este trabajo evidenciamos la capacidad potencial de los hidrogeles híbridos Qs_ZnO para el tratamiento preventivo y curativo de enfermedades de importancia para la salud de los animales acuícolas y la prevención de la resistencia a los medicamentos por bacterias. Se necesita más investigación sobre la aplicación directa y el efecto de la administración de cápsulas de hidrogel en organismos acuícolas comercialmente importantes.

REFERENCIAS

- Alekish M, Ismail ZB, Albiss B, Nawasrah S. (2018). *In vitro* antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: An alternative approach for antibacterial therapy of mastitis in sheep. *Vet World*. Nov;11(10):1428-1432. doi: 10.14202/vetworld.2018.1428-1432. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30532497; PMCID: PMC6247879.
- Arellano-Buendía AS, Juárez-Rojas JG, García-Arroyo FE, Sánchez-Lozada LG, Osorio-Alonso H. (2022) Mecanismos moleculares de los efectos benéficos de la alicina sobre la enfermedad cardiovascular. *Arch Cardiol Mex*. 92(3):362-370. English. doi: 10.24875/ACM.21000196. PMID: 35772125; PMCID: PMC9262295.
- Argote-Vega, Francisco Emilio, Suarez-Montenegro, Zully Jimena, Tobar-Delgado, Magaly Elizabeth, Perez-Alvarez, Jose Angel, Hurtado-Benavides, Andres Mauricio, & Delgado-Ospina, Johannes. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(spe2), 52-60. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)edicionespecialn2.578](https://doi.org/10.18684/bsaa(v15)edicionespecialn2.578)
- Bakke, A.M., Glover, C., Krogdahl, A. 2, 2010. Feeding, digestion and absorption of nutrients. In *Fish Physiology* Ed(s): Martin Grosell, A. P. Farrell, C. J. Brauner, Academic Press, 30, pp. 57-110. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03002-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03002-5).
- Balbuena-Rivarola, E., Rios-Moringo, V., & Flores-Nava, A. (2011) Manual básico de sanidad piscícola. Paraguay: FAO. <http://www.fao.org/3/as830s/as830s.pdf>
- Bautista-Baños, S; Ventura-Aguilar, R; Correa-Pacheco, Z; Corona-Rangel, M. (2017), Quitosano: un polisacárido antimicrobiano versátil para frutas y hortalizas en poscosecha - una revisión. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 23(2). <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030>

- Betancur Henao, C; Hernández Montes, V; Buitrago Sierra, R. (2016) Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana De Investigaciones Biomédicas*, (1561-3011). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002016000400009
- Borlongan, I. G., Coloso, R. M., Golez, N. V. 2002. Feeding habits and digestive physiology of fishes. In *Nutrition in Tropical Aquaculture: Essentials of fish nutrition, feeds, and feeding of tropical aquatic species* Ed(s): O. M. Millamena, R. M. Coloso, F. P. Pascual, Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center pp. 77–97. <http://hdl.handle.net/10862/3316>
- Cabello, F. (2004) Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista Médica De Chile*, (132), 1001-1006. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872004000800014#:~:text=El%20uso%20excesivo%20de%20antibi%C3%B3ticos,y%20el%20Streptococcus%20iniae39.
- Cardoza-Contreras, M.N.; Vásquez-Gallegos, A.; Vidal-Limon, A.; Romo-Herrera, J.M.; Águila, S.; Contreras, O.E. (2019) Photocatalytic and Antimicrobial Properties of Ga Doped and Ag Doped ZnO Nanorods for Water Treatment. *Catalysts* 9, 165. <https://doi.org/10.3390/catal9020165>.
- Carrillo González, R; Martínez Gómez, M; González Chávez, M. (2014) *Nanotecnología en la actividad agropecuaria y el ambiente*. 1st ed. Chapingo, México: Judith Sandoval, pp.34-48.
- Diaz Acosta, E. (2018) Nanopartículas de plata: un enfoque en aplicaciones biológicas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias Y Nanotecnología*, 12(22), 1. doi: <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.22.60758>
- Escalona Rayo, O; Quintanar Guerrero, D (2014). Hidrogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Revista mexicana*

de ciencias farmacéuticas, 43(3).http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000300003

- FAO (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Gilannejad N., Martínez-Rodríguez G., Yúfera M., Moyano F.J. 2018 Modelling digestive hydrolysis of nutrients in fish using factorial designs and desirability function. PLOS ONE, 13(11): e0206556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206556>.
- Guarnieri, A., Triunfo, M., Scieuzo, C. *et al.* (2022) Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. *Sci Rep* 12, 8084. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12150-3>
- Gumus, T. *et al.* (2010) 'Inhibition of heat resistant molds: *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotii* by some plant essential oils', *Food Science and Biotechnology*, 19(5), pp. 1241–1244. doi:10.1007/s10068-010-0177-9.
- Gundogdu, K. *et al.* (2023) 'Addressing the joint impact of temperature and ph on vibrio harveyi adaptation in the time of climate change', *Microorganisms*, 11(4), p. 1075. doi:10.3390/microorganisms11041075.
- Håstein, T. (2000) Principios de prevención y control de las enfermedades de los animales acuáticos. <https://www.oie.int/doc/ged/D2975.PDF>
- Haugland, G.T. *et al.* (2019) 'Pharmacokinetic data show that oxolinic acid and flumequine are absorbed and excreted rapidly from plasma and tissues of lumpfish', *Frontiers in Veterinary Science*, 6. doi:10.3389/fvets.2019.00394.
- Herrera Chale, F., Betancur Ancona, D., & Segura Campos, M. (2014) Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente

activos. *Nutrición Hospitalaria*, (29), 10-20. Retrieved 28 August 2022, from <https://scielo.isciii.es/pdf/nh/v29n1/03revision1.pdf>.

- Jiang, J.; Pi, J.; Cai, J. (2018) The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 18. <https://doi.org/10.1155/2018/1062562>
- Karizoo (2022) *Licorol*, Laboratorios Karizoo México. Disponible en: <http://www.karizoo.com.mx/producto/licorol/> (Accessed: 22 June 2023).
- Karizoo, K. (2022) *Coxsan*, Laboratorios Karizoo México. Disponible en: <https://www.karizoo.com.mx/producto/coxsan/>
- Karizoo. (2021) Resultados obtenidos del uso de fitogénicos en el área sanitaria de la acuicultura: una perspectiva holística para el manejo de enfermedades - Laboratorios Karizoo México. Laboratorios Karizoo México. <http://www.karizoo.com.mx/resultados-obtenidos-del-uso-de-fitogenicos-en-el-area-sanitaria-de-la-acuicultura-una-perspectiva-holistica-para-el-manejo-de-enfermedades/>.
- Kocic-Tanackov, S., Dimic, G., Tanackov, I., Pejin, D., Mojovic, L., & Pejin, J. (2012). Antifungal activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. *Hemijaska Industrija*, 66(1), 33–41. <https://doi.org/10.2298/hemind110614073k>
- Lima, Dijaci Santos de, Lima, Jade Cardôso, Cavalcanti, Raqueline Maiara Costa Bezerra, Santos, Bernadete Helena Cavalcanti dos, Lima, Igara Oliveira. (2017). Estudio de la actividad antibacteriana de los monoterpenos timol y carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de amplio espectro. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 8(1), 17-21. <https://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232017000100003>
- Martin, S.A.M. and Król, E. (2017) 'Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from Omics Technologies', *Developmental & Comparative Immunology*, 75, pp. 86–98. doi: 10.1016/j.dci.2017.02.024.
- Mauri, E; Giannitelli, S.M; Trombetta, M; Rainer, A. (2021) Synthesis of Nanogels: Current Trends and Future Outlook. *Gels*; 7(2):36. <https://doi.org/10.3390/gels7020036>

- Muthuraman, A., & Kaur, J. (2017). Antimicrobial Nanostructures for Neurodegenerative Infections. *Nanostructures For Antimicrobial Therapy*, 139-167. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-46152-8.00006-8>
- Nakal Chidiac, A; Aguilar de Armas, M; García Fernández, L; San Román del Barrio, J. (2018) Nanopartículas de quitosano para su uso en aplicaciones médicas. *Revista de plásticos modernos: Ciencia y tecnología de polímeros*, 116(737). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6642751>
- Nasrollahzadeh, M; Issaabadi, Z; Sajjadi S, M; Sajadi, M; Atarod, M. (2019), *Interface Science and Technology_Chapter 2- Types of nanoestructures*. pp.29-80. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00002-X>
- Neamtu, I.; Rusu, A.G.; Diaconu, A.; Nita, L.E.; Chiriac, A.P. (2017) Basic concepts, and recent advances in nanogels as carriers for medical applications, *Drug Deliv*, 24(1): 539–557
- Ngo Van Hai, (2015) The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review, *Aquaculture*, Volume 446, Pages 88-96, ISSN 0044-8486, [https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.014.\(https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848615001532\)](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.014.(https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848615001532))
- Nilsen-Nygaard, J.; Strand, S.P.; Vårum, K.M.; Draget, K.I.; Nordgård, C.T. (2015) Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers*, 7, 552-579. <https://doi.org/10.3390/polym7030552>.
- Ouellette, R. J., J. David Rawn, 8 - Alcohols and Phenols, Ed(s): Robert J. Ouellette, J. David Rawn, *Principles of Organic Chemistry*, Elsevier, 2015, pp. 209-238, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802444-7.00008-2>.
- Pirela, M; Abreu, V; Plaza, E; Lozada, L; Briceño, A; Gonzalez, G. (2014) Hidrogeles híbridos nano y microestructurados de polilacrilamida/hidroxiapatita/plata. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V*, 29(4), pp.1-9. <http://ve.scielo.org/pdf/rfiucv/v29n4/art02.pdf>
- Pradipta R. Rauta, Mrinal Samanta, Hirak R. Dash, Bismita Nayak, Surajit Das, (2014) Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling

pathways, expressions and immune responses, *Immunology Letters*, Volume 158, Issues 1–2, Pages 14-24, ISSN 0165-2478, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.11.013>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247813001958>)

- PROAQUA. (2021) Noticias de acuacultura - Proaqua México. <https://proaqua.mx/blog-y-noticias/>
- Qu, X.; Wirsén, A.; Albertsson, A.-C. 2000, Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. *Polymer* 41(12), 4589–4598. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00685-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00685-0)
- Rai, M; Kon, K; Ingle, A; Duran, N; Galdiero, S; Galdiero, M. (2014) Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1951-1961. doi: 10.1007/s00253-013-5473-x
- Rajinder Singh, Muftah A.M. Sushni, Asma Belkheir. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L., *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 8, Issue 3, Pages 322-328, ISSN 1878-5352, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.019>.
- Ramirez, A.; Prin, J; Gómez, L; Rojas de Gáscue, B; Müller, A. (2015) Síntesis y caracterización de un hidrogel híbrido de poliacrilamida y finos de ferrosilconmanganeso: Estructura e hinchamiento. 24, <https://www.researchgate.net/publication/304581907>
- Ramirez, A; Benítez, J; Rojas de Astudillo, L; Rojas de Gáscue, B. (2016) Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 6(2). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522016000200002
- Ramirez, Arnaldo, Benítez, José Luis, Rojas de Astudillo, Luisa, Rojas de Gascue, Blanca. (2016). Materiales polímeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista*

Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 36(2), 108-130. Recuperado en 23 de junio de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522016000200002&lng=es&tlng=es.

- Ramírez-Concepción, H., Castro-Velasco, L. and Martínez-Santiago, E. (2016) 'Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium Sativum*)', *Salud y Administración*, 3(8), pp. 39–47. doi: https://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4_Efectos_Terapeuticos_Ajo.pdf.
- Richa, Anirban Roy Choudhury, (2020) PH mediated rheological modulation of chitosan hydrogels, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 156, Pages 591-597, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.049>.
- Rodríguez, I. (2013) Aceite esencial de oregano adicionado a recubrimientos de pectina como tratamiento antifungico, antioxidante y saborizante en frutos de tomate. Tesis Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Saeed, R.M.; Dmour, I.; Taha, M.O. (2020) Stable Chitosan-Based Nanoparticles Using Polyphosphoric Acid or Hexametaphosphate for Tandem Ionotropic/Covalent Crosslinking and Subsequent Investigation as Novel Vehicles for Drug Delivery. *Front. Bioeng. Biotechnol*, 8,4. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00004>.
- Sai Geetha Marapureddy, Pravin Hivare, Aarushi Sharma, Juhi Chakraborty, Sourabh Ghosh, Sharad Gupta, Prachi Thareja. (2022) Rheology and direct write printing of chitosan - graphene oxide nanocomposite hydrogels for differentiation of neuroblastoma cells, *Carbohydrate Polymers*, Volume 269, 2021, 118254, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118254>.
- Seol, G.H., Kim, K.Y. (2016). Eucalyptol and Its Role in Chronic Diseases. In: Gupta, S., Prasad, S., Aggarwal, B. (eds) *Drug Discovery from Mother Nature*.

Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 929. Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6_18

- Suárez Carrillo, A. *Hidrogeles y sus aplicaciones biomédicas*. 2019, Sevilla, pp.1-6.
https://www.upo.es/cms1/export/sites/upo/moleqlla/documentos/Numero32/Destacado_2.pdf
- Swain, P; Nayak, S.K.; Sasmal, A. et al. (2014) antimicrobial activity of metal-based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 30, 2491–2502.
<https://doi.org/10.1007/s11274-014-1674-4>
- Tacias-Pascacio, V., Castañeda-Valbuena, D., Morellon-Sterling, R., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., & Vela-Gutiérrez, G. et al. (2021) Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184, 415-428.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.076>
- Wang, H., Chen, Q. and Zhou, S. (2018) ‘Carbon-based hybrid nanogels: A synergistic nanoplatform for combined biosensing, bioimaging, and Responsive Drug Delivery’, *Chemical Society Reviews*, 47(11), pp. 4198–4232. doi:10.1039/c7cs00399d.
- Yang, C., Chowdhury, M., Huo, Y., & Gong, J. (2015) Phytogetic Compounds as Alternatives to In-Feed Antibiotics: Potentials and Challenges in Application. *Pathogens.* 4(1), 137-156.
<https://doi.org/10.3390/pathogens4010137>