



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**FITOBBIÓTICO A BASE DE NEEM (*Azadirachta indica*) PARA
TRATAMIENTO DE VIBRIOSIS EN *Litopenaeus vannamei***

**FRANCO ORDOÑEZ JESSICA ELISA
INGENIERA ACUICOLA**

**SARMIENTO GANCHOZO KARELYS IVONNE
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2023**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**FITOBÍOTICO A BASE DE NEEM (*Azadirachta indica*) PARA
TRATAMIENTO DE VIBRIOSIS EN *Litopenaeus vannamei***

**FRANCO ORDOÑEZ JESSICA ELISA
INGENIERA ACUICOLA**

**SARMIENTO GANCHOZO KARELYS IVONNE
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2023**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

**FITOBÍOTICO A BASE DE NEEM (*Azadirachta indica*) PARA
TRATAMIENTO DE VIBRIOSIS EN *Litopenaeus vannamei***

**FRANCO ORDOÑEZ JESSICA ELISA
INGENIERA ACUICOLA**

**SARMIENTO GANCHOZO KARELYS IVONNE
INGENIERA ACUICOLA**

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

**MACHALA
2023**

TURNITIN_ Franco_Sarmiento.docx

por Jessica Franco

Fecha de entrega: 11-mar-2024 10:11a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2317743703

Nombre del archivo: TURNITIN__Franco_Sarmiento.docx (2M)

Total de palabras: 6980

Total de caracteres: 36896

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

3%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.utmachala.edu.ec Fuente de Internet	< 1%
2	es.scribd.com Fuente de Internet	< 1%
3	www.eurchembull.com Fuente de Internet	< 1%
4	www.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	< 1%
5	repository.unad.edu.co Fuente de Internet	< 1%
6	Submitted to Universidad Técnica de Machala Trabajo del estudiante	< 1%
7	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	< 1%
8	doczz.com.br Fuente de Internet	< 1%
9	explore.openaire.eu Fuente de Internet	< 1%

10	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	< 1%
11	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	< 1%
12	acikbilim.yok.gov.tr Fuente de Internet	< 1%
13	www.top-anesthesia.com Fuente de Internet	< 1%
14	1library.co Fuente de Internet	< 1%
15	Lina Angelica Zermeño-Cervantes, Aarón Barraza, Herson Antonio González-Ponce, Sergio Francisco Martínez-Díaz et al. "Penaeus vannamei challenged with a <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AHPND strain shows hepatopancreatic microbiota imbalance", Ciencias Marinas, 2023 Publicación	< 1%
16	es.unionpedia.org Fuente de Internet	< 1%
17	repositorio.upn.edu.pe Fuente de Internet	< 1%

Excluir bibliografía

Activo

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

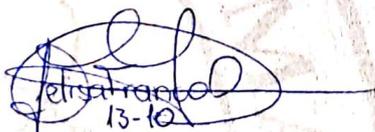
Las que suscriben, FRANCO ORDOÑEZ JESSICA ELISA y SARMIENTO GANCHOZO KARELYS IVONNE, en calidad de autoras del siguiente trabajo escrito titulado FITOBIÓTICO A BASE DE NEEM (*Azadirachta indica*) PARA TRATAMIENTO DE VIBRIOSIS EN *Litopenaeus vannamei*, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Las autoras declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Las autoras como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



Jessica Franco
13-10

FRANCO ORDOÑEZ JESSICA ELISA

0704583640



SARMIENTO GANCHOZO KARELYS IVONNE

0707034971

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Acuicultura, que nos ha permitido formarnos como profesionales.

A la Dra. Lita Sorroza Ochoa, nuestra tutora de tesis, quien nos brindó su guía y apoyo incondicional para el desarrollo de nuestro trabajo.

Al Dr. Roberto Santacruz Reyes y Dr. Colón Velázquez López, por su confianza y apoyo a nuestro proyecto de tesis.

A la Dra. Eveligh Prado Carpio y al Ing. Carlos Pezo por su paciencia, colaboración y apoyo para la elaboración de nuestra tesis.

Jessica Franco Ordoñez y Karelys Sarmiento Ganchozo

Agradezco a Dios por no haberme desamparado nunca, a mis padres por el esfuerzo conjunto para ser mi sustento económico, pero también emocional. A cada uno de mis maestros que ayudaron a mi formación académica. Y finalmente, a mí, por todo el esfuerzo y por no haberme rendido nunca a pesar de toda dificultad que se pudo haber presentado en el camino. ¡Gracias!

Jessica Franco Ordoñez

En primer lugar, le doy gracias a Dios por haberme permitido vivir cada etapa y experiencia de la vida, por darme la fuerza necesaria para lograr mis objetivos, incluido mi proyecto de titulación. También agradezco a mis padres, mis hermanos, mi novio, mi familia, amigos y docentes que han sido parte de este proceso de formación académica.

A mis amigos, por ser parte de este camino de éxito, en especial Sara y Yuliana, con quienes he compartido los mejores momentos de alegría en esta travesía universitaria.

Karelys Sarmiento Ganchozo

DEDICATORIA

Le dedico humildemente este trabajo a Dios todo poderoso, a mis padres Alexis Lyonel Franco Parrales y Jhoena Marely Ordoñez Carrillo y a mis hermanos Jessenia y Juhuar que han sido mi motivación y apoyo incondicional en mi formación profesional.

A mi abuelito materno Luis Douglas Ordoñez Naranjo quien partió al cielo mientras me encontraba en medio de este proceso de titulación y no alcanzó a verme graduada de la universidad, pero sé que desde arriba está muy orgulloso.

A mis demás familiares, por hacerse presentes en todo momento con su respaldo, apoyo y votos de confianza que me impulsaron a cumplir el objetivo de ser profesional.

Jessica Franco Ordoñez

Ese trabajo va dedicado a Dios, a mis padres Keulin Sarmiento y Jovita Ganchozo quienes han sido mi mayor inspiración y apoyo a lo largo de este camino académico, que con su amor incondicional y sacrificio ha sido la fuerza que me han impulsado a alcanzar mis metas.

A mis hermanos Keulin y Angie por ser fuente de motivación.

A mi novio Pablo quien ha estado presente en cada etapa de mi formación universitaria, por brindarme su amor y apoyo emocional.

Karelys Sarmiento Ganchozo

RESUMEN

La acuicultura del camarón *Litopenaeus vannamei*, especie favorita para los cultivos, se ve desafiada a problemas con enfermedades, entre ellas las producidas por bacterias como el *Vibrio sp.* Es por eso que el presente trabajo se planteó el poder evaluar la efectividad de fitobiótico a base de neem (*Azadirachta indica*) para tratamiento de vibriosis en *Litopenaeus vannamei*. Para ello se obtuvieron los extractos alcohólicos (etanol) de hoja, semilla y hoja + semilla de neem, se probó su poder inhibitorio ante *Vibrio sp.* mediante una prueba de sensibilidad en antibiograma. Así, posteriormente se realizó una siembra de hepatopáncreas en placa para determinar la cantidad de UFC/ml de *Vibrio sp.* en el camarón. Finalmente, resultó que el extracto de hoja fue el mejor al producir un halo más grande, por lo tanto, luego de probar dos dosis (200 y 400 µl/g) en alimento para determinar la toxicidad en el camarón se obtuvo que el mismo fue inocuo al tener el 100% de supervivencia durante el tiempo de estudio. Esto permitió concluir que la dosis de 200 µl/g fue el mejor resultado numérico que representó un mayor poder inhibitorio ante el *Vibrio sp.*, lo que sugiere que se podría utilizar para el tratamiento de esta enfermedad.

Palabras clave: Extracto, Vibrio, inhibición, neem.

SUMMARY

The aquaculture of shrimp *Litopenaeus vannamei*, a favourite species for farming, is challenged by problems with diseases, including those caused by bacteria such as *Vibrio* sp. This is why the present study aimed to evaluate the effectiveness of a phytobiotic based on neem (*Azadirachta indica*) for the treatment of vibriosis in *Litopenaeus vannamei*. For this purpose, alcoholic extracts (ethanol) of neem leaf, seed and leaf + seed were obtained, and their inhibitory power against *Vibrio* sp. was tested by means of an antibiogram sensitivity test. Subsequently, a hepatopancreas plate seeding was carried out to determine the number of CFU/ml of *Vibrio* sp. in the shrimp. Finally, it turned out that the leaf extract was the best as it produced a larger halo, therefore, after testing two doses (200 and 400 µl/g) in feed to determine the toxicity in the shrimp, it was found to be innocuous as it had 100% survival during the study time. This led to the conclusion that the dose of 200 µl/g was the best numerical result, representing a greater inhibitory power against *Vibrio* sp., which suggests that it could be used for the treatment of this disease.

Keywords: Extract, *Vibrio*, inhibition, neem.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3.	JUSTIFICACIÓN	4
4.	OBJETIVOS	5
1.1.	OBJETIVO GENERAL	5
1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
5.	HIPÓTESIS	6
6.	REVISIÓN DE LITERATURA	7
6.1.	BACTERIAS QUE AFECTAN CULTIVOS DE CAMARÓN.....	7
6.2.	<i>VIBRIO</i>	7
6.2.1.	<i>Varietades de Vibrio en cultivo de camarón</i>	7
6.2.2.	<i>Enfermedades causadas por Vibrio</i>	7
6.2.3.	<i>Tratamiento para Vibrio en cultivos de camarón</i>	8
6.3.	¿QUÉ ES UN FITOBIÓTICO?	9
6.4.	COMPUESTOS BIOACTIVOS	9
6.5.	EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE PRODUCTOS NATURALES	10
6.5.1.	<i>Maceración</i>	11
6.5.2.	<i>Percolación</i>	11
6.5.3.	<i>Decocción</i>	11
6.5.4.	<i>De reflujo</i>	11
6.5.5.	<i>Extracción Soxhlet</i>	12

6.6.	PREPARACIÓN DE FITOBIÓTICOS PARA USOS ACUÍCOLAS	13
6.7.	PLANTAS USADAS COMO FITOBIÓTICOS	13
6.7.1.	<i>Plantas medicinales en cultivo de camarón</i>	14
6.8.	NEEM	14
6.8.1.	<i>Características</i>	15
6.8.2.	<i>Propiedades</i>	15
6.8.3.	<i>Investigaciones con el neem en acuicultura</i>	17
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
7.1.	MATERIALES Y EQUIPOS	19
7.2.	ÁREA DE ESTUDIO	20
7.3.	METODOLOGÍA	21
7.3.1.	<i>Recolección de hoja y semilla de neem</i>	21
7.3.2.	<i>Obtención de extractos</i>	21
7.3.3.	<i>Ensayo in vitro – Antibiograma</i>	21
7.3.4.	<i>Ensayo in vitro con Tween 80 y extracto de hoja</i>	22
7.3.5.	<i>Obtención de los camarones</i>	22
7.3.6.	<i>Ensayo in vivo</i>	22
7.3.7.	<i>Evaluación de toxicidad</i>	23
7.3.8.	<i>Preparación de medio de cultivo para Vibrio</i>	23
7.3.9.	<i>Diseño experimental</i>	24
7.3.10.	<i>Análisis estadístico</i>	24
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
8.1.	EFFECTO DE PRUEBA DE SENSIBILIDAD FRENTE A <i>VIBRIO</i>	25

8.2.	EFFECTO DE TOXICIDAD DEL EXTRACTO.....	28
8.3.	EFFECTO DEL EXTRACTO DE HOJA DE NEEM ANTE COLONIAS DE <i>VIBRIO</i> 28	
9.	CONCLUSIONES	34
10.	RECOMENDACIONES.....	35
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
	ANEXOS.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación del proyecto	20
Figura 2: Antibiograma de los extractos de hoja, semilla, hoja-semilla y control... 26	
Figura 3: UFC/ml de Vibrio en función de los tratamientos a base de hoja de neem.	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Actividad antibacteriana del extracto de hoja y corteza de <i>A. indica</i>	16
Tabla 2: Croquis del experimento	24
Tabla 3: Efecto inhibitorio de los extractos ante <i>Vibrio</i>	25
Tabla 4: Efecto bactericida del extracto más Tween 80	27
Tabla 5: Cantidad de UFC/ml inicial en camarones.....	28
Tabla 6: Cantidad de UFC/ml final en camarones.	29
Tabla 7: Comparación numérica - porcentaje de reducción de UFC/ml de <i>Vibrio</i> sp.	29
Tabla 8: ANOVA de un factor intergrupos en los datos obtenidos de UFC/ml de <i>Vibrio</i>	30
Tabla 9: Test Duncan – UFC/ml de <i>Vibrio</i> en función de los tratamientos.	30

1. INTRODUCCIÓN

En la producción de crustáceos, el cultivo de camarón es dominante, proporcionando una entrada importante de divisas a los distintos países tanto de Asia como de Latinoamérica, que se dedican a la acuicultura de este crustáceo, siendo *Litopenaeus vannamei* la especie favorita a nivel mundial para los cultivos (FAO, 2020). No obstante, en toda actividad se presentan desafíos como lo son las enfermedades, en este caso la presencia de vibrios, específicamente *Vibrio parahaemolyticus* fue detectado como principal patógeno en los cultivos de India, donde esta especie de bacteria ha provocado grandes mortalidades (Prithvisagar et al., 2021).

Así mismo, Tailandia es otro de los países que según reportes de FAO (2020), desde el año 2012 ha venido teniendo bajas en su producción por el problema de enfermedades, lo que le ha afectado en la competencia mundial. Y es que bacterias como el *V. parahaemolyticus*, causa especial preocupación en las granjas camaroneras, provoca la enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (NHPA), dejando como consecuencias altas mortalidades (Velázquez et al., 2019).

Es así como un estudio de prevalencia de enfermedades en *Litopenaeus vannamei* en Cuba, dio como resultado una predominancia del 80% de bacterias donde el 62,5 % de las mismas pertenecen al género *Vibrio*, destacando especies como *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, y *V. alginolyticus*; además, destacan que la incidencia de los patógenos tiene influencia de los factores climáticos (Rubio et al., 2020).

En Ecuador, se ha evidenciado un constante crecimiento en la producción del camarón blanco ligado a la demanda para exportaciones, por lo que el mantener una buena calidad del producto, basado en sabor, textura, requerimientos de empacadoras para comercialización y bajos costos de producción, es primordial para seguir creciendo en el

mercado, ya que es lo que le ha dado una preferencia al camarón ecuatoriano (López et al., 2023). Ecuador es de los primordiales productores y exportadores de camarón a nivel mundial, cabe destacar que, del total de producción nacional, el 15 % proviene de la provincia de El Oro (Gonzabay et al., 2021).

Consecuentemente, con la creciente demanda de camarón, hay una mayor presión en la producción, la cual debe guardar buena calidad y proporcionar una seguridad alimentaria, lo que es posible solo si se minimiza el impacto patógeno (Varela & Choc, 2020). De igual forma, la intensificación de los sistemas de producción ha traído consigo un considerable episodio de enfermedades, las cuales se suelen tratar con antibióticos y antimicrobianos, pero los mismos contaminan el medio ambiente por la acumulación de residuos, además de que generan resistencia (Toledo et al., 2018).

Es por eso, que el uso de fitobióticos se presenta como una posible solución para minimizar la carga bacteriana en *Litopenaeus vannamei*, estudios previos del potencial de los fitobióticos revelan su poder antibiótico, debido a la presencia de compuestos bioactivos con características antimicrobianas (Abdul et al., 2022), ya que estas se dan por la presencia de fitoquímicos que le ayudan a protegerse frente a patógenos (Adeeyo et al., 2021).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la acuicultura los cultivos de peces, moluscos y crustáceos como el camarón siempre tienden a padecer por la presencia de microorganismos patógenos, los cuales pueden ser de origen viral, bacteriano, fúngico o parasitario que afectan directamente a la producción por ser la causa de enfermedades en los organismos cultivados. En el caso de afecciones por bacterias, destaca la vibriosis, enfermedad causada por microorganismos del género *Vibrio sp.* y que prevalece en los cultivos de camarón, donde la misma destaca por ocasionar elevadas mortalidades y por ende un gran impacto en la economía de los camaroneros.

Para el tratamiento de la vibriosis es común el uso de compuestos químicos o llamados antibióticos, debido a su rápida acción sobre las bacterias y su disponibilidad en el mercado, pero debido a la restricción en Ecuador que limita al uso de Oxitetraciclina y Florfenicol, y por ende el abuso de los mismos, ha generado resistencia por parte de las bacterias, por lo que tener alternativas para el tratamiento, pero sobre todo para la prevención de ésta enfermedad, es primordial para la seguridad y sostenibilidad de los cultivos acuícolas.

3. JUSTIFICACIÓN

Una alternativa para disminuir la presencia de bacterias, específicamente de *Vibrio spp.* en los camarones de cultivo, es el uso de fitobióticos por la bondad de los componentes activos en las plantas medicinales que ancestralmente han demostrado características inhibitorias frente a los microorganismos patógenos. Y es que los extractos de gran parte de las plantas juegan un papel importante al actuar sobre las bacterias rompiendo su pared celular, bloqueando las proteínas, obstruyendo la síntesis del ADN e impidiendo reacciones enzimáticas. Es por eso, que la utilización de extractos naturales de plantas medicinales como el neem (*Azadirachta indica*), es una interesante opción para evitar el uso de antibióticos, debido a que contiene compuestos bioactivos que le otorga la característica antimicrobiana.

4. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Evaluar la efectividad de fitobiótico a base de neem (*Azadirachta indica*) para tratamiento de vibriosis en *Litopenaeus vannamei*.

1.2. Objetivos específicos

- Obtener los extractos alcohólicos de hoja y semilla de neem.
- Evaluar *in vitro* el mejor extracto en cuanto a la inhibición de la carga de *Vibrio*.
- Establecer las dosis de los tratamientos a probar a base de extractos de neem.
- Identificar la dosis *in vivo* para la reducción de *Vibrio sp.* en *Litopenaeus vannamei*.

5. HIPÓTESIS

Mediante la aplicación de extractos de neem (*Azadirachta indica*) en el alimento para el camarón de cultivo, *Litopenaeus vannamei*, se obtendría una disminución de la carga bacteriana por *Vibrio spp.*, lo que posicionaría el uso de fitobióticos a base de neem como una potencial opción para el control de las bacterias que causan Vibriosis.

6. REVISIÓN DE LITERATURA

6.1. Bacterias que afectan cultivos de camarón

La industria acuícola se ve desafiada por problemas tanto de calidad de agua y densidad poblacional como de brotes de enfermedades por patógenos bacterianos (Gruber et al., 2023). Es así que algunas de las enfermedades bacterianas que afectan a los cultivos acuícola y particularmente el de camarón, están provocadas por bacterias pertenecientes al género *Vibrio* (Santiago, et al., 2009).

6.2. *Vibrio*

La Vibriosis, enfermedad amenazadora para la industria acuícola especialmente en cultivos de camarón, tiene por origen *Vibrio sp.*, bacterias de especial preocupación debido a su resistencia a los antibióticos (Sheikh et al., 2022).

6.2.1. Variedades de *Vibrio* en cultivo de camarón

Un estudio realizado por Albuquerque, et al. (2013), presenta 10 especies de *Vibrio* extraídas de la hemolinfa de *L. vannamei*, las cuales son: *V. parahaemolyticus*, *V. xuii*, *V. cholerae*, *V. navarrensis*, *V. brasiliensis*, *V. coralliitycus*, *V. neptunis*, *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus* y *V. vulnificus*, donde los resultados obtenidos permitieron concluir que, si bien es posible que la hemolinfa de los camarones peneidos sea colonizada por diferentes especies de *Vibrio*, esto no siempre llega a perjudicar la salud del camarón.

6.2.2. Enfermedades causadas por *Vibrio*

Peña & Varela (2016) han estudiado la presencia de enfermedades infecciosas en *L. vannamei*, en Costa Rica, donde los resultados mostraron en cuanto a vibriosis una prevalencia del 33.89%, aludiendo que ciertas enfermedades posiblemente tienen que ver

con la prevalencia de enfermedades en dicho sitio y la estación del año en que se realizó el muestreo, sin embargo, esto no guarda suficiente evidencia para relacionar estas dos variables.

Entre las enfermedades causadas por *Vibrio* está la necrosis hepatopancreática aguda, que tiene como agente infeccioso único la especie *Vibrio parahaemolyticus*, presentándose como una enfermedad debilitante de los camarones que afecta mundialmente a miles de granjas camaroneras y en la actualidad su patogénesis aún no es bien conocida (Wang et al., 2022). Sin embargo, Velázquez et al. (2019), hace referencia a que el material infectante de *V. parahaemolyticus* se encuentra en un plásmido que es el que codifica toxinas letales PirABVp mismo que tiene como tejido diana el hepatopáncreas, y es la razón de ser el órgano al que más afecta provocando un desprendimiento de células epiteliales, necrosis y una gran infiltración de hemocitos. Además, esta especie de *Vibrio*, al ser un patógeno zoonótico que se relaciona tanto al camarón silvestre como el de cultivo, se asocia como causa de la gastroenteritis al humano por el consumo de mariscos a baja cocción o crudos (Kohli et al., 2021).

Otra enfermedad es la Vibriosis luminiscente, causada por *Vibrio harveyi*, bacteria que afecta mayormente a los cultivos de camarón en sus primeras etapas como lo son incubación e incluso hasta juveniles atacando principalmente el hepatopáncreas y por ende dejando grandes mortalidades por la inflamación del mismo (Benala et al., 2023).

6.2.3. Tratamiento para *Vibrio* en cultivos de camarón

Ante la presencia de *Vibrio* en cultivos de camarón, se opta como tratamiento el uso de antibióticos como oxitetraciclina, florfenicol y enroflax. Sin embargo, las bacterias tienen una capacidad especial para la rapidez en su reproducción y mutación por lo que

aplicar más productos químicos parecía ser la solución, sin considerar que acarrearía consecuencias por el mal uso de los mismos, es decir resistencia por parte de las bacterias (Santiago et al., 2009).

Otra opción para el control de bacterias patógenas como método preventivo es la administración de probióticos, mismos que tienen la aptitud de controlar aquellos microorganismos patógenos, mediante promover el desarrollo de los organismos por un aprovechamiento efectivo de nutrientes y mejoramiento en el sistema inmune, así como optimar la calidad ambiental del cultivo, una actividad sostenible (Toledo et al., 2018).

6.3.¿Qué es un fitobiótico?

Los fitobióticos son sustancias bioactivas a base de plantas o derivados de plantas que son beneficiosas para ciertas áreas productivas, animales y personas. Estas sustancias incluyen aceites esenciales, hierbas, alcaloides, caronetoides, compuestos fenólicos, etc. Las mismas contienen compuestos bioactivos como los terpenoides, taninos, alcaloides y flavonoides, con efectos antimicrobianos. Varias investigaciones han demostrado cuán útil pueden ser las plantas medicinales para la acuicultura (Abdul, 2022).

Los extractos de plantas tienen la seguridad de no causar daño al medio ambiente, lo que los hace ecológicamente beneficiosos gracias a su alta biodegradabilidad, por lo que es menos probable que generen microbios resistentes, debido a que contienen diversidad de compuestos bioactivos, en lugar de una sola molécula activa que está dirigida a un objeto celular en específico (Hernández et al., 2023).

6.4. Compuestos bioactivos

Este término se usa para referirse a sustancias químicas que son biológicamente importantes, sin embargo, no se definen como nutrientes esenciales. Son compuestos

esenciales, como las vitaminas, y no esenciales, como los alcaloides, que se encuentran naturalmente en plantas (Kumar, 2021). Las cumarinas, quinonas, melicianinas, lactosas, entre otros, son sustancias bioactivas, principios medicinales de los componentes de las plantas (Prieto et al., 2005).

Los compuestos activos de las plantas se encuentran en pequeñas cantidades y en diferentes concentraciones dependiendo si son extraídos de hojas, raíz, semilla, tallo o flor, según la planta, donde su actividad se asocia al contenido de metabolitos secundarios (Ojeda et al., 2022).

6.5. Extracción y aislamiento de productos naturales

Para la separación de productos naturales de las materias primas, el primer paso es la extracción. Para esto, se utilizan procedimientos a través de solventes, destilación, prensado y sublimación, donde de ellos el más usado es la extracción por medio de solventes (Zhang et al., 2018).

El proceso de extracción responde a la separación de la mezcla medicinal, que se encuentra dentro de los tejidos vegetales, usando solventes selectivos, donde los componentes medicinalmente activos se disuelven y gran parte de la materia inerte no se disuelve. De esta manera se logra obtener los metabolitos solubles de la planta, quedando de lado los residuos (orujo celular insoluble). Como resultado del producto se obtiene una mezcla en estado sólido o semisólido, o en forma de polvo seco, destinado para uso interno y/o externo (Kumar, 2021).

Para la extracción por solvente, la elección del mismo es esencial, para ello se debe tener en cuenta la selectividad, solubilidad, costo y seguridad. Investigaciones sobre fitoquímicos, sugieren que los solventes que se usan en los procesos de extracción son

los alcoholes (EtOH y MeOH). Los resultados dependerán en gran parte del tamaño de la partícula, mientras más fino mayor será la penetración del solvente y dispersión del soluto, sin embargo, demasiado fino resulta un exceso de absorción del soluto en sólido y consecuentemente una filtración más difícil (Zhang et al., 2018).

Después del proceso de extracción, es probable que se realicen procedimientos adicionales para purificar o aislar los compuestos que se desean emplear con efecto inhibitorio frente a bacterias (Kumar, 2021). La extracción por maceración, percolación y extracción por reflujo, son métodos convencionales que por lo general utilizan solventes orgánicos en gran cantidad y una duración prolongada (Zhang et al., 2018).

6.5.1. Maceración

Se trata de un método simple que requiere mucho tiempo de extracción y su eficiencia es baja. Se puede utilizar para extraer componentes termolábiles (Zhang et al., 2018).

6.5.2. Percolación

Este método muestra mejor eficiencia a diferencia de la maceración debido a que el proceso es continuo donde el solvente saturado es reemplazado por solvente fresco.

6.5.3. Decocción

El método por decocción hace que el extracto contenga cantidades altas de impurezas solubles en el agua, por lo tanto, este proceso no se puede usar para obtener extractos de componente termolábiles o volátiles (Zhang et al., 2018).

6.5.4. De reflujo

Es más eficiente en comparación con la extracción por percolación o maceración, toma menos tiempo en el proceso y no requiere mayores cantidades de solvente. Sin

embargo, no es recomendable usarlo para extraer productos naturales termolábiles (Zhang et al., 2018).

6.5.5. Extracción Soxhlet

Dentro de los métodos mencionados, este tipo de extracción, a nivel de laboratorio se ajusta como un proceso extractivo completo y con alta eficiencia. Tradicionalmente, este tipo de extracción se ha venido utilizando para obtener compuestos orgánicos, incluido pesticidas, entre otros. El instrumento está compuesto de un recipiente para el disolvente, un cuerpo de extracción, condensador de reflujo que es enfriado por agua y una fuente de calor eléctrica (Ribeiro et al., 2022).

Este método combina los beneficios de la extracción por reflujo y percolación, utilizando el principio de reflujo y sifón para obtener el extracto de la planta usando disolventes frescos. Este proceso requiere menos tiempo, ya que es un método automático de extracción continua, así como una menor cantidad de solventes en comparación a la de maceración y percolación (Zhang et al., 2018).

Existen varios solventes que pueden ser utilizados para la extracción de diferentes componentes activos presentes en las plantas, gran parte de los compuestos que se cree que son los que llevan a cabo las actividades biológicas de la planta de neem se suelen encontrar en algunos extractos que se usan normalmente en los laboratorios (etanol, agua, metanol, éter y cloroformo). Según lo que se mencionan en la literatura publicada últimamente, los extractos alcohólicos como el metanol y etanol son los que más se usan para realizar pruebas antimicrobianas (Wylie & Merrell, 2022).

6.6. Preparación de fitobióticos para usos acuícolas

Los antibióticos naturales para el área acuícola se pueden preparar de diversas formas para la obtención de extractos acuosos, metanólicos y en polvo. El metanol funciona como solvente, que se utiliza para la extracción de compuestos polares, particularmente en plantas, de tal forma que en muchos estudios de preparación de fitobióticos, se lo utiliza como extracto acuoso polar (Abdul, 2022).

Adicional a esto, para la preparación de mezclas de extractos de plantas medicinales se aplican emulsionantes como el Tween 80, que se ha utilizado ampliamente en la industria farmacéutica y alimentaria como agente dispersante en la preparación de soluciones Lopez (2018).

6.7. Plantas usadas como fitobióticos

Las plantas medicinales al presentar compuestos bioactivos funcionan como una alternativa para sustituir tratamientos con sustancias químicas, además que la presencia de efectos secundarios es mucho menor con el uso de extractos naturales (Kumar et al, 2021). Los extractos de plantas tienen una diversidad estructural muy amplia. Contienen fitoquímicos, que permiten disminuir significativamente el crecimiento de microorganismos patógenos (Wasihum et al., 2023). Plantas como *Ageratum conyzoides*, *Brassica nigra*, *Celosia trigyna*, *Centella asiática*, *Racunculus oreophytus*, *Azadiracha indica*, entre otras son conocidas por su uso como medicina tradicional (Adeeyo et al, 2021).

La eficiencia en la reducción de la carga microbiana con extractos de plantas requiere de una mayor concentración para obtener los resultados que se esperan, mostrando ser una desventaja del uso de estos extractos naturales (Reyes y Valle, 2021).

6.7.1. Plantas medicinales en cultivo de camarón

Para la resistencia a infecciones o enfermedades, los camarones dependen de su sistema inmunológico. Los compuestos activos que se encuentran en las plantas medicinales tienen la capacidad de estimular el sistema inmunológico en camarones, y así mismo elevar la resistencia a enfermedades. La administración de estas plantas puede ser como componentes aislados (hoja, semilla, corteza o raíz), extractos o compuestos, incluso puede aplicarse en mezcla con prebióticos o inmunoestimulantes de preferencia. Además de presentar actividad antimicrobiana, tienen la capacidad de mostrar efectos beneficiosos en el crecimiento o supervivencia (Kumar et al, 2021).

En el cultivo de camarones y peces los métodos para administrar medicina natural son mediante inyección, oral, inmersión o baños (Kumar et al, 2021).

Según Aguirre et al. (2018) en un estudio sobre tratamiento de agua de río determinaron que el uso de sustancias naturales de *A. indica*, *Zea mays*, *Moringa oleífera* y *Opuntia ficus-indica*, tienen la capacidad de eliminar ciertos contaminantes y reducir la turbidez. En el caso de *A. indica* observaron una disminución del 99.4 y 99.2% de coliformes totales y fecales, con dosis de 0.6, 0.8 y 1 g/L. Se recalca, además, que el uso de estos extractos de origen natural no altera el pH del agua, por tanto, su uso para tratamiento de agua es una opción viable en el ámbito económico y la sostenibilidad del ambiente.

6.8. Neem

El neem (*Azadirachta indica*) o nim, es un árbol muy conocido en la medicina tradicional gracias a sus propiedades beneficiosas. Se origina principalmente en la India, habitando en las zonas tropicales y subtropicales. Investigaciones respaldan el interés

mundial de los productos a base de neem, que van desde prácticas ancestrales hasta una amplia gama de publicaciones que se atribuye a la *A. indica* entre los fármacos modernos (Chica, 2018).

6.8.1. Características

Muchas partes de la planta se utilizan para recetas naturales, tales como: hojas, semillas, flores, tallo, raíces, frutos y corteza. Se caracteriza por tener propiedades antivirales, antiparasitarias, antifúngicas, etc. (Wyile & Merrell, 2022).

6.8.2. Propiedades

Las crecientes tasas de resistencia a los antibióticos para los patógenos bacterianos ha llevado a la necesidad de nuevas terapias; por lo tanto, gran parte del trabajo reciente sobre el potencial antimicrobiano del neem se ha enfocado en destacar las propiedades antibacterianas de la planta (Wyile & Merrell, 2022).

El árbol de neem contiene numerosos compuestos, muchos de los cuales han demostrado ser bioactivos y tener diversas utilidades por sí solos. Los compuestos que se han investigado más a fondo por sus propiedades antimicrobianas individuales hasta el momento son los limonoides (Wyile & Merrell, 2022).

En un estudio realizado por Devi et al. (2019) determinaron la eficiencia antibacteriana del extracto de etanol de las hojas del neem contra *Staphylococcus aureus* mostrando un halo de inhibición de 13 mm, siendo mayor el nivel de actividad inhibitoria en comparación con el extracto de corteza.

Las sustancias activas del neem poseen propiedades antibacterianas, siendo una alternativa para el control de la contaminación bacteriana presente en el medio. La azadiractina, es un compuesto activo del árbol de neem, demostrando ser uno de los más comprometedores entre una amplia variedad de productos de origen natural, del cual se

han aislado más de 135 compuestos de varias partes del árbol (Ranjit et al., 2014). Este compuesto se encuentra en la semilla del fruto cuando se encuentra en estado inmaduro, obteniéndolo con mayor facilidad mediante extracción con solventes orgánicos. Además, se pueden encontrar otros compuestos como salinnina y meliantriol con propiedades insecticidas (Aguirre, 2019).

Varias partes de este árbol poseen actividad antibacteriana, como el aceite de hojas, corteza y semilla de neem, contra una amplia gama de microorganismos patógenos (Ranjit et al., 2014).

Los métodos que se realizan in vitro, como la dilución en caldo, difusión en disco o en sustancia de agar, y prueba de superposición de agar, se usan para realizar pruebas antimicrobianas de los extractos de aceite de neem y los fitoquímicos presentes, usualmente para conocer la concentración mínima inhibitoria y mínima bacteriana de cada uno (Wylie & Merrell, 2022).

En un análisis en cuanto a la actividad antibacteriana del extracto de hoja y corteza de neem ante la presencia de bacterias Gram-negativas y positivas, mostraron mayor zona de inhibición contra *V. Cholerae* y *B. Subtilis*, en comparación a *E. Coli* y *S. typhy* (Ranjit et al., 2014).

Tabla 1: Actividad antibacteriana del extracto de hoja y corteza de A. indica

Organismos a prueba	Zona de inhibición
<i>Salmonella typhi</i>	10 mm
<i>Escherichia coli</i>	11 mm
<i>Vibrio cholerae</i>	17 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	17 mm

Fuente: Ranjit et al., (2014)

Elaboración: Adaptación por autores.

Gómez et al. (2019) realizaron un estudio de combinaciones de extractos vegetales, donde probaron extractos acohólicos de diferentes plantas combinadas, evaluando el efecto inhibitorio frente a vibrios, para luego haber dosificado 200 µl/g y 400 µl/g, de dos combinaciones en el alimento balanceado. Obteniendo como resultado la inhibición de vibrios en hepatopáncreas con 400 µl/g.

6.8.3. Investigaciones con el neem en acuicultura

El área acuícola también ha sido beneficiada por la utilización de extractos de plantas con propiedades medicinales, en donde varios estudios señalan cuan útil pueden ser, como es el caso del neem. En una investigación realizada por Banerjee et al. (2013) mediante el uso de extracto acuoso de neem y jugo de las hojas, evaluaron el efecto que tienen las sustancias extraídas de las hojas de *A. indica* en *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, dando como resultado una MIC para ambas bacterias de 3,13% y 6,25%, con MBC de 12,50% y 25%. Determinaron la actividad antibacteriana que tiene el jugo de las hojas de neem para la inhibición de vibrios en langostinos.

Otro hallazgo de la efectividad de este fitobiótico es mediante la aplicación en dieta balanceada de la lubina (*Lates calcarifer*), realizado por Talpur & Ikhwanuddin (2013) en donde probaron 5 tratamientos, el cual agregaron 1 -5 g de hojas de neem por kg de alimento balanceado, para luego ser infestados con *V. harveyi*. Teniendo como resultados que la inclusión de estas hojas al alimento optimizó la respuesta inmune y aumentó la resistencia de *L. calcarifer* ante la presencia de la vibriosis.

Dhayanithi et al., (2010) realizaron una investigación sobre el efecto que tiene el extracto de hojas de neem contra bacterias aisladas de peces ornamentales *Amphiprion sebae* y *A. ocellaris* (peces payasos) infectados por bacterias de diferentes géneros,

incluyendo los vibrios. De los extractos probados en el ensayo, el de metanol y etanol mostraron mayor nivel de inhibición de las bacterias aisladas, a diferencia de extractos con otros solventes, en el caso de los extractos con etanol se mostró con un MIC de 75 – 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Según una investigación llevada a cabo por Eufrazio et al. (2023), demostraron que el extracto etanólico de hojas de neem tienen una alta efectividad contra *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (CMI 0,25 g/L), presentando actividad antimicrobiana mucho mayor contra las bacterias gram positivas y negativas.

Así mismo, en otro estudio por parte de Aguirre et al. (2021) evaluaron la resistencia antibiótica de cepas de *Vibrio spp.* aisladas de *Litopenaeus vannamei* y obtuvieron extractos de orégano y neem para la supresión de las cepas bacteriana in vitro. Donde determinaron alta resistencia a los antibióticos, el uso de extracto etanol de neem mediante el método de extracción soxhlet y rotaevaporador sin diluir dio mejor resultado en la inhibición de algunas cepas resistentes a la oxitetraciclina.

Morales et al. (2016) demuestra la actividad bactericida que tienen los tratamientos naturales aplicados a la acuicultura, evaluando la efectividad de extracto acuoso de neem y otros extractos contra *V. parahaemolyticus* en cultivos a baja salinidad. presentando una CMI de 62.50 mg ml^{-1} de neem, presentando halo de inhibición de 12.4 mm.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Materiales y equipos

Equipos

- Soxhlet
- Balanza gramera
- Autoclave
- Estufa

Materiales

- Micropipeta
- Hisopos
- Cajas petri
- Eppendorf
- Marcador
- Varilla de vidrio
- Asa de Digralsky
- Pinzas de laboratorio
- Discos absorbentes
- Papel aluminio
- Guantes
- Peceras
- Aireadores
- Termómetro

Soluciones y solventes

- Etanol al 96%
- Agar TCBS
- Agar Mueller-Hinton
- Agua destilada
- Solución salina

Especies

- *Azadirachta indica*
- *Litopenaeus vannamei*

7.2. Área de estudio

El estudio se realizó en los laboratorios de Química, Sanidad vegetal y Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, localizada en la ciudad de Machala, perteneciente a la Provincia de El Oro.

Figura 1: Ubicación del proyecto



7.3. Metodología

La metodología se fundamenta en un proceso de obtención de extractos de hojas y semillas de neem mediante equipo soxhlet, para posteriormente llevar a cabo un antibiograma que permita determinar el extracto que muestre un mayor halo de inhibición. Con esto determinado, se realiza un ensayo in vivo para conocer si el extracto es tóxico para los camarones.

7.3.1. Recolección de hoja y semilla de neem

Las hojas y semillas de neem fueron recolectados del área verde de la Ciudadela Machala IESS. La recolección se realizó a primeras horas de la mañana para evitar que se pierdan las propiedades de la planta por el proceso de fotosíntesis.

7.3.2. Obtención de extractos

- **Hojas:** Se realizó el proceso de secado en estufa, para luego triturarse y ser colocadas en el equipo soxhlet. Se pesó un total de 14,45g de hojas secas y 150 ml de etanol, para cada uno de los tubos del soxhlet (Anexo 3).
- **Semilla:** Se utilizaron semillas frescas que fueron trituradas y colocadas en una cantidad de 98,461 g de semilla y 115 ml de etanol.

7.3.3. Ensayo *in vitro* – Antibiograma

Se preparó el medio de cultivo con agar Mueller Hinton + NaCl, una vez preparado se procedió a autoclavar por 15 min a 121°C, junto con las pinzas e hisopos envuelto cada material en papel aluminio. Posteriormente, con ayuda de hisopos se tomó una muestra de cepa de *Vibrio sp.* y se sembró por rayado en placa.

Cada placa se dividió en 4 cuadrantes y en cada uno de estos se ubicó un disco absorbente, y con ayuda de una micropipeta se colocó 30 µl de cada extracto (hoja,

semilla, hoja + semilla) y el etanol (control) para proceder con la prueba de sensibilidad que luego de 24 horas permitió observar el diámetro del halo de inhibición de cada extracto y así determinar cuál es el mejor.

7.3.4. Ensayo *in vitro* con Tween 80 y extracto de hoja

Con el fin de poder probar el efecto del Tween 80 en la capacidad de inhibición del extracto de hoja de neem, se realizó una prueba de sensibilidad donde se probaron distintas proporciones 60-40 %, 80-20% y 90-10% de extracto de hoja de neem y tween 80 y un control con 100% extracto de hoja de neem. Para esto se siguió el mismo procedimiento del ensayo *in vitro* inicial descrito anteriormente.

7.3.5. Obtención de los camarones

Los organismos fueron adquiridos de la granja camaronera “TRES ÁNGELES” situada en el cantón Santa Rosa, El Oro. Se recolectaron 39 camarones identificando que tengan una talla muy uniforme con un peso promedio de 3 g, para luego transportarlos al lugar de estudio y ser distribuidos en las unidades experimentales (UE).

El agua que se utilizó en las UE se obtuvo de la misma camaronera, y para abastecer los 8 días de experimentación se utilizó agua de mar filtrada, teniendo en cuenta parámetros como pH de 7,5 y salinidad de 22 UPS. Se almacenó en un tanque de 40 litros para poder realizar los recambios cada 3 días a un 30% del volumen.

7.3.6. Ensayo *in vivo*

Se colocaron 4 camarones con una biomasa de 12 g por cada UE, teniendo una biomasa de total de 108 g. Se alimentó al 3,3% de la biomasa, distribuidas en dos dosis diarias, 10H30 y 16H00 pm.

Se proporcionaron 2 dosis diferentes de extracto de hoja de neem. Para el T1 se suministró 200 µl/g de alimento, en el T2 400 µl/g, y en T0 se aplicó 100 µl de etanol/g

de alimento, con la finalidad de conocer si el extracto resultaba tóxico o en efecto el etanol. Las dosis de extracto de hoja de neem fueron aplicadas en el alimento mediante aspersión.

En cuanto al mantenimiento del agua, se realizó sifoneo y recambio del 30% del volumen de agua cada 3 días, y se mantuvo parámetros de pH y salinidad en el mismo rango con el que se inició.

7.3.7. Evaluación de toxicidad

Evaluar la toxicidad nos permitirá saber si el extracto que estamos usando y el alcohol es seguro de consumir sin tener efectos adversos en los camarones como es la mortalidad. Este parámetro se midió cada 8 horas para tener una mayor observación del comportamiento de los animales.

7.3.8. Preparación de medio de cultivo para *Vibrio*

Para el medio de cultivo se utilizó el agar TCBS preparado según instrucciones de empaque, para siembra de hepatopáncreas con el fin de contar las colonias de *Vibrio sp.* Se realizó una siembra inicial previo al estudio experimental para determinación de supervivencia, preparando un pool de hepatopáncreas de 3 camarones de los recolectados en camaronera con el fin de poder tener la cantidad de UFC/ml inicial para posteriormente luego de aplicar los tratamientos en el alimento poder comparar y resaltar si los mismos han resultado en una disminución de vibrios. Se utilizó una cámara de flujo laminar para realizar la siembra en placas previamente esterilizadas con rayos UV por 20 min. Se realizó una dilución de 1:10 del pool de hepatopáncreas en solución salina con el fin de asegurar que se puedan contar las UFC. Luego se maceró y mezcló bien y se tomaron 100 µl para sembrar en la placa petri con agar TCBS con ayuda del asa Digrafsky. Una

vez se absorbió la muestra, se esperó 24 horas para realizar el conteo de las UFC de *vibrios*.

Culminado el tratamiento para análisis de supervivencia, se recolectaron muestras de hepatopáncreas de los camarones de cada unidad experimental para realizar un pool y seguidamente una siembra en placa bajo el mismo procedimiento descrito previamente.

7.3.9. Diseño experimental

Se llevó a cabo un Diseño Completamente al Azar de 3 tratamientos y 3 repeticiones con diferentes dosis de extracto de hoja de neem, teniendo 9 unidades experimentales, mismas que fueron recipientes de 8 litros de capacidad, que se llenaron con 7 litros de agua. Todas la UE contaron con aireación constante durante 8 días de duración del ensayo.

Tabla 2: Croquis del experimento

TRATAMIENTOS		
T1	T2	T2
T1	T0	T0
T2	T1	T0

Fuente: Autores

7.3.10. Análisis estadístico

Con respecto a los datos obtenidos del conteo de colonias de *vibrios* final, los resultados fueron analizados a través de la prueba estadística ANOVA de un factor intergrupos en el programa estadístico IBM-SPSS, con un 95% de confiabilidad, tomando una prueba Post-hoc, test de Duncan que permitió identificar la diferencia entre tratamientos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Efecto de prueba de sensibilidad frente a *Vibrio*

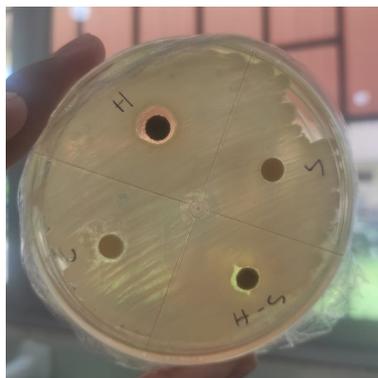
Los resultados obtenidos de los extractos y etanol (control) en el antibiograma fueron los expuestos en la Tabla 3, donde el extracto que mayor halo y por ende tuvo mayor efecto inhibitorio ante *Vibrio*, fue el extracto de hoja de neem.

Tabla 3: Efecto inhibitorio de los extractos ante *Vibrio*

Tratamiento	Diámetro del halo
Repetición 1	
Hoja	11 mm
Semilla	6 mm
Hoja-semilla	7 mm
Control	4 mm
Repetición 2	
Hoja	9 mm
Semilla	6 mm
Hoja-semilla	7 mm
Control	4 mm
Repetición 3	
Hoja	10 mm
Semilla	6 mm
Hoja-semilla	8 mm
Control	5 mm

Fuente: Autores

Figura 2: Antibiograma de los extractos de hoja, semilla, hoja-semilla y control.



Mediante la prueba de sensibilidad se puede comprobar cuan efectivo es el extracto natural obtenido para ser utilizado en la disminución o control de bacterias de *Vibrio* en el hepatopáncreas de los camarones. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con Aguirre (2019) que demostró la efectividad inhibitoria que tiene el extracto de neem sin diluir, contra cepas de vibrios, dando como resultado un halo con diámetro de 12.4 ± 1.7 mm. Así mismo en una investigación realizada por Benerjee et al. (2013) encontró diferentes grados de inhibición de extracto de neem contra bacterias de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolicitus* a 5 concentraciones diferentes: 10, 25, 50, 75 y 100%, siendo la última quien mostró mayor halo de inhibición con 19.6 ± 0.89 mm de diámetro frente a *V. parahaemolyticus* y 14.8 ± 1.1 mm para *V. alginolicitus*, y el de 10% con halos de 10.8 ± 1.1 y 8 mm.

Ranjit et al. (2014) evaluaron la eficiencia bacteriana que tiene el extracto de neem ante la presencia de bacterias Gram-negativas y Gram-positiva, la cual obtuvieron un halo de 17 mm contra *V. cholerae*, siendo una de las bacterias en donde observaron mayor zona de inhibición.

Cabe mencionar que el halo de inhibición que se obtuvo en la presente investigación con 11 mm muestra similitud con los resultados que se obtuvieron en las

investigaciones ya mencionadas y citadas, por lo tanto, se considera actividad antibacteriana del extracto de neem demostrando efecto inhibitorio frente a los vibrios.

Adicional a esto, se realizó un segundo antibiograma usando el disolvente Tween 80, con la finalidad de obtener una mejor emulsión del extracto, mostrando los siguientes resultados:

Tabla 4: Efecto bactericida del extracto más Tween 80

Tratamiento	Diámetro del halo
Repetición 1	
60% neem + 40% Tween	12 mm
80% neem + 20% Tween	11 mm
90% neem + 10% Tween	13 mm
Control: neem	10 mm
Repetición 2	
60% neem + 40% Tween	11 mm
80% neem + 20% Tween	12 mm
90% neem + 10% Tween	13 mm
Control: neem	9 mm
Repetición 3	
60% neem + 40% Tween	11 mm
80% neem + 20% Tween	11 mm
90% neem + 10% Tween	12 mm
Control: neem	9 mm

Fuente: Autores

Los datos obtenidos demuestran que la aplicación de Tween 80 permitió obtener un mayor halo de inhibición a diferentes concentraciones, esto gracias a que el Tween permite tener una mejor emulsión y por ende estabilidad del mismo Reis et al. (2008).

8.2. Efecto de toxicidad del extracto

La prueba de toxicidad se realizó en los 3 tratamientos según las dosis aplicadas a cada uno, dando como resultado el 100% de sobrevivencia. Esto quiere decir que el neem y el alcohol no presentan toxicidad alguna en su ingesta con el alimento balanceado a las dosis suministradas.

8.3. Efecto del extracto de hoja de neem ante colonias de *Vibrio*

Mediante una comparación numérica con respecto a la cantidad de UFC/ml inicial y final según los datos recolectados en las tablas 5 y 6, el tratamiento que más redujo la carga bacteriana en el camarón fue el de 200 µl/g. Sin embargo, los datos finales recolectados ameritaron un análisis estadístico.

Tabla 5: Cantidad de UFC/ml inicial en camarones.

Tratamiento	UFC/ml
T0	5 060
T1	5 200
T2	5 960

Fuente: Autores.

Tabla 6: Cantidad de UFC/ml final en camarones.

Tratamiento	UFC/ml	Promedio UFC/ml
T0-R1	3820	3 610
T0-R2	3200	
T0-R3	3810	
T1-R1	1280	1 290
T1-R2	1300	
T1-R3	1290	
T2-R1	2710	2 630
T2-R2	2520	
T2-R3	2660	

Fuente: Autores

Una comparación numérica de los valores de UFC/ml inicial y las UFC/ml promedio de cada tratamiento final, nos llevó a los siguientes resultados:

Tabla 7: Comparación numérica - porcentaje de reducción de UFC/ml de *Vibrio sp.*

Tratamiento	UFC/ml inicial	Promedio UFC/ml final	% de reducción
T0	5 060	3 610	28,7 %
T1	5 200	1 290	75,2 %
T2	5 960	2 630	55,9 %

Fuente: Autores

Se puede evidenciar mediante la comparación numérica en la Tabla 7, que el porcentaje de reducción del T1 es mayor y por ende más efectivo. Sin embargo, el tratamiento control también ha tenido reducción, es decir que el etanol e incluso los recambios de agua tienen efecto en la disminución de *Vibrio sp.*, pero esto no quiere

decir que el extracto deje de ser eficiente, ya que aun restándole el porcentaje de reducción del control al T1 ($75.2 - 28.7 = 46.5$) sigue marcándose una porción reductora.

El análisis estadístico de los datos de la tabla 6 mediante ANOVA de un factor intergrupos resultó en que hay una diferencia significativa entre los tratamientos por un p-valor menor a 0.05.

Tabla 8: ANOVA de un factor intergrupos en los datos obtenidos de UFC/ml de Vibrio.

ANOVA					
UFC_ml					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Entre grupos	8138400.000	2	4069200.000	89.828	0.000034
Dentro de grupos	271800.000	6	45300.000		
Total	8410200.000	8			

Fuente: Autores.

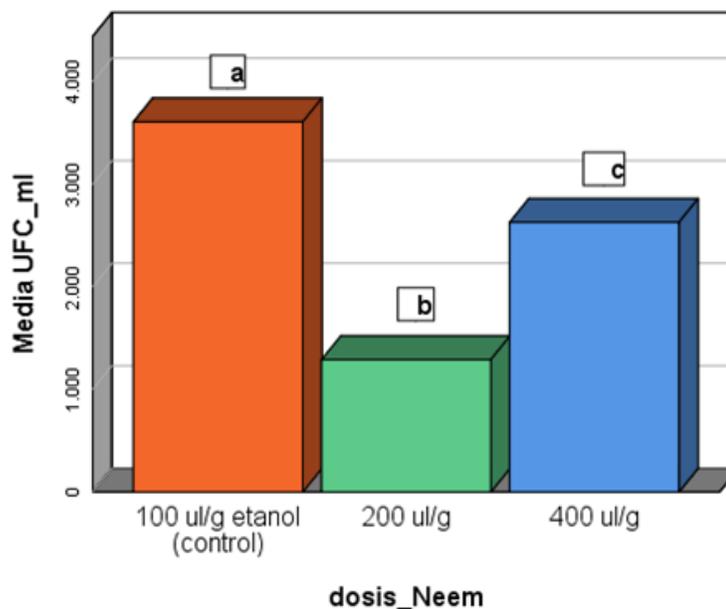
Para evidenciar entre qué tratamientos están las diferencias, se realizó como prueba post-hoc el test de Duncan que demuestra en la figura 3 que todos los tratamientos son diferentes estadísticamente entre sí.

Tabla 9: Test Duncan – UFC/ml de Vibrio en función de los tratamientos.

UFC_ml				
Duncan ^a				
dosis_neem	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
200 ul/g	3	1290.00		
400 ul/g	3		2630.00	
100 ul/g de alcohol	3			3610.00
Sig.		1.000	1.000	1.000

Fuente: Autores.

Figura 3: UFC/ml de *Vibrio* en función de los tratamientos a base de hoja de neem.



Nota: Las letras minúsculas muestran diferencia estadística entre los tratamientos ($p < 0.05$) (test Duncan).

En la figura 3, se evidencia una diferencia significativa entre todos los tratamientos. Además, el tratamiento de 200 $\mu\text{l/g}$ sostiene una menor cantidad de UFC/ml de *Vibrio sp.* lo que demuestra ser la dosis más adecuada para reducir la colonización bacteriana de *Vibrio sp.* en el camarón.

Reyes & Valle (2021) mencionan que una de las desventajas del uso de extractos naturales, es que la concentración tiene que ser mayor para mayor efecto y obtener los resultados esperados. A diferencia de nuestros resultados con respecto a lo que dice estos dos autores, no tuvimos mayor inhibición de *Vibrio sp.* cuando utilizamos mayor concentración, esto se puede deber a que ocurriera un efecto contrario, ya que una mayor concentración o dosificación pueda afectar al sistema inmune, como lo demostró Armijos & Vacacela (2022) en su trabajo investigativo, donde a mayor concentración de

extracto natural disminuyó el número de hemocitos, por ende, hizo que tuviera mayor concentración de bacterias. Contrario a lo que sugiere Reyes & Valle (2021), una mayor concentración no hace que reduzca la carga de *Vibrio sp.*, puesto que los hemocitos se pueden ver afectados, y estos también ayudan a la reducción de bacterias porque son mecanismos de defensa ante patógenos.

De acuerdo a los resultados el extracto si se podría utilizar como tratamiento, pero hace falta hacer más investigaciones, para saber si no afecta el sistema inmune de los animales, para tratar de optimizar este recurso.

La reducción de vibrios se demostró mediante la siembra de hepatopáncreas(HP) demostrando una disminución significativa de colonias, comparando la cantidad de población de la siembra inicial con la final, teniendo como resultado un descenso significativo. Sin embargo, el tratamiento control también mostró una reducción significativa, esto se debe a que el sifoneo y recambio de agua que se llevó a cabo permitió reducir la carga orgánica del agua, por ende, la carga de vibrios en este medio.

Los resultados *in vitro* de este trabajo investigativo son similares a los obtenidos en la investigación realizada por Morales et al. (2016) demostrando que el extracto de neem tiene la capacidad bactericida ante bacterias que se alojan en el HP de los camarones, en este caso los *Vibrio sp.*

Corroborando que las sustancias activas presentes en el neem contienen propiedades antibacterianas, que demuestran ser una alternativa para el control de la infestación bacteriana (Aguirre, 2019).

Esta investigación también es similar a otros estudios *in vivo* realizados en otros organismos acuáticos como los peces. Talpur & Ikhwnuddin (2013) demostraron que el uso de hojas de neem en el alimento balanceado (4g/kg) para lubina mejora la supervivencia (85%) y el sistema inmune, después de haber sido infestados con *V. harveyi*.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron los extractos alcohólicos de hoja y semilla de neem que, al evaluarlos en una prueba de sensibilidad mediante antibiograma, se obtuvo que el extracto de mayor inhibición fue el de hoja de neem, resaltando así su poder bactericida.

Las dosis de los tratamientos con extracto de hoja se establecieron en 200 y 400 $\mu\text{l/g}$ de extracto de hoja y 100 $\mu\text{l/g}$ de alcohol como control y se adicionó al alimento, el cual tuvo buena aceptación por parte de los camarones, considerando así que el alcohol y los recambios de agua, pueden tener influencia en la reducción de *Vibrio*. Además, se comprobó que el extracto de hoja de neem no es tóxico para los camarones ya que no hubo mortalidad en el estudio *in vivo*.

La dosis para reducción de *Vibrio* en *Litopenaeus vannamei*, según los resultados obtenidos, al ser significativamente diferente entre tratamientos y representar un mejor resultado numérico, se concluye que a 200 $\mu\text{l/g}$ se mantiene una dosis segura para el camarón que a su vez actúa dentro del mismo y reduce la carga bacteriana.

Por último, se sugiere que la adición de un 10% de Tween 80 al extracto de hoja de neem permite reforzar su acción inhibitoria, ya que los resultados del antibiograma evidencian que al agregar este producto se generó un mayor halo de inhibición.

10. RECOMENDACIONES

Realizar un estudio de seguimiento a la hidroestabilidad del pellet tras ser humedecido con el fitobiótico y la eficiencia en comparación a usar el fitobiótico como parte de la formulación balanceada para crear el pellet.

Evaluar la eficiencia de combinar el extracto de hoja de neem con extractos de otras plantas con características antimicrobianas.

Evaluar dosis distintas a los tratamientos estudiados para verificar si llega a tener un mejor efecto en el camarón.

Probar el fitobiótico en camarones que pasen por las primeras etapas de cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul, Z., Wee, W., Mohamad, S., Che, H., Hanif, M., Irwan, M., Van, H., Wen, K., & Seong, L. (2022). Role of phytobiotics in relieving the impacts of *Aeromonas hydrophila* infection on aquatic animals: A mini-review. *Frontiers in Veterinary Science*, 9(5). <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1023784>
- Adeeyo, A., Edokpayi, J., Alabi, M., Msagati, T., & Odiyo, J. (2021). Plant active products and emerging interventions in water potabilisation: disinfection and multi-drug resistant pathogen treatment. *Clinical Phytoscience*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40816-021-00258-4>
- Aguirre, S., Piraneque, N., & Cruz, R. (2018). Sustancias Naturales: Alternativa para el Tratamiento de Agua del Río Magdalena en Palermo, Colombia. *Información tecnológica*, 29(3), 59-70. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000300059>
- Aguirre, L., Sánchez, H., & Ordinola, A. (2021). Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(4). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386>
- Aguirre, L. (2019). *Efecto del neem (Azadirachta indica) y orégano (Origanum vulgare) en el crecimiento de Vibrio sp. resistentes a antibióticos, aislados de Litopenaeus vannamei*. Tumbes: Tesis de grado. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/487/TESIS%20-%20AGUIRRE%20CHANTA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Albuquerque, R., Lima, R., dos Fernandes, R. (2013). Fenotipado de cepas de *Vibrio* aisladas de la hemolinfa de camarones marinos. *Ciencias marinas*, 39 (3), 317-321.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802013000300007

- Armijos, C., & Vacacela, L. (2022). *Efecto del aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) sobre la disminución de bacterias totales en el cultivo de camarón Penaeus vannamei*. [Universidad Técnica de Machala] Tesis de grado. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/21917/1/Trabajo_Titulacion_22_08.pdf
- Banerjee, S., Mei, L., Shariff, M., Khatoun, H., & Yusoff, F. (2013). Antibacterial Activity of Neem (Azadirachta indica) Leaves on Vibrio spp. Isolated from Cultured Shrimp. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(2), 355-361. <http://dx.doi.org/10.3923/ajava.2013.355.361>
- Benala, M., Vaiyapuri, M., Sivam, V., Raveendran, K., Mothadaka, M., & Badireddy, M. (2023). Genome characterization and infectivity potential of vibriophage- ϕ LV6 with lytic activity against Luminescent Vibrios of Penaeus vannamei shrimp Aquaculture. *Viruses*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/v15040868>
- Chica, V. (2018). *Efecto antibacteriano del extracto de hojas de neem sobre cepas de Streptococcus mutans. Estudio in vitro*. Quito: Tesis de grado. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14563/1/T-UCE-0015-882-2018.pdf>
- Devi, N., Das, S., Sanjukta, R., & Singh, S. (2019). A comparative study on antibacterial activity of integumentary extract of selected freshwater fish Species and Neem extracts against gram-positive and Gram-Negative bacteria. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(2), 1352-1355. <https://www.entomoljournal.com/archives/2019/vol7issue2/PartW/7-2-154-242.pdf>

- Dhayanithi, N., Kumar, T., & Kathiresan, K. (2010). Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *J Environ Biol.*, 31(4), 409-12. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21186711/>
- Eufrazio, A., Vale, K., Santos, R., Beserra, A., & Alves, C. (2023). Metabolic profile, antimicrobial and toxicity evaluation of *Azadirachta indica* roots. *Ciencia Rural*, 55(5). <https://www.scielo.br/j/cr/a/NJ4jBDvd7cgZnXWSM8PhnJm/?lang=en>
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 3, Issues 1–2). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- Gómez, C., Carbay, Y., Sorroza, L., & Rivera, L. (2019). Sinergia de combinaciones de extractos vegetales para el control de vibriosis en sistema productivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 2(3), 91–98. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/15561>
- Gonzabay, Á., Vite, H., Garzón, V., & Quizhpe, P. (2021). Análisis de la producción de camarón en el Ecuador para su exportación a la Unión Europea en el período 2015-2020. *Polo Del Conocimiento*, 6(9), 1040–1058. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i9.3093>
- Gruber, C., Bui-Chau-Truc, D., Kesselring, J., Nguyen, N., Standen, B., & Wein, S. (2023). Diet-Independent positive effects of a multi-species probiotic on the growth performance and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in white leg shrimp. *Animals*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/ani13030331>
- Hernández, C., Carrascosa, E., Jiménez S., & Fouz, B. (2023). Exploring the Effect of Functional Diets Containing Phytobiotic Compounds in Whiteleg Shrimp Health:

- Resistance to Acute Hepatopancreatic Necrotic Disease Caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Animals*, 13 (8), 1354. <https://doi.org/10.3390/ani13081354>
- Kohli, V., Vaidhyathan, R., Balange, A., Nayak, B., & Kumar, S. (2021). Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed shrimp *Peneaus vannamei*, farm water and sediment. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(3), 1608-1616. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.3.57>
- Kumar, R. (2021). Medicinal plants and traditional practices of Baiga tribe in Amarkantak region of Eastern Madhya Pradesh. Chhattisharh: Natural Medicinal Plants. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=YJRwEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA147&dq=bioactive+compounds+from+medicinal+plants&ots=G5YzK0TMTC&sig=_IuCzgbXkFIfwSDfyts50jqFUxOA#v=onepage&q=bioactive%20compounds%20from%20medicinal%20plants&f=false
- Kumar, A., Kumar, S., & Luyten, W. (2021). Anti-vibrio and immune-enhancing activity of medicinal plants in shrimp: A comprehensive review. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 192-210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.006>
- López, J., Córdova, A., Morales, L., & Barona, R. (2023). El consumo mundial de camarón: Una perspectiva de la producción ecuatoriana y la demanda europea. *Revista Económica*, 11(1), 74–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.54753/rve.v11i1.1621>
- Morales, M., García, N., Bolan, M., & Puello, A. (2016). Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 122(1), 57-65. <https://doi.org/10.3354/dao03060>

- Ojeda, M., Gaxiola, S., & Delgado, F. (2022). Phytochemical composition and biological activities of the plants of the genus *Randia*. *Botanical sciences*, 100(4), 779-796. <https://doi.org/10.17129/botsoci.3004>
- Peña, N., & Varela, A. (2016). Prevalencias de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista de biología marina y oceanografía*, 51 (3), 553-564. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000300007>
- Prieto, A., Auró, A., Fernández, A., Pérez, M. (2005). El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8 (1), 38-49. <https://www.redalyc.org/pdf/432/43200805.pdf>
- Prithvisagar, K., Krishna, B., Kodama, T., Rai, P., Iida, T., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2021). Whole genome analysis unveils genetic diversity and potential virulence determinants in *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Virulence*, 12(1), 1936–1949. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1947448>
- Ranjit, R., Ajit, R., & Bhagyashree, B. (2014). Antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Neem) against Pathogenic Microorganisms. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 3. <http://www.jairjp.com/DECEMBER%202014/07%20RANJIT.pdf>
- Reyes, R., & Valle, C. (2021). Diseño de un protocolo de inclusión de aceites esenciales, como profiláctico y nutraceutico, para la optimización del proceso de producción de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Guayaquil: Tesis de grado. Obtenido de <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/51438>

- Ribeiro, R., Silva, P., & Marciano, J. (2022). Obtenção de extratos de plantas medicinais: uma revisão de escopo dos métodos extrativos modernos em comparação ao método clássico por soxhlet. *Revista Movimenta*, 15(1), 1-14. <https://doi.org/10.31668/movimenta.v15i1.12870>
- Rubio, M., Silveira, R., Hernández, D., Pérez, A., & Pozo, M. (2020). Prevalencia de enfermedades en el camarón de cultivo *L. vannamei* en Cuba. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 37(2), 57–65. <https://doi.org/01388452>
- Santiago, M., Espinosa, A., & Bermúdez, M. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40 (3), 22-32. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57912963005.pdf>
- Reis, F., Graças, M., Estevão, P., Karin, R., Soares, A. & Lima, L. (2008). Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). *Acta Amazonica*, 38(3). <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000300015>
- Sheikh, H., John, A., Musa, N., Abdulrazzak, L., Alfatama, M., & Fadhline, A. (2022). *Vibrio* spp. And their Vibriocin as a Vibriosis control measure in Aquaculture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(10), 4477-4491. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03919-3>
- Toledo, A., Castillo, N., Carrillo, O., & Arenal, A. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal.*, 30(2), 57–71. <https://doi.org/22247920>
- Talpur, A., & Ikhwanuddin, M. (2013). *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer*

- challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol*, 34(1), 254-64.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.003>
- Varela, A., & Choc, L. (2020). Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y limitaciones. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(3), e18165. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18165>
- Velázquez, A., Juárez, J., Racotta, I., Villarreal, H., Valdes, O., Luna, A., Rodríguez, C., Estrada, N., & Ascencio, F. (2019). Transcriptomic analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) in response to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS ONE*, 14(8), 1–29.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220993>
- Wang, C., Yao, D., Zhao, M., Lu, K., Lin, Z., Chen, X., Zhao, Y., & Zhang, Y. (2022). Shrimp lipid droplet protein Perilipin involves in the pathogenesis of AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810520>
- Wasihun, Y., Alekaw, H., & Dires, K. (2023). Antibacterial activity and phytochemical components of leaf extract of *Calpurnia aurea*. *Scientific Reports*, 13 (1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-36837-3>
- Wen, Q., Gen, L., & Cai, W. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13 (20).
<https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Wyile, M., & Merrell, D. (2022). The Antimicrobial Potential of the Neem Tree *Azadirachta indica*. *Front. Pharmacol*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.891535>

ANEXOS

Anexo 1: Peso de muestra de hojas



Anexo 2: Papel filtro con muestra de neem en tubo del Soxhlet.



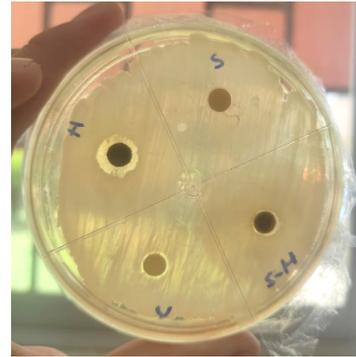
Anexo 3: Proceso de extracción en Soxhlet



Anexo 4: Proceso para antibiograma



Anexo 5: Resultado antibiograma



Anexo 6: Placa de siembra de *Vibrio*- T2



Anexo 7: Preparación de distintas proporciones de extracto de neem y tween 80



Anexo 10: Separación de las dosis de alimentos para cada tratamiento



Anexo 8: Diseño experimental completamente al azar.



Anexo 9: Peso del alimento para las dosis del día.

