



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**EVALUACIÓN
HISTOMORFOMETRICA E
HISTOQUÍMICA DEL INTESTINO
ANTERIOR DE ALEVINOS DE
TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis
niloticus*) SUPLEMENTADAS CON
ACEITES ESENCIALES EN EL
ALIMENTO**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN
SANIDAD ACUÍCOLA

JESÚS ROLDAN JUÁREZ

LIMA – PERÚ

2020

ASESOR

Mg, MV. Cielo Aydeli Llerena Zavala

Docente Auxiliar de la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia - UPCH

CO - ASESOR

Mg. MVZ. Carlos Eduardo Smith Dávila

DEDICATORIA

A mis padres, Jesús y Rosa; por su infinito amor, porque en ellos encontré el mejor ejemplo de vida, la motivación y determinación para seguir este camino que compartimos.

A mis hermanos, Sonia, Víctor, Américo, Hilda, Norka, Adolfo, por su apoyo incondicional, su compañía sempiterna, que me da fuerzas para continuar adelante.

A mis abuelos que en paz descansen Víctor Roldan, Víctor Juárez, Victoria Ramírez, Justina Sarmiento, que me enseñaron a seguir luchando por mi futuro y mi tranquilidad.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios por darme salud, voluntad y darme la oportunidad de seguir pisando esta tierra bendita y cumplir mis metas.

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en especial a la plana docente y administrativa de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por la conducción de mi formación profesional y por las sabias enseñanzas impartidas.

A mis Asesores, Mg, MV Cielo Llerena Zavala y Mg. MVZ. Carlos Eduardo Smith Dávila, por guiarme por el camino de las ciencias veterinarias, la vida y la amistad.

FINANCIAMIENTO

Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) mediante el financiamiento del proyecto: Maestría en Sanidad Acuícola en la Universidad Peruana Cayetano Heredia- Convenio N° 230-2015-FONDECYT- Esquema Financiero EF 230 “Programa de Maestría en Universidades Peruanas”.

Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura (PNIPA). Mediante el cofinanciamiento del subproyecto “Capacitación en suplementación de alimento balanceado con aceites esenciales en la dieta, para aumentar los índices productivos en la crianza de tilapia en el distrito de Barranca PNIPA-ACU-SEREX-PP-000115”.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III.	MARCO TEÓRICO	4
3.1.	Generalidades de la tilapia nilótica.....	4
3.2.	Ciclo biológico de la tilapia.....	5
3.3.	Clasificación Taxonómica	5
3.4.	Morfología externa	6
3.5.	Morfología interna.....	7
3.5.1.	Sistema digestivo.....	7
3.5.2.	Tejido linfoide asociado intestino (GALT)	8
3.5.3.	Células caliciformes	8
3.5.4.	Pliegues intestinales	10
3.6.	Alimentación.	11
3.6.1.	Requerimientos nutricionales de la tilapia.	12
3.7.	Aditivos alimenticios.....	13
3.7.1.	Aceites esenciales	16
3.7.2.	Mecanismo de acción	17
3.7.3.	Carvacol.....	19
3.7.4.	Timol	20
3.7.5.	Cinamaldehído.....	21
3.8.	Uso de aceites esenciales en acuicultura	22
3.9.	Aceite esencial EMERALD®	23
IV.	JUSTIFICACIÓN	25

V. OBJETIVOS.....	26
5.1. Objetivo general	26
5.2. Objetivo específico.....	26
VI. METODOLOGIA.....	27
6.1. Tipo de Estudio	27
6.2. Lugar de Estudio	27
6.3. Población Objetivo	27
6.4. Criterios de inclusión y exclusión	28
6.5. Tamaño de muestra	28
6.6. Recolección de muestras	28
6.7. Procesamiento de muestras.....	29
6.8. Obtención de datos	29
6.9. Consideraciones éticas	30
6.10. Plan de análisis de datos	30
VII. RESULTADOS	31
7.1. Performance en el crecimiento	31
7.2. Morfometría intestinal.....	33
7.3. Reacción Histoquímica.....	37
VIII. DISCUSIONES	40
IX. CONCLUSIONES	45
X. RECOMENDACIONES	46
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
XII. ANEXOS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. Composición química de compuestos volátiles (aceites esenciales) en microencapsulado EMERALD [®] por microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	24
TABLA 02. Medición de peso y talla de alevines de tilapia nilótica (<i>Oreochomis niloticus</i>) suplementadas con aceites esenciales (EMERALD [®])	31
TABLA 03. Mediciones morfométricas y cuantificación de células caliciformes de tilapia nilótica (<i>Oreochomis niloticus</i>) suplementadas con aceites esenciales (EMERALD [®])	33
TABLA 04. Cuantificación de células caliciformes de tilapia nilótica (<i>Oreochomis niloticus</i>) a diferentes coloraciones histoquímicas, suplementadas con aceites esenciales (EMERALD [®])	38

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 01.** Diferencia entre los pesos con la suplantación de aceites esenciales en el alimento entre el grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM). 32
- Figura 02.** Diferencia entre las tallas de crecimiento entre la suplantación del grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM) de aceites esenciales en el alimento. 32
- Figura 03.** Diferencia en la longitud de los pliegues intestinales con la suplantación de aceites esenciales en el alimento del grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM). 34
- Figura 04.** Fotografías de cortes transversales de intestino anterior de alevines de tilapia en el día 30 del grupo Tratamiento (500g/TM), (A) Tinción con ácido periódico de Schiff, (B) Alcían Blue pH 2.5 y (C) Alcían Blue pH 0.5. Microscopio Leica, aumento 10X. 35
- Figura 05.** Diferencias entre el ancho de los pliegues intestinales con la suplementación de aceites esenciales en el alimento entre el grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM). 35
- Figura 06.** Fotografías de cortes transversales de intestino anterior de alevines de tilapia en el día 15 del (A) grupo control y el (B) grupo Tratamiento (500g/TM), con una Tinción con Alcían Blue pH 2.5. Microscopio Leica, aumento 10X. 36
- Figura 07.** Diferencias en el número de células caliciformes con la suplementación de aceites esenciales en el alimento entre el grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM). 36

Figura 08. Fotografías de cortes transversales de intestino anterior de alevines de tilapia en el día 30 del grupo Tratamiento (500g/TM), (A) Tinción con ácido periódico de Schiff, (B) Alcian Blue pH 2.5 y (C) Alcian Blue pH 0.5. Microscopio Leica, aumento 40X. 37

Figura 09. Número de reacciones positivas de las glicoproteínas a las pruebas histoquímicas con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales entre el grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM). 39

Figura 10. Fotografías de cortes transversales de intestino anterior de alevines de tilapia en el día 30 del grupo Tratamiento (500g/TM), (A) Alcian Blue pH 2.5 (B) Alcian Blue pH 0.5 y (C) Tinción con ácido periódico de Schiff. Microscopio Leica, aumento 40X. 39

RESUMEN

El uso de aceites esenciales en la acuicultura ha venido tomando mayor relevancia como promotores de crecimiento e inmunopotenciadores en diferentes especies. El objetivo fue evaluar la histomorfometría e histoquímica del intestino anterior en alevinos de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) suplementados con una mezcla microencapsulada de aceites esenciales de clavo de olor, canela, orégano y palma. Se suplementó el alimento a una dosis de 500 g/TM (0.5%) a una densidad de 5kg/m³. Se obtuvieron 10 muestras de intestino anterior a los 0, 15, 30 días postratamiento, las cuales se sometieron al procedimiento histológico de rutina con hematoxilina y eosina (H&E) y pruebas histoquímicas Ácido periódico de Schiff (PAS/H), Alcian Blue pH (0.5 y 2.5). La influencia en el crecimiento y el número de células caliciformes mejoró a los 30 días postratamiento ($p < 0.05$), y los pliegues intestinales aumentaron de tamaño a partir de los 15 días postratamiento ($p < 0.05$). Las pruebas histoquímicas a la reacción de la glicoproteínas ácidas con el Alcian-Blue mostraron diferencias significativas a los 30 días postratamiento ($P < 0.05$). Sin embargo, las glicoproteínas neutras no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). El microencapsulado de aceites esenciales incremento el número de células caliciformes, y morfología intestinal.

Palabras Clave. Histomorfometría, histoquímica, *Oreochromis niloticus*, aceites esenciales, intestino anterior.

ABSTRACT

The use of essential oils in aquaculture has been taking on greater relevance as growth promoters and immunopotentiators in different species. The objective was to evaluate the histomorphometry and histochemistry of the anterior intestine in gray tilapia fry (*Oreochromis niloticus*) supplemented with a microencapsulated mixture of essential oils of clove, cinnamon, oregano and palm. The food was supplemented at a dose of 500 g / MT (0.5%) at a density of 5kg/m³. Ten samples of the anterior intestine were obtained at 0, 15, 30 days after treatment, which were subjected to the routine histological procedure with hematoxylin and eosin (H&E) and histochemical tests Periodic Schiff acid (PAS/H), Alcian-Blue pH (0.5 and 2.5). The influence on growth and the number of goblet cells improved after 30 days post-treatment (p <0.05), and the intestinal folds increased in size after 15 days after treatment (p <0.05). Histochemical tests on the reaction of acid glycoproteins with Alcian-Blue showed significant differences at 30 days post-treatment (P <0.05). However, neutral glycoproteins showed no significant differences (p> 0.05). The microencapsulation of essential oils increased the number of goblet cells, and intestinal morphology

Keywords. Histomorphometry, histochemistry, *Oreochromis niloticus*, essential oils, head gut.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de tilapia tiene un rol importante en la seguridad alimentaria en el mundo debido a que contribuye una fuente importante de proteínas para el consumo humano. Además, aporta en el sustento económico para miles de familias. La tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) es una de las especies de agua dulce más cultivada y comercializadas en el mundo que representa aproximadamente más de 6 mil millones de dólares (FAO, 2017). En el Perú, se llegó a cosechar 100 454,82 toneladas métricas (TM) de recursos hidrobiológicos de acuicultura, de los cuales la tilapia, representó el 3.3 % de la cosecha de ese año (PRODUCE, 2017).

La intensificación de los cultivos generan un estrés en los peces, lo cual incrementa la susceptibilidad a la presentación de enfermedades infecciosas (Zepeda, 2015). Ante estos problemas, se ha incrementado el uso de antibióticos como profilácticos o terapéuticos generando problemas de resistencia bacteriana, contaminación del medio ambiente y residuos en el producto final. El mal uso y abuso de los antibióticos es una problemática creciente en el mundo (Valladão, 2018), conllevando a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, las cuales van encaminadas a las fuentes naturales que tienen efectos similares a los antibióticos y no representan un riesgo para la salud del consumidor.

El uso de aceites esenciales en la acuicultura está tomando mayor relevancia debido a sus efectos inmunopotenciadores, que permiten reducir la manifestación de enfermedades, y promueven la disminución del uso de antibióticos (Abdollahzadeh *et al.*, 2014). Así mismo, aporta beneficios positivos en la anatomía y fisiología intestinal actuando directamente sobre la digestión, absorción de nutrientes (Mohamed *et al.*, 2014) y tiene una función relevante en el sistema inmunológico.

El sistema gastrointestinal está en continuo contacto con los patógenos después de la ingesta del alimento (Torrecillas *et al.*, 2015). Nicholson *et al.*, 2012 describe que el intestino cumple una función relevante en el sistema inmune, debido a que muchas enfermedades infecciosas se inician por la colonización de la mucosa intestinal y la eficiencia de la barrera intestinal depende de la producción de mucus e integridad epitelial, la presencia y equilibrio entre las bacterias comensales; las cuales mantienen la homeostasis intestinal y la salud de los peces, evitando la aparición de las enfermedades infecciosas.

Las células caliciformes son las encargadas de secretar mucopolisacáridos que forman parte de la barrera más importante contra las bacterias oportunistas conteniendo sustancias con acción antimicrobiana, inmunoglobulinas y lisozimas que destruyen las paredes celulares de las bacterias patógenas impidiendo su colonización (Schroers *et al.*, 2009). Por otro lado, la densidad y el tamaño de los pliegues intestinales dependen del número de células que lo componen, por lo tanto, cuanto mayor sea el número de células, mayor es el tamaño de los pliegues intestinales y, consecuentemente, mayor es el área de absorción de nutrientes (Velasco *et al.* 2010). Por lo expuesto anteriormente, nos planteamos este trabajo de investigación con el objetivo de evaluar la histomorfometría e histoquímica del intestino de alevinos de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) suplementados con una mezcla microencapsulada de aceites esenciales de clavo de olor, canela, orégano y palma (EMERALD[®]) en la alimentación con la finalidad de contribuir al conocimiento de los efectos de este suplemento en los peces de cultivo.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acuicultura en el mundo está orientada a incrementar la eficiencia productiva para obtener una mayor rentabilidad. Por lo cual, se ha venido intensificando el uso de promotores de crecimiento como uno de los principales medios para aumentar su eficiencia productiva. Sin embargo, la organización mundial de la salud (OMS) en el 2005 restringió el uso de estos productos debido a que han venido favoreciendo a la resistencia bacteriana, poniendo en riesgo la salud animal y humana (Wallace, 2004; Castanon, 2007). Debido a esto, se han venido buscando alternativas en fuentes naturales que tengan efectos similares, sin que representen un riesgo para el consumidor.

El uso de aceites esenciales en la dieta, es uno de los productos naturales que ha tomado mucha relevancia debido a sus beneficios en el crecimiento, salud y resistencia a enfermedades en diferentes especies acuícolas. Sin embargo, al hacer uso de aditivos que tengan un efecto beneficioso en la alimentación y salud, es importante asegurarse de que no causen toxicidad en el animal. En este sentido, la histología es una herramienta útil debido a que las características de los tejidos de los órganos internos se pueden ver alterados en beneficio de la fisiología animal o pueden tener efectos tóxicos generando alteraciones y necrosis en los tejidos.

Son muy pocas las investigaciones que se han realizado en el uso de estas moléculas como aditivos en los sistemas de cultivo de tilapia, para determinar los efectos positivos en el crecimiento, ganancia de peso, morfología intestinal y sobre todo como un inmunopotenciador para enfrentar a las bacterias oportunistas en la mucosa intestinal.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de la tilapia nilótica

La Tilapia es un pez teleósteo dulce acuícola perteneciente a la familia Cichlidae, provenientes de África (El Sayer, 2006), denominados genéricamente "Tilapias" son especies de aguas tropicales, siendo la especie más cultivadas en el mundo (FAO, 2017) debido a su gran adaptabilidad a distintos tipos de cautiverio (FONDEPES, 2004; Dirección de Acuicultura, 2014). Su amplia difusión por el mundo se debe a su precocidad, prolificidad, tolerancia a altas densidades, resistencia a enfermedades y a su gran adaptación a los policultivos (Martini y Morales, 2017). Los productores más grandes de tilapia son China, Egipto, Tailandia, siendo Estados Unidos uno de los principales importadores, llegando a consumir 225,000 toneladas métricas anualmente de tilapia (Harvey, 2015).

En los años 70, se introdujeron en el Perú tres especies de Tilapia (*T. rendalli*, *T. nilotica* y *T. mossambica*), por instituciones como el IMARPE y la Universidad Nacional Agraria La Molina (Totocayo, 2016), siendo previamente introducida y promovida en los años 50 por la Dirección General de Caza y Pesca del Ministerio de Fomento y Agricultura (Baltazar, 2007), que permitieron diversas investigaciones. En la actualidad, se ha convertido en la segunda especie íctica más cultivada, alcanzando a producirse 3 041,87 toneladas métricas en el 2017 (PRODUCE, 2017). La producción de tilapia se viene desarrollando en los departamentos de San Martín, Piura y Lima siendo estos los de mayor producción. En la actualidad existen 92 centros acuícolas autorizadas para el cultivo de tilapia,

representando un total de 114,93 hectáreas destinadas a su producción (PRODUCE, 2017).

3.2. Ciclo biológico de la tilapia

El ciclo biológico de la tilapia comprende cuatro etapas, la primera empieza con la fecundación por el apareamiento de los reproductores, donde el macho construye el nido para que sean colocados los huevos por la hembra, los huevos son fecundados por el macho, esparciendo el esperma por encima de ellos; seguidamente, los huevos son recogidos por la hembra en la boca donde los incuba por un período de 3 a 5 días (Saavedra, 2006). En la segunda etapa, las larvas poseen un saco vitelino en el vientre de donde se alimentan los primeros días de nacidos. Esta etapa dura alrededor de 3 a 5 días (Poot *et al.*, 2009). En la tercera etapa, el saco vitelino es absorbido y el alevín es capaz de nadar e ingerir alimentos libremente alcanzando una talla de 1 a 5 cm de longitud (Meyer y Triminio, 2007). La cuarta etapa, lleva un periodo de 3.5 a más meses y son considerados juvenil-adultos, donde los peces alcanzan una talla entre 10 y 18 cm y un peso de 70 a 100 gr. (Poot *et al.*, 2009).

3.3. Clasificación Taxonómica

Existen varias revisiones y cambios continuos en la clasificación taxonómica en la tilapia, sin embargo, taxónomos e investigadores siguen utilizando la clasificación hecha por Berg y modificada por Trewavas en 1993.

PHYLUM	VERTEBRATA.
SUBPHYLUM	CRANEATA
SUPERCLASE	GNATHOSTOMATA
SERIE	PISCIS.
CLASE	ACTINOPTERIGII.
ORDEN	PERCIFORMES
SUBORDEN	PERICOIDAE
FAMILIA	CICHLIDAE.
GENERO	<i>Oreochromis</i>
ESPECIE	<i>O. niloticus</i>

3.4. Morfología externa

La tilapia presenta un cuerpo generalmente comprimido y a menudo discoidal, raramente alargado, la aleta dorsal y anal cortas que presentan espinas y radios, y una aleta caudal redondeada. Presentan una línea lateral interrumpida en dos partes: la parte anterior superior y posterior (Cuellar, 2000). La cabeza del macho es invariablemente más grande que la de la hembra, presenta una boca ancha y bordeada de labios gruesos y tiene un solo orificio nasal a cada lado de la cabeza. Es una especie tropical, su temperatura de cultivo oscila entre los 20 y 30 °C (Arredondo *et al.*, 1994).

3.5. Morfología interna

3.5.1. Sistema digestivo

Los peces presentan una gran variación en la estructura del sistema digestivo, porque están generalmente correlacionadas al hábito alimenticio, edad, el medio acuático que influyen en la forma y el tamaño de un órgano en particular, así también las diferencias morfológicas del tracto intestinal ocurren en la misma especie con hábitos alimenticios diferentes. Las especies carnívoras poseen un estómago con capacidad para grandes volúmenes de presa y un intestino más corto, debido a que la digestión ocurren en el estómago a diferencia de las especies herbívoras que poseen un estómago sin desarrollar y un intestino largo en el cual ocurre la digestión, y las especies omnívoras presentan características intermedias (Baldisseroto, 2009., Moraes y Almeida, 2014). La tilapia es considerada como la especie representante de peces filtradores omnívoros y tiene un sistema digestivo más o menos unas 1.2 a 4.7 veces la longitud del cuerpo (Hurtado, 2005). Muchas especies de peces contienen ciegos pilóricos o divertículos ciegos con un epitelio tipo intestinal muy plegado que se encuentran en la parte final del estómago, sin embargo la tilapia no presenta ciegos pilóricos.

Los peces carecen de glándulas salivales, siendo éstas sustituidas por glándulas mucosas (Vargas, 2011) y glándulas asociadas; hígado y páncreas (Vásquez, 2004; Zamora y Rubio, 2009).

La composición del tejido intestinal está conformado por cuatro tunicas observadas desde el lumen intestinal hacia el exterior que son: la mucosa (formada por una membrana basal de epitelio y por debajo una capa de tejido conectivo denominada

lámina propia), submucosa (conformada por tejido conectivo), muscular (constituida por una muscular interna de fibras longitudinales y muscular externa de fibras de forma circular), la serosa (conformada por tejido conectivo laxo y un epitelio plano simple). Los leucocitos intraepiteliales -IELs- son las células linfoides que se encuentran en el epitelio y en la lámina propia se denominan leucocitos de la lámina propia (LPLs) (Rombout *et al.*, 2011).

3.5.2. Tejido linfoide asociado intestino (GALT)

Los peces presentan órganos linfoides primarios (riñón anterior y el timo) y secundario (bazo y el tejido asociado a mucosas) (Zapata *et al.*, 2006; Salinas, 2015) como son intestino, branquias, piel, órgano olfativo. El tejido linfoide asociado intestino (GALT) por sus siglas en inglés tiene una gran importancia al encontrarse entre el huésped y microorganismos oportunistas (Sommer y Bäckhed, 2013). El GALT, cumple doble función en los organismos acuáticos: la digestión y absorción de nutrientes, y, mantener la homeostasis inmune, al ser una barrera contra microorganismos oportunistas que son potencialmente dañinos para los peces (Salinas, 2015).

3.5.3. Células caliciformes

Las células caliciformes o células Globets, se encuentran en gran proporción en el ápice de los pliegues intestinales, son encargados de secretar glicoproteínas denominadas mucinas. Las células caliciformes producen constantemente glicoproteínas que recubre la lámina propia de los pliegues intestinales proporcionando el espacio para llevar a cabo el intercambio molecular en la mucosa intestinal (Inami *et al.*, 2009; Cao y Wang, 2009; Oropesa *et al.*, 2017).

Existen diferentes tipos de glicoproteínas (neutras, ácidas sulfatadas y ácidas no sulfatadas) de acuerdo a su estructura química. Las glicoproteínas neutras pueden proporcionar cofactores necesarios para el proceso de digestión, y absorción de nutrientes (Anderson, 1986); mientras se tenga un mejor aprovechamiento de los nutrientes en la alimentación, se tendrá un mejor estatus sanitario, y así mejorará su desempeño productivo. Las glicoproteínas ácidas protegen el epitelio intestinal contra la degradación por la acción de las glucosidasas, aumentan la resistencia del moco contra la acción de las bacterias (Carrassón *et al.*, 2006) evitando la translocación de bacterias (Deplancke y Gaskins, 2001; Kim y Ho, 2010) y pueden regular la transferencia de proteínas o fragmentos así como de iones y fluidos (Petrinec *et al.*, 2005).

Por otro lado, la producción de mucopolisacáridos puede ser regulada por la activación de rutas de señalización por factores de transcripción que pueden interactuar con promotores en la transcripción y por factores bioactivos de microorganismos, toxinas, productos de microorganismos, hormonas/neuropéptidos, etc. (Kim y Ho, 2010).

La eficiencia de la barrera intestinal contra patógenos oportunistas depende de la producción de mucus que favorecen a las bacterias comensales que son responsables en mantener la homeostasis intestinal y mejorar la salud de peces, ya que muchas de las enfermedades infecciosas son iniciadas a través de la colonización de la mucosa intestinal y las bacterias con potenciales probióticos compiten por nutrientes principalmente como el hierro y el calcio (Fe^+ y Ca^+), compiten por sitios de adhesión (Torrecillas *et al.*, 2015).

3.5.4. Pliegues intestinales

La anatomía interna de los peces es bastante variable pudiendo presentar superficies relativamente lisas o con pliegues que pueden ser longitudinales, circulares y/o reticulares (Kapoor *et al.*, 1975; Genten *et al.*, 2009; Wilson y Castro, 2011).

Los pliegues intestinales son proyecciones longitudinales en la mucosa, que se extienden en la luz del intestino como dedos flexible (Vargas, 2011), cuya superficie está tapizada por una sola hilera de células epiteliales de diversos tipos; que afectan la mucosa intestinal y amplifican la superficie de absorción unas 5-6 veces (Herrería, 2013). Desde el punto de vista histológico en un corte transversal y longitudinal, estos pliegues a menudo pueden parecerse a los más convencionales microarquitectura de las vellosidades de los mamíferos, y en ocasiones se han confundido con vellosidades debido a que los surcos entre pliegues crean espacios potenciales entre pliegues discretos de la mucosa, y pueden formar estructuras de pseudocriptas que pueden parecer similares a las criptas intestinales de mamíferos. Sin embargo, a diferencia de los mamíferos, los peces no tienen criptas características de la mucosa intestinal (Inami *et al.*, 2009).

Las pliegues ayudan a la rotura y mezclado del alimento con los jugos enzimáticos secretados y proporcionan un gran aumento de la superficie de la mucosa intestinal para la absorción eficiente de los nutrientes y esta absorción está influenciada por el área superficial disponible para los nutrientes, es decir, mientras más sea la densidad de los pliegues mejor será la absorción (Vargas, 2011). El tamaño de los pliegues es un factor a tener en cuenta en la capacidad del intestino para digerir y absorber alimento (Velasco *et al.* 2010). A mayor altura de los pliegues intestinales

se traduce en un aumento no sólo de la superficie intestinal, sino también, de la actividad de las enzimas del borde en cepillo y de los sistemas de transporte de nutrientes (Pluske *et al.*, 1996), lo que da lugar a una activación de las funciones de digestión y absorción (Vargas, 2011).

La densidad y el tamaño de los pliegues intestinales dependen del número de células que lo componen, por lo tanto, cuanto mayor sea el número de células mayor es el tamaño de los pliegues intestinales y consecuentemente mayor área de absorción de nutrientes (Velasco *et al.* 2010).

3.6. Alimentación.

La tilapia tiene la facilidad de obtener alimento natural: plancton, hojas verdes, organismos bentónicos, desperdicios domésticos, semillas, frutas fraccionadas gracias a sus dos mecanismos a) dientes del complejo mandibular faríngeo que trituran los tejidos vegetales y b) bajo pH que es capaz de romper las paredes celulares de las algas verde-azules (Vargas, 2011). Por otra parte, suele consumir huevos, larvas, gusanos y ciertos peces pequeños (alevines), por lo cual es denominada como omnívora. Además, es capaz de aprovechar las proteínas (no utilizadas) eliminadas en las heces de otros animales (Totocayo, 2016).

Para la alimentación de los peces en sus diferentes estadios productivos, se debe considerar el nivel de proteína el cual garantiza su máximo crecimiento. El nivel de proteínas disminuye con el incremento del peso del pez. En la elaboración de alimentos balanceados para el cultivo intensivo de tilapia la proteína puede llegar a representar más del 50% del costo total del alimento (Arévalo y Marín, 2011).

3.6.1. Requerimientos nutricionales de la tilapia.

La alimentación de los peces a base de concentrados comerciales tiene una alta participación en los costos totales de la producción, de ahí la importancia de proporcionar alimentos balanceados con las cantidades precisas de nutrientes y estos contenidos varían según el sistema de cultivo utilizado (extensivo, semi intensivo e intensivo) y según el peso que el pez tenga (Torres y Hurtado, 2012).

Los requerimientos de proteína para la tilapia son afectados por la edad, tamaño, calidad del agua, contenido de energía de la ración, la fuente de proteína y las condiciones de cultivo (El - Sayed, 2006).

Hayashi *et al.* (2002) recomienda 35% de proteína bruta en la fase de larva para su máximo desempeño. Los requerimientos de proteína bruta para las fases de reversión (41,30%), pos reversión hasta 100 g (29,73%) y mayor de 100 g son de 26,8% (Costa *et al.*, 2009 y Furuya y Furuya, 2010).

Los requerimientos de aminoácidos sulfurados disminuyen con el aumento del peso de la tilapia, para las fases de reversión (1,32%), en post reversión y hasta los 100 g de peso (0,92%), y 0.82% para tilapias mayores a 100 g de peso (Furuya y Furuya 2010). Estudios recientes recomiendan usar una mezcla de aminoácidos sulfurados de metionina y cistina a una proporción de 50:50 para mejorar el rendimiento de tilapia de Nilo. La tilapia requiere aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, que puede ser atendido parcialmente por la tirosina (NRC, 1993). Furuya *et al.* 2004 y Bomfim *et al.* 2010, estimaron en 1,42% y 1.70% el requerimiento de lisina para tilapia de Nilo en fase de terminación y alevinos respectivamente, con dietas elaboradas a base de maíz y torta de soya.

3.7. Aditivos alimenticios

Los aditivos utilizados en la producción animal son sustancias, microorganismos o productos formulados, adicionados intencionalmente en la ración, según la normativa 13/2004 (MAPA, 2004) para influenciar en las propiedades físicas o químicas de la dieta, como también afectar el desempeño de los animales o mejorar la salud (Dawood *et al.*, 2017). Los aditivos más utilizados en la acuicultura son los probióticos como *Bacilo* y *Lactobacillus*, mucopolisacáridos, glucanos y los productos extraídos de plantas medicinales en forma de polvo, extracto acuoso y aceites esenciales (Carbone y Faggio, 2016; Hai, 2015).

El uso de aditivos alimenticios puede promover un aumento de los pliegues, el que es asociado a la mejor eficiencia, al aprovechamiento de la ración y a una excelente salud intestinal (Giannenas *et al.*, 2011). El animal que aprovecha mejor los nutrientes de una ración, consecuentemente, tendrá un incremento en su estatus sanitario, el que puede resultar en mayor resistencia a los desafíos propios de los sistemas de crianza intensivas, además de mejorar el desempeño productivo.

Los aceites esenciales están siendo probados en la actualidad como suplementos en las dietas alimenticias por su contenido nutricional y sus aceites esenciales como fuente secundaria, siendo el timol, carvacrol, eugenol, cinamaldehído, y los flavonoides entre otros, los componentes que brindan efectos benéficos anticoccidial, anti fúngico, antioxidante, antibacteriano y más, a nivel sistémico (Awaad y Awaad, 2017).

3.7.1. Probióticos

La aplicación de los probióticos como aditivos en la dieta de los organismos acuáticos tiene como objetivo fortalecer la microbiota intestinal para proporcionar beneficios en salud de los peces (Merrifield *et al.*, 2010; Walker, 2011); a través de la mejora de la morfología intestinal, respuesta inmune, resistencia a enfermedades (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011), equilibrio de la microbiota intestinal así también mostrando una tolerancia al estrés (Lara *et al.*, 2003; Rollo *et al.*, 2006; Aly *et al.*, 2008). Los criterios para ser candidatos a probióticos son el de tener la capacidad de sobrevivir al paso gástrico, poblar el tracto intestinal, competir algunos filotipos endógenos y forman asociaciones con la mucosa intestinal de los peces para ejercer su efecto en el sitio de acción (Ferguson *et al.*, 2010).

Los probióticos tienen la capacidad de modular las actividades fisiológicas de las células de la mucosa intestinal en donde estimulan los parámetros inmunes aumentando la actividad de la lisozima del moco intestinal después de la alimentación Newaj-Fyzul *et al.*, 2007, modulando la colonización de las bacterias patógenas al competir por nutrientes (principalmente, Fe⁺ y Ca⁺), liberar enzimas que ayudan a la proliferación de células del sistema innato del intestino y mantener al sistema inmune activo (immunocapacitación) contra bacterias patógenas (Fuller, 1984; Xing *et al.*, 2013).

Las citoquinas pro-inflamatorias y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), son mensajeros químicos cruciales que transmiten señales entre células en la preparación de los mecanismos de defensa del huésped, en respuesta a la exposición a probióticos y la colonización o invasión bacteriana; induciendo a una respuesta

inflamatoria y así estimulan el reclutamiento y la respuesta inmune innata en el sitio de la colonización o infección (Standen *et al.*, 2013). Los estudios en mamíferos han demostrado que la vigilancia celular de la microbiota intestinal es ejercida por el sistema inmune gastrointestinal y por las bacterias probióticas al generar señales reguladoras que pueden estimular la inmunidad del huésped para permitir una protección mejorada contra patógenos (Resigno *et al.*, 2001; Cross, 2002).

Harper *et al.*, 2011, mostraron en un estudio al usar probióticos en el alimento, un incremento de células caliciformes y linfocitos intraepiteliales (IEL) en el intestino de la trucha arcoíris, esto implica una mejora y una resistencia a la patogénesis intestinal.

El uso de bacterias del ácido láctico (LAB) como probióticos en peces es una de las prácticas más comunes. Este grupo de bacterias beneficiosas puede modificar la histomorfometría del intestino para la utilización eficiente de nutrientes e inmunoprotección más efectiva contra patógenos (Passione, 2012).

Pirat *et al.*, 2011, suplementó tilapias con *Lactobacillus rhamnosos* GG, de origen humano a dosis 10^{10} CFU/g en el alimento por 30 días obteniendo resultados positivos en la mejora de la citoarquitectura del intestino y la inmunidad de la mucosa, aumentando la longitud de los pliegues intestinales del intestino, además de modular la población de células inmunes intestinales al incrementar la población de linfocitos intraepiteliales, granulocitos ácidos y células caliciformes.

3.7.2. Aceites esenciales

En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de productos naturales para la prevención y tratamiento de enfermedades en la acuicultura, con el fin de evitar los efectos perjudiciales de químicos y asegurar la alimentación humana (Awaad y Awaad, 2017). Los aceites esenciales son considerados antibactericidas, sin embargo, para Gibson y Roberfroid, 1995, Garcés *et al.*, 2006; Flores y Martínez, 2006 y Shiva, 2007, son considerados como agentes prebióticos que mejoran el estado sanitario de los animales, debido a que estimulan el crecimiento y/o la actividad de determinados microorganismos beneficiosos del tracto digestivo y que además pueden impedir la adhesión de microorganismos patógenos.

Los aceites esenciales son sustancias volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas, que se caracterizan por una fragancia fuerte lípidos (líquidos rara vez de color), y un sabor que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas y son obtenidos mediante procesos físicos (Delporte, 2010; Martínez *et al.*, 2015), presentan una hidrofobicidad lo que le permite la separación de los lípidos de la membrana celular y la mitocondria (Oosterhaven *et al.*, 1995).

La composición química puede variar de acuerdo a la variedad de la planta: orégano (*Origanum vulgare*), laurel (*Laurus nobilis L.*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), tomillo (*Thymus algeriensis Boiss*), naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus limón*), toronja (*Citrus grandis L.*), ajo (*Allium sativum*), cebolla (*Allium cepa L.*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), pimienta (*Piper nigrum*), así también la parte de la planta (tallo, hoja, corteza, flores, semilla), etapa de desarrollo, el

tiempo del día o del año y el medio ambiente (suelo y clima) en el que dicha planta fue cultivada (Gora *et al.* 2002; Martínez *et al.*, 2015).

Los principales constituyentes de los aceites esenciales principalmente son los terpenoides y los fenilpropanoles, siendo aquellos que generalmente proporcionan sus propiedades aromáticas y biológicas (Bakkali *et al.*, 2008; Raut y Karuppayil, 2014).

Los aceites esenciales tienen el potencial para convertirse en una nueva generación de productos para la nutrición y salud animal, en sustitución a los antibióticos promotores del crecimiento debido a sus efectos positivos sobre la digestión, la comunidad microbiana intestinal, el crecimiento y el bienestar animal (Zeng *et al.*, 2015). Los aceites esenciales se componen de un conjunto diverso de componentes lipófilos y volátiles, algunos de ellos conocidos por ser susceptibles a reacciones de conversión y degradación. Especialmente la disponibilidad de oxígeno, luz, temperatura y pH se reconoce que tienen un impacto crucial en la integridad y la estabilidad de algunos componentes de los aceites esenciales (Dima y Dima 2015).

Varias moléculas presentes en los aceites esenciales son susceptibles a diferentes reacciones de conversión (tales como la oxidación, polimerización, isomerización, deshidrogenación) y reacción térmica que pueden alterar la calidad y las propiedades farmacológicas (Turek y Stintzing 2013).

3.7.3. Mecanismo de acción

Los aceites esenciales actúan como antibacterianos, antioxidantes, insecticidas, antifúngicos, anticancerígenos, analgésicos, anticoccidiales y promotores de crecimiento (Roldán, 2010). Los componentes de los aceites esenciales como son

el timol, carvacol, y eugenol los cuales son compuestos fenólicos poseen fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos (Lambert *et al.*, 2001). Provocando desorden en la membrana citoplasmática, rompiendo la fuerza motriz del protón, flujo de electrones y coagulación del contenido celular (Davidson *et al.*, 2013). Los constituyentes hidrofóbicos de los aceites esenciales son capaces de penetrar en el periplasma de las bacterias Gram negativas a través de la proteína de la membrana externa (Lambert *et al.*, 2001). Los mecanismos de acción del cinamaldehído dependen de la concentración, a concentraciones bajas inhibe las enzimas involucradas en las interacciones de la citosinas, a altas concentraciones actúa como un inhibidor de ATPasa, y a la concentración letal perturba la membrana de la célula (Nazzaro *et al.*, 2013).

También pueden modificar el sistema inmune, mejorando la eficacia de los macrófagos y los granulocitos, otras actividades fisiológicas incluyen antiinflamatorias, diuréticas, endócrinas y diuréticas (Padilla, 2009).

Su característica hidrofóbica le permite tener una acción en la membrana celular y la mitocondria, ocasionando el desordenamiento de la estructura y haciéndole más permeable lo que permite la filtración de iones y otros contenidos celulares (Ooterhaven *et al.*, 1995).

La acción antimicrobiana depende del carácter hidrofílico y lipofílico del aceite esencial, de acuerdo a la cantidad de componentes químicos la actividad antimicrobiana no puede ser atribuida a un solo mecanismo de acción.

Presentan efectos bactericidas y bacteriostáticos (capsaicina, carvacrol, eugenol, alicina, cineol, cinamaldehido y curcumina), coccidiostáticos (carvacrol),

modificadores digestivos (fenogreco o alholva) estimulantes de la actividad enzimática pancreática e intestinal (capsacina, piperina, zingerona, curcumina), optimizadores de la actividad enzimática antioxidante y mejorando la salud de las microvellosidades intestinales (cinamaldehído). También pueden modificar el sistema inmune, mejorando la eficacia de los macrófagos y los granulocitos, otras actividades fisiológicas incluyen antiinflamatorias, diuréticas, endócrinas y diuréticas (Padilla, 2009). Los aceites esenciales son considerados como prebióticos que mejoran el estado sanitario de los animales, debido a que estimulan el crecimiento y/o la actividad de los probióticos del tracto digestivo y que además pueden impedir la adhesión de microorganismos patógenos (Shiva (2007).

3.7.4. Carvacol

Está presente en los aceites esenciales del orégano en un 60 – 70% y tomillo en un 45% (Hernández, 2009), su estructura química está representada por un grupo fenólico con un alto poder hidrofóbico que poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática, ocasionando la salida del ATP, inhibiendo la actividad de la ATPasas y la disminución de la fuerza motriz del protón (Lambert *et al.*, 2001; Burt *et al.*, 2007). El carvacol es acumulable en la membrana plasmática a concentraciones elevadas y por tanto tiene un mayor efecto sobre la destrucción de la membrana plasmática (Ulteé *et al.*, 2002). El carvacrol y el timol actúan en la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, provocando su desestabilización e incrementando su permeabilidad (Ultee *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2001).

El carvacol puede ver potenciado su actividad antibacteriana gracias a otros aceites esenciales como el cimeno que ayuda a mejorar su mecanismo de acción del carvacol (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010). Así mismo podría existir un efecto de inhibición aditivo de la mezcla de carvacrol y timol, pero no un efecto sinérgico ni antagónico (Lambert et al., 2001).

Albado *et al.*, 2001; Arcila *et al.*, 2004 extrajeron aceites esenciales de hojas y flores secas de orégano, obteniendo un 9% de carvacrol, 12.2% de terpineol y 6.7% de cimeno; sin embargo, su composición es variable dependiendo del lugar, la etapa y la edad de la planta, y a veces incluye timol.

3.7.5. Timol

Está presente en el aceite esencial del tomillo, orégano y en otras fuentes naturales como la mandarina y tangerina, sin embargo en el tomillo se encuentra por encima del 50%, es uno de los agentes antibacterianos más activo (Lambert *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 2007), su estructura química es similar al del carvacol cambiando únicamente en el grupo hidroxilo, por lo que su mecanismo de acción es similar al del carvacol, desintegrando la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Helander *et al.*, 1998). Estudios demuestran la efectividad antibacteriana del aceite esencial de orégano sobre *L. monocytogenes* y *Streptococos aureus* (Benavides *et al.*, 2012), y el aceite esencial de tomillo sobre *Stafilococos putrefaciens*, *Escherichia coli* y *Streptococos aureus* (Candoğan, 2010).

En base a sus beneficios biológicos y farmacológicos, se ha venido incluyendo en la dieta de los animales. En la avicultura, se ha demostrado que el timol mejora significativamente la integridad de la barrera intestinal y su estado antioxidante (Placha *et al.*, 2014). La inclusión del tymol en la acuicultura es en gran parte inexplorado, sin embargo Sönmez *et al.*, 2015, demostró que es eficaz para mejorar el crecimiento y el perfil de la enzima antioxidante de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), y para alterar la frecuencia de los agregados linfoides en el intestino del pez dorada (*Sparus aurata Linnaeus*) (Hernández *et al.*, 2016).

3.7.6. Cinamaldehído

El cinamaldehído es un compuesto orgánico responsable del sabor y del olor característico de la canela, que compone en un 90% de cinamaldehído su aroma es debido al aceite esencial aromático que constituye un 0,5-2,5% de su composición (Terán., 2016). Está formada por un grupo fenilo enlazado a un aldehído insaturado actúa como un optimizador de la actividad enzimática antioxidante y mejorando la salud de las microvellosidades intestinales (Padilla, 2009).

El cinamaldehído actúa inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y en alto grado de lisis celular (Zekaria, 2008). Se ha demostrado la actividad de la canela y clavo frente a *Clostridium perfringens* (Mitch, 2004); otros trabajos demostraron que los aceites esenciales presentan mayor actividad frente a *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* (Dean 1995 y Huerta 2007). Los compuestos de cinamaldehído en un ensayo *in vivo* redujeron la virulencia de *Vibrio harveyi* hacia el camarón *Artemia* (Brackman *et al.*, 2008).

3.8. Uso de aceites esenciales en acuicultura

Los aceites esenciales son utilizados recientemente como aditivos en la acuicultura para mejorar la resistencia y prevenir brotes de enfermedades, así como para mejorar el crecimiento de los peces, el bienestar animal y la utilización de alimentos (Sutili *et al.*, 2018). Estudios anteriores demuestran los beneficios de los aceites esenciales probados experimentalmente, Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn (2010) suplementaron aceites esenciales de canela en dietas de pescado teniendo como resultados la reducción de la tasa de mortalidad de tilapia (*Oreochromis niloticus*) que fueron infectados experimentalmente con *Streptococcus itiae* y no tuvo efectos adversos en pescado. Así también los aceites esenciales de canela inhibió el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* con valores de IZD más bajos que los observados en el presente estudio (Gupta *et al.*, 2008).

Valladão *et al.*, (2019), obtuvo resultados significantes en el ancho de las vellosidades intestinales a una dosis de 500 mg/kg de alimento durante 15 días con aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*) en el alimento, en tilapias gris (*Oreochromis niloticus*). Por otro lado, Valladão *et al.*, (2017), observó que a una dosis de 250 mg/kg de alimento por 60 días con aceite esencial de té (*Melaleuca alternofila*) en el alimento, en tilapias gris, aumentó la longitud y ancho de las vellosidades intestinales. Por otro lado, Moreira *et al.* (2018), observó que los animales que recibieron aceite esencial de albahaca silvestre a una dosis de 0.5 y 1% presentan mejores resultados, en mayor número de células caliciformes por área y epitelio

más espeso, sugiriendo que la adición del aditivo mejora la estructura de la mucosa intestinal y en la histomorfometría intestinal.

Los aceites esenciales son utilizados como una alternativa para sustituir a los antibióticos como promotores de crecimiento debido a la resistencia adquirida por algunas bacterias. Por otro lado algunos actúan como antioxidantes, otros estimulan la digestión, mejoran la capacidad de absorción de nutrientes ya que estimulan la actividad enzimática en la mucosa intestinal y pancreática (Martínez *et al.*, 2015). Así también aumentan la fermentación de partículas de alimentos fibrosos no digeridos debido a la mejora del crecimiento y la multiplicación de la microbiota beneficiosa en el intestino (Giannenas *et al.*, 2013).

Sin embargo, a pesar de las actividades biológicas diversas y relevantes reportadas, estos fitoquímicos están compuestos de moléculas a menudo inestables y volátiles, lo que hace que las características químicas y físicas de los aceites esenciales sean aspectos importantes a tener en cuenta en la investigación de nutrición de peces (Sutili *et al.*, 2018).

3.9. Aceite esencial EMERALD®

El EMERALD® es un producto comercial de la línea empresarial IGUSOL Avance SA, España. Contiene una alta concentración de aceites esenciales diseñados para ser liberados gradualmente en el tracto digestivo de los animales con el único objetivo de mejorar el bienestar animal. El EMERALD® está compuesto por aceites esenciales de plantas como; canela, clavo de olor, orégano y palma. Este producto está sujeto a un innovador proceso de microencapsulación, gracias a ello, atrapa sus diferentes componentes, evitando su volatilización y permitiendo una mejor

homogenización con el alimento, permitiendo que los peces puedan consumirlo y así que actuando en perfectas condiciones.

Este producto se viene usando como promotor de crecimiento e inmunopotenciador en peces, langostinos y pollos, actuando en el reforzamiento de la barrera intestinal, estimulando el sistema inmunológico, mejorando la protección de la microvellosidades y mejorando la actividad de las bacterias prebióticas del género *Lactobacillus sp* y estabilizando las bacterias intestinales beneficiosas. Este producto se ha venido usando como promotor de crecimiento en la alimentación de pollos, langostinos, salmónidos. A dosis de 150 a 250 g/TM alimento en alevines y en camarones a dosis de 40 a 500 g/TM.

Tabla 01. Composición química de compuestos volátiles (aceites esenciales) en microencapsulado EMERALD® por microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Compuestos volátiles (aceites esenciales)	Tr (min)	% en la muestra (Áreas relativas)
Estireno	14.35	0.29
Benzaldehído	15.87	0.73
p-cimeno	17.01	0.81
Limoneno	17.09	0.12
1-metil-4-(1-metiletetil)-Benceno	18.17	0.09
3-fenil-2-Propenal	20.33	1.08
Cinamaldehído	21.17	53.93
Tymol	21.24	24.22
Carvacrol	21.4	18.73

Fuente: Informe final del LID- Laboratorio - Unidad de investigación de productos naturales.

IV. JUSTIFICACIÓN

El uso de aceites esenciales como aditivo alimenticio pueden promover al aumento en el número de células caliciformes, longitud y ancho de los pliegues intestinales y esto es asociado a una mejor digestión y absorción de nutrientes, mejorando así el estatus sanitario de los peces frente a los desafíos propios de los sistemas de crianza y lo hace una alternativa eficaz para la prevención de enfermedades infecciosas de los peces. En base a estas moléculas muchas investigaciones han venido evaluando su efecto bactericida *in vitro* en sistemas controlados (laboratorios) con fines de investigación con la finalidad de evaluar su efecto sobre el comportamiento productivo de los animales. Sin embargo, existe una escasa información de estos productos usados en sistemas de cultivo semi intensivo e intensivos.

La ciencia de la histología es una herramienta útil debido a que se pueden observar microscópicamente los cambios que se podrían producir en los intestinos con los aditivos, como aumento de células del epitelio (lo que sugeriría el aumento de la absorción de nutrientes, electrolitos y fluidos de la luz intestinal), aumento de células caliciformes y linfocitos (aumentaría la protección local), así como lesiones compatibles con apoptosis y/o necrosis celular (evidenciando posibles efectos tóxicos de la sustancia suplementada) o en ocasiones evidenciar que no existen cambios morfológicos por el uso del suplemento; permitiendo justificar el reemplazo en el uso de antibióticos con aceites esenciales en el Perú para de esta forma, disminuir la dependencia a los mismos y disminuir su impacto en la salud animal, humana y ambiental.

V. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general

Evaluar la histomorfometría e histoquímica del intestino anterior de alevinos de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) suplementadas con una mezcla de microencapsulado de aceites esenciales de clavo de olor, canela, orégano y palma.

5.2. Objetivo específico

- Evaluar el performance en el crecimiento con el grupo control y el experimental.
- Comparar las medias de longitud y ancho de los pliegues intestinales del grupo control y el grupo tratamiento.
- Contabilizar y comparar el número de células caliciformes en el grupo control y el grupo tratamiento.
- Determinar las reacciones de las pruebas histoquímicas a las glicoproteínas ácidas y neutras en el intestino anterior del grupo control y grupo tratamiento.

VI. METODOLOGIA

6.1. Tipo de Estudio

Experimental, longitudinal

6.2. Lugar de Estudio

La parte experimental se realizó en la Empresa HIPPOCAMPUS DEL PERÚ S.A.C dedicada a la producción de peces tropicales de manera semi intensiva, ubicada en la provincia de Barranca del departamento de Lima, donde se alimentaron a los alevinos con los aceites esenciales.

En el Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. (FAVEZ-UPCH): se realizó las evaluaciones de las láminas histológicas e histoquímicas (mediciones de pliegues intestinales, conteo de células caliciformes, reacciones histoquímicas).

6.3. Población Objetivo

Se utilizó alevinos de tilapia nilotica distribuidos equitativamente en 2 tanques circulares de geomenbrana de 60 m³ a una densidad de siembra de 5 kg/m³ (300 alevinos de tilapia por tratamiento). Para la alimentación de los alevinos se usó un alimento balanceado comercial, completo, extruido, diseñado para atender las necesidades nutricionales de los alevinos de tilapia, asegurándoles una alta tasa de crecimiento y supervivencia al inicio de la crianza.

6.4. Tratamiento

La homogenización del alimento comercial con el microencapsulado de aceites esenciales se realizó mediante una mezcladora, en donde se administró el alimento comercial extruido, luego se añadió el microencapsulado de soya con extractos de aceites esenciales, posteriormente se adicionó melaza para garantizar su adherencia al alimento, el cual fue homogenizado durante 10 minutos.

La alimentación de los 300 alevinos de tilapia nilótica del grupo tratamiento y grupo control se realizó durante 30 días, a una ración de 6 veces por día asegurándonos el consumo óptimo del alimento suplementado y el alimento no suplantado respectivamente para ambos tratamientos.

6.5. Criterios de inclusión y exclusión

Se excluyó de la toma de datos a los ejemplares que no sean alevinos (muertos).

6.6. Tamaño de muestra

Para obtener un tamaño de muestra adecuado y contar con datos verídicos para cada tratamiento, se realizó la prueba estadística diferencia de medias. Se tomó datos de un estudio de referencia Valladão *et al*, 2019, con una confianza del 95 % y una potencia o poder estadístico de 90%, obteniendo como resultado 10 individuos por grupo de tratamiento y en cada periodo de muestreo (0, 15, 30 días postratamiento).

6.7. Recolección de muestras

El muestreo se realizó en la empresa HIPPOCAMPUS DEL PERU SAC, en donde se midieron el peso y la longitud de los peces en ambos grupos (control y

tratamiento) en el día 0, 15 y 30 días postratamiento. Se tomaron 10 peces por cada tratamiento en los días 0 días, 15 y 30 días postratamiento del periodo experimental; todos los peces en cada periodo fueron anestesiados con benzocaína (200 mg/L) durante 10 minutos hasta la pérdida de los sentidos (movimiento de aletas y nulo movimiento opercular) y sacrificados por corte medular, a nivel de la espina supraoccipital (Branson, 2008; AVMA, 2011). Se realizó la necropsia en la cual se colectó una sección de intestino anterior y fueron fijados en solución de formol al 10%, por 24 horas.

6.8. Procesamiento de muestras

Las muestras recolectadas de intestino anterior de los alevines de tilapia gris se sometieron al proceso histológico de parafina para cada tratamiento.

Para la evaluación de longitud y profundidad (ancho) de los pliegues intestinales (histomorfometría) se realizó la tinción hematoxilina eosina (H&E).

Para la evaluación de la reacción histoquímica de las glicoproteínas se utilizaron los métodos de PAS/H (Acido periódico de Schiff), Alcian – Blue pH (AB pH 0.5) y (AB pH 2.5) para determinar la reacción de las glicoproteínas neutras, glicoproteínas acidas sulfatadas y no sulfatadas, respectivamente y se contabilizó el número de células caliciformes en las distintas tinciones.

6.9. Obtención de datos

Para la obtención de datos de las muestras, se tomaron fotos con el objetivo de 10x, 40x, por medio de una cámara incorporada a un microscopio Leica ® con un software Leica® application Suite Versión 3.4.0.

En la histomorfometría se midió la longitud, profundidad, números de células caliciformes de los pliegues intestinales obteniéndose promedios.

En la histoquímica se evaluó la presencia de la reacción de las glicoproteínas neutras (PAS/Schiff), glicoproteínas acidas sulfatadas (AB pH 2.5) y glicoproteínas acidas no sulfatadas (AB pH 0.5).

6.10. Consideraciones éticas

La investigación fue ejecutada una vez obtenida la aprobación del Comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Fue aprobado en sesión CIEA (Comité Institucional de Ética para el uso de animales) el día 27 de junio del 2019 con el código de inscripción 103984. Los procedimientos usados en la presente investigación están sometidas a las normas éticas del comité institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

6.11. Plan de análisis de datos

Para los datos obtenidos, en peso y talla se usó el análisis de una vía (ANOVA) para determinar la asociación entre las variables y así también para longitud, ancho de las vellosidades y número de células caliciformes. La comparación entre medias se realizó mediante la prueba de Waller Duncan ($P < 0,05$), para lo cual se usó el paquete estadístico *Statistical Analysis System* (SAS v 9.4), y para la histoquímica se consideró las reacciones positivas a las tres coloraciones (PAS/Schiff, Alcian Blue (AB pH 2.5) y Alcian Blue (AB pH 0.5) con las glicoproteínas neutras y ácidas (sulfatadas y no sulfatadas).

VII. RESULTADOS

7.1. Influencia en el crecimiento

La suplementación con el microencapsulado de aceites esenciales a una dosis de 500 g/TM de alimento, muestran diferencias significativas en el peso y longitud de los alevines de tilapia nilótica a los 30 días post tratamiento ($p < 0.05$). Sin embargo, no muestra diferencias significativas a los 15 días de suplementación del microencapsulado de aceites esenciales ($p > 0.05$), como se muestra en la Tabla 02.

Tabla 02. Medición de peso y talla de alevines de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) suplementadas con aceites esenciales (EMERALD®)

Ítem	Días	Tratamiento		P Valor
		control	500 g/TM	
Peso	0	1.2 ± 0.34	1.19 ± 0.35	0.93n.s
	15	4.37 ± 0.94	4.57 ± 0.83	0.48n.s
	30	5.70 ± 0.80	6.26 ± 0.74	0.02*
Longitud	0	2.03 ± 0.43	2.15 ± 0.51	0.97n.s
	15	3.76 ± 0.65	4.05 ± 0.67	0.33n.s
	30	4.87 ± 0.47	5.28 ± 0.61	0.02*

Los datos representan la media ± error estándar.

(*). Muestran diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratamiento en el estudio ($p < 0.05$).

(n.s). No muestra diferencias significativas entre los tratamientos en el estudio ($p > 0.05$).

La Figura 01, muestra una comparación entre el grupo tratamiento (500g/TM) y el grupo control. Los resultados muestran una mayor ganancia de pesos a los 15 y 30 días de suplementación con el microencapsulado de aceites esenciales en alevines de tilapia nilótica en sistema de cultivo semi intensivo ($p < 0.05$). Por otro lado la curva de crecimiento de alevines de tilapia nilótica incrementa a los 15 y 30

días con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales (500g/TM) diferencia del grupo control que es menor ($P < 0.05$) como se muestra en la Figura 02.

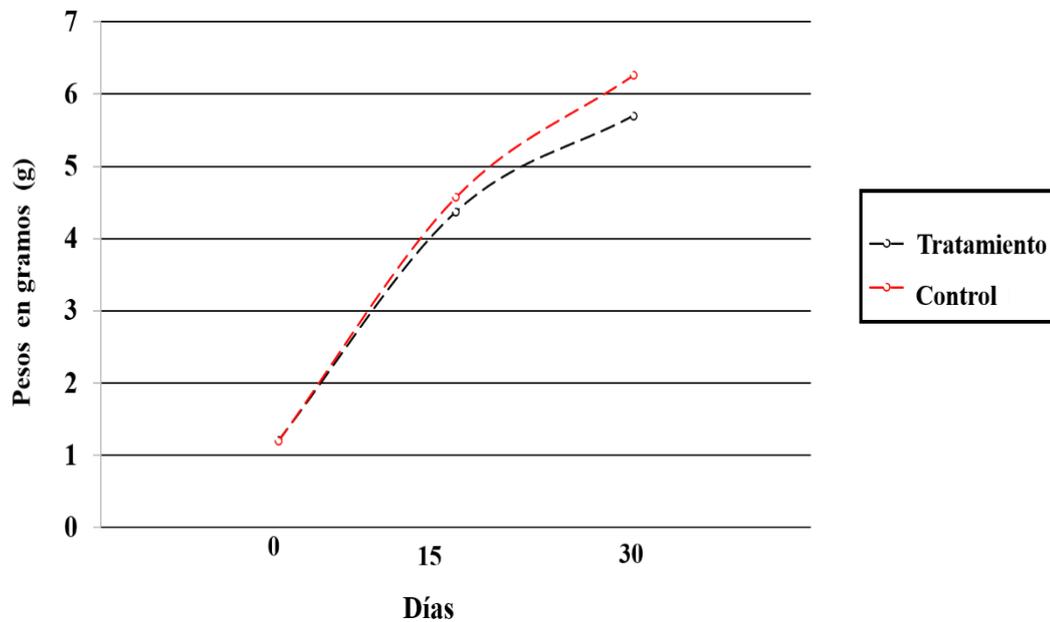


Figura 01. Diferencia entre los pesos con la suplantación de aceites esenciales en el alimento entre el grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM).

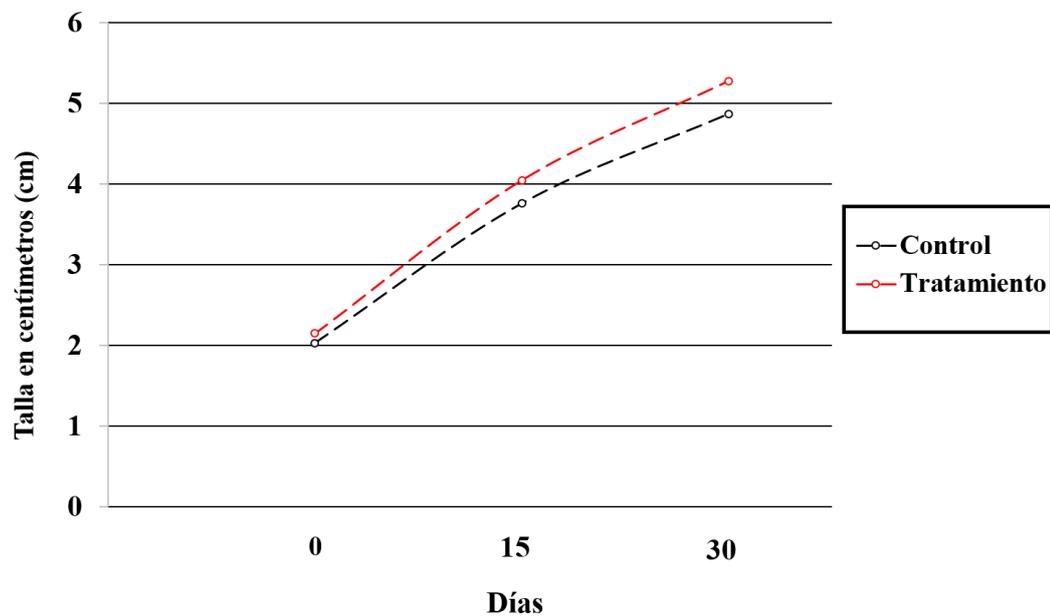


Figura 02. Diferencia entre las tallas de crecimiento entre la suplantación del grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM) de aceites esenciales en el alimento.

7.2. Morfometría intestinal

El número de células caliciformes fue alterado mostrando estadísticamente diferencias significativas a los 30 días entre los tratamientos (500g/TM) y control (0g/TM) ($p < 0.05$), con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales fue mayor el número de células caliciformes, como se muestra en la Tabla 03.

La morfología intestinal (longitud y ancho de los pliegues intestinales) mostró diferencias significativa a los 15 y 30 días con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales (500g/TM) a comparación con el grupo control (0g/TM) ($p < 0.05$), como se muestra en la Tabla 03.

Tabla 03. Morfología intestinal y número de células caliciformes de tilapia nilótica (*Oreochomis niloticus*) suplementadas con aceites esenciales (EMERALD®)

Ítem	Días	Tratamientos		P - Valor
		control	500 g/TM	
Número de Células caliciformes	0	622 ± 116.95	628.2 ± 112.59	0.934 n.s
	15	604.3 ± 125.63	672.5 ± 167.03	0.315 n.s
	30	1065.3 ± 92.31	1159.5 ± 86.67	0.030*
Longitud de pliegues intestinales	0	127.78 ± 10.67	122.08 ± 11.66	0.398 n.s
	15	175.79 ± 19.01	201.67 ± 22.75	0.013*
	30	228.41 ± 38.09	269.39 ± 21.48	0.008*
Ancho de pliegues intestinales	0	41.69 ± 5.66	42.14 ± 7.04	0.904 n.s
	15	64.38 ± 11.94	75.07 ± 6.34	0.022*
	30	76.09 ± 8.28	84.13 ± 8.06	0.041*

Los datos representan la media ± error estándar.

(*). Muestran diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratamiento en el estudio ($p < 0.05$).

(n.s). No muestra diferencias significativas entre los tratamientos en el en el estudio ($p > 0.05$).

La suplementación con el microencapsulado de aceites esenciales en alevines de tilapia nilótica en sistemas de cultivo semi intensivo a una dosis de 500g/TM en el alimento presenta mejores resultados incrementando la longitud de los pliegues intestinales a diferencia del grupo control que presenta resultados inferiores ($P < 0.05$) (Figura 03 y 04).

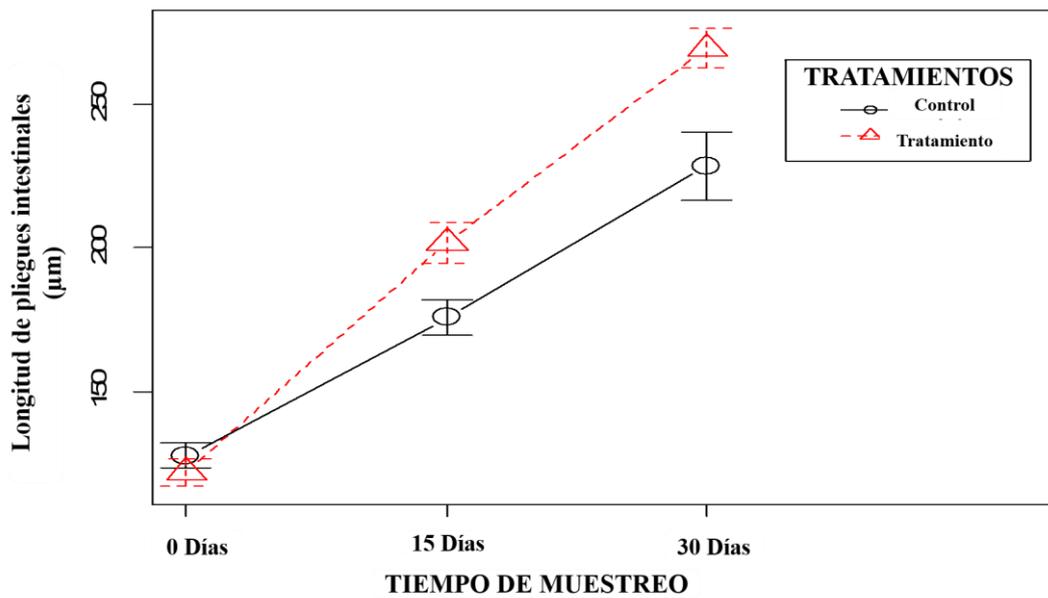


Figura 03. Diferencia en la longitud de los pliegues intestinales con la suplantación de aceites esenciales en el alimento del grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM).

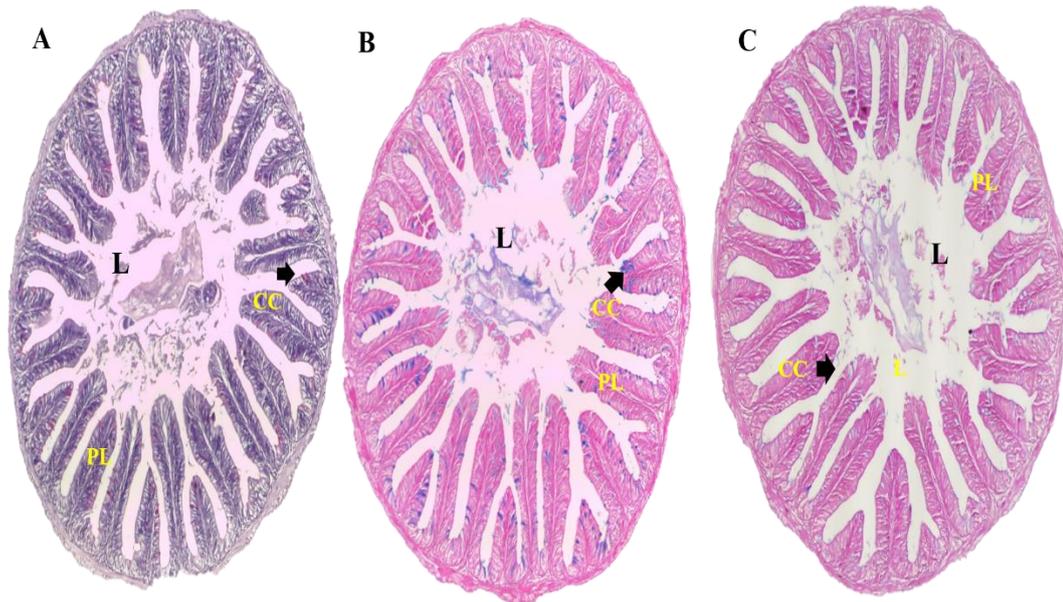


Figura 04. Fotografías de cortes transversales de intestino anterior de alevines de tilapia nilótica en el día 30 del grupo Tratamiento (500g/TM), (A) Tinción con ácido periódico de Schiff, (B) Alcian Blue pH 2.5 y (C) Alcian Blue pH 0.5 PL = pliegue intestinal, L= lumen, cc = célula caliciforme Microscopio Leica, aumento 10X.

Así mismo se observa que la suplementación con el microencapsulado de aceites esenciales presenta mejores efectos en el ancho de los pliegues intestinales a diferencia del grupo control que es menor ($P < 0.05$) (Figura 05 y 06).

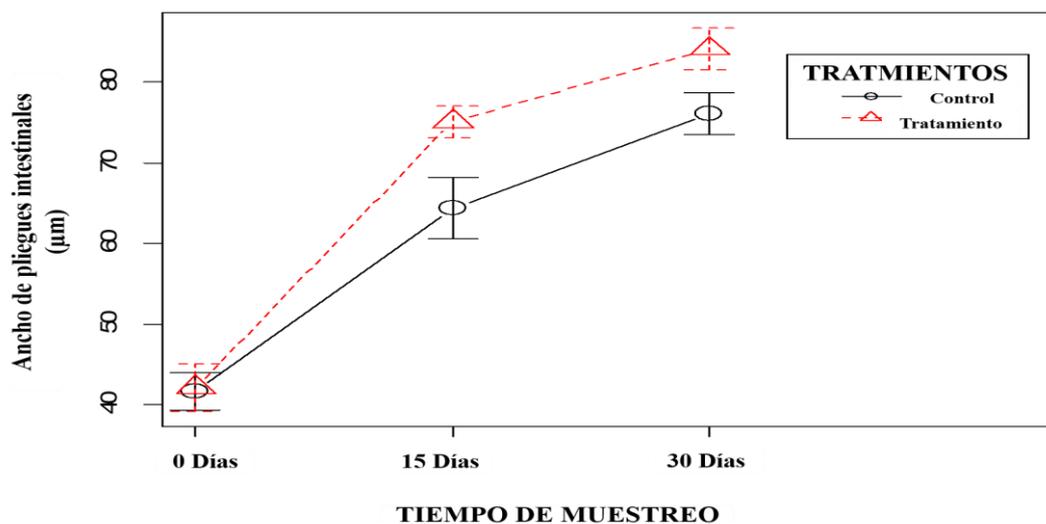


Figura 05. Diferencias entre el ancho de los pliegues intestinales con la suplementación de aceites esenciales en el alimento entre el grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM).

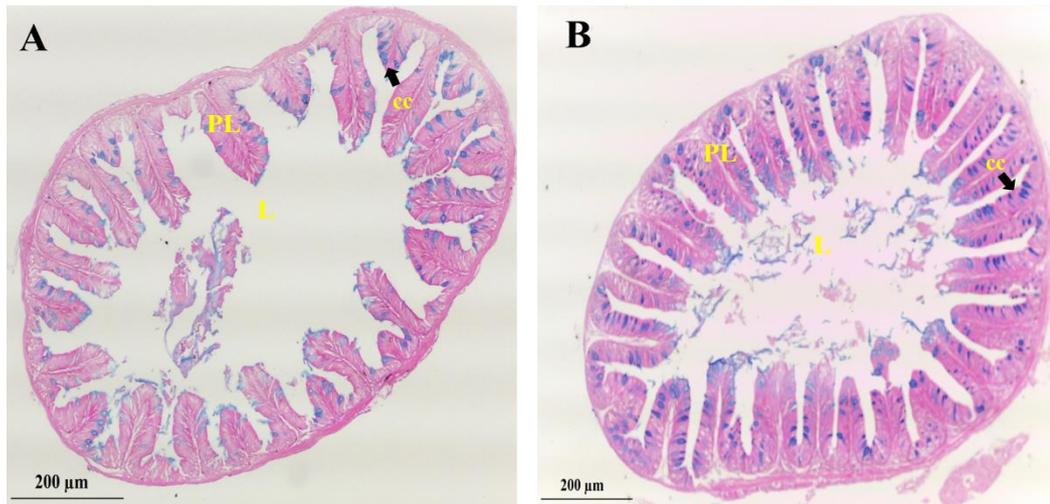


Figura 06. Fotografías de cortes transversales de intestino anterior de alevines de tilapia nilótica en el día 15 del (A) grupo control y el (B) grupo Tratamiento (500g/TM), con una Tinción con Alcian Blue pH 2.5 en don se muestra cambios en longitud, ancho y número de células caliciformes con secreción de glicoproteínas acidas sulfatadas. PL = pliegue intestinal, L= lumen, ccgas= célula caliciforme productora de glicoproteínas acidas sulfatadas. Microscopio Leica, aumento 10X.

El número de células caliciformes se incrementa con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales, mostrando un mayor número a los 30 días en comparación con el grupo control ($P < 0.05$) (Figura 07 y 08).

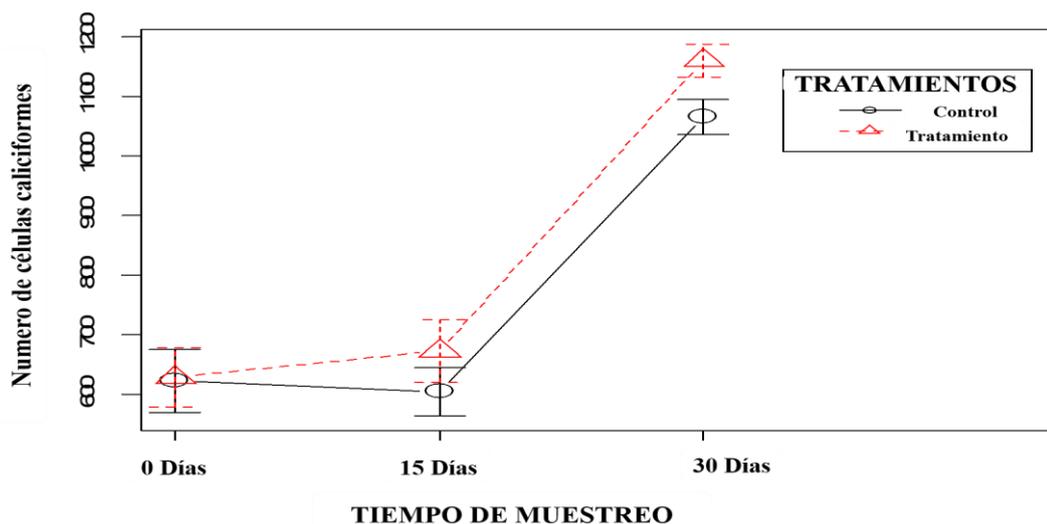


Figura 07. Diferencias en el número de células caliciformes con la suplementación de aceites esenciales en el alimento entre el grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM).

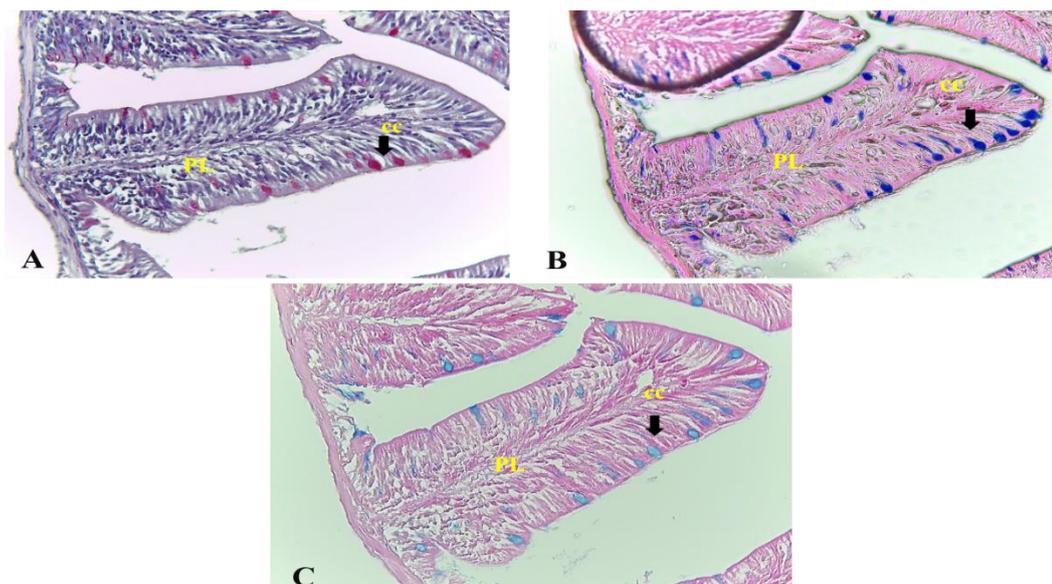


Figura 08. Fotografías de cortes transversales de intestino anterior de alevines de tilapia nilótica en el día 30 del grupo Tratamiento (500g/TM), (A) Tinción con ácido periódico de Schiff, (B) Alcian Blue pH 2.5 y (C) Alcian Blue pH 0.5 PL = pliegue intestinal, cc = célula caliciforme Microscopio Leica, aumento 40X.

7.3. Reacción histoquímica

La Tabla 04, muestra las reacciones positivas de las pruebas histoquímicas a las glicoproteínas neutras, ácidas sulfatadas y no sulfatadas con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales en alevines de tilapia nilótica en sistemas de cultivo semi intensivo durante 30 días.

La prueba histoquímica del ácido periódico Schiff (PAS/H), no mostró diferencias significativas en la reacción de las glicoproteínas neutras en los tres periodos de muestreo (0, 15 y 30 días) post alimentación ($p > 0.05$).

Sin embargo, las glicoproteínas ácidas sulfatadas mostraron diferencias significativas con la prueba histoquímica Alcian Blue pH 2.5 con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales a los 30 días ($P < 0.05$).

Así mismo las glicoproteínas ácidas no sulfatadas mostraron diferencias significativas a la prueba histoquímica Alcian Blue pH 0.5, a los 30 días con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales ($P < 0.05$).

TABLA 04. Cuantificación de células caliciformes de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) a diferentes coloraciones histoquímicas, suplementadas con aceites esenciales (EMERALD®)

Células Caliciformes	Día	Tratamientos		P - Valor
		Control	500 g/TM	
Ácido periódico Schiff (PAS/H)	0	235.2 ± 36.7	238.4 ± 37.6	0.895n.s
	15	228.3 ± 70.8	240.6 ± 57.7	0.675n.s
	30	369.2 ± 42.1	388.9 ± 43.4	0.316n.s
Alcian blue pH (2.5)	0	214.4 ± 39.3	214.4 ± 37.6	0.987n.s
	15	224.2 ± 29.3	249.6 ± 53.1	0.202n.s
	30	376.6 ± 40.9	417.8 ± 39.9	0.021*
Alcian blue pH (0.5)	0	172.4 ± 62.2	175.4 ± 41.9	0.930n.s
	15	151.8 ± 39.4	182.3 ± 66.7	0.229n.s
	30	319.5 ± 30.9	352.8 ± 30.5	0.026*

Los datos representan la media ± error estándar.

(*). Muestran diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratamiento en el estudio ($p < 0.05$).

(n.s). No muestra diferencias significativas entre los tratamientos en el estudio ($p > 0.05$).

La suplementación con microencapsulado de aceites esenciales en alevines de tilapia nilótica en sistemas de cultivo semi intensivo a una dosis de 500g/TM en el alimento presenta mejores resultados incrementando las reacciones de las glicoproteínas con las pruebas histoquímicas PAS/H, Alcian Blue pH (0.5 y 2.5) a comparación con el grupo control (0g/TM) ($P < 0.05$). (Figura 09 y 10).

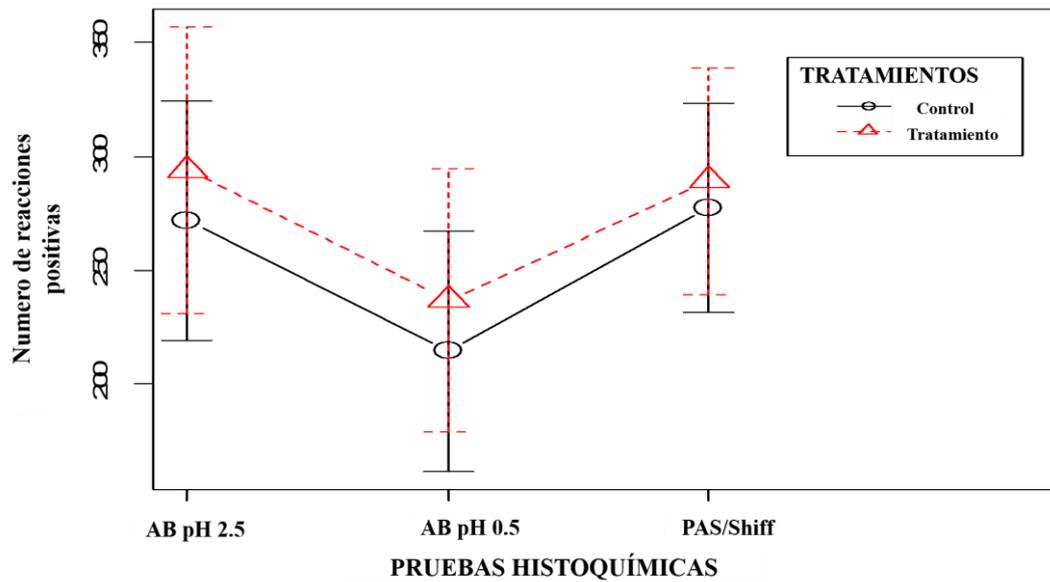


Figura 09. Número de reacciones positivas de las glicoproteínas a las pruebas histoquímicas con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales entre el grupo tratamiento (500/TM) y grupo control (0g/TM).

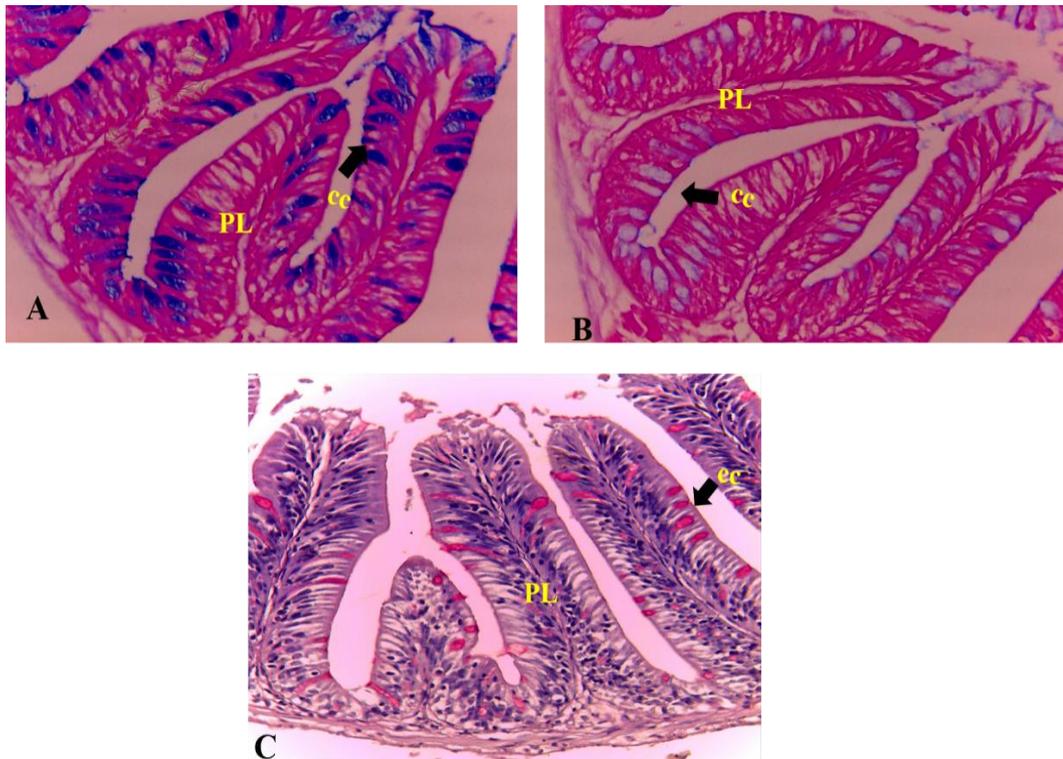


Figura 10. Fotografías de cortes transversales de intestino anterior de alevines de tilapia nilótica en el día 30 del grupo Tratamiento (500g/TM), (A) Alcian Blue pH 2.5 (B) Alcian Blue pH 0.5 y (C) Tinción con ácido periódico de Schiff, PL = pliegue intestinal, cc = célula caliciforme s. Microscopio Leica, aumento 40X.

VIII. DISCUSION

La suplementación alimenticia con un microencapsulado de aceites esenciales en alevines de tilapia nilótica durante 30 días, con una dieta experimental de 500g/TM de alimento realizado en el presente estudio muestran mejores resultados de peso y longitud, con diferencias significativas de pesos de 6.26 g para el grupo tratamiento y 5.70 g en el grupo control, coincidiendo con los resultados obtenidos por Amer *et al.*, 2018 quienes suplementaron las dietas de alevines de tilapia del Nilo con timol y cinamaldehído encontrando un aumento significativo del peso corporal con cinamaldehído (a dosis de alimento en un período de 15 días) y 30 días de tratamiento con cinamaldehído y timol (1 y 2 ml/ kg⁻¹). Asimismo, Verastegui y Fikoshima, 2009, evidenciaron un efecto promotor de crecimiento utilizando aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Eugenia caryophyllata*) adicionadas en el alimento a dosis de 2% y 1% durante 60 días en la dieta de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) mantenidas en condiciones de laboratorio.

A su vez, la longitud (talla) en el crecimiento de los peces mostró diferencias significativas en el grupo experimental con la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales obteniéndose tallas de 5.28 cm para el grupo tratamiento y 4.87 cm para el grupo control en un periodo de 30 días, corroborándose los resultados obtenido por Abdel Wahab *et al.*, 2007, quienes suplementaron 0.5% de aceite de canela en la dieta tilapia del Nilo mejorando su rendimiento de crecimiento. Así mismo Al-Sagheer *et al.*, 2017, encontró que los índices de crecimiento mejoraron significativamente con dosis de 200 y 400 mg

kg⁻¹ de aceites esenciales de hierba de limón (*Cymbopogon citratus*) (LEO) y geranio (*Pelargonium graveolens*) incorporadas en la dieta durante 90 días. Lo que demuestra que los aceites esenciales actúan como promotores de crecimiento mejorando el apetito además de estar relacionado con la estimulación sensorial por el aceite esencial de canela (cinamaldehído) (Abdel Wahab *et al.*, 2007). A su vez, Hall *et al.*, 2002; Padilla, 2009; Hashemi y Davoodi (2010) afirman que el cinamaldehído estimula e incrementa las secreciones de mucopolisacáridos, favoreciendo la absorción y digestión de los nutrientes en el intestino, modulando también la microbiota intestinal y actuando como prebióticos por controlar las bacterias patógenas y sus toxinas. Por este, motivo mejoraría la digestibilidad de los nutrientes que resultaría de la contribución de las enzimas y nutrientes secretados por las bacterias con carácter probiótico y por lo tanto generaría un mejora en el performance del crecimiento.

Según nuestro estudio la administración por 15 días de aceites esenciales de (clavo de olor, canela, orégano, palma) en alevines de tilapia nilótica en sistemas de cultivo semi intensivo parecen ser suficiente para alterar la morfología intestinal, ya que tendrían un efecto de sinergismo entre sus componentes permitiendo potenciar su efecto. Dicha afirmación es consolidada por estudios realizados por Valladão *et al.*, (2019) quienes obtuvieron resultados significantes en el ancho de los pliegues intestinales a una dosis de 500 mg/kg de alimento durante 15 días con aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*), que contiene timol, en tilapias gris (*Oreochromis niloticus*). Ya en el años 2017, Valladão *et al* había encontrado que a una dosis de 250 mg/kg de alimento por 60 días con aceite esencial de té (*Melaleuca alternofila*, en tilapias nilótica, aumentaba la longitud y ancho de los

pliegues intestinales, coincidiendo con el trabajo realizado por Zeppenfeld *et al.* 2016, quienes usaron aceites esenciales de cedrón (*Aloysia triphylla*), mostrando cambios significativos en la longitud de los pliegues intestinales de catfish a una dosis de 0.25 ml/kg durante 60 días y también en el número de pliegues intestinales a dosis de 2 ml/kg y 1 ml/kg con respecto al grupo control.

En base a estas evidencias la suplementación con aceites esenciales en la dieta de los peces aumentan la longitud, ancho y número de los pliegues intestinales, ya que este mayor aumento puede ser debido a la mayor tasa de rotación causada por los estímulos de los principios activos de los aceites esenciales que promueven el rápido crecimiento de los pliegues (Branco *et al.*, 2010), mejorando la eficiencia de absorción de los nutrientes (Mohamed *et al.*, 2014). Revelando el beneficio de usar estos aceites como suplemento alimenticio en peces influyendo positivamente en la anatomía y fisiología intestinal que actúa directamente sobre el digestión y asimilación de nutrientes. Nicholson *et al.*, 2012 describe que el intestino cumple una función relevante en el sistema inmune, debido a que muchas enfermedades infecciosas se inician por la colonización de la mucosa intestinal y la eficiencia de la barrera intestinal depende de la producción de mucus e integridad epitelial para prevenir la aparición de la enfermedades.

En esta investigación el número de células caliciformes fue influenciada por la suplementación del microencapsulado de aceites esenciales en el alimento, mostrando cambios significativos en la secreción de glicoproteínas de las células caliciformes, coincidiendo con Moreira (2018), quien utilizó aceite esencial de albahaca de clavo (*Ocimum gratissimum*) a una dosis de 5% del alimento en la dieta de juveniles de paco (*Piaractus brachyomus*) durante 30 días encontrando

beneficios significativos como mayor número de células caliciformes por área. Esto nos podría estar indicando que los aceites esenciales tienen efectos en el aumento de las células caliciformes, mejorando la salud intestinal de los peces, protegiendo contra la actividad de las bacterias oportunistas y la buena calidad de la mucosa intestinal. Así mismo, podríamos afirmar que mientras presenten un mayor número de células caliciformes ocurrirá una mayor protección contra las bacterias oportunistas en la mucosa intestinal. La secreción de las glicoproteínas está asociada a la cantidad de células caliciformes las que están relacionadas a diferentes condiciones de alimentación y la protección contra la actividad bacteriana (Arellano *et al.*, 1999; Smith, 1989).

En el grupo experimental con la suplementación alimentaria con el microencapsulado de aceites, se observa a las células caliciformes fuertemente coloreadas por el Alcian blue pH 2.5 y 0.5, lo que evidencia que las células caliciformes contienen mucha mucina ácida incluido glicoconjugados sulfatados y no sulfatados. Así mismo a la prueba PAS/Shiff se observa una coloración morado magenta que demuestra que contiene mucinas neutras. Murillo (2017), cuantificó la producción de mucinas neutras y ácidas en intestino de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*), usando oligodeoxinucleótidos, donde se observó un aumento en la cantidad de mucinas neutras a los 3 días, encontrando una correlación positiva entre la expresión de IL-1 β y IL-8 con el número de mucinas neutras en el intestino.

Los resultados obtenidos de las células caliciformes estén clareadas fuertemente a azules, morado-magenta, probablemente refleje los efectos de los aceites esenciales conjuntamente con el desarrollo de los peces lo que reflejan que la capa de moco intestinal puede tener varias funciones en los peces como lubricación, protección,

defensa inmunológica, digestión y absorción (Smith, 1989; Arellano *et al.*, 1999; Domeneghini *et al.*, 2005).

Estos mucopolisacáridos en los peces forman parte de la barrera más importante contra las bacterias oportunistas conteniendo sustancias con acción antimicrobiana, inmunoglobulinas y lisozimas que destruyen las paredes celulares de las bacterias, impidiendo su colonización (Schroers *et al.*, 2009; Estensoro *et al.*, 2013). Este impedimento de la colonización de las bacterias patógenas se debe principalmente a que los aceites esenciales al tener la capacidad de ser prebióticos (Gibson y Roberfroid, 1995, Garcés *et al.*, 2006; Flores y Martínez, 2006, Shiva, 2007) mejoran la actividad de las bacterias benéficas (probióticos), que tienen la capacidad de competir por nutrientes principalmente (Fe^{+} y Ca^{+}), liberar enzimas que ayudan a la proliferación de células caliciformes y mantener al sistema inmune activo (inmunocapacitación) contra bacterias (Fuller, 1984; Xing *et al.*, 2013).

Esto nos sugiere que al presenciar un mayor incremento de células caliciformes incrementa la secreción de mucinas permitiendo modular la microbiota intestinal mejorando la digestión y absorción de nutrientes. Las mucinas comprende una mezcla de metabolitos (bacteriocinas, proteasas, lisozimas y peróxido de hidrogeno) que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Lazado y Caipang, 2014). Para Freccia *et al.* 2014, esta estimulación proporcionaría una mayor variedad de aminoácidos para la síntesis de proteínas y por lo tanto aumentaría el contenido de proteína en el pez.

IX. CONCLUSIONES

- Los parámetros productivos como la ganancia de peso incrementaron en un 16.9% y talla 10.43% a un corto plazo de 30 días con la suplementación con el microencapsulado de aceites esenciales adicionado en el alimento a dosis de 500g/TM.
- La suplementación a corto plazo con el microencapsulado de aceites a una dosis de 500g/TM aumentó el número de células caliciformes en un 17.71% a diferencia del grupo control en un 14.78%, así estimulando los componentes celulares de la respuesta inmune no específica de la tilapia.
- La suplementación a corto plazo con el microencapsulado de aceites esenciales a una dosis de 500g/TM de alimento mejoró la morfología intestinal del largo y ancho de los pliegues favoreciendo la absorción de los nutrientes.
- La suplementación con el microencapsulado de aceites esenciales actúa como un promotor de crecimiento aumentando la secreción de las glicoproteínas neutras y ácidas (sulfatadas y no sulfatas) relacionadas con la inmunidad innata lo que mejora la salud intestinal.

X. RECOMENDACIONES

- Se recomienda usar el microencapsulado de aceites esenciales ya que actúa como un promotor de crecimiento, mejorando la morfología intestinal de los peces los cuales repercuten en la salud intestinal y aprovechamiento de los nutrientes en la digestión.
- Se recomienda emplear y evaluar otras dosis de suplementación con el microencapsulado de aceites esenciales y a mayor tiempo que el de la presente investigación, para determinar su efecto inmunoestimulante y generador de aumento de glicoproteínas y número de células caliciformes.
- Se recomienda evaluar más parámetros con la suplementación de aceites esenciales en sistemas de producción como; factor de conversión alimenticia, índices de mortalidad y realizar desafíos contra patógenos.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177-183.
- Abdel-Wahab, A. M., Hassouna, M. M., Abdel-Maksoud, A. M., & Abu-Seef, R. A. M. (2007). Cinnamon as a feed supplement in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, diets that reared in earthen ponds. *Egyptian J. Nutrition and Feeds*, 10(2), 331-890.
- Albado E, Saez G, Gabriel S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev Med Hered* 12: 16-19.
- Al-Sagheer, A. A., Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. (2018). Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquaculture nutrition*, 24(3), 1006-1014.
- Aly, S. M., Mohamed, M. F., & John, G. (2008). Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture research*, 39(6), 647-656.

- Anderson, T. A. (1986). Histological and cytological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata* (Pisces, Kyphosidae), in relation to diet. *Journal of morphology*, 190(1), 109-119.
- Amer, S. A., Metwally, A. E., & Ahmed, S. A. (2018). The influence of dietary supplementation of cinnamaldehyde and thymol on the growth performance, immunity and antioxidant status of monosex Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(3), 251-256.
- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Uribe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, 54(1), 100-111.
- Arellano, J.M., Dinis, M.T., & Sarasquete, C., (1999). Histomorphological and histochemical characteristics of the intestine of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Eur. J. Histochem.* 43, 121–133.
- Arévalo Villalta, T. J., & Marín, A. G. (2011). Comparación del rendimiento del cultivo de tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando machos reversados versus machos genéticamente mejorados (supermachos) criados en sistema intensivo (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).
- Arredondo, F., Campos, M., & Garduño, A. (1994). Desarrollo científico y tecnológico del banco de genoma de tilapia. *México: SEPESCA*.
- [AVMA] American Veterinary Medical Association. 2011. AVMA guidelines on euthanasia. USA: AVMA. 86 p.

- Awad, E. y Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants in growth performance and immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 40-54
- Bakkali, F., Averbeck, S, Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Baltazar, P. M. (2007). La Tilapia en el Perú: acuicultura, mercado, y perspectivas. *Revista peruana de biología*, 13(3), 267-273
- Boatto G, Pintore G, Palomba M, De Simone F, Ramundo E, Todice G. Composition and antibacterial activity of *Inula helenium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Fitoterapia* 1994; 3: 279-80.
- Bomfim, M. A. D., Lanna, E. A. T., Donzele, J. L., Quadros, M., Ribeiro, F. B., & Souza, M. P. (2010). Níveis de lisina, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(1), 1-8.
- Burt, S. A. (2007). Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. Utrecht University.
- Branco, P.A.C., Soares, R.T.R.N., Bretas, A.A., Cabral, N.O., Vieites, F.M., Bonaparte, T.P. & Mota, T. (2010). Oleos essenciais em dietas para leitões recém-desmamados. *Glob. Sci. Technol.*, 3, 75–83.
- Brackman, G., Defoirdt, T., Miyamoto, C., Bossier, P., Van Calenbergh, S., Nelis, H., & Coenye, T. (2008). Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding

activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC microbiology*, 8(1), 149

- Branson E. 2008. Fish welfare. New York: Blackwell. 316 p.
- Cao, X. J., & Wang, W. M. (2009). Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Anatomia, histologia, embryologia*, 38(4), 254-261.
- Carbone, D., & Faggio, C. (2016). Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 172-178.
- Carrassón, M., Grau, A., Dopazo, L. R., & Crespo, S. (2006). A histological, histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae). *Histology and histopathology*.
- Carson, CF y Hammer, KA (2011). Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In: Thormar H (ed.) *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, pp. 203–238. Wiley, Chichester.
- Castanon, J. I. R. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry science*, 86(11), 2466-2471.
- Costa, M. L. S., Melo, F. P., & Correia, E. S. (2009). Efeitos de diferentes níveis proteicos da ração no crescimento na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757), variedade Chitralada, criadas em tanques-rede. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 35(2), 285-294.
- Cuellar, G. A. (2000). Cultivo de Tilapia en Estanques y Jaulas Flotantes. *Menorías del Curso, abril. SEMARNAP*, Tampico, Tamaulipas.

- Cross, M. L. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 34(4), 245-253.
- Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2013). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In *Food microbiology* (pp. 765-801). American Society of Microbiology.
- Dawood, M. A., Koshio, S., Esteban, M. Á. (2017). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. doi: 10.1111/raq.12209.
- Deplancke, B., & Gaskins, H. R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American journal of clinical nutrition*, 73(6), 1131S-1141S
- Dima C, Dima S (2015) Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science* 5: 29– 35
- Dirección de Acuicultura. 2014. El cultivo de tilapia y su desarrollo en el Perú, de Ministerio de la Producción. [Acceso el 15 de septiembre del 2018]. Disponible en: http://rnia.produce.gob.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=256:cultivotilapiaperu&catid=22:actividades&Itemid=76.
- Domeneghini, C., Arrighi, S., Radaelli, G., Bosi, G., & Veggetti, A., (2005). Histochemical analysis of glycoconjugate secretion in the alimentary canal of *Anguilla Anguilla*.L. *Acta Histochem*. 106, 477–487.

- Dhar, A. K., Manna, S. K., & Allnutt, F. T. (2014). Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease*, 25(1), 1-17.
- El-Naby, F. S. A., Naiel, M. A., Al-Sagheer, A. A., & Negm, S. S. (2019). Dietary chitosan nanoparticles enhance the growth, production performance, and immunity in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 501, 82-89.
- El-Sayed, A. F. M. (2006). Tilapia culture in salt water: environmental requirements, nutritional implications and economic potentials. In *Eighth Symposium on Advances in Nutritional Aquaculture*. November (pp. 15-17).
- [FAO], Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. FIGIS - Estadísticas de Pesca. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquacultureproducción>
- Falcone, P. M., Mastromatteo, M., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2007). Evaluating in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene-indicating and pathogenic bacteria. *Journal of food protection*, 70(2), 425-431.
- Ferguson, R. M. W., Merrifield, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa, S., Picchiatti, S., & Davies, S. J. (2010). The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of applied microbiology*, 109(3), 851-862.

- [FONDEPES] Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 2004. Especie de cultivo. En Manual de Cultivo de Tilapia. Lima - Perú: Alfredo R. Palomino Ramos. 33 p.
- Fuller, R. (1984). Actividad microbiana en el tracto alimentario de las aves. *Actas de la Sociedad de Nutrición* , 43 (1), 55-61
- Furuya, W. M., Pezzato, L. E., Barros, M. M, Pezzato., A. C, Furuya, V. R & Miranda, E. C. (2004). Use of the ideal protein concept for the precise formulation of amino acid levels in diets without fishmeal for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 35 (12), 1110-1116
- Furuya, W. M., & Furuya, V. R. B. (2010). Nutritional innovations on amino acids supplementation in Nile tilapia diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 88-94.
- Flores, L. A., & Martínez, P. (2006). Principales aditivos empleados en nutrición porcina: alimentación líquida. *Jornada técnica alimentación líquida*. Colegio de Veterinarios de Murcia. Murcia, 3.
- Delporte, C. (2010). investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso. análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo (Doctoral dissertation, Universidad de Chile)
- Freccia A, Sousa SMN, Meurer F, Butzge AJ, Mewes JK, Bombardelli RA (2014) Essential oils in the initial phase of broodstock diets of Nile tilapia. *Brazilian Journal of Animal Science* 43: 1–7.
- Garcés, C., Soler, M. A., & Barragán, J. I. (2005). Evaluación del uso de extractos vegetales en la alimentación de pollos de carne. Departamento de

Producción Animal y Ciencia Tecnológica de los Alimentos. Universidad Cardenal Herrera-CEU. Moncada (Valencia). España, 161-169.

- Genten, F. (2009). Atlas of Fish Histology Science Publishers. *Enfield, New Hampshire, Estados Unidos*
- Giannenas, I., Skoufos, J., Giannakopoulos, C., Wiemann, M., Gortzi, O., Lalas, S., & Kyriazakis, I. (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5569-5577.
- Gibson, G. R & Roberfroid, M. B (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introduction of the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125 (6), 1401-1412.
- Gupta, C., Garg, A. P., Uniyal, R. C. and Kumari, A. 2008. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2(9): 247-251.
- Gora, J., Lis, A., Kula, J., Staniszevska, M., & Wołoszyn, A. (2002). Chemical composition variability of essential oils in the ontogenesis of some plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(6), 445-451
- Hai, N. V. (2015). Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 592-597.
- Hall, V., Rocha, M., & Rodríguez, E. (2002). Plantas Medicinales (Vol. II). Centro Nacional de Información de Medicamentos. Universidad de Costa Rica.
- Hashemi S. R, Davoodi. (2010). Phytochemicals as new class of feed additive in poultry industry. *J Anim Vet Adv* 9: 2295-2304.

- Harper, G. M., Monfort, M., Saoud, I. P., Emery, M., Mustafa, S., Rawling, M., & Merrifield, D. L. (2011). An ex vivo approach to studying the interactions of probiotic *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 2 (Special issue).
- Harvey, D. (2015). Aquaculture trade—recent years and top countries. *United States Department of Agriculture, Washington, DC*.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., & Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected components of essential oils on Gram negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (9), 3590-3595.
- Hernández A, García BG, Caballero MJ, Hernández MD (2016). The inclusion of thyme essential oil in the feed of gilthead seabream (*Sparus aurata*) promotes changes in the frequency of lymphocyte aggregates in gut-associated lymphoid tissue. *Aquac Res* 47:3341–3345.
- Herrería Román, E. (2013). Intestino delgado y patologías asociadas a la malabsorción intestinal.
- Hayashi, C., Boscolo, W. R., Soares, C. M., & Meurer, F. (2002). Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a reversão sexual. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(2), 823-828.
- Hernández Gutiérrez, A. M. (2009). Efecto de la utilización de aceites esenciales de orégano en la dieta de pollos de engorde sobre el crecimiento

alometrico del tracto gastrointestinal, glándulas anexas y parámetros productivos.

- Inami, M., Taverne-Thiele, A. J., Schrøder, M. B., Kiron, V., & Rombout, J. H. (2009). Immunological differences in intestine and rectum of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & shellfish immunology*, 26(5), 751-759
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports*, 12(5), 319-330.
- Kapoor, B. G., Smit, H., & Verighina, I. A. (1976). The alimentary canal and digestion in teleosts. In *Advances in marine biology* (Vol. 13, pp. 109-239). Academic Press
- Kühlwein, H., Emery, M. J., Rawling, M. D., Harper, G. M., Merrifield, D. L., & Davies, S. J. (2013). Effects of a dietary β - (1, 3-1, 6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 115(5), 1091-1106.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B. E., & López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as

growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216(1-4), 193-201.

- Lazado, C. C., & Caipang, C. M. A. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & shellfish immunology*, 39(1), 78-89.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L. D., Coppola, R. and Feo, V. D. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharm.*, 6(12): 1451-1474.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., & Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1699-1706.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262–1267.
- [NRC]. National Research Council (US). Subcommittee on Warmwater Fish Nutrition, & National Research Council. (1983). *Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes* (No. 12). National Academies
- [MAPA]. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2004). Instrução Normativa nº 13. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?met>
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Børgwald, J., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of

probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2), 1-18.

- Martini, B., & Morales, A. (2017). Comparación de dietas con harina de tilapia o harina de vísceras de aves, en pollos Cobb® durante los primeros siete días de edad.
- Martínez, R. M., Cerrilla, M. E. O., Haro, J. G. H., Garza, J. R. K., Ramos, J. Z., & Soriano, R. R. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia*, 40(11), 744-750.
- Meyer, D. E., Triminio, S. (2007). Reproducción y cría de alevines de tilapia: Manual práctico. Publicación del programa de colaboración y apoyo a la investigación en acuicultura (ACRSP), Universidad Estatal de Oregon, Corvallis, EE.UU.
- Mohamed, M. A., El-Daly, E. F., El-Azeem, N. A. A., Youssef, A. W., & Hassan, H. M. A. (2014). Growth performance and histological changes in ileum and immune related organs of broilers fed organic acids or antibiotic growth promoter. *International Journal of Poultry Science*, 13(10), 602–610.
- Moreira, a. P., Lima, j. J., Oliveira, f. C., Chagas, e. C., & Campos, c. M. (2018). Histomorfometria intestinal de pacus alimentados com dieta contendo óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. In *Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE)*.

- Murillo Higuera, Y. (2017). Efecto de oligodeoxinucleotidos CpG sobre la modulación de la respuesta inmune, antioxidante y morfología intestinal de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*).
- [OMS]. Organización Mundial de la Salud (2005). Reglamento Sanitario Internacional. 2a ed. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.
- Oosterhaven, K., Poolman, B., & Smid, E. J. (1995). S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops & Products*, 1(4), 23-31
- Oropesa, A. L., Moreno, J. J., & Gómez, L. J. (2017). Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes: recopilando y analizando datos. *Revista de Toxicología*, 34(2), 99-108.
- Padilla Sánchez, A. (2009). Efecto de la inclusión de aceites esenciales de orégano en la dieta de pollos de engorde sobre la digestibilidad y parámetros productivos.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 86.
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I., & Ruiz-Zarzuela, I. (2011). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish & shellfish immunology*, 31(2), 196-201

- Poot, C., Novelo, R., & Hernández, M. (2009). ABC en el cultivo integral de Tilapia. *Centro de Estudios Tecnológicos del Mar*, 2
- Pluske, JR, Hampson, DJ y Williams, IH. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 51: P.215-236.
- [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2017. Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017. Ministerio de la Producción. Perú. 196p.
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2010. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Sci.*, 76(2): 287-293.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology*, 2(4), 361.
- Roldán, L. P. (2010). Evaluación del uso de los aceites esenciales como alternativa al uso de los antibióticos promotores de crecimiento en pollos de engorde. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689-1699.
- Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., & Carnevali, O. (2006). Live microbial feed supplement in aquaculture for

improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(2), 167-177.

- Rombout, JH, Abelli, L., Picchiatti, S., Scapigliati, G. y Kiron, V. (2011). Teleost inmunología intestinal. *Inmunología de pescado y mariscos*, 31 (5), 616-626.
- Saavedra Martínez, M. A. (2006). Manejo del cultivo de tilapia. Nicaragua, BIDEAUSAID, Departamento de Tecnología y Arquitectura. Facultad de Ciencia, Tecnología y Ambiente. Universidad Centroamericana. Managua, Nicaragua. 31 de julio al 4 de agosto de 2006, p15.
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.
- Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227.
- Sönmez AY, Bilen S, Alak G, Hisar O, Yanık T, Biswas G (2015) Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiol Biochem* 41:165–175.
- Sutili, F. J., Gatlin, D. M., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2018). Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*. doi: 10.1111/raq.12197.
- Shiva, C. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos

promotores de crecimiento. Departament de sanitat "anatomía animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

- Schroers, V., van der Marel, M., Neuhaus, H., & Steinhagen, D. (2009). Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 288(3-4), 184-189.
- Smith, L.S., (1989). Digestive functions in teleost fishes. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego.
- Terán Velástegui, G. E. (2016). Comparación de la efectividad antimicrobiana entre aceite esencial de canela y clorhexidina frente a *enterococcus faecalis*. estudio in vitro (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Torrecillas, S., Montero, D., Caballero, M. J., Robaina, L., Zamorano, M. J., Sweetman, J., & Izquierdo, M. (2015). Effects of dietary concentrated mannan oligosaccharides supplementation on growth, gut mucosal immune system and liver lipid metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish & shellfish immunology*, 42(2), 508-516.
- Torres, D. M., & Hurtado, V. (2012). Requerimientos nutricionales para tilapia del Nilo.
- Totocayo, N. H. (2016). La Tilapia Roja en el Perú. *Revista AquaTIC*, (19).
- Turek C, Stintzing FC (2013) Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12: 40–53.

- Trewavas E. (1983). Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*.
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Kotzent, S., Assane, I. M., & Pilarski, F. (2019). Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. *Aquaculture International*, 1-13.
- Valladão, G. M. R. (2018). Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo: efeitos sobre a saúde, morfologia intestinal e microbiota. Tese apresentada ao programa de pós-graduação do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista
- Valladão, G. M., Gallani, S. U., Pala, G., Jesus, R. B., Kotzent, S., Costa, J. C., & Pilarski, F. (2017). Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquaculture research*, 48(11), 5640-5649.
- Vargas, J. 2011. Observación morfológica del aparato digestivo y hábitos alimenticios en peces. Nutrición y alimentación de organismos acuáticos, Folleto de componente curricular. Departamento de acuicultura e industrias pesqueras, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú. 14pp.
- Verastegui, A., & Fukushima, M. (2009). Observaciones preliminares del efecto de la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Eugenia caryophyllata*) en el crecimiento de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis*

spp.), bajo condiciones de laboratorio. In *Anales Científicos* (Vol. 70, No. 4, pp. 73-80).

- Vásquez Torres, D. M., & Hurtado, V. (2012). Requerimientos nutricionales para tilapia del Nilo., W. (2004). Principios de nutrición aplicada al cultivo de peces. Colección Unillanos, 30.
- Velasco, S., et al. (2010). Los prebióticos de tipo inulina en alimentación aviar I: características y efectos a nivel intestinal. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4(2): P.87-104.
- Wallace, R. J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the nutrition society*, 63(4), 621-629.
- Welker, T. L., & Lim, C. Use of probiotics in diets of tilapia. *J Aquacult Res Dev* 2011.
- Wilson, J. M., & Castro, L. F. C. (2010). Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In *Fish physiology* (Vol. 30, pp. 1-55). Academic Press.
- Xing, C. F., Hu, H. H., Huang, J. B., Fang, H. C., Kai, Y. H., Wu, Y. C., & Chi, S. C. (2013). Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. *Fish & shellfish immunology*, 35(4), 1122-1128.
- Zeng Z, Zhang S, Wang H, Piao X (2015) Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6: 7.

- Zepeda, A. P. (2015). Estudio de la patogenicidad de diferentes especies de *Aeromonas* en la trucha arcoíris (*oncorhynchus mykiss*). Tesis para optar el grado de doctor. Universidad Autónoma de México. P, 117.
- Zamora, N. S., y Rubio, V. C. (2009). La digestión en peces. Madrid, España: Discript preimpresión, S. L.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frías, C., y Cortes, A. (2006). Ontogenia del sistema inmune de los peces. *Inmunología de peces y mariscos*, 20 (2), 126-136.
- Zekaria, D. (2006). Los aceites esenciales: una alternativa a los antimicrobianos. *Laboratorios Calier*.
- Zeppenfeld, C. C., Hernández, D. R., Santinón, J. J., Heinzmann, B. M., Da Cunha, M. A., Schmidt, D., & Baldisserotto, B. (2016). Essential oil of *loysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*, 22(4), 933-940.

XII. ANEXOS



Anexo 01. Mapa del centro de cultivo de la empresa HIPPOCAMPUS DEL PERÚ SAC en la provincia de Barranca – Lima (Fuente: Google Maps®).



Anexo 02. Vista panorámica del centro de cultivo de la empresa HIPPOCAMPUS DEL PERÚ SAC en la provincia de Barranca – Lima.



Anexo 03. Microencapsulado de aceites esenciales EMERALD® de línea comercial IGUSOL.



Anexo 04. Siembra de alevines de tilapia nilótica (*Oreochomis niloticus*) para la suplementación con aceites esenciales EMERALD®



Anexo 05. Medición de los parámetros productivos de alevinos de tilapia nilótica post suplementación con aceites esenciales EMERALD®.



Anexo 06. Necropsia de alevinos de cada tratamiento y toma de intestino anterior



Anexo 07. Toma de muestras y envío de muestras de intestino anterior en formol al 10%, post alimentación con aceites esenciales en alevines de tilapia gris.



Anexo 08. Evaluación de láminas histológicas con el microscopio Leica y el programa LAZ 3.4.