

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

VETERINARIA - ZOOTECNIA



TESIS

“Efecto de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre los parámetros hematológicos de paco (*Piaractus brachypomus*) en Madre de Dios”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO-ZOOTECNISTA

Autor:

Bach. PAREDES SALAS, Marian Antonia

Asesor:

Mag. FLORES MENDOZA, Jimmy

Co Asesora:

M. Sc. GONZALES FLORES, Anaí

Puerto Maldonado, Diciembre del 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

VETERINARIA - ZOOTECNIA



TESIS

“Efecto de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre los parámetros hematológicos de paco (*Piaractus brachypomus*) en Madre de Dios”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO -
ZOOTECNISTA

Autor:

Bach. PAREDES SALAS, Marian Antonia

Asesor:

Mag. FLORES MENDOZA, Jimmy

Co-Asesora:

M. Sc. GONZALES FLORES, Anaí

Puerto Maldonado, Diciembre del 2023

Dedicatoria

El presente trabajo dedico a Dios por guiar mis pasos y mantener sólido mi camino, a mi madre por ser mi ejemplo de perseverancia, fortaleza, por siempre confiar en mí y ser mi apoyo incondicional, a mi hermano por siempre aconsejarme, enseñarme y estar presente en cada paso que doy.

Agradecimiento

A mi casa de estudios por el cual pude formarme profesionalmente, a cada docente que formo parte de toda mi carrera universitaria y por transmitir sus conocimientos.

A mi asesor, Mag. Jimmy Flores Mendoza por asesorarme en cada etapa de mi tesis.

A mi co-asesora Blga. Mag. Anaí Paola Prissilla Gonzales Flores, por ser el cerebro y pieza fundamental de este proyecto, por enseñarme, asesorarme, orientarme, aconsejarme en este arduo camino, y haber fortalecido mis conocimientos.

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana- IIAP, por permitirme ejecutar mi proyecto en sus instalaciones y ser el lugar que me acogió como tesista y profesional.

Al CONCYTEC por ser el principal gestor de este proyecto y por su financiamiento.

Al Ing. Jean Paul Revollar Ramírez por acompañarme, apoyarme y aconsejarme a lo largo de todo este proceso.

Al Blgo Rommel Adriel, porque desde el día uno siempre me apoyo incondicionalmente en el transcurso de la ejecución de mi tesis y estuvo pendiente de cada detalle.

A cada uno de mis compañeros del área de AQUAREC que siempre estuvieron presentes en este camino de elaboración y ejecución de mi tesis, apoyándome en distintas actividades.

TURNITIN_MARIAN PAREDES SALAS

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

INDICE DE SIMILITUD

11%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional Jose Faustino Sanchez Carrion Trabajo del estudiante	2%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	repositorio.unamad.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	1library.co Fuente de Internet	1%
6	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	revistas.iiap.gob.pe Fuente de Internet	<1%

Presentación

En los últimos años la acuicultura obtuvo un notorio crecimiento a nivel mundial gracias a la demanda que existe por el consumo y aprovechamiento de la carne de pescado que brinda muchos nutrientes en la alimentación humana. El paco (*Piaractus brachypomus*) es eficiente para la crianza y realización de métodos de estudios, por poseer características como la buena adaptación al clima, fácil aceptación de alimento balanceado, y rusticidad.

Actualmente, se vienen realizando diversos estudios experimentales de cultivos, policultivos, densidad de siembra, enfermedades parasitarias, bacterianas y aditivos en la alimentación para mejorar la producción de paco en sistemas intensivos. Sin embargo, aún no se evaluaron estudios como el de enriquecer las dietas con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*), el objetivo fue evaluar el efecto de la nanopartícula (NNP) cargada de aceite esencial de romero en los parámetros sanguíneos de los peces, las cuales son los encargados de mantener el estado de salud de los peces, homeostasis y actúan como primera barrera de defensa contra enfermedades bacterianas, parasitarias, víricas, etc., por ende fortalecen el sistema inmunológico para así mejorar la producción.

Los aceites esenciales (AE) han ganado bastante popularidad en los últimos años en la acuicultura, ya que demostraron que poseen propiedades que actúan como inmunoestimulantes, antiparasitarios, antibacterianos, promotores de crecimiento y anestésicos. Sin embargo, los AE poseen características que limitan su aprovechamiento, por lo que es necesario aplicar nuevas tendencias como la nanotecnología, para mejorar la capacidad de biodisponibilidad, absorción en lugares deseados, controlar el tiempo de liberación y proteger los compuestos bioactivos de factores externos como temperatura, radiación, iluminación y aire.

El presente trabajo de investigación evaluó el efecto de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre los parámetros hematológicos de paco (*Piaractus brachypomus*) en Madre de Dios.

Resumen

El estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la alimentación suplementada con nanopartículas (NNP) cargadas de aceite esencial (AE) de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre los parámetros hematológicos y crecimiento corporal de paco (*Piaractus brachypomus*). Un total de 135 peces fueron alimentados durante 45 días con NNP cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) en el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) – Puerto Maldonado, los peces se distribuyeron en tres tratamientos, T1: grupo control, T2: 0.01 g/kg NNP y T3: 0.025 g/kg NNP con 3 repeticiones, se midieron, pesaron a los peces y las muestras de sangre se extrajeron de la vena caudal y se analizaron los parámetros hematológicos como: eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), concentración de hemoglobina corpuscular medio (CHCM), trombocitos, leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, leucocitos granulares positivos (LG-PAS) y basófilos. Los resultados mostraron que el T2 y T3 presentaron diferencia significativa superior ($p < 0.05$) en la producción de linfocitos a comparación del grupo control; los demás parámetros como hematocrito, trombocitos, leucocitos totales, LG-PAS y basófilo no presentaron diferencia significativa entre tratamientos. Así mismo la biometría de los peces a los 30 y 45 días de tratamiento presentó como resultado a los 30 días se observó una diferencia significativa superior ($p < 0.05$) en los peces del T2 y T3 en comparación con los peces del grupo control, pero este fenómeno no se observó a los 45 días. Se concluye que la alimentación suplementada con NNP cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) en pacos (*Piaractus brachypomus*) influye positivamente en los parámetros hematológicos y crecimiento.

Palabras clave: Nanopartículas, *Piaractus brachypomus*, alimentación, hematología, aceites esenciales.

Abstract

The objective of the study was to evaluate the effect of feeding supplemented with nanoparticles (NNP) loaded with rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil (EO) on the hematological parameters and body growth of paco (*Piaractus brachypomus*). A total of 135 fish were fed for 45 days with NNP loaded with rosemary EO (*Rosmarinus officinalis*) at the Peruvian Amazon Research Institute (IIAP) - Puerto Maldonado, the fish were distributed in three treatments, T1: control group, T2: 0.01 g/kg NNP and T3: 0.025 g/kg NNP with 3 repetitions, the fish were measured, the fish were weighed and the blood samples were extracted from the caudal vein and the hematological parameters were analyzed such as: erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), thrombocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils, positive granular leukocytes (LG-PAS) and basophils. The results showed that T2 and T3 presented a significantly higher difference ($p < 0.05$) in lymphocyte production compared to the control group; The other parameters such as hematocrit, thrombocytes, total leukocytes, LG-PAS and basophil did not present a significant difference between treatments. Likewise, the biometry of the fish at 30 and 45 days of treatment showed that at 30 days a higher significant difference was observed ($p < 0.05$) in the fish from T2 and T3 compared to the fish from the control group, but This phenomenon was not observed after 45 days. It is concluded that feeding supplemented with NNP loaded with rosemary EO (*Rosmarinus officinalis*) in pacos (*Piaractus brachypomus*) positively influences hematological parameters and growth.

Keywords: Nanoparticles, *Piaractus brachypomus*, food, hematology, essential oils.

Introducción

En la Amazonía peruana, la acuicultura inició con el cultivo de especies nativas como: paco (*Piaractus brachypomus*), gamitana (*Colossoma macropomum*), entre otros⁽¹⁾. En la región de Madre de Dios, la especie nativa que más se cultiva es el paco (*Piaractus brachypomus*), que es una especie omnívora, frugívora, rústica que tiene buena aceptación al cambio de alimento, tiene características muy importantes que permiten la fácil adaptación al agua y al clima favoreciendo su crecimiento y desarrollo ⁽²⁾.

Durante varios años, se realizaron diversos estudios basados en la alimentación, densidad de siembra, cultivo y parasitología, con el objetivo de mejorar el desempeño productivo en sistemas controlados de esta especie ⁽³⁻⁵⁾. Sin embargo, debido a la necesidad de intensificar los sistemas de siembra surgieron algunos problemas de resistencia a diversos microorganismos y altos niveles de estrés ocasionando mortalidades y por ende pérdidas económicas en los centros de cultivos intensivos ⁽⁶⁾.

Para optimizar y mejorar el sistema inmunológico de los peces se vienen usando una serie de aditivos incorporados y enriquecidos en las dietas, como los Aceites Esenciales (AE), que poseen compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas, antiparasitarias, antimicóticas, antioxidantes e inmunoestimulantes, que mejoran la conversión alimenticia y por ende influye de manera positiva en el crecimiento, factor de condición, absorción de nutrientes, sobrevivencia y la salud de los peces⁽⁷⁻¹¹⁾.

Sin embargo, los AE son esparcidos en la dieta y al ser de naturaleza hidrofóbica, al contacto con el agua se desprenden y son de fácil oxidación por lo que no se aprovecharía el potencial que presentan sus componentes interfiriendo en la biodisponibilidad y absorción por el organismo de los peces ^(13,15). La nanotecnología es una alternativa interesante para proteger los compuestos bioactivos de los AE de plantas, potenciando la capacidad su funcionalidad, presentando mayor estabilidad, y mejorando el rendimiento en dosis bajas ^[16]. Además, ayuda a una liberación controlada en el lugar requerido, con capacidad mucoadhesiva y sensibles a ciertos niveles de pH,

para evitar que los aceites esenciales pierdan sus propiedades durante el proceso de absorción⁽¹³⁾.

El romero (*Rosmarinus officinalis*) es una planta medicinal que tiene gran adaptabilidad, capacidad de crecer y reproducirse en distintos lugares con gran facilidad, posee propiedades tónicas, inmunoestimulantes, antiespasmódicos y sirve como diurético; por lo que podría ser benéfica para la salud del paco y la acuicultura⁽¹⁷⁾.

Por tanto, el presente trabajo buscó evaluar el efecto de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre los parámetros hematológicos de paco (*Piaractus brachypomus*) en la región de Madre de Dios.

Índice

Dedicatoria	3
Agradecimiento	4
Presentación	5
Resumen	6
Abstract	7
Introducción.....	8
Índice	10
CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Descripción del problema.....	1
1.2 Formulación del problema.....	2
1.3 Objetivos	2
1.3.1 General	2
1.3.2. Específicos.....	2
1.4 Variables	3
1.4.1 Variable independiente	3
1.4.2 Variable dependiente	3
1.5 Operacionalización de variables	4
1.6 Hipótesis	5
1.7 Justificación	5
1.8 Consideraciones éticas	6
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	7

2.1	Antecedentes de estudio.....	7
2.2	Marco Teórico	9
2.2.1	Paco <i>Piaractus brachypomus</i>	9
2.2.2	Hematología.....	10
2.2.3	Aceites esenciales	13
2.2.4	Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	14
2.2.5	Aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	15
2.2.6	Nanotecnología.....	15
2.2.7	Dieta	16
2.3	Definición de términos.....	18
CAPITULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN		19
3.1	Tipos de estudio.....	19
3.2	Diseño del estudio.....	19
3.3	Población y muestra.....	19
3.4	Métodos y técnicas	20
3.4.1.	Método de inclusión de nanopartículas de aceite esencial de romero en el alimento de los peces	20
3.4.2.	Obtención y aclimatación de los peces muestreados	21
3.4.3.	Distribución y alimentación de los peces con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero <i>Rosmarinus officinalis</i>	22
3.4.4.	Análisis hematológico	24
3.5	Tratamiento de los datos.....	24
3.6	Recursos.....	24
CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACION		25

4.1 Crecimiento corporal de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) después de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (<i>R. officinalis</i>)	25
4.2 Efecto de la alimentación suplementada con NNP cargadas de AE romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) después de 45 días sobre las células de la serie roja de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>)	26
4.3 Efecto de la alimentación suplementada con NNP cargadas de AE de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) después de 45 días sobre las células de la serie blanca y diferenciación leucocitaria	28
DISCUSION	31
CONCLUSIONES.....	33
SUGERENCIAS	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	
Anexo 1: Matriz de operacionalización de las variables	43
Anexo 2: Matriz de consistencia.....	44
Anexo 3: Instrumento	45

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros e índices hematológicos en alevinos, juveniles y reproductores de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) criados en cautiverio	11
Tabla 2. Requerimientos nutricionales de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) de acuerdo a su etapa.....	17
Tabla 3. Distribución al azar de los peces en los tanques de fibra de vidrio	23
Tabla 4. Composición nutricional de alimento balanceado	23
Tabla 5. Resultados de trombocitos y leucocitos de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) después de 45 días de alimentación con NNP de AE de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	28

Índice de figuras

Figura 1. A) Nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero de forma irregular B) Nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero con distribución regular. Imágenes no publicadas, obtenidas de: Mathews et al., 2023	20
Figura 2. A) nanopartículas de aceite esencial de romero B) dilución de melaza C) inclusión de las NNP de AE de romero en el alimento balanceado D) elaboración de los pellets E) alimento elaborado con NNP de AE de romero.	21
Figura 3. A) Hemoglobina B) Eritrocitos C) Hematocrito D) Volumen corpuscular medio (VCM) E) Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) F) Trombocitos en sangre de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>).	27
Figura 4. A) Neutrófilo bilobulado (T1) B) Trombocitos (T1) C) Basófilo (T1) D) linfocito (T2) E) Leucocito granular positivo (T2) F) Eosinófilo (T3) G) Monocito (T1) en extensión sanguínea de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>), tipo de tinción Rosenfeld, aumento de 100x.....	30

CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Descripción del problema

En los últimos años, la producción de la acuicultura a nivel mundial ha experimentado un notable crecimiento debido a la necesidad por proteína animal en la dieta humana ⁽¹⁸⁾. En ese sentido, surgió la necesidad de producir peces en grandes toneladas, por lo que son cultivados en altas densidades, con escaso recambio de agua, sumado al uso de dietas no balanceadas, mala calidad de agua e inadecuada manipulación; todos estos factores en conjunto comprometen la salud de los peces⁽²⁾, por lo que cada vez más se reportan mortalidades en la producción⁽⁶⁾.

En ese sentido, se ha visto el uso desmedido y mal administrado de suplementos sintéticos incorporados en las dietas de los peces para potenciar el sistema inmunológico, los parámetros hematológicos, el estado de salud, controlar el ataque de agentes infecciosos e incrementar el rendimiento de los peces en los centros piscícolas ⁽¹⁹⁻²²⁾. Sin embargo, su uso indiscriminado ha llevado a la generación de resistencia a antibióticos, eliminación de bacterias benéficas, inmunosupresión, acumulación en el músculo de los peces e impactos negativos de los residuos en el medio natural ⁽²⁰⁾. Por lo tanto, las plantas medicinales con sus derivados los aceites esenciales han ganado importancia en el sector acuícola, y se usan principalmente esparcidos en el alimento. Sin embargo, al contacto con el agua un porcentaje significativo se volatiliza, oxida y desprende de la dieta por ser de naturaleza hidrofóbica; por lo que existen pérdidas, poco aprovechamiento por los peces y por ende contaminación en los sistemas acuáticos⁽¹³⁾.

Por lo tanto, emerge la necesidad de buscar productos de origen naturales, bioamigables, sostenibles, no tóxicos y biodegradables para

mejorar y potenciar los parámetros sanguíneos, el sistema inmunológico, la salud y por ende la productividad en los sistemas de cultivo.

1.2 Formulación del problema

¿La alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) influye positivamente sobre los parámetros hematológicos de paco (*Piaractus brachypomus*) en Madre de Dios?

1.3 Objetivos

1.3.1 General

-) Evaluar el efecto de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre los parámetros hematológicos de paco (*Piaractus brachypomus*) en Madre de Dios.

1.3.2. Específicos

-) Evaluar el crecimiento corporal de paco (*Piaractus brachypomus*) después de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).
-) Analizar las células de la serie roja y trombocitos de paco (*Piaractus brachypomus*) después de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).
-) Evaluar el efecto de las nanopartículas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre las células de la serie blanca y diferenciación leucocitaria en la sangre de paco (*Piaractus brachypomus*) en Madre de Dios

1.4 Variables

1.4.1 Variable independiente

-) Nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*), cualitativa ordinal (0.01 g/kg y 0.025 g/kg de alimento balanceado)

1.4.2 Variable dependiente

-) Medición corporal
 -) Peso (g)
 -) Longitud (cm)

Parámetros hematológicos

-) Serie roja
 -) Hematocrito (%).
 -) Hemoglobina (g/dL).
 -) Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$).
 -) Volumen corpuscular medio (fL).
 -) Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL).
-) Trombocitos (μL)
-) Serie blanca
 -) Leucocitos totales (μL)
 -) Diferenciación leucocitaria (μL): Monocitos, Neutrófilos, Eosinófilos, Linfocitos, Basófilos, Leucocito granular positivo (LG-PAS)

1.5 Operacionalización de variables

DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ITEMS
Variable Independiente Nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Medida expresada en gramos de Nanopartículas para incluir en el alimento	D1 0.01	Gramo/Kilogramo	g/kg
		D2 0.025	Gramo/Kilogramo	g/kg
Variable Dependiente Parámetros hematológicos de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>)	Medición y conteo de células de la serie roja y serie blanca mediante diferentes métodos.	D1 Peso	Gramos	g
		D2 Longitud	Centímetros	Cm
		D3 Hematocrito	Porcentaje	%
		D4 Hemoglobina	Gramos/ decilitros	g/dL
		D5 Eritrocitos	RBC/microlitros	$\times 10^6/\mu\text{L}$
		D6 Volumen corpuscular medio	Fentolitros	fL
		D7 Concentración de hemoglobina corpuscular media	Gramos/ decilitros	g/dL
		D8 Trombocitos	Microlitros	μL
		D9 Leucocitos Totales	Microlitros	μL
		D10 Monocitos, Neutrófilos, Eosinófilos, Linfocitos, Basófilos, Leucocito granular positivo	Microlitros	μL

1.6 Hipótesis

Ha: Las nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) mejoran los parámetros hematológicos de paco (*Piaractus brachypomus*) en Madre de Dios.

Ho: Las nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) no mejoran los parámetros hematológicos de paco (*Piaractus brachypomus*) en Madre de Dios.

1.7 Justificación

Las plantas aromáticas destacaron en diversas áreas económicas y productivas, por la capacidad de sus compuestos bioactivos y metabolitos secundarios comprobados a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* en animales⁽²³⁾. Todas las plantas tienen compuestos fenólicos como: los flavonoides, las xantonoides, los estilbenoides, las antraquinonas, las diarilheptanoides y las antranas, estos metabolitos son barreras de defensa y de supervivencia de las plantas⁽²³⁾. El Carvacrol y Timol son los monoterpenos más comúnmente encontrados en plantas de la familia Lamiaceae y el ácido carnósico solo se encuentra en algunas especies de plantas como el romero (*Rosmarinus officinalis*), la cual tiene una gran actividad antioxidante⁽²⁴⁾.

El romero (*Rosmarinus officinalis*) es una planta que se encuentra ampliamente distribuida en diferentes países del mundo y en el Perú tiene interés económico por lo que es expendida en los principales mercados de las localidades⁽²⁵⁾; para tratar algunas dolencias gastrointestinales, bacterianas, fúngicas, inflamatorias, antioxidantes y también es bien usada en la cosmética, debido a sus compuestos como monoterpenos (1,8-cineol, borneol, -pineno, -pineno, limoneno, canfeno, alcanfor y mirceno) ⁽²⁶⁾.

Así mismo, el AE de romero viene siendo usado en la acuicultura debido a la capacidad de sus compuestos bioactivos. La forma más común de aplicación en la acuicultura es incorporada en la dieta, para mejorar el sistema inmunológico, la salud, el rendimiento y el crecimiento de los peces.

Sin embargo, cada vez se buscan otras formas de aplicar tecnología que ayuden a proteger el AE de la oxidación, degradación, volatilidad, etc. [27], y los factores externos a los que los AE son sensibles y pueden perjudicar el aprovechamiento⁽²⁸⁾. Por lo tanto, la nanotecnología a través del encapsulamiento con quitosano, es una forma interesante de proteger, extender la vida útil, mejorar la capacidad transportadora y liberación controlada del aceite esencial de romero en peces⁽¹⁵⁾.

El quitosano, es un polisacárido, no tóxico, brinda mayor biodegradabilidad y es compatible con muchos compuestos, pero no existen muchos estudios de la utilización de quitosano como encapsulador de AE en productos para peces⁽²⁹⁾. Por lo tanto, a través de la presente investigación se busca estudiar la eficacia de las nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) incluidas en la dieta y el efecto en los parámetros hematológicos de paco (*Piaractus brachypomus*), la especie nativa amazónica más cultivada y con gran aceptación comercial en la región de Madre de Dios.

1.8 Consideraciones éticas

Los especímenes de paco serán utilizados exclusivamente para la investigación, la manipulación se realizará siguiendo las normas éticas internacionales y protocolos establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal en el código sanitario para los animales acuáticos y bienestar de los peces de cultivo como están señalados en el capítulo 7.1 y artículos 7.1.1 y 7.1.2.

También fue evaluada por el comité de bioética para el uso de animales de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con código N°033-2022-CBE-FCB-UNMSM.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de estudio

En el año 2021, realizaron un estudio basado en la utilización de AE de limón con nanopartículas de quitosano en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y determinaron que la utilización de AE de limón con nanopartículas de quitosano al 1% mejoró la ganancia de peso y tasa de conversión alimenticia a diferencia del grupo control, también la glucosa, el colesterol sérico y los triglicéridos mostraron una disminución significativa; por lo que la administración de este AE tiene la capacidad de mejorar el crecimiento y el sistema inmune de la trucha arco iris ⁽²⁹⁾.

En el año 2020, realizaron un estudio basado en el efecto del AE de romero sobre los parámetros hematológicos en el gran esturión (*Huso huso*), trabajaron 180 peces divididos en seis grupos con concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 2% de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*), los resultados mostraron mejoras del sistema inmunológico, la proteína total y la glucosa se elevaron de forma significativa, y los parámetros hematológicos se elevaron también; concluyendo que el aceite esencial de romero se puede utilizar en las dietas para mejorar el sistema inmune y los parámetros hematológicos del gran esturión ⁽¹⁴⁾.

En el año 2018, realizaron un estudio de “La nanoencapsulación como tecnología es eficiente para aumentar el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de plantas en el sistema alimentario”, exhibieron los beneficios antibacterianos de esta nueva tecnología en plantas como la canela (*Cinnamomum verum*); a bacterias susceptible como el *Aspergillus spp*, el comino (*Cuminum cyminum*) y el romero (*Rosmarinus officinalis*) como antifúngico, antioxidante y antibacteriano, demostrando así que el método de

la nanotecnología es efectiva, reduce la contaminación bacteriana, protege el producto y se adecua al sistema alimentario⁽³⁰⁾.

En el año 2019, realizaron un estudio basado en la influencia de las NNP de quitosano y los AE de hinojo (*Foeniculum vulgare*) sobre la vida útil de *Huso huso* en filetes de pescado; el estudio se dividió en 5 tratamientos: T1: grupo control, T2: NNP cargadas de quitosano en sistema de envasado en atmosfera modificada, T3: AE de hinojo en sistema de envasado en atmosfera modificada, T4: NNP de quitosano y T5: AE, todas las muestras fueron mantenidas en 0 y 4 °C por 27 días, y evaluaron propiedades químicas, sensoriales y microbianas. Los resultados demostraron, el T3 mantiene los factores químicos de filetes a diferencia del T1 que se deterioraron en 6 días después de la refrigeración y el crecimiento de bacterias disminuyó en el T4, las características organolépticas se mantuvieron y mejoraron en el tratamiento. En conclusión, el T3 mejora la vida útil de los filetes de pescado hasta los 18 días y es antibacteriano⁽²⁴⁾.

En el año 2021, realizaron un estudio basado en nanopartículas de zeína impregnadas con eugenol y AE ajo (*Allium sativum*) para el tratamiento de patógenos de peces, con el objetivo de emplear un sistema efectivo, biodegradable y bioamigable para el control de enfermedades. Las formulaciones de NNP de zeína obtuvieron mejores propiedades fisicoquímicas y un tamaño 150 nm que brindó una mayor protección de los compuestos contra la degradación en el almacenamiento por 90 días, también demostraron que presentan baja toxicidad y baja actividad antibacteriana⁽³¹⁾.

En el año 2016, realizaron un estudio utilizando AE dietéticos de clavo de olor, albahaca y jengibre en tilapia (*Oreochromis niloticus*), contra *Streptococcus agalactiae*; trabajaron durante 55 días con dosis de 0.5, 1 y 1.5%, realizaron biometría de los peces los días 10, 35 y 55, extrajeron sangre para las pruebas hematoinmunológicas y demostraron que el AE de albahaca, clavo de olor y jengibre mejoraron eficazmente la respuesta inmunológica contra *Streptococcus agalactiae*, con mayor producción de neutrófilos, leucocitos y linfocitos, pero el AE de albahaca y clavo al 1.5% presentaron efectos adversos afectando el hematocrito y hemoglobina, a los 55 días

concluyeron que el AE de albahaca, clavo y jengibre mejoraron el sistema inmunológico ⁽³²⁾.

En el año 2021, realizaron un estudio basado en el tratamiento contra endoparásitos de peces con nanobiopartículas cargadas de fármacos y evaluaron los parámetros sanguíneos e histología del tejido intestinal; T1: nanobiopartículas conjugadas de derivado de quitosano, alginato y praziquantel, T2: nanobiopartículas puras, T3: nanobiopartículas con praziquantel y los peces fueron alimentados dos veces al día por tres días consecutivos. Los resultados de los parámetros hematológicos no tuvieron diferencia significativa entre el T2 y T1, el T3 demostró que el praziquantel altera las células sanguíneas. Concluyendo que es seguro la administración de las nanobiopartículas siendo óptimas, eficaces, aceptable por los peces, y podría mejorar la salud del pez⁽³³⁾.

En el año 2018, realizaron un estudio basado en la “influencia de suplementación de las nanopartículas de quitosano dietético mejoran el crecimiento, producción, rendimiento e inmunidad en tilapia (*Oreochromis niloticus*)”, donde evaluaron un total de 120 peces, que dividieron en 4 grupos diferentes y alimentaron con concentraciones de 1,3 y 5 g de nanopartículas de quitosano (ChNP) por kg de alimento y un grupo control por 70 días, donde obtuvieron resultados positivos en rendimiento, crecimiento, lípidos crudos, leucocitos, eritrocitos, proteínas, globulinas, ALT y AST en los peces del grupo alimentados con 5 g de ChNP/kg⁽⁵⁸⁾.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Paco *Piaractus brachypomus*

El *Piaractus brachypomus*, conocido comúnmente con el nombre paco en el Perú, tiene diferentes denominaciones que varía dependiendo el país, por ejemplo, en Brasil se le conoce como pirapitanga y caranha, en Venezuela como cachama u morocoto y en Colombia como cachama blanca, se distribuye a lo largo de toda la cuenca Amazónica y Orinoco en Sudamérica⁽³⁴⁾.

Es una especie omnívora, crece y se desarrolla en aguas dulces y cálidas a temperatura que oscila entre 28-31°C, posee características muy adaptables a cualquier cambio sin afectar su crecimiento y desarrollo, una de las principales características es la rusticidad, fácil adaptación, rápido crecimiento, resistente a diferentes microorganismos y también soporta bajos niveles de oxígeno por períodos cortos ⁽³⁵⁾.

Clasificación de paco (*Piaractus brachypomus*), Según Cuvier 1818

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Characiformes

Familia: Serrasalminidae

Género: *Piaractus*

Nombre científico: *Piaractus brachypomus*

Nombre común: "Paco"

Es una especie con gran potencial productivo que se cultiva de manera extensiva, intensiva y semi intensiva ⁽³⁶⁾. Aplicando métodos como biofloc y densidad de siembra, con el objetivo de mejorar la producción de *Piaractus brachypomus* alcanzando un peso promedio de 20 kg y más de 80 cm en el medio natural⁽³⁷⁾. Es una especie migratoria con capacidad de recorrer kilómetros en la etapa de reproducción, tiene la capacidad de adaptarse a cultivos y policultivos junto con otras especies sin afectar su crecimiento y desarrollo ⁽³⁸⁾.

2.2.2 Hematología

La hematología es la disciplina que se encarga de estudiar la sangre de los peces, los índices hematológicos varían por factores extrínsecos entre ellos está el oxígeno, temperatura, pH y por otro lado los factores intrínsecos como la edad, especie y estado nutricional. La extracción de sangre se realiza mediante la vena caudal con un promedio de 0.2-0.5 ml de sangre con una jeringa bañada de anticoagulante ya sea EDTA al 10% o heparina sódica⁽³⁹⁾.

A diferencia de otros animales y del humano en los peces existe mayor producción de células inmaduras por diferentes factores, pero desaparecen por la capacidad que tienen de maduración o diferenciación en los vasos sanguíneos, este proceso se puede confundir con un cuadro anémico, aunque realmente no es, esta ocurrencia puede atribuirse al desequilibrio de la homeostasis o adaptaciones variables abióticas y bióticas, además los peces tienen la capacidad de utilizar otros órganos como productores de células sanguíneas cuando el órgano principal no está en la capacidad de producir o presenta alguna enfermedad⁽⁴⁰⁾.

Tabla 1. Parámetros e índices hematológicos en alevinos, juveniles y reproductores de paco (*Piaractus brachypomus*) criados en cautiverio

Células sanguíneas	Alevinos	Juveniles	Reproductores
Hematocrito %	22.9	32.4	35.2
Hemoglobina g/dl	6.37	8.0	10.1
Eritrocitos 10 ⁶ /mm ³	1.305	1.65	1.67
Leucocitos 10 ⁶ /mm ³	1.635	1.95	2.102
VCM fL	177.83	197.32	210.55
HCM pg	49.21	48.82	60.26
CHCM g/dL	28.08	24.83	28.75

Fuente: Garay, 2010

Morfológicamente, los eritrocitos de los peces presentan un núcleo y son elípticos, similar comparando con otras especies, los trombocitos varían su forma dependiendo al grado de maduración o reactividad, son elípticos aunque algunos pueden ser alargados y fusiformes, en caso de los neutrófilos estos presentan núcleos excéntricos alargados, segmentados y redondeados⁽⁴¹⁾.

Eritrocitos: Los eritrocitos de los peces, aves, anfibios y reptiles se diferencian de los mamíferos por presentar la forma elíptica y nucleada, contienen pocos organelos y presentan una vida útil corta, está compuesta por una membrana citoplasmática lipoproteica semipermeable.

Volumen corpuscular medio (VCM): Este parámetro nos muestra el tamaño aproximado de los eritrocitos de la sangre y se expresa en fentolitros, para calcular se necesitan datos como el hematocrito y el número de eritrocitos. Este parámetro es importante porque puede proporcionar información importante sobre las causas de las anemias existen 3 categorías: microcíticas (cuando el VCM se encuentra debajo del rango normal), normocíticas (es cuando el VCM se encuentra dentro del rango normal), macrocíticas (es cuando el VCM se encuentra por encima del rango normal).

Hemoglobina (Hb): es una hemoproteína conjugada que va junto a los eritrocitos, que presenta una coloración roja, encargada de transportar el oxígeno de los pulmones a diferentes tejidos del cuerpo, extrae el dióxido de carbono y también participa en la regulación del PH.

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM): Es el parámetro que indica la medida de concentración de hemoglobina en un volumen determinado de eritrocitos, este parámetro tiende a disminuir cuando hay anemias microcíticas a ese fenómeno se le denomina hipocromía.

Monocitos: Los monocitos o macrófagos, son los leucocitos que se encuentran en mayor cantidad en la circulación de los peces, son asimétricos y poseen un núcleo circular o en forma de C y aspecto reniforme, la cromatina nuclear es de color púrpura y el citoplasma presenta una coloración azul cielo y libre de granulocitos, pero se observan vacuolas citoplasmáticas de diferentes tamaños que se suelen observar cómo espacios vacíos, dichas vacuolas aparecen en células activadas en mayores cantidades y grandes.

Linfocitos: son los leucocitos más pequeños en el torrente sanguíneo, encargados de la inmunidad humoral y celular del organismo produciéndose en órganos linfoides como bazo y timo, se caracterizan principalmente por la alta relación citoplasma-núcleo, el citoplasma es basofílico, sin granulación, se suelen presentar en forma circular o irregular con numerosas proyecciones citoplasmáticas, en algunas especies se pueden observar de diferentes tamaños y esto se debe a la etapa de maduración del leucocito, y en las células de mayor tamaño la cromatina nuclear de color púrpura claro.

Leucocito granular PAS-positivo (LG-PAS) o célula granulocítica especial (CGE): Es una célula sanguínea cuya función hasta el momento no ha sido identificada, tiene la capacidad de migrar al sitio de inflamatorio en procesos inducidos experimentalmente, pero no se logra identificar su función, son células grandes y el citoplasma es blanco, con granulocitos circulares neutras, que no se logran teñir con colorantes ácidos o básicos, tienen cromatina nuclear compacta.

Eosinófilos: Los eosinófilos son muy variables en cuanto a la forma, gránulos y tamaño, suelen ser pequeños o grandes dependiendo a las especies, el núcleo tiene cromatina color púrpura, es redondo u ovalado y puede ser segmentado, el citoplasma presenta una coloración hialino y contiene varias gránulos de forma cristaloides o barras redondeadas, los eosinófilos maduros presentan el citoplasma lleno de granulación, los eosinófilos jóvenes presentan pocos granulocitos en forma de bastones que mayormente se encuentran en peces como paco, gamitana y sus híbridos.

Basófilos: Son células que no se encuentran con facilidad en el torrente sanguíneo de la mayoría de los peces, se encuentran con más frecuencia en peces como el bagre perteneciente al género *Pseudoplatystoma*, son células irregulares o redondas, el núcleo presenta una coloración púrpura, y es de forma alargado o circular, el citoplasma presenta granulación basófila, así como en el caso de los eosinófilos, los basófilos presentan una cierta cantidad de granulación dependiendo al grado de maduración y se encarga del proceso de fagocitosis especialmente de la remoción de detritus celulares.

Trombocitos: Son células que intervienen en la coagulación de la sangre y en la fagocitosis, tiene forma elíptica, presenta granulación acidófila, el núcleo de color violeta, cromatina suelta en células jóvenes y compacta en células maduras.

2.2.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son sustancias volátiles que brindan aroma y diversas propiedades benéficas a las plantas y son extraídas de diferentes partes de plantas naturales como de raíces, flores, tallos y hojas, existiendo

diferentes métodos de extracción como la destilación por arrastre de vapor, la extracción con disolventes, la extracción por fluidos supercríticos y la extracción por microondas ⁽⁴²⁾.

Se clasifican por su consistencia, naturaleza química y origen, en consistencia están las esencias fluidas (volátiles), los bálsamos (espesas) y oleorresinas (viscosas o semisólidas), en la naturaleza química se clasifican de acuerdo a los componentes que tienen las plantas en mayor cantidad como en monoterpenoides (monoterpenos), sesquiterpenoides (sesquiterpenos), y fenilpropanoides (fenilpropano), por último, en su origen pueden ser naturales, sintéticas y artificiales ⁽⁴³⁾.

Los AE son extraídos de diversas plantas como el orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus algeriensis Boiss*), clavo (*Syzygium aromathicum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y cítricos como el limón (*Citrus limón*) y la naranja (*Citrus sinensis*); también del ajo (*Allium sativum*), cebolla (*Allium cepa var. cepa L.*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) ⁽⁴⁴⁾.

2.2.4 Romero (*Rosmarinus officinalis*)

Es una planta culinaria y medicinal por las propiedades que posee como ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos y alcoholes triterpénicos, tiene acción estimulante, tónica, antiespasmódico, anti gonadotrópico, diurético y presenta potente acción en principales sistemas como sistema circulatorio, sistema nervioso y corazón⁽¹⁷⁾.

El romero (*Rosmarinus officinalis*) pertenece a la familia Lamiaceae, es una planta vegetal que proviene del Sur de Europa, considerada en el Perú como hierba aromática y medicinal, cultivada entre 0 y 3500 msnm, crece en zonas arenosas y rocosas pero tienen gran adaptabilidad por lo que se puede cultivar en diversas zonas, floreciendo en primavera y otoño, y mide aproximadamente de 0.5-1 m de altura⁽⁴⁵⁾.

Se realizaron diversos estudios del romero en forma de extractos y AE a nivel farmacológico donde demostró su eficacia frente a bacterias y virus, siendo un gran antioxidante, antiinflamatorio y diurético, presenta acción a nivel celular como en la homeostasis, regulación de ácidos grasos,

crecimiento celular, mejora la oxidación microsomal en hígado e incluso la hoja de romero es un dermoprotector y por último estimula y mejora la memoria⁽¹⁷⁾.

2.2.5 Aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*)

El AE de romero es extraído de las hojas de las plantas, siendo utilizado como aditivo en el alimento para los animales, tiene función antibacteriana principalmente frente al *Staphylococcus aureus* que es una de las bacterias más sensibles, los compuestos químicos más importantes que contiene son: piperitona, alfa pineno, camfeno, linalool, 3 octanona, sabineno, entre otros, son 20 sus componentes, principalmente 11 monoterpenos oxigenados, 6 no oxigenados y 2 sesquiterpenos oxigenados con 1 no oxigenado⁽⁴³⁾.

El AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) es ampliamente utilizado por los beneficios que brinda principalmente a nivel fitofarmacéutico y en peces de cultivo se ha comprobado su capacidad antioxidante, función bactericida específicamente contra *Yersinia ruckeriy*, *Lactococcus garvieae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas veroni*, función antihelmíntica contra monogéneos branquiales en paco (*Piaractus brachypomus*) y aumento en el área de absorción de nutrientes, gracias a sus compuestos fenólicos, que son los dipertenos, ácido carnosico, carnosol, ácido rosmarinico, -pineno, acetato de bornillo, alcanfor, 1.8 cineol, entre otros ^(14,46-48).

2.2.6 Nanotecnología

La nanotecnología es un proceso tecnológico que se ha dado mayor importancia en los últimos años aplicando en productos como saborizantes, semillas, alimentos, vitaminas, productos farmacéuticos y aceites esenciales, busca proteger y mejorar la biodisponibilidad de un producto sensible, la encapsulación brinda el producto en forma de nano y micro partícula por medio de procesos fisicoquímicos y mecánicos que forman una pared homogénea o heterogénea ⁽⁴⁹⁾. El término nano equivale a 10^{-9} nm, y

nanotecnología significa ensamblar partículas pequeñas de 1-100 nm, con átomos y moléculas para producir materiales con nuevas propiedades.

Protege a los alimentos o aditivos de las altas temperaturas, daños por la luz, estabilidad, oxígeno, resiste la condición del pH del estómago y evita la interacción con lípidos impidiendo una liberación inadecuada, tiene la capacidad de penetrar la mucosa intestinal y el epitelio intestinal para llegar al torrente sanguíneo de forma eficiente y sea liberado, existiendo varios sistemas de micro/nanoencapsulación donde se utilizan materiales que contienen proteínas dentro de estos productos se encuentra el suero de leche y gelatina, lípidos como las ceras, carbohidratos como almidón, maltodextrina y derivados, por último en gomas como la goma arábica, persa y alginato de sodio⁽⁵⁰⁾.

Existen métodos para formular la encapsulación, estas se presentan como nanopartículas de lípidos sólidos, poliméricas, portadores de lípidos nanoestructurados, nano, microemulsiones y liposomas para su formulación, también se utilizan productos como la goma persa, quitosano, almidón, ciclodextrina, maltodextrina, albumina y globulina para la encapsulación⁽³⁰⁾.

2.2.7 Dieta

La dieta de los peces es muy variada incluso en su hábitat natural ellos escogen el tipo de alimentación de acuerdo a la época del año, especie, ambiente y características organolépticas, en caso de larvas y alevinos lo más recomendable es que su alimentación se base en plantas, algas, protozoarios, crustáceos, nematodos, detritus, e incluso existe el canibalismo entre ellos, por porcentaje de proteína que aporta este tipo de alimentación y mejora la digestión para su adecuado desarrollo y crecimiento⁽⁵¹⁾.

Tabla 2. Requerimientos nutricionales de paco (*Piaractus brachypomus*) de acuerdo a su etapa

Etapas de desarrollo	PC%	Lípidos%
Alevinos	35	8
Juveniles	25	5
Reproductores	30	5

Fuente: Garzon, 2019

El paco (*Piaractus brachypomus*) es un pez omnívoro de agua dulce, su alimentación en un sistema extensivo se basa en frutas y semillas que le brinda la capacidad de alimentarse de manera natural⁽⁵²⁾.

En el sistema intensivo se alimenta de dietas elaboradas y balanceadas, a base de harina de pescado, torta de soja, maíz molido, polvillo de arroz donde el porcentaje varía de 14-40% de proteína cruda⁽⁵³⁾. La dieta extrusada es un método de alimentación que se brinda a peces de diferentes etapas como: alevinos, juveniles y reproductores, este proceso gelatiniza los almidones brindándole al pez la capacidad de aprovechar la mayor cantidad de carbohidratos en la dieta y este alimento tiene la capacidad de flotar en el agua⁽⁵⁵⁾.

Los peces de agua dulce producen mayor cantidad de Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPII) del tipo omega 6, a diferencia de los peces de agua salada, pero presentan la desventaja de producir menor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados del tipo omega 3, que cumple la función de influir en la composición de los lípidos del músculo del pez, por tal razón se incluye en la dieta de peces de etapa de engorde aceites vegetales como el aceite de palma, aceite de soja y aceite de maíz que mejoran la producción de AGPII de tipo omega 3 ⁽⁵⁴⁾.

2.3 Definición de términos

Nanotecnología: Es un método tecnológico que se encarga del diseño y formación de átomos o moléculas de menor tamaño para uso industrial y farmacéutico⁽⁵⁰⁾.

Nanoencapsulado: Es la reducción de moléculas para añadir a productos específicos y proteger de diversos factores⁽⁴⁹⁾.

Biodisponibilidad: Se denomina en farmacocinética como la capacidad de un fármaco para su absorción o determine su función en el órgano determinado⁽¹⁷⁾.

Aceite esencial: Es una sustancia química que se obtiene de diferentes partes de las plantas naturales se encargan de brindar sabor, olor y son metabolitos secundarios altamente volátiles⁽⁴⁴⁾.

Hemograma: Es una técnica de laboratorio que se encarga medir el número, composición y proporciones de las células sanguíneas de los seres vivos⁽⁵⁷⁾.

Bioquímica sanguínea: Es una prueba de sangre que se encarga de medir sustancias que se encuentran en la sangre como glucosa, enzimas, proteínas, grasas y electrolitos⁽¹⁷⁾.

CAPITULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1 Tipos de estudio

El estudio de investigación fue de tipo experimental, observacional y con enfoque cuantitativo, ya que fue un estudio donde se aplicó una nueva tecnología que encapsuló el AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) y se adicionó al alimento para peces y requiere de analizar el efecto en los parámetros hematológicos de los peces.

3.2 Diseño del estudio

El diseño de estudio se desarrolló con un diseño completamente al azar DCA, que se asignó a 3 tratamientos experimentales con 3 repeticiones al mismo tiempo, cada tratamiento trabajó con dosis de 0.01 g/kg y 0.025 g/kg de alimento comercial con un grupo control (sin nanopartículas).

3.3 Población y muestra

El presente estudio se realizó en el centro de investigación Roger Beuzeville Zumaeta “El castañal”, ubicado en el km. 20 carretera interoceánica Puerto Maldonado – Cusco del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) es una institución de investigación científica y tecnológica con énfasis en la conservación y uso correcto de los recursos naturales de la región Amazónica. Ubicado a una altitud de 226m, latitud Sur 12°39'01” y latitud Norte 69°19'16”.

La población del presente estudio fue un total de 135 peces obtenidos mediante reproducción inducida y fueron mantenidos en un estanque de tierra de 100 m² hasta el desarrollo de los experimentos en el IIAP sede- Madre de Dios (Imagen 1), que luego fueron distribuidos en las unidades experimentales y la muestra consistió en un total de 90 peces.



Imagen 1. Ubicación satelital del IIAP. Fuente: Google earth, 2022

3.4 Métodos y técnicas

3.4.1. Método de inclusión de nanopartículas de aceite esencial de romero en el alimento de los peces

Las nanopartículas (NNP) cargadas de aceite esencial de romero fueron proporcionadas por la Universidad Federal de Sao Paulo (UNIFESP-Brasil). a simple vista eran de color blanco amarillento en forma de esferas irregulares con un olor característico a la planta de romero.

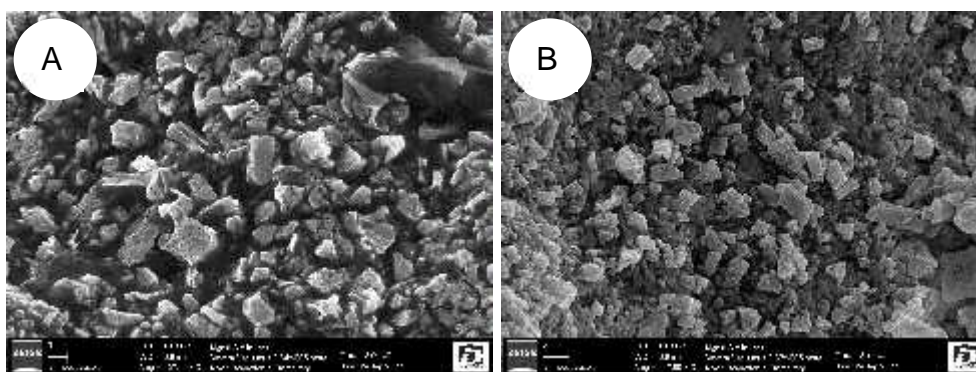


Figura 1. A) Nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero de forma irregular B) Nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero con distribución regular.

La inclusión de las nanopartículas se realizó en el alimento comercial con 40% de proteína, previamente molido hasta conseguir la textura en polvo, se adicionó la melaza al 3%, agua destilada 50% con respecto al peso del alimento comercial y con una pelletizadora manual modelo MPE60 se formaron los pellets de calibre de 0.5 x 1.0 mm, de acuerdo a la metodología que uso Yong, 2021; se realizaron dos tratamientos con concentraciones de 0.01 g/kg y 0.025 g/kg de Nanopartículas (NNP) de aceite esencial (AE) de romero y un grupo control (sin nanopartículas), los pellets fueron secados a temperatura ambiente hasta conseguir 10% de humedad y el producto final se conservó en refrigeración (4°C) hasta su uso.



Figura 2. A) Nanopartículas de aceite esencial de romero B) Dilución de melaza C) Inclusión de las NNP de AE de romero en el alimento balanceado D) Elaboración de los pellets E) Alimento elaborado con NNP de AE de romero.

3.4.2. Obtención y aclimatación de los peces muestreados

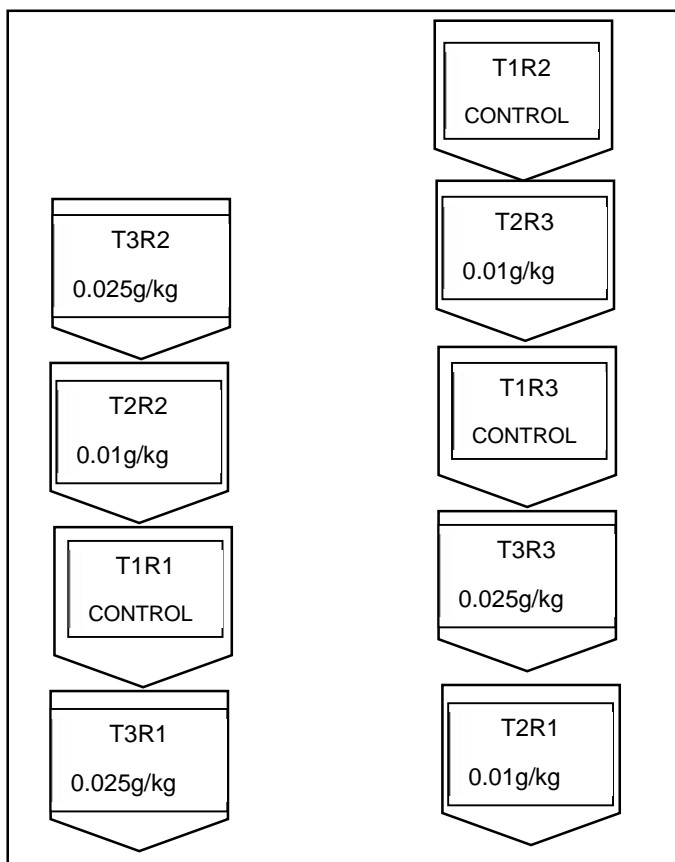
Para el desarrollo de la investigación los peces fueron obtenidos por reproducción artificial en el Laboratorio de Reproducción de Peces Amazónicos del IIAP-sede Madre de Dios. Cuando los peces llegaron a medir entre 5-7 cm de longitud en promedio fueron aclimatados por un período de siete días en un tanque de concreto revestido de mayólica de capacidad de

1000 L, con flujo de agua constante y se alimentaron con una dieta comercial al 40% de proteína bruta con frecuencia de 2 veces al día (08:00 y 04:00 horas). Diariamente se evaluaron los parámetros de calidad de agua del tanque, como: temperatura, oxígeno, pH y amonio.

3.4.3. Distribución y alimentación de los peces con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*)

Antes de la distribución los peces se pesaron con una balanza digital Modelo SF-400 con capacidad de 10000g x 1g y se midieron con un ictiómetro, e iniciaron con un peso promedio de 7.72 ± 0.032 g, longitud de 7.50 ± 0.031 cm, siendo distribuidos de manera aleatoria en nueve tanques de fibra de vidrio con capacidad de 200 L de agua, a una densidad de 15 peces por tanque con flujo de agua constante. Fueron considerados 3 tratamientos: T1 (grupo control), T2 (0.01 g/kg NNP de AE de romero) y T3 (0.025 g/kg NNP de AE de romero) por triplicado. Los peces fueron alimentados dos veces al día (9:00 y 16:00 horas) hasta aparente saciedad durante 45 días.

Tabla 3. Distribución al azar de los peces en los tanques de fibra de vidrio



Fuente: propia

Tabla 4. Composición nutricional del alimento balanceado comercial

Composición nutricional	
Proteína (min)	40.0 %
Carbohidratos	29.0%
Grasa (min)	5.0%
Fibra (max)	4.0 %
Ceniza (max)	12.0 %
Humedad	10.0 %

Fuente: AQUATECH®

3.4.4. Análisis hematológico

Después de los 45 días de alimentación, se seleccionaron 10 peces de cada repetición se pesaron, midieron y se realizó la extracción de sangre de la vena caudal usando jeringas bañadas con Acido Etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10%. La sangre extraída se colocó en tubos tipo eppendorf de 1.5 ml y fue utilizada para la cuantificación de los eritrocitos con solución formol citrato a través de la cámara de Neubauer, el hematocrito se determinó por el método del microhematocrito usando capilares y la concentración de hemoglobina por el método de la cianometahemoglobina usando solución Drabkin. Estos datos se utilizaron para calcular los índices hematimétricos como: volumen corpuscular medio. (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) como se describe en Wintrobe (1934).

Se realizaron frotis de sangre y tinción con una combinación de May Grünwald-Giemsa Wright, para el recuento diferencial de leucocitos. La identificación y el recuento de leucocitos se realizaron como se describe en Tavares-Dias et al., 1999. Los frotis de sangre también se utilizaron para determinar el número total de leucocitos y trombocitos.

3.5 Tratamiento de los datos

Todos los datos obtenidos fueron evaluados estadísticamente bajo un diseño completamente al azar DCA, que se asignó a 2 tratamientos con 3 repeticiones, y un grupo control, los resultados se expresaron en promedio y desviación estándar. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA); cuando existió diferencias significativas entre los grupos se utilizó el test de Dunnett para comparar cada tratamiento con el control usando el software estadístico "Sigma Plot 14".^[58].

3.6 Recursos

Proyecto financiado por Pro Ciencia-Concytec, mediante Contrato 073-2021.

CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACION

4.1 Crecimiento corporal de paco (*Piaractus brachypomus*) después de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (*R. officinalis*)

Durante el periodo de alimentación los peces aceptaron el alimento y no hubo mortalidad. La tabla 5. muestra la biometría realizada a los 30 y 45 días de alimentación con NNP cargadas de AE de romero al 0.01 g/kg y 0.025 g/kg. Después de 30 días de alimentación con las dos concentraciones de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) se observó diferencia significativa superior ($p < 0.05$) en peso y longitud a comparación del grupo control, pero a los 45 días de alimentación no hubo diferencia significativa en ningún tratamiento.

Tabla 5. Resultados de peso y longitud de paco (*Piaractus brachypomus*) a los 30 y 45 días de alimentación con nanopartículas (NNP) cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*).

Parámetros	Día	N	Control	T1	T2
Peso (g)	30	30	25.8±6.0 ^a	29.3±5.9 ^b	29.7±6.7 ^b
Longitud (cm)	30	30	10.2±0.7 ^a	10.6±0.6 ^b	10.6±0.7 ^b
Peso (g)	45	30	29.7±6.7 ^a	32.8±7.6 ^a	32.1±7.1 ^a
Longitud (cm)	45	30	11.1±0.7 ^a	11.2±0.8 ^a	11.2±0.7 ^a

Los datos son expresados en promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes en la misma línea indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Abreviación: N: Número de muestras, NNP: nanopartícula, Control: (0 g/kg), T1: tratamiento 1 (NNP 0.01g/kg), T2: tratamiento 2 (NNP 0.025 g/kg).

4.2 Efecto de la alimentación suplementada con NNP cargadas de AE romero (*Rosmarinus officinalis*) después de 45 días sobre las células de la serie roja de paco (*Piaractus brachypomus*)

Los resultados obtenidos de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, VCM y CHCM se muestran en la figura 3. Después de los 45 días de alimentación con NNP cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*), se puede observar que el número de eritrocitos del grupo control presentaron una diferencia significativa ($p < 0.05$) superior en comparación a los tratamientos con NNP cargadas de AE de romero al 0.01 g/kg y 0.025 g/kg (Figura 3 B). Sin embargo, el nivel de VCM mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) superior en el tratamiento con NNP cargadas de AE de romero al 0.01g/kg y 0.025 g/kg a comparación del grupo control (figura 3 D).

El nivel de hemoglobina de los peces del grupo control y los peces del tratamiento con NNP cargadas de AE de romero al 0.025 g/kg muestran valores inferiores a diferencia de los peces del tratamiento con NNP cargadas de AE de romero al 0.01 g/kg demostrando así que las NNP cargadas de AE esencial de romero no tienen un efecto sobre este parámetro (Figura 3 A), en cambio en el valor de CHCM muestra valores inferiores en el grupo control en comparación con el tratamiento de NNP cargadas de AE de romero al 0.01 y 0.025 g/kg (Figura 3 E).

El único parámetro que no mostró diferencia significativa entre el grupo control y los dos tratamientos con NNP cargadas de AE de romero, es el hematocrito como se muestra en Figura 3 C.

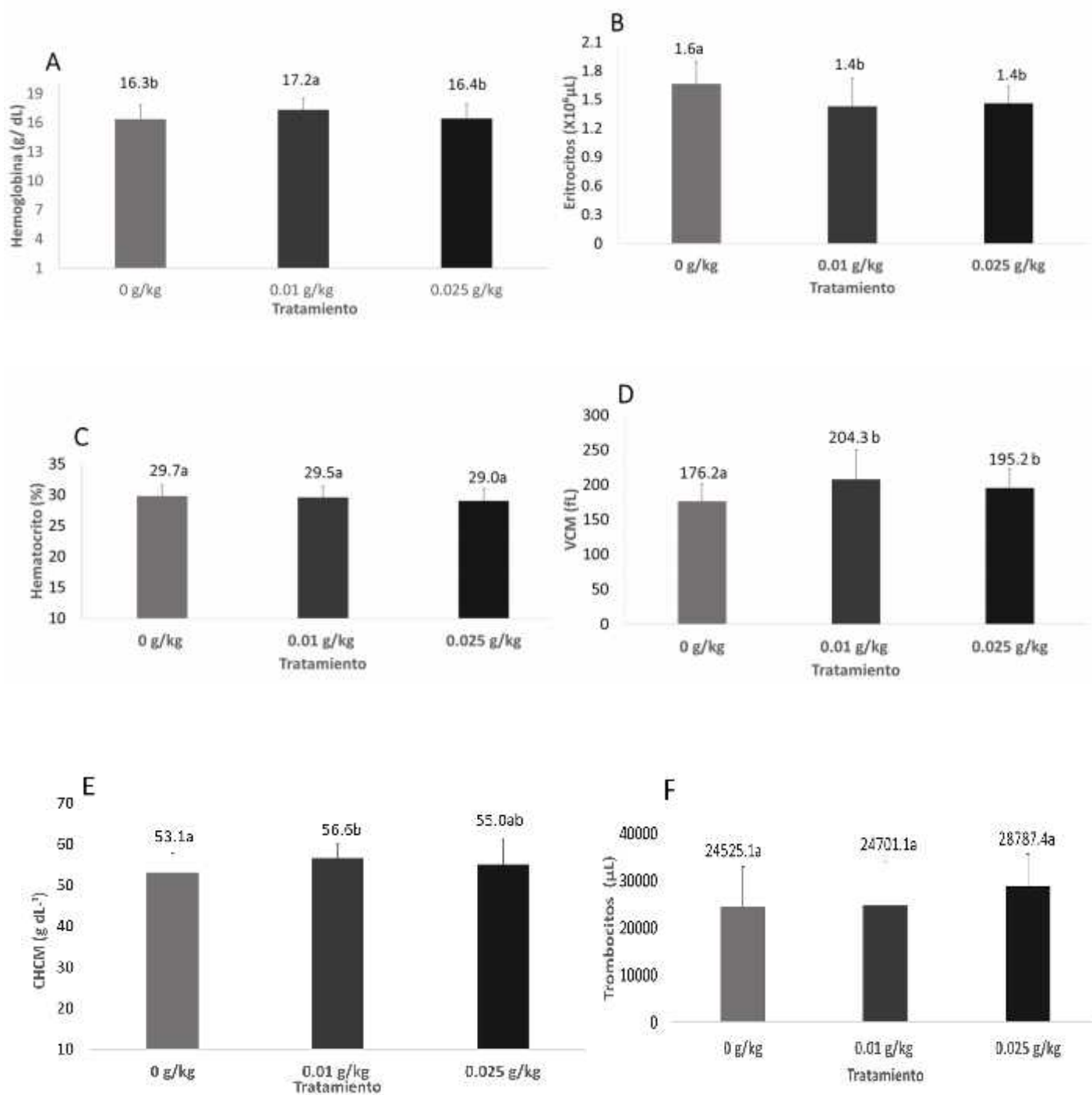


Figura 3. A) Hemoglobina B) Eritrocitos C) Hematocrito D) Volumen corpuscular medio (VCM) E) Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) F) Trombocitos en sangre de paco (*Piaractus brachypomus*)

4.3 Efecto de la alimentación suplementada con NNP cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) después de 45 días sobre las células de la serie blanca y diferenciación leucocitaria

Los resultados obtenidos de la serie blanca se muestran en la tabla 6, se observó que la cantidad de linfocitos en los peces del tratamiento con NNP cargadas de AE de romero al 0.025 g/kg mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) superior al grupo control y tratamiento con NNP de AE de romero al 0.01 g/kg. Sin embargo, los monocitos del tratamiento con NNP cargadas de AE de romero al 0.025 g/kg mostraron índices menores a comparación de los otros tratamientos.

La cantidad de neutrófilos y eosinófilos se vieron disminuidas en los tratamientos con NNP cargadas de AE de romero al 0.01 y 0.025 g/kg a comparación del grupo control, pero los leucocitos totales, trombocitos, LG PAS y basófilos no mostraron diferencia significativa entre el grupo control y los peces alimentados con NNP cargadas de AE de romero.

Tabla 6. Resultados de leucocitos de paco (*Piaractus brachypomus*) después de 45 días de alimentación con NNP de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*)

Parámetros	N	Control	T1	T2
Leucocitos tot.	30	25968 ± 9661 ^a	23915 ± 8569 ^a	27010 ± 5995 ^a
Linfocitos	30	20540 ± 6848 ^a	21907 ± 7854 ^a	25797 ± 5849 ^b
Monocitos	30	1132 ± 636 ^a	1162 ± 536 ^a	568 ± 307 ^b
Neutrófilos	30	3174 ± 2540 ^a	462 ± 335 ^b	411 ± 584 ^b
LG-PAS	30	177 ± 217 ^a	178 ± 165 ^a	189 ± 216 ^a
Eosinófilos	30	444 ± 453 ^a	95 ± 221 ^b	9.8 ± 38.9 ^b
Basófilos	30	158 ± 204 ^a	103 ± 134 ^a	28.8 ± 62.2 ^a

Los datos son expresados en promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma línea indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Abreviación: LG-PAS: leucocito granular positivo, N: Número de muestras, tot: totales, Control: (0 g/kg), T1: tratamiento 1 (NNP 0.01g/kg), T2: tratamiento 2 (NNP 0.025 g/kg). Los valores de parámetros se miden en microlitros (uL).

En la extensión sanguínea se observaron células como eritrocitos, trombocitos y leucocitos, dentro de las células leucocitarias se diferenciaron linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, LG-PAS y basófilos como se muestra en la figura 4, los neutrófilos observados estaban compuestos de un núcleo alargado excéntrico redondo y segmentados en forma de 8 o de dos lóbulos, los monocitos se observaron con vacuolas en el citoplasma, con núcleo y de pared irregular, los linfocitos se observaron de diferentes tamaños y sin granulación, en caso de los trombocitos se observaron de forma elíptica y algunos con núcleo condensado esto se debe al nivel de maduración de la célula, los eosinófilos se mostraron con núcleo irregular grande y gránulos abastados en el citoplasma, el leucocito granular positivo es una célula parecida al neutrófilo pero de mayor tamaño con gránulos finos, los basófilos se observaron en menor cantidad con gránulos pequeños de color azul-púrpura en todo el citoplasma. También se observaron células inmaduras.

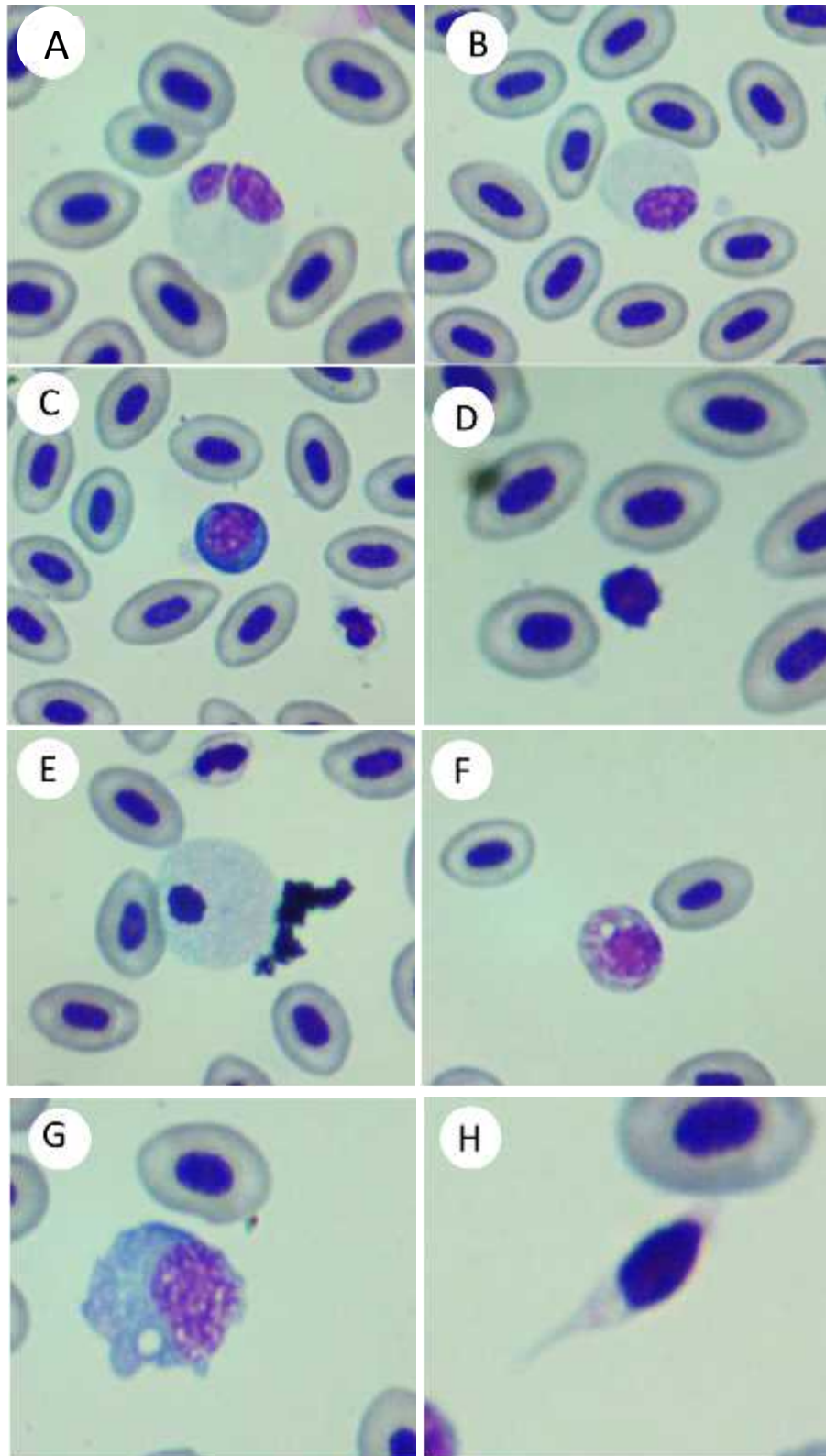


Figura 4. A) Neutrófilo bilobulado (T1) B) Neutrofilo alargado excentrico (T1) C) Basófilo (T1) D) linfocito (T2) E) Leucocito granular positivo (T2) F) Eosinófilo (T3) G) Monocito (T1) H) Trombocito (T1) en extensión sanguínea de paco (*Piaractus brachypomus*), tipo de tinción Rosenfeld, aumento de 100x.

DISCUSION

La nanotecnología es un nuevo método que se está aplicando en la acuicultura, para mejorar el aprovechamiento de AE como eugenol(2), orégano, menta negra, carvacrol, timol(3), limón(4), aplicado en peces como tilapia (*Oreochromis niloticus*) (1), gran esturión joven (*Huso Huso*) (5) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), pero existe escasa información sobre el uso de NNP con AE aplicadas en la alimentación de paco (*Piaractus brachypomus*) y cómo influye en la salud de esta especie.

Para determinar la salud de los peces es necesario conocer las células sanguíneas como los eritrocitos que son los encargados de llevar oxígeno y alimento a todo el organismo; y leucocitos que son las defensas del cuerpo, dentro de estas células se encuentran los linfocitos encargados de reconocer los antígenos, los monocitos actúan en un proceso inflamatorio, los neutrófilos contra infecciones producidas por microorganismos por medio del proceso de fagocitosis, eosinófilos actúan en defensa contra parásitos y basófilos actúan en el proceso de fagocitosis, todas las células mencionadas nos indican el estado de salud del pez⁽⁶⁾.

Los valores hematológicos de los peces varían de acuerdo a distintos factores como edad, ambiente en el que son criados, sexo, especie, manejo, aparición de enfermedades y estrés, García et al, 2007 indica que las variaciones hematológicas en peces teleósteos dependen del medio que lo rodea, por lo que los valores hematológicos son proporcionales a la actividad que realizan los peces y al tipo de alimentación.

En el estudio que realizó Ebrahimi, et al; 2020 utilizando el aceite esencial de romero en la alimentación de *Huso huso* a dosis de 0.01, 0.1, 1 y 2 % indica que los parámetros hematológicos y la inmunidad de esta especie mejoraron significativamente, pero no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de hematocrito, al igual que en nuestro estudio, la NNP de

AE de romero no tuvo influencia sobre este parámetro lo que indica que el quitosano y AE de romero no afecta de manera negativa ni positiva.

Según Jaramillo y Valdebenito, (2005), el conteo de eritrocitos en peces teleósteos varía entre 1.0 a $3.0 \times 10^6 \mu\text{L}$; en nuestro estudio los valores de eritrocitos disminuyeron linealmente en los tratamientos de peces alimentados con NNP cargadas de AE de romero, sin embargo se encuentra dentro del rango promedio, los trombocitos y leucocitos totales no mostraron diferencia significativa en ningún tratamiento y grupo control, lo que difiere con el estudio que realizó Fatma, et al; 2018 utilizando nanopartículas de quitosano (ChNP) en la dieta de *Oreochromis niloticus* a concentraciones de 1, 3 y 5 g de ChNP por kilogramo de alimento, se observó que la concentración más alta de 5g de ChNP aumentó linealmente los valores de eritrocitos, hemoglobina, trombocitos y leucocitos, la diferencia de valores hematológicos en los dos estudios probablemente se debe a la dosis de administración del quitosano que evidentemente fue más alta en el otro estudio y al tiempo de alimentación de los peces, ya que los peces alimentados con NNP cargadas de AE de romero se realizó por 45 días y los peces alimentados con quitosano fueron por 70 días lo que influenciaría en los resultados.

Según Seo, et al. 2000 y Mori, et al. 2015, el quitosano tiene la capacidad de estimular a los macrófagos a producir mediadores pre Inflamatorios y Fatma et al; 2018 indica que el quitosano en concentraciones de 3 y 5 g/kg es efectivo para eliminar bacterias aerobias y anaerobias, por otro lado el AE de romero tiene propiedades antibacterianas causada principalmente por alfa-pineno, acetato de bornilo, alcanfor y 1,8-cineol, antioxidantes e inmunoestimulantes, dentro de su composición también se encuentra el timol, es un fenol que tiene actividad lisozima específicamente sobre la IgM e IgG (7) lo que explicaría el incremento lineal y diferencia significativa de los linfocitos en el tratamiento con 0.025g/kg de NNP cargadas de AE de romero.

Este mismo comportamiento pasó con el estudio de Ebrahimi que utilizó el AE esencial de romero en la alimentación de los peces a dosis de 0.01, 0.1, 1 y 2% por kg de alimento, en los grupos con tratamiento de AE de romero el

recuento de linfocitos fue significativamente mayor a comparación del grupo control pero en el grupo con tratamiento al 2% hubo una disminución significativa de linfocitos probablemente se debe a que uno de los compuestos del AE de romero en altas dosis produzca una inhibición o sea tóxico como indicó (8) que usó extracto acuoso de romero y en altas dosis (más de 20ml/100g) afectó produciendo hepatotoxicidad y nefrotoxicidad en *Oreochromis niloticus*, e ahí la importancia del equilibrio de la cantidad de estos compuestos aplicados.

El recuento de neutrófilos y eosinófilos en los tratamientos con NNP de AE de romero presentó una disminución lineal a comparación del grupo control, tal como el estudio que realizó Ebrahimi, 2020; que obtuvo el recuento de neutrófilos y eosinófilos más bajos a comparación del grupo control, se sabe que los neutrófilos y eosinófilos actúan contra microorganismos que afectan el organismo del pez y el AE de romero tiene actividad antiparasitaria contra monogéneos que afectan a los peces tal como indicó Gonzales et al, 2022, lo que explicaría la disminución de producción de eosinófilos y neutrófilos en los tratamientos con NNP cargadas de AE de romero.

CONCLUSIONES

-) Después de la alimentación con NNP cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*), se observó que a los 30 días existió una diferencia significativa entre el tratamiento 0.01g/kg y 0.025 g/kg de NNP cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) con el grupo control, por lo que concluimos que el tratamiento con NNP de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) influye en el crecimiento de manera positiva en el paco (*Piaractus brachypomus*)
-) Los parámetros hematológicos evaluados como hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina corpuscular media y trombocitos se encuentran dentro del rango reportado, de paco (*Piaractus brachypomus*) después de la alimentación con NNP cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) la cual este tipo de alimentación no afecta las células rojas y mantiene la homeostasis.

-) Los leucocitos totales no presentaron alteración, pero la producción de linfocitos aumentó en el tratamiento con dosis más alta por lo que concluimos que la alimentación con NNP cargadas de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) mejora el sistema inmune de paco (*Piaractus brachypomus*). Las células leucocitarias se observaron con un núcleo, citoplasma y organelos sin ninguna alteración, por lo que las nanopartículas de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) no tienen efecto sobre la formación y maduración de las células sanguíneas de paco (*Piaractus brachypomus*).

SUGERENCIAS

Se sugiere evaluar las muestras de músculos para determinar la capacidad antioxidante de las NNP de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) en paco (*Piaractus brachypomus*).

La alimentación a los 30 días obtuvo un resultado positivo de crecimiento, pero a los 45 días no se obtuvo el mismo efecto, se recomienda incrementar el período de alimentación de 60 a 70 días y evaluar parámetros de crecimiento, hematología, bioquímica sanguínea, histología y actividad antiparasitario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcantara-Bocanegra F. Situacion De La Piscicultura En La Amazonia Peruana Y Estrategia Para Su Desarrollo. *Folia Amaz* 2006;3(1–2):81.
2. Tafur-Gonzales J, Alcantara-Bocanegra F, Del Águila-Pizarro M, Cubas-Guerra R, Mori-Pinedo L, Chu-Koo FW. Paco *Piaractus brachypomus* Y GAMITANA *Colossoma macropomum* Criados en policultivo con el bujurqui-tucunaré, *Chaetobranchus semifasciatus* (cichlidae). *Folia Amaz* 2009;18(1–2):97.
3. Deza- Taboada SA, Quiroz S, Rebaza-Alfaro M, Rebaza-Alfaro C. Efecto de la densidad de siembra en el crecimiento *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) “Paco” en estanques seminaturales de Pucallpa. *Folia Amaz* 2006;13(1–2):49.
4. Chaverra S, García J, Pardo S. Biofloc effect on juvenils Cachama blanca *Piaractus brachypomus* growth parameters. *Med Vet Y Zootec* 2017;12(4):170–80.
5. Cuadros RC, Rivadeneyra NLS, Malta JCO, Enrique Serrano-Martínez M, Mathews PD. Morphology and surface ultrastructure of *Dadaytrema oxycephala* (Digenea: Cladorchiidae) with a new host record from Peruvian Amazon floodplain. *Biol* 2018;73(6):569–75.
6. Tavares-Dias M, Martins ML. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J Parasit Dis* 2017;41(4):913–8.
7. Alzamora L, Morales L, Fernández G. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *An la Fac Med Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]* 2001;62:156–61.
8. Barriga I, Anai B, Prissilla P, Gonzales F, Renato A, Brasiliense P, et al. Essential oil of *Lippia grata* (Verbenaceae) is effective in the control of monogenean infections in *Colossoma macropomum* gills , a large Serrasalimidae fish from Amazon. *Aquac Res* 2020;51(March):1–9.

9. Gonzales APPF, Yoshioka ETO, Mathews PD, Mertins O, Chaves FCM, Videira MN, et al. Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. *Aquaculture* 2020;528.
10. Ezzat Abd El-Hack M, Alagawany M, Ragab Farag M, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, et al. Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *J. Essent. Oil Res.* 2016;28(5):365–82.
11. Lopes JM, Marques NC, dos Santos MD de MC, Souza CF, Baldissera MD, Carvalho RC, et al. Dietary limon *Citrus × latifolia* fruit peel essential oil improves antioxidant capacity of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles. *Aquac Res* 2020;51(12):4852–62.
12. Ribeiro SC, Castelo AS, Da Silva BMP, Cunha ADS, Proietti Júnior AA, Oba-Yoshioka ET. Respostas hematológicas de tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) alimentado com dietas suplementadas com óleo essencial de *mentha piperita* (Lamiaceae) e desafiados com *Aeromonas hydrophila*. *Acta Amaz* 2016;46(1):99–106.
13. Fernandes Patta ACM, Mathews PD, Madrid RRM, Rigoni VLS, Silva ER, Mertins O. Polyionic complexes of chitosan-N-arginine with alginate as pH responsive and mucoadhesive particles for oral drug delivery applications. *Int J Biol Macromol* 2020;148:550–64.
14. Ebrahimi E, Haghjou M, Nematollahi A, Goudarzian F. Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture* 2020;521.
15. Mathews PD, Fernandes Patta ACM, Gonçalves J V., Gama GDS, Garcia ITS, Mertins O. Targeted Drug Delivery and Treatment of Endoparasites with Biocompatible Particles of pH-Responsive Structure. *Biomacromolecules* 2018;19(2):499–510.

16. Pino JA, Aragüez Y. Conocimientos actuales acerca de la encapsulación de aceites esenciales Current knowledge about the encapsulation of essential oils. *Rev CENIC Cienc Quím* 2021;52(1).
17. Avila-sosa R, Navarro-cruz AR, Vera-lópez O, Dávila-márquez RM, Melgoza-palma N, Meza-pluma R. Romero (*Rosmarinus officinalis*): Una revisión de sus usos no culinarios. *Benemérita Univ Autónoma Puebla* 2011;52(222):23–36.
18. Sugawara E, Nikaido H. Properties of AdeABC and AdeIJK efflux systems of *Acinetobacter baumannii* compared with those of the AcrAB-TolC system of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(12):7250–7.
19. Alves CMG, Nogueira JN, Barriga IB, dos Santos JR, Santos GG, Tavares-Dias M. Albendazole, levamisole and ivermectin are effective against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalminidae). *J Fish Dis* 2019;42(3):405–12.
20. Andrade-Porto SM, Affonso EG, Kochhann D, Oliveira Malta JC, Roque R, Ono EA, et al. Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). *Aquaculture* 2017;479(February):38–44.
21. Benavides-González F, Gómez-Flores RA, Sánchez-Martínez JG, Rábago-Castro JL, Montelongo-Alfaro IO. In vitro and in vivo antiparasitic efficacy of praziquantel against monogenean *Ligictalurus floridanus* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Thai J Vet Med* 2014;44(4):533–9.
22. Carneiro PCF, Schorer M, Mikos D. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesq agropec bras, Brasília* 2005;40:99–102.
23. Christaki E, Bonos E, Giannenas I, Florou-Paneri P. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agric* 2012;2(3):228–43.
24. Maghami M, Motalebi AA, Anvar SAA. Influence of chitosan

- nanoparticles and fennel essential oils (*Foeniculum vulgare*) on the shelf life of *Huso huso* fish fillets during the storage. *Food Sci Nutr* 2019;7(9):3030–41.
25. Huamantupa I, Cuba M, Urrunaga R, Paz E, Ananya N, Callalli M, et al. Richness, use and origin of expended medicinal plants in the markets of the Cusco City. *Rev Peru Biol* 2011;18(3):283–91.
 26. Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J Ethnopharmacol* 2019;229(September 2018):29–45.
 27. Hadidi M, Pouramin S, Adinepour F, Haghani S, Jafari SM. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Carbohydr Polym* [Internet] 2020;236(November 2019):116075. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116075>
 28. Abdel-Tawwab M, Samir F, Abd El-Naby AS, Monier MN, Fernandes Patta ACM, Mathews PD, et al. Polyionic complexes of chitosan-N-arginine with alginate as pH responsive and mucoadhesive particles for oral drug delivery applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet] 2019;148(3):25–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.160>
 29. Guheytsi A, Pezhman S, Shekarabi H, Islami HR. Alimentando truchas arcoíris , *Oncorhynchus mykiss*, con aceite esencial de limón cargado en nanopartículas de quitosano: efecto sobre el rendimiento del crecimiento , parámetros hematoinmunológicos séricos y composición corporal Introducción. *Acuic Int* 2021;2:10.
 30. Prakash B, Kujur A, Yadav A, Kumar A, Singh PP, Dubey NK. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control* 2018;89:1–11.

31. Luis AIS, Campos EVR, De Oliveira JL, Guilger-Casagrande M, De Lima R, Castanha RF, et al. Zein Nanoparticles Impregnated with Eugenol and Garlic Essential Oils for Treating Fish Pathogens. *ACS Omega* 2020;5(25):15557–66.
32. Brum A, Pereira SA, Owatari MS, Chagas EC, Chaves FCM, Mouriño JLP, et al. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 2017;468:235–43.
33. Madrid RRM, Mertins O, Tavares-Dias M, Flores-Gonzales AP, C.M.F. Patta A, Ramirez CAB, et al. High compliance and effective treatment of fish endoparasitic infections with oral drug delivery nanobioparticles: Safety of intestinal tissue and blood parameters. *J Fish Dis* 2021;44(11):1819–29.
34. Cajo-Pinche MI, Díaz-Viteri JE, Vilchez-Navarro Y, Montalvan-Apolaya PS. Obtención de colágeno a partir de subproductos de Paco (*Piaractus brachypomus*). *Rev Biodivers Amaz* 2022;1(1):e148.
35. Chaverra Garcés SC, García González JJ, Pardo Carrasco SC. Efectos del biofloc sobre los parámetros de crecimiento de juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus*. *CES Med Vet y Zootec* [Internet] 2017;12(3):170–80. Available from: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/4484>
36. Mesa-granda M, Botero-aguirre M. Estudio fenotípico de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético de espina intramuscular. *Rev Col Cienc Pec* [Internet] 2007;20(1):25–30. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/2950/295023036010.pdf>
37. Deza-Taboada sa, Quiroz S, Rebaza-Alfaro M, Rebaza-Alfaro C. efecto de la densidad de siembra en el crecimiento de *Piaractus brachypomus* (cuvier, 1818) “paco” en estanques seminaturales de Pucallpa. *Folia Amaz* 2002;13(1–2):49.

38. Loqui Sánchez AJ, Tumbaco Tigrero CK, Zambrano Alarcón ME, Casignia Coox DA. Evaluación del crecimiento de “*Piaractus brachypomus*” en dos sistemas de producción complementando la alimentación con harina de soya, maíz hidropónica y su análisis sensorial. *Reciamuc* 2022;6(1):15–24.
39. Centeno L, Silvia-Acuña R, Barrios R, Salazar R, Matute C, Pérez JL. Características hematológicas de la cachama (*Colossoma*). *Delta* 2007;25(4):237–43.
40. Jakowska S. Algunos Problemas en Hematología Comparada. *Rev Biol Trop* 1959;7(2):143–55.
41. Campos Rodrigues de oliveira CA, Matos Oliveira F. Estudio morfológico de células sanguíneas de *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1817). *Pubvet* 2018;1–6.
42. Peredo-Luna H, Palou-García E, López-Malo A. Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Sel. Ing. Aliment.* 2009;3(1):8.
43. Martínez A. Aceites Esenciales. Div Publicaciones UIS [Internet] 2003;180. Available from: https://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
44. Martinez Martinez A, Cerrilla O, Esther M, Haro H, Guadalupe J, Garza K, et al. Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia* [Internet] 2015;40(11):744–50. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/339/33942541003.pdf>
45. Ponce J, Guadalupe LF, Arana C. Estudio bromatológico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” y obtención del aceite esencial. *Cienc Invest* 2015;18(1):9–13.
46. Nieto G, Ros G, Castillo J. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines* 2018;5(3):98.

47. Tural S, Durmaz Y, Urçar E, Turhan S. Antibacterial Activity of Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Laurel (*Lauris nobilis* L.), Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Parsley (*Petroselinum crispum* L.) Essential Oils against Some Fish Pathogenic Bacteria. *Acta Aquat Turc* 2019;15(4):439–46.
48. Gonzales AF, Mamani V, Pereyra M, Aguilar E, Mathews PD, Tavares-Dias M, et al. In vitro efficacy and tolerance of the essential oils of three species of the Lamiaceae family against monogeneans from the gills of *Piaractus brachypomus* from the Peruvian Amazon. *Aquac Int* 2022;(0123456789).
49. Raeisi S, Ojagh SM, Quek SY, Pourashouri P, Salaün F. Nano-encapsulation of fish oil and garlic essential oil by a novel composition of wall material: Persian gum-chitosan. *LWT* 2019;116.
50. Delshadi R, Bahrami A, Tafti AG, Barba FJ, Williams LL. Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. *Trends Food Sci. Technol.* 2020;104:72–83.
51. Velasco Garzón JS, Gutiérrez Espinosa MC. Aspectos nutricionales de peces ornamentales de agua dulce. *Rev Politécnica* 2019;15(30):82–93.
52. Mesa-Granda MN, Botero-Aguirre MC. La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. 2007.
53. Coelho-Emerenciano MG, Massamitu-Furuya W. Ensilado de maíz en dietas para postlarva de camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*. *Investig Mar* 2006;34(2):57–61.
54. Vásquez Quispesivana W, Porturas Olaechea R, Crispín Sánchez F. Effect of the inclusion of different lipid sources in the diet on the polyunsaturated fatty acids profile in *Piaractus brachypomus* Fillet.
55. Deza-Taboada SA, Quiroz S, Rebaza-Alfaro M, Rebaza-Alfaro C. Efecto de la densidad de siembra en el crecimiento de *Piaractus brachypomus*

- (Cuvier, 1818) "Paco" en estanques seminaturales de Pucallpa. *Folia Amaz* 2002;13(1-2):49.
56. Bonilla DM, Mendoza Y, Moncada CE, Murcia O, Calle J, Nerio L. *officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* cultivada in vitro Resumen
Effect of essential oil of *Rosmarinus officinalis* on *Porphyromonas*
Introducción. *Rev Colomb Cienc Quím* 2016;45(2):275-87.
57. Hematológicas C, Paco DEL, Teobaldo L, Vera G. Promoción 2009-1
Tingo María- Perú. 2010;
58. Jorge Dagnino S. Análisis de varianza. *Rev Chil Anest* 2014;43(4):306-10.

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de operacionalización de las variables

DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ITEMS
Variable Independiente Nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Medida expresada en gramos de Nanopartículas para incluir en el alimento	D1 0.01	Gramo/Kilogramo	g/kg
		D2 0.025	Gramo/Kilogramo	g/kg
Variable Dependiente Parámetros hematológicos de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>)	Biometría del peso corporal, medición y conteo de células de la serie roja y serie blanca mediante diferentes métodos.	D1 Peso	Gramos	g
		D2 Longitud	Centímetros	Cm
		D3 Hematocrito	Porcentaje	%
		D4 Hemoglobina	Gramos/ decilitros	g/dL
		D5 Eritrocitos	RBC/microlitros	$\times 10^6/\mu\text{L}$
		D6 Volumen corpuscular medio	Fentolitros	fL
		D7 Concentración de hemoglobina corpuscular media	Gramos/ decilitros	g/dL
		D8 Trombocitos	Microlitros	μL
		D9 Leucocitos Totales	Microlitros	μL
		D10 Monocitos, Neutrófilos, Eosinófilos, Linfocitos, Basófilos, Leucocito granular positivo	Microlitros	μL

Anexo 2: Matriz de consistencia

TITULO: Efecto de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) sobre los parámetros hematológicos de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) en Madre de Dios NOMBRE DEL TESISISTA: Marian Antonia Paredes Salas				
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES INDICADORES	METODOLOGIA
<p>General A pesar de haber muchos estudios usando AE como suplementos en peces y otros mamíferos, no se han realizado ensayos acerca de los efectos beneficios de las nanopartículas cargadas de AE de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) y su influencia sobre los parámetros hematológicos en peces amazónicos como el paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) en Madre de Dios.</p>	<p>General Evaluar el efecto de la alimentación suplementada con NNP cargadas de AE de romero sobre los parámetros hematológicos de paco Específicos Evaluar el crecimiento corporal de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) después de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>). Analizar las células de la serie roja de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) después de la alimentación suplementada con nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>). Evaluar el efecto de las nanopartículas de aceite esencial de</p>	<p>General Las NNP cargadas de AE de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) mejora los parámetros hematológicos del paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) en MDD Justificación La nanotecnología es un nuevo método que envuelve el núcleo mediante una barrera celular para evitar reacciones físicas y químicas, manteniendo así sus funciones biológicas y fisicoquímicas intactas, se está poniendo en práctica en la aplicación de AE obteniendo grandes beneficios, como optimizar el aprovechamiento del producto, evitar la contaminación, degradación</p>	<p>Variable Independiente Nanopartículas cargadas de aceite esencial de romero Dimensiones 0.01g/kg 0.025g/kg Indicadores g/kg Variable Dependiente Medición corporal Peso Longitud Serie roja: Hematocrito Hemoglobina Eritrocitos VCM CHCM Leucocitos totales Trombocitos Serie blanca: Monocitos, Neutrófilos, Eosinófilos, Linfocitos, Basófilos, Leucocito granular Dimensiones g cm % g/dL RBC/μL fL g/dL $X10^6/\mu$L % WBC/μL μL</p>	<p>Enfoque Cuantitativo Diseño Experimental Nivel Básico Tipo Aplicada Métodos <ul style="list-style-type: none">) Microhematocrito) Cianometahemoglobina) Frotis sanguíneo para el recuento de leucocitos Técnicas Instrumentales de muestreo Protocolos Fichas bibliográficas De recolección de datos Ficha de registros De procesamiento de datos Microsoft Excel De análisis ANOVA Población 135 pacos (<i>Piaractus brachypomus</i>) Muestra 90 pacos (<i>Piaractus brachypomus</i>) Procedimiento <ul style="list-style-type: none">) Obtención y aclimatación de los peces.) Inclusión de las nanopartículas del aceite esencial de romero en el alimento de los peces. Distribución y alimentación de los peces en las unidades experimentales </p>

	<p>romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) sobre las células de la serie blanca y diferenciación leucocitaria en la sangre de paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) en Madre de Dios</p>	<p>del AE oxidación, disminuir la contaminación del ambiente en el que desarrollan los peces, liberación controlada del AE, mejora el consumo, aprovechamiento y biodisponibilidad, obteniendo resultados beneficiosos en la salud de los peces mejorando la calidad de vida.</p>	<p>Indicadores Porcentaje Gramos/decilitros RBC/ microlitros Fentolitros Gramos/decilitros Porcentaje WBC/microlitros Microlitros Gramos Centímetros</p>	<p>) Análisis hematológicos</p>
--	---	---	---	---------------------------------

**FICHA N^o 1: REGISTRO BIOMÉTRICO (PESO Y LONGITUD) DE JUVENILES DE
PACO**

Fecha: 02/01/2023

tratamiento: T2

repetición: R1

Número de peces	Peso (g)	Longitud total (cm)
1	33	11
2	18	9.2
3	24	10.5
4	34	11.1
5	32	11
6	29	10.9
7	35	11.2
8	27	10.5
9	24	10
10	25	10
11	34	11.2
12	27	10.5
13	25	10
14	24	9.9
15	27	10.4
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		

Observaciones:

.....

.....

FICHA Nº2: REGISTRO DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA EN LOS TANQUES

FECHA: 23/12/2022								
TURNO	MAÑANA			TARDE			1 vez por semana	1 vez por semana
TRATAMIENTO	Oxígeno Disuelto (ppm)	pH	Temperatura (C°)	Oxígeno Disuelto (ppm)	pH	Temperatura (C°)	Amonio	Nitrito
T1R1	5.59	6.49	26.69	4.58	6.46	27.34		
T1R2	5.92	6.25	26.58	6.00	6.65	27.31		
T1R3	6.49	6.56	26.68	5.99	6.64	27.34	2.00	0.05
T2R1	5.99	6.51	26.71	6.10	6.55	27.30		
T2R2	5.71	6.43	26.69	5.87	6.38	27.28		
T2R3	5.55	6.42	26.71	5.43	6.56	27.41	2.00	0.05
T3R1	6.47	6.62	26.76	5.35	6.66	27.44		
T3R2	6.15	6.52	26.71	6.49	6.41	27.35		
T3R3	5.91	6.51	26.68	5.97	6.57	27.25	1.50	0.05
FECHA: 06/01/2023								
TURNO	MAÑANA			TARDE			1 vez por semana	1 vez por semana
TRATAMIENTO	Oxígeno Disuelto (ppm)	pH	Temperatura (C°)	Oxígeno Disuelto (ppm)	pH	Temperatura (C°)	Amonio	Nitrito
T1R1	5.60	6.41	22.55	6.10	6.17	24.35		
T1R2	6.00	6.48	23.55	5.90	6.33	24.60		
T1R3	6.20	6.42	23.69	6.10	6.39	24.55		
T2R1	7.01	6.48	22.71	6.00	6.35	24.23		
T2R2	5.78	6.23	23.53	5.97	6.16	24.50		
T2R3	5.94	6.24	23.68	5.55	6.20	24.60		
T3R1	7.00	6.67	22.41	5.98	6.34	24.39		
T3R2	6.00	6.22	23.68	6.00	6.12	24.52		
T3R3	7.00	6.25	23.73	7.00	6.26	24.45		

FICHA Nº4: FICHA DE ANALISIS DE HEMOGLOBINA

EXPERIMENTO

TRATAMIENTO

REPETICION

NANOPARTICULAS

T1

R1

Número de pez	M1	M2	M3	PROM	Hb
1				0.63	
2				0.48	
3				0.56	
4				0.55	
5				0.63	
6				0.61	
7				0.64	
8				0.66	
9				0.62	
10				0.65	

RESPONSABLE DEL MUESTREO

MARIAN

FECHA DEL MUESTREO

16/01/2023

FICHA Nº5: FICHA DE ANALISIS DE CONTEO DE ERITROCITOS

EXPERIMENTO

TRATAMIENTO

REPETICION

NANOPARTICULAS

T3

R3

Número de pez	C1	C2	C3	C4	C5	PROM
1	31	37	25	29	23	29
2	36	32	32	30	39	33.8
3	25	30	37	23	30	29
4	31	36	30	34	25	31.2
5	33	22	35	34	28	30.4
6	27	36	33	28	30	30.8
7	32	33	25	27	23	28
8	29	22	27	34	28	28
9	20	35	36	33	33	31.4
10	24	27	27	19	32	25.8

RESPONSABLE DEL MUESTREO

MARIAN

FECHA DEL MUESTREO

16/01/2023

FICHA N°6: FICHA DE ANALISIS DE HEMATOCRITO

EXPERIMENTO

TRATAMIENTO

REPETICION

NANOPARTICULAS

T1

R2

Número de pez	M1	M2	PROM
1	31	30	30.5
2	33	34	33.5
3	32	32	32
4	31	31	31
5	31	32	31.5
6	30	29	29.5
7	30	29	29.5
8	32	33	32.5
9	30	30	30
10	33	33	33

RESPONSABLE DEL MUESTREO

MARIAN

FECHA DEL MUESTREO

16/01/2023

