



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

Facultad de
Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y
Acuicultura

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MACROALGAS
ANTÁRTICAS (*Himantothallus grandifolius* y *Desmarestia
confervoides*) FRENTE A CEPAS DE *Yersinia ruckeri*, AISLADAS DE
TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)**

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor

AUTOR (A)

Benites Guardia, Carmen Rosario

ASESOR (A)

Figueroa Vargas Machuca, Manuel Eduardo

JURADO

Zambrano Cabanillas, Abel Walter

Mogollón Ávila, Santos Valentín

Moreno Garro, Víctor

Lima – Perú

2020

DEDICATORIA

Es mi anhelo como modesto gesto de agradecimiento, dedicarle este trabajo de investigación a mis padres, Robert y Rosa, a quienes debo sacrificio, amor y dedicación. A mis hermanos, por formar parte de mi vida y hacerla caóticamente hermosa. Dedico y dedicaré cada logro alcanzado a ustedes por cada pequeña lección recibida que me han ayudado a cumplir mis objetivos.

A mi *alma mater*, la Universidad Nacional Federico Villarreal, por ser la institución que me abrió las puertas y ser la impulsora de muchos grandes profesionales.

AGRADECIMIENTOS

Al M.V. Pablo Londoño Bailon y a la Ing. Claudia Cecilia Sánchez Robinet, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta investigación, quienes con sus conocimientos, enseñanzas y colaboración permitieron el desarrollo de este trabajo. Gracias a ellos por su dedicación y orientación, por cada consejo brindado que me permitió desarrollarme no solo académicamente, sino también como persona.

Al Ing. Manuel Figueroa y a mis maestros de la Universidad por haber compartido conmigo sus conocimientos. Gracias a aquellos maestros que me ayudaron a crecer personalmente y gracias a sus enseñanzas hoy puedo sentirme orgullosa de mi casa de estudios.

Al Instituto Tecnológico de la Producción; a la Dra. Susana Sirvas, responsable del Laboratorio de Biotecnología. Un agradecimiento especial a todo el equipo del laboratorio de Biotecnología y de Fisicoquímica. Gracias a todo el equipo en general de las diferentes áreas del ITP.

A la Dra. Nieves Sandoval Chaupe, Responsable de la Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por facilitar una cepa de *Yersinia ruckeri* para el desarrollo de la presente investigación.

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto de investigación “Actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria y anti-quorum sensing de macroalgas y líquenes provenientes de la Estación Machu Picchu (Isla Rey Jorge - Antártida) en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos” realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) y la Dirección de Asuntos Antárticos del Ministerio de Relaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
I. INTRODUCCIÓN	16
1.1. Descripción y formulación del problema.....	17
1.2. Antecedentes.....	21
1.3. Objetivos	25
1.3.1. Objetivo General.....	25
1.3.2. Objetivos específicos	25
1.4. Justificación e importancia.....	25
1.5. Hipótesis.....	28
1.5.1. Hipótesis nula	28
1.5.2. Hipótesis alternante.....	28
II. MARCO TEÓRICO	29
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	29

2.1.1. Las algas	29
2.1.1.1. Características.....	29
Nutrición.....	29
Reproducción	29
Estructura general.....	30
2.1.1.2. Clasificación.....	30
2.1.1.2.1. Algas pardas (Phaeophyta).....	31
2.1.1.3. Compuestos bioactivos en algas	37
2.1.1.3.1. Metabolitos secundarios en algas	37
2.1.2. Análisis Fitoquímico	42
2.1.3. Extracción.....	42
2.1.3.1. Técnicas de extracción.....	43
2.1.3.1.1. Extracciones convencionales con disolventes	44
2.1.3.1.2. Extracción asistida por ultrasonido.....	47
2.1.4. Trucha arco iris	47
2.1.4.1. Clasificación Taxonómica.....	48
2.1.4.2. Características generales	48
2.1.4.3. Cultivo de truchas en el Perú.....	48
2.1.4.4. Enfermedades más comunes en el cultivo de truchas.....	50
Enfermedad Entérica de la Boca Roja.....	52
2.1.5. <i>Yersinia ruckeri</i>	53
2.1.5.1. Transmisión	54
2.1.5.2. Prevención y control	55
III. MÉTODO.....	57

3.1.	Tipo de investigación	57
3.2.	Ámbito temporal y espacial.....	57
3.3.	Variables	57
3.4.	Muestra.....	57
3.5.	Instrumentos	58
3.5.1.	Materiales	58
3.5.2.	Equipos.....	59
3.5.3.	Medios de cultivo	60
3.5.4.	Reactivos	60
3.6.	Procedimientos	61
3.6.1.	Recolección y pre-tratamiento de muestras algales.....	61
3.6.2.	Tratamiento primario de muestra algales.....	62
3.6.3.	Análisis fitoquímico preliminar.....	62
3.6.4.	Obtención de extractos naturales	63
3.6.5.	Solubilización de extractos.....	66
3.6.6.	Material biológico.....	66
3.6.6.1.	Características morfológicas de <i>Y. ruckeri</i>	66
3.6.6.2.	Producción de cepas de trabajo.....	67
3.6.6.3.	Identificación del biotipo de las cepas de <i>Y. ruckeri</i>	67
3.6.6.4.	Evaluación de sensibilidad a antibióticos.....	67
3.6.7.	Evaluación antibacteriana	69
3.6.7.1.	Preparación de inóculo bacteriano	69
3.6.7.2.	Microdilución en caldo.....	69
3.7.	Análisis de datos.....	70

IV. RESULTADOS	71
4.1. Análisis fitoquímico preliminar	71
4.2. Obtención de extractos naturales	72
4.3. Solubilización de extractos.....	75
4.4. Obtención y preservación de muestras bacterianas	77
4.4.1. Características culturales de cepas de <i>Y. ruckeri</i> , (N1).....	77
4.4.2. Características culturales de cepas de <i>Y. ruckeri</i> , (R3).....	77
4.4.3. Identificación del biotipo de las cepas de <i>Y. ruckeri</i>	78
4.4.4. Evaluación de sensibilidad a antibióticos	79
4.4.5. Evaluación antibacteriana	80
V. DISCUSIÓN	85
VI. CONCLUSIONES	89
VII. RECOMENDACIONES	90
VIII. REFERENCIAS.....	91
IX. ANEXOS	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1.	
<i>Diferenciación de grupos taxonómicos (Basado en Van den Hoeck et al., 1995)</i>	31
Tabla 2.	
<i>Clasificación taxonómica de H. grandifolius</i>	32
Tabla 3.	
<i>Clasificación taxonómica de D. confervoides</i>	35
Tabla 4.	
<i>Técnicas de extracción de algas</i>	43
Tabla 5.	
<i>Clasificación taxonómica de la trucha arco iris</i>	48
Tabla 6.	
<i>Enfermedades más comunes en trucha arco iris</i>	51
Tabla 7.	
<i>Clasificación Taxonómica de la Y. ruckeri</i>	53
Tabla 8.	
<i>Reportes de Yersinia ruckeri en el Perú</i>	56
Tabla 9.	
<i>Condiciones de trabajo en el proceso de extracción con diclorometano para ambas matrices</i>	64
Tabla 10.	
<i>Condiciones de trabajo en el proceso de extracción con acetona para ambas matrices</i>	65
Tabla11.	
<i>Condiciones de trabajo en el proceso de extracción con metanol para ambas matrices.</i>	65
Tabla 12.	
<i>Resumen de las extracciones secuenciales para ambas macroalgas</i>	65
Tabla13.	
<i>Metabolitos secundarios presentes en H. grandifolius (H) y D. confervoides (D)</i>	71
Tabla14.	
<i>Extractos y precipitados obtenidos.</i>	72

Tabla15.	
<i>Rendimiento de extracción con los tres solventes utilizados para H. grandifolius.....</i>	72
Tabla16.	
<i>Rendimiento de extracción con los tres solventes utilizados para D. confervoides</i>	74
Tabla17.	
<i>Solubilidad de extractos.</i>	75
Tabla 18.	
<i>Concentración de los extractos solubilizados para evaluación antibacteriana.</i>	76
Tabla 19.	
<i>Inhibición de los discos de antibióticos contra las cepas evaluadas</i>	79
Tabla 20.	
<i>Parámetros de lectura de halos de inhibición y su interpretación.....</i>	80
Tabla 21.	
<i>Resultado de los ensayos de la actividad antibacteriana de los extractos crudos obtenidos de las macroalgas</i>	81
Tabla 22.	
<i>Resultados de los ensayos de la actividad antibacteriana de los extractos crudos metanólicos.....</i>	82
Tabla 23.	
<i>Resultados del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos frente a Y. ruckeri (Biotipo 2).....</i>	82
Tabla 24.	
<i>Resultados del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos frente a Y. ruckeri (Biotipo 1).....</i>	83
Tabla 25.	
<i>Solventes utilizados en la prueba de solubilidad del extracto acetónico de H. grandifolius.....</i>	112

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> De izquierda a derecha: Algas rojas (Rhodophytas); Algas verdes (Chlorophytas) y Algas pardas (Phaeophytas).	31
<i>Figura 2.</i> Morfología de las Phaeophytas.	32
<i>Figura 3.</i> Morfología de <i>H. grandifolius</i>	33
<i>Figura 4.</i> Talo muy joven, de unos mm de largo, con crecimiento tricotálico.	34
<i>Figura 5.</i> Crecimiento de tipo tricotálico, visible en etapas jóvenes.	34
<i>Figura 6.</i> Crecimiento de tipo tricotálico	36
<i>Figura 7.</i> Morfología de <i>Desmarestia confervoides</i>	36
<i>Figura 8.</i> Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa.	38
<i>Figura 9.</i> Estructuras químicas de terpenoides	39
<i>Figura 10.</i> Estructura química del fenol	40
<i>Figura 11.</i> Estructuras químicas algunos alcaloides (compuestos nitrogenados)	40
<i>Figura 12.</i> Esquema idealizado de una operación de extracción líquido-líquido.	44
<i>Figura 13.</i> Esquema de la extracción; antes de la extracción (izquierda) y después de la extracción (derecha).	45
<i>Figura 14.</i> Dispositivo de extracción Soxhlet	46
<i>Figura 15.</i> Equipos experimentales utilizados para la extracción por ultrasonido.	47
<i>Figura 16.</i> Crecimiento de la producción de trucha en el Perú.	49
<i>Figura 17.</i> Producción de trucha en el Perú (mayor a 500 toneladas por año)	49
<i>Figura 18.</i> Producción de trucha en el Perú (menor a 500 toneladas/año)	50
<i>Figura 19.</i> Signos externos. Oscurecimiento de la piel (a); boca roja (b); distensión abdominal (c); secreciones (d); exoftalmia (e).	53

<i>Figura 20.</i> Prueba de tinción de Gram para <i>Y. ruckeri</i> . Visto bajo Microscopio.	54
<i>Figura 21.</i> Recolección de muestras de macroalgas.....	61
<i>Figura 23.</i> <i>D. confervoides</i>	62
<i>Figura 22.</i> <i>H. grandifolius</i>	62
<i>Figura 24.</i> Proceso de obtención de extractos.....	63
<i>Figura 26.</i> Concentración de la muestra en rotaevaporador	64
<i>Figura 25.</i> Proceso de filtración del extracto en solución.	64
<i>Figura 27.</i> Caracterización cultural de cepas bacterianas.....	67
<i>Figura 28.</i> Diagrama de la evaluación de sensibilidad antibiótica.....	68
<i>Figura 30.</i> Siembra por extensión.	70
<i>Figura 29.</i> Evaluación antibacteriana	70
<i>Figura 31.</i> Extractos metanólicos de <i>H. grandifolius</i> . MH1 (a), MH2 (b) y MH3 (c) ...	73
<i>Figura 32.</i> Extractos metanólicos de <i>D. confervoides</i> . MD1 y MD2.....	74
<i>Figura 33.</i> Extractos solubles en DMSO. DH (a), DD (b) y AD (c).....	75
<i>Figura 34.</i> Extractos solubles en agua. MH1(a), MH2(b), MH3(c), MD1(d) y MD2(e) 76	
<i>Figura 35.</i> <i>Y. ruckeri</i> en TSA, cultivo de 48 h.....	77
<i>Figura 36.</i> <i>Y. ruckeri</i> en TSA, cultivo de 48 h.....	77
<i>Figura 37.</i> R3 en TSA, cultivo de 48 h.....	77
<i>Figura 38.</i> R3 en TSA, cultivo de 48 h.....	77
<i>Figura 39.</i> Prueba de biotipo para la cepa N1.....	78
<i>Figura 40.</i> Prueba de biotipo para la cepa R3.	78
<i>Figura 41.</i> Halos de inhibición.....	79
<i>Figura 43.</i> Microdilución en placa	80
<i>Figura 42.</i> Siembra por extensión	80
<i>Figura 44.</i> Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	81

Figura 45. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos con la cepa N1 (Biotipo 2), *Y. ruckeri*. 83

Figura 46. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos con la cepa R3 (Biotipo 1), *Y. ruckeri*. 84

Figura 47. Pruebas de solubilidad para el extracto acetónico de *H. grandifolius* con diferentes solventes. 111

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana de extractos crudos obtenidos a partir de las macroalgas antárticas *Himantothallus grandifolius* y *Desmarestia confervoides*, frente a cepas de *Yersinia ruckeri*. Se realizó un análisis fitoquímico preliminar de ambas macroalgas para determinar la presencia de metabolitos secundarios asociados a la actividad antibacteriana. Posteriormente se realizaron extracciones sucesivas biodirigidas mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonido y agitación en shaker utilizando tres solventes orgánicos (diclorometano, acetona y metanol) a razón de 1:3 masa/volumen. Cada extracto se evaluó frente a dos cepas bacterianas de *Y. ruckeri*, de distinto biotipo (1 y 2) mediante el método de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bactericida (CMB) y el porcentaje de inhibición. Se obtuvieron 9 extractos, de los cuales, los diclorometánicos (2) y acetónicos (2) no presentan actividad antibacteriana frente a las cepas de *Y. ruckeri* a diferencia de los extractos metanólicos (5) que sí demostraron actividad antibacteriana. Los extractos metanólicos de *H. grandifolius* presentaron mayor actividad antibacteriana, HG1 y HG3 (CMI = 48 mg/ml – 93,8% de inhibición, CMB = 96 mg/ml) en contraste de los extractos metanólicos de *D. confervoides* (MIC = 96mg/ml – 98% de inhibición). De tal forma que, se concluye que los extractos metanólicos de las dos macroalgas evaluadas si presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *Y. ruckeri*, lo cual estaría asociado a la presencia de metabolitos secundarios, tales como: Flavonoides, Taninos, Fenoles y/o lactonas.

Palabras clave: Extracto crudo, *Himantothallus grandifolius*, *Desmarestia confervoides*, Antártida, actividad antibacteriana, *Yersinia ruckeri*.

ABSTRACT

In the present study, the antibacterial activity of crude extracts obtained from the Antarctic macroalgae *Himantothallus grandifolius* and *Desmarestia confervoides*, against strains of *Yersinia ruckeri* was evaluated. A preliminary phytochemical analysis of both macroalgae was performed to determine the presence of secondary metabolites associated with antibacterial activity. Subsequently, successive biodirected extractions were performed using the technique of ultrasonic assisted extraction and shaking using three organic solvents (dichloromethane, acetone and methanol) at a ratio of 1: 3 mass/volume. Each crude extract was evaluated against two bacterial strains of *Y. ruckeri*, of different biotype (1 and 2) by the broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (CMB) and the percentage of inhibition. Nine crude extracts were obtained, dichloromethane (2) and acetic (2) do not show antibacterial activity against *Y. ruckeri* strains, unlike methanolic extracts (5) that did demonstrate antibacterial activity. The methanolic extracts of *H. grandifolius* had higher antibacterial activity, HG1 and HG3 (MIC = 48 mg/ml – 93,8% inhibition, CMB = 96 mg/ml) in contrast to the methanolic extracts of *D. confervoides* (MIC = 96 mg/ml - 98% inhibition). Thus, it is concluded that the methanolic extracts of the two macroalgae evaluated present antibacterial activity against *Y. ruckeri* strains, which would be associated with the presence of secondary metabolites, such as: Flavonoids, Tannins, Phenols and/or Lactones.

Keywords: Crude extract, *Himantothallus grandifolius*, *Desmarestia confervoides*, Antarctica, antibacterial activity, *Yersinia ruckeri*.

I. INTRODUCCIÓN

La actividad acuícola en el Perú se distribuye a lo largo del territorio nacional, siendo diversas las especies que se producen: langostinos (*Litopenaeus* spp), concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) trucha (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia (*Oreochromis* spp) y algunos peces amazónicos. Según el Ministerio de Producción (PRODUCE, 2018), el cultivo de trucha arco iris (54,6 % de la producción total) presenta una mayor producción a nivel nacional, sin embargo, también es uno de los sectores que mayores problemas ha presentado debido a la presencia de enfermedades bacterianas como es el caso de la enfermedad entérica de la boca roja (ERM, por sus siglas en inglés).

Esta enfermedad ocasiona una infección sistémica de curso agudo a crónico que afecta a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) prácticamente en todas las etapas de su cultivo (Tobback et al., 2007), y cuyo agente etiológico es la bacteria *Yersinia ruckeri*, (Austin y Austin, 2007).

Dentro de los métodos que se emplean para controlar esta enfermedad, se incluyen el uso de antibióticos, los que, según su naturaleza, pueden eliminarse rápidamente o permanecer activos por tiempos prolongados (Barattini, 2012). Estos fármacos principalmente son suministrados a través de alimentos medicados y su uso indiscriminado o excesivo, ha originado el desarrollo de resistencia por parte de las comunidades bacterianas, lo que genera que las bacterias sean cada vez más difíciles de tratar, requiriendo antibióticos en mayor cantidad o más potentes.

Por otro lado, no es posible cuantificar o vigilar la cantidad ingerida de antibióticos consumidos como residuos en los alimentos de origen animal, lo que puede causar problemas directos para la salud pública, tales como la anemia aplásica, que está asociada con el cloranfenicol (FAO, 2019). Del mismo modo,

también se genera una alteración de la flora intestinal y como consecuencia una disminución de bacterias que compiten con microorganismos patógenos, aumentando así el riesgo de enfermedad (Doyle, 2006). Lozano y Arias (2008) mencionan que los residuos de antibióticos (penicilina, sulfonamidas y estreptomicina) en alimentos pueden desencadenar reacciones alérgicas, causar hipersensibilidad. Se han presentado casos de personas sensibles a la penicilina con reacciones alérgicas debido al consumo de leche o carne contaminada (Doyle, 2006). En tal sentido, según lo expuesto anteriormente, se plantea realizar una búsqueda de alternativas más saludables como remplazo a los antibióticos sintéticos.

1.1. Descripción y formulación del problema

En la actualidad la presencia de patógenos causantes de enfermedades bacterianas es uno de los problemas con mayor importancia en el sector acuícola. Blanco et al., (2004) señalan que las enfermedades infecciosas son la principal causa de pérdidas económicas en acuicultura debido a la mortalidad de los animales, los costos de los tratamientos y el descenso de la producción. La Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense (España, 2004) indica que las pérdidas económicas causada por la mortalidad de los peces debido a enfermedades infecciosas se estiman en un 10 % y que, en algunos casos, estas enfermedades pueden causar pérdidas superiores al 90 %. La Enfermedad Entérica de la Boca Roja (ERM) es una importante infección que afecta principalmente a salmónidos, ocasionando una infección sistémica de curso agudo a crónico que afecta a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) prácticamente en todas las etapas de su cultivo (Tobback et al., 2007), cuyo agente etiológico es la bacteria *Yersinia ruckeri*, (Austin y Austin, 2007).

Los métodos que se emplean para controlar esta bacteria, además de otros agentes patógenos, en los sistemas de producción acuícola incluyen el uso de antibióticos, los que, según su naturaleza, pueden eliminarse rápidamente o permanecer activos por

tiempos prolongados (Barattini, 2012). Estos fármacos principalmente son suministrados a través de alimentos medicados y su uso indiscriminado o excesivo, ha originado el desarrollo de resistencia por parte de las comunidades bacterianas. El número de los medicamentos empleados en el sector acuícola a nivel mundial es reducido (304 medicamentos autorizados para acuicultura) y más de la mitad corresponden a vacunas (51 %), seguido de los antibióticos que ocupan el segundo puesto (29 %). Por otro lado, la trucha arco iris es la principal especie producida en la acuicultura continental a nivel mundial (99 %) y es la segunda especie a la que se destinan más medicamentos en la acuicultura (20 %) (AQUA, 2019).

Muchas enfermedades bacterianas graves, tales como la ERM, se están volviendo más difíciles de tratar, debido a la constante exposición de antibióticos frente a comunidades bacterianas lo que conlleva a la aparición de cepas resistentes, por lo tanto, requieren antibióticos más potentes, lo cual se ha convertido en un problema de interés global.

Algunos medicamentos se emplean con fines terapéuticos y profilácticos para tratar o prevenir infecciones, en estos casos, los antibióticos deben ser obligatoriamente suministrados bajo el control de un profesional (Torres y Zarazaga, 2002). Por otro lado, los antibióticos también son empleados como promotores del crecimiento o inmunopotenciadores, sin embargo, la Unión Europea decidió eliminar aquellos antibióticos utilizados como promotores debido a la diseminación de cepas resistentes de alto nivel, posteriormente otros países como Chile, Turquía, Corea del Sur y Estados Unidos, también prohibieron su uso, aunque fueron ampliamente utilizados en el pasado. No obstante, Brasil, México y otros países de América Latina se siguen utilizando los antibióticos como promotores de crecimiento (Revista NutriNews, España, 2018). En Cuba, se emplean antibióticos como suplemento dietético y se considera una estrategia prometedora para disminuir las pérdidas económicas por enfermedades (Pérez et al., 2014). En el Perú existen diversos antibióticos autorizados

para su uso como tratamiento, sin embargo, no existe registro de estudios sobre su uso como promotores de crecimiento.

Generalmente se suministran los antibióticos a los peces a través del alimento, por lo que la absorción del fármaco depende en gran medida del tipo de antibiótico utilizado. Algunos antibióticos como los fenicoles (cloranfenicol y tianfenicol) tienen un porcentaje de absorción mayor al 90 %, por lo que, la cantidad excretada a través de las heces es muy baja. En contraste, otros antibióticos como la oxitetraciclina, tienen porcentajes de absorción muy bajos en el intestino del pez, lo que genera un aumento de su presencia en el medio acuático (Barattini, 2012).

Los antibióticos excretados por el pez más el alimento medicado no consumido, son vertidos directamente al agua y/o al fondo del estanque de cultivo y como es de esperar, en estos ambientes acuáticos coexisten numerosas especies de bacterias, que son constituyentes de la microflora natural del agua. La acumulación de antibióticos en el sedimento podría causar cambios en la biodiversidad bacteriana, alterando la composición y diversidad de las comunidades del suelo (Varela y Alfaro, 2018) y lo que es más importante, afectan a bacterias que cumplen un rol importante en los ciclos bioquímicos del suelo, como, por ejemplo, la fijación de nitrógeno, lo cual afecta de manera indirecta a las plantas.

Por otro lado, no es posible cuantificar o vigilar la cantidad ingerida de antibióticos consumidos como residuos en los alimentos de origen animal, lo que puede causar problemas directos para la salud pública, tales como la anemia aplásica, que está asociada con el cloranfenicol (FAO, 2019). Del mismo modo, también se genera una alteración de la flora intestinal y como consecuencia una disminución de bacterias que compiten con microorganismos patógenos, aumentando así el riesgo de enfermedad (Doyle, 2006). Lozano y Arias (2008) mencionan que los residuos de antibióticos (penicilina, sulfonamidas y estreptomicina) en alimentos pueden desencadenar reacciones alérgicas, causar hipersensibilidad. Se han presentado casos de personas

sensibles a la penicilina con reacciones alérgicas debido al consumo de leche o carne contaminada (Doyle, 2006).

A nivel mundial se ha originado una controversia en la utilización de antibióticos, en vista de los riesgos asociados con los efectos directos e indirectos en la salud humana por el consumo tanto activo como pasivo, lo cual ha dado lugar a prohibiciones del uso de algunos antibióticos en la producción de alimentos de origen animal y al establecimiento de límites máximos de residuos (LMR). En nuestro país, sobre la base de la Ley de Inocuidad de los Alimentos, se planteó la NTS N° 120-MINSA/DIGESA-V.01 “Norma Sanitaria que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano” (MINSA/DIGESA, 2016).

Por esta razón, se busca alternativas más saludables utilizando sustancias de origen natural. Los ambientes marinos han pasado por muchas etapas de evolución lo cual ha definido y seleccionado diversas estrategias de supervivencia, defensa, ataque, adaptación y comunicación entre los organismos que habitan en ella (Fernández, 2015). Siendo el caso de las macroalgas, quienes han desarrollado diversos mecanismos de defensa ante situaciones de estrés, defensa contra predadores e infecciones originadas por virus, hongos y bacterias, por lo cual han desarrollado un carácter de inhibición de crecimiento contra otros organismos debido a que producen metabolitos secundarios, como protección y autodefensa (Piñol y Palazon, 1993).

En tal sentido, se plantea aprovechar la producción de compuestos bioactivos de macroalgas antárticas, que por las condiciones extremas del hábitat producen metabolitos secundarios asociados a la disminución de epifitos, inhibiendo a organismos competidores y patógenos microbianos (Vlachos, 1997).

Formulación del problema

¿Presentan actividad antibacteriana los extractos crudos de las macroalgas antárticas (*Himantothallus grandifolius* y *Desmarestia confervoides*) frente a cepas de *Y. ruckeri*, aisladas de trucha arco iris (*O. mykiss*)?

1.2. Antecedentes

Los primeros estudios acerca de compuestos con actividad antibacteriana en macroalgas fueron descritos por Shirahama (1942), quien investigó que *Cystophyllum hakodatense* tenía efecto sobre *Lactobacillus bulgaris* y *Lactobacillus helveticus*. Pratt (1951), encontró que algunos extractos crudos de macroalgas marinas solubles en éter inhibían el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. De manera similar Bruce y Duff (1967), encontraron actividad antibacteriana en dos extractos acetonicos de *Isochrysis galbana*.

De Lara et al., (1996) investigaron la actividad antibacteriana de macroalgas marinas: *Chaetomorpha antennina*, *Cladophoropsis robusta*, *Codium gíraffa*, *Enteromorpha intestinalis*, *Halimeda discoidea*, *Ulva* sp, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa racemosa*, *Amphiroa beauvoisii*, *Amphiroa mexicana*, *Rhodymenia pacifica*, *Hypnea spinella*, *Jania tenella*, *Chnoospora mínima*, *Sargassum liebmannii*, *Padina durvillaei*, *Padina gymnospora* y *Padina crispata*. El extracto acetónico de *J. tenella* (Rhodophyta) presentó mayor actividad, con halos de inhibición de 22 mm \pm 0,8 contra *S. aureus* y de 18 mm \pm 1,6 contra *Streptococcus pyogenes*. Los extractos de *C. antennina* y *E. intestinalis* (Chlorophyta), *A. beauvoisii*, *A. mexicana* y *H. spinella* (Rhodophyta), *C. mínima*, *S. liebmannii* y *P. durvillaei* (Phaeophyta), presentaron una moderada actividad antibacteriana, debido a que sus halos de inhibición fluctuaron entre 12 mm y 14 mm. Los autores mencionan que, las bacterias Gram (+) fueron más susceptibles lo que coincide con lo reportado por Pesando y Caram (1984), Padmini et al. (1988) y Campos et al. (1988), quienes sugieren que la diferencia de sensibilidad

entre las bacterias Gram (+) y las bacterias Gram (-), se debe a la naturaleza química de los extractos, confirmando la existencia de sustancias de origen algal con actividad biológica que nos muestra el potencial que tienen las algas para ser estudiado.

Ríos et al., (2009) en la Universidad de los Andes, en Venezuela investigaron la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de las algas marinas: *Acanthophora* sp., *Bryothamnion triquetrum*, *Gracilaria* sp., *Gelidium* sp., *Caulerpa mexicana*, *Caulerpa* sp., *Caulerpa* spp., *Codium decorticatum*, *Halimeda incrassata*, *Ulva* sp. y *Sargassum* sp. La actividad antibiótica de los extractos crudo se evaluó mediante la aparición de halos de inhibición contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, y *E. coli*. De los 33 extractos ensayados sólo 17 presentaron actividad antibacteriana (5 con etanol, 6 con diclorometano y 6 con hexano), resultando activos 14 frente a Gram (-) y 4 contra Gram (+). Las algas que mostraron actividad antibacteriana fueron: *Acanthophora* sp., *B. triquetrum*, *Gracilaria* sp., *Gelidium* sp., *C. mexicana*, *Caulerpa* sp., *Caulerpa* spp., *H. incrassata*, *Ulva* sp., *C. decorticatum*, *Sargassum* sp.

En México, Molina (2011) evaluó la capacidad inhibitoria de siete especies de microalgas: *I. galbana*, *Navicula incerta*, *Nitzschia laevis*, *Navicula byskanterae*, la Cepa 2B, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta* y la Cepa 5B contra las bacterias patógenas *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio campbellii* y *Vibrio harveyi*. Para evaluar la capacidad inhibitoria de los cultivos de microalgas se realizaron conteos de bacterias heterotróficas en medio ZoBell y bacterias que crecen en medio TCBS (BTCBS). Las especies *I. galbana* CCMP, *N. incerta*, *N. byskanterae* y la cepa 2B fueron más eficientes para inhibir el crecimiento de bacterias tipo *Vibrio*.

Silva et al. (2013) investigaron la actividad antibacteriana de los extractos etanolicos, metanolicos, hexanicos y acetonicos de las macroalgas *Padina gymnospora*, *Hypnea musciformes*, *Ulva fasciata* y *Caulerpa prolifera*. Donde se utilizó el método de

difusión en disco para evaluar el efecto antimicrobiano de las algas contra cepas patrón de *Vibrio parahaemolyticus*, *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Resultando que los extractos etanolicos de *P. gymnospora* y *H. musciformes* inhibieron todas las cepas evaluadas. El extracto metanolicos de *U. fasciata* inhibio el crecimiento de *Vibrio navarrensis*.

Marín (2013) estudió la actividad antibacteriana, antiviral y citotóxica de extractos y productos naturales de *Codium amplivesiculatum*, *Codium simulans*, *Codium cuneatum* y *Codium fragile*. Las bacterias analizadas fueron: *S. aureus* (ATCC-BAA-42), *E. coli* (ATCC- BAA-196) *S. pyogenes* (ATCC-BAA-946), *V. parahaemolyticus* (ATCC17802), *V. alginolyticus* (ATCC-17749) y *V. harveyi* (ATCC-14126). Reportó que se obtuvieron 7 fracciones activas contra *S. aureus*, 9 contra *S. pyogenes*, 9 contra *V. parahaemolyticus*, 6 contra *V. alginolyticus* y 12 contra *V. harveyi*. Ninguna de las fracciones mostró actividad contra *E. coli*.

Cortés et al. (2014) investigaron la actividad antimicrobiana de un extracto diclorometánico y etanólico del alga roja *Ceramium rubrum* contra *Y. ruckeri*. La prueba de inhibición bacteriana se realizó mediante el método de difusión en agar. Los autores reportan que el extracto etanólico y diclorometanico inhibieron el crecimiento de *Y. ruckeri*, sin embargo, la inhibición antibacteriana más alta se logró con el extracto diclorometanico (14,7 mm).

Troncoso et al. (2015) evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos crudos de las macroalgas: *Gracilaria chilensis*, *Lessonia spicata*, *Durvillaea antarctica* y *Macrocystis pyrifera*, *Ulva rigida* y *Ulva lactuca*, contra dos bacterias utilizando el método de discos de difusión. Las algas marinas *G. chilensis* y *M. pyrifera* presentaron inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* y *P. aeruginosa*. La investigación

permitió identificar compuestos con capacidad antibacterianos del extracto de *M. pyrifera*.

Magallanes et al. (2003) realizaron una investigación sobre la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de 12 especies de macroalgas marinas: *Grateloupia doryphora*, *Rhodymenia flabellifolia*, *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Prionitis decipiens*, *Ahnfeltiopsis durvillaei*, *Porphyra columbina*, *Petalonia fascia*, *Desmarestia* sp, *Bryopsis plumosa*, *Cryptopleura* sp., *Ulva nematoidea* y *M. pyrifera*. Enfrentaron a cada extracto crudo contra cepas bacterianas perteneciente a los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Aeromonas* y *Vibrio*. Los resultados obtenidos indican que de 12 especies de algas ensayadas solamente 5 (*G. doryphora*, *A. durvillaei*, *P. decipiens*, *P. fascia* y *B. plumosa*) presentaron algún efecto antibacteriano. Finalmente, los autores de la investigación, mencionan que *P. fascia* es la especie con mayor espectro de actividad antibacteriana. Parhuayo (2015) estudió el efecto inhibitorio de la microalga *I. galbana* (Haptophyta) sobre bacterias tipo *Vibrio* spp., en la investigación se usaron extractos microalgas obtenidos con n-butanol y metanol (0,1 y 0,5 g de pellet) para el test de sensibilidad, donde se registraron halos de inhibición más grandes con metanol (0,5 g de pellet).

Quispe (2017) identificó bacterias nativas aisladas del tracto intestinal de trucha arco iris y evaluó la actividad antibacteriana de *Lactobacillus* sp. y *Bacillus* sp. frente a una cepa de *Y. ruckeri*. Los resultados obtenidos demostraron el potencial probiótico de las bacterias aisladas.

A la actualidad, a nivel mundial existen numerosos estudios sobre la capacidad antibacteriana de algunas macroalgas (aproximadamente 2297 artículos, según el buscador académico ScienceDirect). Si hablamos específicamente de algas pardas, el número de estudios es menor (1398 artículos). Ahora, si nos centramos en algas

antárticas la cantidad de estudios aproximado es más pequeña (96) haciendo referencia a cepas clínicas. Si hablamos de patógenos en peces el número de estudios disminuye (25). Finalmente, ninguno de estos estudios implicó la búsqueda de compuestos bioactivos de las algas antárticas *Himantotallus grandifolius* y *Desmarestia confervoides*, y su posterior evaluación frente a patógenos de trucha arco iris.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de macroalgas antárticas *H. grandifolius* y *D. confervoides*, frente a *Y. ruckeri*, aislada de trucha arco iris (*O. mykiss*)

1.3.2. Objetivos específicos

Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos obtenidos frente a cepas de *Y. ruckeri*.

Determinar la concentración mínima bactericida (MCB) de los extractos obtenidos frente a cepas de *Y. ruckeri*.

1.4. Justificación e importancia

La enfermedad entérica de la boca roja (ERM) es más prevalente en trucha arco iris, sin embargo, Austin y Austin (2007) reportaron brotes en poblaciones de otros salmónidos como *Salmo trutta* (trucha marrón), *Salvelinus fontinalis* (salvelino o trucha fontana), *Oncorhynchus tshawytscha* (salmón real) y *Oncorhynchus kisutch* (salmón coho). La mortalidad del cultivo de trucha arco iris causada por *Y. ruckeri*, es variable, pudiendo ocasionar pérdidas de 0,1 – 0,5 % por día y de 0,5 a más de 5 % por semana (Meir, 1986). En Estados Unidos, Austin y Austin (2007) estimaron que la pérdida acumulativa de trucha arco iris a causa de este agente patógeno es de 30 – 35 % de la población durante cada brote de la enfermedad.

La actividad acuícola en el Perú se distribuye a lo largo del territorio nacional, siendo diversas las especies que se producen: langostinos (*Litopenaeus* spp), concha de

abanico (*Argopecten purpuratus*) trucha (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia (*Oreochromis* spp) y algunos peces amazónicos. Según el PRODUCE (2018), el cultivo de trucha arco iris (54,6 % de la producción total) presenta una mayor producción a nivel nacional, siendo Puno y Junín, los departamentos de mayor producción. Sin embargo, en el departamento de Junín, *Y. ruckeri* fue aislada y descrita por primera vez (Bravo y Kojagura, 2004). Posteriormente este agente patógeno se registró en otras regiones del país, asimismo se han realizado diversos estudios sobre la prevalencia, la patogenicidad, la transmisión de la enfermedad (Sierralta, 2011; Sirvas et al., 2011; Sandoval, 2012; Alvarado, 2012; Flores, 2013; Mamani, 2016; Quispe, 2017) y sensibilidad antibiótica (Temoche et al., 2017).

Si bien, todos estos estudios han contribuido al conocimiento de esta enfermedad, lo cual ha permitido emplear algunos medicamentos para su control (quinolonas, tiamulinas, sulfonamidas, oxitetraciclina y eritromicina, y antisépticos) (Bullock, 2004), cabe mencionar que: a) existe una gran demanda de antibióticos para la prevención y tratamiento de enfermedades, b) uso inadecuado y excesivo de antibióticos en la industria acuícola causando una disminución en la eficacia del fármaco y en la resistencia bacteriana (Barattini, 2012), por lo que es necesario emplear nuevas vías de solución frente a esta cepa bacteriana.

La resistencia bacteriana en peces se ha reportado en todas las áreas de la acuicultura, tanto en aguas continentales como ambientes marinos (Dixon, 1994) y las nuevas investigaciones sugieren la utilización de compuestos naturales como alternativa a los antibióticos sintéticos. Actualmente, diversos estudios sobre compuestos bioactivos se enfocan en organismos marinos, los cuales son considerados una importante fuente de sustancias con potencial bioactivo (Magallanes et al., 2003).

Las interrelaciones de las algas con los organismos que comparten su hábitat, en especial sus depredadores, han permitido el desarrollo de mecanismos de defensa morfológicos y químicos para su protección (Díaz, 2002). Los principales compuestos

bioactivos producidos por las algas están formados por una amplia gama de metabolitos secundarios, cada uno con una función específica dentro de su medio. Estos metabolitos también están asociados a la disminución de epífitos, inhibiendo a los organismos competidores y patógenos microbianos (Vlachos et al., 1997).

En la actualidad, diversos metabolitos secundarios, tales como péptidos, sesquiterpenos, ergosteroles, alcaloides, compuestos halogenados, entre otros, han sido aislados de macroalgas, esponjas, cnidarios, holoturias y tunicados con la finalidad de aprovechar su actividad antimicrobiana (Trujillo et al., 2014). Dentro de estos compuestos destacan los péptidos antimicrobianos (PAM), proteínas de bajo peso molecular que se sintetizan principalmente en tejidos epiteliales regularmente expuestos al ataque microbiano, los cuales constituyen un medio rápido para combatir una amplia variedad de bacterias, hongos, virus e incluso protozoarios (Montaño *et al.*, 2002). Las algas proporcionan una excelente fuente de compuestos bioactivos como carotenoides, polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos grasos, pigmentos, vitaminas, polifenoles, entre otras sustancias (Borowitzka, 2003), además, las algas marinas tienen grandes propiedades antioxidantes, antivirales, antiinflamatorias y antiparasitarias (Pelegri y Ortega, 2008).

En el caso de las algas pardas, por ejemplo, producen una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales incluyen terpenoides, oxilipinas, florotaninos e hidrocarburos volátiles, así mismo, producen metabolitos mixtos de origen terpeno-aromático (Vlachos et al., 1997). Varios de estos compuestos ofrecen un amplio espectro de actividades farmacológicas tales como: citotóxica, antimicrobiana, antioxidante y como inhibidores de diferentes enzimas (Echavarría et al., 2009). Por otra parte, en la Antártida, las macroalgas, crecen en ambientes extremos debido a la temperatura y los cambios climáticos que afectan directamente a los organismos que habitan en ella, generando la presencia de metabolitos secundarios con acción antibiótica, como una estrategia de defensa contra la herbivoría (consumidores de

plantas) y de ataque en contra de bacterias y hongos bastante resistentes presentes en el medio (De Lara y Álvarez, 1995).

Por lo antes expuesto, se evalúa la actividad antibacteriana de macroalgas antárticas contra cepas de bacterias de importancia acuícola, como: *Y. ruckeri*. Para lo cual se han escogido las macroalgas antárticas de las especies *H. grandifolius* y *D. confervoides*.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis nula

Los extractos de las macroalgas antárticas *H. grandifolius* y *D. confervoides* no presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *Y. ruckeri*, aisladas de trucha arco iris (*O. mykiss*)

1.5.2. Hipótesis alternante

Los extractos de las macroalgas antárticas *H. grandifolius* y *D. confervoides* presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *Y. ruckeri*, aisladas de trucha arco iris (*O. mykiss*).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. Las algas

El término algas incluye a macroalgas y un grupo altamente diversificado de microorganismos conocidos como microalgas (Barsanti y Gualtieri, 2005)

Las algas constituyen un grupo de vegetales muy heterogéneos y de amplia distribución, encontrándose en agua dulce o salada, en el suelo, sobre rocas, corteza de los árboles e incluso en la nieve (Lindorf et al., 1991; Pérez et al., 1998). Algunas especies viven en simbiosis con hongos, constituyendo a los líquenes, mientras que otras son simbioses de animales como corales y esponjas (Peña et al., 2005).

2.1.1.1. Características

Nutrición

La mayoría de los grupos de algas se consideran fotoautótrofos, es decir, dependen completamente de su aparato fotosintético para su metabolismo, así como, del uso de la luz solar como fuente de energía y el dióxido de carbono (CO₂) para producir carbohidratos y trifosfatos de adenosina (Lindorf et al., 1991; Pérez et al., 1998).

Sin embargo, existen ciertas especies de algas que necesitan obtener su nutrición exclusivamente de fuentes externas; es decir, que son heterótrofos (osmotrofia es la absorción de las sustancias disueltas). Existen estrategias nutricionales de las algas en un espectro que combina fotoautotrofia y heterotrofia, esta capacidad se conoce como mixotrofia (Barsanti y Gualtieri, 2005).

Reproducción

Los métodos de reproducción pueden ser asexual por división de una sola célula o fragmentación de una colonia, o sexual por producción de esporas móviles o por unión de gametos (Barsanti y Gualtieri, 2005).

Estructura general

Las algas muestran un amplio rango de formas de vida y de complejidad de estructuras, carecen de auténticas hojas, tallos y raíces como las de las plantas. Las partes aplanadas del talo (como hojas) de muchas algas se denominan frondes. El cuerpo en su conjunto es conocido como talo independientemente. El agua y los nutrientes, que están en contacto directo con todo el talo, son absorbidos directamente a través de la superficie sin necesidad de raíces. También en contraste con las hojas y los tallos de las plantas, el estipe y el rizoide generalmente carecen de tejidos especializados en el transporte de agua y nutrientes (Castro y Huber, 2007).

2.1.1.2. Clasificación

Su diferencia de formas ha permitido clasificar a las algas en diferentes grupos, de acuerdo a sus características estructurales como tipo de célula, reproducción, nutrición, entre otros (Peña et al., 2005). Se pueden clasificar en tres amplios grupos basándose en su pigmentación: pardas (*Phaeophytas*), verdes (*Chlorophytas*) y rojas (*Rhodophytas*) (Figura 1). Las algas pardas suelen ser grandes, por ejemplo, el cochayuyo presenta una longitud que varía desde los 20 m, las algas gruesas y correosas varían de 2 a 4 m mientras que algunas especies de menor tamaño presentan de 30 a 60 cm. Las algas rojas suelen tener un tamaño menor, con una longitud de unos pocos centímetros a un metro aproximadamente, pero no siempre son rojas, ya que a veces son de color púrpura o incluso un rojo pardo, pero los botánicos las clasifican como Rodofitáceas (Tabla 1). Las algas verdes son también pequeñas y su longitud es parecida a la de las rojas. Las macroalgas se distinguen de las microalgas (*Cyanophyceae*) debido a que estas últimas tienen un tamaño microscópico, frecuentemente unicelular y suelen llamarse algas azules-verdes las cuales florecen a veces y contaminan los ríos y cursos de agua (FAO, 2014).



Figura 1. De izquierda a derecha: Algas rojas (Rhodophytas); Algas verdes (Chlorophytas) y Algas pardas (Phaeophytas).

Fuente: AlgaeBase (2019). Recuperado de <http://www.algaebase.org/>

Tabla1.

Diferenciación de grupos taxonómicos (Basado en Van den Hoek et al., 1995)

División	Tipo de pigmento	Reserva	Pared celular
Chlorophytas	Clorofila a,b y carotenos	Almidos, similiar a plantas terrestres	Celulosa, algunos grupos sílice
Phaeophytas	Clorofila a, c y fucoxantina	Manitol, laminaria	Celulosa, ácido alginico
Rhodophytas	Clorofila a,d y ficoeritrina, fucozantina, carotenos	Almidón de florideas	Celulosa, pectinas (algunas CaCO ₃)

Fuente: Peña et al., (2005).

2.1.1.2.1. Algas pardas (Phaeophyta)

Constituyen un grupo importante conformado por aproximadamente 1500 especies (Van den Hoek, 1995). Las algas pardas predominan en aguas frías, particularmente en el hemisferio norte. Se fijan al sustrato mediante rizoides formando auténticos bosques o praderas como las de Laminaria en el Atlántico o Macrocystis en el Pacífico. Poseen formas filamentosas que alcanzan hasta 50 metros o más, su pared celular contiene ácido

algínico y sales sulfatadas. Estos compuestos dan resistencia y flexibilidad a las algas, ya que forman geles en matriz intercelular, ayudándoles a resistir las tenciones provocadas por las olas y corrientes (Cubas, 2008).

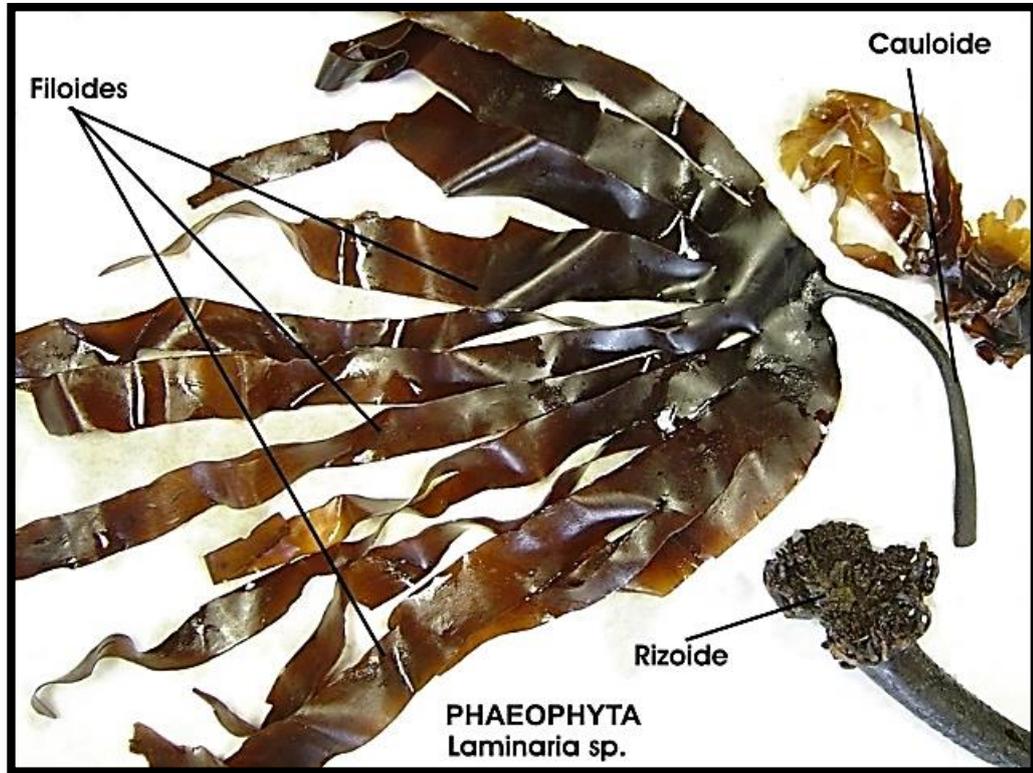


Figura 2. Morfología de las Phaeophytas.

Fuente: Google imágenes (2019). Recuperado de https://es.123rf.com/photo_35254795

2.1.1.2.2. *Himantothallus grandifolius*

Tabla 2.

Clasificación taxonómica de *H. grandifolius*

Familia	<i>Desmarestiaceae</i>
Genero	<i>Himantotallus</i>
Nombre científico	<i>Himantotallus grandifolius</i> , Zinova, 1959

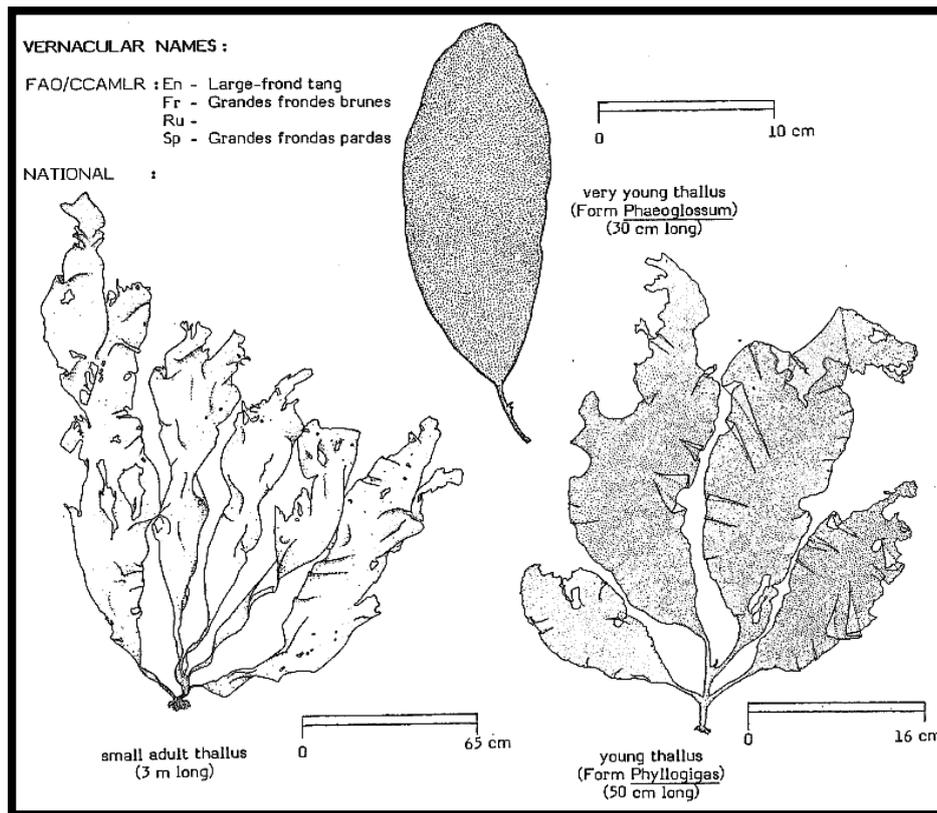


Figura 3. Morfología de *H. grandifolius*

Fuente: FAO (1985)

Morfología: Talo formado por hojas grandes, verde oliva, lanceoladas, no divididas que surgen de manera opuesta (joven) o irregular (vieja) de un estípote aplanado corto y fuerte (a menudo retorcido en espiral) fijado al sustrato por un soporte (rizoide). Las cuchillas se adelgazan gradualmente hacia el estípote en sus bases y mueren en sus extremos distales.

Estructura y crecimiento: La estructura es de tipo uniaxial. Una sección transversal muestra una médula distintiva con un eje central y un filamento longitudinal, una corteza con varias filas de células parenquimatosas y un meristodermo superficial de células pigmentadas y pequeñas.

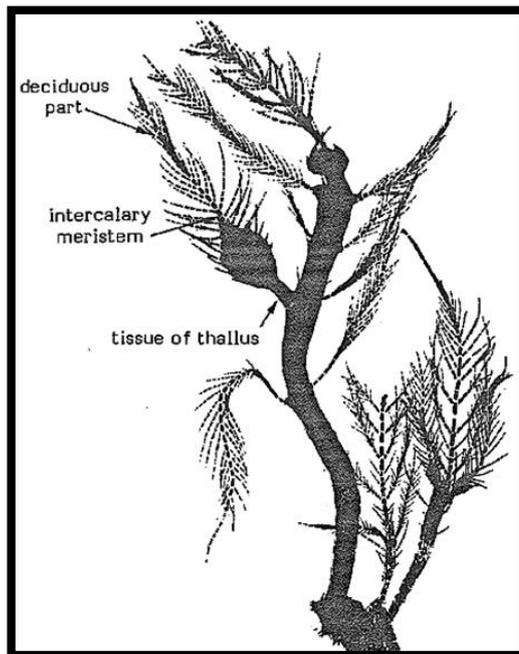


Figura 4. Talo muy joven, de unos mm de largo, con crecimiento tricotático.

Fuente: FAO (1985)

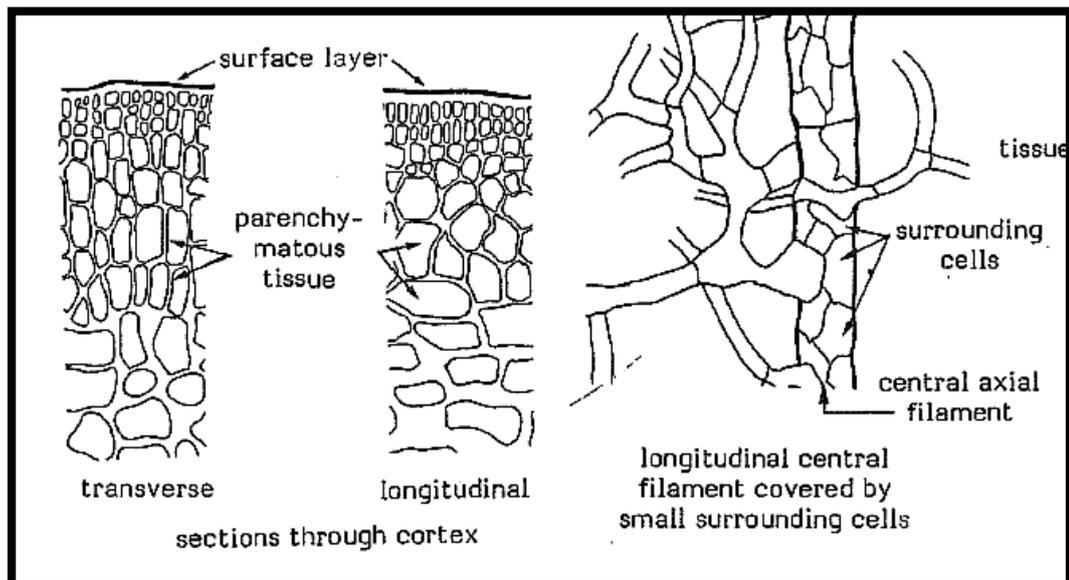


Figura 5. Crecimiento de tipo tricotático, visible en etapas jóvenes.

Fuente: FAO (1985)

Tamaño: Es la más grande de las algas antárticas, su talo alcanza hasta 10 m de longitud, con cuchillas más grandes conocidas de 8 m de largo y 1 m de ancho.

Distribución geográfica: Endémica de la región antártica. Se encuentra en la península Antártica, en la costa de la reina María, la costa de Adelia, la tierra de Wilkes, la tierra de Victoria y el sur de Georgia.

Ecología: Se encuentran como grupos aislados en la zona infralitoral hasta 30 m de profundidad.

2.1.1.2.3. *Desmarestia confervoides*

Tabla 3.

Clasificación taxonómica de D. confervoides

Familia	Desmarestiaceae
Genero	Desmarestia
	<i>Desmarestia confervoides</i>
Nombre científico	Ramírez y Peters 1993.
	<i>Desmarestia viridis</i> var. <i>distans</i>
Sinónimo (s) heterotípico (s):	JD Hooker 1846
	<i>Desmarestia willii</i> , Reinsch 1890

Morfología: Talo de tamaño mediano, blando y flácido, que surge de un sujetador pequeño, compacto y cónico. Su eje principal se bifurca a 4 o 5 órdenes, con tipo de bifurcación opuesta. Todas las partes del talo son cilíndricas o ligeramente comprimidas.

Estructura y crecimiento: Estructura de tipo uniaxial. La sección transversal muestra un gran filamento axial central rodeado por una célula pequeña e hifa, una corteza de células parenquimatosas y una capa superficial de células pigmentadas pequeñas. Crecimiento de tipo tricotálico. Los meristemas intercalares de las frondas jóvenes dan lugar a ramificaciones deciduas pequeñas y coloreadas en una dirección y al tejido parenquimatoso de la fronda en la dirección opuesta.

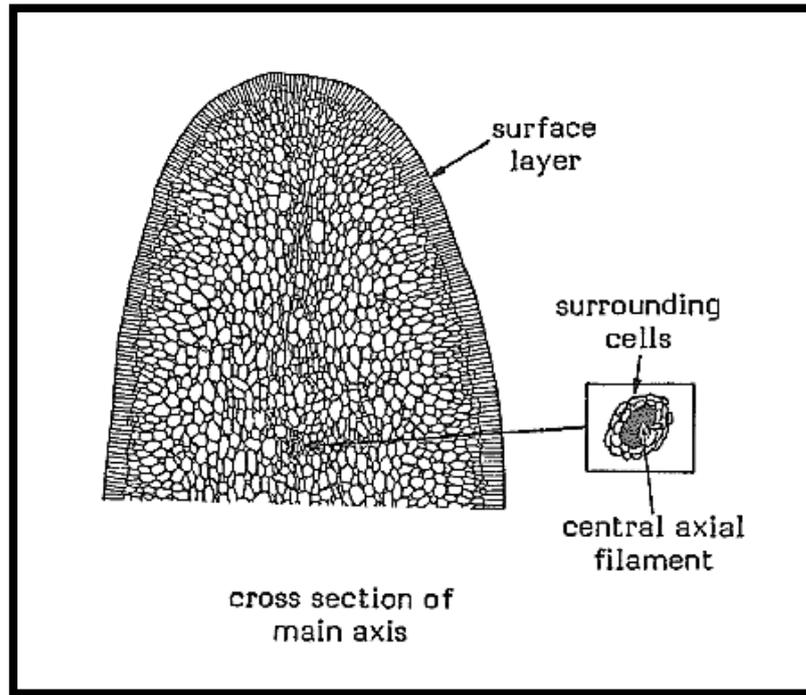


Figura 7. Crecimiento de tipo tricotómico

Fuente: FAO (1985)

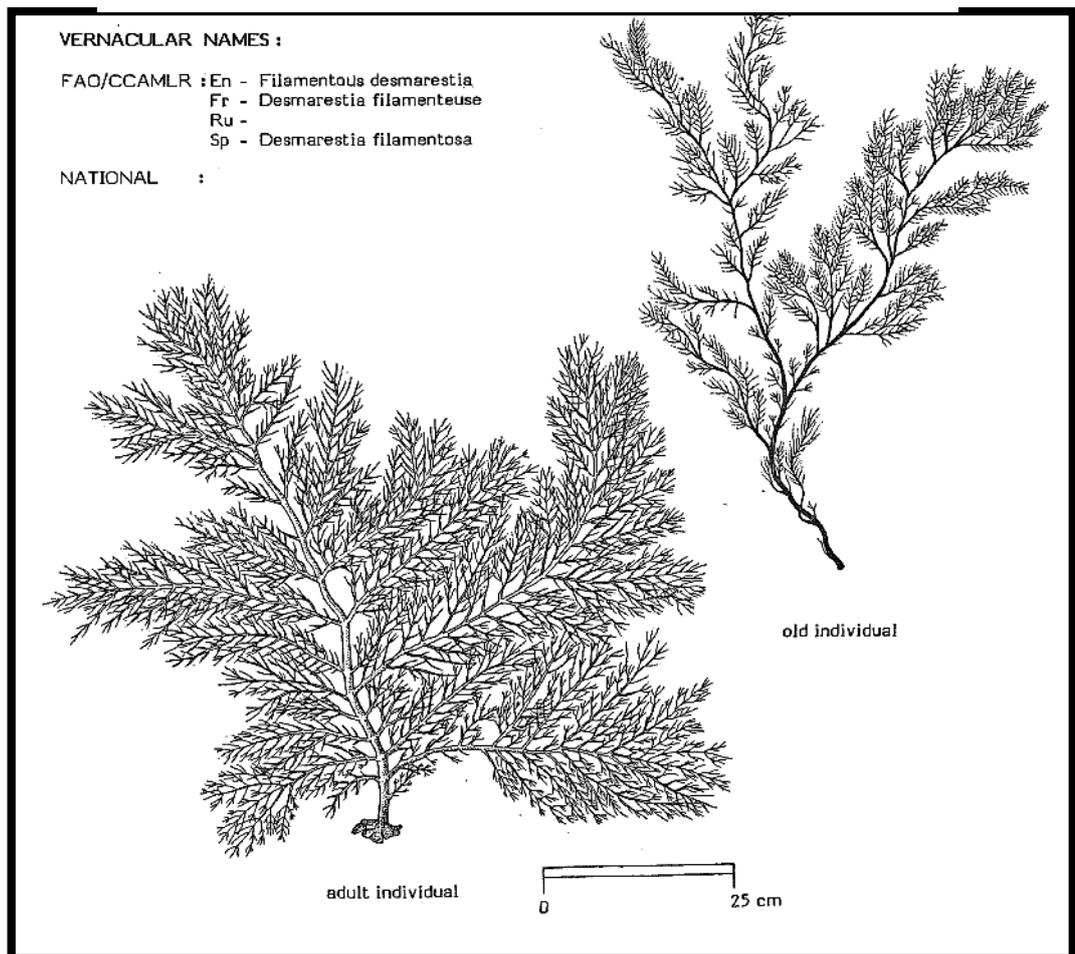


Figura 6. Morfología de *Desmarestia confervoides*

Fuente: FAO (1985)

Tamaño: Talo que alcanza hasta 1 m de largo, con eje principal de 0,5 cm de diámetro que se mantiene firme hasta unos 10 cm de ancho.

Distribución geográfica: Tierra del fuego, Georgia del sur, Tierra de Victoria y Malvinas, Príncipe Eduardo, Islas Crozet y Auckland.

Ecología: Encontrado en grupos densos en la parte superior de la zona infralitoral hasta unos 5 m de profundidad.

2.1.1.3. Compuestos bioactivos en algas

Los organismos marinos son considerados una importante fuente de sustancias bioactivas. En términos generales, los compuestos bioactivos son aquellas sustancias que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos y con efectos beneficiosos para la salud. Estas sustancias químicas se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas y ciertos alimentos (como frutas, verduras, nueces, aceites y granos integrales). Los compuestos bioactivos cumplen funciones en el cuerpo que pueden promover la buena salud (Instituto Nacional del Cáncer, 2019).

Los principales compuestos bioactivos producidos por las algas están formados por una amplia gama de metabolitos secundarios, cada una con una función específica dentro de su medio, atribuyéndole entre otras funciones, la defensa química contra herbívoros marinos (Magallanes et al., 2003).

2.1.1.3.1. Metabolitos secundarios en algas

Los metabolitos secundarios son aquellos que no se encuentran involucrados directamente en procesos primarios como son la fotosíntesis, división celular o reproducción de las algas, más bien este tipo de compuestos se caracterizan por ser subproductos de rutas metabólicas normales que se sintetizan dependiendo de condiciones externas tales como ataques de patógenos, predadores, cambios térmicos o lumínicos, deficiencias nutricionales o presencia de otros organismos, obteniendo así una gran variedad de metabolitos como son polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados,

florotaninos y otros compuestos fenólicos y pigmentos como los carotenoides y flavonoides (García et al., 2013).

Los metabolitos secundarios tienen una implicación ecológica como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos (Bourgau et al., 2001). Otros tienen una función fisiológica, por ejemplo, los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas (Wink, 2007). Además, son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos (Goossens et al., 2003).

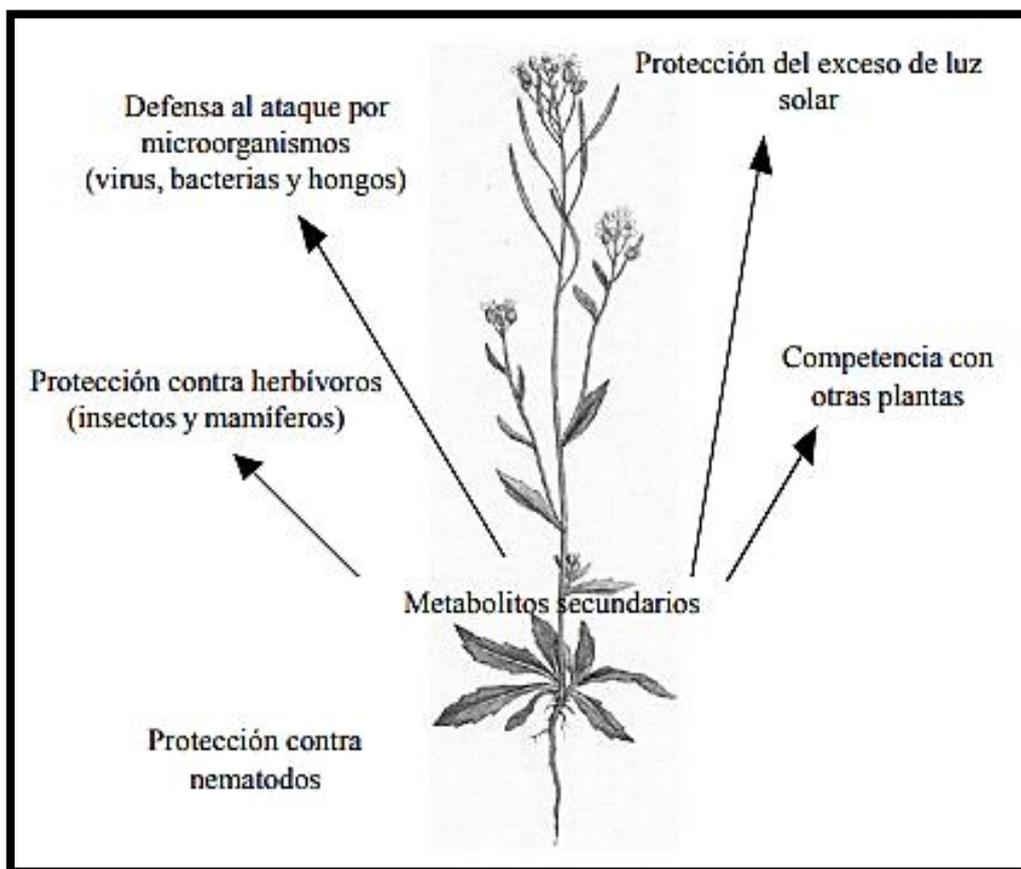


Figura 8. Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa.

Fuente: Sepúlveda, G. et al., (2003).

Particularmente en las algas marinas se han encontrado grupos de metabolitos como: diterpenos, eicosanoides, lecitinas, esteroides y alcaloides (Ospina et al., 1997). Además, las algas pueden sintetizar una gran variedad de compuestos químicos, entre los que podemos citar compuestos nitrogenados y diterpenos en algas verdes, terpenos halogenados en las algas rojas y metabolitos mixtos de origen terpeno aromático en las algas pardas (Magallanes et al., 2003).

En general, los metabolitos secundarios han sido incluidos en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Chinou, 2008). Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides (Sarin, 2005) y se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de los cuales se encuentran carotenos, glicósidos cardiotónicos, taxol, entre otros (Shilpa et al., 2010). Entre los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos.

Los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 4 000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacológica (Sajc et al., 2000)

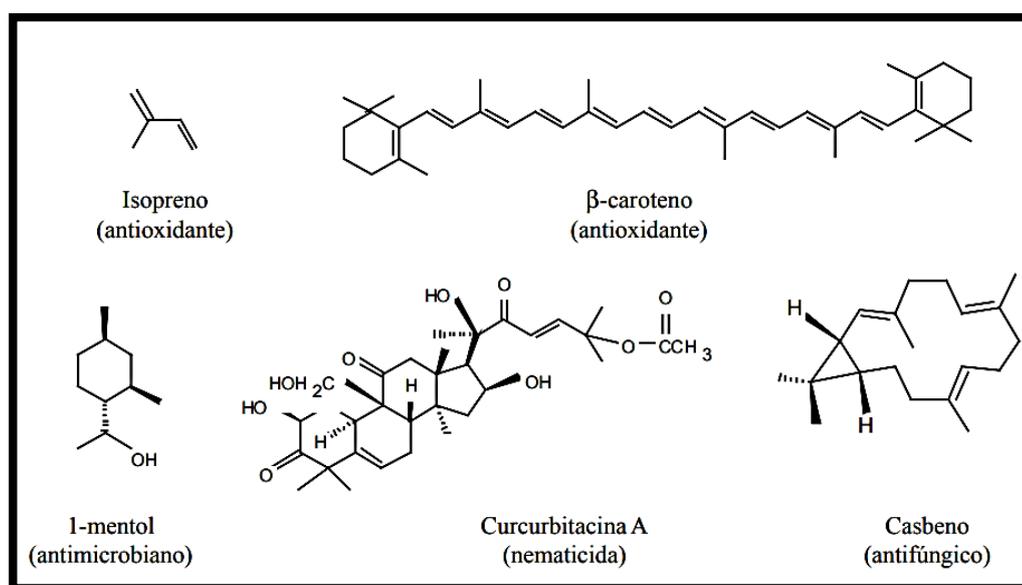


Figura 9. Estructuras químicas de terpenoides

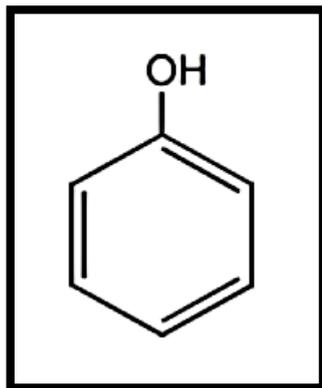


Figura 11. Estructura química del fenol

Fuente: Pérez, N. (2009).

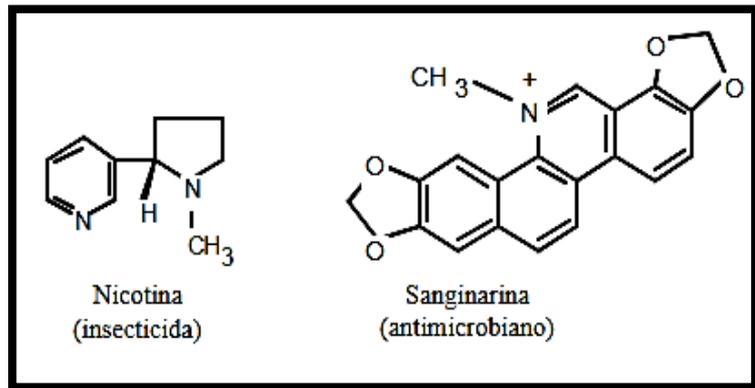


Figura 10. Estructuras químicas algunos alcaloides (compuestos nitrogenados)

Fuente: Pérez, N. (2009).

Terpenos

Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides (Sarin, 2005) y se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de los cuales se encuentran carotenos, glicósidos cardiotónicos, taxol, entre otros (Shilpa et al., 2010).

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP (Avalos et al., 2009).

Los monoterpenos tales como el mentol, que es un antimicrobiano, el citronelal, que es un repelente de insectos y las piretrinas que funcionan como venenos del sistema nervioso de los insectos, son componentes químicos con actividad biológica potencial durante la respuesta de defensa de las plantas que los producen (Sepúlveda et al., 2004). Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios que tienen actividades biológicas como antiinflamatoria, antitumoral, citotóxica, antibacterial, antimalaria y actividad neurotóxica y alérgica (Ruiz y Suarez, 2015).

Compuestos fenólicos

Entre los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre otras (Gurib, 2006). Los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos.

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido siquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) (Avalos, 2009).

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana (Mantilla y Sanabria, 2016). Del mismo modo, los isoflavonoides actúan como fitoalexinas, las cuales pueden ser definidas como compuestos antimicrobianos de pequeño peso moléculas o metabolitos de estrés biológico. Pueden ser constitutivos o también ser inducidos por ataque biológico o heridas. Los constituyentes varían entre las especies y el hábitad y distribución de la planta. Este tipo de flavonoides inhiben la germinación de esporas de hongos y causan daño a los sistemas de membrana (Mantilla y Sanabria, 2016).

Por otro lado, los taninos son sustancias de origen polifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias (Mantilla y Sanabria, 2016).

Alcaloides

Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 4 000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacológica (Sajc et al., 2000).

Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Avalos, 2009), también se pueden derivar de purinas y del acetato de los policétido (Sepúlveda, 2004).

2.1.2. Análisis Fitoquímico

El análisis fitoquímico comprende el estudio de metabolitos secundarios presentes en especies vegetales, los cuales pueden ser fenoles y polifenoles, quinonas, flavonas y flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, glucósidos y saponinas (Prashant et al., 2011).

Existen distintos métodos cualitativos para la detección preliminar de los diferentes metabolitos secundarios que pueden encontrarse en las plantas, basados en la extracción de estos mediante solventes orgánicos de diferentes polaridades y aplicando pruebas de coloración (Gutiérrez et al., 2008; Colina, 2016).

Respecto a las pruebas cualitativas, estas son realizadas para identificar la presencia de el o los tipos de metabolitos secundarios que presentan las plantas, cabe mencionar la prueba de espuma en el caso de saponinas, la reacción de los flavonoides con el reactivo de Shinoda, la reacción de los taninos con gelatina-cloruro de sodio, entre otros (Colina, 2016).

2.1.3. Extracción

La separación de un compuesto por extracción se basa en la transferencia selectiva del compuesto (mezcla sólida o líquida) con otras sustancias (generalmente disolvente orgánico) hacia una fase líquida. El éxito de la técnica depende básicamente de la

diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial.

A lo largo del tiempo los principales métodos usados para realizar extracciones de algas son extracciones convencionales con disolventes como es el caso de la extracción con equipo Soxhlet y por medio del método de hidrólisis tanto alcalina como ácida (Michalak y Chojnacka, 2014).

2.1.3.1. Técnicas de extracción

Tabla 4.

Técnicas de extracción de algas

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	EJEMPLOS
Extracción con agua	Homogenización
	Ebullición
	Autoclavado
Extracciones convencionales con disolventes	Extracción líquido-líquido
	Extracción sólido-líquido
	Extracción en equipo Soxhlet
Hidrólisis ácida y alcalina	Hidrólisis ácida y alcalina
Nuevas técnicas de extracción	Extracción de fluidos supercríticos
	Extracción asistida por ultrasonido
	Extracción por microondas
	Extracción líquida presurizada

Fuente: Michalak y Chojnacka (2014)

Hay parámetros (temperatura, incidencia de la luz del sol, humedad, entre otros) que se deben tomar en cuenta al momento de conseguir los extractos, ya que esto tiene un efecto significativo en el tipo y efectividad del extracto, lo que implica que a través de una correcta extracción no se pierda la funcionalidad biológica de los compuestos (Ruiz et al., 2016).

2.1.3.1.1. Extracciones convencionales con disolventes

Son las extracciones tradicionales donde se incluye a la extracción Soxhlet, extracción líquido-líquido y la extracción sólido-líquido. Estas extracciones se caracterizan por el uso de solventes orgánicos de diversas polaridades (diclorometano, éter de petróleo, hexano, acetona, metanol, etanol) (Suasnavas, 2017). La extracción con disolventes, consiste en poner en contacto el material vegetal con un disolvente capaz de solubilizar las sustancias activas. Los compuestos activos deben pasar del material vegetal al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido (con los compuestos activos disueltos) y el material vegetal sobrante.

Extracción líquido-líquido

Es un procedimiento muy utilizado para separar compuestos disueltos o suspendidos en fases acuosas. El procedimiento consiste en agitar la fase acuosa con un disolvente orgánico inmiscible en agua y dejar separar ambas fases. Los solutos presentes se distribuyen entre la fase acuosa y la fase orgánica, de acuerdo con sus solubilidades relativas (Bernal, 2013)

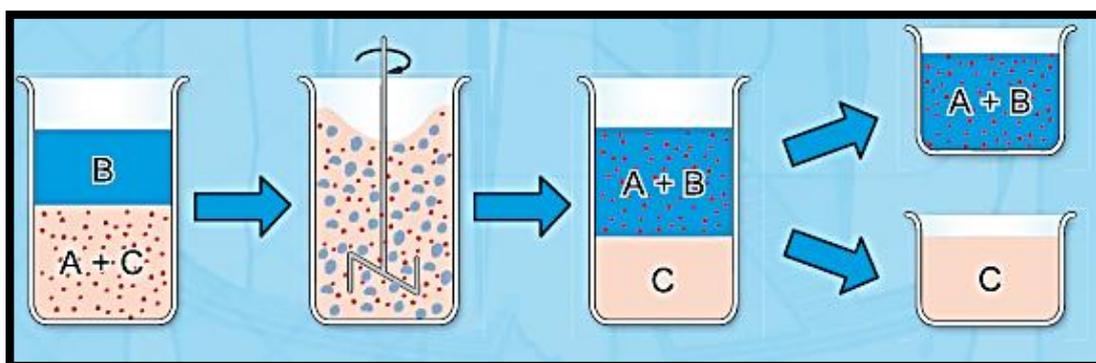


Figura 12. Esquema idealizado de una operación de extracción líquido-líquido.

Fuente: Google imágenes (2019). Recuperado de <https://sites.google.com/site/bioseparacionesfluidofluido/intruccion>

Extracción sólido-líquido

Es una operación básica o unitaria mediante la cual se separan uno o varios constituyentes solubles contenidos en un sólido inerte mediante la utilización de un disolvente adecuado.

Los factores más importantes que influyen sobre la velocidad de extracción son:

- **Tamaño de las partículas sólidas:** Evidentemente cuanto más pequeñas sean, mayor es la superficie interfacial y más corta la longitud de los poros. Por tanto, mayor es la velocidad de transferencia. Sin embargo, tamaños excesivamente pequeños pueden hacer que las partículas se apelmacen dificultando la extracción.
- **Tipo de disolvente:** El disolvente debe ser lo más selectivo posible y se recomienda de baja viscosidad.
- **Temperatura:** Un aumento de la temperatura favorece la solubilidad y aumentan los coeficientes de transferencia de materia. El límite superior se fija atendiendo a criterios de calidad del producto, criterios económicos y de seguridad con respecto al disolvente.
- **Agitación del disolvente-soluto:** Favorece la transferencia por aumento de coeficientes de transferencia de materia en la interfase. Además, se evita la sedimentación y apelmazamiento de las partículas sólidas.

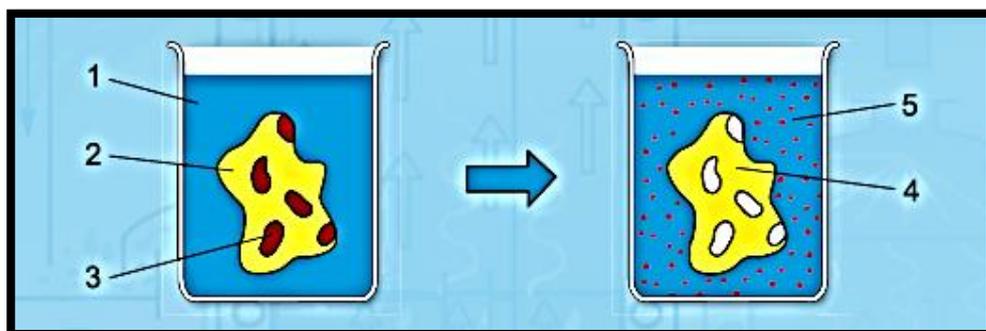


Figura 13. Esquema de la extracción; antes de la extracción (izquierda) y después de la extracción (derecha).

Fuente: Google imágenes (2019). Recuperado de <https://sites.google.com/site/bioseparacionesfluidofluido/intruccion>

La regeneración del disolvente consiste, generalmente, en un proceso de evaporación/destilación, en el cual se elimina parte del disolvente y queda una solución concentrada de extracto como producto.

Extracción en equipo Soxhlet

La extracción Soxhlet es la técnica de separación sólido-líquido comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza. De igual modo, puede ser usada como técnica preparativa de muestra como paso previo al análisis mediante otra técnica instrumental, por ejemplo, la extracción de ácidos grasos en muestras de tocino para su posterior determinación mediante cromatografía de gases.

La extracción Soxhlet se fundamenta en las siguientes etapas: 1) colocación del solvente en un balón. 2) ebullición del solvente que se evapora hacia un condensador a reflujo. 3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior. 4) ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo retornando el solvente con el material extraído al balón. 5) Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón del solvente (Núñez, 2008).

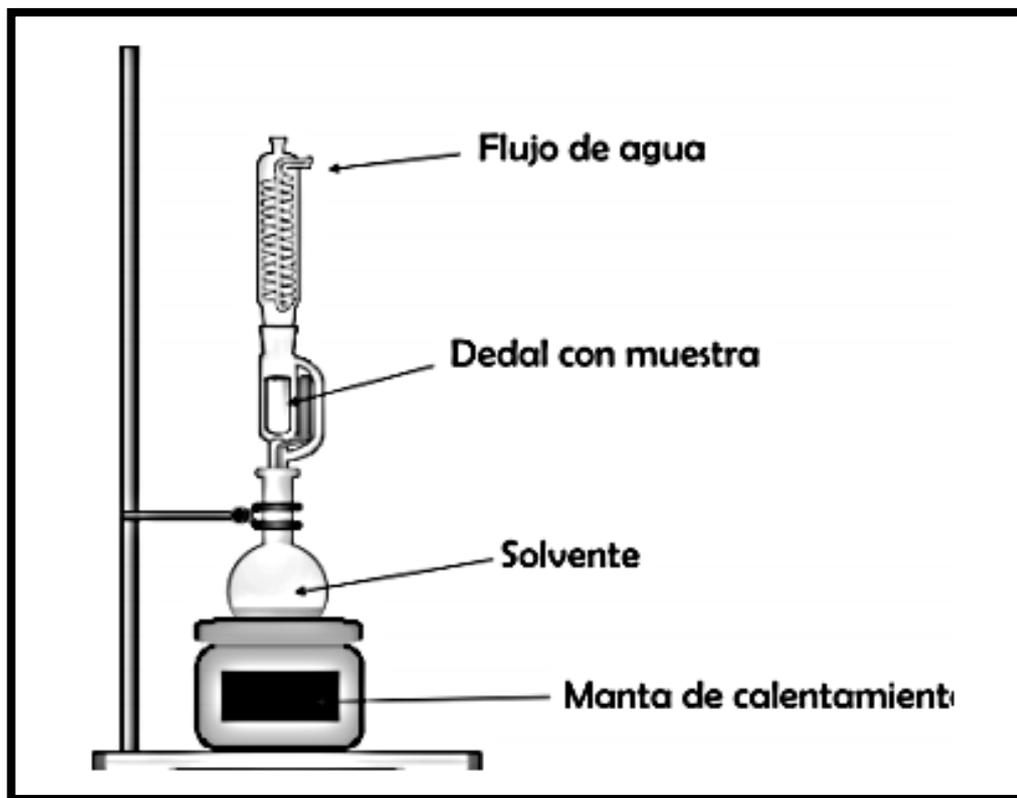


Figura 14. Dispositivo de extracción Soxhlet

Fuente: Universidad Peruana del Oriente (2004). Recuperado de https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/curso0405/TAQP5_0405.pdf

2.1.3.1.2. Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido, utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Gao y Liu, 2005). Cuando se utilizan materiales secos el proceso de ultrasonicación facilita la rehidratación del tejido mediante la apertura de los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos (Vinatoru, 2001).

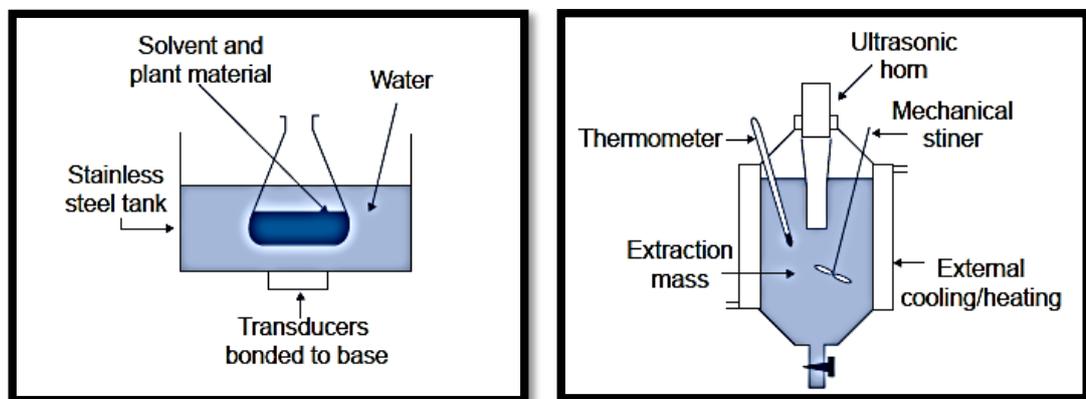


Figura 15. Equipos experimentales utilizados para la extracción por ultrasonido.

Fuente: Azuola, y Vargas (2007).

2.1.4. Trucha arco iris

La trucha arcoíris es originaria de los ríos y lagos de Norte América, al oeste de las Montañas Rocosas, sin embargo, este pez ha sido introducido en el mundo entero debido a su uso en la pesca deportiva y a su succulenta carne (Revista NAT GEO, 2010).

La trucha fue la primera especie en el desarrollo de la acuicultura peruana. En el año 1982 se inició la truchicultura con la importación de 50 000 ovas embrionadas procedentes de los Estados Unidos, las cuales fueron destinadas a un criadero particular de la Oroya (Godoy, 2002).

2.1.4.1. Clasificación Taxonómica

Tabla 5.

Clasificación taxonómica de la trucha arco iris

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Salmoniformes
Familia	Salmonidae
Genero	Oncorhynchus
Especie	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre común	trucha arcoíris

2.1.4.2. Características generales

Cuerpo de forma alargada, fusiforme. Presenta una coloración azul a verde oliva sobre una banda rosada a lo largo de la línea lateral y plateada por debajo de ella. La parte del lomo, los costados, la cabeza y las aletas están cubiertas con pequeños puntos negros (FAO, 2019). La coloración de la piel varía de acuerdo al ambiente en que habita, la edad y el estado de madurez sexual. La denominación de trucha arco iris se debe a la presencia de una franja de colores de diferentes tonalidades, predominantemente rojiza, sobre la línea lateral en ambos lados del cuerpo (Mendoza y Palomino, 2004).

2.1.4.3. Cultivo de truchas en el Perú

La actividad de crianza de truchas en el Perú, viene creciendo vertiginosamente, principalmente a nivel intensivo, identificando 02 sistemas de cultivo: en ambientes convencionales (estanques de concreto, mampostería de piedra, tierra y otros) y no convencionales (jaulas flotantes). Este último sistema ha logrado un mayor desarrollo, en la Región Puno que cuenta con el 98 % de unidades productivas en jaulas flotantes.

Para el 2012, el aporte de las Regiones de Puno y Junín constituyeron alrededor del 88,4 % de la producción nacional de truchas (Puno 18 471,2 TM/Año - Junín 3 412,53 TM/Año) (FONDEPES, 2014). En los últimos 10 años la producción nacional de truchas en Perú aumentó 678 % al pasar de 6 997 toneladas en el 2007 a 54 424 toneladas en el 2017, según estadísticas de la Oficina de Estudios Económicos del Ministerio de la Producción (PRODUCE) (GESTIÓN, 2018). De acuerdo a las proyecciones del PRODUCE para el 2021 se alcanzará una producción de 78 mil toneladas.

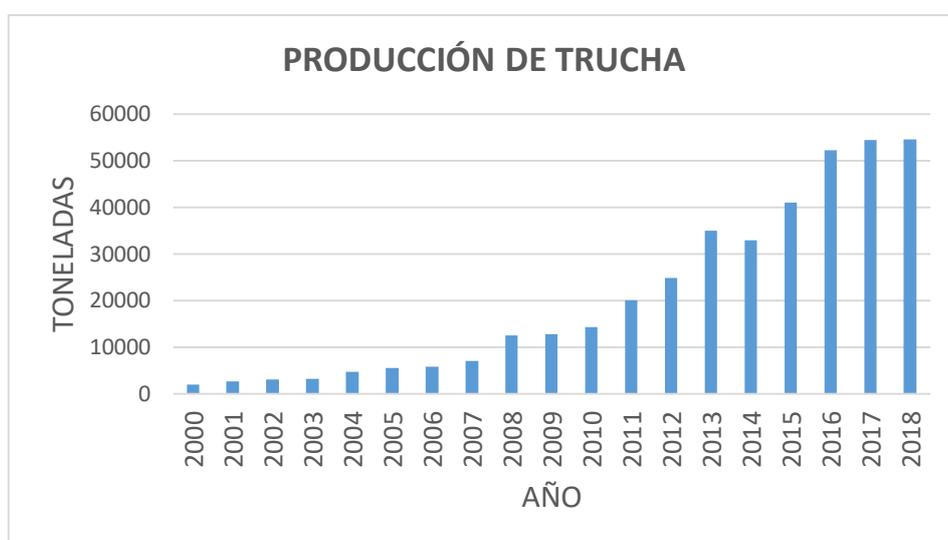


Figura 16. Crecimiento de la producción de trucha en el Perú.

Fuente: Anuario estadístico pesquero y acuícola (PRODUCE) y revista gestión (2018).

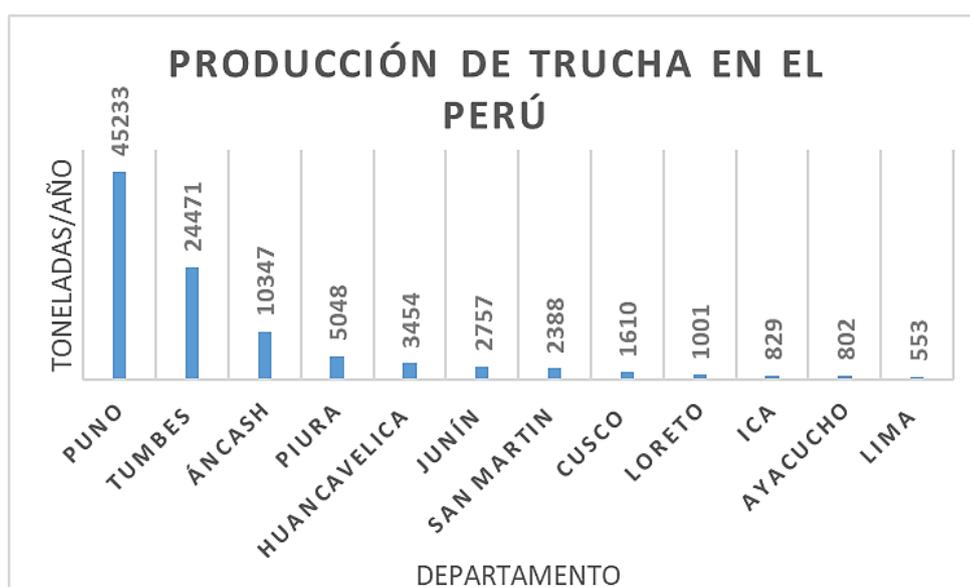
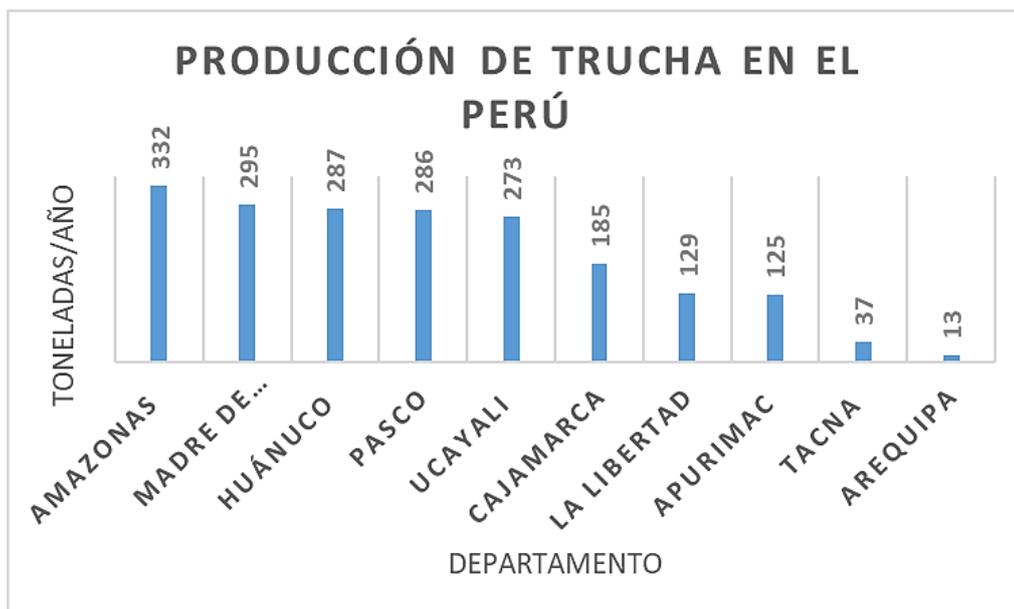


Figura 17. Producción de trucha en el Perú (mayor a 500 toneladas por año)

Fuente: Anuario estadístico pesquero y acuícola (PRODUCE)



Fuente: Anuario estadístico pesquero y acuícola (PRODUCE)

Figura 18. Producción de trucha en el Perú (menor a 500 toneladas/año)

2.1.4.4. Enfermedades más comunes en el cultivo de truchas

Las principales enfermedades en las truchas se pueden clasificar en los siguientes grupos (tabla 6):

- Enfermedades causadas por virus
- Enfermedades causadas por bacterias
- Enfermedades por hongos
- Enfermedades por parásitos internos o externos.

En los departamentos de mayor producción (Puno y Junín), se han reportado agentes etiológicos bacterianos y virales (Mamani, 2016), siendo las enfermedades bacterianas las más predominantes (MAG, 2011). Las enfermedades bacterianas más comunes son: la enfermedad entérica de la boca roja, la enfermedad bacteriana del riñón, forunculosis, piscirickettsias, enfermedad del agua fría y septicemia hemorrágica bacteriana (FONDEPES, 2014).

Tabla 6.

Enfermedades más comunes en trucha arco iris

Grupos	Especificaciones
1 Virales	SHV - Septicemia Hemorrágica Viral NPI - Necrosis Pancreática Infecciosa NHI - Necrosis Hematopoyetica Infecciosa
2 Bacterianas	Enfermedad Bacteriana del Riñón Enfermedad Entérica de la Boca Roja Forunculosis Piscirickettsias Enfermedad del agua fría Septicemia Hemorrágica Bacteriana
3 Micóticas	Ictiofoniasis (sistémica) Saprolegniasis (Externa) Branquiomicosis (Externa)
4 Parasitarias	Protozoos Externos: Ich, Trichodina, Ichthyobodo, etc. Protozoos Internos: Enfermedad del Torneo Metazoos

Fuente: FONDEPES (2014)

Enfermedad Entérica de la Boca Roja

El agente etiológico es *Y. ruckeri*, un microorganismo de la familia de las enterobacteriaceae. Perjudica principalmente a salmónidos de todas las edades, tanto alevines como adultos. La Enfermedad Entérica de la Boca Roja o Yersiniosis, es una infección sistémica de curso agudo a crónico que afecta principalmente a la trucha arco iris (*O. mykiss*).

La fuente de infección de la Yersiniosis es básicamente el agua, infectándose los animales a través de las branquias o del tracto gastrointestinal (Blanco et al., 2004). Los signos más comunes de la infección son aletargamiento, oscurecimiento del dorso, marcada exoftalmia, hemorragias subcutáneas e inflamación en las mandíbulas, opérculos, paladar y base de las aletas (Tebbit et al., 1981; Chía, 1997). La aparición de un brote sucede normalmente cuando las condiciones de calidad del agua no son óptimas. Esto se debe a la relación que existe entre las situaciones de estrés (cambios de temperatura, oxígeno disuelto, pH, etc.) y el posterior mal desempeño del sistema inmune de los peces en cultivo, provocando un aumento en las tasas de infección por causa de patógenos (Muñoz, 2015).

En alevines la enfermedad se presenta de forma aguda, ocasionando la muerte casi sin síntomas. En adultos puede manifestar de forma leve (letargia, oscurecimiento), y pudiendo evolucionar a la forma crónica: se percibe exoftalmia y lo más característico, una congestión de los vasos de la zona oral, y hemorragias en la boca, que en algunos casos también se pueden observar en el opérculo branquial (Blanco et al., 2004).

El diagnóstico de esta enfermedad se centra en el aislamiento de *Y. ruckeri* a partir de riñón, intestino posterior y fecas, sin embargo, en algunos casos también es posible su aislamiento del cerebro, hígado y bazo (Chía, 1997). En el Perú, *Y. ruckeri*, fue aislado por primera vez en el departamento de Junín (Bravo y Kojagura, 2004) (Tabla 8)



Figura 19. Signos externos. Oscurecimiento de la piel (a); boca roja (b); distensión abdominal (c); secreciones (d); exoftalmia (e).

Fuente: Sirvas et al. (2011)

2.1.5. *Yersinia ruckeri*

Y. ruckeri es una enterobacteria (tabla 7) Gram (-) (figura 20), posee forma de bacilo ligeramente curvo de 0,5 – 0,8 μm de diámetro y entre 1,0 – 3,0 μm de longitud (Bastardo, 2012). Aproximadamente el 80 % de las cepas aisladas muestran movilidad, presentando 7 u 8 flagelos en disposición períttrica, que está asociado principalmente con la temperatura de incubación, dejando de funcionar a temperaturas inferiores a 9 °C y están ausentes a 35 °C (Davies y Frerichs, 1989).

Clasificación taxonómica

Tabla 7.

Clasificación Taxonómica de la *Y. ruckeri*

Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Género	Yersinia
Especie	<i>Yersinia ruckeri</i>

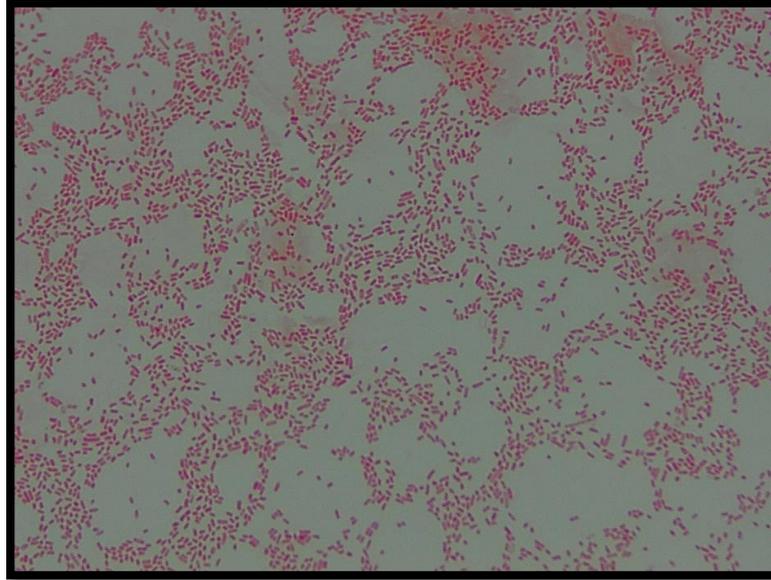


Figura 20. Prueba de tinción de Gram para *Y. ruckeri*. Visto bajo Microscopio.

Fuente: Elaboración propia

Esta bacteria crece tanto en condiciones aérobicas como anaeróbicas en cualquier medio primario enriquecido, dentro de un rango de pH entre 6,5 a 7,7, en un tiempo que va desde las 12 a 96 horas, en agar de soya tripticasa (TSA) las colonias crecen, normalmente con un diámetro de 1 a 2 mm, redondas, lisas, ligeramente convexas y con bordes completos (Concha, 1998), diversos autores mencionan que su temperatura optima de crecimiento es de 22 a 28 °C. Las cepas de *Y. ruckeri* pueden ser divididos en 2 biotipos, biotipo 1 y 2, basados en su capacidad de fermentar el sorbitol, hidrólisis del Tween 20 y Tween 80, y en la motilidad (Tobback, 2009). La hidrólisis enzimática del Tween 80 se produce por acción de una lipasa, que da lugar a la liberación de ácido oleico y sorbitol polioxietilado.

2.1.5.1. Transmisión

La principal forma de transmisión de *Y. ruckeri* es por vía horizontal, de pez a pez a través del agua, es decir que los peces sanos son expuestos a bacterias que han sido eliminadas en heces por peces enfermos o portadores asintomáticos (Sierralta, 2011). En la mayoría de los casos, la infección se da a causa de las condiciones de estrés, habiéndose observado de manera experimental que los peces enfermos transmiten la bacteria *Y. ruckeri* a peces

clínicamente sanos cuando la temperatura del agua es mayor a 25° C (Hunter et al., 1980).

Glen et al. (2004) realizaron un estudio donde mencionan que la transmisión de esta infección, también se da por vía vertical, de las hembras a los huevos.

Las aves, peces, crustáceos silvestres y algunos mamíferos como la rata almizclera *Ondatra zibethicus* (Austin y Austin, 2007), también pueden comportarse como vectores potenciales de esta enfermedad, transmitiendo el agente infeccioso a truchas y salmones cultivados en agua dulce o salobre (Willumsen, 1989).

2.1.5.2. Prevención y control

El control de esta enfermedad generalmente ha sido mediante tratamientos con antibióticos, los cuales son suministrados, normalmente, mediante alimentos. Aunque en algunos casos pueden ser diluidos en el medio de cultivo (Abbass, 2010); sin embargo, esta práctica presenta consecuencias negativas sobre el ambiente acuático, y posteriormente generan problemas a nivel global.

Entre los antibióticos más utilizados frente a *Y. ruckeri*, están la oxitetraciclina y la sulfametazina, las cuales se han usado de forma individual o combinadas, sin embargo, se han reportado casos donde este último tratamiento no fue efectivo para la Yersiniosis, por el contrario, se generó resistencia ante estos antibióticos (López, 2012). Otras combinaciones evaluadas se han dado utilizando oxitetraciclina y sulfametazina con trimetoprim y sulfonamida, ácido oxolínico y flofenicol (Navais, 2003). Si bien el uso de antibióticos puede contribuir al control de la enfermedad, la constante exposición a las bacterias a estas sustancias puede motivar la generación de cepas resistentes.

Tabla 8.

Reportes de Yersinia ruckeri en el Perú

Lugar	Autor
Junín	Bravo y Kojagura, 2004. Fernández, 2011. Sierralta, 2011. López, 2012. Bueno, 2012. Mateo, 2017.
Puno	Sandoval, et al, (2016). Mamani, 2016. Quispe, 2017.
Huancavelica	Flores, 2013
Lima	Sirvas et al., 2011.Temoche, 2017.
Ancash	Mesías, et al., (2019)
Amazonas	Castro, et al., (2017)

Fuente: Elaboración propia

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

El presente estudio reúne las condiciones de una investigación experimental, a razón de que se evaluaron los efectos producidos por la acción de variables independientes (extractos a partir de macroalgas) sobre variables dependientes (cepas de diferentes biotipos de *Y. ruckeri*).

3.2. Ámbito temporal y espacial

El desarrollo del presente estudio de investigación se llevó a cabo en el marco del proyecto de investigación “Actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria y anti-quorum sensing de macroalgas y líquenes provenientes de la Estación Machu Picchu (Isla Rey Jorge - Antártida) en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos”, en el laboratorio de Biotecnología de la Dirección de Investigación, Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica (DIDITT) del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), ubicado en la Carretera camino a Ventanilla KM 5,2 Callao, durante el periodo de noviembre del 2018 hasta junio del 2019.

3.3. Variables

Variables independientes: extractos a evaluar, obtenidos a partir de las macroalgas.

Variables dependientes: cepas de *Y. ruckeri* (Biotipo 1 y 2)

3.4. Muestra

Las muestras de macroalgas antárticas utilizadas en esta investigación fueron proporcionadas por la Dirección de Asuntos Antárticos del Ministerio de Relaciones Exteriores durante la Expedición Científica Peruana (ANTAR XXIV - 2018), en coordinación con el Instituto Tecnológico de la Producción.

3.5. Instrumentos

3.5.1. Materiales

- Asa de Kolle
- Agua destilada
- Balón de 1000 ml
- Baguetas de vidrio
- Cuchara
- Espátula Drigalsky
- Embudos de vidrio
- Frasco de vidrio (100, 250, 500, 1000 ml)
- Gradilla para tubos Falcón de 50 ml
- Guantes de látex talla “S”
- Guardapolvo
- Hisopos estériles
- Ligas
- Marcador
- Mascarilla
- Micropipeta 0.5 – 10 μ l
- Micropipeta 2 – 20 μ l
- Micropipeta 20 – 200 μ l
- Micropipeta 100 – 1000 μ l
- Microtubos Eppendorf de 0,5, 1,5 y 2,0 ml estériles
- Papel filtro
- Papel Kraft
- Papel toalla
- Papel mantequilla
- Parafilm (Laboratory Film)

- Patrón de turbidez de 0,5 de Mc Farland
- Pipeta Multicanal 200 μ l
- Placas Petri tamaño de 90 mm x 150 mm
- Placas de 96 pocillos
- Rack para microtubo
- Soporte universal
- Soporte de aros con nuez
- Tips sin filtro de 10 μ l, 200 μ l y 1000 μ l estériles
- Tips con filtro de 10 μ l, 200 μ l y 1000 μ l estériles
- Toca
- Tubos de ensayo 100 mm x 13 mm
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Tubos Falcón de 50 ml estériles
- Vaso de precipitados de 100 ml, 250 ml, 600 ml y 1000 ml
- Viales de vidrio de 5 ml

3.5.2. Equipos

- Agitador orbital (TermoScientific)
- Autoclave (Yamato SM 510)
- Balanza analítica, precisión 0,01 mg (Ohaus DV 2014 C),
- Balanza de humedad (Sartorius MA35)
- Campana extractora de gases (The Baker Company, Noys)
- Cabina Workstation (ESCO)
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5804R)
- Congeladora (Frigidaire)
- Estufa de secado (Mettler, Elds)
- Incubadora (Binder)
- Incubadora (MMM group)

- Lector de placas (Bioteck PowerWave XS)
- Mechero Bunsen
- Microscopio (Olympus SC50)
- Molino de cuchillas (Retsch ZM 200)
- Licuadora – blender (Waring)
- Refrigeradora (Frigidaire)
- Rotaevaporador (Heidolph, modelo Laborata 4003)
- Selladora al vacío (Multivac C 100)
- Sonicador (Symphony VWR)

3.5.3. Medios de cultivo

- Agar tripticasa soya (TSA)
- Tryptic Soy Broth (TSB)
- Agar

3.5.4. Reactivos

- Aceite de inmersión
- Alcohol de 70°
- Glicerol
- Peptona
- Reactivos para gram (Cristal violeta, safranina, lugol, alcohol acetona)
- Cloruro de calcio (CaCl₂)
- Tween 80
- Tween 20
- Solución salina al 0,85 %
- Dimetilsulfoxido (DMSO)
- Diclorometano (CH₂Cl₂)
- Acetona (C₃H₆O)
- Metanol (CH₃OH).

- Discos antibióticos:

Sulphamethoxazole/ trimethoprim 19:1 (SXT)

Florfenicol 30 µg (FFC)

Oxytetraciclina 30 µg (OT)

Gentamicina 10 µg (GM)

Amoxicilina 10 µg (AM)

3.6. Procedimientos

3.6.1. Recolección y pre-tratamiento de muestras algales

Las muestras de macroalgas (*D. confervoides* y *H. grandifolius*) fueron recolectadas por el Instituto Tecnológico de la Producción en los alrededores de la Estación Científica Machu Picchu en la Isla Rey Jorge, Antártida, (62°05'27"S, 58°28'12"W) durante la Expedición Científica Peruana (ANTAR XXIV) de enero a marzo del 2018. Las muestras recolectadas fueron lavadas con agua destilada. Luego fueron secadas en una estufa a 40° C, se realizó una premolienda y se empaquetaron al vacío. Finalmente, las muestras fueron trasladadas al ITP.



Figura 21. Recolección de muestras de macroalgas.

Fuente: Proyecto ANTAR XXIV (2018)



Figura 23. H. grandifolius

Fuente: Proyecto ANTAR XXIV (2018)



Figura 22. D. confervoides

Fuente: Proyecto ANTAR XXIV (2018)

3.6.2. Tratamiento primario de muestra algales

Las muestras secas (premolidas) se volvieron a moler en un molino de laboratorio a 16000 revoluciones por minuto (rpm). El material obtenido se pesó y almacenó al vacío en congelación.

3.6.3. Análisis fitoquímico preliminar

Las muestras secas y molidas (25 g de cada matriz) se sometieron a extracción asistida por ultrasonido con metanol (125 ml) en una relación de peso/volumen de 1:5. El extracto fue filtrado y llevado a ensayo fitoquímico.

El rendimiento de extracción (η) para cada solvente se calculó de la siguiente manera:

$$(\eta\%) = (\text{solubilizado}(\text{obtenido})) / \text{biomasa}(\text{proporcionada}) \times 100.$$

El solubilizado(obtenido) (en gramos de peso seco) es la cantidad de material extraído de la biomasa con los diferentes solventes y la biomasa(proporcionada) es la cantidad de biomasa (en gramos) utilizada para realizar la extracción (Álvarez y Félix, 2016).

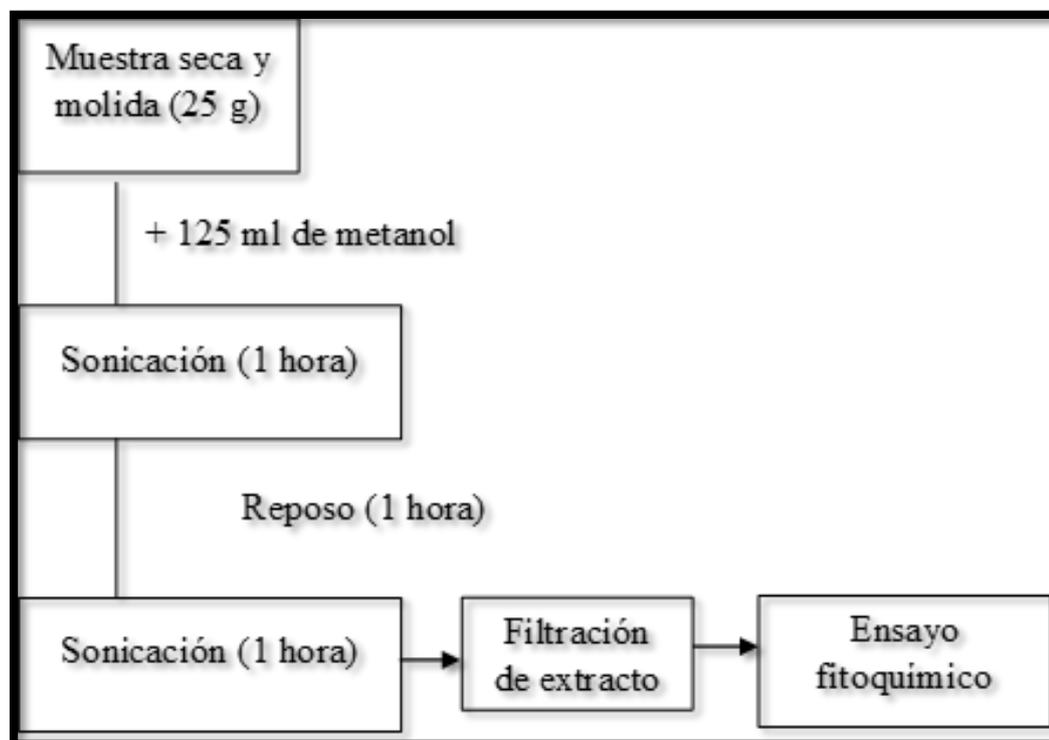


Figura 24. Proceso de obtención de extractos

Fuente: Elaboración propia

En el anexo 3 se detallan las pruebas cualitativas, que fueron realizadas por el Centro de Control Analítico (CCA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

3.6.4. Obtención de extractos naturales

Las algas secas y molidas se sometieron a extracciones sucesivas, utilizando tres solventes orgánicos: Diclorometano (CH_2Cl_2), Acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) y Metanol (CH_3OH). Se utilizó 600 g de muestra molida y se trabajó con cada solvente en una relación de 1:3, luego se llevó la muestra a extracción por ultrasonido durante 1 hora a temperatura promedio entre 20 – 25 ° C.

Posteriormente se realizó la extracción por agitación durante dos horas a 240 rpm (revoluciones por minuto). El extracto en solución obtenido se filtró y se concentró en un rotaevaporador a baja temperatura y presión reducida. Finalmente, el extracto obtenido se dejó en una campana extractora de gases para la evaporación del solvente.



Figura 26. Proceso de filtración del extracto en solución.



Figura 25. Concentración de la muestra en rotaevaporador

Tabla 9.

Condiciones de trabajo en el proceso de extracción con diclorometano para ambas matrices

	Sonicación	Agitación orbital	Recuperación de solvente	Tiempo de cristalización
Tiempo	Una hora	Dos horas	1 hora (600 ml)	Dos semanas
Presión	-	-	300 – 400	-
Temperatura	20 – 24 ° C	Tem. Ambiente	30 ° C	Tem. Ambiente
RPM	-	240	-	-

Tabla 10.

Condiciones de trabajo en el proceso de extracción con acetona para ambas matrices

	Sonicación	Agitación orbital	Recuperación de solvente	Tiempo de cristalización
Tiempo	Una hora	Dos horas	1 hora (300 ml)	tres semanas
Presión	-	-	100 – 300	-
Temperatura	20 – 24 ° C	Tem. Ambiente	30° C - 35 ° C	Tem. Ambiente
RPM	-	240	-	-

Tabla 11.

Condiciones de trabajo en el proceso de extracción con metanol para ambas matrices.

	Sonicación	Agitación orbital	Recuperación de solvente	Tiempo de cristalización
Tiempo	Una hora	Dos horas	2 horas (300 ml)	2 meses
Presión	-	-	70 – 100	-
Temperatura	20 – 24 ° C	Tem. Ambiente	30° C - 35 ° C	35° C
RPM	-	240	-	-

Tabla 12.

Resumen de las extracciones secuenciales para ambas macroalgas

	N° de extracciones secuenciales	
Solvente	<i>H. grandifolius</i>	<i>D. confervoides</i>
Diclorometano	5	6
Acetona	5	5
Metanol	9	9

3.6.5. Solubilización de extractos

Se pesaron 4 mg de los extractos obtenidos (diclorometánicos y acetónicos) y se solubilizaron con 40 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) (figura 33), se agregaron 960 µl de caldo TSB y se obtuvo una solución de trabajo de 4 mg/ml al 4 % de DMSO.

Los extractos metanólicos se solubilizaron en agua (figura 34) (160 mg de extracto más 800 µl de agua estéril), obteniéndose una solución de trabajo de 98 mg/ml. Sin embargo, se observó pequeños precipitados en dos extractos por lo que se agitaron en vórtex durante 5 min y se centrifugó por 5 min a 13 000 rpm. Posteriormente se determinó la concentración del extracto soluble, para lo cual se dispuso 50 µl en una balanza de medición de humedad y se secó a 100 ° C durante 5 minutos. Finalmente se estimó la concentración del extracto de la siguiente manera:

Fórmula utilizada:

$$\% \text{ concentración} = ((W \text{ muestra seca} - W \text{ del plato}) / W \text{ de la muestra}) \times 100$$

3.6.6. Material biológico

3.6.6.1. Características morfológicas de *Y. ruckeri*

Se trabajó con dos cepas bacterianas de *Y. ruckeri*, la cepa de código R3 pertenece a la colección bacteriana del laboratorio de Biotecnología de la DIDITT del ITP y la de código N1 fue cedida por la Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria (Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM). Ambas cepas fueron acondicionadas a temperatura ambiente y sembradas por agotamiento de estrías en placas Petri con agar tripticosa de soya (TSA). Se incubaron a 22 ° C durante 48 h. Se identificaron características morfológicas de forma, borde, superficie, elevación, luz transmitida, consistencia y color.

3.6.6.2. Producción de cepas de trabajo

A partir de un cultivo axénico de cada cepa bacteriana, se seleccionó 3 a 4 colonias de igual tamaño y se volvió a reactivar en 50 ml de caldo de cultivo (TSB) colocándolo en incubación sin agitación durante 24 horas a 22 °C. Seguidamente, cada tubo de cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 7 minutos y se retiró el sobrenadante obtenido, luego se resuspendió el pellet con TSB al 15 % de glicerol y cada 1 ml de mezcla obtenido se dispensó en microtubos, los cuales se almacenaron congelación a – 30 °C hasta la realización del ensayo biológico.



Figura 27. Caracterización cultural de cepas bacterianas.

3.6.6.3. Identificación del biotipo de las cepas de *Y. ruckeri*

Las cepas de *Y. ruckeri* pueden clasificarse en 2 biotipos, biotipo 1 y 2, basados en su capacidad de fermentar el sorbitol, hidrólisis del Tween 20 y Tween 80, como en su motilidad (Toback, 2009). La identificación del biotipo se realizó mediante la hidrólisis del Tween 80 en medio sólido (Anexo 1). Se inoculó 10 µl de cultivo bacteriano overnight de cada cepa bacteriana sobre el medio de cultivo y se incubaron durante 48 h a 22 °C.

3.6.6.4. Evaluación de sensibilidad a antibióticos

Se empleó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer según el INS (2002), Las cepas de *Y. ruckeri* fueron reactivadas en medio TSA e incubadas a 22 °C. A partir de un cultivo

axénico de cada muestra, se retiró un inóculo y se realizó una suspensión bacteriana en solución salina estéril al 0,85 % hasta obtener una turbidez del 0,5 de la escala de Mc Farland (equivalente a 1×10^8 UFC, unidades formadoras de colonia). Posteriormente, las muestras se hisoparon en medio TSA y se colocaron los discos de antibióticos con pinzas estériles, ejerciendo una leve presión para que el disco pueda adherirse al medio de cultivo (figura 28).

Los antibioticos evaluados fueron:

- Sulphamethoxazole/ trimethoprim 19:1 (SXT)
- Florfenicol 30 μg (FFC)
- Oxytetraciclina 30 μg (OT)
- Gentamicina 10 μg (GM)
- Amoxicilina 10 μg (AM)

Se consideró según el INS (2002), que la distancia entre discos debe ser como mínimo 25 mm, finalmente se incubó durante 24 horas a 22 °C.

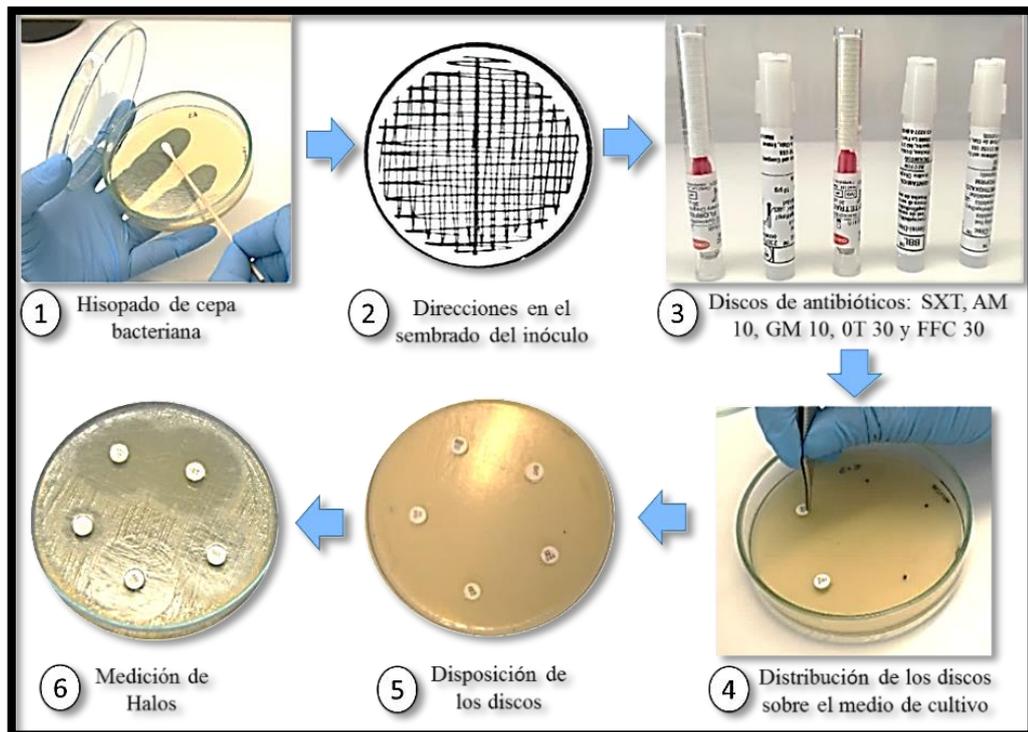


Figura 28. Diagrama de la evaluación de sensibilidad antibiótica

Fuente: Elaboración propia

3.6.7. Evaluación antibacteriana

3.6.7.1. Preparación de inóculo bacteriano

Se reactivaron las cepas bacterianas en TSB y se dejó incubar a 22 °C por 24 horas. Posteriormente se hizo la siembra en estrías por agotamiento en placas con TSA para su verificación. Las cepas bacterianas utilizadas fueron R3 (biotipo 1) y N1 (biotipo 2).

A partir de un cultivo axénico de cada muestra, se retiró un inóculo y se realizó una suspensión bacteriana en solución salina estéril al 0,85 % hasta obtener una turbidez del 0,5 de la escala de Mc Farland (equivalente a 1×10^8 UFC, unidades formadoras de colonia). Luego, se realizó una dilución para obtener un inóculo bacteriano de 1×10^7 UFC (Anexo 2).

3.6.7.2. Microdilución en caldo

Se empleó el método de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos (figura 45). Se utilizó caldo TSB como medio de cultivo. En las placas se colocaron las diluciones seriadas de los extractos naturales y 10 μ l del inóculo bacteriano.

Los extractos diclorometánicos y acetónicos que fueron solubles en DMSO se evaluaron a partir de 2 mg/ml, debido que el DMSO no debe exceder del 2 % de volumen total. Los extractos metanólicos que fueron solubles en agua, se evaluaron a partir de 96 mg/ml.

Las placas se incubaron a 22 °C durante 24 horas, luego a la longitud de onda de 600 nm se midió la densidad óptica para determinar la CMI y el porcentaje de inhibición según Banjara et al. (2007).

Para determinar la CMB, se realizó una siembra por extensión a partir de un pocillo al azar (100 μ l) por cada concentración evaluada (figura 44), se realizó una extensión uniforme con una espátula Drigalski sobre la superficie del medio de cultivo (TSA), con la finalidad de determinar a qué concentración el extracto presenta un efecto bactericida.



Figura 30. Evaluación antibacteriana

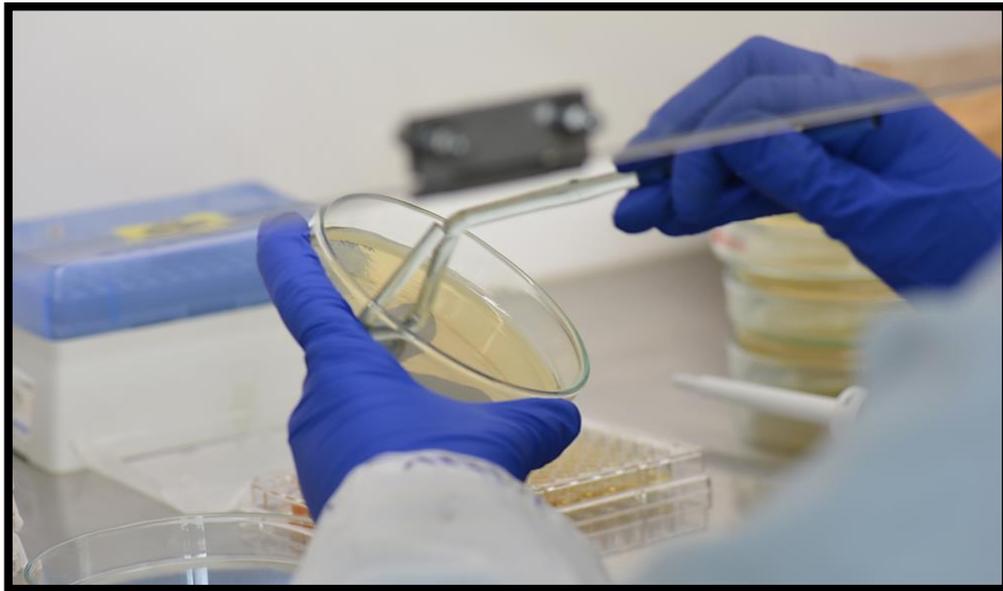


Figura 29. Siembra por extensión.

3.7. Análisis de datos

Para el procesamiento de datos se utilizó el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, con descripción IBM SPSS Statistics 21.0). Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (de William Kruskal y W. Allen Wallis) para determinar si existe o no diferencia significativa a un nivel de confianza del 95%. Para la realización de gráficos de barra se empleó Excel 2016.

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis fitoquímico preliminar

Según el análisis fitoquímico realizado para esta investigación se encontraron los siguientes metabolitos secundarios en ambas macroalgas evaluadas, los cuales se detallan en la tabla 13.

Tabla 13.

Metabolitos secundarios presentes en H. grandifolius (H) y D. confervoides (D)

Metabolito	Ensayo cualitativo	Resultados	
		H	D
Antocianinas	Prueba cualitativa	++	+
	Reacción de Dragendorff	-	-
Alcaloides	Reacción de Mayer	-	-
	Reacción de Wagner	-	-
Lactonas	Reacción de Baljet	++	++
Flavonoides	Reacción de Shinoda	+	++
Aminoácidos	Reacción de Ninhindrina	+	-
Cardenólidos	Reacción de Kedde	+	-
Esteroides	Reacción de Liebermann-Burchard	+	+
Saponinas	Reacción de espuma	-	-
Taninos	Reacción de cloruro férrico	++	+
Triterpenos	Reacción de Liebermann-Burchard	+	+
Azucares reductores	Reacción de Fehling	-	++
Fenoles	Reacción de cloruro férrico	++	+

(+++) Muy abundante. (++) Abundante. (+) Moderado. (+/-) Escaso. (-) Ausencia

4.2. Obtención de extractos naturales

A partir de la extracción secuencial con tres solventes diferentes se obtuvieron: 9 extractos y 3 precipitados (Tabla 14).

Tabla 14.

Extractos y precipitados obtenidos.

Solvente	Especie	
	<i>H. grandifolius</i>	<i>D. confervoides</i>
Diclorometano	DH	DD
Acetona	AH	AD
	PH1	PD1
	MH1	PD2
Metanol	MH2	MD1
	MH3	MD2

D: diclorometano, A: acetona, M: metanol, P: precipitado.

Los rendimientos de extracción para *H. grandifolius* se detallan en la tabla 15; para *D. confervoides* en la tabla 16.

Tabla 15.

Rendimiento de extracción con los tres solventes utilizados para H. grandifolius

	<i>H. grandifolius</i>			
	Solubilizado (g)	Biomasa (g)	Rendimiento (%)	
Extracto diclorometánico	6,74	600	1,123	
Extracto acetónico	34,77	600	5,795	
	PH1(*)	58,52	600	9,753
Extracto metanólico	MH1	10,59	600	1,765
	MH2	37,9	600	6,3
	MH3	21,32	600	3,41

* Precipitado que quedó retenido al momento de la filtración en la obtención de los extractos.

A partir de la extracción con metanol se obtuvieron 3 extractos (figura 31) y un precipitado. Inicialmente, al finalizar las extracciones (7 extracciones secuenciales), se filtró el extracto obtenido y se obtuvo un precipitado (PH1) que quedó en el papel filtro y el extracto soluble se llevó a concentrar en un rotaevaporador.

El extracto concentrado se dejó durante 4 semanas en refrigeración. Transcurrido ese tiempo se observó la formación de dos fases: fase 1 (primera formación de cristales, MH1) en estado sólido y una fase 2 (sobrenadante) en estado líquido. Posteriormente, con la finalidad de acelerar la evaporación del solvente por acción del calor, el sobrenadante se colocó dentro de una estufa a 35 °C. Nuevamente se observaron dos fases y se separaron al igual que en procedimiento anterior, de este modo se obtuvieron los segundos cristales (MH2) más un segundo sobrenadante, del cual se formaron los terceros cristales (MH3).

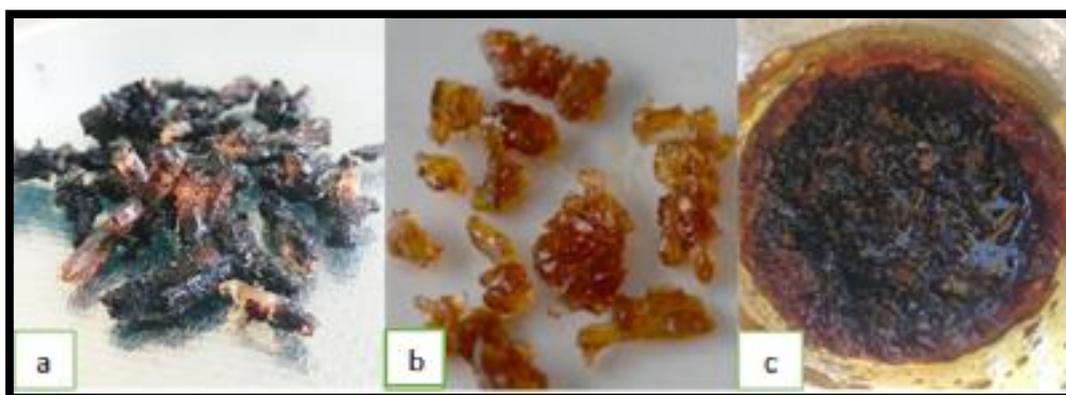


Figura 31. Extractos metanólicos de *H. grandifolius*. MH1 (a), MH2 (b) y MH3 (c).

Tabla 16.

Rendimiento de extracción con los tres solventes utilizados para D. confervoides

<i>D. confervoides</i>				
		Solubilizado	Biomasa	Rendimiento
		(g)	(g)	(%)
Extracto diclorometánico		24,17	600	4,03
Extracto acetónico		18,09	600	3,015
	PD1*	22,74	600	3,79
Extracto metanólico	PD2*	16,89	600	2,815
	MD1	2040	600	3,4
	MD2	42	600	7

* Precipitado que se formó en la obtención de extractos (no se evaluó su actividad antibacteriana).

En la obtención de extractos metanólicos de *D. confervoides* se obtuvieron dos precipitados, el primero (PD1) se formó al finalizar la séptima extracción (a partir de la filtración del extracto concentrado) y el segundo (PD2) al finalizar el proceso de extracción (9 extracciones secuenciales). En *D. confervoides* el proceso de formación de cristales fue el mismo que en la *H. grandifolius*, con la diferencia que esta vez solo se obtuvieron dos extractos metanólicos (MD1 y MD2) (figura 32). Al finalizar la obtención de los extractos, estos fueron empacados al vacío y almacenados en congelación (-20 °C) hasta su evaluación.

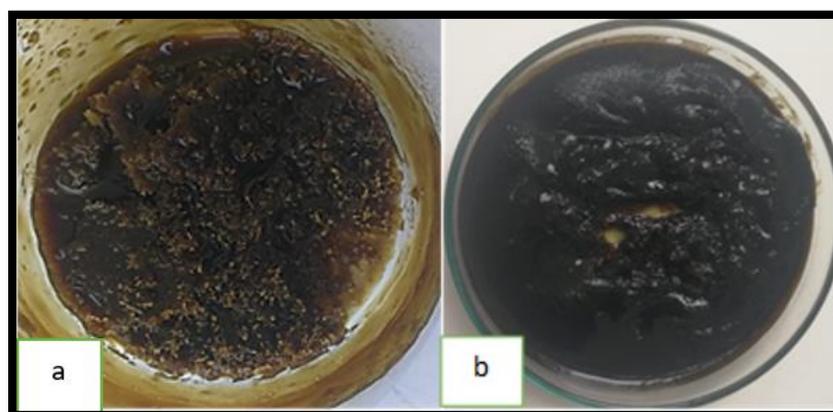


Figura 32. Extractos metanólicos de *D. confervoides*. MD1 y MD2

4.3. Solubilización de extractos

De los 9 extractos obtenidos, 5 de ellos presentaron solubilidad en agua (figura 34); 3 en DMSO (figura 33) y 1 extracto más los precipitados formados no fueron solubles bajo ningún sistema evaluado (tabla 17).

Tabla 17.

Solubilidad de extractos.

Solubles en agua	Solubles en DMSO	No se lograron solubilizar
MH1	DH	AH
MH2	DD	PH1
MH3	AD	PD1
MD1		PD1
MD2		

*El extracto AH, no es soluble bajo ningún sistema evaluado (figura 47). Se probó la solubilidad con el mismo solvente de extracción, además de, otros solventes de polaridad semejante (Anexo 4). De igual forma, los 3 precipitados obtenidos no se lograron solubilizar, por lo que no se les consideró para realizar las evaluaciones antibacterianas.

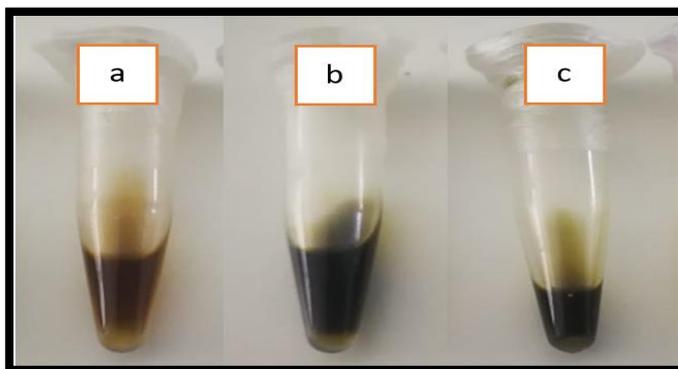


Figura 33. Extractos solubles en DMSO. DH (a), DD (b) y AD (c).

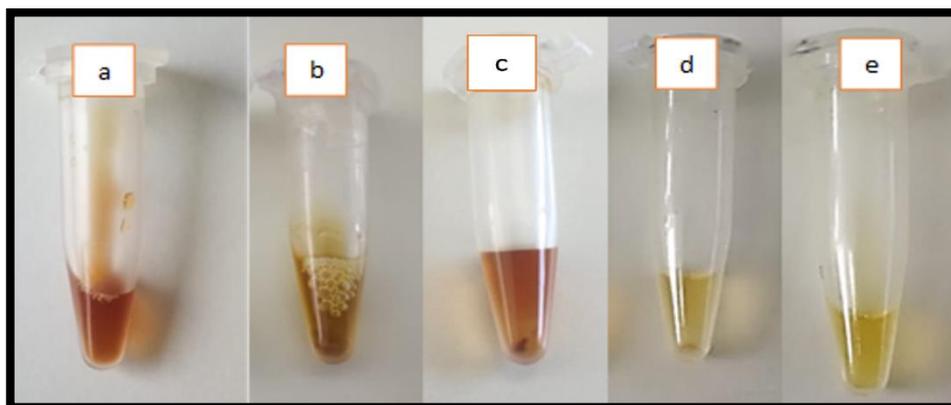


Figura 34. Extractos solubles en agua. MH1(a), MH2(b), MH3(c), MD1(d) y MD2(e)

Los extractos que se lograron solubilizar fueron evaluados a concentraciones diferentes dependiendo del tipo de sistema utilizado para su solubilización. Los extractos diclorometánicos y acetónico se solubilizaron en DMSO y la concentración máxima presente en la solución de trabajo de este solvente debe ser 2 mg/ml al 2 % de DMSO. En contraste, los extractos metanólicos fueron solubles en agua y la concentración mayor utilizada fue de 96 mg/ml (tabla 18).

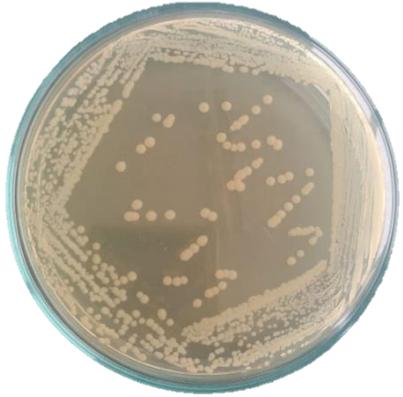
Tabla 18.

Concentración de los extractos solubilizados para evaluación antibacteriana.

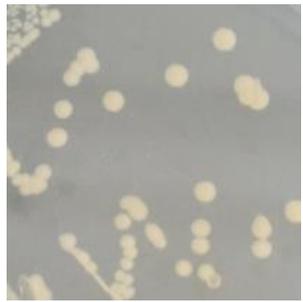
Extracto	Concentración de trabajo	Concentración a evaluar
DH	4 mg/ml	2 mg/ml
MH1	96 mg/ml	96 mg/ml
MH2	98.04 mg/ml	96 mg/ml
DD	4 mg/ml	2 mg/ml
AD	4 mg/ml	2 mg/ml
MD1	98.08 mg/ml	96 mg/ml
MD2	98.4 mg/ml	96 mg/ml

4.4. Obtención y preservación de muestras bacterianas

4.4.1. Características culturales de cepas de *Y. ruckeri*, (N1)

Placa con medio base TSA <i>Yersinia ruckeri</i>	Colonia en TSA <i>Yersinia ruckeri</i>	Características en TSA	
 <p><i>Figura 35. Y. ruckeri</i> en TSA, cultivo de 48 h</p>	 <p><i>Figura 36. Y. ruckeri</i> en TSA, cultivo de 48 h</p>	Morfología	Cepa
		Tamaño	2,5 mm
		Forma	Circular
		Borde	Redondeado
		Superficie	Lisa
		Elevación	Plana
		Luz transmitida	Opaca
		Consistencia	Blanda
		Color	Crema

4.4.2. Características culturales de cepas de *Y. ruckeri*, (R3).

Placa con medio base TSA Cepa: R3	Colonia en TSA Cepa: R3	Características en TSA	
 <p><i>Figura 37. R3</i> en TSA, cultivo de 48 h</p>	 <p><i>Figura 38. R3</i> en TSA, cultivo de 48 h</p>	Morfología	Cepa
		Tamaño	3 mm
		Forma	Circular
		Borde	Redondeado
		Superficie	Lisa
		Elevación	convexo
		Luz transmitida	Opaca
		Consistencia	Blanda
		Color	Crema

4.4.3. Identificación del biotipo de las cepas de *Y. ruckeri*

Descripción de los biotipos

Para la determinación del biotipo se realizó las pruebas de hidrólisis enzimática del Tween 80 y motilidad en gota pendiente.

La cepa R3, presenta halos de precipitación (figura 40) lo cual indica que hidrolizó el Tween 80 además presentó motilidad por lo que corresponde al biotipo 1. En contraste, la cepa N1, no presenta halos de precipitación ni es motil por lo que corresponde al biotipo 2 (figura 41).



Figura 40. Prueba de biotipo para la cepa N1.



Figura 39. Prueba de biotipo para la cepa R3.

4.4.4. Evaluación de sensibilidad a antibióticos

Se realizó una evaluación de sensibilidad de las cepas de *Y. ruckeri*, N1 y R3 frente a 5 antibióticos (Tabla 19). Los resultados se interpretan de acuerdo la medición de la formación de halos de inhibición (figura 42).

Tabla 19.

Inhibición de los discos de antibióticos contra las cepas evaluadas

Disco de Antibiótico	Diámetro de inhibición (mm)	
	R 3	N1
SXT	25	28
AM 10	28	35
GM 10	17	20
OT	37	42
FFC	37	40

Sulphamethoxazole/trimethoprim 19:1 (SXT), Florfenicol 30 μ g (FFC), Oxytetracyclina 30 μ g (OT), Gentamicina 10 μ g (GM) y Amoxicilina 10 μ g (AM)

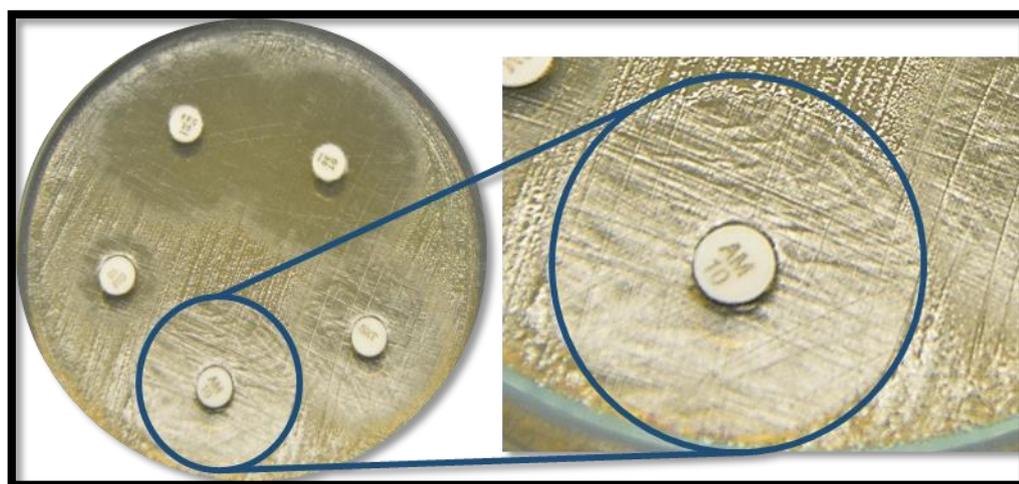


Figura 41. Halos de inhibición

De acuerdo a los parámetros de lectura de halos de inhibición (Tabla 20) las cepas evaluadas (N1 y R3) son consideradas como cepas muy sensibles, puesto que, presentan halos de inhibición mayores a 17 mm.

Tabla 20.

Parámetros de lectura de halos de inhibición y su interpretación

Interpretación	Abreviatura	Halo de inhibición
Resistente	R	≤ 7 mm
Sensibilidad media	M	$\leq 8 - 11$ mm
Sensible	S	$\geq 12 - 16$ mm
Muy sensible	MS	≥ 17 mm

Fuente: CISIPA (2017). Basado en disposiciones internacionales del National Committee for Clinical Laboratory Standards de USA (NCCLS)

4.4.5. Evaluación antibacteriana

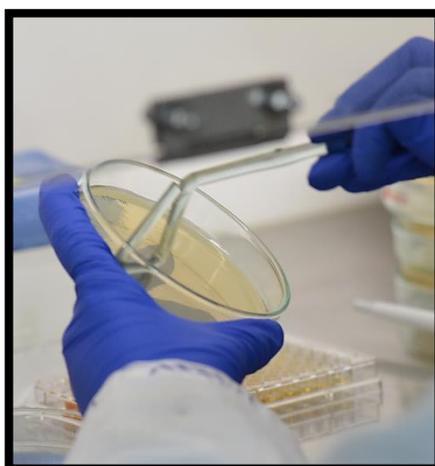


Figura 43. Siembra por extensión

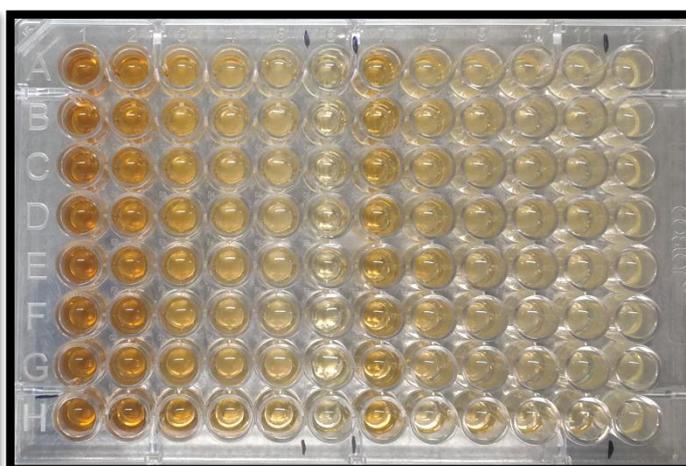


Figura 42. Microdilución en placa

La CMI es la mínima concentración del extracto que, en un determinado período de tiempo, fue capaz de inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas evaluadas. Del mismo modo, la CMB es la mínima concentración del extracto que, en un período de tiempo es capaz de matar al 99,9 % crecimiento de las cepas bacterianas evaluadas (figura 45). Los

extractos diclorometánicos y acetónicos, fueron evaluados a concentraciones seriadas (2, 1 y 0,5 mg/ml) y no presentaron actividad antibacteriana frente a ninguna cepa de *Y. ruckeri*.

La CMI y CMB de los extractos evaluados frente a ambas cepas de *Y. ruckeri* (N1 y R3) se muestran en la tabla 21.

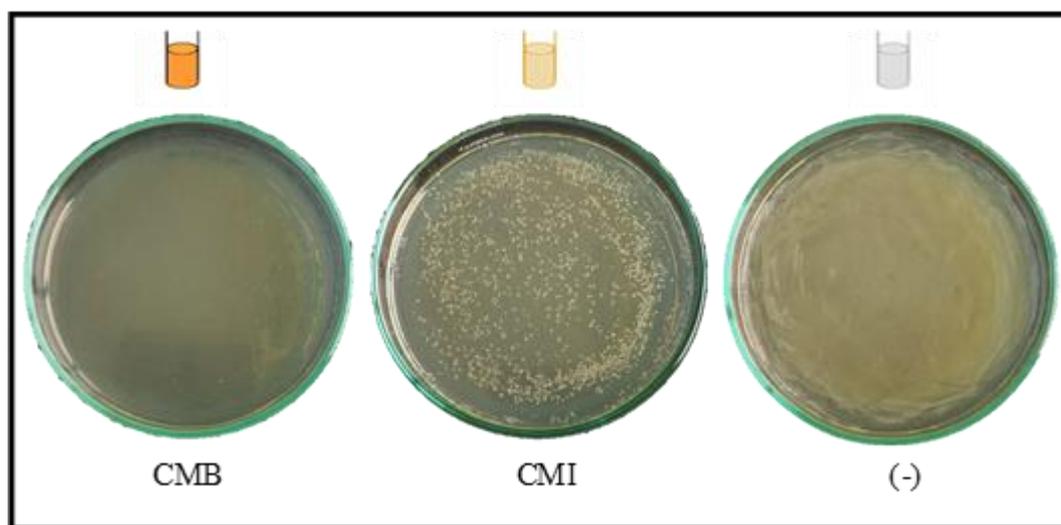


Figura 44. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Fuente: Elaboración propia

Tabla 21.

Resultado de los ensayos de la actividad antibacteriana de los extractos crudos obtenidos de las macroalgas

Especie	Extracto	N1	R3
	Diclorometánico	NP	NP
	Metanólico - 1	Actividad	Actividad
	Metanólico - 2	Actividad	Actividad
<i>Himantothallus grandifolius</i>	Metanólico - 3	Actividad	Actividad
	Diclorometánico	NP	NP
	Acetónico	NP	NP
<i>Desmarestia confervoides</i>	Metanólico - 1	Actividad	Actividad
	Metanólico - 2	Actividad	Actividad

NP: No presenta actividad antibacteriana - Actividad: Presenta actividad antibacteriana.

Tabla 22.

Resultados de los ensayos de la actividad antibacteriana de los extractos crudos metanólicos

	R3			N1		
	Concentration (mg/ml)					
	96	48	24	96	48	24
MH1	CMB	CMI	-	CMB	CMI	-
MH2	CMI	-	-	CMI	-	-
MH3	CMB	CMI	-	CMB	CMI	-
MD1	CMI	-	-	CMI	-	-
MD2	CMI	-	-	CMI	-	-

Se obtuvieron 9 extractos crudos, de los cuales únicamente 5 de ellos (obtenidos con metanol) fueron activos frente a *Y. ruckeri* (Biotipo 1 y 2). Los extractos fueron evaluados en concentraciones seriadas a partir de 96 mg/ml siendo la menor concentración 6 mg/ml en cada pocillo. Los extractos de *H. grandifolius* fueron los más efectivos (96 mg/ml) inhibiendo el 100 % del crecimiento bacteriano.

Tabla 23.

Resultados del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos frente a Y. ruckeri (Biotipo 2)

	Concentración del extracto evaluado				
	96 mg/ml	48 mg/ml	24 mg/ml	12 mg/ml	6 mg/ml
MH1	100 %	71,9 %	38,2 %	23 %	21,8 %
MH2	98,8 %	30,1 %	28,3 %	21,3 %	14,9 %
MH3	100 %	93,8 %	5,4 %	7,3 %	5,1 %
MD1	95 %	64,9 %	19,6 %	6,4 %	0 %
MD2	98 %	22,5 %	15,1 %	6,4 %	5 %

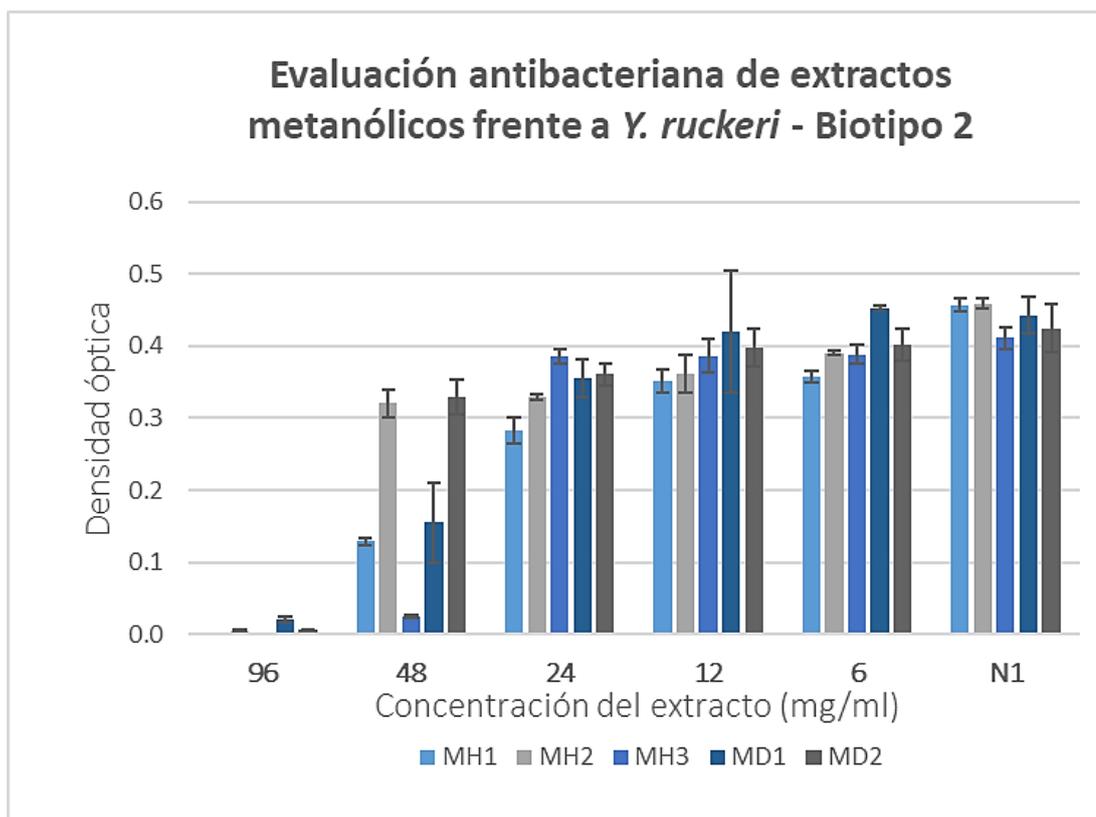


Figura 45. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos con la cepa N1 (Biotipo 2), *Y. ruckeri*.

Tabla 24.

Resultados del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos frente a *Y. ruckeri* (Biotipo 1)

	Concentración del extracto evaluado				
	96 mg/ml	48 mg/ml	24 mg/ml	12 mg/ml	6 mg/ml
	mg/ml				
M.H1	100 %	66,2 %	35,9 %	23 %	12,8 %
M.H2	98,5 %	43,8 %	29,1 %	20,2 %	14,2 %
M.H3	100 %	45,3 %	11,4 %	12,6 %	8,1 %
M.D1	92 %	26,1 %	1,1 %	0 %	0 %
M.D2	93 %	40,1 %	17,9 %	0 %	0 %

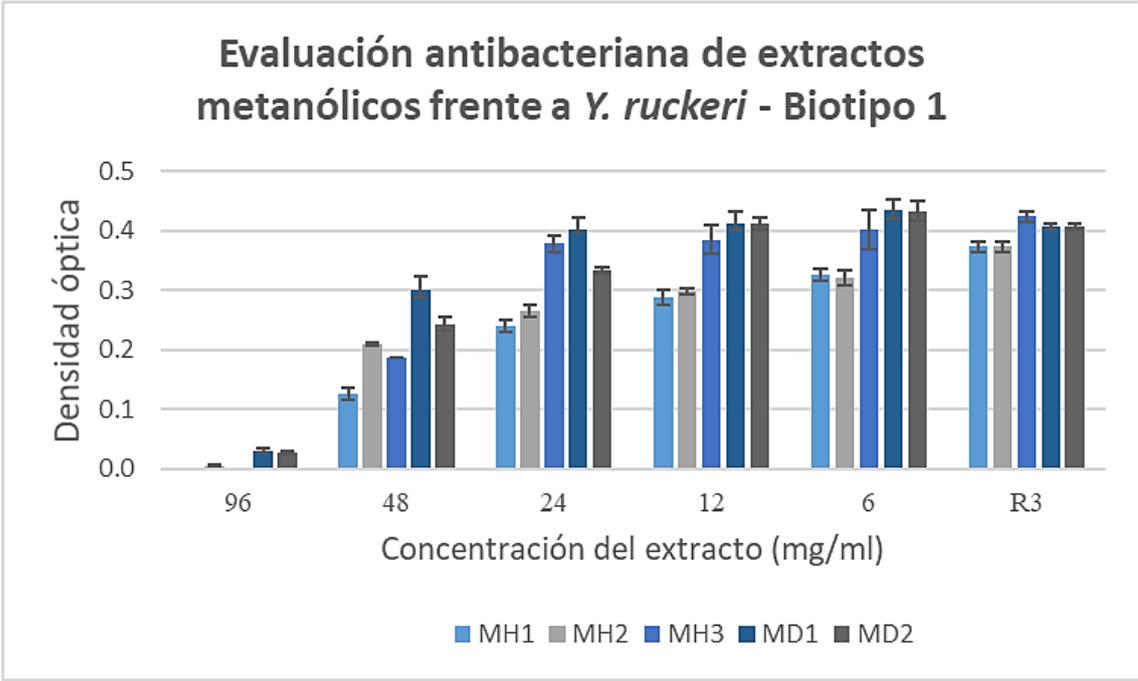


Figura 46. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos con la cepa R3 (Biotipo 1), *Y. ruckeri*.

V. DISCUSIÓN

En el trabajo se demostró que los extractos crudos de las macroalgas antárticas *H. grandifolius* y *D. confervoides* producen compuestos bioactivos con propiedad antibacteriana frente a las cepas de *Y. ruckeri* (Biotipo 1 y 2). Actualmente no existen estudios previos acerca de la capacidad antibacteriana de las macroalgas evaluadas, sin embargo, existen investigaciones que demuestran la producción de diferentes tipos de metabolitos secundarios con potencial antibacteriano en otras macroalgas frente a *Y. ruckeri*.

En esta investigación se obtuvieron 9 extractos crudos (2 diclorometánicos, 2 acetónicos y 5 metanólicos), de los cuales únicamente los extractos metanólicos presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas de *Y. ruckeri*. Este hallazgo es similar a lo reportado por Bansemir et al. (2006), quienes examinaron la actividad antibacteriana de extractos diclorometánicos, metanólicos y acuosos de las macroalgas cultivadas: *Asparagopsis armata*, *Falkenbergia rufolanosa*, *Gracilaria cornea* y *Halopitys incurvus* frente a *Y. ruckeri*. En este estudio los autores indicaron que el extracto diclorometánico, en comparación al extracto metanólico fue el más efectivo frente a *Y. ruckeri*, lo cual es similar a los resultados presentados por Cortés et al. (2014), quienes investigaron la actividad antimicrobiana de un extracto diclorometánico y etanólico del alga roja *Ceramium rubrum* contra *Y. ruckeri*. Aunque los autores reportaron que ambos extractos evaluados, tanto etanólico, como diclorometánico inhibieron el crecimiento de *Y. ruckeri*, se menciona que la actividad antibacteriana más alta se logró con el extracto diclorometánico.

Si bien los autores antes mencionados reportan resultados positivos frente a *Y. ruckeri*, lo cual es comparable con nuestros hallazgos, existe una diferencia con respecto a los extractos de mayor efectividad. En ambos casos se utilizaron solventes de mayor y menor polaridad (metanol y diclorometano), a pesar de ello, en nuestro estudio se encontró que solamente el extracto metanólico presentó actividad antibacteriana, mas no el extracto

diclorometánico. Probablemente esta diferencia sea debido al tipo de macroalgas utilizadas, pues los autores mencionados utilizaron algas rojas que posiblemente poseen metabolitos secundarios solubles en diclorometano, en cambio en nuestro estudio se trabajó con algas pardas, que aparentemente tienen metabolitos secundarios con propiedad antibacteriana solubles en metanol, lo cual se confirmó mediante el análisis fitoquímico, en el que se evidencia la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y triterpenos.

Por otro lado, las pruebas de actividad antibacteriana se realizaron mediante el método de difusión en agar, a diferencia de nuestro estudio donde se utilizó el método de microdilución en caldo. Bansemir et al. (2006) trabajaron con discos de 2 mg y con ello reportaron halos de inhibición de 15.3 mm, mientras que Cortés et al. (2014) trabajando con discos de 1 mg encontraron halos de inhibición de 14 mm. Ambos autores consideran que los extractos evaluados tienen un alto porcentaje de efectividad en relación al antibiótico utilizado como control positivo (Oxytetracycline 20 µg/disc) que obtuvo halos de inhibición de 14,5 mm de diámetro.

Por su parte, Martínez et al. (2002) evaluaron extractos metanólicos de macroalgas pardas del Caribe colombiano, donde reportaron que: *Dictyota bartayresiana*, *Dictyota pulchella* y *Padina boergesenii* presentaron actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas (*S. aureus*) y ninguna fue activa contra cepas Gram negativas (*Escherichia coli*), lo que ya había sido mencionado por De Lara et al. (1995), quienes reportaron que las bacterias Gram positivas (*S. aureus*) fueron más susceptibles a los extractos algales activos que las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Enterobacter* sp). Del mismo modo, Algaser et al. (2013) evaluaron extractos metanólicos de macroalgas pardas de las costas de Libia y mencionan que las bacterias Gram (-) son más resistentes, confirmando lo reportado por Castro (1997), quien estudió el efecto antibacteriano del alga parda *Sargassum sinicola* e indicó que los extractos de *S. sinicola* únicamente inhibieron el crecimiento de *Bacillus subtilis*, recalcando que esta bacteria es una Gram (+).

En contraste, Ríos, et al., (2009) evaluaron extractos de macroalgas de la zona tropical de Venezuela, donde evaluaron macroalgas rojas, verdes y pardas. Los autores encontraron extractos con alta actividad (+) antibacteriana contra cepas Gram (-) de *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* en comparación a una baja (-) actividad antibacteriana en *S. aureus*, Gram (+).

Cabe mencionar que las macroalgas utilizadas por estos autores fueron recolectadas en regiones tropicales y sub tropicales (a diferencia de nuestro estudio), entonces la diferencia de sensibilidad entre bacterias Gram (+) y Gram (-) sea probablemente a la naturaleza química del extracto (Pesando y Caram, 1984). En ese mismo orden de ideas, Castro (1997) hace referencia a que las macroalgas, indistintamente de pertenecer a la misma familia, no presentan la misma actividad antibacteriana cuando han sido recolectadas en distintos puntos geográficos, presumiblemente esto se deba a que existen además otros factores que afectan las propiedades bioactivas de las algas, tales como la estación del año en que fueron recolectadas, las variaciones climáticas de su medio natural y del estado reproductivo del alga (Martínez et al., 2002).

Desde otro punto de vista, Vlachos, et al., (1996) consideran que la efectividad de algunos extractos de algas dependerá en gran medida al solvente que se utilice y de las variables aplicadas en el proceso. Soto y Rosales (2016), mencionan que el uso de etanol, metanol y acetona, como solventes de extracción con mejores resultados. Sin embargo, Capriotti et al. 2014, consideran que la efectividad y el rendimiento de los extractos dependerá de la composición química de los compuestos a extraer, así como de factores como la concentración del solvente, temperatura, tiempo de contacto, tamaño de partícula y relación masa-solvente.

En nuestro estudio el extracto con mejor rendimiento y efectividad antibacteriana fue el extracto metanólico (teniendo en cuenta que el método utilizado fue la extracción convencional con solventes), lo cual es similar al hallazgo de Osuna, et al., (2016), quienes evaluaron dos extractos utilizando dos solventes: acetona y metanol, donde

mencionan que el extracto metanólico mostró un halo de inhibición mayor comparado con el extracto de acetona, en cambio, De Lara, et al., (1995) encontraron una mejor respuesta antibiótica en general utilizando acetona, en comparación a evaluaciones efectuados con etanol u otro solvente de mayor polaridad (metanol) lo que ya había sido mencionado por Rosell y Srivastava (1987).

García, et al., (2012) encontraron que extractos algales obtenidos con metanol poseían alta actividad antibacteriana, en dicho estudio los autores hacen referencia a que los compuestos responsables de la actividad antibacteriana fueron los compuestos fenólicos, lo cual ya había sido reportado por Maximiliem et al., (1998), a su vez estos reportes concuerdan con lo mencionado por Nylund et al., (2008) y Osuna, et al., (2016) quienes señalan que la efectividad de los compuestos bioactivos de los extractos de algas presumiblemente estén relacionados al contenido de compuestos fenolicos (ej. taninos, flavonoides, terpenos futranona y algunos ácidos grasos). Estos estudios dan mayor veracidad a nuestros resultados, puesto que, los metabolitos secundarios encontrados en esta investigación son fenoles, flavonoides, triterpenos y taninos.

Por su parte, Gonzales del Val et al., (2001) afirman que estos metabolitos secundarios presentan una mayor solubilidad en solventes orgánicos polares, por lo que recomienda utilizar sistemas para la obtención de extractos de algas utilizando mezclas acuosas de metanol y etanol.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que los extractos obtenidos (extractos metanólicos) de *Himantotallus grandifolius* y *Desmarestia confervoides* producen compuestos bioactivos (especialmente grupos fenólicos), que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas del Biotipo 1 y 2 de *Yersinia ruckeri*.

Utilizando el método de microdilución en caldo se demostró que los extractos evaluados a concentraciones seriadas a partir de 48 mg/ml tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas evaluadas, concluyendo que 48 mg/ml es la concentración mínima inhibitoria (MCI).

En ese mismo orden de ideas se encontró y demostró que los extractos algales a concentraciones de 96 mg/ml inhibe al 100% el crecimiento de las cepas bacterianas evaluadas, por lo tanto, se concluye también que, esta es la concentración mínima bactericida (MCB)

Los resultados obtenidos en esta investigación, en conjunto con previos estudios sobre la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, demuestran que las macroalgas son una fuente potencial de compuestos bioactivos con actividad antibacteriana que pueden ser empleados en tratamientos de enfermedades bacterianas, además de, hongos, virus, y otros patógenos.

VII. RECOMENDACIONES

Es necesario aislar e identificar químicamente las sustancias presentes en los extractos crudos obtenidos en esta investigación, de esta manera poder medir y evaluar su actividad con mayor precisión, para lo cual es importante buscar el principio activo de la actividad a nivel de molécula y no de extracto.

Además, se recomienda seguir realizando estudios posteriores orientados a la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de origen natural, ya que muchos organismos marinos existentes aún no han sido estudiados.

VIII. REFERENCIAS

- Alóz, J. (2014). *Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global*. Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Europea de Madrid, Villaviciosa de Odón, Madrid, España.
- Algaser, R., Whida, F., Abduelrhman, E., Gammoudi, F. y Azawai, S. 2013. Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. *Natural Science*, 5(1): 7-14
- Alvarez, F., Korbee, N. y Figueroa, F. (2016). *Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods*. Department of Ecology and Geology, Faculty of Sciences, International Campus of Excellence Andalucía Tech, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain.
- Angulo, F. (2000). Agentes antimicrobianos en Acuicultura: impacto y potencial en la salud pública. *Enf Infec Microbiol 2000*; 20 (6)
- Austin, B. y Austin, D. (2007). *Bacterial fish pathogens-diseases of farmed and wild fish*. Springer-Verlag, 2nd Edn., 188-226.
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145, 2009 ISSN: 1989-3620.

- Azuola, R., y Vargas-Aguilar, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Revista Tecnología En Marcha*, 20(4). Recuperado a partir de https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/449.
- Bansemir, A., Blume, M., Schroder, S., y Lindequist, U. (2006). Selección de algas marinas cultivadas para la actividad antibacteriana contra bacterias patógenas de peces. *Acuicultura*, 252, 79-84. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.051
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2005). *Algae second edition anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Instituto de Biofísica, Pisa, Italia.
- Barattini, P. (2012). *Antibióticos en acuicultura*. Boletín INIA N° 223. ISSN 0717-4829. Coyhaique, Chile, 2012.
- Bernal, A. (2013). Extracción líquido-líquido. Química orgánica. Acceso disponible en: <http://riubu.ubu.es/bitstream/10259.3/62/3/20.3%20-%20Extracci%C3%B3n%20de%20C3%ADquido-1%C3%ADquido.pdf>
- Bernal, R. y Guzmán, U. (1984). El antibiograma de Discos. Normalización de la Técnica de KIRBY-BAUER. *BIOMEDICA Vol. 4*, No. 3 y 4 – 1984. Universidad Nacional de Colombia.
- Borowitzka M. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* 25: 743–756.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi S. y Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161:839-851

- Bravo, S. y Kojagura, V. (2004). First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 24(2) 2004, 104
- Bruce, D. y Duff, D. (1967). The identification of two antibacterial products of the marine planktonic alga *Isochrysis galbana*. *Journal of Genetic Microbiology* 48:293-298.
- Bueno, H. (2012). *Caracterización Fenotípica y Molecular de Cepas de Yersinia ruckeri Aisladas de Oncorhynchus mykiss, del Centro Piscícola "El Ingenio" – Huancayo. Memoria para optar al título profesional de Biólogo Microbiólogo y Parasitólogo*. Lima, Perú. Facultad de Ciencias Biológicas. E. A. P. de Microbiología y Parasitología. U. Nacional Mayor de San Marcos. 75p
- Bullock G, (2004). Enteric redmouth disease of salmonids. *Fish Dis Leaflet* 2004; 82:1-8.
- Calderón, Ó., Visoso, S., De la Rosa, I., Acosta, J. y Jiménez, B. (2014). *Efecto antimicrobiano de tres tipos de algas marinas contra el E. faecalis*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Capriotti, A.L.; Cavaliere, C.; Crescenzi, C.; Foglia, P.; Nescatelli, R.; Samperi, R.; y Lagana, A. (2014). Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Wood Chemistry* 158:392-400.
- Carrion, A. y Garcia, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica*. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímica y Farmacéutica. Cuanca, Ecuador. 2010.

- Castro, P. y Huber, M. (2005). *Biología Marina*. (6ta edición). Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2007. Pp. 108,109.
- Castro, T., Peña, C. y E. Mateo. (2014). first report of viral diseases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Perú. *The Biologist*. 1: 67-75.
- Chía, R. (1997). *Efectividad de dos vacunas Nacionales para la prevención de la Yersiniosis causada por la cepa atípica de Yersinia Ruckeri en Salmo Salar*. Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA. Universidad Austral de Chile.
- Chinou, I. (2008). *Primary and secondary metabolites and their biological activity*. En: WaksmundzkaHajnos M, Sherma J, Kowalska T (Eds) *Thin layer chromatography in phytochemistry*, pp. 59-76. CRS Press, Boca Raton
- Colina, R. (2016). *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco)*. TESIS Para optar el Título Profesional de Químico. Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM.
- Concha, A. (1998). *Caracterizacion bioquimica, electroforetica y sensibilidad antibiotica de cepas de Yersinia ruckeri aisladas desde Salmon del Atlantico (Salmo salar)*. [tesis de bachiller]. Universidad Austral Chile.
- Cortés, Y., Hormazábal, E., Leal, H., Urzúa, A., Mutis, A., Parra, L. y Quiroz, A. (2014). Novel antimicrobial activity of a dichloromethane extract obtained from red

seaweed *Ceramium rubrum* (Hudson) (Rhodophyta: Florideophyceae) against *Yersinia ruckeri* and *Saprolegnia parasitica*, agents that cause diseases in salmonids. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(3), 126-131. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.04.005>

Coy, C., Parra, J. y Cuca, L. (2014). *Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (rutaceae)*. DOI: 10.15765/e.v4i4.513.

Cubas, P. (2008). Phaeophyta (algas pardas). Acceso disponible en: https://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_pardas/7_Phaeophyta_texto.pdf

Davies, R. y Frerichs, G. (1989). Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases* 4:357-365.

De Lara, G., Álvarez, S. y C. Lozano-Ramírez. (1996). Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano. *Rev. Biol. Trop.*, 44(2):895-898. Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado 55-535. México, D. F. 09340. (Rec. 13-111-1995. Rev. 14-VI-1995. Ac. 14-VIII-1995).

Díaz, G. y Garzón, J. (2005). Estacionalidad en ensamblajes de algas en arrecifes de coral con influencia de surgencias en el Caribe colombiano. *Botanica Marina*, 45 (3), pp. 284-292. Consultado el 30 de mayo. 2019, desde doi: 10.1515 / BOT.2002.028

- Dixon, B. (1994). Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. *J World Aquacult Soc*;25:60-3. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00805.x>.
- Domínguez, X. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. México, D.F.: *Limusa*, 1973. 281 p.
- Echavarría, B., Franco, A. y Martínez, A. (2009). *Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano*. Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica ISSN 0121-4004 Volumen 16 número 1, año 2009. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 126-131.
- FAO, 1985. *Species Identification Sheets*. Fishing area, 48. 58, 88. For fishery purposes. P-43. ISBN: 92/5/102357/3.
- FAO, 2005-2019. *Programa de información de especies acuáticas. Oncorhynchus mykiss*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Cowx, I. G. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 15 June 2005. [Citado 30 May 2019].
- Fernández, M., Hernández, I y Regueira S. (2019). Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta* [revista en Internet]. 2015 [citado 2019 Jun 11];40(7): [aprox. 0 p.]. Disponible en: <http://revzoilomarinellosld.sld.cu/index.php/zmv/article/view/46>
- FONDEPES (Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero) (2014). *Manual de Crianza de Trucha en Ambientes Convencionales*. Lima-Perú. 57p. Acceso disponible en: https://www.fondepes.gob.pe/src/manuales/MANUAL_TRUCHA.pdf

- Forrt, A. (2007). *Uso y abuso de Antibióticos en la Salmonicultura*. Acceso: 11 febrero 2011], 13 pp. Documento 23. Disponible en: http://oceana.org/sites/default/files/o/fileadmin/oceana/uploads/americanadelsur/documentos_2007/Usos_antibioticos_en_la_salmonicultura.pdf
- Gao, M. y Liu, C. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoids from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 1461-1463
- García, A., Gutiérrez, L., Acedo, E., Burgos, A., López, M., Valdés, M. y Burboa-Zazueta, M. (2013). Las algas y otros organismos marinos como fuente de moléculas bioactivas. *Revista Biotecnología*, 15(1), 25–32.
- Godoy, M. (2002). *Truchicultura*. 2ª Edición. Perú: Editorial Perú, 247.
- Gonzalez del Val, A., Platas, G., Basilo, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., Jimenez del Rico, M., Garcia Reina, G. y Pelez, F. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Journal of Microbiology* 4: 35-40
- Goossens, A., Häkkinen S., Laakso, I., Seppänen T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A. Söderlund, H., Zabeau, M., Inze, D. y Oksman-Caldentey, K. (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8595-8600

- Gurib, A. (2006). Medicinal plants: Tradition of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27:1-93.
- Holt, R., Rohovec, J. y Fryer, J. (1993). Bacterial cold-water disease. In “bacterial disease of fish” (Inglis, V., Roberts, RJ & Bromage, NR. Eds.). *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, UK. Pp.3-22.
- Hunter, V., Knittel, M. y Fryer, J. (1980). Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 6: 467-472.
- INS. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión* / Elaboración: Rosa Sacsquispe Contreras y Jorge Velásquez Pomar. -- Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. ISBN 9972 - 857 - 18 – 2
- Kumar, K. y R, Rengasamy. (2000). Evaluation of antibacterial potencial of seaweeds occurring along the coast of Tamil Nadu, India against the plant pathogenic bacterium *xanthomonas oryzae* p.v. *oryzae* (Ishiyama) Dye. *Botanica Marina*, 43: 409-415.
- Lannan C., Bartholomew, J. y Fryer, J. (1999). Rickettsial and Chlamydial infections. *Fish disease and disorders Vol.3*, 245-267
- Leon, J., Avalos, R. y Ponce M. (2009). *Flavobacterium psychrophilum* y su patologia en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del Centro Piscicola El Ingenio, Huancayo. *Rev. Peru. Biol.* 2009; 15(2): 117 – 124.

- Lindorf H., De Parisca, L. y Rodríguez P. (1991). *Botánica*. Ed. Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, pp. 584.
- Magallanes, C. (2003). *Potencial antibacteriano de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Magallanes, C., Córdova, C. y Orozco, R (2003). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. s <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm> *Rev. peru. biol.* 10(2): 125- 132 (2003) Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.
- Mamani, D. (2016). *Evidencia de Piscirickettsia salmonis y Yersinia ruckeri en truchas arcoíris (oncorhynchus mykiss) en cultivo de balsa jaula en el lago titicaca en el distrito de Pomata departamento de Puno (Perú)*. Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias de la Acuicultura. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- Mantilla, J. y Sanabria, A. (1985). Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 4(2), 25-33. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56644>
- Marín, A. (2013). *Potencial bioactivo de algas del género Codium, recolectadas en baja california sur, México*. Tesis que para obtener el grado de doctorado en Ciencias Marinas.
- Maximilien, R., De Nys, R., Holmstrom, C., Gram, L., Givskov, M., Crass, K., Kjelleberg, S. y Steinberg, P.D. 1998. Chemical mediation of bacterial surface colonisation

by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology* 15(3): 233-246.

Medinilla, B. (1993). *Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. pp 8-9.

Meir, W. (1986). Enteric redmouth disease: outbreak in rainbow trout in Switzerland. *Dis. Aquat. Org.* 2: 81-82.

Mesías, F., Vargas, M., Cueva, A., Manchego, A. y Sandoval, N. (2019). Patogenicidad de una cepa de *Yersinia ruckeri* de un brote de yersiniosis en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de Huaraz, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 387-403. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15695>

Michalak, I. y Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 581–591.

MINSA/DIGESA-V.01. 01 (2016). “*Norma Sanitaria que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano*” Lima, Perú.

Molina, C. (2011). *Efecto inhibitorio de diferentes especies de microalgas sobre Vibrio spp.* Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. México.

Montaño, K. y Vargas, F. (2002). Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*, vol. 27, núm. 1, enero, 2002, pp. 21-27 Asociación Interciencia Caracas, Venezuela.

- Muñoz, J., Mardones, O., Chacoff, L. y Gesto, M. (2015). Estrés en peces: respuesta fisiológica y sus implicaciones en el cultivo de salmónidos . *Salmonexpert* , (5), 55-57.
- Núñez, C. (2008). Extracciones con equipo soxhlet. Acceso disponible en: <http://cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>
- Nylund, G.M., Cervin, G., Persson, F., Hermansson, M., Steinberg, P.D. y Pavia, H. 2008. Seaweed defence against bacteria: a poly-brominated 2-heptanone from the red alga *Bonnemaisonia hamifera* inhibits bacterial colonisation. *Marine Ecology Progress Series*, 369: 39-50
- Ospina A. (1997). *Actividad antimicótica de dos especies de algas del pacífico colombiano*. 1997. p. 5-12, 18-22, 27, 28, 39, 40
- Panreac Química S.L.U. (2017). Versión 2: JMBJUL17. Leído en: https://www.itwreagents.com/download_file/ce_ivd_instructions/CEIVD08/es/CEIVD08_es.pdf
- Peña, J., Palacios, M. y Ospina, N. (2005) *Algas como indicadoras de contaminación*. (1ª. Ed.). Cali, Colombia. Universidad del Valle.
- Perez, D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro. *Madrid. Vol. 22N. o 3-1998*

- Pérez, N. y Jiménez, E. (2011). *Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas.
- Piñol, M. y Palazon, J. (1993). Metabolismo secundario en: ASCON-BIETO J, M. TALON. Fisiología y Bioquímica vegetal, Madrid, España: *McGraw – Hill-Interamericana (1993)* 582. P
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. y Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia. (1)* 1: 98-106.
- Pratt, R., Mautner, H., Gardner, M., Sha, Y. y Dufrenoy, J. (1951). Report on the antibiotic activity of seaweed extracts. *Journal of American Pharmacolgy Association. Edición Científica 40: 575-579.*
- Quispe, W. (2017). *Aislamiento de Lactobacillus sp. de "trucha arco iris" Oncorhynchus mykiss con potencial probiótico frente a Yersinia ruckeri en puno*. Tesis presentada para optar el título de licenciado en Biología en la Universidad Nacional del altiplano - Puno Facultad de Ciencias Biológicas, Perú.
- Revista National Geographic. (2010). *Trucha arcoíris*. Acceso disponible en: <https://www.nationalgeographic.es/animales/trucha-arcoiris>
- Ríos, N., Medina, G., Jiménez, J., Yáñez, C., García, M., Di Bernardo, M. y Gualtieri, M. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Rev. Perú. biol. 16(1): 097- 100* (agosto 2009) © Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.

- Robledo, D., Freile, Y., Chan, M. y Ortega, B. (2008). Propiedades antileishmaniales de extractos de algas marinas tropicales. *Fitoterapia*. 2008; 79 (5): 374 - 377.
- Ruiz, E. y Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46 (1), 9-24.
- Ruiz, I., Hurtado, M., Nieves, M., Manzano, M., Burgos, A., Lizardi, J. y Hernández, E. (2016). Algas marinas: potencial fuente de compuestos contra el cáncer. *Revista Ciencia*, 67(3), 1-9.
- Russell, C. (1997). *Salmonid Richettsial Septicemia*. Disponible en: <http://hmsc.oregonstate.edu>.
- Rosell KG., Srivastava LM (1987) Ácidos grasos como sustancias antimicrobianas en algas pardas. En: Ragan MA, Bird CJ (eds) Duodécimo Simposio Internacional de Algas Marinas. *Desarrollos en hidrobiología*, vol. 41. Springer, Dordrecht
- Sajc, L., Grubisic, D. y Vunjak-Novakovic G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal* 4:89-99
- Sarin, R. (2005) Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology* 4:79-93
- Sepúlveda, J. y Porta, D. y Rocha, S. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3), 355-363.

- Shilpa, K., Varun, K. y Lakshmi, BS. (2010). An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J Plant Sci* 5:222-247
- Shirahama, K. (1942). On the unsaponifiable matter and phosphatides in marine algae fat. *Journal of the Faculty of Agriculture. Hokkaido University.* 49:1-93.
- Silva, G., Albuquerque, R. y Oliveira, J. (2013). Macroalgas marinas tropicales atlánticas con actividad biológica contra vibrios virulentos y resistentes a antimicrobianos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(1): 183-188, 2013 Antibacterial activity of macroalgae DOI: 103856/vol41-issue1-fulltext-17. Sea Sciences Institute, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil.
- Soto, M. y Rosales, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714. Epub 00 de de 2016. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Suasnavas, J. (2017). *Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de 4 géneros de microalgas originarias de la estación antártica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado*. Proyecto de investigación presentado como requisito previo para la obtención del título de Bioquímica Clínica. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR. Quito, Ecuador.
- Talavera, Z. (2008). *Determinación de presencia de Renibacterium salmoninarum y caracterización renal de lesiones histopatológicas presentes en truchas arcoíris (Oncorhynchus mykiss) en crianza comercial*. TESIS para optar el título profesional de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM.

- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., y Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J Fish Dis.* 2007; 30: 257-268.
- Torres, C. y Zarazaga, M. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria*, 16(2), 109-112. Recuperado en 25 de junio de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112002000200002&lng=es&tlng=es.
- Troncoso, N., Saavedra, R., Olivares, A., Farías, J., Urrutia, H y Agurto, C. (2005). Identificación de compuestos antibacterianos en macroalgas presentes en la Región del Biobío, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía Vol. 50*, S1: 199-204, abril 2015 DOI 10.4067/S0718-19572015000200007
- Trujillo, L., Uribe, J., López, B. y López, D (2014). Actividad antibacteriana de extractos crudos del crustáceo *Austromegabalanus psittacus* (Cirripedia: Balanidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía Vol. 49*, N°2: 385-392, agosto 2014 DOI10.4067/S0718-19572014000200018. Chile.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*. N°. 8:303-313
- Vlachos, V., Critchley, T. y Holi, A. (1997). Establishment of a protocol for testing antimicrobial activity in southern African macroalgae. Cambridge, Gran Bretaña. *Microbios*, 88: 115-123.

Wink, M. (2007). Bioprospecting: *The search for bioactive lead structures from nature*.

En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, pp. 97-116. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

IX. ANEXOS

1. Preparación del medio de cultivo para determinar el Biotipo de las cepas:

Para 1 L de medio de cultivo:

Parte A

- Peptona, 10 g
- Cloruro de sodio (ClNa), 5 g
- Cloruro de calcio (CaCl₂), 0, 1 g
- Agar, 15 g

Parte B

- Tween 80 a una concentración de 1 %.

Posteriormente, la parte A y B se esterilizaron en autoclave (121 °C durante 15 min), posteriormente ambas partes se mezclaron y homogenizaron, y finalmente se obtuvo el medio de cultivo.

2. Fórmula utilizada para realizar las diluciones:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Donde:

C₁= Concentración inicial (solución stock)

V₁=Volumen inicial (solución stock)

C₂=Concentración final (solución final)

V₂=Volumen final (solución final)

3. Metodología para la determinación del análisis fitoquímico

- **Reacción de Dragendorff**

El reactivo de Dragendorff se prepara mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30 % con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se deja en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 100 ml. La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona este reactivo a una solución ácida de alcaloides (Coy, *et al.*, 2014).

- **Reacción de Mayer**

El reactivo Mayer se emplea para la caracterización no específica de alcaloides. La mayoría de los alcaloides reaccionan dando un precipitado blanco o amarillo claro, amorfo o cristalino. El precipitado es (una sal compleja) puede disolverse posteriormente en un solvente menos polar para su identificación. El reactivo Mayer se basa en la acidez de los alcaloides en su forma de sales (Clorhidratos) debido a que en medios básicos el reactivo Mayer no precipita. A 1 ml de extracto ácido agregar unas gotas de reactivo de Mayer. Observar formación de precipitado blanco (Coy, *et al.*, 2014)

- **Reacción de Wagner**

Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua. La solución se afora a 100 ml con agua destilada. La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados floculentos color marrón (Domínguez, 1973)

- **Reacción de Baljet**

Se utiliza dos soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de usarse. Solución A: se coloca 1 g de ácido pícrico en 100 ml de etanol. Solución B: se agregan 10 g de NaOH en 100 ml de agua. Para la prueba se agregan 100 µl de la

muestra y 3 a 4 gotas del reactivo, siendo la prueba positiva si adquiere una coloración naranja o rojo oscuro (Domínguez, 1973)

- **Reacción de Shinoda**

10 g de la muestra disuelta en etanol se trata con limaduras de magnesio, se le aplica calor (60° C) y después unas gotas de HCL concentrado por las paredes. Se considera positiva con la aparición de colores naranja, rojo, rosa, rosa-azul a violeta (Domínguez, 1973)

- **Reacción de Ninhidrina**

El grupo alfa-amino de los aminoácidos forma complejos coloreados con la ninhidrina: violeta azulado en la mayoría de los aminoácidos cuyo grupo amino es primario, amarillo para la prolina e hidroxiprolina y café para la asparagina que tiene un grupo amido en la cadena lateral. Esta reacción también identifica los grupos alfa-amino libres presentes en péptidos y proteínas (Universidad Jorge Tadeo Lozano, Laboratorio de química orgánica).

- **Reacción de Kedde**

Solución A: ácido 3.5 dinitrobenzoico al 2 % en metanol. Solución B: KOH al 5.7 % en agua. Se mezclan cantidades iguales de las soluciones A y B del reactivo y se añade una punta de espátula de la muestra a ensayar. Los cardenólidos y sus agliconas dan color azulado, rosa hasta violeta (Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 2010).

- **Reacción de Liebermann-Burchard**

Se disuelve una pequeña cantidad de muestra (1.5 mg) en cloroformo para añadir el reactivo que se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico en una mezcla de 1 ml de anhídrido acético con 1 ml de cloroformo; la aparición de cualquier color en el lapso de 1 hora determina que la prueba es positiva (Domínguez, 1973)

- **Reacción de espuma**

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, en una probeta por 15 segundos, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar una solución acuosa de un jabón. Esta es una prueba presuntiva de saponinas, ya que existen otras sustancias que también pueden formar espuma (Medinilla, 1993).

- **Reacción de cloruro férrico**

Cloruro férrico (FeCl_3). Cloruro de hierro (III) como catalizador de reacciones de alquilación de benceno. La “prueba del cloruro férrico” es una prueba colorimétrica tradicional para fenoles, que usa una disolución al 1 % de cloruro de hierro (III) que ha sido neutralizada con hidróxido sódico hasta que se forme un leve precipitado de $\text{FeO}(\text{OH})$. La sustancia orgánica se disuelve en agua, metanol o etanol, luego se añade la disolución neutra de cloruro: se forma un complejo coloreado transitorio o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol. Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos, determina tanto fenoles como taninos. A 0.2 mL de extracto etanólico agregar 1 gota de solución de cloruro férrico al 0.1 % (Coy, *et al.*, 2014).

- ✓ Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- ✓ Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- ✓ Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalol, derivados del ácido gálico.

- **Reacción de Fehling**

La prueba de Fehling se utiliza para la detección de sustancias reductoras, particularmente azúcares reductores. Se basa en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído que pasa a ácido reduciendo la sal cúprica de cobre (II), en medio alcalino, a óxido de cobre (I). Éste forma un precipitado de color rojo. Un aspecto importante de esta reacción es que la forma aldehído puede detectarse

fácilmente, aunque exista en muy pequeña cantidad. Si un azúcar reduce el licor de Fehling a óxido de cobre (I) rojo, se dice que es un azúcar reductor (Panreac Química S.L.U.)

El reactivo de fehling es una mezcla entre 2 soluciones acuosas

- Sulfato cúprico cristalizado, 35 g; agua destilada, hasta 1.000 ml.
- Sal de Seignette (tartrato mixto de potasio y sodio), 173 g; solución de hidróxido de sodio al 40%, 3 g; agua, hasta 500 ml.

Ambas se guardan separadas hasta el momento de su uso para evitar la precipitación del hidróxido de cobre (II).

4. Sistemas evaluados (tabla 25) para la Solubilización del extracto acetónico de *H. grandifolius* (figura 47).

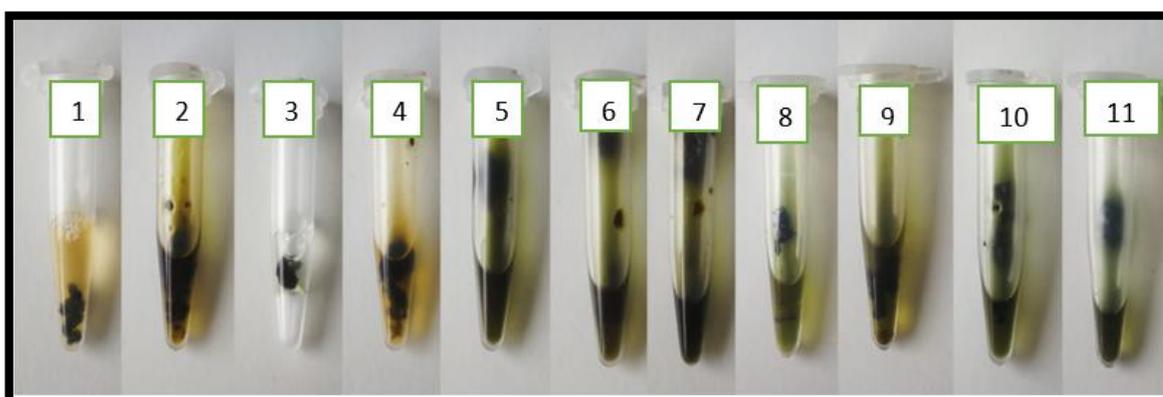


Figura 47. Pruebas de solubilidad para el extracto acetónico de *H. grandifolius* con diferentes solventes.

Tabla 25.

Solventes utilizados en la prueba de solubilidad del extracto acetónico de H. grandifolius.

N° Sistema evaluado	Solvente utilizado
1	Agua
2	DMSO
3	Tween 20
4	Metanol
5	Acetato de etilo
6	Acetona
7	Acetona + acetato de etilo
8	Acetona + metanol
9	Acetona + metanol + diclorometano
10	Diclorometano
11	Metanol + diclorometano