



**UES**

Universidad Estatal de Sonora  
La fuerza del saber, estimulará mi espíritu

**Aislamiento y evaluación de compuestos bioactivos con actividad antibacteriana *in vitro* de extractos metanólicos de *Gracilaria vermiculophylla* contra *Vibrio parahaemolyticus***

**Tesis que para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BIOSUSTENTABLES**

**Presenta:**

**ANA SARAHÍ ALEGRÍA HERNÁNDEZ**

**Navojoa, Sonora, México**

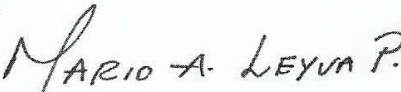
**Junio de 2019**

## CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis titulada **Aislamiento y evaluación de compuestos bioactivos con actividad antibacteriana *in vitro* de extractos metanólicos de *Gracilaria vermiculophylla* contra *Vibrio parahaemolyticus***, presentada por **Ana Sarahí Alegría Hernández**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que se acepte como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Sistemas de Producción Biosustentables.

  
Dra. Martha Elisa Rivas Vega

Directora

  
Dr. Mario Alberto Leyva Peralta

Co-director

  
Dr. Anselmo Miranda Baeza

Sinodal

## DEDICATORIA

A la persona más importante de mi vida, por ser mi motor día con día, por darme su apoyo a lo largo de este camino, por ser mi fuente inagotable de cariño y, sobre todo, por su gran paciencia y amor.

Porque hoy, mi reconocimiento es para ti... MAMÁ

## **AGRADECIMIENTOS**

Al consejo de nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este posgrado, con el número de registro 639602.

A mi comité tororial: Dra. Martha Elisa Rivas Vega, por aceptarme dentro de su grupo de investigación y ayudarme a crecer a lo largo de esta etapa. Agradezco su paciencia y confianza. Dr. Anselmo Miranda Baeza y Dr. Mario Alberto Leyva Peralta por su disponibilidad y apreciables consejos durante este proceso.

A mis padres y hermano por enseñarme que, aunque el camino sea difícil, al llegar a casa veré mi mayor recompensa.

A mi segunda familia, Ephraim, Sughey, Belem y Joel. Gracias por ser parte de este logro, por adoptarme con tanto amor, por compartir mis alegrías y ser mi apoyo en los momentos más difíciles. Gracias por siempre estar presentes, por sus palabras de aliento y su infinita fe en mí. ¡Los quiero!

A mis tíos, Zulema, Tomas y Lupita, porque también son parte importante y porque no sé qué haría sin sus consejos y cariño.

A las personas maravillosas que conocí y que adopté como mi familia de Navojoa: Elpidia, Diana, Fernando, Fátima y Mary.

A mis compañeros de generación, Javier, Jesús, Carlos y Mauricia, por hacerme partícipe de sus actividades y transmitirme sus conocimientos.

A TODOS, ¡MUCHAS GRACIAS!

## RESUMEN

La acuicultura es una de las actividades con mayor potencial de desarrollo en los últimos años a nivel mundial. Constituye una fuente de alimentos con un elevado valor nutricional y costos accesibles; sin embargo, a medida que la producción incrementa, también se ha acrecentado la presencia de enfermedades infecciosas dentro de los cultivos, generando pérdidas económicas importantes. En años recientes, una de las principales infecciones es el síndrome de la muerte temprana o síndrome de la necrosis hepatopaneocrática aguda, causada específicamente por la cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus*. La capacidad antimicrobiana de los extractos crudos de macroalgas es una propiedad que se ha estudiado durante los últimos años. En el presente estudio se obtuvo un extracto metanólico crudo de la macroalga *Gracilaria vermiculophylla*, del cual se obtuvieron cinco fracciones por medio de cromatografía en columna, a cada una de las fracciones se les determinó el perfil fitoquímico, así como la actividad antimicrobiana *in vitro* con *V. Parahaemolyticus*. Una vez identificada la fracción más activa, se obtuvieron cuatro subfracciones, las cuales fueron analizadas por RMN para identificar los compuestos bioactivos. Se encontró que el extracto metanólico crudo de *G. vermiculophylla* tuvo un rendimiento de extracción de 8.7 g de extracto/100g de harina seca. El extracto crudo y la fracción 3 presentaron una MIC<sub>50</sub> de 1400 µg/mL. El análisis de RMN mostró señales pertenecientes al grupo terpeno dentro del espectro de la subfracción 4 de la fracción 3.

## Contenido

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
RESUMEN.....	v
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
I. Introducción .....	1
I.1. Antecedentes .....	2
I.1.1 Muerte temprana.....	2
I.1.2 Antibióticos.....	¡Error! Marcador no definido.
I.1.3 Aditivos.....	3
I.1.4 Algas marinas .....	4
I.1.5 Metabolitos secundarios en algas marinas.....	5
I.1.6 <i>Gracilaria vermiculophylla</i> .....	8
I.2 Hipótesis .....	9
I.3 Objetivos .....	9
I.3.1 General .....	9
I.3.2 Particulares .....	10
II. Materiales y métodos .....	11
II.1. Colecta .....	11
II.2. Obtención del extracto.....	11
II.3. Perfil fitoquímico del extracto metanólico.....	12
II.4. Fraccionamiento de extracto metanólico de <i>Gracilaria vermiculophylla</i> .....	13
II.5. Cromatografía en Capa Fina (TLC) .....	14
II.6. Evaluación antimicrobiana .....	14
II.7. Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	15
II.8. Extracción de terpenos.....	15
II.9. Procesamiento de datos .....	16
III. Resultados y discusión .....	17
IV. Conclusiones .....	35

<b>V. Recomendaciones .....</b>	<b>36</b>
<b>VI.Literatura citada.....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1.	Pruebas Fitoquímicas del Extracto Crudo de <i>Gracilaria vermiculophylla</i> .	19
2.	Porcentajes de Inhibición del Extracto Crudo de <i>Gracilaria vermiculophylla</i> .	22
3.	Concentración mínima inhibitoria (MIC <sub>50</sub> ) en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del extracto metanólico de <i>G. vermiculophylla</i> para la bacteria <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	22



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ejemplos de polisacáridos (fucoida y laminarin) con actividad biológica	5
2.	Ejemplo de proteína (lectina) con actividad biológica	6
3.	Ejemplo de pigmentos (clorofila y $\beta$ -caroteno) con actividad biológica	6
4.	Ejemplo de polifenoles (ácido cinámico, ácido benzoico) con actividad biológica	7
5.	Estructura de metoxibifurcarenona (terpeno) aislada de alga marina ( <i>cystoseira amentácea</i> )	7
6.	<i>Gracilaria vermiculophylla</i> .	9
7.	Obtención del extracto	11
8.	Columna cromatográfica	14
9.	Distribución del bioensayo en microplaca de 96 pozos	15
10.	Extracto metanólico crudo de <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	17
11.	Análisis por cromatografía en capa fina del extracto metanólico	18
12.	Columna cromatográfica y fracciones obtenidas	20
13.	Actividad antimicrobiana al termino de las 48 horas de las diferentes concentraciones evaluadas contra <i>v. parahaemolyticus</i>	21
14.	Bandas pertenecientes a la fracción 3	24
15.	Cinética de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de <i>G. vermiculophylla</i> contra <i>v. parahaemolyticus</i>	25
16.	Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 1 de <i>G. vermiculophylla</i> contra <i>v. parahaemolyticus</i> .	25
17.	Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 2 de <i>G. vermiculophylla</i> contra <i>v. parahaemolyticus</i>	26

18.	Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 3 de <i>G. vermiculophylla</i> contra <i>v. parahaemolyticus</i>	26
19.	Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 4 de <i>G. vermiculophylla</i> contra <i>v. parahaemolyticus</i>	27
20.	Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 5 de <i>G. vermiculophylla</i> contra <i>v. parahaemolyticus</i>	28
21	Espectro RMN 1H de subfracción 1, 2, 3 y 4 de la fracción 3, 400MHz	30
22	Triterpeno lupeol	31
23	Comparación del espectro RMN de F3-4 con el triterpeno lupeol	32
24.	Extracto terpenico y reacción Lieberman-Bouchard positiva	34

## I. Introducción

A nivel mundial la acuicultura ha aumentado su impacto social y económico a través de la producción de alimentos, la contribución a los medios de subsistencia y la generación de ingresos. Sin embargo, cuando es mal administrada puede afectar la estabilidad de los ecosistemas que se reflejan en trastornos ambientales y repercuten negativamente en aspectos sociales y económicos (FAO, 2012).

La acuicultura es una de las actividades con mayor potencial y desarrollo en los últimos años en México, la cual aporta beneficios sociales y económicos que se traducen en una fuente de alimentación de la población con un elevado valor nutricional y costos accesibles (Álvarez *et al.*, 2012).

Conforme han aumentado los niveles de producción, las enfermedades infecciosas dentro de los cultivos han sido más frecuentes, generando pérdidas económicas importantes. Las más agresivas son de origen viral y bacteriano ya que han causado mortalidades elevadas en los cultivos de camarón (Varela *et al.*, 2014).

Se han registrado alrededor de 20 virus que afectan a los cultivos de camarón (Lightner *et al.*, 1998), dentro de los que destacan el, *Baculovirus penaei*, Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHN) (Gómez *et al.*, 2001) y el Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), siendo este último el de mayor realce a nivel nacional. En cuanto a las enfermedades de origen bacteriano, se tiene que, las cepas patógenas del género *Vibrio* pueden causar mortalidades severas como el caso del síndrome de la muerte temprana o síndrome de la necrosis hepatopaneocrática aguda, causada por una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* (Lightner *et al.*, 2014).

Actualmente se realizan diversas investigaciones sobre alternativas para proponer soluciones o modelos de prevención contra el ataque de dicho microorganismo. Tal es el caso del uso de algas marinas, las cuales recientemente han recibido mucha atención por ser fuentes potenciales de metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antioxidantes (Zhang *et al.*, 2010).

## I.1. Antecedentes

### I.1.1 Muerte temprana

Durante los últimos años se ha presentado una patología emergente denominada enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). Esta fue reportada por primera vez en el 2009 en camarones de cultivo en China, afectando a las especies *Penaeus monodon* y *Litopenaeus vannamei*. Posteriormente, se propagó a países cercanos, impactando a Vietnam, Malasia y Tailandia (Tran *et al.*, 2013; Varela., Nelson 2016).

En 2013, las granjas de camarón al noroeste de México registraron altas tasas de mortalidad durante los primeros días después de la siembra. La propagación comenzó en el estado de Nayarit, posteriormente se reportó en Sinaloa y Sonora. El sector acuícola tuvo grandes pérdidas económicas, debido a las altas mortalidades ya que los antibióticos comúnmente utilizados no fueron eficaces (Soto *et al.*, 2015).

Los organismos infectados presentaron signos de anorexia, letargo, decoloración en el hepatopáncreas con daño severo caracterizado por una necrosis del epitelio tubular. Estos estudios fueron similares a los reportados en Asia para la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (Lightner *et al.*, 2012).

La AHPND es causada por una cepa altamente virulenta de *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2014; Pantoja y Lightner, 2014; Han *et al.*, 2015). Esta cepa bacteriana es portadora de un plásmido de aproximadamente 69 kb, responsable de la síntesis de toxinas con actividad proteolítica, las cuales dañan en forma irreversible al hepatopáncreas, generando desprendimientos celulares masivos (Varela, 2016).

La bacteria *Vibrio parahaemolyticus* es un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo, halofílico, oxidasa positiva, fermentador de glucosa y ureasa variable. Requiere concentraciones de NaCl de 1% y medios selectivos para su desarrollo (Heitmann *et al.*, 2005). Crece a una temperatura optima de 37°C, sin embargo, su rango de

crecimiento abarca de los 5 a los 43°C; un pH de entre 7.8 a 8.6 y un promedio de incubación de 15 horas (Balakrish y Hormazábal, 2005).

### **I.1.2 Antibióticos**

Durante el proceso de cultivo, algunas empresas emplean antibióticos con el fin de impedir (uso profiláctico) y tratar (uso terapéutico) enfermedades bacterianas (FAO, 2000). La aplicación de los antibióticos tiene repercusiones negativas, se asocia con problemas ambientales y en la salud humana. Entre los más estudiados se encuentra la resistencia a bacteriana, así como, la acumulación de antibióticos en los tejidos del camarón que pueden provocar daños al consumidor (Santiago *et al.*, 2009).

El uso racional de estos tiene como objetivo mantener la eficacia para la acuicultura, prevenir o reducir la transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre (COSAES, 2015).

Los antibióticos pueden ser clasificados en dos tipos; a) de amplio espectro, usados para el control de bacterias Gram (+) y Gram (-), entre los cuales se encuentran: quinolonas, fosfomicina, amoxicilina, ampicilina, florfenicol, tetraciclinas), y b) de espectro reducido que actúan sobre Gram (+) o sobre Gram (-) entre ellos están: sulfonamidas, penicilinas, lincosaminas, macrólidos, etc. (COSAES 2015).

En México, los antibióticos más utilizados para contrarrestar las enfermedades producidas por bacterias del género *Vibrio* son oxitetraciclina (OTC), florfenicol (FFC), ormetoprim - sulfametoxazol, sarafloxacin (SARA) y enrofloxacin (Roque *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2006).

### **I.1.3 Aditivos**

Los aditivos alimentarios son sustancias puras o mezclas, que se agregan intencionalmente a los alimentos para realizar varias funciones específicas.

Una de las alternativas para contrarrestar las enfermedades infecciosas, es el uso de aditivos inmunoestimulantes. Algunos como el  $\beta$ -glucano han jugado un rol importante en la acuicultura a gran escala.

También destacan los lipopolisacáridos, considerados como inmunoestimulantes de amplio espectro desde 1960. Así mismo, la quitina, promueve el crecimiento y el sistema inmune de los organismos acuáticos, inhibe el crecimiento de los patógenos, purifica el agua y aumenta la resistencia a enfermedades.

Los peptidoglicanos también promueven el crecimiento y resistencia a patógenos y el sistema inmune de los organismos acuáticos.

#### **I.1.4 Algas marinas**

A diferencia de las plantas terrestres, las algas marinas son recurso sin explotar, que ofrece un gran potencial para aislar compuestos naturales, de gran interés para la salud y la alimentación (Rodríguez *et al.*, 2010).

Debido a la diversidad de propiedades biológicas que poseen las macroalgas, diferentes autores las han utilizado como sujeto de estudio. Elleuch *et al.*, (2011) reportaron que la fibra que contienen las algas marinas tiene la capacidad de reducir la respuesta glucémica y el colesterol en sangre. También en 2011, Holdt y Kraan indicaron que estas son capaces de producir un cambio bacteriano en el colon, dando lugar a lo que se conoce como “efecto prebiótico”. Debido a los polisacáridos sulfatados presentes en las macroalgas se le atribuyen muchas propiedades biológicas, entre las más relevantes destacan: actividad antiviral, antiinflamatoria, antiparasitarias y antimicrobiana (Chew y Lim, 2008; Pallela *et al.*, 2010; Jiao *et al.*, 2011; Wijesekara *et al.*, 2011).

Actualmente su aplicación consiste en la obtención de ficocoloides como los carragenanos utilizados en la industria alimentaria como aditivos para la estabilización de suspensiones (Pereira *et al.*, 2009); y el agar el cual es utilizado como agente gelificante (Holdt y Kraan, 2011).

El uso de la capacidad antimicrobiana de los extractos crudos de macroalgas se ha estudiado en acuicultura, debido a la susceptibilidad que tienen los cultivos de camarón a ser atacados por patógenos resistentes a antibióticos como es el caso de *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus* y *Vibrio parahaemolyticus* (Immanuel *et al.*, 2004).

### I.1.5 Metabolitos secundarios en algas marinas

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas sintetizadas por plantas, bacterias, hongos, algas y animales. Las algas y, por ende, sus extractos pueden ser una gran fuente de compuestos biológicamente activos. Sus propiedades, son aprovechadas en el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos con aplicación en humanos, plantas y animales (Chojnacka *et al.*, 2012).

Las algas marinas tienen un alto contenido de polisacáridos, cuya estructura está relacionada con la división a la que pertenecen. Los polisacáridos sulfatados inhiben la actividad de diversas bacterias y virus (Leonard *et al.*, 2010). Entre los polisacáridos más importantes, presentes en diferentes algas marinas, se encuentran: galactanos, fucoidan, laminarin y alginatos (Figura 1).

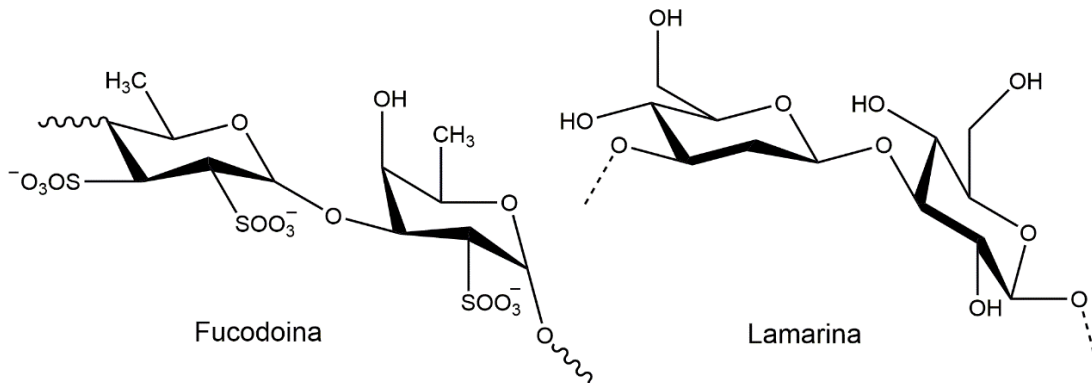


Figura 1. Estructura de dos polisacáridos (fucoidan y laminarin) con actividad biológica.

Las proteínas son otro ejemplo de metabolitos secundarios presentes en las algas, aunque en menor cantidad que los polisacáridos (Leonard *et al.*, 2010). Las proteínas más importantes que pueden ser extraídas son las lectinas (Figura 2), las cuales pueden unirse a carbohidratos y participar en diversos procesos biológicos; además de poseer actividad antibacteriana, antiviral y antiinflamatoria (Cunningham *et al.*, 2010).

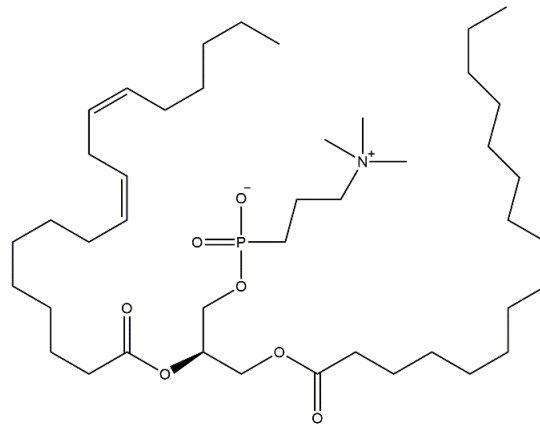


Figura 2. Estructura de la lectina (proteína con actividad biológica).

Los pigmentos, como las clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas (Figura 3), son los principales pigmentos con actividad biológica presentes en las algas marinas. Los cuales poseen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales y neuroprotectoras (Holdt *et al.*, 2011).

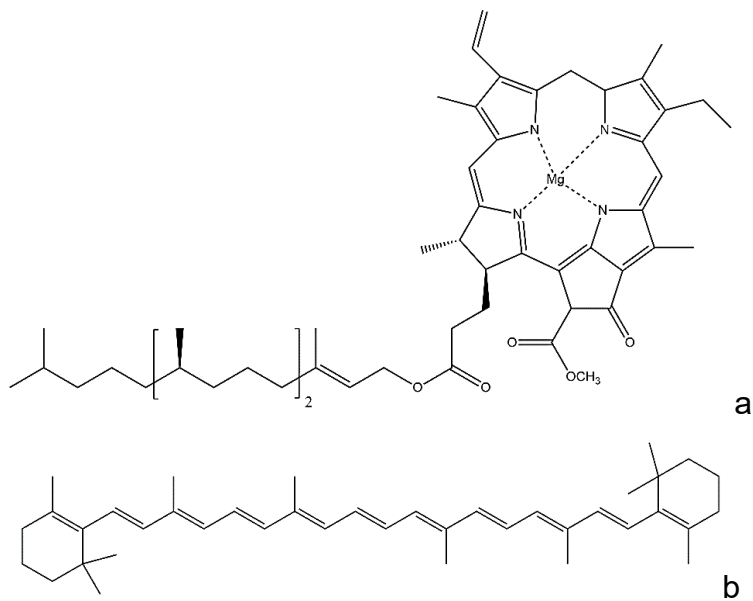


Figura 3. Estructura de pigmentos con propiedades biológicas (a. clorofila y b.  $\beta$ -caroteno).



Los polifenoles son compuestos producidos también por las algas (Figura 4), dentro de los más importantes se encuentran los flavonoides, isoflavonas, ácido cinámico, ácido benzoico y quercitina (Keyrouz *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2011).

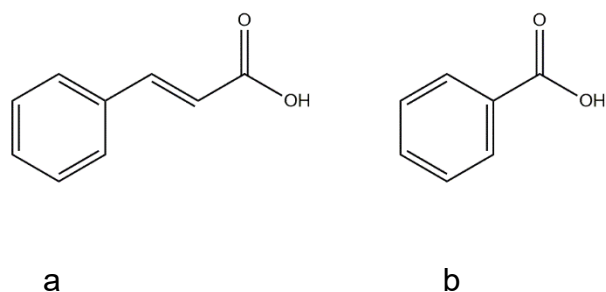


Figura 4. Estructura de polifenoles (a. ácido cinámico y b. ácido benzoico) con actividad biológica.

Dentro de los compuestos químicos que son capaces de sintetizar algunas algas marinas se encuentran los terpenoides y derivados fenólicos. Los principales productores de estas moléculas pertenecen a la clase *Phaeophyceae*. En este grupo de organismos se han extraído casi el 40% de todos los metabolitos secundarios descritos actualmente en algas marinas (Anónimo, 2013).

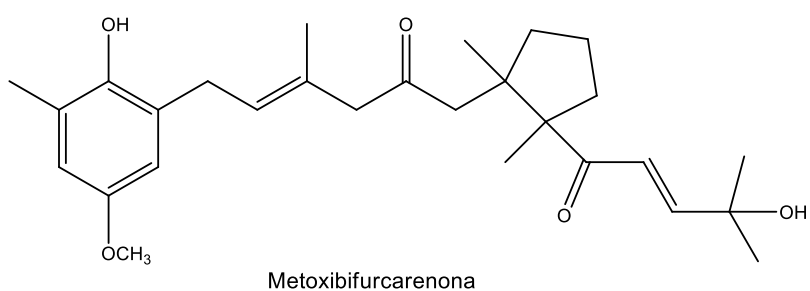


Figura 5: Estructura de metoxibifurcarenona (terpeno) aislada de alga marina (*Cystoseira amentácea*).

### **I.1.6 *Gracilaria vermiculophylla***

Se sabe que, *Gracilaria vermiculophylla* (Figura 6) es una de las macroalgas con más valor económico, además de encontrarse distribuida en todo el mundo. Osuna et al. (2016) evaluaron la capacidad de extractos crudos (metanol y acetona) de esta alga para inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*; en la cual concluyen que cuenta con compuestos bioactivos de tipo fenólicos y/o terpenos capaces de inhibir el crecimiento de dicha bacteria.

En un estudio Su-Ten Yen *et al.* (2009) evaluaron extractos acuosos de *Gracilaria tenuistipitata* sobre la recuperación inmunológica de camarón blanco, después de una infección con *Vibrio alginolyticus*. Por otro lado, Leys *et al.* (2011) realizaron un análisis de 19 especies de *Gracilaria*, en el cual se obtuvieron diferentes extractos (agua, metanol, cloroformo, hexano, etc.) para determinar su toxicidad, efecto citotóxico, espermicida, antibacteriano, antiviral, antifúngico, antihipertensivo, antiinflamatorio. Así como efectos analgésicos y espasmolíticos en el tracto gastrointestinal. Rajasekar-Thirunavukkarasu *et al.*, (2013), evaluaron extractos crudos (acetona y metanol) de *G. edulis* *G. verrucosa* contra *V. alginolyticus*



Figura 6. *Gracilaria vermiculophylla*

### **I.2 Hipótesis**

La macroalga *Gracilaria vermiculophylla* contiene compuestos bioactivos que sirven como agentes antibacterianos, por lo que puede inhibir la presencia de *Vibrio parahaemolyticus in vitro*.

### **I.3 Objetivos**

#### **I.3.1 General**

Identificar los compuestos bioactivos del extracto metanólico de la macroalga *Gracilaria vermiculophylla* y evaluar su actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Vibrio parahaemolyticus*.

### **I.3.2 Particulares**

1. Determinar la actividad antibacteriana del extracto crudo de *Gracilaria vermiculophylla* contra *Vibrio parahaemolyticus*.
2. Determinar la actividad antibacteriana de las fracciones metanólicas de *Gracilaria vermiculophylla* contra *Vibrio parahaemolyticus*.
3. Aislar los compuestos bioactivos de las subfracciones obtenidas de la fracción más activa del extracto metanólico de *Gracilaria vermiculophylla*.

## II. Materiales y métodos

### II.1. Colecta

La macroalga, fue colectada en la Laguna Costera de Agiabampo, Sonora, México. La biomasa fue lavada *in situ* y transportada en bolsas dentro de hieleras al laboratorio de investigación de la Universidad Estatal de Sonora (Unidad Académica Navojoa). Posteriormente fueron secadas en estufa de convección de aire a 45°C durante 48h y molidas en un molino pulverizador Cyclotec.

### II.2. Obtención del extracto

La biomasa seca y molida fue colocada en un recipiente con metanol, en una proporción 1:10 p/v durante 10 días a temperatura ambiente, con agitación periódica. Pasados los 10 días el extracto se filtró por gravedad (Figura 7A), utilizando un filtro whatman No. 4. Posteriormente se concentró bajo presión reducida y temperatura constante (40°C) en un rotaevaporador Yamato (Figura 7B).

A)



B)



Figura 7. Obtención del extracto metanólico

### **II.3. Perfil fitoquímico del extracto metanólico**

Para la determinación del perfil fitoquímico se utilizaron las técnicas usadas por Kamba y Hassan (2010). Se determinó la presencia de:

**Flavonoides (reacción de Shidona y reacción de hidróxido de sodio).** Para la determinación de flavonoides, se disolvieron 0.5 mL del extracto en 2 mL de etanol absoluto, los cuales se colocaron en 3 tubos de ensaye. Al primero se le realizó la prueba de Shinoda, y se le agregaron 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, cuando se observó una coloración roja se tomó como positivo para la presencia de auronas o chalconas. Al segundo tubo se le adicionaron 3 gotas de hidróxido de sodio (10%) y se observó la reacción, cuando se formó una coloración de amarillo a rojo, se registró como positivo para la presencia de xantonas y flavonas, cuando fue de café a naranja, de flavonoles, de púrpura a rojizo de chalconas y de azul de antocianinas.

**Saponinas (reacción de Rosenthaler).** Se adicionaron dos gotas del reactivo Rosenthaler y se esterificó con dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, se consideró la prueba positiva al formar una coloración violeta.

**Taninos (reacción de cloruro férrico y ferricianuro de potasio ).** Se utilizó 1 mL del extracto, se le adicionaron 2 mL de agua destilada y 3 gotas de cloruro de sodio al 2%, se calentó a ebullición por un minuto, se enfrió y se filtró, distribuyendo en cuatro tubos el filtrado, el cuarto se utilizó como testigo.

**Quinonas (reacción con ácido sulfúrico).** Se colocaron 2 mL del extracto en una cápsula de porcelana y se concentró a sequedad, se utilizó la reacción con ácido sulfúrico, en la cual se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado al extracto. Se consideró positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración roja que apareció en los dos primeros minutos.

**Terpenos (reacción de Lieberman-Bouchard).** Utilizando la reacción de Lieberman-Bouchard se determinó terpenos con cloroformo, anhídrido acético por último ácido sulfúrico concentrado.

**Alcaloides (reacción de Wagner y reacción de Mayer).** Para determinar alcaloides se tomó una porción del extracto y se adicionó entre 5 a 10 mL de ácido clorhídrico al 10%, se calentó a ebullición por cinco minutos, se enfrió y filtró. Posteriormente el filtrado se dividió en 2 tubos de ensaye. Se utilizaron las reacciones de Wagner y Mayer.

**Cumarinas (reacción de hidróxido de potasio).** Para cumarinas se utilizó la reacción de hidróxido de potasio al 0.5 M. Se disolvió el extracto en 1 mL de agua hirviendo. Se colocó en papel filtro 2 manchas del extracto diluido aplicado con micro pipeta, se aplicó en una de las dos manchas una gota de KOH 0.5 M, se observó fluorescencia a longitud de onda de 366 nm.

**Glucósidos cardiacos (cloruro férrico con ácido sulfúrico concentrado).** En la determinación de glucósidos cardiacos se tomó 0.5 g de extracto y se adicionó 5 mL de agua, se añadieron 2 mL de ácido acético glacial con una gota de solución de cloruro férrico. Se le agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Un anillo marrón en la interfase indicó la presencia de un deoxyazúcar.

#### **II.4. Fraccionamiento de extracto metanólico de *Gracilaria vermiculophylla***

Se realizó un fraccionamiento del extracto metanólico de la macroalga *Gracilaria vermiculophylla* mediante cromatografía en columna (Figura 8), utilizando como fase estacionaria sílica gel de 200-400 mesh, como fase móvil se utilizó una serie de solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etilo y metanol) y combinaciones de estos, para encontrar el mejor sistema de separación, el cual fue una mezcla de acetato de etilo-metanol, en una proporción 8:2. Se realizó un segundo fraccionamiento de la fracción más activa, a las mismas condiciones anteriormente mencionadas.



Figura 8. Columna cromatográfica

### II.5. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

El monitoreo de las fracciones se realizó a través de cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios de aluminio con una capa 0.20 mm de grosor de sílica gel 60 con un indicador fluorescente UV 254. La fase móvil varió utilizando solventes de distintas polaridades: hexano, acetato de etilo, y metano, así como mezclas de ellos. Iniciando con hexano 100%, hexano-acetato de etilo 8:2, hexano-acetato de etilo 5:5 y acetato de etilo 100%, acetato de etilo-metanol 8:2.

### II.6. Evaluación antimicrobiana

Para la determinación de la actividad biológica se utilizó la técnica de mínima concentración inhibitoria (MIC) en la cual se determinó la capacidad antimicrobiana de las fracciones y subfracciones de *Gracilaria vermiculophylla* contra *Vibrio parahaemolyticus*. Se prepararon microdiluciones de las fracciones y subfracciones para obtener concentraciones de 1700, 1400, 1000 y 700  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

El ensayo de MIC se llevó a cabo en placas de 96 pozos, por triplicado. En las placas se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de las microdiluciones y 15  $\mu\text{L}$  del inóculo bacteriano, previamente ajustado al estándar 0.5 de MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL), se utilizó



como control: caldo soya tripticaseína con bacteria y gentamicina ( $12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como control. Seguido, se procedió a incubar las placas por 48 horas a una temperatura de  $30^\circ\text{C}$  y se tomaron las lecturas de absorbancias a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas en un lector de micro placas Epoch 131030C a una longitud de onda de 630nm (Navarro *et al.*, 2013).

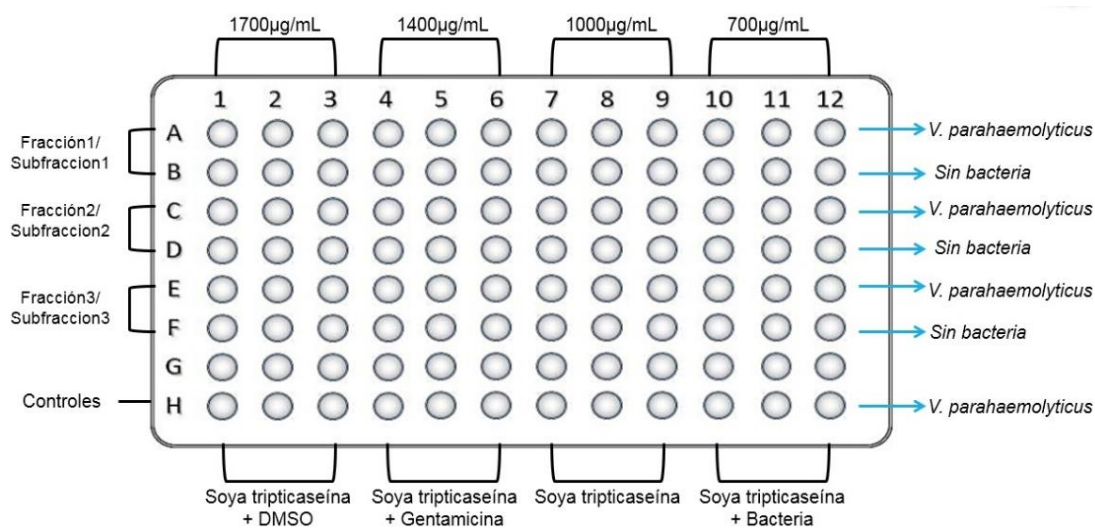


Figura 9. Distribución del bioensayo en microplaca de 96 pozos.

## II.7. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis de las subfracciones por RMN de protón ( $^1\text{H}$ ) se realizó en un equipo Bruker Avance, a una frecuencia de 400 MHz en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, de la Universidad de Sonora. Como solvente se utilizó cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ); todos los desplazamientos químicos tuvieron como referencia tetrametilsilano (TMS).

## II.8. Extracción de terpenos

Al finalizar la separación y la selección de las diferentes fracciones y subfracciones que fueron evaluadas, se llevó a cabo una extracción de terpenos, con pequeñas modificaciones de la técnica que indican Bousselessela *et al.* (2013).

Se agregaron 250 gramos de harina de alga en 750mL de éter de petróleo durante 3 días con agitación periódica. Pasado los 3 días se procedió a filtrar la muestra por gravedad y concentrar a 95 rpm y  $40^\circ\text{C}$ . Una vez concentrada la muestra se le agregaron 150mL de acetato de etilo y 50mL de agua destilada (en embudo de

separación), se recuperó la fase acuosa y seguido se secó la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$ ; se filtró por gravedad y se concentró a 95 rpm y  $40^\circ\text{C}$ .

### **II.9. Procesamiento de datos**

Los datos obtenidos fueron analizados por medio de análisis de varianza de una vía, cuando hubo diferencias significativas se aplicaron las pruebas de comparación de medias de Tukey. En todos los casos se trabajó al 95% de confianza ( $\alpha=0.05$ ).

### III. Resultados y discusión

#### III.1. Obtención del extracto

El extracto metanólico crudo obtenido de *G. vermiculophylla* (Figura 10) tuvo un rendimiento del 8.7%. Su-Tuen Yeh *et al.* (2009) obtuvieron un extracto acuoso (caliente) con un rendimiento del 21.7%. Así mismo, Leys *et al.* (2011) realizaron diversos extractos, utilizando una variedad de solventes, como acetona, hexano, agua, cloroformo, etc. y mezclas de los mismos. Los rendimientos variaron entre 7 y 18%. Por otro lado, Osuna-Ruiz (2016) obtuvo un extracto metanólico con un rendimiento de 5.5%; siendo este último el que más se asemejó al rendimiento que se obtuvo en este trabajo. A partir de los datos mencionados se puede inferir que los rendimientos están dados por diversos factores, uno de ellos es la naturaleza de los solventes que se utilizan para realizar las extracciones, además de las condiciones en las que se encontraban las diferentes muestras (lugar de colecta, temperatura, salinidad, etc.) y el tratamiento después de su colecta (lavado, secado, almacenamiento).



Figura 10. Extracto metanólico crudo de *Gracilaria vermiculophylla*

Al desconocer la naturaleza de la muestra, se realizó un análisis por TLC para determinar su pureza y establecer las condiciones en las que iniciaría el fraccionamiento (Figura 11). Se seleccionaron como fase móvil: 1) hexano (100%), 2) hexano-acetato de etilo (8:2), 3) hexano-acetato de etilo (5:5), 4) Acetato de etilo (100%), 5) acetato de etilo-metanol (8:2), el resultado se muestra en la figura 12.

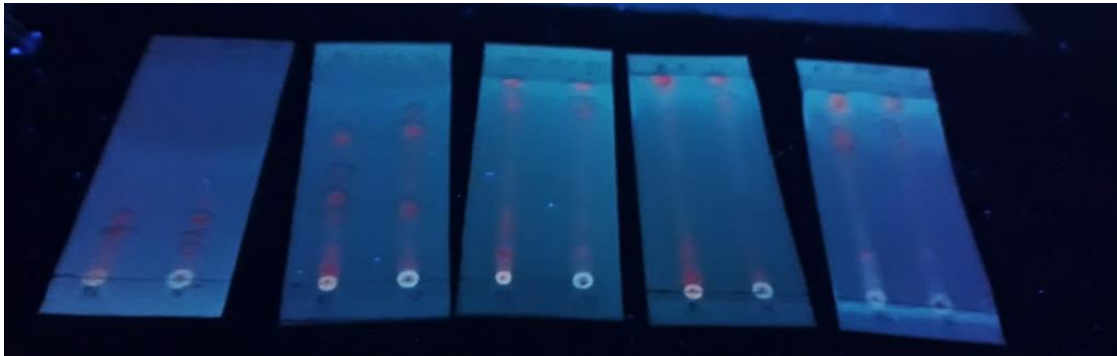


Figura 11. Análisis por cromatografía en capa fina del extracto metanólico.

### III.2. Perfil fitoquímico del extracto metanólico

En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis fitoquímico que se realizó, dando como positivo la presencia de grupos terpenos y glucósidos cardiacos.

En muchos de los estudios reportados, como es el caso de Ozuna-Ruiz (2016), indican que dentro de los principales grupos de metabolitos secundarios comunes en algas marinas se encuentran los de tipo lípido y polisacárido. También poseen grandes cantidades de polifenoles, florotaninos y flavonoides.

Además, se han encontrado que algunos esteroides, como, fucoesterol y algunos terpenoides poseen actividad antitumoral, antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa (Li *et al.*, 2015).

Así mismo, Gómez *et al.*, (2016), reportan que los compuestos bioactivos presentes en algas marinas son polisacáridos, fenoles, pigmentos, halógenos, proteínas, esteroides, entre otros.

Tabla 1. Pruebas fotoquímicas del extracto metanólico crudo de *G. vermiculophylla*

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Prueba Fitoquímica</b>	<b>Resultado</b>
<b>Terpenos</b>	Lieberman-Bouchard	<b>+</b>
<b>Flavonoides</b>	Reacción de shinoda	-
<b>Saponinas</b>	Reacción de Rosenthaler	-
<b>Taninos</b>	Reacción de cloruro férrico	-
	Reacción de ferrocianuro de potasio al 1%	-
<b>Quinonas</b>	Reacción con ácido sulfúrico	-
<b>Glucósidos cardiacos</b>	Reacción Keller Kiliani	<b>+</b>
<b>Alcaloides</b>	Reacción de Wagner	-
	Reacción de Mayer	-

### **III.3. Fraccionamiento de extracto metanólico de *Gracilaria vermiculophylla***

Una vez establecidas las condiciones de la fase móvil con la cual partiría el fraccionamiento del extracto (acetato de etilo-metanol, 8:2), las muestras se colocaron en la columna cromatográfica, con la cual se logró la separación de 5 fracciones, las primeras tres lograron eluir con una fase móvil 8:2, mientras que las últimas dos con una fase móvil 7:3, utilizando la misma mezcla de solvente.

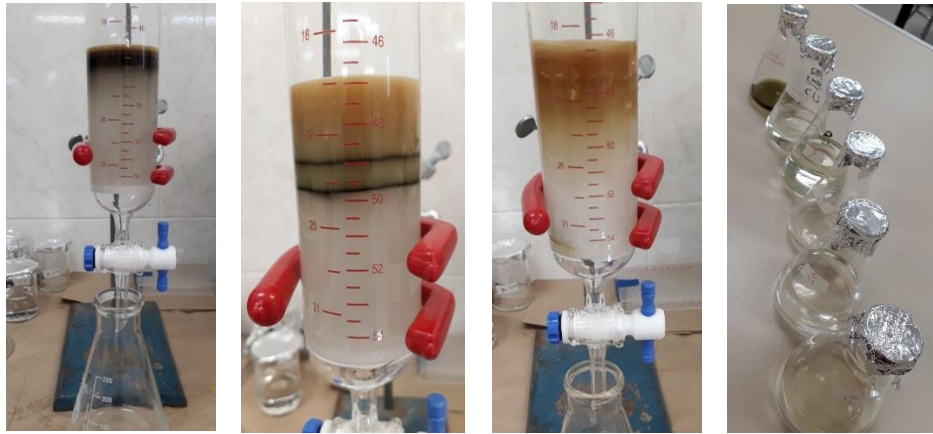


Figura12. Columna cromatográfica y fracciones obtenidas

#### III.4. Evaluación antimicrobiana *in vitro*

Una vez obtenidas las 5 fracciones se procedió a llevar a cabo el bioensayo de mínima concentración inhibitoria. En la Figura 13 se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana al término de las 48 horas de las diferentes concentraciones de las fracciones evaluadas, contra *V. parahaemolyticus*. En dicha figura se muestra una línea horizontal negra, la cual indica el valor de referencia de MIC<sub>50</sub>. En la figura se puede apreciar que la fracción 5, es la que muestra una MIC<sub>50</sub> a una concentración de 1700 µg·mL<sup>-1</sup>, sin embargo, algunas fracciones presentaron una coloración más fuerte, lo que por consecuencia genera un ligero aumento en la densidad óptica, es por eso que se analizaron las fracciones estadísticamente, para sacar un porcentaje de inhibición y seleccionar la fracción más activa.

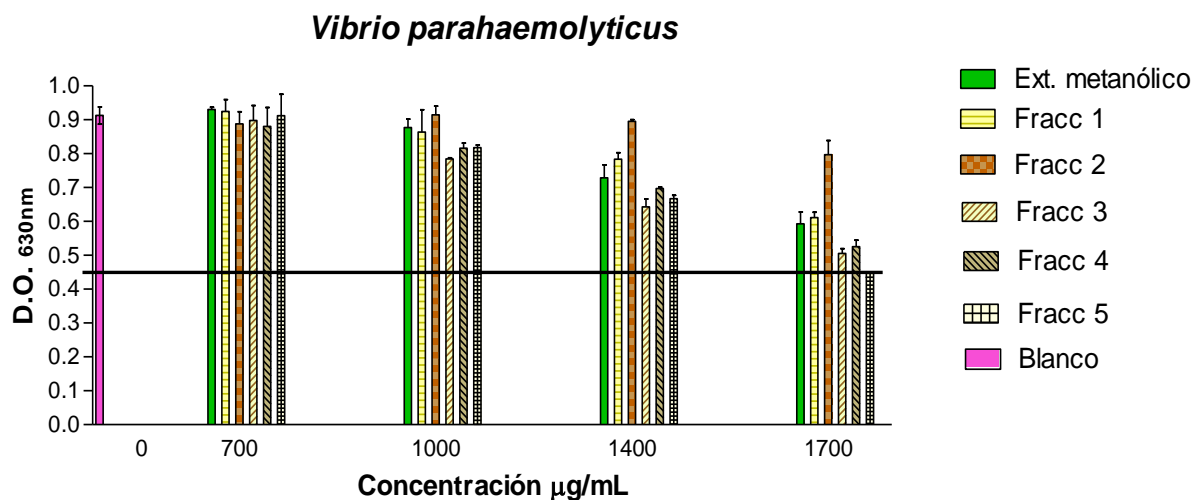


Figura 13. Actividad antimicrobiana al termino de las 48 horas de las diferentes concentraciones de las fracciones evaluadas, contra *Vibrio parahaemolyticus*

En la Tabla 2 se presentan los porcentajes de inhibición de cada una de las fracciones analizadas, así como del extracto metanólico. En la tabla se puede observar, que si bien, la fracción 5 tuvo un porcentaje de inhibición por arriba del 50%, no fue la fracción más activa. Sin embargo, la fracción 3 obtuvo un porcentaje de 72% de inhibición, al igual que el extracto metanólico, por lo que se puede deducir que en la fracción 3 se encuentra el componente bioactivo del extracto, además que a concentraciones menores ( $1000$  y  $700 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) su actividad aumenta, en relación al extracto metanólico.

Tabla 2. Porcentajes de inhibición del extracto metanólico y fracciones de *G. vermiculophylla*

Muestra	1700 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	700 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Extracto metanólico	72.85	53.82	31.96	29.97
Fracción 1	47.75	40.48	30.74	32.79
Fracción 2	60.31	36.84	36.50	24.92
Fracción 3	72.20	50.54	45.94	43.55
Fracción 4	58.11	41.19	29.72	24.82
Fracción 5	66.41	44.71	29.91	21.05

En la tabla 3, se muestran los valores de MIC<sub>50</sub> del extracto metanólico y fracciones de *G. vermiculophylla*. En estudios previos se han evaluado los extractos metanólicos de otras macroalgas para inhibir el crecimiento de bacterias. Manilal *et al.* (2011) extrajeron compuestos bioactivos de la macroalga *L. brandinii* utilizando metanol los cuales mostraron mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, en comparación con las Gram negativas.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (MIC<sub>50</sub>) en  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  del extracto metanólico y fracciones de *G. vermiculophylla* para la bacteria *V. parahaemolyticus*.

Muestra	MIC <sub>50</sub>
Extracto crudo	<1400
Fracción 1	>1700
Fracción 2	<1700
Fracción 3	<1400
Fracción 4	<1700
Fracción 5	<1700



Layse *et al.* (2011), realizaron un estudio muy completo, en el que evaluaron diferentes especies de *Gracilaria* y evaluaron diversas actividades biológicas, entre ellas, actividad antifúngica, citotoxicidad, antiinflamatoria y antibacterial, siendo esta última la de mejor potencial. Determinaron la capacidad de las distintas especies contra bacterias de tipo Gram negativas y Gram positivas, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio cholera*, *Shigella boydii*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, entre otras. En ese estudio la actividad antimicrobiana fue evaluada con discos que fueron impregnados con una porción del extracto a diferentes concentraciones, las cuales iban desde  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $5 \text{ mg/mL}$ ; concentraciones por arriba de las analizadas en este trabajo, además de que sólo indicaban si había inhibición o no, es decir de una manera cualitativa y no cuantitativa.

En 2009, Su-Tuen y Jiann-Chu evaluaron un extracto acuoso (caliente) de *Gracilaria tenuistipitata*, en el cual vieron un efecto positivo en la respuesta inmune del camarón blanco, después de un proceso infeccioso con *Vibrio alginolyticus*. Se analizaron concentraciones de 0 (control), 200, 400 y  $600 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Los camarones fueron tratados por inmersión con estas concentraciones de *G. tenuistipitata*, por un tiempo de 3 horas, y posteriormente sometidas a una infección con *V. alginolyticus*. Los resultados indicaron que el recuento de hemocitos, la actividad de las enzimas fenoloxidasas y superóxido dismutasa de los camarones sumergidos en  $600 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  fueron significativamente más altos que los de los camarones de control a las 12–72 h después de la prueba.

Todo lo anterior, sirve de base para validar los resultados obtenidos en este proyecto, ya que las concentraciones evaluadas tuvieron una mejor actividad biológica, dado que estas fueron mucho menores que las evaluadas en las investigaciones descritas anteriormente.

Una vez obtenidos los porcentajes de inhibición, se tomó la fracción 3, como la fracción más activa y se procedió a su subfraccionamiento, mediante monitoreo por TLC, se llegó a apreciar 4 bandas (Figura 14).

Estas bandas fueron separadas por medio de cromatografía en columna, filtradas y concentradas y almacenadas para análisis posteriores.

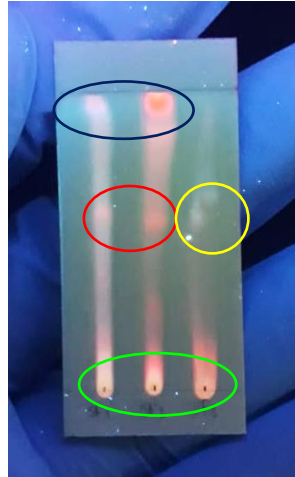


Figura 14. Bandas pertenecientes a la fracción 3.

En la figura 15, se presenta la cinética de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*. Se puede apreciar que la densidad óptica mostró una tendencia semi-estacionaria a partir de las 12 h de incubación en las concentraciones de 1700 y 1400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , en comparación con el resto. Esta tendencia indica que, en estas concentraciones, el extracto empieza a inhibir el crecimiento de *V. parahaemolyticus* a partir de las 12 h.

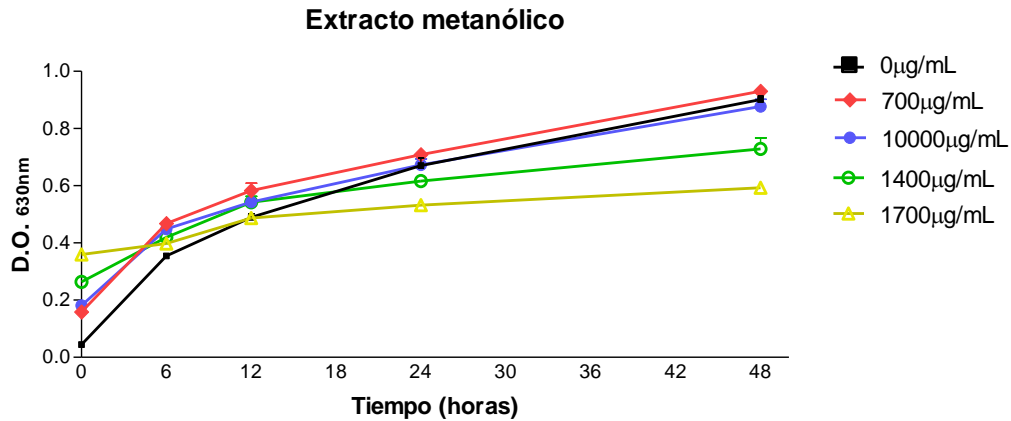


Figura 15: Cinética de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*.

En la figura 16, se presenta la cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 1 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*. Se aprecia que a la concentración de  $1700 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , en el periodo de las 12 a las 48 horas, la D.O. se mantiene en una fase, sin embargo, respecto al control, no hay diferencia significativa, las 48 horas. Mientras que en la concentración de  $1400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , durante las 12 y 24 horas, hay un descenso en la densidad óptica.

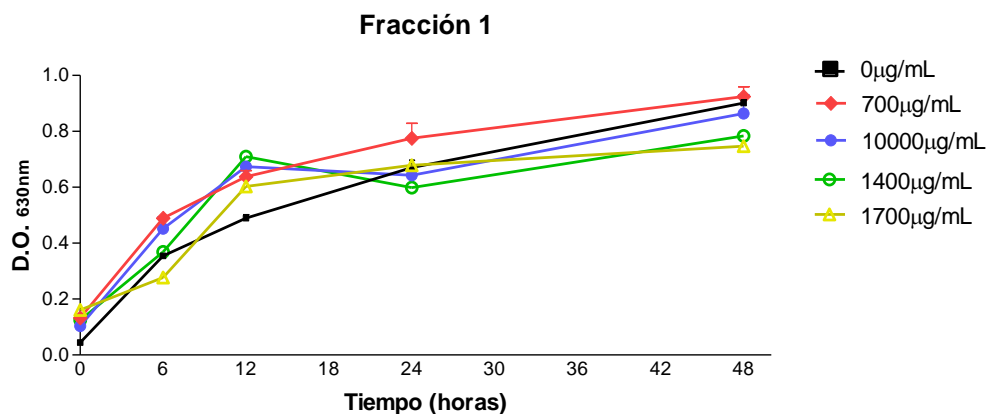


Figura 16: Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 1 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*.

En la figura 17, se presenta la cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 2 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*. Con esta fracción, ninguna de las concentraciones tuvo un efecto inhibitorio sobre la bacteria.

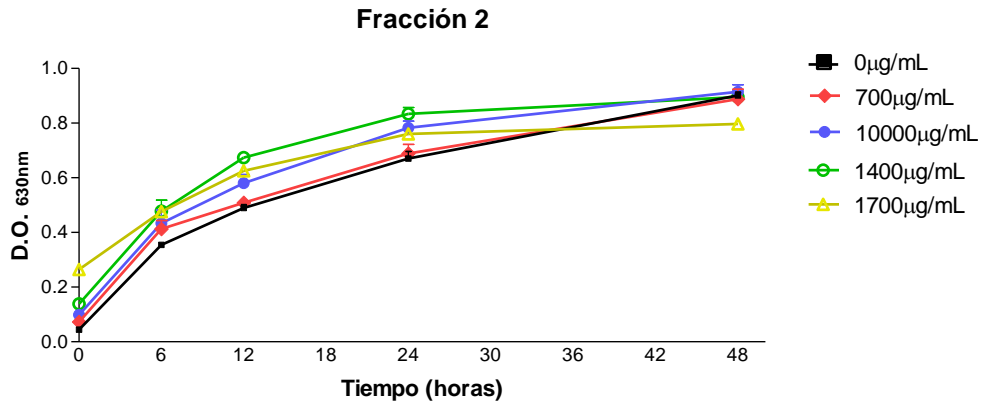


Figura 17: Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 2 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*.

En la figura 18, se presenta la cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 3 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*. Con esta fracción se observó que a la concentración de 1700 µg·mL<sup>-1</sup> la fase estacionaria en las D.O. comenzó a partir de las 12 horas, mientras que a concentraciones de 1400 y 1000 µg·mL<sup>-1</sup>, esta fase se alcanzó a partir de las 24 horas. En los 3 casos se encuentran muy por debajo de la densidad óptica del tratamiento control.

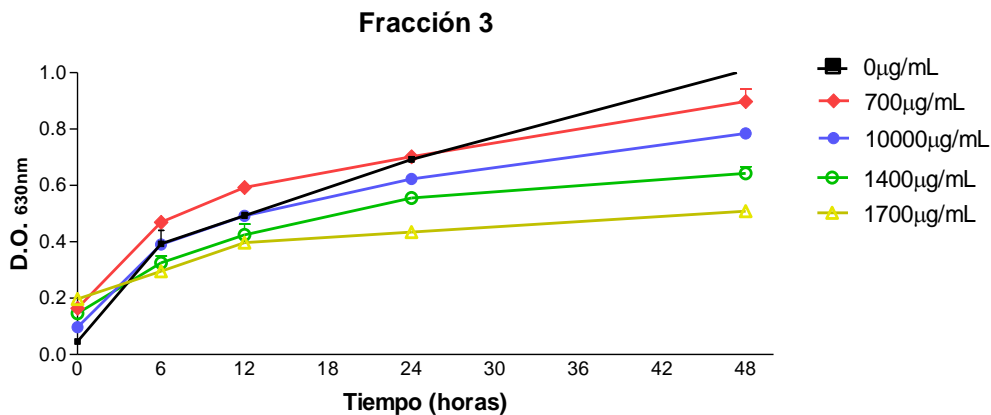


Figura 18: Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 3 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*.

En la figura 19, se presenta la cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 4 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*. En este caso, todas las concentraciones mostraron una tendencia similar al control, sin embargo, en concentraciones superiores a  $1400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  la D.O. disminuyó significativamente con respecto al control.

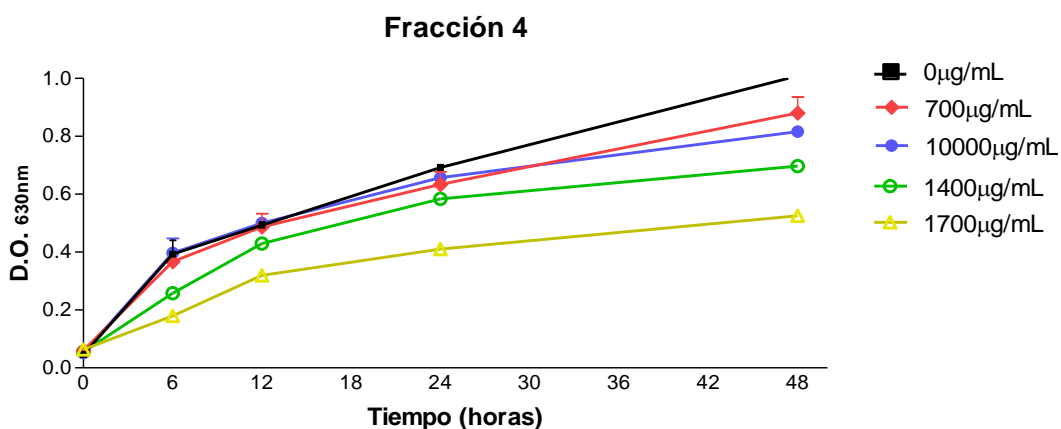


Figura 19: Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 4 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*.

En la figura 20, se presenta la cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 5 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*. De igual manera que la fracción anterior, estas cinéticas tienen una tendencia similar al control, sin embargo, en un periodo de las 24 a las 48 horas, la D.O. de la concentración de  $1700 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  mantuvo una tendencia semiestacionaria.

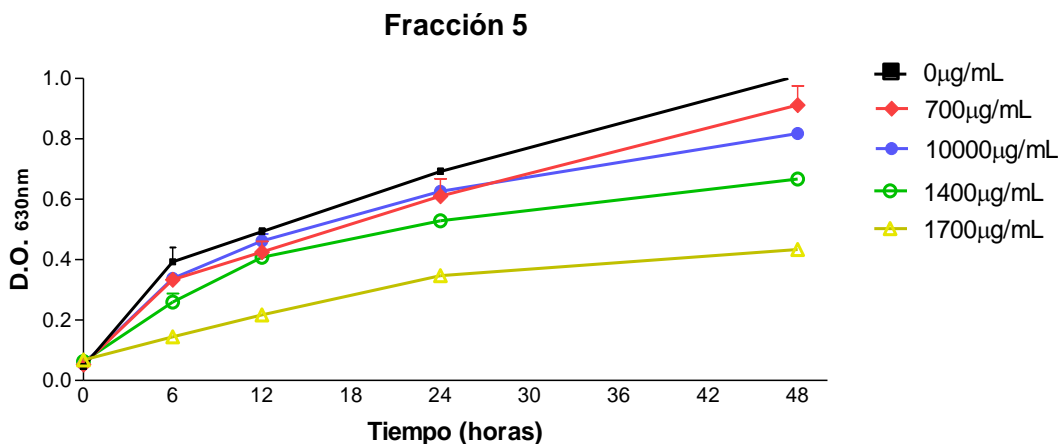


Figura 20: Cinética de la actividad antimicrobiana de la fracción 5 de *G. vermiculophylla* contra *V. parahaemolyticus*.

Estudios realizados en la India con diferentes especies de *Gracilaria*, han demostrado buena actividad antimicrobiana, En la India se realizó el estudio de los extractos metanólico y éter dietílico de cuatro especies de *Gracilaria* (*crassa*, *folifera*, *debilis* y *corticata*), colectadas en la costa de Mandapam. Los resultados de este estudio demostraron que ambos extractos de las cuatro especies de *Gracilaria* tuvieron actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* y *Eschericia coli*, destacando a *Gracilaria folifera* con la mayor actividad frente a las dos cepas de bacterias evaluadas (Rameshkumar *et al.*, 2016).

Otro estudio realizado en la India, donde se evaluó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Gracilaria adulis*, colectada en la costa del suroeste de este país. El extracto metanólico de *G. adulis* mostró muy buena actividad antibacteriana, principalmente, contra *Vibrio cholerae*, *Eschericia coli* y *Salmonella typhii* (Duraismy *et al.*, 2012).

### III.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

De las subfracciones cromatográficas de la fracción más activa del extracto metanólico (fracción 3), se realizó un análisis de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ ) y el espectro se comparó con lo reportado en la literatura. La figura 21 muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de las subfracciones 1, 2, 3 y 4 de la Fracción 3

y se señala el desplazamiento químico (en ppm) para cada tipo de protón en la molécula. En el recuadro rojo se muestran las señales a campo alto, que son características de los terpenos.

Ostil-Castillo *et al.* (2010) reportaron la caracterización de compuestos procedentes de extractos de plantas terrestres con potencial biológico. En su estudio utilizaron RMN  $^1\text{H}$ , para la determinación de las estructuras químicas de los posibles compuestos activos. Entre sus resultados destaca la presencia de señales características de protones vinílicos en 4.69 una señal doble, del protón vinílico H-29a, en 4.57 ppm una señal doble, para H-29b, en 3.19 ppm se observó una señal múltiple para el protón unido a C-OH, una señal triple de dobles en 2.38 ppm para H-19, también dos señales simples entre 1.8 y 0.7 ppm debidas a metilos terciarios. El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  también coincidió con la estructura del triterpeno conocido como lupeol (Figura 22).

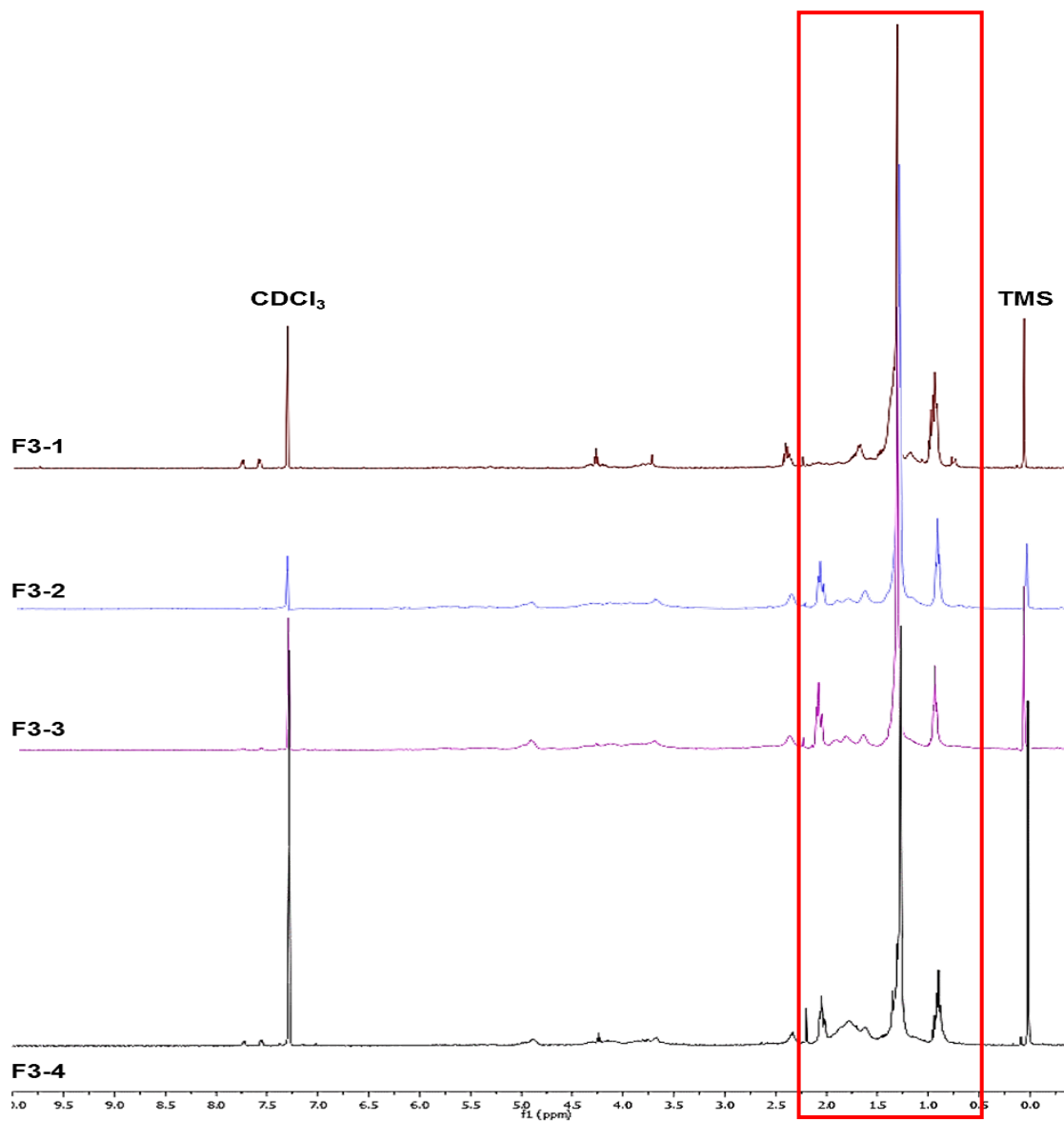


Figura 21. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de subfracción 1, 2, 3 y 4 de la fracción 3, 400 MHz.



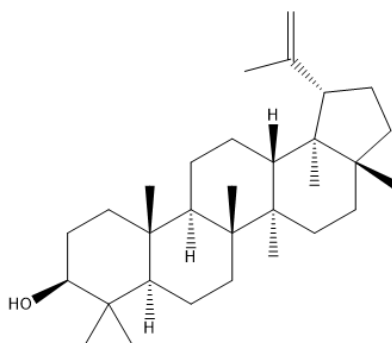


Figura 22: Estructura química de triterpeno lupeol.

Haciendo una comparación de lo publicado por los anteriores investigadores y los resultados del análisis de RMN para este trabajo, existen señales similares al terpeno lupeol en la subfracción 4 de la fracción 3 (F3-4) (Figura 23).

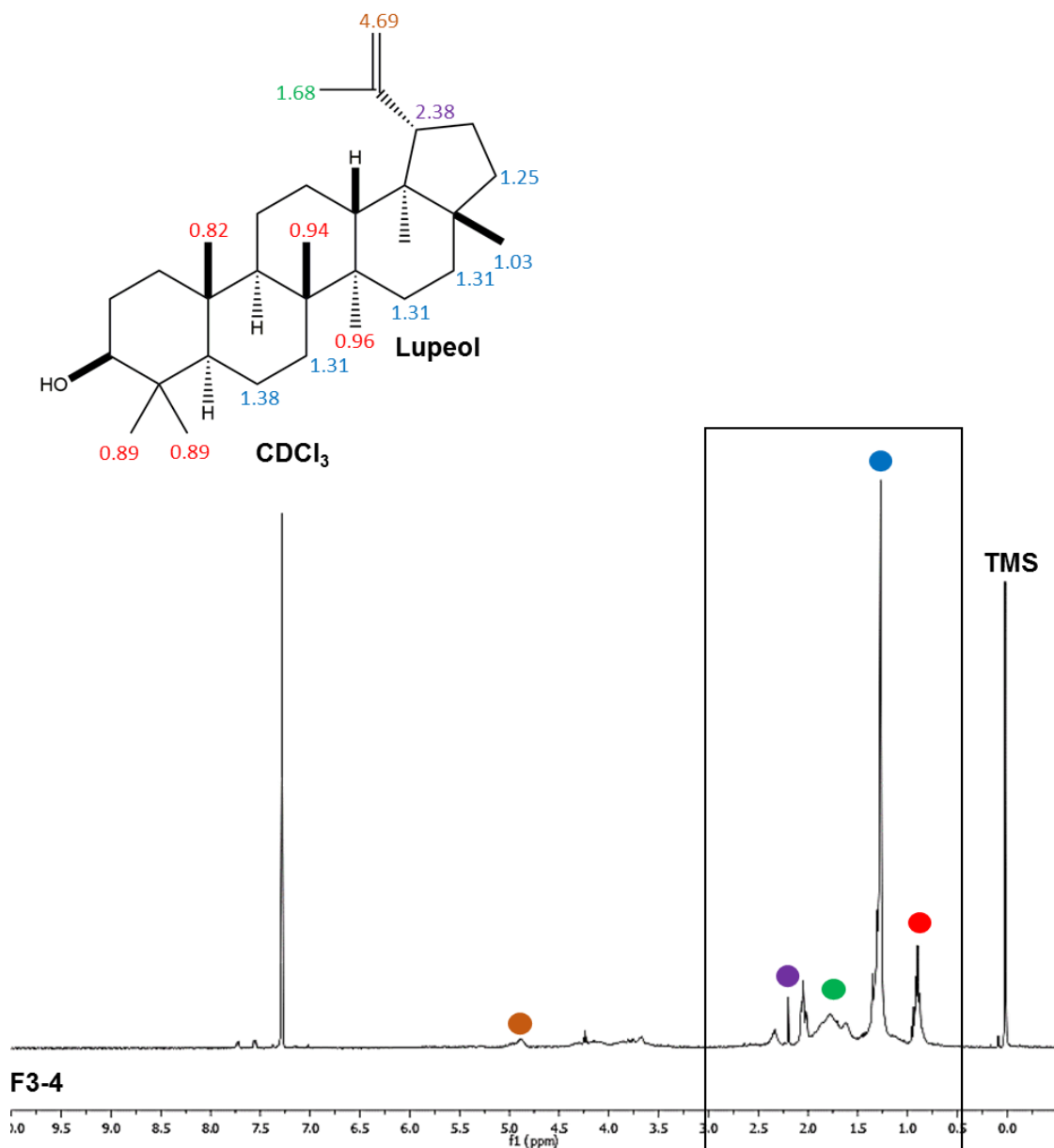


Figura 23. Comparación del espectro RMN de F3-4 con el triterpeno lupeol

La comparación del espectro de F3-4 con el terpeno lupeol, muestran señales similares a campo alto, entre 0.5 y 2.5 ppm, y la señal entre 4.5 y 5 ppm representativa de los dobles enlaces. Estas señales son características de los compuestos de tipo terpeno, mismas que son consistentes con reportes previos. Relacionando los resultados obtenidos en el perfil fitoquímico y los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , existen indicios de que los compuestos activos presentes en el extracto metanólico de *G. vermiculophylla* son de tipo terpeno.

Diferentes estudios han demostrado la actividad de las macroalgas contra diferentes microorganismos y se han logrado identificar el tipo de metabolitos secundarios presentes en los extractos de las macroalgas que son responsables de esta actividad. Cyriac y Eswaran (2015) publicaron un estudio en donde identificaron por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) 13 compuestos bioactivos del extracto metanólico de *Gracilaria dura*, la mayoría fueron de tipo ácido graso como ácido oleico, ácido palmitoleico y el ácido 9-octadecanoico; también se identificaron dos compuestos de tipo terpeno, fitol y escualeno, los cuales ya se han reportado como compuestos con actividad antibacteriana, antioxidante y antitumoral.

Agra *et al.* (2018) publicaron un estudio de actividad antibacteriana contra *Aeromonas hydrophyla* y *Vibrio sp.*, del extracto acetato de etilo de *Gracilaria arcuata*, demostrando que inhibe del crecimiento de ambas bacterias. A través de un análisis por GC-MS, se determinó que los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo son de tipo ácido graso y esteroides. Entre los compuestos que identificaron están: ácido hexadecanoico, colest-5-en-3-ol, estigma-5-en-3-ol (24s), ergost-5,7-dien-3-ol (3 $\beta$ ) y ergost-5-en-3-ol.

### **III.6 Extracción de terpenos**

El análisis fotoquímico realizado al extracto metanólico, dio positivo a compuestos de naturaleza tipo terpenos, y teniendo como referencia las cromatografías en capa fina (TLC) se cree que, dentro de las fracciones obtenidas, se encuentran este tipo de moléculas, principalmente en la fracción 3, ya que tuvo una actividad similar al extracto crudo. Adicionalmente, el análisis de RMN realizado a esta fracción, permite inferir que efectivamente existen compuestos de esta naturaleza dentro de la fracción. Basado en lo anterior, se realizó la extracción de terpenos, directamente de la harina de *G. vermiculophylla*. Teniendo como resultado un extracto terpénico (figura 25) con un rendimiento de 0.12%. Para confirmar que la extracción fue eficaz, se extrajeron compuestos terpenos, se realizó una prueba de Lieberman-Bouchard (figura 24).

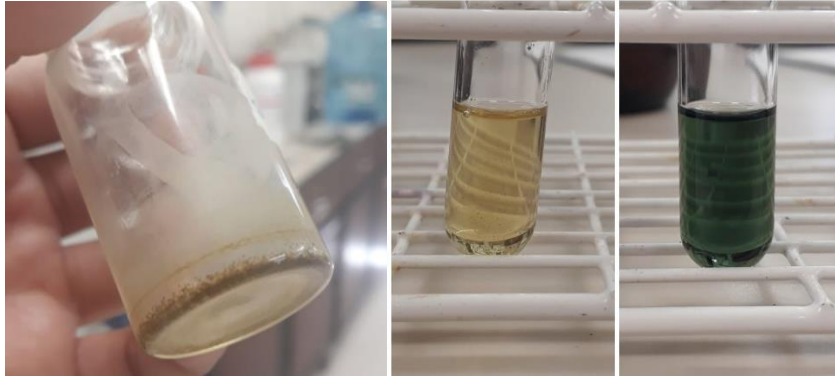


Figura 24. Extracto terpénico y reacción Liebermann-Bouchard positiva.

#### **IV. Conclusiones**

- Se logró obtener un extracto metanólico del alga *G. vermiculophylla*, con actividad contra *Vibrio parahaemolyticus*. Teniendo un rendimiento de 8.7 g de extracto/100g de harina seca.
- Se derivaron 5 fracciones del extracto crudo, las fracciones 2, 3 y 5 mostraron inhibición superior al 60%. Siendo la fracción 3 la más activa contra *V. parahaemolyticus*, infiriendo que esta fracción puede ser la que contenga los grupos de tipo terpeno.
- La fracción más activa (fracción 3) se usó para realizar un subfraccionamiento, del cual se obtuvieron 4 nuevas subfracciones.
- Los resultados del análisis de RMN indican que dentro del espectro de la subfracción 4 de la fracción 3, existen señales características de los compuestos terpenos, que sumado al resultado de las pruebas fitoquímicas indica la presencia de compuestos de tipo terpeno.
- Se obtuvo un extracto terpénico con un rendimiento de 0.12%, demostrando que la presencia de este grupo es importante para la actividad antibacteriana.

## V. Recomendaciones

- Realizar un análisis por espectrometría y espectroscopia (GS-masas, infrarrojo) de las subfracciones obtenidas, para purificar y caracterizar las moléculas presentes en esas subfracciones.
- Desarrollar un bioensayo *in vivo*, para determinar la efectividad, de las fracciones/subfracciones del extracto metanólico de *Gracilaria vermiculophylla* en camarón infectado con *Vibrio parahaemolyticus*.

## VI. Literatura citada

- Agra A., Kasanah N. 2018. Bioactivity of red seaweed *Gracilaria arcuate* against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio sp.* The Natural Products Journal. 2(8): 147-152.
- Álvarez, T.P., F. Soto., Q.S, Avilés., L.C. Díaz., C.L. Treviño. 2012. Panorama de la investigación y su repercusión sobre la producción Acuícola en México. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca -Instituto Nacional de la Pesca. 30 pp.
- Balakrish N., y Hormazábal O.J. C. 2005. The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. Revista chilena de infectología 22(2): 125-130.
- Chew, Y.L. y Lim, Y.Y. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT-Food Science Technology, 41(6): 1067-1072
- COSAES. 2015. Protocolo sanitario. Recuperado el 22 de Mayo del 2019. [www.cosaes.com](http://www.cosaes.com).
- Cunningham, S. y Joshi, L. 2010. In: Transgenic Crop Plants; Kole, C. Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg 2010, pp. 343-357.
- Cyriac B. y K. Eswaran. 2015. GC - MS determination of bioactive components of *Gracilaria dura*(C.Agardh) J. Agardh. Science Research Reporter 5: 100-105.
- Cyriac B. y Eswaran K. GC-MS determination of bioactive components of *Gracilaria dura* (C.Agardh) J. Agardh. Science Research Reporter. 5(2): 100-105.
- Duraisamy R., C. Veerabahu, Priya R. 2012. Antibacterial activity of some selected seaweeds from the Gulf of Mannar Coast, South India. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 5(4):89-90.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., y Attia, H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. Food Chemistry, 124(2), 411-421.

- Gómez-Gil, B., Roque, A. y Guerra, A. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: PÁEZ-OSUNA, F. (Ed.). Camaronicultura y medio ambiente. México: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, 273-274.
- Gupta, S. y Abu-Ghannam, N. 2011. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2011, 12, 600-609.
- Han, J.E., L. Mohny, K. Tang, C. Pantoja, y D.V. Lightner. 2015. Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports* 2:17-21.
- Heitmann, G., Jofré, M., Hormázabal, O., Carlos, J., Olea, N., Vallebuona, S., y Valdés, H. 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista chilena de infectología*, 22(2), 131-140.
- Holdt, S.L. y Kraan, S. 2011. Bioactives compounds in seaweeds: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3): 543-597.
- Immanuel, G., Vincibai, V.C., Sivaram, V., Palavesam, A. y Marian, M.P. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236 (1-4): 53-65.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., y Ewart, H. S. 2011. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 9(2), 196-233.
- Joshi, J., J. Srisala, V.H. Truong, I.T. Chen, B. Nuangsaeng, O. Suthienkul, C.F. Lo, T.W. Flegel, K. Sritunyalucksana, y S. Thitamadee. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture* (428–429):297-302



- Kamba A.S. y Hassan L. G. 2010. Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Euphorbia balsamifera* leaves, stems and root against some pathogenic microorganisms. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 4(9), pp. 645-652
- Keyrouz, R., Abasq, M.L. y Le Bourvellec, C. 2011. Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. Food Chem., 2011, 126, 831-836.
- Layse C., Almeida, H., Falcão, G., Lima, C., Montenegro, N., Lira, P., Athayde-Filho, L., Rodrigues, M., Souza, J., Barbosa-Filho y Leônia M. 2011. Bioactividades de algas marinas del género *Gracilaria*. Department of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil.
- Leonard S.G., Sweeney T., Pierce K.M., Bahar B., Lynch B.P. y O'Doherty, J.V. 2010. The effects of supplementing the diet of the sow with seaweed extracts and fish oil on aspects of gastrointestinal health and performance of the weaned piglet. Livest. Sci., 2010, 134, 135-138.
- Li Y. X., Y. Li y Kim S. 2015. "Anticancer Compounds from Marine Algae", en S. K. Kim y K. Chojnacka (eds.),
- Li Y.X., y Kim S.K. 2011. Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry: An Overview. Food Sci. Biotechnol., 2011, 20, 1461-1466.
- Lightner D.V 2013. Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS). Videoconferencia de la Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. OIRSA.
- Lightner, D.V., Redman, R., Pantoja C., Noble, B. y Tran, L. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. Global Aquacult Advocate Jan/Feb 2012:40
- Manilal E. Sugathan, S., Balu S., Kiram, G., Selvin, J., Shakir, C. y Lipton, A. 2011. La actividad biológica del alga roja *Laurencia brandenii*. Acta Bot. Croat. 70: 81-90.

- Navarro M., Ruiz P., Valencia D., Robles R., Ruiz E., Virués C., Hernandez J., Domínguez Z., y Velazquez C. 2013. Antibacterial Activity of Sonoran Propolis and Some of Its Constituents Against Clinically Significant Vibrio Species. *Foodborne pathogens and disease*. 10(2): 151.
- Nithya P. y Dhanalakshmi B. 2016. Antibacterial activity of methanol extracts from selected seaweed of south east coast of India. *International Journal of Applied Research*. 2(9): 714-718.
- Osti-Castillo M., Torres-Valencia J., Villagómez-Ibarra J. y Castelán-Pelcastre I. 2010. Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 9(5), 359-367.
- Osuna Ruiz, I., C. M. López Saiz, A. Burgos Armando, M. Nieves Soto y M. A. Hurtado Oliva. 2016. Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweeds species from Sinaloa, Mexico, *Pharmaceutical Biology*, 9:1-15.
- Pallela R., Na-young, Y. y Kim, S.K. 2010. Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms. *Marine Drugs*, 8: 1189-1202.
- Pantoja C., y D.V. Lightner. 2014. EMS/AHPND: Descripción de la enfermedad en Asia y América. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel, editores, *Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos*. OIRSA, Rep. de Panamá, PAN. p.172-177
- Rajasekar-Thirunavukkarasu, Priyadharshini-Pandiyar, Deivasigamani-Balaraman, Kumaran-Subaramaniyan, Gnana-Jothi G.E., Sakthivel-Manikkam, Balamurugan-Sadaiyappan. 2013. Isolation of bioactive compound from marine seaweeds against fish pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* (VA09) and characterisation by FTIR. *Journal of Coastal Life Medicine*, 1: 26-33.
- Rameshkumar S., Radhakrishnan K., Sreenivasan A., Aanand S. 2016. Antibacterial activity of four *Gracilaria* species of red seaweeds collected from Mandapam Coast, Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve, India. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4: 703-707.

- Rameshkumar S., Radhakrishnan K., Sreenivasan A., y Aanand S. 2016. Antibacterial activity of four *Gracilaria* species of red seaweeds collected from Mandapam Coast, Golf of Mannar Marine Biosphere Reserve, India. *Journal of Coastal Life Medicine*. 4(9): 703-707.
- Rodriguez-Bernaldo de Quiros, F. S. Frecha, P. A. Vidal, y H. J. Lopez. 2010. Antioxidant compounds in edible brown seaweeds, *European Food Research and Technology*, vol. 231, no.3, pp. 495–498, 2010.
- Roque A., Molina A. A., Bolán M. C. y Gomez G. B. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17:383–387.
- Santiago M., Espinoza A., y Bermúdez M. 2009. Use of antibiotics in culture shrimp. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 40(3):22-32
- Soto R. S., Simoes N., Roque A. y Gómez G. B. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*, 258:109–115.
- Soto, S. A., Gomez, B., Lozano, R., Betancourt, M. y Morales, M. 2015. Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol*, 81(5): 1689–1699.
- Su-Tuen Y. y Jiann-Chu C. 2009. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed earlier recovery in immunity after a *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish & Shellfish Immunology* 26 (2009) 724–730.
- Tran L., Nunan, L., Redman, R., Mohny, L., Pantoja C., Fitzsimmons, K. y Lightner, D. 2012. Determinación de la naturaleza infecciosa del agente del síndrome de necrosis hepatopancreática aguda que afecta a los camarones peneidos, 105 (1): 45-55.
- Varela A. y Peña, N. 2014. El Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV): una revisión y su impacto en la camaronicultura costarricense. *Revista Ciencias*

Veterinarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Costa Rica. 28 (2), 51-69.

Varela A. y Peña-Navarro, N., 2016. Histopatología diferencial de tres enfermedades bacterianas que afectan el hepatopáncreas de camarones peneidos. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 27(1):73-80.

Wijesekara I., Pangestuti, R., y Kim, S. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydrate Polymers, 84(1), 14-21.

Zhang Z., Wang F, Wang X, Liu X, Hou Y, y Zhang Q. 2010. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. Carbohydr. Polym. 82: 118–121.