

UTILIZACIÓN DE EXTRACTO DE AJO (*Allium sativum*) Y EXTRACTO DE
CÍTRICOS COMO TRATAMIENTOS PROFILÁCTICOS DE AEROMONIASIS EN
GUPPYS (*Poecilia reticulata*)

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia
De la
Universidad Nacional Autónoma de México
Para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
Por

Efrén Boylan Sánchez

Asesora: MVZ. Ana Estela Auró Angulo

México D.F 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A MI MADRE, ROSARIO SÁNCHEZ CARREÓN, POR DARME SU AMOR, CARIÑO
Y CONFIANZA

A MI ESPOSA E HIJOS

A LA TODA LA FAMILIA SÁNCHEZ CARREÓN

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE CON SUS CONSEJOS MOTIVARON A REALIZAR EL PRESENTE TRABAJO EN ESPECIAL A LA MVZ. ANA AURO Y AL MVZ. AZAEL AVILA

AL DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA DE LA FMVZ

AL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE LA FMVZ

CONTENIDO

Página

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Historia de la Acuariofilia de los peces de ornato.....	2
1.2 <i>Poecillia reticulata</i> como pez ornamental.....	2
1.3 Enfermedades bacterianas en peces de ornato.....	3
1.4 Medicina Alternativa en el tratamiento de enfermedades de peces.....	5
1.41 <i>Allium sativum</i> y sus propiedades terapéuticas.....	6
1.42 Extracto de cítricos y sus propiedades terapéuticas.....	7
1.5 Justificación.....	8
1.6 Objetivo.....	9
1.7 Hipótesis.....	9
II MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
2.1 Preparación de los acuarios experimentales.....	10
2.2 Elaboración de tratamientos experimentales.....	10
2.3 Obtención de animales experimentales.....	11
2.4 Evaluación del efecto directo de <i>Alium sativum</i> y cítricos.....	11
2.5 Evaluación del efecto antimicrobiano de <i>Alium sativum</i> y cítricos.....	12
2.6 Diagramas de flujo del Experimento.....	15
III RESULTADOS.....	18
3.1 primera prueba biológica.....	18
3.2 Segunda prueba biológica.....	21
IV DISCUSIÓN.....	23
V CONCLUSIONES.....	26

VI LITERATURA CITADA.....	27
VIII FIGURAS.....	30

RESUMEN

BOYLAN SÁNCHEZ EFRÉN. Utilización de extracto de ajo (*Allium sativum*) y extracto de cítricos como tratamientos profilácticos de aeromoniasis en guppys (*Poecilia reticulata*) (Bajo la dirección de Ana Estela Auró Angulo)

El objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vivo* la capacidad antibacteriana del ajo y el extracto de cítricos en guppys (*Poecilia reticulata*). Se llevaron a cabo 2 experimentos. En el primero se evaluó el efecto directo del ajo y de los cítricos sobre *Poecilia reticulata*, se formaron 3 grupos experimentales, al primer grupo se le aplico extracto de ajo, al segundo grupo se le aplico extracto de cítricos, y al tercer grupo se denominó control. Durante 5 días consecutivos se aplicaron los tratamientos, midiéndose el porcentaje de mortalidad. La mortalidad registrado fue de 0.0% para el control, 10% para cítricos y 10 % para el ajo, sin embargo no se encontró diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los grupos tratados y el control. En el segundo experimento se evaluó la capacidad antimicrobiana del ajo y de los cítricos, formándose grupos similares al anterior experimento, con los mismos tratamientos experimentales, solo que esta vez se desafiaron con cepas tipificadas de *Aeromonas sp* durante 5 días, midiéndose el porcentaje de mortalidad en los diferentes grupos. Se registro un porcentaje de mortalidad del grupo control y el grupo de cítrico de 53.33 % y 23 % respectivamente, encontrándose diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) a favor del grupo cítricos. El grupo de ajo registró una mortalidad de 3.33% con diferencia significativa ($\alpha=0.05$) con el grupo control y con el grupo cítricos. Con estos resultados se concluye que los extractos de ajo y cítricos pueden utilizarse como profilácticos y terapéuticos de aeromoniasis en peces ornamentales. **Palabras clave:** *Allium sativum*, Cítricos, *Aeromonas*, *Poecilia reticulata*.

I INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la Acuariofilia

La Acuicultura, es una de las muchas actividades económicas mas antiguas, que se caracteriza por el aprovechamiento racional y sostenible de los organismos acuáticos, con la finalidad de proveer alimento. Sin embargo, otra de las finalidades es proveer especies para acuarios ornamentales, a esta parte de la acuicultura se le conoce como *Acuariofilia*. Se cree que la acuariofilia nace en China en el siglo XVII, con el mantenimiento en estanques de carpas doradas (*Ciprinus carpio*), posteriormente fue descubierto el gibelio (*Carassius auratus*) que bajo selección genética, dio origen a la carpa roja o pez rojo, que fue mantenido en vasijas de porcelana en un principio, y posteriormente en vasijas de cristal, marcando este acontecimiento el inicio de la acuariofilia moderna, sin embargo, fue hasta el siglo XIX que el naturalista ingles S.H Ward instalo el primer acuario, pero a partir de 1855 el naturalista ingles P.H. Goos comienza a utilizar el termino *Acuario* en sus obras, refiriéndose a semejar lo mas posible a la naturaleza.¹

1.2 *Poecilia reticulata* como pez ornamental

El guppy o *Poecilia reticulata* pertenece a la familia *Poeciliidae* también conocidas como carpas dentadas vivíparas, Es considerado como una de las especies de peces mas populares del mundo, además de ser una especie muy estudiada.² El hábitat de los guppys incluye la zona septentrional de Brasil, Venezuela, Guayana, Barbados y Trinidad, pero , se han adaptado bien al las condiciones ambientales de México. Son peces pequeños, los machos llegan a medir 3 cm y las hembras 6 cm. Las medidas meristemáticas de las aletas de los Guppys son: D (8) Aleta Dorsal, C (16-18) Aleta Caudal, A (8-10) Aleta Anal, V (5) Aleta Ventral, P (13-14) Aleta Pectoral, L (26-28) Línea Lateral, LT (8) Línea Transversal. Cada letra corresponde a la cantidad de radios en cada aleta , excepto las letras L y LT, a las que el número

corresponde con la cantidad de escamas.³ El dimorfismo sexual viene dado principalmente en la forma de la aleta anal, la cual en el macho está modificada en forma de gonopodio, su órgano reproductor. Los machos poseen la aleta caudal coloreada y más grande que las hembras. Los guppys son peces que requieren gran cantidad de proteína en la dieta, pues en vida libre consumen pequeños animales como gusanos, crustáceos e insectos, larvas de mosquito, vegetales y algas.⁴ Estos peces requieren ser mantenidos en acuarios comunitarios, con un rango de temperatura de los 22° a los 28°C, con una dureza media de 100 a 200 ppm de carbota de calcio y magnesio, y el agua ligeramente alcalina con un rango de pH entre 7.2 - 7.8⁴

1.3 Enfermedades bacterianas en peces de ornato

Los guppys (*Poecilia reticulata*) al igual que muchas especies de peces de agua dulce mantenidas en cautiverio son susceptibles a enfermedades infecciosas. Estas enfermedades se dan por modificaciones en los parámetros fisicoquímicos del agua como la temperatura, dureza, pH, amoníaco, nitritos, entre otros,⁵ que tienen como consecuencia directa estresar al pez, causando una depresión del sistema inmunológico, y una débil o ausente respuesta contra los microorganismos causantes de enfermedad presentes en el acuario.^{6, 7} Estas enfermedades se presentan naturalmente, ya que los animales son sometidos a largos periodos de estrés por hacinamiento, falta de alimento o una deficiente calidad del agua. Las enfermedades más comunes en peces ornamentales son las parasitarias, sin embargo, las enfermedades bacterianas pueden presentarse frecuentemente generando grandes pérdidas económicas.⁸

Las bacterias causantes de enfermedad se establecen en el acuario en el momento en que se introducen los peces.^{9 10} La mayoría son Gram negativas, entre las cuales destacan *Aeromonas* y *Pseudomonas*, que pueden aislarse en los acuarios como microflora normal, convirtiéndose en flora patógena por algún cambio brusco en los

parámetros fisicoquímicos del agua, alimento, o una excesiva manipulación.¹¹ Los peces enfermos contribuyen a la persistencia de las enfermedades, pues a través de sus excreciones y lesiones, liberan gran cantidad de gérmenes capaces de causar enfermedad a los peces sanos.¹² *Aeromonas hydrophilia*, y *Aeromonas salmonicida* afectan a la familia de los salmonidos, ciprinidos como la carpa, pero también se ven afectados la familia de los guramis, los poecilidos y los carácidos, puede haber muerte repentina, pues estas bacterias incuban de 24 a 72 horas (curso agudo) o presentar lesiones (curso crónico) como hemorragias, úlceras en órganos, palidez de las branquias, ascitis, que hace que las escamas se proyecten hacia fuera pareciendo los peces “cono de piña”.¹³ Esta enfermedad se transmite por vía digestiva y respiratoria (branquias) . La morbilidad puede ser del 30 al 40 % y la mortalidad pueda alcanzar hasta el 50 %.¹³ Estas bacterias también puede causar necrosis o podredumbre de las aletas, en la cual hay asociaciones con otras bacterias como *Pseudomonas fluorescens* y *Vibrio anguillarum*. La aparición de esta enfermedad esta relacionada con el aumento de temperatura y gran cantidad de materia orgánica.⁸

Entre los tratamientos recomendados se encuentra el uso de antibióticos como la oxitetraciclina, nifurpirinol, ácido oxalínico, paraclorofenoxietanol, eritromicina y sulfonamidas, con un protocolo de medicación no menor a los 5 días con recambios de agua del 25-30 % durante el periodo de medicación y el retiro de carbón activado del sistema de filtración.¹⁴ Sin embargo la dosificación en sistemas acuáticos muchas veces es complicada y costosa, además de no ser exacta, causando problemas como intoxicación por sobredosis en peces y demás organismos vivos presentes en el acuario como bacterias nitrificantes encargadas de llevar a cabo la desintoxicación de elementos nitrogenados en el acuario, o la resistencia bacteriana de organismos patógenos presentes en el acuario por no llegar a mantener los niveles terapéuticos adecuados de los medicamentos causando a futuro una inutilización de muchos antibióticos.¹⁵

1.4 Medicina Alternativa en el tratamiento de las enfermedades de los peces.

Otro tratamiento que puede ser efectivo y seguro es con medicina alternativa (MA), que ha tomado importancia debido los efectos colaterales negativos que se descubren en los fármacos de uso común, la resistencia bacteriana a los quimioterapéuticos y los altos costos de los medicamentos.¹⁶ En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través del protocolo denominado Alma-Atá, reconoce las terapéuticas alternativas como medicina correctiva y fomenta su utilización, sin embargo la aplicación oficial de dicho protocolo en nuestro país, se da hasta el año de 1997, con las reformas de la Ley General de Salud, en el artículo 224 fracción B, para el año 2002 se obtiene la Norma Oficial Mexicana de acupuntura y se presenta la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Cabe señalar que la homeopatía llegó a establecer su farmacopea desde 1992. En México el 53 % de las terapias realizadas corresponden a métodos alopáticos, mientras que el 47 % corresponde a terapias alternativas, destacando la herbolaria con un 17 %, en Sudamérica, Asia, África y Oceanía las terapias alternativas ocupan el 49%, 72 %, 78% y 47 % respectivamente, mientras que en Norteamérica y la Comunidad Europea solo representan el 22% y 32%.¹⁷ Sin embargo, en la Unión Europea, desde el pasado año, se han prohibido gran cantidad de antibióticos de uso veterinario por los efectos residuales en los productos de origen animal y por la resistencia bacteriana hacia los antibióticos de uso frecuente.¹⁸ Ante esta problemática, en medicina veterinaria se han realizado estudios con la finalidad de preservar la salud del animal sin efectos colaterales tanto para el animal, como para el ecosistema y así producir alimentos de origen animal libres de residuos.¹⁹ La medicina alternativa incluye técnicas como acupuntura, dietoterapia, homeopatía, herbolaria etc. Que han demostrado ser seguras y efectivas.¹⁶

La herbolaria consiste en la utilización de plantas o frutos en la terapia de alguna enfermedad, estas plantas o frutos se utilizan de diferentes maneras; por infusión, por maceración, por zumo fresco, o por ungüento. Algunas de las plantas mas utilizadas son el ajo y los cítricos.^{14, 16, 19}

1.4.1 *Allium sativum* y sus propiedades terapéuticas

Allium sativum es una planta de bulbo tunificado, con hojas largas basales y planas terminadas en punta, su flor es de color blanco rozado. La clasificación botánica del ajo es:

División; *fanerógamas*, subdivisión; *angiosperma*, clase; *monocotiledóneas*, orden; *liliforas*, familia; *liliáceas*, género; *allium*, Especie; *sativum*

Químicamente el ajo contiene proteínas (6 g), grasas (0.1-2 g), carbohidratos (31 g) y 135 kcal de energía, estos valores son en base a 100 gramos de ajo, además de contener vitamina C, fósforo, potasio, cinc y manganeso. Como principios activos contenidos en el aceite se encuentran el bisulfuro de alilo, trisulfuro de alilo, tetrasulfuro de alilo y bisulfuro de alilpropilo, representando de 1 a 4 gramos por cada 100 gramos de ajo, y como principios hidrosolubles se encuentra la aliina con 240 miligramos, y la alicina, que es el principio activo con actividad bactericida que mas se conoce, sin embargo, se han identificado otras sustancias como las alisatinas I y II y la garlicina que pueden tener el mismo efecto.²⁰

La fracción hidrosoluble de *Allium sativum* contiene alrededor de un 1% de aliina [(+)-S-alil-L-cisteína sulfóxido] como el aminoácido sulfurado principal. También contiene (+)-S-metil-L-cisteína sulfóxido, gamma-L-glutamil péptidos, S-alil-cisteína, aminoácidos ubicuos, y adenosina. En presencia de la enzima alinasa, la aliina se convierte en alicina (1 mg de aliina equivale a 0,45 mg de alicina).²¹ Debido a la alicina y sus productos de transformación, produce un efecto ligeramente hipolipemiente (colesterol, triglicéridos), antiagregante plaquetario,

activador de la fibrinólisis, y vasodilatador periférico,^{22, 21,16} además de mejorar daños endoteliales a nivel vascular.²³ Por otra parte, se ha visto que el ajo puede prevenir algunos tipos de carcinogénesis oral, al modular la lipoperoxidación, incrementando los niveles de glutatión (GSH), glutatión peroxidasa (GPx), y glutatión transferasa (GST), enzimas que actúan en la barrera antioxidante a nivel celular, previniendo la reacción en cadena de los radicales libres, involucrados en el desarrollo de algunos tumores.²⁴ Se ha estimado que cada miligramo de principio activo de ajo (alicina) equivale a 15 unidades estandarizadas de penicilina.¹⁶ En cuanto a enfermedades de tipo infeccioso, se ha demostrado que el ajo (*Allium sativum*) tiene efecto antibiótico,²⁵ efecto parasiticida²⁶ y efecto fungicida.²⁷ Mojica²⁸ y Peña²⁹ demostraron el poder antihelmíntico del ajo en tilapias y carpas, respectivamente. García²⁶ comparó el efecto del ajo y del azul de metileno contra *Costia necatrix* en tilapias, encontrando más efectivo y económico el tratamiento con ajo en este tipo de parasitosis. Ramos²⁷ demostró el poder fungicida del ajo sobre *Saprolegnia sp* en truchas, utilizando el extracto de ajo, a dosis de 200 mg /L, encontró un porcentaje de efectividad del 90% al quinto día, y del 100% al sexto día. En este experimento también se utilizó ajo machacado a la misma dosis, encontrando un 80% de efectividad al 6 día y un 100 % al séptimo día, recomendando este autor la utilización de esta planta como terapéutico y profiláctico.

1.4.2 Extracto de cítricos y sus propiedades terapéuticas

El extracto de cítricos se ha utilizado por su poder viricida, bactericida, antiparasitario y fungicida en procesos de desinfección de granjas de diferentes especies animales, incluyendo estanques de peces y camarones.^{30 31} El extracto de cítricos es una mezcla de varios frutos que incluyen toronja (*Citrus paradisi*), mandarina (*Citrus reticulata* blanco), y naranja dulce (*Citrus sinensis*). Esta mezcla de frutos aportan gran cantidad de ácido ascórbico, ácido cítrico y bioflavonoides

cítricos (naringina, hesperidina, rutina, quercetina) que actúan sinérgicamente en reacciones como antioxidantes, controlando la cantidad de radicales libres a nivel celular. Por otra parte, la capacidad contra infecciones que se ha detectado, se ha relacionado con la inhibición de toxinas en procesos metabólicos de los microorganismos patógenos y con el efecto bacteriostático y antiinflamatorio de los flavonoides.^{32, 33} En un estudio realizado para determinar la capacidad antibacteriana de un extracto de cítricos, se realizaron pruebas *In vitro*, y se calculó la Concentración Mínima Inhibitoria para *Lactococcus garvieae*, agente productor de la estreptococosis en la trucha y la tilapia, en 15ppm; *Aeromonas salmonicida*, agente causal de la furunculosis, en 60 ppm. Para *Aeromonas hydrophyla*, la CMI fue 150 ppm, y para *Yersinia ruckeri*, 300 ppm.³⁴ En este mismo estudio se llevó a cabo también una prueba *In vivo* con truchas, a las que se les inoculó por vía intraperitoneal *Lactococcus garvieae*, y se les proporcionó extracto de cítricos a dosis de 500 ppm por vía alimento al grupo experimental, teniendo como resultado 90 % de mortalidad en el grupo control, y 10 % de mortalidad en el grupo experimental, concluyendo que el extracto de cítricos tiene efectividad contra este tipo de bacterias.^{16, 34}

1.5 JUSTIFICACIÓN

El acuarismo en México, representa una producción de peces de ornato de 7,111 toneladas con un valor de \$32.133 millones de pesos. Por otro lado, el volumen de importación de peces de ornato es de 10,981,077 ejemplares con un valor de \$ 9.636 millones de pesos, proviniendo principalmente de Estados Unidos, Asia y Sudamérica.³⁵ Esta actividad tiene poca o nula intervención del Médico Veterinario, principalmente en el manejo médico y sanitario de las especies, lo que conlleva al desarrollo de enfermedades como la aeromoniasis, un mal diagnóstico de la misma, y un mal tratamiento, que se refleja con grandes pérdidas de animales y en la resistencia bacteriana a muchos productos presentes en el mercado. Es por esta

razón que la norma oficial mexicana NOM-021-PESC-94, regula los medicamentos usados en la terapéutica de peces, dejando un número limitado de productos para ser utilizados.³⁶ Dado este panorama la medicina alternativa ofrece recursos naturales, efectivos y a bajo costo, como el ajo y los cítricos, que podrían llegar a prevenir algunas enfermedades de origen bacteriano en peces ornamentales.

1.6 OBJETIVO

Evaluar la efectividad de *Allium sativum* y *cítricos*, como profilácticos de aeromoniasis en acuarios de peces ornamentales

1.7 HIPÓTESIS

Los acuarios con tratamientos de *Allium sativum* y de *cítricos*, tendrán menor índice de mortalidad causada por aeromoniasis, que los acuarios no tratados.

II MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la sección de acuicultura del departamento de especies productivas no tradicionales, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este estudio constó de dos experimentos o pruebas biológicas; en el primero se evaluó el efecto directo del ajo y cítricos sobre *Poecilia reticulata*, el segundo experimento consistió en evaluar el efecto antimicrobiano *in vivo* del ajo y cítricos sobre *Poecilia reticulata*

2.1 Preparación de los acuarios experimentales

Los acuarios experimentales fueron montados en recipientes plásticos con medidas de 37 cm largo X 26 cm ancho X 15 cm altura. Con una capacidad de 14.43 litros. Estuvieron dotados de un sistema de aireación en serie por una bomba comunitaria con la finalidad de oxigenar el agua. la temperatura se dio con calentadores fijos sumergibles de 20 w, y fue registrada con un termómetro digital auto adherible en cada uno de los acuarios. El agua utilizada fue tomada del grifo y declarada por medio de aeración y reposo durante 24 horas. Estos acuarios fueron colocados en un anaquel metálico tipo librero con una disposición de 3 acuarios en cada entrepaño.

2.2 Elaboración de Tratamientos Experimentales

El tratamiento de ajo fue elaborado a partir de ajo deshidratado en polvo*, en agua desionizada a fin de obtener una solución al 10 % de ajo. El tratamiento de cítricos

* ESCOSA Marca registrada

se utilizó en la presentación comercial.[†] Para el grupo control se utilizó agua desionizada.

2.3 Obtención de los animales experimentales

Los animales experimentales se obtuvieron del mercado de peces “Nuevo San Lázaro” ubicado en la colonia Magdalena Mixhuca, en la ciudad de México, fueron transportados en bolsas de plástico a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, se recibieron y aclimataron en un contenedor plástico, posteriormente, permanecieron durante 48 horas, tiempo en el cual fueron eliminados peces que enfermaron o murieron debido al estrés del traslado. Estos animales fueron adquiridos de un lote de 8 semanas de edad, con una longitud promedio de 1.5 cm / animal y un peso promedio de 0.1 gramos/ animal

2.4 Primera prueba biológica; Evaluación del Efecto directo de *Allium sativum* y Cítricos sobre *Poecilia reticulata*

Los animales fueron seleccionados totalmente al azar del contenedor de aclimatación, fueron tomados con red, y puestos en cada uno de los acuarios experimentales.

Se formaron 3 grupos experimentales, según los tratamientos; grupo *Allium sativum* (AS) compuesto por 10 animales experimentales, y 2 repeticiones con 10 animales cada una. El segundo grupo llamado cítricos (CB) compuesto por 10 animales experimentales, con 2 repeticiones de 10 animales cada una, el último grupo denominado control (C) formado por 10 animales experimentales, y 2 repeticiones

[†] Clean Bacter Marca registrada

de 10 animales cada una. Los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación, con una duración de 5 días

Aplicación de los tratamientos

Durante 5 días se aplicaron los tratamientos experimentales, para el grupo de ajo (AS) se aplicó 1.5 ml (150 mg) directamente en el acuario, para el grupo de cítricos (CB) se aplicó 1.5 ml directamente en el acuario, finalmente, al grupo control (C) se aplicó 1.5 ml de agua desionizada directamente en el acuario.

Durante esta prueba se evaluaron algunos efectos adversos los tratamientos mediante la mortalidad de los animales experimentales, durante esta prueba se midieron parámetros del agua (temperatura, pH, amonía, nitritos, dureza)

Evaluación de resultados

Los resultados fueron procesados en el paquete estadístico EPISTAT con la prueba de probabilidad exacta de Fisher con un límite de confianza de $\alpha=0.05$

2.5 Segunda prueba biológica, Evaluación del efecto antimicrobiano *in vivo* de *Allium sativum* y Cítricos sobre *Poecilia reticulata*

En el segundo experimento se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto de cítricos y de *Allium sativum* contra las enfermedades causadas por *Aeromonas*

Selección de animales experimentales y lotificación

Los animales fueron seleccionados totalmente al azar del contenedor de aclimatación, fueron tomados con red, y puestos en cada uno de los acuarios experimentales. Se formaron 3 grupos experimentales, según los tratamientos: grupo *Allium sativum* (AS) compuesto por 10 animales experimentales y 2 repeticiones. El segundo grupo llamado cítricos (CB) compuesto por 10 animales y

2 repeticiones. el último grupo denominado control (C) formado por 10 animales y 2 repeticiones

Obtención de las muestras para el aislamiento bacteriano

Se obtuvieron muestras de agua a partir de acuarios del departamento de Acuicultura de la FMVZ.; se remitió la muestra de agua al área de diagnóstico del departamento de microbiología e inmunología de la FMVZ de la UNAM, para cultivo primario, también se remitieron cultivos bacterianos donados por la Facultad de Medicina para su tipificación bioquímica de *Aeromonas sp*

Elaboración de inóculos bacterianos

A partir de cultivos primarios realizados en el departamento de microbiología e inmunología se realizaron resiembras bacterianas diarias en gel agar sangre, con la finalidad de tener cultivo joven para preparar los inóculos bacterianos durante el experimento. El inóculo se realizó en agua desionizada con las colonias bacterianas procedentes de las resiembras diarias, basándose en el método de Mc Farland, se utilizó una concentración bacteriana de Mc Farland 2 (600×10^6 UFC/ ml)

Aplicación de tratamientos terapéuticos e inóculos bacterianos

Durante 5 días se aplicaron tratamientos en los acuarios experimentales directamente en el agua, para el grupo de ajo (AS) se aplicó 1.5 ml (150 mg), para el grupo cítricos (CB) se aplicó 1.5 ml, finalmente, al grupo control (C) se aplicó 1.5 ml de agua. De manera simultánea fueron aplicados los inóculos bacterianos directamente en el agua de los acuarios experimentales de los grupos *Allium sativum* (AS), cítricos (CB) y Control (C). Se aplicó 50 ml de inóculo a cada acuario experimental.

Evaluación de resultados

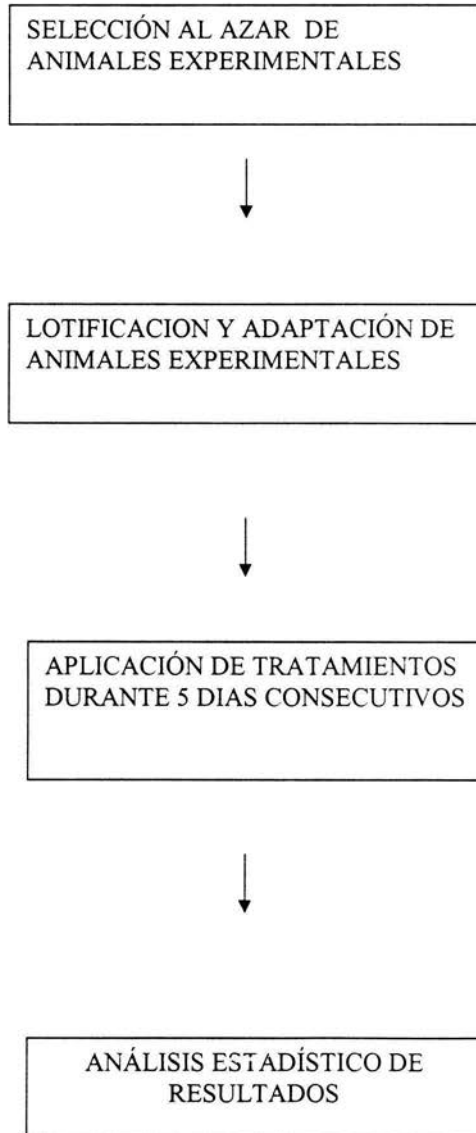
Se midió la mortalidad de los grupos tratados, los peces muertos se conservaron en solución de formaldehído al 10 % para estudio histopatológico posterior. Los resultados fueron procesados en el paquete estadístico EPISTAT con la prueba de probabilidad exacta de Fisher con un límite de confianza de $\alpha=0.05$

2.6 DIAGRAMAS DE FLUJO



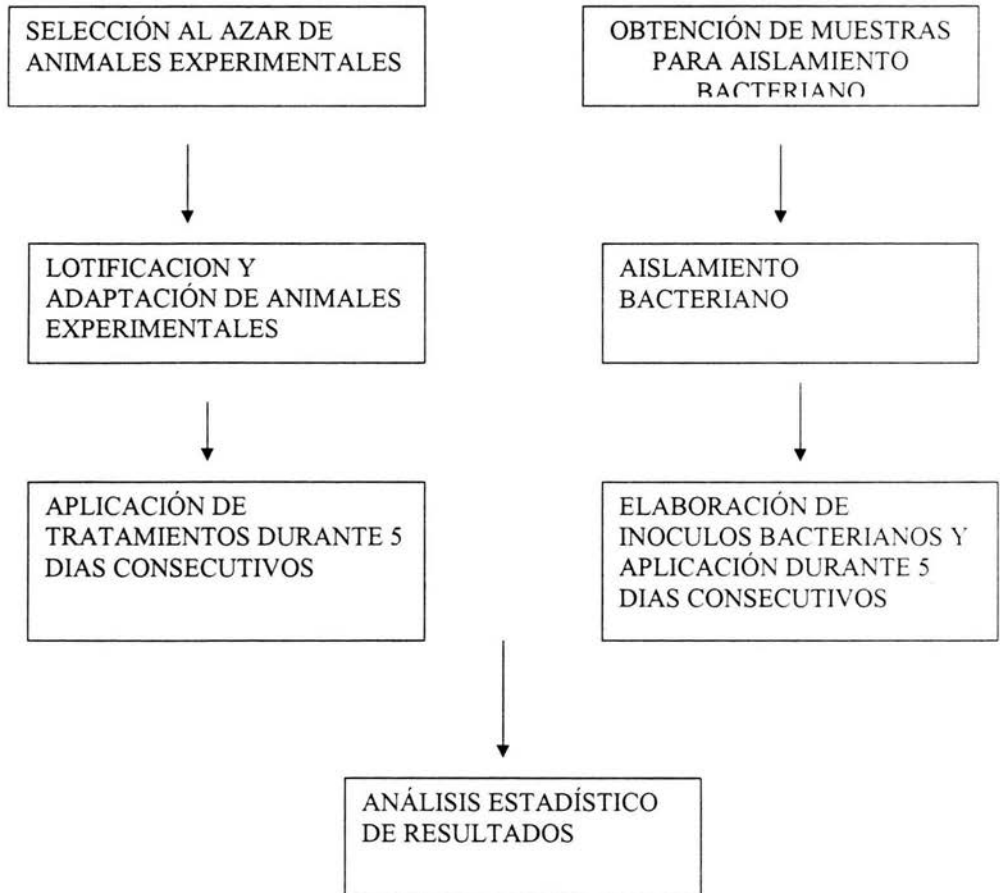
PRIMERA PRUEBA BIOLÓGICA

Efecto de *Allium sativum* y extracto de cítricos sobre *Poecilla reticulata*



SEGUNDA PRUEBA BIOLÓGICA

Efecto Antimicrobiano de *Allium sativum* y extracto de cítricos en *Poecilla reticulata*



III RESULTADOS

3.1 Primera prueba biológica

Efecto de *Allium sativum* y extracto de cítricos (Clean Bacter MR) sobre *Poecilla reticulata*.

El cuadro 1 muestra las mortalidades encontradas de los animales experimentales durante un periodo de 5 días de exposición a los tratamientos (*Allium sativum* y cítricos) al grupo control se le administró 1.5 ml de agua destilada, al grupo cítricos se le administro 1.5 ml de producto comercial, finalmente al grupo *Allium sativum* se le administró 1.5 ml de solución concentrada de ajo al 10 %. Los resultados fueron 0 mortalidades para el grupo control, 3 para el grupo cítricos y 3 para el grupo del Ajo con un porcentaje de 0 %, 10 %, 10 % respectivamente, además, estos resultados fueron analizados con la prueba estadística probabilidad exacta de Fisher contenida en el paquete estadístico EPISTAT, observando que no hubo diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) entre el control y los 2 tratamientos experimentales, tampoco se observo diferencia significativa ($\alpha=0.05$)entre los grupos experimentales

En el Cuadro 2 se muestran los parámetros químicos del agua durante la primer prueba biológica con la finalidad de monitorear cambios en la calidad del agua de los acuarios experimentales

CUADRO 1

Mortalidades encontradas en los grupos experimentales tratados con ajo deshidratado y extracto de cítricos

<i>DIA/GRUPO</i>	<i>CONTROL (C)</i>	<i>CLEAN BACTER (CB)</i>	<i>ALLIUM SATIVUM (AS)</i>
<i>0</i>	0	0	0
<i>1</i>	0	0	1
<i>2</i>	0	2	1
<i>3</i>	0	0	0
<i>4</i>	0	1	0
<i>5</i>	0	0	1
<i>TOTAL</i>	0	3	3

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos experimentales y el grupo control.

Cuadro 2 Parámetros del agua durante el experimento 1

<i>DIA</i>	<i>Control (C)</i>			<i>Clean Bacter (CB)</i>			<i>Allium Sativum (AS)</i>		
	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>5</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	25	26	28	25	26	28	25	26	28
<i>PH</i>	8.6	8.2	7.8	8.6	8.2	7.8	8.6	8.2	7.8
<i>NH4 (mg/L)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>NO2 (mg/L)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>GH (PPM)</i>	180			180			180		
<i>Temperatura (°C)</i>	24	25	28	25	26	28	25	26	28
<i>PH</i>	8.6	8.2	8.4	8.6	8.3	8.3	8.6	8.2	8.3
<i>NH4 (mg/L)</i>	0	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0.5
<i>NO2 (mg/L)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>GH (PPM)</i>	180			180			180		
<i>Temperatura (°C)</i>	25	26	28	25	26	28	25	26	28
<i>PH</i>	8.6	8.2	7.8	8.6	8.2	7.8	8.6	8.2	7.8
<i>NH4 (mg/L)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>NO2 (mg/L)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>GH (PPM)</i>	180			180			180		

3.2 Segunda prueba biológica, efecto antimicrobiano del ajo y de cítricos sobre *Poecilla reticulata*

Después de la remisión de muestras de agua y cepas tipificadas al laboratorio de diagnóstico del departamento de microbiología e inmunología de la FMVZ de la UNAM, se lograron aislar, por pruebas bioquímicas 2 colonias bacterianas: *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida*,

Aplicación de tratamientos e inóculos bacterianos a los grupos experimentales

El cuadro 3 muestra las mortalidades obtenidas durante la segunda prueba biológica, posterior a la aplicación simultánea de colonias bacterianas patógenas y tratamiento experimentales. El número de peces muertos fue 16 para el grupo control, 7 para el grupo cítricos, y 1 para el grupo ajo, representando 53.33 %, 23 %, y 3.33 % de mortalidad respectivamente. Dichos resultados fueron analizados con el paquete estadístico EPISTAT utilizando la prueba de probabilidad exacta de Fisher con un límite de confianza de $\alpha=0.05$

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos tratamientos experimentales a favor de los tratamientos con un límite de confianza de $\alpha=0.05$

También se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de ajo (AS) y cítricos (CB) a favor del extracto de ajo, con un límite de confianza de $\alpha=0.05$

CUADRO 3

Mortalidades encontradas en los grupos experimentales tratados con ajo deshidratado y extracto de cítricos después de haber sido inoculados con cepas tipificadas de *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida*

DIA/GRUPO	CONTROL (C)	CLEAN BACTER (CB)	ALLIUM SATIVUM (AS)
0	0	0	0
1	0	0	1
2	3	1	0
3	2	5	0
4	1	0	0
5	10	1	0
TOTAL	16	7	1

Se encontró diferencia significativa entre el grupo control y los dos tratamientos experimentales

IV DISCUSIÓN

Primera prueba Biológica

Las mortalidades reportadas en el primer experimento representan el 10 % en el grupo de cítricos (CB), y 10 % en el grupo de ajo (AS). En el caso del grupo de los cítricos (CB) el extracto tiene un pH ácido que pudo afectar de manera momentánea el agua de los acuarios de dicho grupo, estresando y predisponiendo a los animales a una muerte repentina, en el análisis postmortem se encontró pérdida de lubricación del cuerpo del pez, pérdida de escamas en un 30 % de la superficie corporal, deshilachamiento de aleta caudal y un halo mucoso alrededor del pez. Por otra parte el grupo del ajo (AS) sufrió el mismo porcentaje de mortalidad (10%), la cual se pudo deber al efecto directo de los productos sulfurados del ajo en las branquias de los peces experimentales, pues en el examen postmortem los animales muertos presentaron una irritación branquial severa.

Cabe señalar que las dosis utilizadas en los diferentes tratamientos, fueron modificadas antes de realizar el experimento, pues las dosis reportadas eran para animales de producción (truchas, carpas, tilapias) y no para peces de ornato, de tal manera que se ajustó dicha dosis en base a la biomasa de cada grupo experimental y a la dosis letal 50 % calculada en un experimento previo.

A pesar de todo esto, las mortalidades entre los diferentes grupos, no fueron estadísticamente significativas, lo que indica que los grupos tratados en esta prueba biológica no difieren del grupo Control (C), grupo que no recibió tratamiento alguno.

Otro efecto que se observó, pero no fue medido, es la turbidez del agua, la cual toma gran importancia en acuarios ornamentales, pues la apreciación de estos acuarios depende de la claridad del agua. En el caso del grupo de los cítricos (CB) la turbidez fue evidente, el agua se tornó de color amarillento opaco. En el caso del

grupo de ajo (AS) también se tornó turbia el agua con una coloración blanca, que impedía ver el fondo en algunos casos.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos del agua, no hubo modificaciones repentinas, ni extremas

Segunda prueba biológica

Las colonias bacterianas aisladas en este experimento (*Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida*) coinciden con trabajos de diferentes autores (Montes 1993, Sticney 2000), incluso en la muestra de agua remitida se identificó *Vibrio sp.* en cantidad abundante, sin embargo para el presente experimento no se requirió de esta cepa bacteriana.

En cuanto a las mortalidades encontradas en los grupos experimentales, coinciden con diferentes datos epidemiológicos de otros autores (Zarzuelo 1981), como el periodo de incubación de las bacterias y el porcentaje de mortalidad.

El grupo control (C) presentó 16 mortalidades en el periodo del estudio (5 días) lo que representa el 53.33 % de este grupo como lo señala Zarzuelo (1981), el número de mortalidades comenzó a incrementar a partir del 3 día, que es lo que dura el periodo de incubación de las *Aeromonas*. En cuanto a signos clínicos los animales de este grupo presentaron, ascitis, dificultad de nado, deshilachamiento de aletas, protusión de vasos sanguíneos a nivel abdominal y palidez de las branquias, que son algunos de los signos reportados por Carrington (1995) y por Auró (1999)

El grupo de cítricos (CB) presentó un total de 7 mortalidades, que representa un 23 % de la población de este grupo, el mayor número de mortalidades (5) se registró el tercer día lo cual coincide con el periodo de incubación bacteriana, sin embargo, en los siguientes días la mortalidad se estabilizó. En cuanto a signos clínicos, los peces muertos presentaron deshilachamiento de aletas, ascitis y pérdida de mucus protector, lo que indica que estas mortalidades pudieron haberse dado por el inóculo bacteriano probablemente asociado con el tratamiento profiláctico, pues algunos

signos clínicos fueron muy similares, sin embargo, en este experimento hubo diferencia estadísticamente significativa contra el grupo control (C). A pesar de la diferencia numérica (16 vs 7) y la diferencia estadística, el extracto de cítricos demostró ser efectivo contra la aeromoniasis, mostrando un 30 % menos mortalidad que el grupo control (C). Sin embargo hacen falta mas estudios de este producto en peces de ornato con la finalidad de determinar una dosis con un mayor margen de seguridad.

El grupo de *Allium sativum* o ajo (AS) presento una mortalidad acumulada de 1 pez, lo que representa el 3.33% del grupo, e indica que presento un 50 % menos mortalidad que el grupo control (C) y un 20 % menos mortalidad que el grupo de cítricos (CB). Con ambos grupos hubo diferencia estadísticamente significativa . La sinología que presento este pez fue deshilachamiento de aletas, protución de vasos sanguíneos y aumento de volumen abdominal.

El presente estudio demuestra que el ajo (*Allium Sativum*) y extracto de cítricos pueden ser utilizados como profilácticos de manera segura y barata en peces de ornato contra las enfermedades causadas por *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas hydrophyla*. A pesar de estos resultados hacen falta realizar mas estudios con esta planta en otras especies de peces ornamentales y tratar de purificar los principios activos para evitar los efectos adversos que se observaron como la turbidez del agua. Otros estudios que pudieran complementar el presente trabajo, serian relacionados con la resistencia bacteriana hacia el ajo , el efecto en acuarios marinos o salobres, y el efecto sobre las bacterias nitrificantes benéficas, encargadas de la filtración biológica en los acuarios.

V CONCLUSIONES

- La medicina alternativa (MA) ofrece opciones seguras y efectivas que se pueden utilizar en la acuicultura y en la Medicina Veterinaria, como lo es la Herbolaria
- El extracto de cítricos en presentación comercial (Clean Bacter ®) puede llegar a utilizarse como profiláctico de aeromoniasis a dosis de 0.103 ml/litro de agua, o 1.5 ml por 14.43 litros, incluso se podría utilizar como terapéutico a la misma dosis en el momento que presenten los primeros signos clínicos.
- El extracto de ajo (*Allium sativum*) a dosis de 10.39 mg/litro o 150 mg/14.43 litros puede llegar a prevenir el 50 % de mortalidad causada por aeromoniasis.
- El Médico Veterinario en su ejercicio profesional, puede intervenir de manera importante en la acuicultura de peces de ornato, diseñando programas sanitarios de prevención y tratamiento de enfermedades

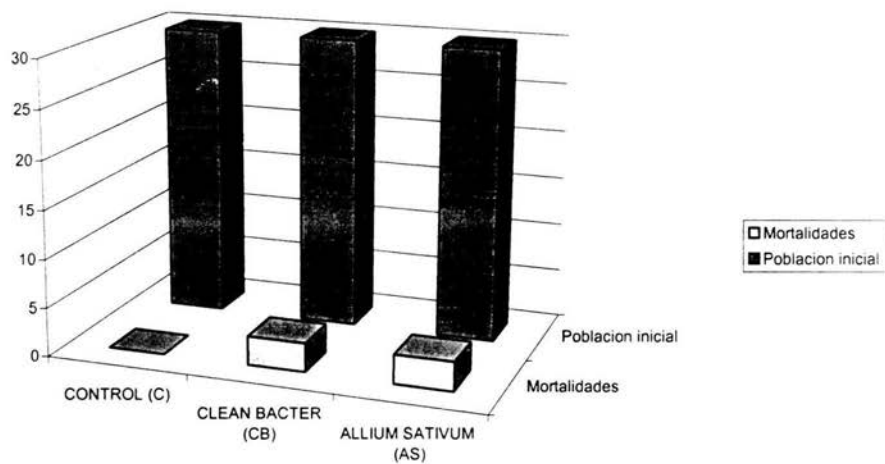
VI LITERATURA CITADA

-
- 1.- Petrovikým I, Pros L. *Peces de Acuario* Ediciones SUSAETA segunda edición, Madrid, España 1997
 - 2.- Ledo S. "El Guppy" <http://www.la-atlantida.com>. Actualizado al 3 de enero de 2003
 - 3.- Mills D. Vevers Gwynne "Guía práctica de los peces de Acuario" Editorial Blume, España 1995
 - 4.- Favré H. *El Acuario* Editorial Daimon mexicana, México 1986
 - 5.- Gratzek JB *Acuariology: Fish diseases and water chemistry* Tetra press publications USA 1992
 - 6.- Auró A. Ocampo CL *Diagnostico del estrés en peces* Vet. Mex., 30 (4) 1999; 337-344
 - 7.- Carrington Neville *The healthy aquarium* Tetra press, Belgium 1995
 - 8.- Montes DCG *Registro de enfermedades mas importantes en peces de acuario del D.F.* Tesis Licenciatura. Fac. Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.,1993
 - 9.- Tunze Aquariumtechik *Aquarium Ecology a supplementary aproach* 2 ed Germany 1995
 - 10.- Sticney RR *Encyclopedia of aquaculture* Edit. Jhon Wiley & Sons & Sons Inc. United States of America, 2000; 69-74
 - 11.- Schubert G *Fish Diseases a complementary introduction.* published by T.F.H. editions, United States of America 1997
 - 12.- García MLJ *Enfermedades Bacterianas de las tilapias* memorias, primer curso internacional de producción de tilapias. Fac. Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.,1996
 - 13.- Zarzuelo; *Principales enfermedades infecciosas de los peces* editorial AEDOS, Barcelona España 1981
 - 14.- Auró A, Ocampo CL, *Terapéutica de las enfermedades de los peces* UNAM México 1999

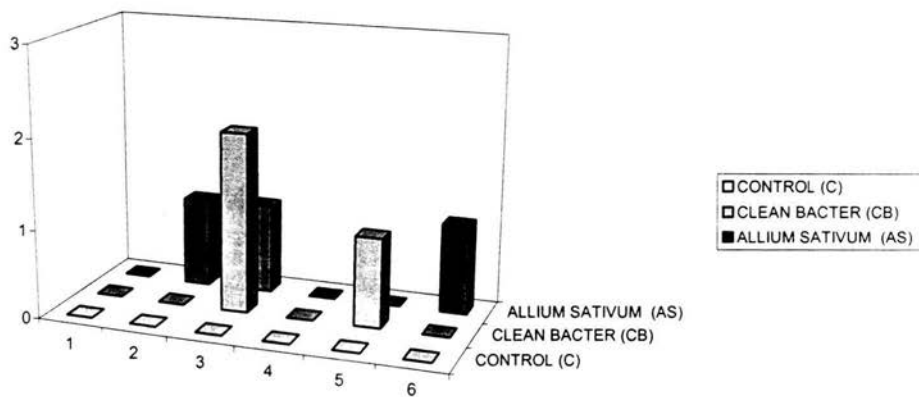
-
- 15.- Calva MJJ *Impacto del Uso de Antibióticos en Veterinaria, sobre la Resistencia Bacteriana en el Ser Humano* Memorias seminario "Aditivos empleados en la alimentación animal y sus efectos en la salud Pública" Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán 18-19 abril D.F. México 2002
- 16.- Schoen AM, Wynn SG *Complementary and Alternative Veterinary Medicine* Mosby press United States of America 1998
- 17.- Salas CA, *La Homeopatía como terapéutica alternativa*. Memorias Foro Nacional de Homeopatía 2003, Hospital Nacional Homeopático, México julio 15 de 2003
- 18.- Balconi I *Tecnología Avipecuaria*, Midia Relaciones 15 (178) 2002; 2-3
- 19.- Auró A, Jiménez EM *La herbolaria Medicinal en el Tratamiento de las enfermedades de los peces en México* Vet. Mex, 24(4) 1993; 291-295
- 20.- Caudet Y.F. *Ajo, Cebolla y Limón, sus propiedades terapéuticas* Cuadernos Alternativos editorial Astri, España 2002
- 21.- Kyung k. H., Lee Y.C. Antimicrobial activities of sulfur compounds derived from s-alk(en)yl-L- cysteine sulfoxides in *Allium* and *Brassica*. Disponible en URL www.fitoterapia.com Actualizado al 28 de diciembre de 2003
- 22.- <http://www.fitoterapia.net> actualizada al 12 de enero de 2003
- 23.- Baluchnejadmorajad T., Roghani M., Homayounfar H., Hosseini M. *Benefical effect of aqueous garlic extract on the vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rats* Journal of Ethnopharmacology 85 (1) 2003; 139-144
- 24.- Balasenthil S., Ramachandran C., Nagini S., *Prevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by garlic*. Fitoterapia 72 (5) 2001; 524-531
- 25.- Cruz PJN *Terapia antibacteriana en peces dulce-acuicolas* Tesis Licenciatura. Fac. Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1992
- 26.- García C. CA. *Evaluación comparativa del efecto sobre Costia necatrix del ajo (Allium sativum) y del azul de metileno en tilapia (Tilapia spp)* Tesis Licenciatura. Fac. Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989

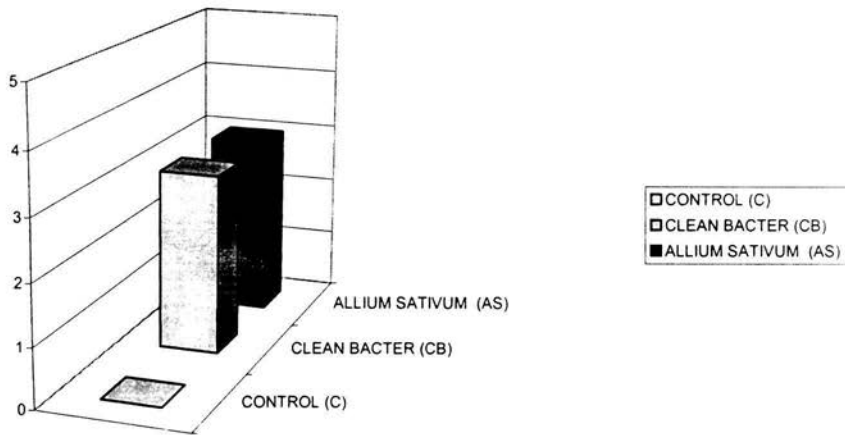
-
- 27.- Ramos AJC *Utilización del ajo (Allium sativum) para el tratamiento de saprolegniasis en trucha arcoiris (Salmo gairdneri)* Tesis Licenciatura. Fac. Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1990
- 28.- Mojica SMA. *Evaluación comparativa del efecto nematocida del ajo (Allium sativum) y del tartrato de antimonio y potasio en tilapia (Tilapia mossambica)* Tesis Licenciatura. Fac. Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1987
- 29.- Peña N. Auró A. Sumano L.H. *A comparative trial of garlic, its extract and amomonium potassium tartrate as antihelmintics in carp.* Journal of Ethnopharmacol, 24 : 1988; 199-203
- 30.- [Http://www.citrobio.com](http://www.citrobio.com) , Actualizado al 5 de abril de 2003
- 31.- <http://www.biocitroeuropa.com>, actualizado al 12 de abril de 2003
- 32.- Purina *Cuadriservicio Vepe de Purina* 9 año No 5 1987
- 33.- *Vitamins & Minerals* Family Medical, published by Gedddes & Gosset, United Kindom, 1999
- 34.- Royo F. *Et al Uso de biocitro para el control de patógenos bacterianos que afectan a la trucha arcoiris Onchorynkus minkis* VI encuentro de investigadores de las ciencias pecuarias (ENICIP) 2001 Medellin, Colombia, 8-9 de noviembre de 2001
http://cuco.unizar.es/infecepi/publicaciones/listar_pubs.asp?o=autor&e=12,
Actualizado al 12 de Diciembre de 2003
- 35.- INEGI Anuario Estadístico de Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos Tomo 1 México, 1995
- 36.- Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Anuario estadístico de pesca 2003. disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx>
Actualizado al 3 de enero de 2004

Mortalidades Acumuladas durante el primer experimento con respecto a la poblacion inicial

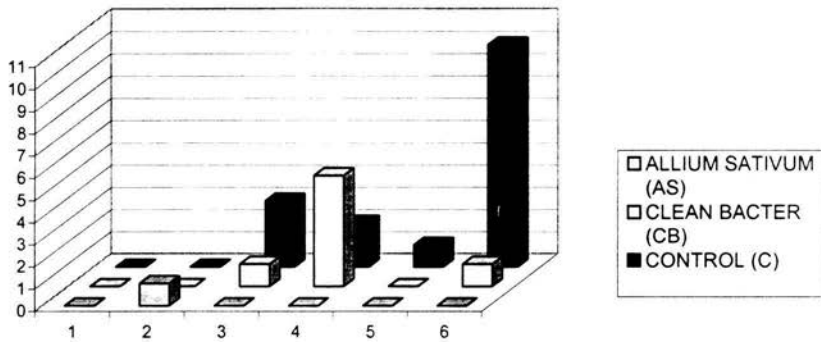


Frecuencia de Mortalidades durante el Experimento 1

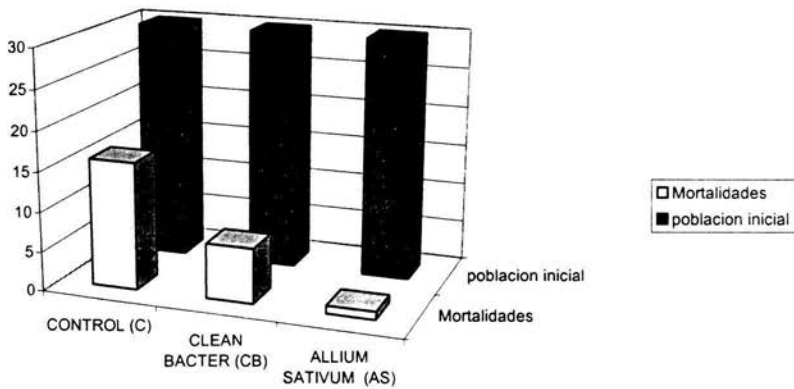


Mortalidad Acumulada durante el primer Experimento

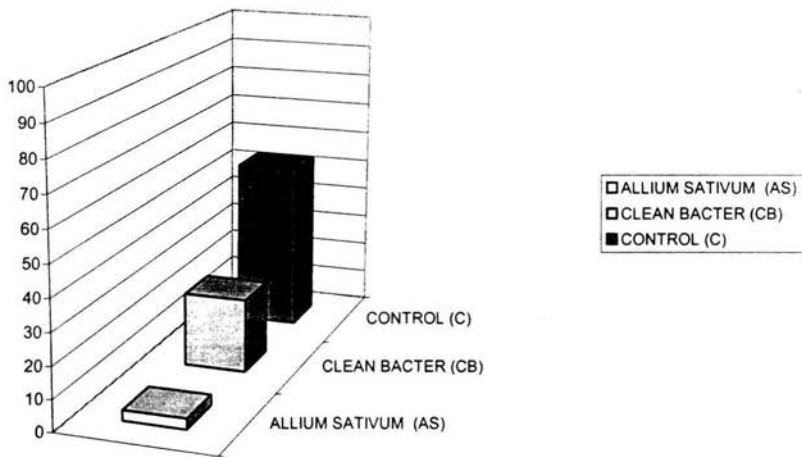
Frecuencia de mortalidad durante el segundo experimento



Mortalidad acumulada durante el experimento 2 con respecto a la Poblacion inicial



Porcentaje de mortalidad por grupo durante el segundo Experimento



Porcentaje de mortalidad entre los diferentes grupos durante el segundo experimento

