



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA
MICROALGA *Chaetoceros calcitrans* SOBRE *Vibrio alginolyticus* Y *Vibrio*
parahaemolyticus
(Modalidad: Tesis de grado)

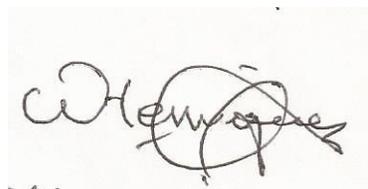
MAIRIM ESMERALDA MORALES GALANTÓN

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

CUMANÁ, 2021

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA
MICROALGA *Chaetoceros calcitrans* SOBRE *Vibrio alginolyticus* Y *Vibrio*
parahaemolyticus

APROBADO POR:



Willian Henríquez
Asesor Académico



Jurado principal



Jurado principal

DEDICATORIA

A:

Principalmente a Dios por darme salud, paciencia y perseverancia para lograr mis objetivos.

Mi gran ejemplo de vida, mi madre, Miriam, por su amor, apoyo, fortaleza y guía en todo momento.

Mis ángeles guardianes, tío Manuel y abuelos Josefa y Guillermo, aunque no estén físicamente siempre los llevare en mi corazón.

Mí, por haber encontrado la fuerza necesaria para lograr esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, padre, hermanos, sobrinos y demás familiares que siempre estuvieron a mi lado brindándome apoyo y nunca dudaron que lograría este triunfo.

A mi novio, por su apoyo y por siempre sacarme una sonrisa en los momentos difíciles.

Al Dr. Willian Henríquez, por sus enseñanzas y paciencia, por darme la confianza a lo largo de la investigación, por dejarme ser parte de laboratorio 412, por ser mi asesor y brindarme su amistad.

Al Dr. Miguel Guevara, por los conocimientos compartidos y guiarme profesionalmente en la investigación.

Al Instituto Oceanográfico de Venezuela, especialmente al personal del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, por toda la ayuda brindada en los cultivos microalgales.

A la Universidad de Antioquia, especialmente al Dr. Elkin Galeano J., por la contribución brindada para los estudios de Resonancia Magnética Nuclear.

Al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai" (IIBCA-UDO), especialmente al Laboratorio de Polímeros, por toda la ayuda para la realización de los espectros IR.

A todos los profesores del departamento de química de la Universidad de Oriente, por sus enseñanzas, lo que me llevo a alcanzar esta meta.

Al personal de la biblioteca del Instituto Universitario de Tecnología de Cumaná, por la solidaridad en los textos que requería al cursar mis materias.

A mis compañeros de estudios, Mary, Leonel, Francis, Andy y amigos del Laboratorio 412 del edificio de Ciencias, por su compañía en los momentos gratos y difíciles de la carrera.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	11
General	11
Específicos	11
METODOLOGÍA	12
CULTIVO Y OBTENCIÓN DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE LA DIATOMEA <i>Chaetoceros calcitrans</i>	12
Cepa de microalga	12
Condiciones de cultivo	12
Muestras	12
Obtención de los extractos	12
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	13
FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO	13
Cromatografía en columna (CC)	13
Cromatografía de capa fina (CCF)	14
EXTRACCIÓN/LIMPIEZA DE LA BIOMASA	14
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	16
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)	16
Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT- IR)	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE LA DIATOMEA <i>Chaetoceros calcitrans</i> A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaNO ₃	17
Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos	18
Pruebas fitoquímicas al extracto bioactivo	19
Fraccionamiento cromatográfico analítico	19
Reproducción de la diatomea bajo la condición que propicio actividad antibacteriana	20
Proceso de extracción/limpieza	22
Fraccionamiento cromatográfico de las subfracciones F3, P2' y P3 mediante CC	26
CCF analítica de las subfracciones	27
Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas mediante CC	28
ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS	29

Análisis de resonancia magnética nuclear de ^1H de la subfracción P33.....	29
Análisis de resonancia magnética nuclear de ^1H de las subfracciones P23 y P32	35
Comparación con espectros de estructuras conocidas.....	44
Análisis de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT- IR)	46
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Rendimiento porcentual m/m del extracto etanólico de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , cultivada a diferentes concentraciones de nitrato de sodio (4, 8 y 16 mmol l ⁻¹) y cosechada en fase exponencial y fase estacionaria de crecimiento.....	17
Tabla 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chaetoceros calcitrans</i> , cultivada a la concentración de 8 mmol l ⁻¹ de NaNO ₃ y cosechada en fase estacionaria de crecimiento, sobre <i>Vibrio alginolyticus</i> y <i>V. parahaemolyticus</i>	18
Tabla 3. Capacidad de separación de los componentes presentes en el extracto activo, 8 mmol l ⁻¹ de NaNO ₃ y fase estacionaria de crecimiento de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , utilizando diferentes sistemas de solventes sobre sílica gel 60 con indicador fluorescente UV ₂₅₄ (ALUGRAM, SIL G/UV ₂₅₄).	20
Tabla 4. Cultivo y rendimiento de extracción a la concentración de 8 mmol l ⁻¹ de NaNO ₃ , cosechada en fase estacionaria de crecimiento.	20
Tabla 5. Sistemas de solventes empleados en el fraccionamiento cromatográfico de los extractos FEs8 y FEs8' de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> sobre sílica gel (tamaño de partícula 0,032-0,063 mm, Kieselgel S).	21
Tabla 6. Fraccionamiento cromatográfico de la FEs8 y FEs8'	21
Tabla 7. Biparticiones orgánicas (cloroformo y acetato de etilo) de los extractos obtenidos por medio de la limpieza de la biomasa de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i>	23
Tabla 8. Sistemas de solventes empleados en el fraccionamiento cromatográfico de las fracciones FRE1 y FRE2, obtenidas a partir de los extractos de las biombras 1 y 2 de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i>	25
Tabla 9. Fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de FRE1	25
Tabla 10. Fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de FRE2	26
Tabla 11. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de F3 (0,1741 g).....	27
Tabla 12. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de P2' (0,9105 g) y P3 (0,6033 g).....	27

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Molécula de isopreno.	2
Figura 2. Molécula de fenol.	2
Figura 3. Ejemplos de alcaloides.	3
Figura 4. Terpenos con alta actividad antibacteriana.	10
Figura 5. Diagrama de fraccionamiento de los extractos a través de la extracción/limpieza de la biomasa y biparticiones en cloroformo y acetato de etilo.	15
Figura 6. A) Precipitado blanco generado usando reactivo de Meyer, B) precipitado rojo evidenciado con el reactivo Dragendorff, en la prueba de alcaloides al extracto bioactivo FEs8.	19
Figura 7. Diagrama de fraccionamiento cromatográfico del remanente acuoso del extracto en C ₂ H ₅ OH:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i>	24
Figura 8. Diagrama de fraccionamiento cromatográfico del remanente acuoso del extracto en H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i>	24
Figura 9. Cromatografía de capa fina sobre sílica gel 60 con indicador fluorescente UV ₂₅₄ (ALUGRAM, SIL G/UV ₂₅₄ de las subfracciones A) F33, B) P22, C) P23, D) P32 y E) P33.	28
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por: A) software TopSpin y B) asistente CMC.....	30
Figura 11. Ampliación del espectro RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, en la región con δ 1,19-1,49 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por el asistente CMC.....	32
Figura 12. Ampliación del espectro de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, en la región con δ 3,54-3,61 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por el asistente CMC.....	33
Figura 13. Ampliación del espectro RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, en la región con δ 3,1-4,1 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por el asistente CMC con relación a las señales para los solventes.....	34
Figura 14. Ampliación del espectro RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, en la región con δ 4,6-5,8 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por el asistente CMC, con relación a las señales para los solventes.....	35
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P23, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por: A) software TopSpin y B) asistente CMC.....	36
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P32, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por: A) software TopSpin y B) asistente CMC.....	37

Figura 17. Ampliación del espectro de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P23, en la región con δ 0,7-1,5 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por el asistente CMC.....	38
Figura 18. Ampliación del espectro de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P32, en la región con δ 0,6-1,2 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por el asistente CMC.....	39
Figura 19. Ampliaciones de los espectros de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) en las regiones entre 1,16 a 1,66 ppm donde se observan señales para 6H, de las subfracciones A) P23, B) P32 y C) P33.....	40
Figura 20. Ampliación del espectro de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P23, en la región con δ 3,1-4,0 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por el asistente CMC.....	40
Figura 21. Ampliación del espectro de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P32, en la región con δ 3,2-4,4 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por el asistente CMC.....	42
Figura 22. Ampliaciones de los espectros de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) en las regiones entre 4,5 a 5,4 ppm de las subfracciones A) P23 y B) P32, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> , generado por el asistente CMC.....	43
Figura 23. Ampliaciones de los espectros de RMN ¹ H (500 MHz; MeOD) en las regiones entre 7,2 a 8,8 ppm donde se observan señales a campo bajo, de las subfracciones A) P23, B) P32 y C) P33.....	44
Figura 24. A) Espectro de RMN ¹ H (500MHz; MeOD) de la muestra P33 aislada de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i> . B) Espectro de RMN ¹ H de celobiosido del ácido oleanólico aislado de <i>B. vulgaris</i> (Khakimov <i>et al.</i> , 2016).....	45
Figura 25. Superposición de los espectros IR de las subfracciones P23, P32 y P33, purificadas a partir de la fracción acuosa del extracto H ₂ O:HCl de la diatomea <i>Chaetoceros calcitrans</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

IIBCA-UDO: Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai"
CC: Cromatografía en columna
CCF: Cromatografía capa fina
MeOH: Metanol
MeOD: Metanol deuterado
EtOH: Etanol
C₂H₅OH:HCl: Sistema etanol-ácido clorhídrico
H₂O:HCl: Sistema agua-ácido clorhídrico
mmol l-1: Milimol por litro
UPS: Unidades prácticas de salinidad
FEx: Fase exponencial de crecimiento
FEs: Fase estacionaria de crecimiento
FCE1: Fracción en cloroformo del extracto C₂H₅OH:HCl
FAE1: Fracción en acetato de etilo del extracto C₂H₅OH:HCl
FRE1: Fracción remanente acuoso del extracto C₂H₅OH:HCl
FCE2: Fracción en cloroformo del extracto H₂O:HCl
FAE2: Fracción en acetato de etilo del extracto H₂O:HCl
FRE2: Fracción remanente acuoso del extracto H₂O:HCl
IR: Infrarrojo
Rf: Relación entre el desplazamiento químico del analito y el frente del solvente
ATCC: American Typer Culture Collection, por sus siglas en ingles
RMN: Resonancia magnética nuclear
RMN ¹H: Resonancia magnética nuclear de protones
δ: Desplazamiento químico en ppm
s: Singulete
d: Doblete
q: Cuarteto
m: Multiplete
CMC: Complete Molecular Confidence, por sus siglas en inglés

RESUMEN

Se evaluaron las propiedades antibacterianas de la microalga *Chaetoceros calcitrans*, sobre las especies bacterianas *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Se realizaron cultivos axénicos, en medio f/2 Guillard, variando la concentración de nitrato de sodio (4, 8 y 16 mmol l⁻¹). Las fases exponencial y estacionaria fueron alcanzadas a los 12 y 22 días, respectivamente, de iniciado el cultivo. La cosecha de la biomasa y posterior extracción etanólica de metabolitos generaron extractos crudos que difieren en cuanto a la capacidad antibacteriana. De todos los extractos, el único que ejerció efecto antibacteriano fue la concentración 8 mmol l⁻¹ de NaNO₃, de la fase estacionaria, por tal razón esta condición se reprodujo para generar mayor cantidad de biomasa/extracto y posterior fraccionamiento de columna. Sin embargo, las fracciones obtenidas no presentaron actividad antibacteriana, por tal motivo se realizaron limpiezas a las biombrasas utilizando C₂H₅OH:HCl y H₂O:HCl para lograr la disolución completa de la muestra, posterior a esto se llevaron a cabo biparticiones al extracto y fraccionamiento al remanente acuoso en cada caso, a las fracciones lo suficientemente puras se les realizaron estudios de Resonancia Magnética Nuclear, permitiendo de esta forma establecer un esqueleto base triterpénico/esteroidal enlazado a heteroátomos o residuos glicosídicos, estos datos fueron confirmados a través del análisis de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años se viene desarrollando un proceso de búsqueda de productos naturales en organismos acuáticos, a través de la identificación de compuestos y especies promisorias (Mora *et al.*, 2008). Se ha determinado que ciertos compuestos orgánicos son responsables de importantes propiedades biológicas, los cuales son denominados metabolitos primarios o secundarios, dependiendo de su implicación en los procesos metabólicos esenciales en las especies que lo producen (Fenical, 1982). Los metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) están distribuidos y participan en la actividad celular de todo ser viviente, mientras que los secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo, sin embargo, si tienen implicación ecológica como defensa (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Los metabolitos secundarios de origen aromático son más frecuentes en el reino vegetal, los cuales se forman a través de reacciones enzimáticas y presentan función metabólica definida, estos se caracterizan por presentar un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático (Marcano y Hasegawa, 2002). Para clasificar los metabolitos secundarios se han utilizado muchos puntos de vista, de esta forma han sido incluidos en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas; terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Los terpenos o terpenoides son el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, están constituidos por unidades múltiples de isopreno (figura 1), pueden ser lineales, cíclicos y se dividen de acuerdo al número de unidades de isopreno usadas en su biosíntesis, por ejemplo, los monoterpenos consisten en dos unidades de isopreno y tienen diez átomos de carbono (C_{10}), mientras que los sesquiterpenos tienen tres unidades de isopreno y quince átomos de carbono (C_{15}), a estos le siguen, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Los terpenos son ampliamente usados por sus olores y sabores característicos, por lo cual juegan un papel importante en la medicina tradicional. Sin embargo, la extracción a gran escala de los triterpenoides es a menudo costosa, ya que son compuestos que generalmente están presentes en bajas cantidades y

en mezclas complejas, lo que dificulta su aislamiento (Griffin, 2000). Entre los triterpenos, resaltan las saponinas, las cuales son un grupo de glucósido, que pueden estar unidas a moléculas de triterpenos, o bien esteroides, estas se disuelven en agua y producen espuma abundante (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

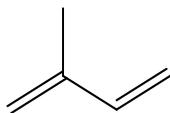


Figura 1. Molécula de isopreno.

Otra clase de metabolitos secundarios son los compuestos fenólicos, donde se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilos, libres o sustituidos (figura 2). Muchos de estos compuestos fenólicos son capaces de producir disrupción de la pared celular de patógenos, es decir ocasionar un daño estructural y mal funcionamiento de la misma, lo cual hace que las células de algunos agentes patógenos se sensibilicen (Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016). Los fenoles han sido reportados por ser esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, dentro de las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos se encuentran, analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre otros. Dentro del grupo de los fenoles, los flavonoides constituyen el grupo más grande de los fenoles (Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016; Sierra *et al.*, 2018).

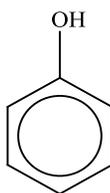


Figura 2. Molécula de fenol.

Los compuestos nitrogenados son principalmente alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los primeros constituyen un diverso grupo de compuestos sintetizados, generalmente a partir de aminoácidos, estos se encuentran principalmente en las plantas superiores y en menor cantidad en microorganismos y animales. La mayoría de los alcaloides presentan acción fisiológica en humanos y animales, incluso a bajas dosis, siendo los ejemplos más

conocidos cocaína, nicotina, morfina y cafeína (Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). De esta misma forma, los alcaloides son compuestos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos debido a su capacidad de intercalarse en el ADN, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Nájera-Arce *et al.*, 2018). El nitrógeno en el alcaloide, puede presentarse como una amina primaria, secundaria o terciaria, sal cuaternaria de amonio, amida y N-óxidos, o incluso puede conseguirse más de un nitrógeno con diferente funcionalidad en la misma molécula (Marcano y Hasegawa, 2002).

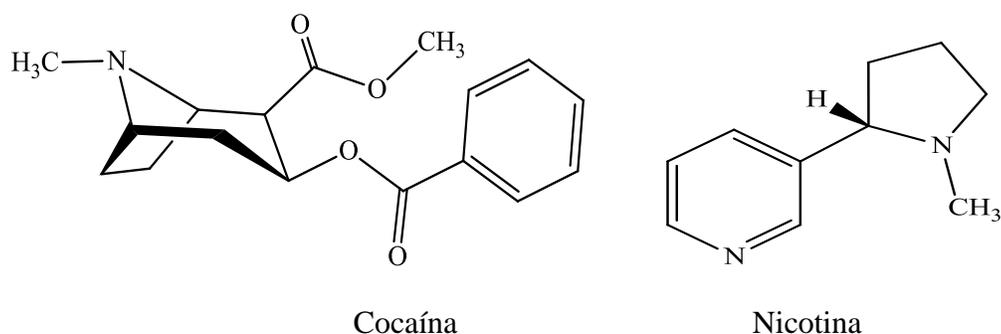


Figura 3. Ejemplos de alcaloides.

La gran variedad de organismos que habitan en mares y océanos y las posibles propiedades de sus extractos, hacen de este medio una fuente potencial de compuestos con bioactividad. De esta forma, la evaluación de compuestos bioactivos en organismos marinos en las últimas décadas ha producido una gran cantidad de sustancias, con aplicaciones farmacéuticas e industriales. Solo en 2013, más de mil compuestos de origen marino farmacológicamente activos se caracterizaron en todo el mundo, con eficacia potencial contra el cáncer, virus, bacterias y hongos, entre otros (Shannon y Abu-Ghannam, 2016).

El primer producto de origen marino se aisló en 1953, se trata del ácido kaínico ($C_{10}H_{15}NO_4$), obtenido de extractos de algas pardas y empleado como insecticida y antihelmíntico (De la Calle, 2007). De igual forma, antes de 1940, ya se deducía que la

producción de compuestos antibacterianos en diatomeas era causada por la resistencia al ataque bacteriano (Waksman *et al.*, 1937; Sieburth y Pratt, 1962; Droop y Elsen, 1966).

En la actualidad, las industrias acuícolas están siendo afectadas por la presencia de cepas patogénicas de *Vibrios*, siendo *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* las responsables de pérdidas económicas. Los *Vibrios* son bacterias marinas Gram negativas que pueden crecer rápidamente y tienen la capacidad de adaptarse a bajas concentraciones de oxígeno (Molina, 2011). La ingesta de productos marinos contaminados con estas bacterias suelen provocar enfermedades gastroentéricas, afectando a los órganos que conforman el sistema digestivo. En los camarones los brotes de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* producen necrosis hepatopancreática, disminución del tamaño y la muerte (Leyton, 2012).

La vibriosis es habitualmente tratada con antibióticos (Parhuayo, 2015), los cuales son compuestos producidos de forma natural o química a base de productos naturales aislados, que eliminan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos, estos poseen distintos métodos de acción, especificidad y toxicidad, sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos resulta poco efectivo, debido al surgimiento de cepas bacterianas resistentes (Karunasagar *et al.*, 2007), volviéndose no susceptibles a múltiples fármacos, tales como ampicilina, cefotaxima, tetraciclina y cloranfenicol (Liu, *et al.*, 2019), es decir la bacteria permanece insensible a los efectos del antibiótico, debido a la capacidad natural, desarrollo de mecanismos, o capacidad de adaptación, la cual está dada en cierta medida por sus cortos ciclos de vida y su alta frecuencia de mutación lo que se ha convertido en un problema mundial (Santiago *et al.*, 2009; Avendaño-Herrera *et al.*, 2005).

Existen condiciones básicas que debe cumplir el antibiótico para poder inhibir el crecimiento de microorganismos bacterianos, como lo son; unirse a un blanco específico o sitio activo en el microorganismo, los cuales dependen del tipo de antibiótico, de igual forma, el principio de acción ocurre cuando se interrumpe algún mecanismo bioquímico indispensable para que la bacteria pueda desarrollarse y sobreviva, otra condición es la

concentración, la cual debe ser la suficiente para ocupar el mayor número de sitios activos y de esta manera actuar en el periodo adecuado (Santiago *et al.*, 2009). Sin embargo, las bacterias del género *Vibrio* son abundantes en aguas costeras, poseen la habilidad de desarrollarse rápidamente y tienen la capacidad natural de adquirir resistencia a respuesta de presión selectiva, lo cual ha sido reportado en numerosos estudios (Le *et al.*, 2005). A menudo, en el área medicinal la mezcla de productos naturales es más efectiva, debido a interacciones sinérgicas beneficiosas, caso contrario al antagonismo, que ocurre cuando los efectos de componentes activos interfieren entre sí, es decir, la presencia de un componente anula el efecto del otro (Quintana, 2013).

Entre los organismos marinos poseedores de diversas sustancias bioactivas destacan las microalgas, las cuales se definen como microorganismos fotosintéticos oxigénicos, que habitan en casi todos los ambientes marinos, incluidos sistemas de agua dulce, como estanques, lagos y ecosistemas de agua salada, además, poseen gran diversidad morfológica (unicelulares o formando filamentos, cadenas, colonias o cenobios) (Mitra *et al.*, 2012; Lara *et al.*, 1996). La variada gama de metabolitos en estos organismos se debe a una respuesta como defensa química por competencia, nutrientes, espacio y luz, lo cual ha provocado el desarrollo de mecanismos bioquímicos y fisiológicos para protegerse de patógenos y depredadores, o para otras funciones como la reproducción y comunicación (Shannon y Abu-Ghannam, 2016). Las evidencias indican que algas y microalgas contienen sustancias útiles, incluyendo pigmentos (β -caroteno, astaxantina, zeaxantina, luteína, cantaxantina, clorofila, ficoeritrina, fucoxantina y ficocianina), ácidos grasos poliinsaturados (ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido araquidónico), antioxidantes (catalasas, polifenoles, superóxido, dismutasa, tocoferoles), vitaminas (A, B₁₂, C, D, E y K), aminoácidos esenciales (leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, asparagina, glicina) y antimicrobianos (ácido tropoditético, diterpenos de labdano, hidroquinonas bromadas, florotaninos) (Parsaeimehr y Chen, 2013).

La plasticidad fisiológica de las microalgas permite a los investigadores manipular los parámetros fisicoquímicos, tales como luz, pH, temperatura, salinidad, nutrientes, a fin

de propiciar la síntesis de un determinado metabolito (Alcocer, 2012; Villa *et al.*, 2014). Por ejemplo, la acumulación de lípidos insaturados se logra con la disminución de la temperatura en los cultivos de las microalgas (Tejeda-Benitez, 2015), por lo que podría ser de interés para futuras aplicaciones en la producción de lípidos especiales (Bhakuni y Razat 2005). Por otro lado, la fase de crecimiento afecta en los rendimientos de pigmentos (clorofilas a, c y carotenos) encontrados en las biomásas cosechadas (Fidalgo, 1995), estos pigmentos son bien conocidos como antioxidantes naturales debido a su capacidad de eliminar radicales libres, reducir el estrés oxidativo y mejorar la inmunización (Azizan *et al.*, 2018). Otro de los parámetros es la concentración de nitrógeno, donde se ha reportado que en medios saturados se genera biomasa microalgal con altos contenidos proteicos, independientemente de la fuente de nitrógeno (Fidalgo, 1995). Es así como diversos investigadores consideran a NaNO_3 (f/2 de Guillard) como la mejor fuente de nitrógeno, aun cuando la asimilación de nitrato requiere de la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio, mediante pasos que requieren energía (López-Elías *et al.*, 2015). Evidentemente, el N es uno de los nutrientes principales en el crecimiento de las microalgas, al ser parte importante en la estructura celular de estos microorganismos.

Otro factor de interés es la elección del solvente o mezclas de solventes los cuales influyen en las propiedades químicas y físicas del extracto en cuestión, del mismo modo en el amplio espectro de las estructuras químicas producidas por las microalgas. Dependiendo de la polaridad del solvente usado, los grupos funcionales extraídos, pueden ser hidrófilos polares o lipófilos no polares, lo que influye directamente en la capacidad del extracto para actuar sobre la membrana celular de bacterias. Varios protocolos para la extracción de compuestos antibacterianos han sido reportados, como el uso de maceración, lo cual es muy requerido, con el fin de liberar componentes celulares unidos a la sílice de las diatomeas (Shannon y Abu-Ghannam, 2016; Azizan *et al.*, 2018). En resumen, son diversos los factores que influyen en la eficacia de los compuestos bioactivos y por tal razón estos deben considerarse al escoger el método de cultivo, otros factores naturales como las variaciones estacionales, temperatura del

océano, contaminantes, también poseen influencia en la potencia de las sustancias bioactivas.

Entre las microalgas que se perfilan como posibles fuentes de compuestos antibacterianos destacan las diatomeas. Numerosas investigaciones han referido que las diatomeas presentan bioactividad sobre comunidades bacterianas, influyendo en el crecimiento, supervivencia o reproducción de estos organismos, acción que es conocida como alelopatía, mecanismo producido por la excreción de sustancias (Molina, 2011). Las diatomeas son el grupo de microalgas más abundantes en el fitoplancton (Nelson *et al.*, 1995), se caracterizan por la presencia de una cápsula protectora silíceas, llamada frústulo, constituido por dos partes encajadas la una en la otra, similar a un estuche, que mantiene a la microalga protegida del exterior (Fidalgo, 1995). Las intrincadas paredes celulares silíceas de las diatomeas son probablemente el ejemplo de materiales nanoestructurados más complejos y difícil de reproducir (Round *et al.*, 1990). Los restos fosilizados de las diatomeas conocidos como, tierra de diatomea o diatomita son comercialmente valiosos como absorbentes, antiaglomerantes, material para aislamiento, para el desarrollo y producción de plantas, en donde con mezcla de algunos fertilizantes químicos, suple los micronutrientes que la planta necesita para su desarrollo y conservar la salud del suelo (Azizan *et al.*, 2018; Kuppusamy *et al.*, 2017).

Numerosos compuestos han sido aislados de las diatomeas, dentro de los cuales destacan unas proteínas compuestas a las que denominaron silaffinas, así como otras moléculas designadas poliaminas lineales de cadena larga, ambas promueven la formación de nanoesferas de sílice a partir de ácido disilícico *in vitro* (Kroger *et al.*, 2000). Esta formación de patrones silíceos intrincados ha sido demostrada *in vitro* con silaffinas, las cuales promueven la formación de retículos de nanoesferas de sílice, posterior a la adición de una solución de ácido disilícico, Por otro lado, las poliaminas con estructuras diferentes, adicionadas a soluciones de ácido monosilícico inducen rápidamente la precipitación y controlan el tamaño de las esferas de sílice *in vitro* (Kroger *et al.*, 1999 y 2000).

Una especie de diatomea promisorio para la obtención de compuestos bioactivos es *Chaetoceros calcitrans* (División *Heterokontophyta*, clase *Bacillariophyceae*), posee un tamaño de 3-6 μm (Takano, 1968), presenta cloroplastos marrones o amarillos (fucoxantina o β -caroteno) y están envueltas en cubiertas de sílice. En cuanto a su composición bioquímica presentan un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, como ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (AA) y vitamina C y E, lo cual la cataloga como fuente alimenticia para organismos cultivados (Villa *et al.*, 2014).

Con el objeto de revisar de forma bibliográfica el rol que juegan las interacciones bacteria-microalga en ambientes marinos, Riquelme y Avendaño-Herrera (2003) afirman la variedad de metabolitos con actividad bactericida en macro y microalgas. Esta característica, convierte a las diatomeas en una alternativa potencial de compuestos bioactivos naturales y por lo tanto como agentes de biocontrol (Defoirdt *et al.*, 2007).

Las propiedades antibacterianas de las microalgas, han sido evaluadas en los últimos años, tal como, *Tetraselmis maculata*, la cual ha sido extensamente reportada como una microalga con capacidad inhibitoria bacteriana (Duff *et al.*, 1966), similares propiedades antibacterianas han sido descritas en cultivos microalgales del género *Chaetoceros*, especies estrechamente relacionadas como *Chaetoceros muelleri* y *Chaetoceros lauderi* mostraron efectos antibacterianos, lo que podría relacionarse con su composición lipídica, incluidos triacilgliceroles (TAG), diacilglicerol (DAG), monoacilglicéridos (MAG), ácidos grasos libres (FFA), terpenos, esteroides, contenido de hidrocarburos, otros compuestos como clorellina, neoftadieno, fitol, o a cantidades elevadas de ácidos eicosapentaenoicos (EPA) (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010; Chauton *et al.*, 2004).

De igual forma, Nájera-Arce *et al.*, en el 2018 cultivaron diferentes especies de diatomeas, dentro de las cuales se encontraba *Chaetoceros curvisetus*, siendo el extracto de esta especie el que poseía mayor actividad antibacteriana contra especies bacterianas gram positivas y gram negativas, lo que puede deberse a un efecto sinérgico entre los distintos compuestos y no a uno en particular. Según el perfil fitoquímico, se encontraron saponinas, aceites esenciales, alcaloides, quinonas, flavonoides, cumarinas,

lignanos y triterpenos, los autores sugieren que la presencia de aceites esenciales en todos los extractos con actividad antibacteriana de las diatomeas evaluadas, está relacionado con la capacidad que poseen los aceites esenciales de romper la membrana celular bacteriana, las cuales están básicamente compuestas por terpenoides. El mecanismo de acción de los terpenoides está dado por el aumento en la permeabilidad de la membrana de las células bacterianas, dañando la estructura de la pared celular e interactuando en el trabajo del transporte activo y la fuerza iónica en el citoplasma de la membrana de las bacterias (Griffin, 2000). Agregando a lo anterior, Nájera-Arce *et al.* (2018) infieren que algunos tipos de ácidos grasos poliinsaturados están presentes en el extracto de *C. curvisetus* y estos pudieran ser responsables de la actividad antibacteriana.

Por otro lado, Rai y Rajashekhar (2015) muestran que *C. calcitrans* es generadora de compuestos como fenoles, flavonoides, clorofila a y c, β -caroteno, astaxantina y vitamina C, de doce especies de fitoplancton analizadas esta diatomea fue la que produjo mayor contenido de clorofila c, β -caroteno y astaxantina. Estos metabolitos presentan diversas actividades biológicas, incluyendo antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, anticoagulante, antimutagénico, antiproliferativo y actividad contra el cáncer, por tal motivo los estudios de caracterización de potenciales biomoléculas parecen ser prometedores para futuras aplicaciones. De esta forma, Rampen *et al.* (2010) realizaron un estudio de esteroides en diversas diatomeas, incluyendo *C. calcitrans*, los resultados demuestran la presencia de esteroides con diferentes números de átomos de carbono. Por otro lado, en el 2012 Seraspe *et al.* reportaron que los extractos de *C. calcitrans*, muestran actividad de amplio espectro, sin embargo, la purificación parcial de estos confirma mayor actividad antibacteriana usando hexano como solvente, lo que indica que los componentes bioactivos están en la fracción no polar, además deducen que bajo las observaciones realizadas el compuesto activo, podría ser de naturaleza terpénica. Caso similar, reportaron Hadi-Setyawan y Andayani-Maftuch (2019), en el estudio fitoquímico para *C. calcitrans*, el cual resultó positivo para triterpenos, infiriendo que el compuesto bioactivo es de esta naturaleza.

En los últimos años, se ha incrementado el número de artículos científicos sobre las actividades biológicas de terpenos y su potencial uso como fármacos. Bueno-Sánchez *et al.* (2009) reportaron la actividad antibacteriana de 16 terpenos, siendo timol y carvacrol los más activos. Los autores consideran que el grupo hidroxilo presente en las dos estructuras es clave para la actividad antibacteriana.

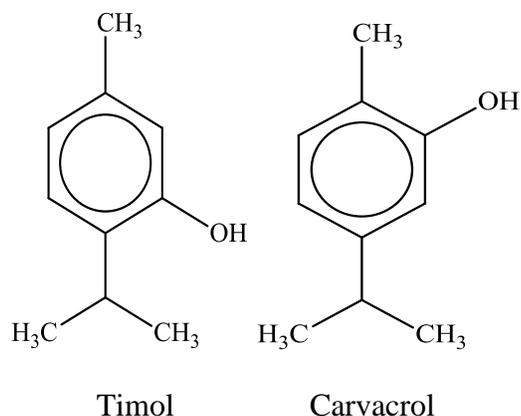


Figura 4. Terpenos con alta actividad antibacteriana.

Aunque diversos estudios confirman la presencia de compuestos antibacterianos en los extractos de la diatomea *C. calcitrans*, que podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas a camarones-peces, el uso de técnicas de instrumentación más sofisticadas han sido insuficientes para caracterizar la estructura de los componentes responsables de la propiedad antibacteriana en la microalga, siendo determinado solo la naturaleza química del principio activo.

OBJETIVOS

General

Evaluar la composición química y actividad antibacteriana de la microalga *Chaetoceros calcitrans*, cultivada a diferentes concentraciones de NO_3^- , sobre las especies bacterianas *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

Específicos

Cultivar *Chaetoceros calcitrans* a diferentes concentraciones de NO_3^- , hasta alcanzar la fase estacionaria de reproducción.

Obtener los extractos etanólicos de las biomásas de *Chaetoceros calcitrans*, cosechadas en las fases exponencial y estacionaria.

Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos, sobre las especies *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

Reproducir la diatomea *Chaetoceros calcitrans* bajo las condiciones que genere el extracto más activo, para la obtención de mayor cantidad de biomasa.

Fraccionar el extracto etanólico de mejor actividad hasta el aislamiento de los componentes responsables del efecto antibacteriano.

Caracterizar químicamente los compuestos bioactivos aislados, mediante las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).

METODOLOGÍA

1. CULTIVO Y OBTENCIÓN DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE LA DIATOMEA *Chaetoceros calcitrans*

1.1. Cepa de microalga

La diatomea *Chaetoceros calcitrans* utilizada en esta investigación fue proporcionada por el Banco de Germoplasma de algas de la Universidad de Oriente, Venezuela, identificada con el código BGAUDO-173, mantenida bajo condiciones controladas de laboratorio (23 ± 1 °C, 100 lux, fotoperiodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad) en medio f/2 Guillard (Guillard, 1975) a 37 UPS (unidades prácticas de salinidad).

1.2. Condiciones de cultivo

Chaetoceros calcitrans fue cultivada, axénicamente, por duplicado, durante 20 días en matraces con 1500 ml de medio f/2 Guillard (4, 8 y 16 mmol l⁻¹ de nitrato de sodio), a 23 ± 1 °C, pH de 7,8; fotoperíodo 12 horas luz: 12 horas oscuridad y en irradiación de 5000 lux. Los cultivos se realizaron de forma unialgal y se agitaron manualmente dos veces al día.

1.3. Muestras

Cuando los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial y estacionario se realizó la cosecha total de la biomasa, mediante centrifugación a 4000 rpm/10 min, separando mediante decantación. Las biomásas obtenidas fueron conservadas bajo refrigeración hasta el procesamiento para la obtención de los diferentes extractos.

1.4. Obtención de los extractos

Las biomásas cosechadas en las fases de cultivos a diferentes concentraciones de iones NO₃⁻, fueron sometidas a procesos de maceración/extracción, hasta observar que el solvente no extrajo componentes solubles de la biomasa. El solvente utilizado fue etanol grado técnico y el proceso de maceración se realizó por 24 horas para permitir la

extracción de los metabolitos secundarios. Posterior, el solvente de extracción fue eliminado mediante rotaevaporación a presión reducida a la temperatura de 35 °C, obteniéndose así los extractos de cada biomasa cosechada a diferentes concentraciones de NO₃⁻.

2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El efecto antibacteriano de los diferentes extractos se evaluó utilizando como organismos reveladores las cepas bacterianas Gram negativas: *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus*, mediante la técnica de difusión en agar, en la cual discos estériles de papel de filtro Whatman N°3 de 10 mm de diámetro se impregnaron con 10 µl del extracto en prueba (40 mg/ml), lo cual proporciona una concentración final de 400 µg de extracto/disco. Seguidamente, estos discos se colocaron sobre placas de Petri, previamente servidas con 12 ml de agar Mueller Hinton (HIMEDIA, Laboratorios Pvt. Limited, Bombay-India) e inoculadas, con una suspensión bacteriana de concentración conocida (1 x 10⁸ células/ml) estandarizada por comparación con un patrón comercial McFarlan 0,5. Posteriormente, las placas de Petri se incubaron a 29 ±1 °C por 24 horas. El extracto con principios antibacterianos produjo un halo de inhibición alrededor de los discos, el cual se cuantificó mediante una regla graduada.

Adicionalmente, al extracto bioactivo se le realizaron pruebas químicas para detectar familias de compuestos siguiendo la metodología descrita por Marcano y Hasegawa (2002).

3. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

El extracto etanólico bioactivo fue procesado mediante las técnicas de cromatografía convencionales para lograr la separación y purificación de los metabolitos presentes. Entre dichas técnicas se encuentran:

3.1. Cromatografía en columna (CC)

La condición de cultivo que propició la biosíntesis de compuestos bioactivos contra las dos cepas bacterianas de *Vibrio* fue repetida a mayor escala con la finalidad de obtener mayor cantidad de biomasa, para generar los extractos respectivos y así realizar el fraccionamiento biodirigido.

El fraccionamiento del extracto bioactivo se realizó mediante el proceso de cromatografía de columna por gravedad. La columna vertical de vidrio, empacada con sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil diversos solventes de distintas polaridades, metanol, cloroformo, hexano y agua destilada, generaron movimiento de la muestra a través de la columna, producto de las diversas interacciones de los componentes del extracto, lográndose de esta manera conseguir la separación, como lo describe Romero, 2002.

3.2. Cromatografía de capa fina (CCF)

Cada una de las fracciones fueron sometidas a procesos de cromatografía de capa fina, utilizando placas de vidrio recubiertas con sílica gel 60 con indicador fluorescente UV₂₅₄ (ALUGRAM, SIL G/UV₂₅₄), con diferentes eluyentes que funcionaron como fase móvil, con el fin de agrupar aquellas fracciones que presentaron valores similares de R_f (relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa). Aquellas fracciones con R_f similares fueron agrupadas y se les evaluó su bioactividad como fue descrito anteriormente.

4. EXTRACCIÓN/LIMPIEZA DE LA BIOMASA

Las fracciones no manifestaron acción antibacteriana en las pruebas realizadas. Con el objeto de liberar compuestos orgánicos incorporados en la sílice y lograr la disolución completa de la muestra, se llevaron a cabo dos extracciones adicionales a las biomásas 1 y 2, una con etanol y ácido clorhídrico y la otra con agua y ácido clorhídrico a partes iguales. El proceso de maceración se llevó a ebullición para permitir la extracción de

componentes solubles, dejándola en reposo por 24 horas, para la obtención de los extractos crudos, los cuales fueron filtrados, para eliminar impurezas y para posterior realización de biparticiones orgánicas a cada una de las soluciones, primero con cloroformo (CHCl_3) y luego con acetato de etilo ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$). De esta manera fueron obtenidas fracciones en cloroformo y acetato de etilo, así como, un remanente acuoso para cada caso, como se muestra en la figura 5.

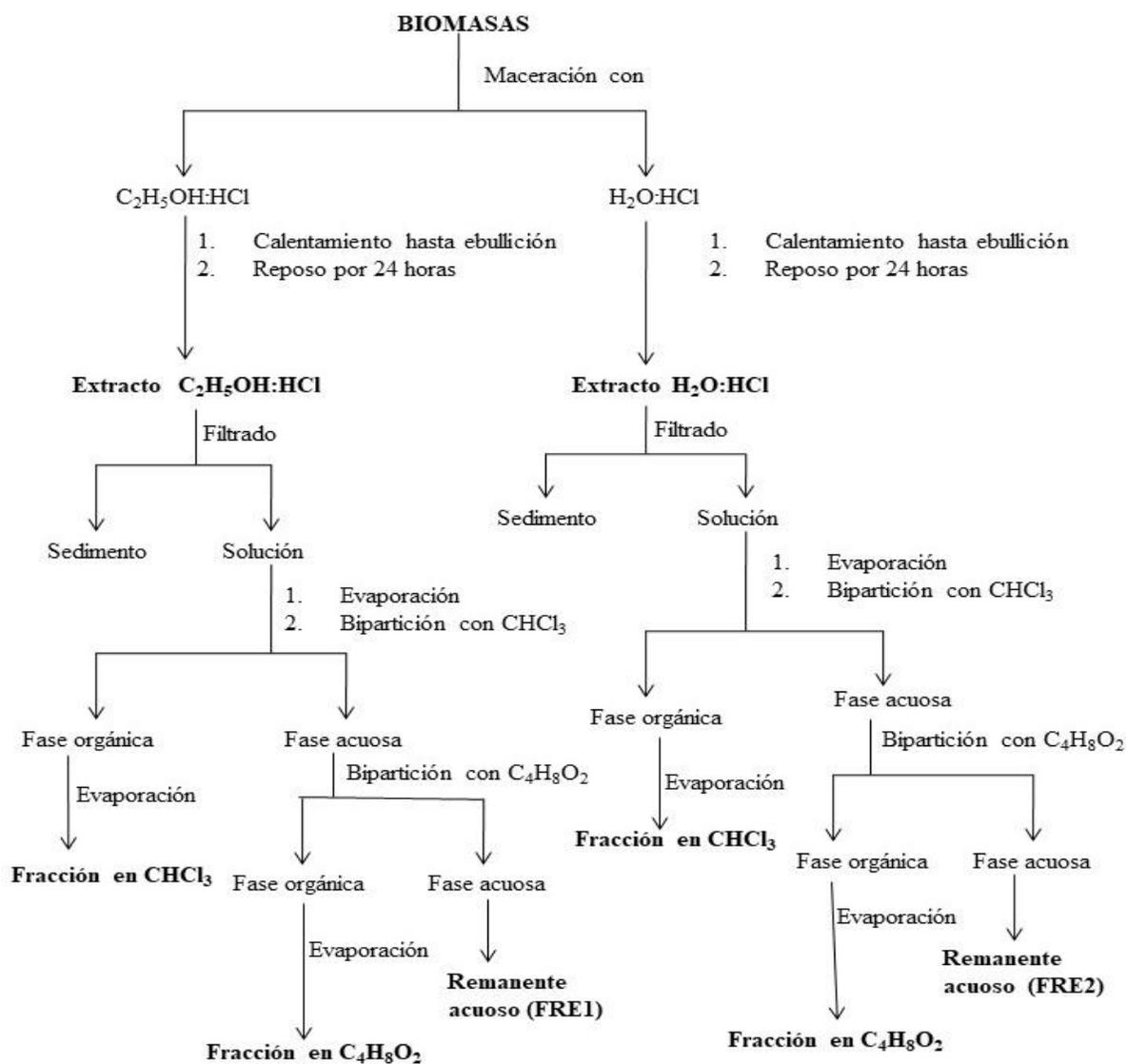


Figura 5. Diagrama de fraccionamiento de los extractos a través de la extracción/limpieza de la biomasa y biparticiones en cloroformo y acetato de etilo.

De la misma manera los remanentes acuosos fueron fraccionados, sin embargo, para este caso se rellenó la columna de vidrio de 4 cm de diámetro a 22 cm con sephadex LH-20. Posterior a esto, a las fracciones obtenidas se les evaluó la actividad antibacteriana como se especificó anteriormente.

5. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Para la elucidación estructural de los componentes aislados de la biomasa de la diatomea *C. calcitrans* se utilizaron las siguientes técnicas para la caracterización de compuestos orgánicos.

5.1. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los análisis de RMN de ^1H se realizaron en el laboratorio de RMN, perteneciente al Departamento de Farmacia de la Universidad de Antioquia (Colombia), haciendo uso de un espectrómetro Bruker advance de 500 MHz para los análisis de ^1H . Las muestras fueron disueltas en solventes deuterados adecuados. De igual forma, para la interpretación, análisis y el procesamiento de espectros se utilizaron los softwares, TopSpin versión 4.0.8 y el asistente CMC “Complete Molecular Confidence” versión 2.16, descargados directamente con la licencia académica del servidor de Bruker, a través del enlace <https://www.bruker.com/nc/service/support-upgrades/software-downloads/nmr/pc/pc-topspin.html>, que permite la instalación directa de los softwares, para el procesamiento por medio de Windows 10 de 64 bit.

5.2. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT- IR)

Los análisis de infrarrojo para las muestras correspondientes se realizaron en el Laboratorio de Polímeros, perteneciente al Departamento de Ciencia de los Materiales del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai" (IIBCA-UDO) de la Universidad de Oriente. Las muestras fueron colocadas en pastillas de KBr, haciendo uso del equipo de espectroscopia infrarroja marca Perkin Elmer, modelo frontier, registrándose de esta manera los espectros IR de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados y análisis de los resultados obtenidos de extractos, fracciones y subfracciones de la diatomea *C. calcitrans* con sus respectivos rendimientos, pruebas fitoquímicas, actividad antibacteriana e interpretación espectroscópica de las fracciones fundamentalmente puras.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE LA DIATOMEA *Chaetoceros calcitrans* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaNO_3

Los cultivos de la diatomea *C. calcitrans* a diferentes concentraciones de iones NO_3^- y cosechadas en fases de crecimiento exponencial y estacionaria generaron biomásas de la microalga y de extracto etanólico similares, sin embargo, el rendimiento biomasa/extracto resultó mayor para la concentración de 8 mmol l^{-1} de NaNO_3 en fase estacionaria de crecimiento, en la tabla 1 se pueden apreciar estos resultados.

Tabla 1. Rendimiento porcentual m/m del extracto etanólico de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, cultivada a diferentes concentraciones de nitrato de sodio (4, 8 y 16 mmol l^{-1}) y cosechada en fase exponencial y fase estacionaria de crecimiento.

Experimento	FEx4	FEx8	FEx16	FEs4	FEs8	FEs16
Biomasa (g)	0,5358	0,5464	0,5864	0,5555	0,5512	0,6629
Extracto (g)	0,0653	0,0503	0,0969	0,0966	0,0988	0,1062
Rendimiento (%)	12,19	9,21	16,52	17,39	17,92	16,02

FEx: Fase exponencial de crecimiento, FEs: Fase estacionaria de crecimiento, 4, 8 y 16: concentración en mmol l^{-1} de NaNO_3 .

Según referencias bibliográficas consultadas, la concentración de NaNO_3 óptima para el cultivo de una determinada especie microalgal no sigue una relación simple, debido a que depende de otros factores, tales como luz, temperatura, pH y concentraciones de los demás nutrientes adicionados. Sin embargo, los datos demuestran que existe una relación directa en la generación de biomasa/extracto al aumentar la concentración de NaNO_3 .

Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos

Las pruebas de actividad antibacteriana de los diferentes extractos revelaron que solo el extracto obtenido a partir de la biomasa cultivada a la concentración de 8 mmol l⁻¹ de NaNO₃, cosechada en fase estacionaria de crecimiento fue capaz de inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*, con diámetros de halos de inhibición similar al ejercido por el antibiótico sulfato de estreptomicina, en la tabla 2 se presentan estos resultados.

Tabla 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chaetoceros calcitrans*, cultivada a la concentración de 8 mmol l⁻¹ de NaNO₃ y cosechada en fase estacionaria de crecimiento, sobre *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*.

Diámetro promedio de los halos de inhibición (mm)				
	<i>Vibrio alginolyticus</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
EtOH	-	-	-	-
Antibiótico	22,0	21,7	19,0	19,3
Extracto FEs8	20,0	19,7	16,3	17,0

El hecho de que solo el extracto cultivado a la concentración de 8 mmol l⁻¹ NaNO₃ y cosechado en fase estacionaria de crecimiento ejerciera efecto antimicrobiano frente a *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, es relevante puesto que esto deja claro que la concentración de nitrógeno y la etapa de crecimiento influyen en la biosíntesis de sustancias por la diatomea *C. calcitrans*. En algunas investigaciones se asegura que la fase de crecimiento afecta en mayor medida la composición química que pudiera ser extraída de la biomasa, puesto que, los mayores rendimientos en composición de proteínas, carbohidratos y pigmentos (clorofilas y carotenos) se obtienen en la fase estacionaria (Fidalgo, 1995). Es decir, la fase de crecimiento pudiera tener mayor efecto sobre la actividad antimicrobiana en comparación con la concentración de nitrógeno, en relación a esto, en etapas donde el crecimiento es más lento, se produce mayor concentración de metabolitos bioactivos (Fidalgo, 1995; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010), lo cual está en correlación con lo encontrado en esta investigación.

Pruebas fitoquímicas al extracto bioactivo

En las pruebas fitoquímicas, aplicadas al extracto bioactivo (8 mmol l^{-1} de NaNO_3 , fase estacionaria), solo se determinó la presencia de alcaloides básicos, con los reactivos de Meyer y Dragendorff, evidenciando precipitados blanco y rojo, respectivamente, como se muestra en la figura 6A y 6B.

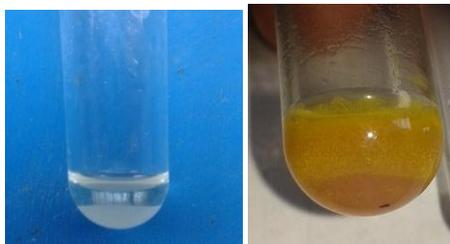


Figura 6. A) Precipitado blanco generado usando reactivo de Meyer, B) precipitado rojo evidenciado con el reactivo Dragendorff, en la prueba de alcaloides al extracto bioactivo FEs8.

La prueba positiva para alcaloides concuerda con investigaciones como la reportada por Nájera-Arce *et al.* (2018) para *Chaetoceros curvisetus*, por otro lado, se ha determinado la producción de poliaminas de cadena larga lineal en diatomeas (Kroger *et al.* 2000), siendo unas acilpoliaminas de cadena larga lineal las responsables del efecto antibacteriano del extracto metanólico de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali* (Henríquez *et al.* 2015).

Fraccionamiento cromatográfico analítico

En la purificación del extracto activo, 8 mmol l^{-1} de NaNO_3 en fase estacionaria de crecimiento, por CCF analítica se separaron bandas, correspondientes a los constituyentes químicos con distintos valores de Rf, lo cual, se reporta en la tabla 3.

Tabla 3. Capacidad de separación de los componentes presentes en el extracto activo, 8 mmol l⁻¹ de NaNO₃ y fase estacionaria de crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, utilizando diferentes sistemas de solventes sobre sílica gel 60 con indicador fluorescente UV₂₅₄ (ALUGRAM, SIL G/UV₂₅₄).

Sistema de solventes	Rf de las bandas			
CHCl ₃ /MeOH (2:1)	0,92	0,83	0,73	0,17
CHCl ₃	0,95	0,84	-	-
CH ₂ Cl ₂	0,76	-	-	-

El fraccionamiento cromatográfico del extracto activo, 8 mmol l⁻¹ NaNO₃ y fase estacionaria de crecimiento, sobre sílica gel, con el sistema de solvente CHCl₃/MeOH 2:1, permitió evidenciar la separación de 4 bandas del extracto crudo, mientras que usando solo cloroformo o diclorometano permitió la separación de menos bandas, como puede detallarse en la tabla 3. Estos resultados sugieren que el extracto es una mezcla de compuestos de naturaleza de polaridad intermedia.

Reproducción de la diatomea bajo la condición que propicio actividad antibacteriana

La diatomea *C. calcitrans* se reprodujo bajo las condiciones que generó el extracto activo, para la obtención de mayor cantidad de biomasa como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Cultivo y rendimiento de extracción a la concentración de 8 mmol l⁻¹ de NaNO₃, cosechada en fase estacionaria de crecimiento.

	Volumen de cultivo (l)	Biomasa (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
FES8'	18	4,4486	0,1129	2,54

Para realizar el fraccionamiento cromatográfico se utilizaron los dos extractos FES8 y FES8' (FES8 0,0430 g y FES8' 0,1129 g), empleando una columna de 1,5 cm de diámetro, la cual alcanzó una altura de 10 cm de sílica gel (tamaño de partícula 0,032-0,063 mm, Kieselgel S) como fase estacionaria y como fase móvil, solventes de distintas polaridades como hexano, metanol, finalizando con agua y las mezclas respectivas de las

mismos, variando la polaridad en orden creciente. Se recogieron 20 eluatos de 5ml cada uno. Es importante mencionar que, se evidenció color amarillo a partir del eluato 4, con partículas de color naranja, este se fue degradando hasta el eluato 14. Los datos del proceso de fraccionamiento se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Sistemas de solventes empleados en el fraccionamiento cromatográfico de los extractos FEs8 y FEs8' de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* sobre sílica gel (tamaño de partícula 0,032-0,063 mm, Kieselgel S).

Eluyentes	Relación v/v	Eluatos	Fracciones
C ₆ H ₁₄	1	1-2	A
C ₆ H ₁₄ :MeOH	9:1	3	A
C ₆ H ₁₄ :MeOH	8:2	4-5	A
C ₆ H ₁₄ :MeOH	1:1	6-7	A-B
MeOH	1	8-9	B-C
MeOH:H ₂ O	8:2	10	C
MeOH:H ₂ O	5:5	11	C
H ₂ O	1	12-20	C-D-E

Los eluatos fueron agrupados en fracciones, lográndose obtener 5 fracciones, como se detalla en la tabla 6. Para tal fin, se realizaron corridas por cromatografía de capa fina (CCF), sobre sílica gel 60 con indicador fluorescente UV₂₅₄ (ALUGRAM, SIL G/UV₂₅₄), la cual permitió agruparlos en fracciones según la similitud de los R_f y color de la solución.

Tabla 6. Fraccionamiento cromatográfico de la FEs8 y FEs8'.

Eluatos	Fracciones	Masa(g)	Rendimiento (%)
3-6	A	0,0510	32,71
7-8	B	0,0200	12,83
9-12	C	0,0041	2,63
13-15	D	0,0025	1,60
16-20	E	-	-

En la CCF realizada usando como sistema de solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1, se evidencio que la muestra A generaba una banda intermedia con R_f de 0,89, en cambio la muestra B (R_f 0,96) y C (R_f 0,98) se iban con el solvente dejando una banda casi al final del recorrido, mientras que D se iba completamente con el solvente. Como puede observarse en la tabla 6, no se reporta la masa de la fracción E, ya que es la recolección de la solución generada al realizar varios lavados a la columna, por tal motivo se infiere que se trataba del solvente e impurezas.

Por otro lado, las fracciones obtenidas por medio del fraccionamiento cromatográfico de FEs8 y FEs8', no produjeron actividad antibacteriana utilizando como organismos reveladores las cepas bacterianas *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus*, por tal motivo se decidió realizar extracciones por medio de la limpieza de la biomasa con ácido clorhídrico mezclado con etanol y agua en relación 1:1, siguiendo la metodología sugerida por Kroger *et al.* (2000) para la extracción de poliaminas.

Proceso de extracción/limpieza

Del proceso de extracción con $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{HCl}$ y $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la biomasa de la diatomea *C. calcitrans*, se obtuvieron las masas mostradas en la tabla 7. El extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ produjo gran cantidad de cristales de forma cuadrada con masa de 0,7845 g, por tal motivo se realizó lavados a las partículas utilizando metanol, posterior a esto la prueba con nitrato de plata resultó positiva formándose un precipitado blanco insoluble (cloruro de plata), indicativo de presencia de iones cloruro en el extracto.

Tabla 7. Biparticiones orgánicas (cloroformo y acetato de etilo) de los extractos obtenidos por medio de la limpieza de la biomasa de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*.

Biomasa	Condición de extracción/limpieza	Masa extracto (g)	Fracción orgánica	Masa fracción (g)	Rendimiento (%)
FEs8	C ₂ H ₅ OH:HCl	0,6471	FCE1	0,0026	0,40
			FAE1	0,0061	0,94
			FRE1	0,5936	91,73
FEs8'	H ₂ O:HCl	3,7657	FCE2	0,0037	0,09
			FAE2	0,0276	0,73
			FRE2	2,1060	55,93

FCE1: Fracción en cloroformo del extracto C₂H₅OH:HCl; FAE1: Fracción en acetato de etilo del extracto C₂H₅OH:HCl; FRE1: Fracción remanente acuoso del extracto C₂H₅OH:HCl; FCE2: Fracción en cloroformo del extracto H₂O:HCl; FAE2: Fracción en acetato de etilo del extracto H₂O:HCl; FRE2: Fracción remanente acuoso del extracto H₂O:HCl.

Las biparticiones en cloroformo (FCE1 y FCE2) y acetato de etilo (FAE1 y FAE2) no generaron suficiente masa como para realizar fraccionamiento, para un aislamiento satisfactorio de algún metabolito secundario. Por lo tanto, se decidió trabajar solo con las fracciones remanente acuoso de las dos condiciones.

Las fracciones remanentes acuosos presentaban capacidad higroscópica, es decir, absorbían humedad del medio ambiente, los resultantes acuosos fueron fraccionados como se detallan en las figuras 7 y 8. La columna utilizada fue de 4 cm de diámetro y alcanzó una altura de 22 cm del absorbente utilizado (sephadex LH-20), fueron recolectadas consecutivamente las fracciones F1-F6 para la fracción remanente acuoso FRE1 y P1-P4 para la fracción FRE2. Las mezclas de solventes utilizados para generar movimiento de la muestra a través de la columna se muestran en la tabla 8.

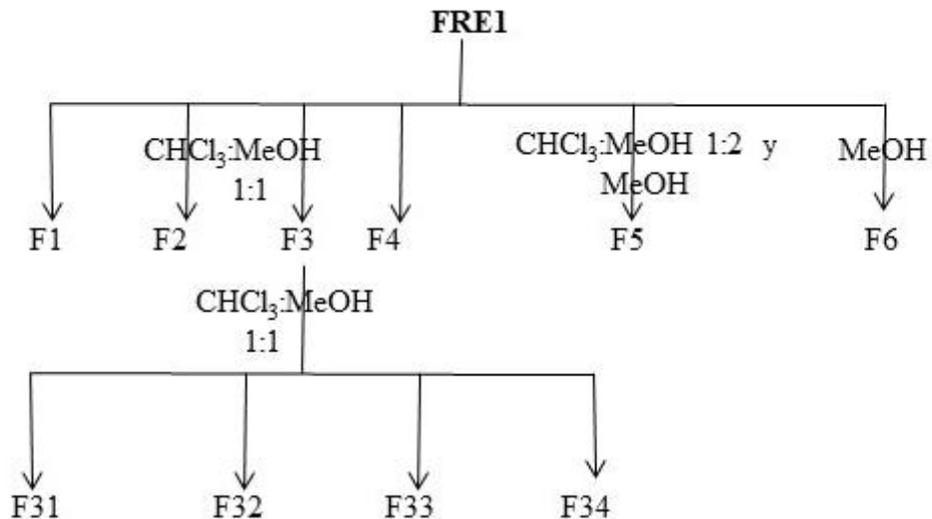


Figura 7. Diagrama de fraccionamiento cromatográfico del remanente acuoso del extracto en $C_2H_5OH:HCl$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*.

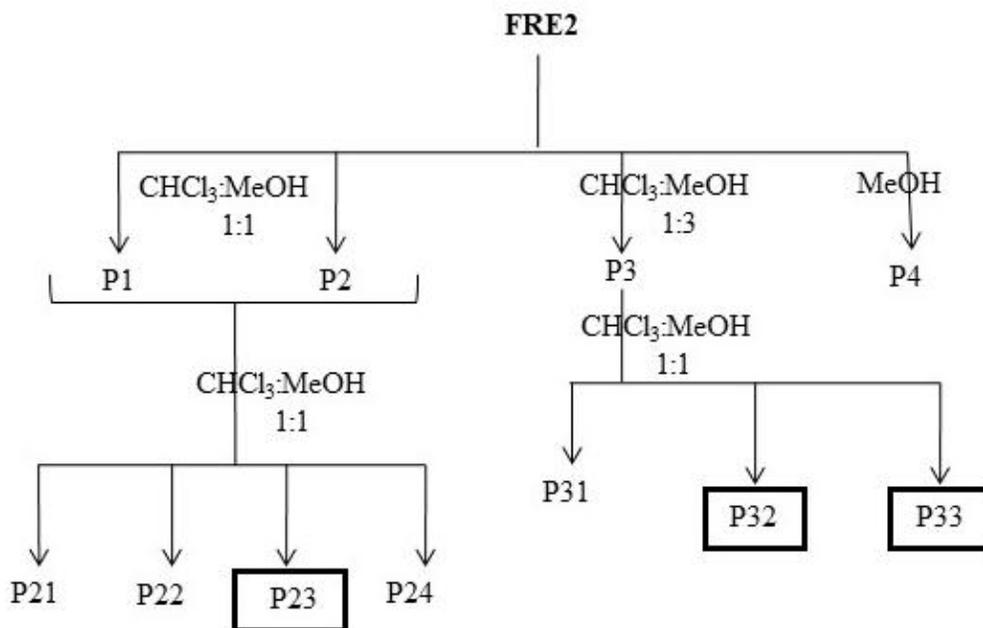


Figura 8. Diagrama de fraccionamiento cromatográfico del remanente acuoso del extracto en $H_2O:HCl$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*.

Tabla 8. Sistemas de solventes empleados en el fraccionamiento cromatográfico de las fracciones FRE1 y FRE2, obtenidas a partir de los extractos de las biomásas 1 y 2 de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*.

FRE1			FRE2		
Eluyentes	Relación v/v	Eluatos	Eluyentes	Relación v/v	Eluatos
CHCl ₃ :MeOH	1:1	1-16	CHCl ₃ :MeOH	1:1	1-13
CHCl ₃ :MeOH	1:2	17	CHCl ₃ :MeOH	1:3	14-16
MeOH	1	18-23	MeOH	1	17-20
			MeOH:H ₂ O	1:1	21
			H ₂ O	1	22-26

Los eluatos obtenidos por medio del fraccionamiento del remanente acuoso del extracto C₂H₅OH:HCl (FRE1) fueron agrupados en 6 fracciones, ver tabla 9, a través de corridas por cromatografía de capa fina (CCF), mediante visualización bajo luz ultravioleta para observar los desplazamientos de los componentes por eluato y agruparlos en fracciones de acuerdo a la similitud de los R_f. De la misma forma, se realizó para los eluatos obtenidos del remanente acuoso del extracto H₂O:HCl (FRE2), ver tabla 10.

Tabla 9. Fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de FRE1.

Eluatos	Fracciones	Masa(g)	Rendimiento (%)
4-8	F1	0,0966	16,27
9	F2	0,0129	2,17
10-11	F3	0,1741	29,33
12-14	F4	0,1107	18,65
15-20	F5	0,0106	1,79
21-23	F6	0,0151	2,54

La fracción F1 fue la única muestra que al evaporarse el solvente no se observaba presencia de humedad, sin embargo, no se disolvía en cloroformo, metanol y era difícil de absorber por la sílica para la realización de la CCF analítica. De igual modo, se

evidenció que las demás fracciones se desplazaban por completo, sin evidencia de separaciones, incluso al aumentar la polaridad de los solventes, con excepción de F3, la cual registró una banda intermedia en la capa fina con Rf 0,76.

Tabla 10. Fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de FRE2.

Eluatos	Fracciones	Masa(g)	Rendimiento (%)
4-7	P1	0,2035	9,66
8-12	P2	0,7070	33,57
13-16	P3	0,6033	28,65
17-21	P4	0,4164	19,77

Al ser realizadas las pruebas de CCF analítica para posteriores análisis y fraccionamientos, se observó que P1 y P2 poseían iguales características, con Rf de 0,68, por tal motivo estas fracciones fueron unidas y se denominaron P2'.

Fraccionamiento cromatográfico de las subfracciones F3, P2' y P3 mediante CC.

Se seleccionó la F3 proveniente de FRE1 y P2' y P3, estas últimas originarias de FRE2, para ser purificadas por cromatografía de columna debido a sus comportamientos cromatográficos en capa fina en pruebas preliminares, bandas bien definidas y buenas separaciones en cada caso. Se empleó una columna de 2 cm de diámetro, la cual alcanzó una altura de 9 cm del absorbente utilizado (gel de sephadex LH-20) y como fase móvil una mezcla CHCl₃:MeOH (1:1), recolectándose eluatos de 5 ml, en cada caso.

Los 6 eluatos para la fracción F3 fueron agrupados mediante corridas en CCF, con ayuda de luz ultravioleta, obteniéndose de esta manera 4 subfracciones, las cuales se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de F3 (0,1741 g).

Eluatos	Fracciones	Masa (g)	Rendimiento (%)
1-2	F31	0,0020	1,15
3-4	F32	0,0146	8,38
5	F33	0,1097	63,01
6	F34	0,0342	19,64

Los eluatos obtenidos de P2' y P3 fueron agrupados en fracciones, lográndose obtener 4 y 3 subfracciones, respectivamente, como se muestra en las tablas 12 y 13. Igualmente, se llevaron a cabo por corridas de cromatografía de capa fina (CCF) y mediante visualización bajo luz ultravioleta por eluato para agruparlos, como en el caso de F3.

Tabla 12. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de P2' (0,9105 g) y P3 (0,6033 g).

P2'			
Eluatos	Fracciones	Masa (g)	Rendimiento (%)
2-3	P21	0,0372	5,26
4	P22	0,1679	23,75
5	P23	0,2375	33,59
6-7	P24	0,2032	28,74
P3			
3	P31	0,0031	0,51
4-6	P32	0,3052	50,59
7-11	P33	0,0111	1,84

CCF analítica de las subfracciones

A las subfracciones obtenidas se les realizó CCF analítica para determinar la pureza de las mismas. De F3 solo la subfracción F33, con Rf de 0,46 usando la mezcla de solvente CHCl₃:MeOH 1:3 resultó interesante para posteriores pruebas, sin embargo, la observación en la corrida sugiere baja pureza (figura 9A). De igual forma, la CCF de

P22 con mezcla CHCl_3 :MeOH 1:1 produjo una banda con R_f 0,50 y P23 en mezcla de CHCl_3 :MeOH 1:3 una de 0,64, en ambos casos las muestras dejaron poco rastro en su recorrido (figura 9B y 9C). Del mismo modo, de la fracción P32 se separó una banda con R_f de 0,64 al ser eluida con una mezcla de solvente 1:3, ver figura 9D. Por otro lado, la subfracción P33, se desplazó con el frente del solvente, sin embargo, al agregar metanol para disolverla se formaron cristales, los cuales fueron lavados con una mezcla CHCl_3 :MeOH en igual proporción, posterior a esto se le volvió a realizar CCF, observándose que la muestra no dejaba rastro en la base o en el recorrido y la mayor concentración se depositaba en forma de círculo con R_f 0,69 (figura 9E).

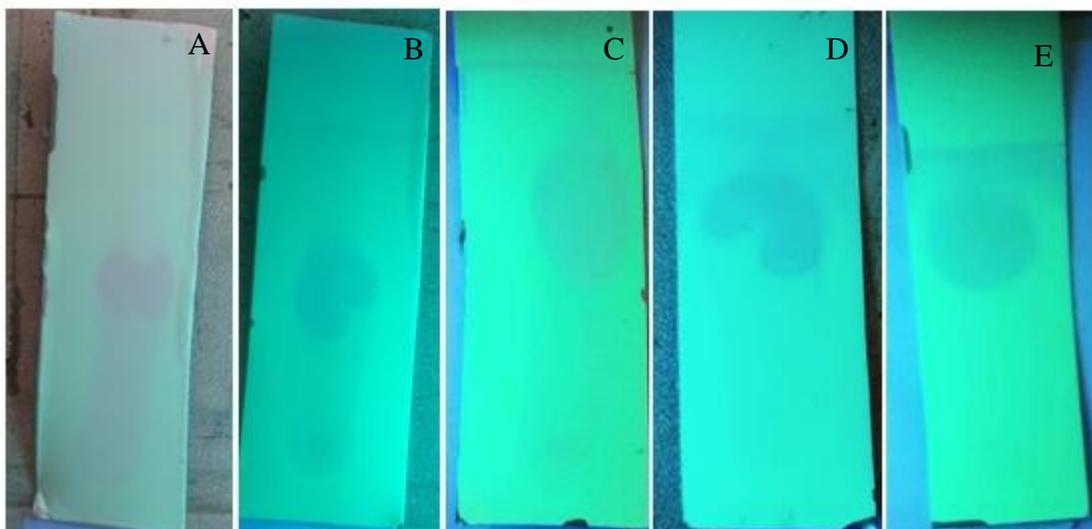


Figura 9. Cromatografía de capa fina sobre sílica gel 60 con indicador fluorescente UV_{254} (ALUGRAM, SIL G/ UV_{254} de las subfracciones A) F33, B) P22, C) P23, D) P32 y E) P33.

Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas mediante CC

Con la intención de contribuir en la búsqueda de compuestos con actividad antibacteriana a partir de fuentes naturales, al ensayar las fracciones provenientes de la fracción remanente acuosa del extracto de la biomasa 1 y 2, se utilizaron otras especies bacterianas, gram negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa*

(ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y gram positiva *Staphylococcus aureus* (IBE Doc-19), observándose una leve actividad por la fracción P2, sobre *K. pneumoniae*, la cual no pudo cuantificarse debido a que no se formó un halo de inhibición como tal, sino que hubo baja formación de bacterias alrededor del disco, es decir, la actividad biológica ejercida por la fracción P2 produjo un efecto bacteriostático, el cual no produce la muerte total de las bacterias, si no que inhibe o retarda el crecimiento bacteriano, lo cual está en relación con los datos reportados por Hadi-Setyawan y Andayani-Maftuch, en el 2019.

En consecuencia, la ausencia de actividad en las fracciones y subfracciones, permite inferir la presencia de un efecto sinérgico en el extracto etanólico, es decir, tiene la propiedad de producir un efecto bactericida superior al ejercido por cada una de sus fracciones por separado.

ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS

Los análisis espectroscópicos de RMN ^1H de las subfracciones P23, P32 y P33 fueron realizados a partir de los FID, obtenidos en un espectrómetro Bruker de 500 MHz, utilizando como solvente MeOD. A partir de los FID se generaron espectros monodimensionales de protones, mediante el uso del software TopSpin versión 4.0.8 y el asistente CMC versión 2.16, descargados del servidor de Bruker.

Análisis de resonancia magnética nuclear de ^1H de la subfracción P33

El espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la fracción P33, que se muestra en la figura 10, posee señales características de esqueletos triterpénicos y esteroidales, lo cual está en relación con lo reportado por Seraspe *et al.* (2012), Rai y Rajashekhar (2015) y Hadi-Setyawan y Andayani-Maftuch (2019) con respecto al patrón espectroscópico de este tipo de compuestos. En este espectro se observan zonas muy complejas con gran número de señales, las cuales se superponen unas con otras. Las señales a campo alto con δ_{H} entre 0,80 a 2,50 ppm son indicativas que el compuesto es triterpeno por naturaleza, según lo reportado por Eswaraiah *et al.* (2011).

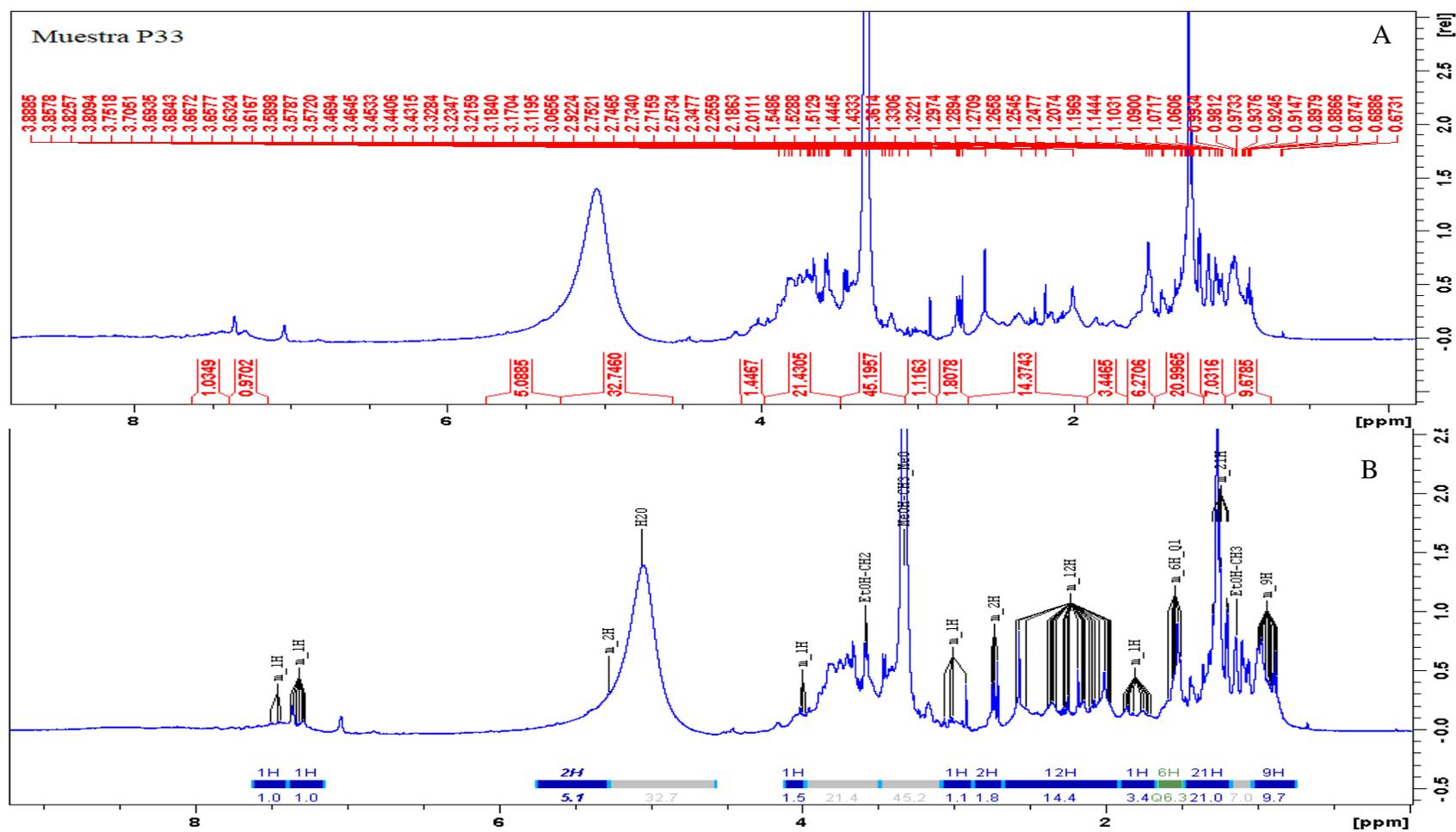


Figura 10. Espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por: A) software TopSpin y B) asistente CMC.

La primera zona con señales generadas de forma automatizada por el programa TopSpin para el espectro de la muestra P33, integra para 9H con δ 0,7458-1,0387 ppm que podría indicar 3 grupos CH_3 , seguida de la señal para el CH_3 del EtOH, en la cual se observa un multiplete con δ 1,1969-1,4847 ppm para 21H. Haciendo uso del asistente CMC se fragmentó la zona de 21H (figura 11), dando como resultado la separación de una primera zona con δ 1,2287-1,1780 ppm (3H, d), seguida de otra con δ 1,2287-1,2832 ppm (9H, m), luego otra zona con δ 1,2832-1,3087 ppm (2H, d) y otra de δ 1,3087-1,4885 ppm (7H, m). Es decir, la zona de 21H podría indicar la presencia de grupos CH_3 y CH_2 . De esta misma forma, la siguiente región de desplazamiento entre 1,4885-1,6699 ppm (6H, m), según lo reportado por algunos autores como Okoye *et al.* (2014) y Eswaraiah *et al.* (2011), podrían ser de protones unidos a carbonos terciarios, sin embargo, desde el punto de vista estructural los triterpenos y esteroides solo poseen de 3 a 4 protones unidos a carbonos terciarios, de esta manera los 2 protones restantes revelan que se trata de más de un compuesto de naturaleza triterpénica o esterooidal, por ende más de 4 carbonos terciarios, o bien corresponder a un grupo CH_2 . Por otro lado, se observa una zona con δ entre 2,0111-2,5734 ppm (12H, m), que podría corresponder a protones cercanos a grupos que sacan densidad electrónica del entorno que rodea dichos protones.

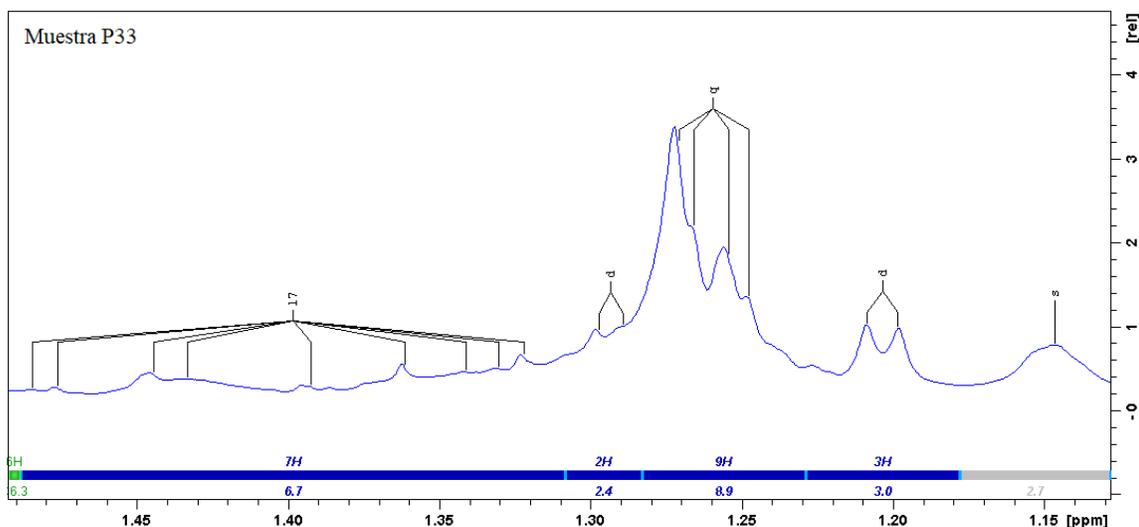


Figura 11. Ampliación del espectro RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, en la región con δ 1,19-1,49 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por el asistente CMC.

Los datos automatizados por el software TopSpin y asistente CMC muestran la presencia de un protón a campo alto con δ 2,9224-3,0829 ppm (1H, m), el cual debe estar unido o cercano a un átomo electronegativo, posiblemente un átomo de oxígeno de un grupo hidroxilo, que generalmente está unido al C-3. Algunos reportes consideran que el grupo hidroxilo presente en las estructuras de algunos compuestos triterpénicos es clave para la actividad antibacteriana (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009; Jaramillo-Madrid *et al.*, 2020). Los desplazamientos reportados para estos protones fueron de 3,50 a 3,60 ppm para el protón unido al oxígeno y de 3,15 a 3,20 ppm para el protón unido al C-3 (Eswaraiah *et al.*, 2011; Okoye *et al.*, 2014). Haciendo uso del asistente CMC se estrechó la zona producida para el doblete del CH_2 del EtOH, que pasó de tener un desplazamiento de 3,4991-3,9812 ppm a 3,5822-3,6086 ppm, de esta manera, se observó una integral al lado del pico del solvente, en donde se evidenció, la formación de dos picos continuos en la zona de δ 3,5624-3,5821 ppm (1H, d), marcados con el número 9 en la figura 12, lo que podría indicar la presencia del protón unido al átomo de oxígeno. De esta manera, el asistente CMC deja clara evidencia que es utilizado para extraer de

manera eficiente información de datos complejos al revelar señales ocultas que son solapadas por los solventes o multipletes.

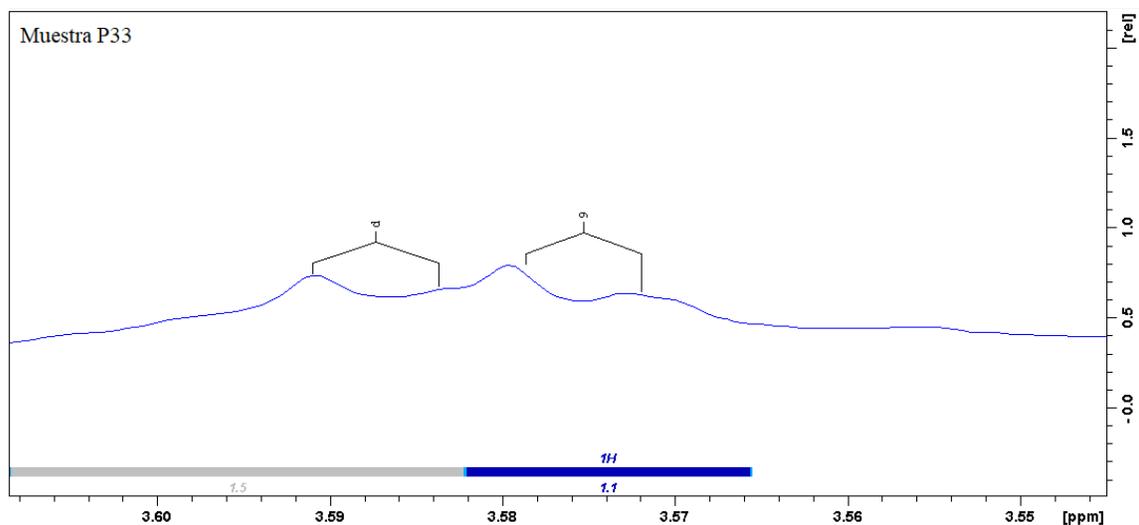


Figura 12. Ampliación del espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, en la región con δ 3,54-3,61 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por el asistente CMC.

Se evidencio que, las señales generadas por el software para los solventes eran muy amplias, de esta forma, haciendo uso del asistente CMC se fragmentaron las zonas para el CH_3 de MeOH y el CH_2 de EtOH, con el fin de generar nuevas integrales para obtener información adicional. De esta manera, fueron observadas señales con δ 3,0879-3,2788 ppm (3H, m), seguida de la zona para el CH_3 del MeOH, luego otra región con δ 3,3902-3,5624 ppm (2H, m), siguiendo una señal de δ 3,5624-3,5821 ppm (1H, d), continua la señal doblete del solvente para el CH_2 del EtOH, seguida de una región con δ 3,6085-3,7742 ppm (4H, m), luego una zona con δ 3,7742-3,9812 ppm (4H, m), detalladas en la figura 13. Las señales con desplazamiento entre $\sim 3,0$ y $\sim 4,2$ ppm, podrían indicar protones enlazados o próximos a heteroátomos, principalmente de nitrógeno, que se relaciona por dar positivo a las pruebas de alcaloides, o bien, de residuos glicosídicos, las cuales son señales que se superponen.

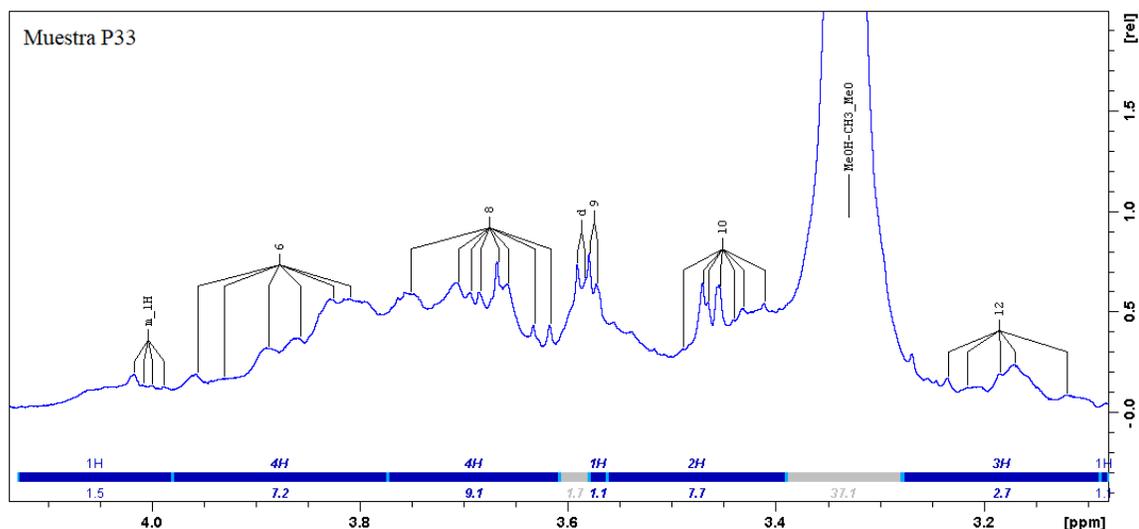


Figura 13. Ampliación del espectro RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, en la región con δ 3,1-4,1 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por el asistente CMC con relación a las señales para los solventes.

La señal en forma de singlete de δ 5,282 ppm (solapada con la señal de agua, figura 14) que integra para 2H, indica la presencia de protones de carbonos insaturados $\text{C}=\text{C}$, que se muestra entre 5,15 a 5,40 ppm o protones anoméricos de residuos glicosídicos, los cuales se presentan entre 4,5 a 5,5 ppm. Sin embargo, para muchos triterpenos la señal olefínica integra solo para 1H debido a su posición, para este caso en particular los 2H podrían ser indicativo a la impureza presente o que están en una posición diferente a la generalmente conocida para los triterpenos (C-12), con excepción de algunos que no poseen ese doble enlace, por ejemplo, Lupeol, Lupenone, Taraxerol, Friedelin, Betulin, entre otros. Por esta razón se infiere también en un esqueleto esterooidal, ya que ese doble enlace no está fijo en el C-12, por ejemplo, como el Ergosterol peróxido que se encuentra en el C-6 o el β -Sitosterol en el C-5. Es decir, la señal olefínica está en correlación con lo reportado por Chauton *et al.* en el 2004 para la especie *Chaetoceros muelleri* en su RMN ^{13}C y por Rampen *et al.*, en el 2010 para *Chaetoceros calcitrans*.

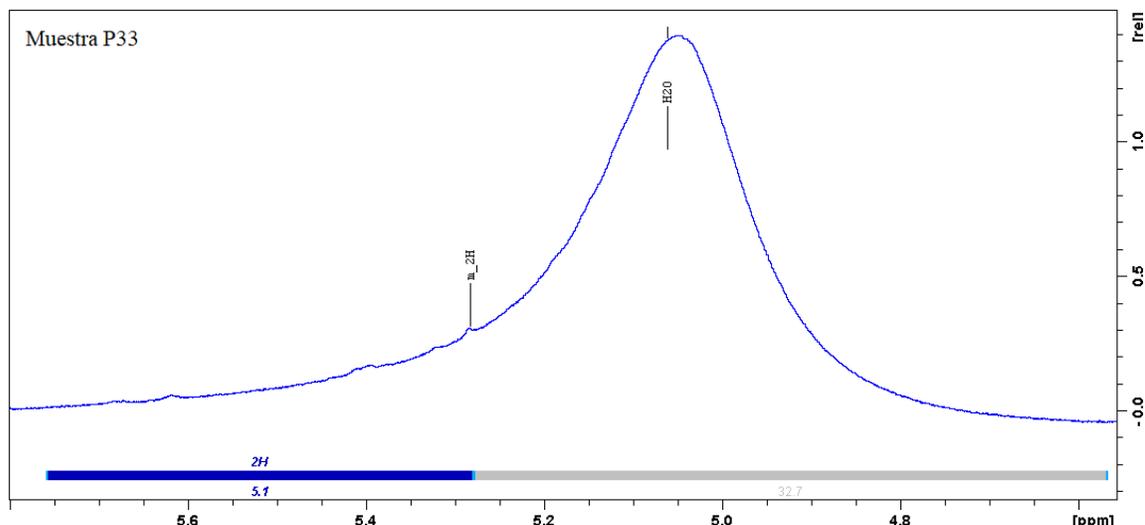


Figura 14. Ampliación del espectro RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P33, en la región con δ 4,6-5,8 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por el asistente CMC, con relación a las señales para los solventes.

Análisis de resonancia magnética nuclear de ^1H de las subfracciones P23 y P32

Al hacer uso del FID del experimento de RMN ^1H de la subfracción P23, mediante el asistente CMC, varias regiones fueron tomadas como impurezas de forma automatizada, ver figura 15A y 15B, siendo este espectro el que arrojó mayores regiones de impurezas, lo que podría decirse que la mezcla es más homogénea en cuanto a la relación de sus componentes, es decir no hay un componente en mayor relación con respecto a los demás. Si se toma en cuenta que esta subfracción fue de las primeras en eluir, es de esperar que el espectro mostrara zonas impuras o mezcla de sustancias. Es importante mencionar que, el programa también establece las señales características de los solventes usados como impurezas. De la misma manera la subfracción P32 muestra solo una zona impura, además de las mostradas para los solventes, como se aprecia en la figura 16A y 16B.

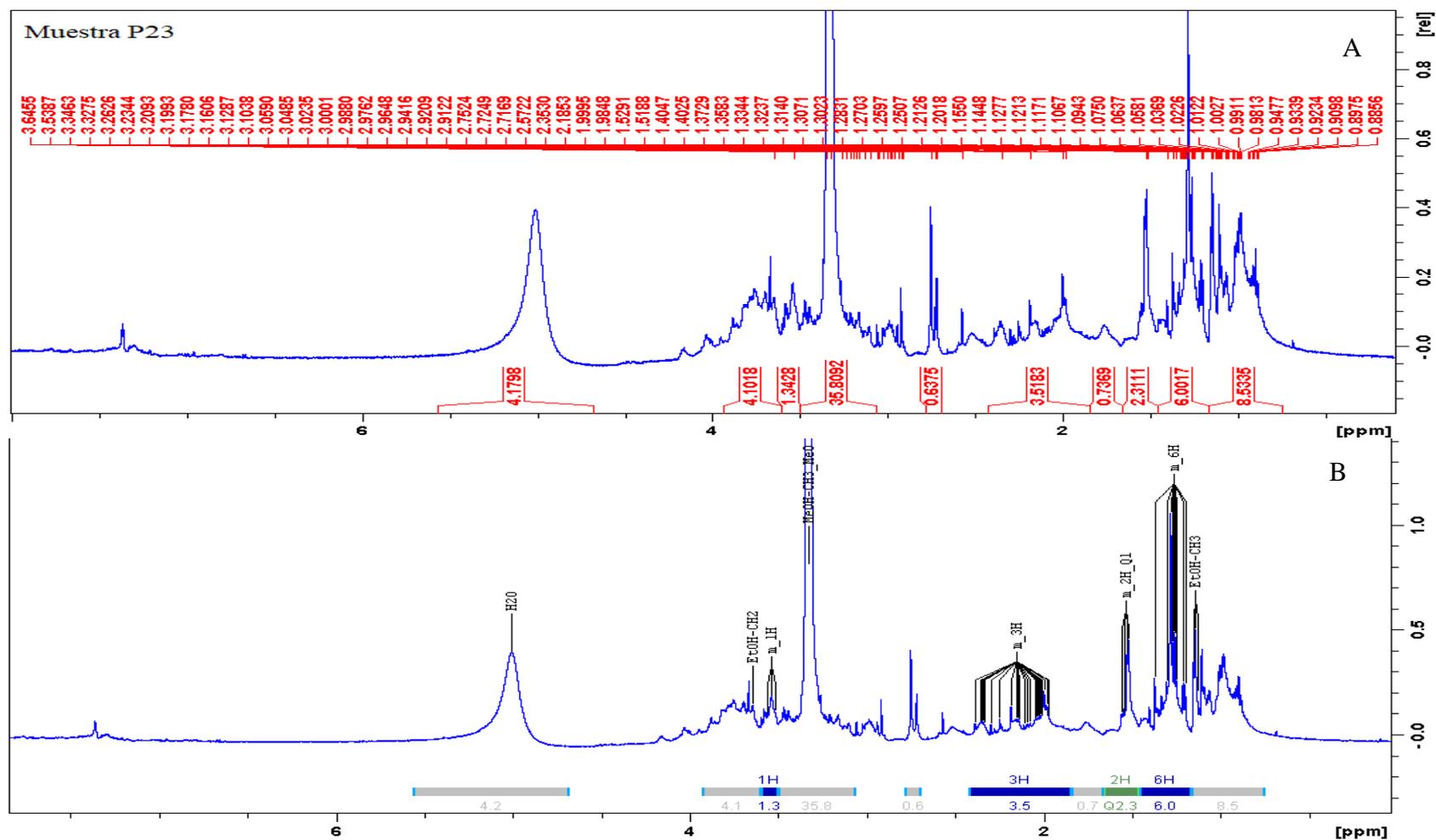


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P23, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por: A) software TopSpin y B) asistente CMC.

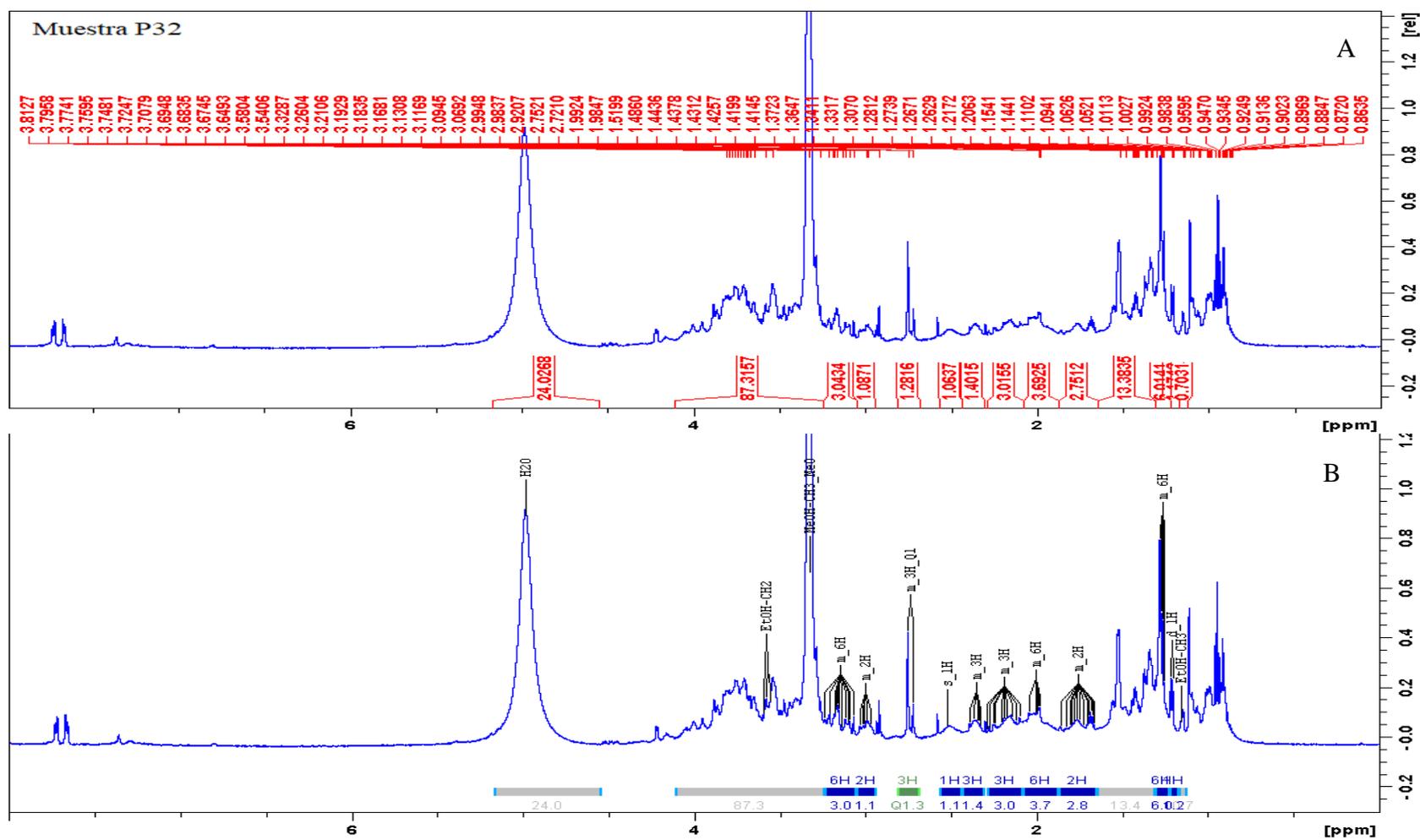


Figura 16. Espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P32, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por: A) software TopSpin y B) asistente CMC.

El asistente CMC de forma automatizada, para P23 y P32, no generaba integrales debajo de la zona del CH₃ del EtOH, la cual es de suma importancia para la evidencia de grupos CH₃. La señal para el CH₃ del EtOH de la muestra P23 se observó muy amplia, haciendo uso del asistente, esta señal paso de tener un δ 0,7536-1,1663 ppm a 1,1184-1,1663 ppm. Así mismo, se observó un multiplete con δ 0,6993-1,1154 ppm (7H, m), el cual fue fragmentado en una primera zona con δ 0,6993-0,9993 ppm (4H, m) y otra con δ 0,9993-1,1154 ppm (3H, m), se detalla en la figura 17.

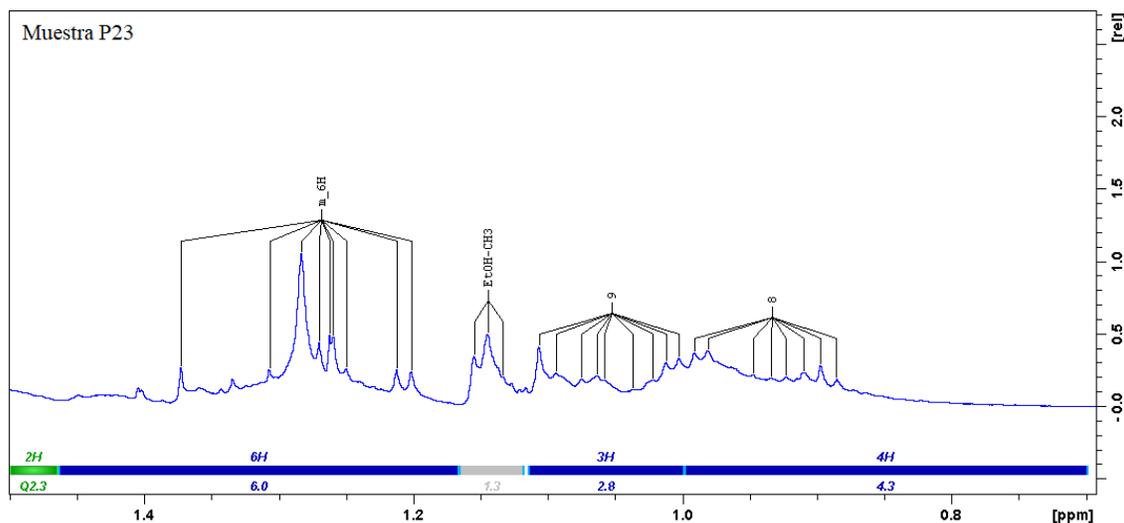


Figura 17. Ampliación del espectro de RMN ¹H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P23, en la región con δ 0,7-1,5 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto H₂O:HCl de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por el asistente CMC.

Así mismo, para la muestra P32, se observó antes de la región del CH₃ del EtOH (δ 1,1267- 1,1721 ppm), picos con δ de 0,6001- 1,1520 ppm (14H, m). Haciendo uso del asistente CMC, se determinó que los 14H corresponden a una primera señal de δ 0,6001- 0,8005 ppm (1H, s), la cual es un pico de baja intensidad y que está por debajo de la zona terpenoide por naturaleza, la cual se presenta desde 0,8 a 2,3 ppm, seguida una integral con δ 0,8005-1,0299 ppm (9H, m), por último, una de δ 1,0299-1,1520 ppm (4H, m) (figura 18). Estos desplazamientos químicos de protones alifáticos, se asumen que son un grupo de señales que corresponden a protones de grupos metilos en la estructura.

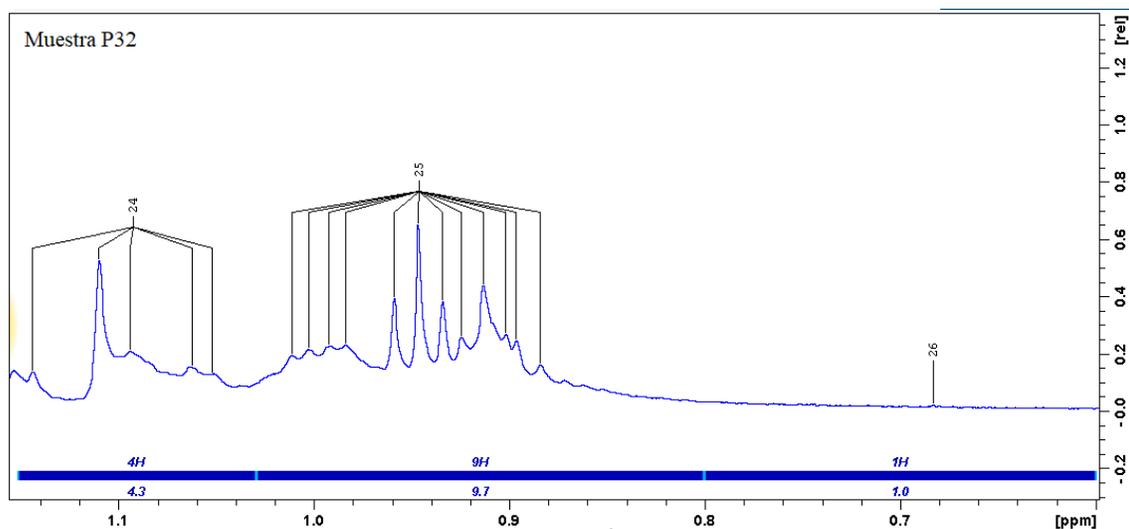


Figura 18. Ampliación del espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P32, en la región con δ 0,6-1,2 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por el asistente CMC.

Haciendo una comparación entre los tres espectros estudiados, se observó señales de 6H en cada espectro, detallados en la figura 19, con desplazamientos de 1,1663-1,4641 ppm para P23, para P32 con δ 1,2264-1,3105 ppm y de δ 1,4885-1,6699 ppm para P33. Como se mencionó anteriormente para la muestra P33, de estos 6H, 3 o 4 corresponden a protones unidos a carbonos terciarios, mientras que los restantes podrían indicar que se trate de más de un compuesto de naturaleza triterpénica o esteroidal, o bien corresponder a un grupo CH_2 . Este resultado estaría en correlación a lo encontrado para algunos triterpenos/esteroides, puesto que estos protones presentan desplazamientos característicos de 1,30 a 1,60 ppm (Eswaraiah *et al.*, 2011; Okoye *et al.*, 2014).

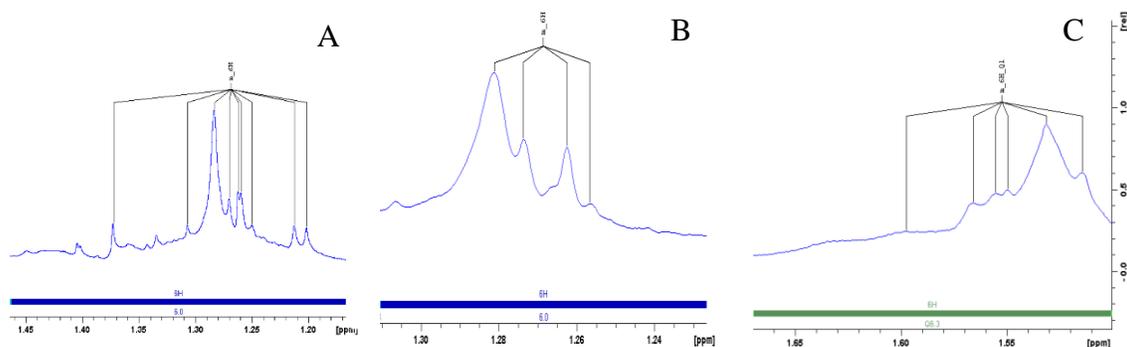


Figura 19. Ampliaciones de los espectros de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) en las regiones entre 1,16 a 1,66 ppm donde se observan señales para 6H, de las subfracciones A) P23, B) P32 y C) P33.

Una de las características establecidas para la muestra P33, fue la presencia de un grupo hidroxilo y un protón unido al C-3, que está relacionada según algunos reportes con la actividad antibacteriana (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009). La muestra P23 presenta una integral de δ 3,5001-3,6047 ppm (1H, m), característica de un protón unido a un átomo de oxígeno, de forma manual se observó una región con δ 3,1383-3,2580 ppm (1H, q), que podría ser atribuida al protón unido al C-3, ver figura 20.

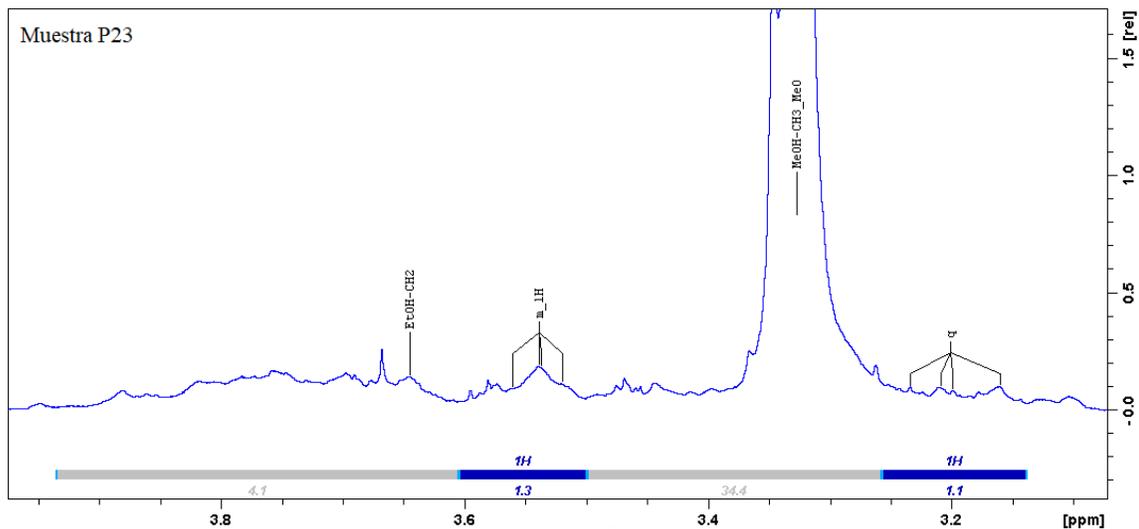


Figura 20. Ampliación del espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P23, en la región con δ 3,1-4,0 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por el asistente CMC.

Caso contrario se aprecia para la muestra P32, debido a que, esta no presenta de forma automática los picos característicos de estos protones, así que, utilizando el asistente CMC, se fragmentaron las regiones establecidas para el CH₃ del MeOH y el CH₂ del EtOH, posterior se determinó una integral en la región con δ 3,2443-3,2996 ppm (1H, s), en la que se observa una señal en forma de singulete específicamente en 3,2620 ppm. Esta señal se desplaza hacia campo bajo, comparado con los datos encontrados en la literatura, sin embargo, podría decirse que la señal de 6H con δ 3,0537-3,2443 ppm, solapa gran parte de la zona característica de este protón. Del mismo modo, se observó otra integral con δ 3,5275-3,5436 ppm (1H, s), definida en δ 3,539 ppm, identificada con el número 9 en la figura 21, la cual está en correlación con el desplazamiento químico de un protón unido a un átomo de oxígeno.

De la misma manera que en el espectro de P33, haciendo uso del asistente CMC, se estrechó la zona de los solventes para el CH₃ del MeOH y el CH₂ del EtOH en el espectro de RMN ¹H de la muestra P32, que se observan en forma de singulete y cuarteto respectivamente, para la observación de nuevas regiones que dieran indicio a otras características básicas de la naturaleza de esta muestra. De esta forma, se determinaron nuevas integrales y multipletes por regiones, las cuales se detallan en la figura siguiente, siendo la primera zona de δ 3,2443-3,2996 ppm (1H, s), identificada con el número 11 en la figura 21, seguida del CH₃ de MeOH, que aunque es un singulete con desplazamiento de 3,3290 ppm, la zona donde se encuentra dicha señal fue fragmentada (δ 3,2996-3,3891 ppm), luego otra zona de δ 3,3889-3,5274 ppm que no posee formación de multipletes, consecutiva de una zona con δ 3,5275-3,5436 ppm (1H, s), que se mencionó anteriormente, seguida la zona fragmentada para el CH₂ del EtOH (δ 3,5436-3,6072 ppm), continua una región amplia de δ 3,6071-4,1132 ppm (18H, m) y por último una zona de 5 picos de δ 4,1132-4,5469 ppm para 1H. Estas señales, al igual que las evidenciadas en el espectro de la muestra P33 y P23, podrían ser de protones enlazados o próximos a heteroátomos, o bien, para señales correspondientes a protones de residuos glicosídicos.

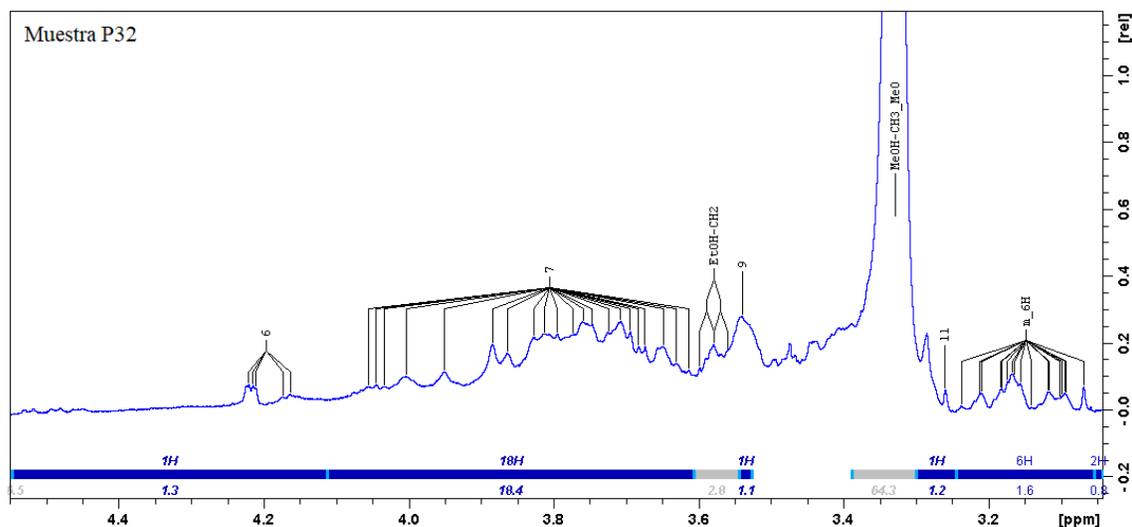


Figura 21. Ampliación del espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) de la subfracción P32, en la región con δ 3,2-4,4 ppm, purificada a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por el asistente CMC.

En el caso particular del espectro de la muestra P23, en la región entre 5,2 y 5,4 ppm no se evidenció señales (figura 22A), por lo cual se infiere que el esqueleto estructural de esta muestra no posee protones de carbonos insaturados ($\text{C}=\text{C}$) o protones anoméricos correspondientes a compuestos glicosídicos, que a menudo se encuentran dentro de 4,5 y 5,5 ppm, o bien, que la señal generada por el H_2O es tan amplia e intensa que solapa completamente esta zona característica. Por otro lado, la muestra P32 tiene varias señales a pie de la intensa con δ 5,2 a 5,4 ppm (2H, s), pico de δ 5,385 ppm (figura 22B), lo cual indica la presencia de protones de carbonos insaturados $\text{C}=\text{C}$ o protones anoméricos, al igual que la muestra P33.

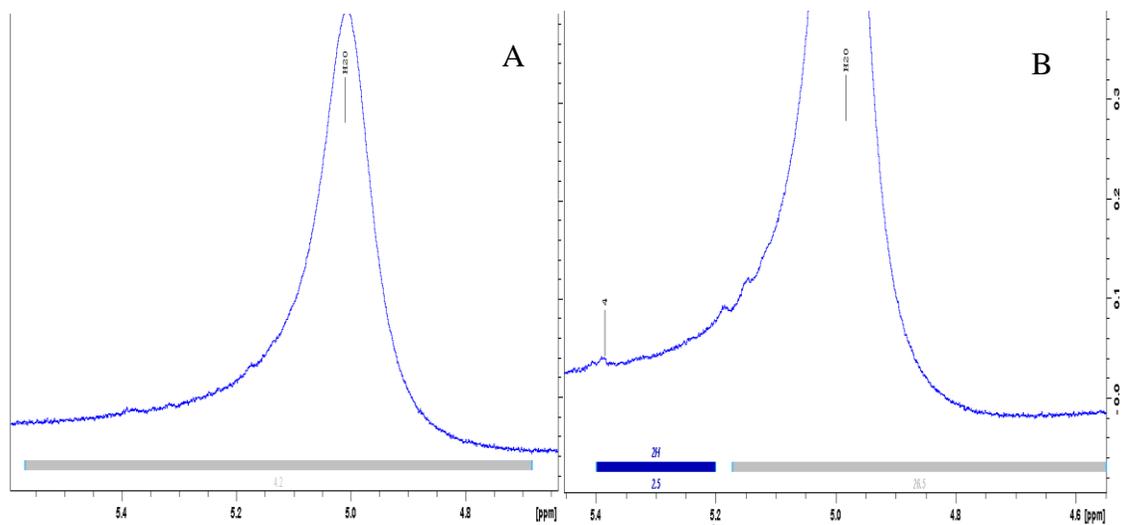


Figura 22. Ampliaciones de los espectros de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) en las regiones entre 4,5 a 5,4 ppm de las subfracciones A) P23 y B) P32, purificadas a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, generado por el asistente CMC.

Por otro lado, se observó señales a campo bajo, para la muestra P23, de δ 8,800–8,3250 ppm (2H, m), para la muestra P32 de δ 7,0915–8,0278 ppm (1H, m) y δ 8,4200– 8,7060 ppm (2H, m) y para la muestra P33 con señales de δ 7,1526–7,3912 ppm (1H, m) y otra de δ 7,3912–7,6293 ppm (1H, m), esto puede ser detallado en la figura 23, las cuales son típicas de compuestos aromáticos (Dyer, 1973).

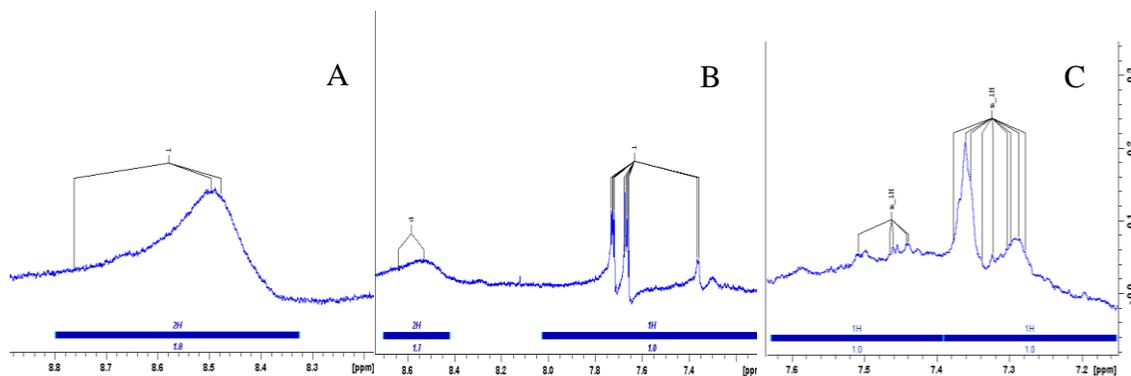


Figura 23. Ampliaciones de los espectros de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) en las regiones entre 7,2 a 8,8 ppm donde se observan señales a campo bajo, de las subfracciones A) P23, B) P32 y C) P33.

Comparación con espectros de estructuras conocidas

Mediante comparación con datos espectroscópicos de estructuras conocidas obtenidos por consultas bibliográficas, se pudo sustentar los análisis de los estudios llevados a cabo. De esta forma, se muestra en la figura 24, el espectro de la muestra P33 junto al espectro del ácido oleanólico unido a un disacárido.

Las relaciones más importantes son basadas en los desplazamientos químicos entre 0,80 a 2,50 ppm para protones de la parte terpenoidal de la estructura, también las señales que van desde 3,0 a 4,0 ppm correspondientes a protones de unidades sacáridas enlazadas a la estructura base del compuesto, desplazamientos químicos entre 4,5 a 5,5 ppm, debidos a protones anoméricos, entre 5,15 a 5,4 ppm para protones de carbonos insaturados $\text{C}=\text{C}$. Así mismo, cuando se trata del ácido oleanólico sin restos glicosídicos se presentan señales de 3,15 a 3,20 ppm para el protón junto al C-3 y luego de 3,50 a 3,60 ppm para la señal del protón unido al -OH.

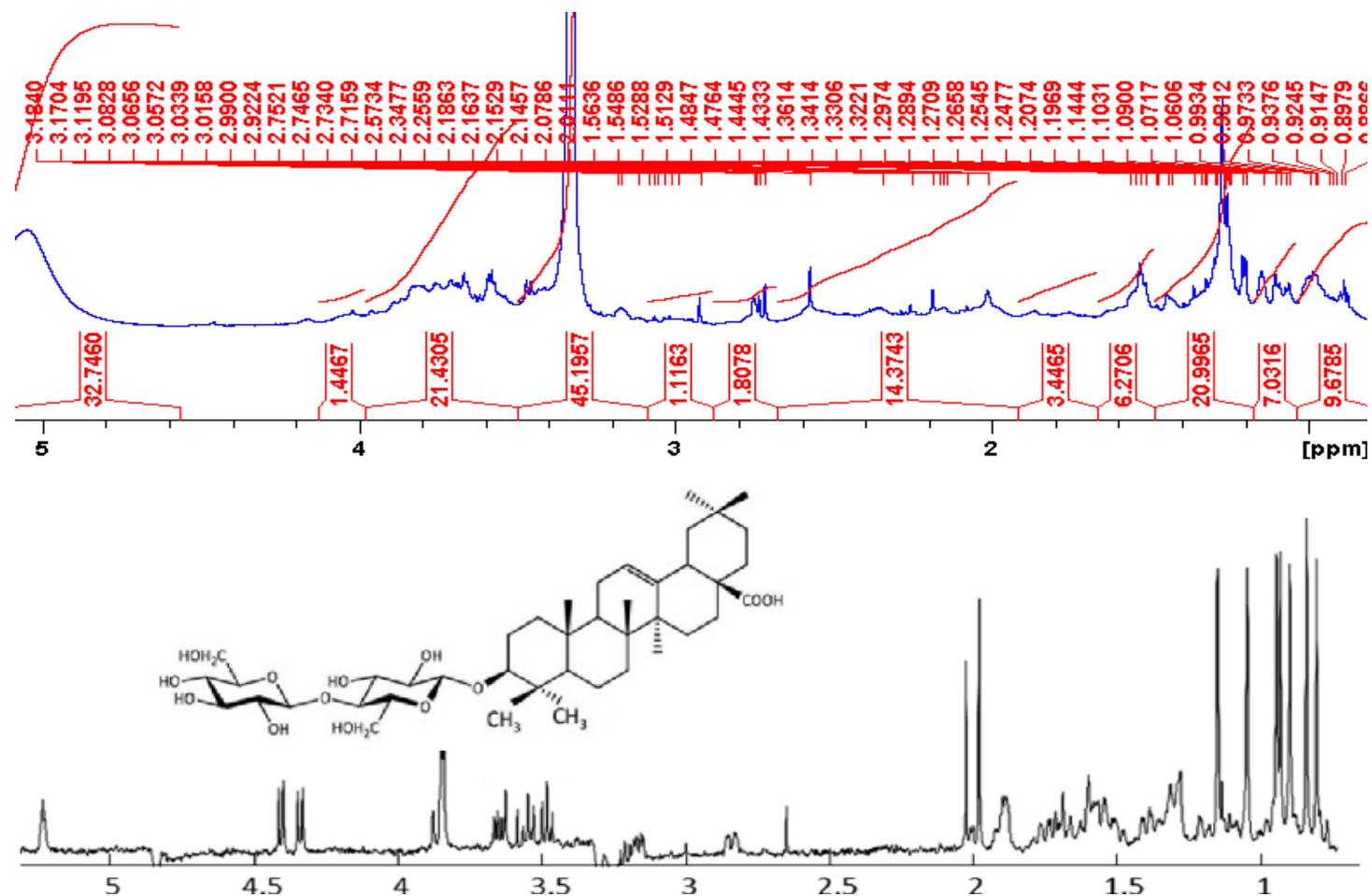


Figura 24. A) Espectro de RMN ^1H (500MHz; MeOD) de la muestra P33 aislada de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*. B) Espectro de RMN ^1H de celobiosido del ácido oleanólico aislado de *B. vulgaris* (Khakimov *et al.*, 2016).

Análisis de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT- IR)

Una vez evidenciadas señales características en los espectros de RMN ^1H , se procedió a confirmar con los análisis de infrarrojo. Es importante acotar que, la posición e intensidad de las bandas correspondientes a cada espectro, ofrece información sobre los grupos funcionales presentes en cada muestra.

En la siguiente figura, se muestra la superposición de los espectros IR de las subfracciones P23, P32 y P33 (en pastillas de KBr, figura 25). Los picos intensos y anchos a 3400,77, 3431,83 y 3409,79 cm^{-1} de las muestras P23, P32 y P33 respectivamente, corresponden a las vibraciones de estiramiento del enlace del grupo hidroxilo, lo cual permite inferir en la naturaleza higroscópica de la muestra, el solvente utilizado o a grupos OH presentes en la estructura de la molécula. Los picos agudos y definidos en P32 y P33 a 3239,42 y 3239,33 cm^{-1} podrían ser causados por vibraciones de estiramiento de enlace N–H. Así mismo, las bandas a 2244,93 y 2253,33 cm^{-1} de P33 y P32 podrían significar el estiramiento del enlace $\text{N}\equiv\text{C}$, estas observaciones estarían en correlación con las pruebas fitoquímicas, al resultar positivo para alcaloides y sustenta las señales asignadas a protones próximos a heteroátomos en los espectros de RMN ^1H .

Por otro lado, las señales a 1635,26, 1635,14 y 1633,71 cm^{-1} de las muestras P23, P32 y P33 respectivamente, son vibraciones de estiramiento del enlace doble $\text{C}=\text{C}$. Al encontrar absorción en esta región para la muestra P23, se confirma que el esqueleto estructural tiene insaturaciones, en consecuencia, se sustenta la información generada por medio del espectro de RMN ^1H , donde se sugiere que la señal de H_2O solapa la zona característica de las insaturaciones.

Las señales a 1421,53 y 1406,42 cm^{-1} de P32 y P33 corresponden a deformaciones C–H. La banda a 1111,85 cm^{-1} de P32 y una ligera a 1146,84 cm^{-1} de P23, podrían corresponder a vibraciones de estiramiento del enlace C–OH, específicamente de alcoholes secundarios, las cuales se presentan $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$. De igual forma, la señal a 1049,43 cm^{-1} para P33 se debe a vibraciones de estiramiento del enlace C–OH, que son

absorbidas por alcoholes primarios a $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$. Es importante mencionar que, los datos teóricos fueron consultados en Dyer, 1973.

La superposición de espectros IR evidencia la relación que existe entre las muestras P32 y P33, las cuales poseen señales en común, incluso en la región de la huella dactilar, lo cual está en concordancia, puesto que, estas dos subfracciones provienen de la fracción P3, que fue fraccionada del remanente acuoso del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ (FRE2), lo que podría indicar ser una misma mezcla de sustancias.

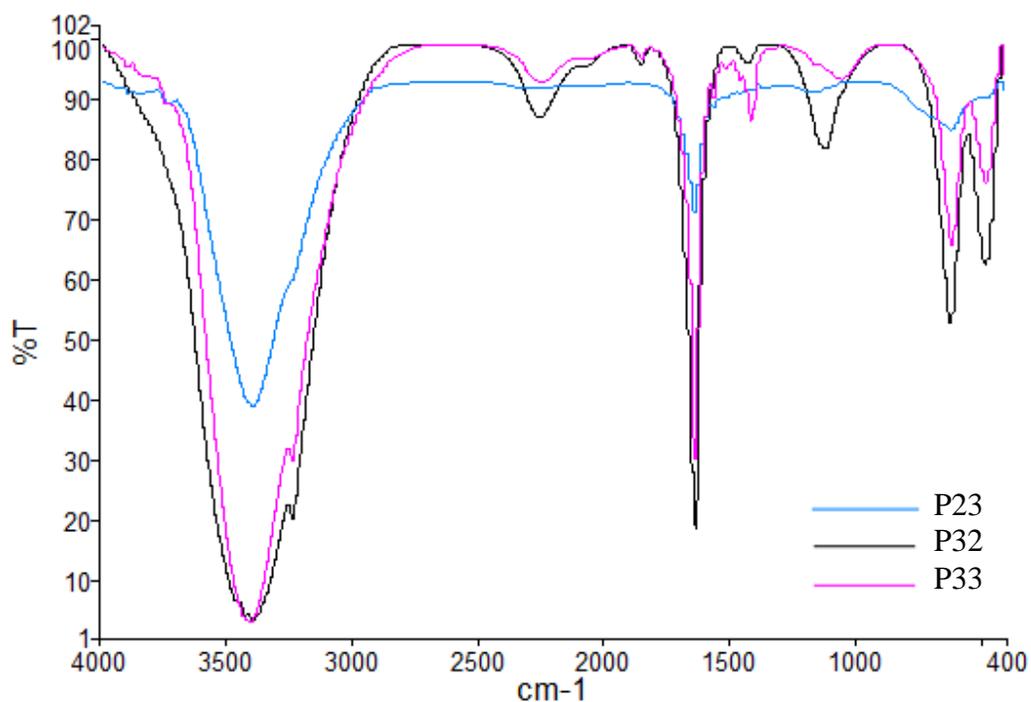


Figura 25. Superposición de los espectros IR de las subfracciones P23, P32 y P33, purificadas a partir de la fracción acuosa del extracto $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* a concentración de 8 mmol l⁻¹ de NaNO₃ y en fase estacionaria de crecimiento generó mayor rendimiento biomasa/extracto.

Solo el extracto obtenido a partir de la biomasa cultivada a la concentración de 8 mmol l⁻¹ de NaNO₃, cosechada en fase estacionaria de crecimiento fue capaz de inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

Las pruebas fitoquímicas, aplicadas al extracto bioactivo (8 mmol l⁻¹ de NaNO₃, fase estacionaria), detectaron solo la presencia de alcaloides básicos.

Los análisis de RMN e IR sugieren que las sustancias aisladas de P23, P32 y P33 son similares, generando un esqueleto de base triterpénico/esteroidal enlazado a heteroátomos o residuos glicosídicos.

El uso de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* en cultivos de camarones/peces puede ser una alternativa viable para controlar las infecciones en las industrias acuícolas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcocer, C. 2012. *Detección de actividad antibiótica en cultivos de microalgas en dos fases de crecimiento*. Trabajo de especialización. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México.
- Avendaño-Herrera, R.; Lody, M. y Riquelme, C. 2005. Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 40(2): 117-125.
- Azizan, A.; Ahamad Bustamam, M. S.; Maulidiani, M.; Shaari, K.; Ismail, I. S.; Nagao, N. y Abas, F. 2018. Metabolite Profiling of the Microalgal Diatom *Chaetoceros Calcitrans* and Correlation with Antioxidant and Nitric Oxide Inhibitory Activities via ^1H NMR-Based Metabolomics. *Mar. Drugs*, 16: 154-173.
- Bhakuni, D. S. y Razat, D. S. 2005. *Bioactive marine natural products*. Anamaya Publishers, New Delhi, India.
- Bueno-Sánchez, J. G.; Martínez-Morales, J. R. y Stashenko, E. 2009. Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Salud uis*, 41: 231-235.
- Chauton, M. S.; Storseth, T. R. y Krane, J. 2004. High-resolution magic angle spinning nmr analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (*Bacillariophyceae*) and comparison with ^{13}C -NMR and distortionless enhancement by polarization transfer ^{13}C -NMR analysis of lipophilic extracts. *Journal of phycology*, 40(3): 611-618.
- De la Calle, F. 2007. Fármacos de origen marino. *Pharma Mar SAU*, 58: 141-155.
- Defoirdt, T.; Boon, N.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W. y Bossier, P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, 25(10): 472-479.
- Droop, M. R. y Elsen, K. G. R. 1966. Are pelagic diatoms free from bacteria? *Nature*, 211: 1096.
- Duff, D.; Bruce, D. y Anita, N. 1966. The antibacterial activity of marine planktonic algae. *Canadian Journal of Microbiology*, 12: 877-884.
- Dyer, J. 1973. *Aplicaciones de espectroscopia de absorción en compuestos orgánicos*. Prentice-Hall. New Jersey.
- Eswaraiah, C.; Elumalai, A. y Habibur, R. 2011. Isolation of phytochemical constituents from stem barks of *Madhuca longifolia*. *Int. Res J Pharm. App Sci.*, 1(1): 43-60.
- Fenical, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science*, 215(4535): 923-928.

- Fidalgo, J. 1995. *Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno*. Trabajo doctoral. Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de la Coruña, La Coruña.
- Griffin, S. 2000. *Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure*. Trabajo doctoral, Universidad de Western Sidney, Penrith.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Smith, W. L. y Chanle, M. H. (eds). Plenum Press, New York, USA. Págs. 26-60.
- Hadi-Setyawan, F. y Andayani-Maftuch, S. 2019. Antibacterial Candidate of *Chaetoceros calcitrans* against *Aeromonas salmonicida* bacteria based in vitro. *International journal of scientific & technology research*, 8(10): 1345-1347.
- Jaramillo-Madrid, A.; Ashworth, J. y Ralph, P. 2020. Levels of diatom minor sterols respond to changes in temperature and salinity. *J. Mar. Sci*, 8: 85-99.
- Karunasagar, I.; Shivu, M. M.; Girisha, S. K. y Krohne, G. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture*, 268: 288-292.
- Khakimov, B.; Tseng, L.; Godejohann, M.; Bak, S. y Engelsen, S. 2016. Screening for Triterpenoid Saponins in Plants Using Hyphenated Analytical Platforms. *Molecules*, 21(12): 1614.
- Kroger, N.; Deutzman, R. y Sumper, M. 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, 286: 1129-1132.
- Kroger, N.; Deutzman, R.; Bergsdorf, C. y Sumper, M. 2000. Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97: 14133-14138.
- Kuppusamy, P.; Soundharrajan, I.; Srigopalram, S.; Yusoff, M. M.; Maniam, G.P.; Govindan, N. y Cho, K. C. 2017. Potential pharmaceutical and biomedical applications of diatoms microalgae-An overview. *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 46: 663-667.
- Lara, M.; Moreno, J. y Amaro, E. 1996. *Fitoplancton. Conceptos básicos y técnicas de laboratorio*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Pág. 227.
- Le, T.; Munekage, Y. y Kato, S. 2005. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Science of The Total Environment*, 349(1-3): 95-105.
- Leyton, Y. 2012. *Identificación de productos extracelulares de dos bacterias marinas inhibidoras de Vibrio parahaemolyticus y evaluación del potencial uso de estos productos como control de este patógeno*. Trabajo doctoral. Facultad de Recursos del Mar, Universidad de Antofagasta, Chile.

- Liu, S. R.; Peng, X. y Li, H. 2019. Metabolic mechanism of ceftazidime resistance in *Vibrio alginolyticus*. *Dove medical press journal: Infection and drug resistance*, 12: 417-429.
- López-Elías, J.; González-Vega, R.; Márquez-Ríos, E. y Torres-Arreola, W. 2015. Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muelleri*. *Revista internacional de botánica experimental*, 84: 331-337.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición. Torino. Venezuela.
- Mitra, D.; Van Leeuwen, J. y Lamsal, B. 2012. Heterotrophic /mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 1(1): 40-48.
- Molina, C. 2011. *Efecto inhibitorio de diferentes especies de microalgas sobre Vibrio spp.* Trabajo de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior De Ensenada, México.
- Mora, J.; Newmark, F.; Santos-Acevedo, M. y Sanchez, J. 2008. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. *Rev. Esp. Quimioter*, 21(3): 174-179.
- Nájera-Arce, C; Álvarez-Fitz, P.; Pérez-Castro, D.; Toribio-Jiménez, J. y Castro-Alarcón, N. 2018. Actividad antibacteriana de diatomeas marinas aisladas de Acapulco, Guerrero, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(2): 195-217.
- Nelson, D. M.; Treguer, P.; Brzezinski, M. A.; Leynaert, A. y Queguiner, B. 1995. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cycles*, 9: 359-372.
- Okoye, N.; Ajaghaku, D.; Okeke, H. y Ilodigwe, E. 2014. Beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. *Pharm Biol*, 52(11): 1478-1486.
- Parhuayo, L. 2015. *Efecto inhibitorio de la microalga Isochrysis galbana (Haptophyta) sobre bacterias tipo vibrio spp.* Trabajo de pregrado. Facultad de Pesquería, Universidad Nacional Agraria, Perú.
- Parsaeimehr, A. y Chen, Y. F. 2013. Algal bioactive diversities against pathogenic microbes. In *Microbiol Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*; Méndez-Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 4: 796-803.
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4): 195-211.

- Quintana, A. 2013. Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9): 1689-1699.
- Rai, S. V. y Rajashekhar, M. 2015. Phytochemical screening of twelve species of phytoplankton isolated from Arabian Sea coast. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3(11): 857-863.
- Rampen, S.; Abbas, B.; Shouten, S. y Sinninghe, J. 2010. A comprehensive study of sterols in marine diatoms (Bacillariophyta): Implications for their use as tracers for diatom productivity. *Limnol Oceanogr*, 55(1): 91-105.
- Riquelme, C. y Avendaño-Herrera, R. 2003. Interacción bacteria microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76: 725-736.
- Romero A. 2002. *Cursos de métodos cromatográficos*. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Round, R.; Crawford, D. y Mann, D. 1990. *The diatoms*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sánchez-Saavedra, M.; Licea-Navarro, A. y Bernaldez-Sarabia, J. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana de diferentes especies de fitoplancton. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(3): 531-536.
- Santiago, M.; Espinosa, A. y Bermúdez, M. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3): 22-32.
- Seraspe, E. B.; Ticar, B. F.; Formacion, M. J.; Pahila, I. G.; De la Peña, M. R. y Amar, E. C. 2012. Antibacterial properties of the microalgae *Chaetoceros calcitrans*. *Asian Fisheries Science*, 25(4): 343-356.
- Shannon, E. y Abu-Ghannam, N. 2016. Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. *Marine Drugs*, 14(4): 81.
- Sieburth, J. y Pratt, D. M. 1962. Anticoliform activity of seaweed associated with the termination of *Skeletonema costatum* blooms. *Tram. N. Y. Acad. Sci. Ser. II*, 24: 498-501.
- Sierra, M.; Barros, R.; Gómez, D. Mejía, A. y Suarez Deivis. 2018. *Productos Naturales: Metabólicos Secundarios y Aceites Esenciales*. Fundación Universitaria Agraria de Colombia - UNIAGRARIA. Bogotá.
- Suárez-Medina, K. y Coy-Barrera, E. 2016. Diversidad de los compuestos orgánicos bioactivos de origen natural: una singularidad manifestada por la plasticidad en el metabolismo secundario. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2): 252-269.

Takano, H. 1968. On the diatom *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) emend and its dwarf form *pumilus* forma nov. *Bulletin Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*, 55: 1-7.

Tejeda-Benítez, L.; Henao-Argumedo, D.; Alvear-Alayón, M. y Castillo-Saldarriaga, C. R. 2015. Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Fac. Ing.*, 24(39): 43-54.

Villa, A.; Herazo, D. y Torregroza, A. 2014. Efecto del fotoperiodo del crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (CLON C-CAL) en cultivos estáticos. *Intropica*, 9: 111-117.

Waksman, S. A.; Stokes, J. y Butler, M. R. 1937. Relation of bacteria to diatoms in sea water. *Journal Marine Biological Association UK*, 22: 35.

METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MICROALGA <i>Chaetoceros calcitrans</i> SOBRE <i>Vibrio alginolyticus</i> Y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
MORALES GALANTÓN MAIRIM ESMERALDA	CVLAC	23683785
	e-mail	MAIRIMMORALES3@GMAIL.COM
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Chaetoceros calcitrans</i> , EFECTO ANTIBACTERIANO, VIBRIOS, CONDICIONES DE CULTIVO.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Sub área
CIENCIAS	QUÍMICA
	PRODUCTOS NATURALES

Resumen (abstract):

Se evaluaron las propiedades antibacterianas de la microalga *Chaetoceros calcitrans*, sobre las especies bacterianas *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Se realizaron cultivos axénicos, en medio f/2 Guillard, variando la concentración de nitrato de sodio (4, 8 y 16 mmol l⁻¹). Las fases exponencial y estacionaria fueron alcanzadas a los 12 y 22 días, respectivamente, de iniciado el cultivo. La cosecha de la biomasa y posterior extracción etanólica de metabolitos generaron extractos crudos que difieren en cuanto a la capacidad antibacteriana. De todos los extractos, el único que ejerció efecto antibacteriano fue la concentración 8 mmol l⁻¹ de NaNO₃, de la fase estacionaria, por tal razón esta condición se reprodujo para generar mayor cantidad de biomasa/extracto y posterior fraccionamiento de columna. Sin embargo, las fracciones obtenidas no presentaron actividad antibacteriana, por tal motivo se realizaron limpiezas a las biomásas utilizando C₂H₅OH:HCl y H₂O:HCl para lograr la disolución completa de la muestra, posterior a esto se llevaron a cabo biparticiones al extracto y fraccionamiento al remanente acuoso en cada caso, a las fracciones lo suficientemente puras se les realizaron estudios de Resonancia Magnética Nuclear, permitiendo de esta forma establecer un esqueleto base triterpénico/esteroidal enlazado a heteroátomos o residuos glicosídicos, estos datos fueron confirmados a través del análisis de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
WILLIAN HENRÍQUEZ	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8249952
	e-mail	whenriquez66@gmail.com
	e-mail	
HERNANDO HERRERA	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5872352
	e-mail	hherrera.mata@gmail.com
	e-mail	
HELLEN BRUZUAL	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	18581108
	e-mail	<u>tuamorhelena@gmail.com</u>
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2021	11	18

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis Mairim Morales.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado(a) QUÍMICA

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado(a)

Área de Estudio: QUÍMICA

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU Nº 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC Nº 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *Mazley*
FECHA *5/8/09* HORA *5:30*

Cordialmente,

Juan A. Bolanos Currelo
Secretario

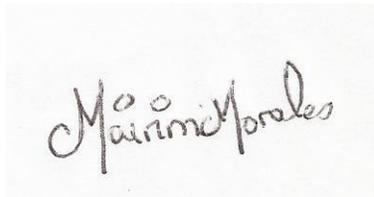


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

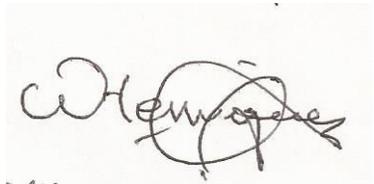
JABC/YGC/marija

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

A handwritten signature in black ink on a light background. The signature reads "Mairim Morales" in a cursive script.

**MAIRIM MORALES
AUTOR**

A handwritten signature in black ink on a light background. The signature reads "Willian Henríquez" in a cursive script.

**PROF: WILLIAN HENRÍQUEZ
ASESOR**