



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

EVALUACIÓN DEL EFECTO
INMUNOESTIMULANTE DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (MUÑA)
FRENTE AL PATÓGENO *Aeromonas hydrophila*
EN *Piaractus mesopotamicus* (PACÚ)

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN SANIDAD ACUICOLA

FARIVA TRILCE VICUÑA ALVARADO

LIMA - PERÚ

2019

ASESOR DE TESIS:

Dr. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

A todos los bachilleres, titulados,
Magísteres, doctores que empiezan una tesis
Y mueren en el intento de terminarla
Si se puede no se rindan y continúen, No es fácil,
como la mayoría de cosas que valen la pena.

¡Buena suerte!

AGRADECIMIENTOS

Al programa Cienciactiva del CONCYTEC por el apoyo financiero brindado al programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH.

A Universidad Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) y al Programa de Pos-Graduación CAUNESP por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación en sus instalaciones por la asesoría y todo lo enseñado.

A la Dra Julieta Engracia de Moraes y al Dr. Flavio Ruas de Moraes con quienes tuve el placer de trabajar y aprender.

A Jefferson Yunis Aguinaga, Alexander Victor Cueva Quiroz, Karina Eliana Herencia Bueno, Livia Saccani Hervas, Bruno Luis Miani Verri, Caled Alvarez Rubio, Fernando Carlos Ramos Espinoza y a las practicantes del laboratorio de patología clínica de la UNESP por todo su apoyo sin ellos no hubiera sido posible este trabajo.

A los Drs. Miembros de mi jurado por sus correcciones, orientación y mejoramiento de este trabajo de investigación: Dr. Carlos Shiva Ramayoni, Dr. Luis Jara Salazar y a la Dra. Rosario Rojas.

A mi amigo el Dr. Néstor Falcón Pérez por su apoyo incondicional y su asesoramiento constante.

A la Dra Cielo Llerena por sus consejos, asesoramiento, tiempo y por su grandiosa amistad.

A mis padres por su apoyo incondicional, siempre tratare de ser la mejor para orgullo de ustedes

A la Dra Fernanda Nogueira Valentín y mi hermana Grecia por su compañía y apoyo durante la fase de experimentación en Brasil.

A Juan Diego Cusicanqui por su apoyo intelectual, quien gracias a su experiencia y conocimientos en patología clínica contribuyó desinteresadamente en este trabajo de investigación.

A mis amigos de la maestría de Sanidad Acuícola II: Renato Aco, Karol Quevedo, Milagros Cabrera y Francisco Grande, por sus motivaciones constantes.

A Rosario Lapa (Charito) por toda la gentileza y apoyo constante en los trámites administrativos.

A mi alma máter la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) por todos los conocimientos brindados y mi formación profesional.

Al PhD. MSc. M.V. Enrique Serrano, al Dr. Luis Llanco Albornoz y a Cesar Burga por el apoyo al Programa de Maestría.

FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis para optar el grado de Maestro en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC, Convenio de Gestión N° 230-2015-FONDECYT-DE- PROMOCIÓN 2.

TABLA DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN.....	Pág. 1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	Pág. 2
III.	MARCO TEÓRICO.....	Págs. 3 – 10
	3.1. Acuicultura	Pág. 3
	3.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	Págs. 3 y 4
	3.3. <i>Piaractus Mesopotamicus</i>	Pág. 4
	3.4. Sistema inmune de los peces	Pág. 5
	3.5. Inmunoestimulantes	Págs. 6 y 7
	3.6. Fitoterapia	Pág. 7
	3.7. Aceite esencial (A.E)	Pág. 8
	3.8. Técnicas de extracción del A.E	Págs. 8 y 9
	3.9. Muña (<i>Minthostachys mollis</i>)	Págs. 9 y 10
IV.	ANTECEDENTES.....	Págs. 11y 12
V.	JUSTIFICACION DEL ESTUDIO.....	Págs. 13 y 14
VI.	HIPOTESIS.....	Pág. 15
VII.	OBJETIVOS.....	Pág. 15
	Objetivo General	Pág. 15
	Objetivos Específicos.....	Pág. 15

VIII. METODOLOGÍA.....	Págs. 16 - 30
1. Lugar de estudio	Pág. 16
2. Diseño del estudio.....	Págs. 16 y 17
3. Población	Pág. 17
3.1.Criterios de Inclusión	Pág. 17
4. Tamaño de muestra.....	Pág. 18
5. Procedimiento y técnicas	Pág. 18 - 25
5.1.Elaboración del aceite esencial.....	Pág. 18 y 19
5.2.Evaluación del aceite	Pág. 19
5.3.Selección de los peces.....	Pág. 20
5.4.Determinación de la concentración de A.E en la dieta.....	Pág. 21
5.5.Aclimatación	Pág. 22
5.6.Preparación del alimento	Págs. 22 -23
5.7.Medición de parámetros productivos	Pág. 23
5.8.Bacteria y Dosis letal 50	Pág. 24
5.9.Validación de parámetros productivos	Pág. 25
6. Toma de muestra	Págs. 25 - 30
6.1.Hematología	Págs. 26 - 27
6.2.Burst Respiratorio	Pág. 28
6.3.Lisozimas	Págs. 28-29
6.4.Conteo de Proteínas Totales	Págs. 29
6.5.Actividad bactericida en suero.....	Pág. 30

IX.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	Pág. 31
X.	PLAN DE ANALISIS DE DATOS.....	Pág. 31
XI.	RESULTADOS	Págs. 32 - 44
	Elaboración del aceite esencial	Pág. 32
	Cromatografía de gases	Págs. 33 y 34
	Parámetros productivos.....	Págs. 35
	Hematología	Págs. 36 - 39
	Burst Respiratorio.....	Págs. 40 y 41
	Lisozimas	Pág. 42
	Conteo de Proteínas Totales.....	Pág. 43
	Actividad bactericida en suero.....	Pág. 44
XII.	DISCUSIÓN	Págs. 45 - 65
XIII.	CONCLUSIONES	Pág. 66
XIV.	RECOMENDACIONES	Pág. 67
XV.	BIBLIOGRAFÍA.....	Págs. 68 - 81

LISTA DE CUADROS

Cuadro 01	Clasificación sistemática (Cronquist 1981)	Pág. 9
Cuadro 02	Resultados de los valores hematológicos para los grupos inoculados con PBS	Pág. 38
Cuadro 03	Resultados de los valores hematológicos para los grupos inoculados con <i>A. hydrophyla</i>	Pág. 39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Procedimiento de elaboración del aceite esencial.....	Pág. 16
Gráfico 2.	Esquema del proceso de experimentación.....	Pág. 17
Gráfico 3.	Resultados de la diferencia estadística entre los grupos experimentales y la variable ganancia de talla(cm).....	Pág. 35
Gráfico 4.	Diferencia estadística entre los grupos experimentales y el porcentaje de hematocrito.....	Pág. 36
Gráfico 5.	Resultado diferencia estadística entre los grupos experimentales inoculados con <i>A. hydrophila</i> y porcentaje de Hematocrito.....	Pág. 37
Gráfico 6.	Resultado de la diferencia estadística significativa entre los grupos experimentales inoculados con PBS y el Burst Respiratorio.....	Pág. 40
Gráfico 7.	Resultado de la diferencia estadística entre los grupos experimentales inoculados con <i>A. hydrophila</i> y el Burst respiratorio.....	Pág. 41
Gráfico 8.	Resultado de la diferencia estadística significativa entre los grupos experimentales inoculados con <i>A. hydrophila</i> y la cantidad de lisozimas.....	Pág. 42
Gráfico 9.	Resultado de la diferencia estadística significativa entre los grupos experimentales inoculados con PBS y la cantidad de proteínas totales expresadas en g/dL.....	Pág. 43
Gráfico 10.	Resultado de la reacción bactericida en suero de los grupos experimentales: Control, 2%, 1% y 0.5% de A.E.	Pág. 44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Rendimiento de la materia prima de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) para la elaboración de A.E.....	Pág. 32
Tabla 2.	Resultados del análisis de composición del aceite esencial por Cromatografía de gases.....	Págs. 33 y 34
Tabla 3.	Resultado del análisis estadístico de la ganancia de peso para los grupos experimentales.....	Pág. 35

ANEXOS:

1. Distribución inicial de los grupos experimentales.
2. Constancia de clasificación botánica
3. Promedio de los pesos y tallas de los peces correspondiente a cada grupo experimental.
4. Promedio de peso y talla de los grupos al inicio del experimento.
5. Resultados de la prueba de palatabilidad para determinar la mayor concentración de A.E aceptada por los peces.
6. Resultados del análisis bromatológico del alimento sin y con A.E
7. Cantidad de alimento en gramos suministrado a los peces durante los 30 días del experimento
8. Cantidad de A.E en (mL) suministrada en el alimento y la cantidad esperada de consumo del A.E por pez y por grupo.
9. Resultados del ensayo para determinar la concentración bacteriana a utilizar en el estudio.
10. Reorganización de los grupos post desafío
11. Certificado de aprobación del comité de ética de animales de la UPC.

Glosario de Abreviaciones:

A.E: Aceite esencial

Ag: Antígeno

BR: Burst Respiratorio

CG-EM: Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas

Igs: Inmunoglobulinas

MH: Anemia microcítica hipocrómica

O.D: Densidad Óptica

PBS: Solución tampón fosfato salino o buffer fosfato salino

pH: Coeficiente que indica el grado de acidez o alcalinidad de una solución

P.V: Peso vivo

TSA: Medio de Cultivo microbiológico Trypticase Soja Agar

UFC: Unidad Formadora de Colonias

RESUMEN

La acuicultura es una actividad productiva sostenible que representa una fuente importante de ingresos económicos; su rápido crecimiento se debe principalmente a mejoras en el manejo y la creación de sistemas de cultivo que maximizan el aprovechamiento de las instalaciones. El aumento en la densidad facilita la proliferación de patógenos bacterianos, por lo que resulta necesario buscar alternativas al uso de antibióticos para controlarlos. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto inmunoestimulante del aceite esencial de la planta nativa *Minthostachys mollis* (muña) frente al patógeno de *Aeromonas hydrophila* en *Piaractus mesopotamicus* (pacu). Se trabajó con 180 juveniles de pacú, que fueron distribuidos en 4 grupos con 3 repeticiones. El aceite esencial fue adicionado y proporcionado durante 30 días. Al final de este periodo se evaluaron parámetros productivos (peso y longitud); luego se realizó el desafío inmunológico con *A. hydrophila* y después de 24 horas se evaluó la respuesta inmune innata mediante un hemograma completo, Burst Respiratorio, lisozimas y actividad bactericida en suero. La suplementación con el aceite esencial al 1% promueve una mayor y más rápida respuesta fagocítica teniendo un 4% más de Burst respiratorio al ser inoculado con el patógeno *A. hydrophila* además que promueve un 25% de mayor crecimiento del pez frente a los otros grupos experimentales.

Palabras clave: Inmunoestimulante, aceite esencial, *Minthostachys mollis*, *A. hydrophila*, muña

ABSTRACT

Aquaculture is a sustainable productive activity that represents an important source of economic income; its rapid growth is mainly due to improvements in the management and creation of cultivation systems that maximize the use of the facilities. The increase in density facilitates the proliferation of bacterial pathogens, so it is necessary to look for alternatives to the use of antibiotics to control them. The objective of the study was to evaluate the immunostimulant effect of the essential oil of the native plant *Minthostachys mollis* (muña) against the pathogen of *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus* (pacu). It was worked with 180 youth from pacu, which were distributed in 4 groups with 3 repetitions. The essential oil was added and provided for 30 days. At the end of this period, productive parameters (weight and length) were evaluated; The immune challenge was then performed with *A. hydrophila* and after 24 hours the innate immune response was evaluated by a complete blood count, respiratory burst, lysozymes and serum bactericidal activity. Supplementation with the essential oil at 1% promotes a greater and faster phagocytic response having 4% more respiratory burst when inoculated with the pathogen *A. hydrophila* in addition to promoting 25% higher growth of the fish compared to the other experimental groups.

Key Words: Immunostimulant, essential oil, *Minthostachys mollis*, *A. hydrophila*, muña

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es uno de los sistemas de producción de alimentos de más rápido crecimiento (FAO, 2016). Simboliza una fuente importante de ingresos económicos para los países en desarrollo, por lo que implica intervenciones en el proceso de cría lo que ha traído la presencia de varios patógenos que resulta necesario controlar (CONAPESCA, 2013). *Aeromonas hydrophila* es una bacteria importante, actúa como patógeno para el 100% de peces de agua dulce, se encuentra ampliamente distribuida en los recursos hídricos, infectando a animales de sangre fría, caliente y al hombre (Janda y Abbott, 2010).

Para el control de la aeromoniasis se está empleando inadecuadamente los antibióticos, ya sea por utilizar un producto no indicado para acuicultura o por la sobre medicación (Alderman y Hastings, 1998), práctica que está generando la existencia de patógenos con una elevada resistencia antibiótica (Cabello, 2003). Por lo que resulta necesario buscar alternativas sostenibles y responsables con el medio ambiente.

Los aceites esenciales (A.E) son fracciones líquidas volátiles, contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica (Alzamora *et al.*, 200). Estudios recientes demuestran la actividad antibacteriana e inmunoestimulante de diversos A.E de plantas nativas (Carhuapoma, 2002). *Minthostachys mollis* “muña”, es una de las más importantes plantas aromáticas nativas peruanas que se ha estudiado, cuyas propiedades medicinales han sido evaluadas (Fuertes y Murguía, 2001). El objetivo de este estudio fue determinar la actividad inmunoestimulante del A.E de *M. mollis* “muña” frente al patógeno *A. hydrophila* en *Piaractus mesopotamicus* (pacú).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El empleo de antibióticos tiene como objetivo controlar infecciones causadas por bacterias que aparecen debido a distintos factores como el hacinamiento, las manipulaciones y carencias dietéticas que son propias de una crianza intensiva (Angulo, 2000). Estudios recientes han mostrado que el uso de antibióticos no es imprescindible, tanto en ganadería como en acuicultura se pueden reemplazar con otras alternativas (Cabello, 2004).

La acuicultura como actividad productiva, está utilizando antibióticos en exceso, práctica que genera alteraciones en la microbiota ambiental produciendo cambios drásticos que favorecen la existencia y aumento de bacterias las cuales desarrollan resistencia a una serie de antibióticos (Bushman, 2001). Existen evidencias epidemiológicas y moleculares que demuestran la existencia de bacterias “multidrogo resistentes” (Rhodes, *et al.*, 2000). En nuestro país, las normas del Código acuático, 2016 mediante campañas de concientización tratan de restringir el uso de los antibióticos en especies acuáticas para consumo humano.

El aprovechamiento de las bondades terapéuticas de las plantas representa una alternativa para el control y prevención de enfermedades (Teuber, 2001). El mercado nacional y extranjero exige productos de calidad, cuya producción no ocasione un impacto negativo en el medio ambiente (Coquet *et al.*, 2000) Frente a esta situación la fitoterapia y la evaluación del efecto inmunoestimulante de la “muña” (*M. mollis*) representa un primer paso en la evaluación de alternativas naturales para controlar enfermedades y mejorar el sistema inmune de los peces.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Acuicultura:

La acuicultura es uno de los sistemas de producción de alimentos de más rápido crecimiento, actualmente representa el 50 % del pescado que está destinado al consumo humano en el mundo (FAO, 2016). Como una actividad productiva representa una importante fuente de ingresos económicos para los países en desarrollo (CONAPESCA, 2013). El aumento de las densidades producto de la crianza intensiva ocasiona en los organismos acuáticos situaciones de estrés que desencadenan la patogenicidad de bacterias propias del organismo (Cremonesini *et al.*, 2008).

3.2. *Aeromonas hydrophila*

Son bacilos Gram (-) oportunistas, conforman parte de la microbiota intestinal normal de los peces y distintos organismos acuáticos (Cipriano, 2000). Están ampliamente distribuidas en los recursos hídricos, infectando a animales de sangre fría, caliente y al hombre (Janda y Abbott, 2010). Es un patógeno de importancia en acuicultura con morbilidad de 80% y mortalidad del 51.2% (Rodríguez y Hernández, 1998). En un estudio realizado en Colombia se determinó la prevalencia del patógeno en trucha y rampuche del 100%, seguida por dorada de 80%, bagre de 73,33%, bocachico y sierra de 60% y mojarra 50% (Suárez y Herrera 2011).

La presencia de la bacteria no necesariamente indica enfermedad, su patogenicidad está asociada a cambios en el ambiente acuático, factores de estrés como aumento de densidad, estado fisiológico, condiciones de inmunosupresión (Chopra y Houston, 1999).

Las infecciones en peces por *A. hydrophila* se clasifican en dos: las que causan lesiones internas afectando los riñones y las que provocan lesiones externas que producen necrosis en aletas causando la pérdida total de la estructura culminando en la muerte del pez (Cremonesini y Thomson, 2008). Existen reportes que demuestran la resistencia que posee a las penicilinas: amoxicilina y cefalotina mayor a 80% y furoxona de 57,8% por lo que el tratamiento con antibiótico es limitado (Janda, y Abbott 2000) (Muñoz, *et al.*, 2012).

3.3.Piaractus mesopotamicus.

Conocido en Brasil como pacú, pez cuyas características anatómicas y calidad de carne son comparables al *Piaractus brachipomus*, conocido en Perú como paco, cachama blanca y en algunos lugares de la selva como gamitana (SINCHI – INADE, 1999). Es un pez teleósteo originario de los ríos de Paraguay y Paraná, tiene importancia en el mercado, el filete de pacú es considerado de alta calidad, es de carne blanca y buen sabor, debido a sus infiltraciones grasas (Tavares *et al.*, 1999). Pueden llegar a medir hasta 80 cm y tener un peso de 18 kilogramos (Froese y Pauly, 2005). Tiene comportamiento alimentario diurno, siendo la ración óptima para esta especie 3% del peso vivo que debe ser distribuida en tres momentos del día (Sobenes *et al.*, 2012).

Es utilizado como modelo experimental, se adapta fácilmente al manejo, sus requerimientos nutricionales son básicos, resiste pH de 6.8 hasta 7.5, es omnívoro y tienen una curva de crecimiento rápida, son muy resistentes al estrés y tienen un apetito arrasador (Belo *et al.*, 2005).

3.4.Sistema inmune en los peces:

En los peces teleósteos el sistema inmune es similar al de los vertebrados con algunas diferencias significativas, por ejemplo, los órganos linfo hematopoyéticos son: el timo, riñón anterior, bazo y el tejido inmune mucosal, no poseen ganglios linfáticos, ni medula ósea (Clauss *et al.*, 2008).

La respuesta inmunológica de los peces se divide en dos clases sistema inmune innato y el adquirido ambos compuestos por una parte humoral y celular cuya eficacia puede estar relacionada a la edad de los peces y o a distintos factores (Nielsen y Gassent 2006).

Las células involucradas en la respuesta inmune innata son los leucocitos, los mismos que se encuentran en sangre, su cantidad depende de la especie y las condiciones fisiológicas, también se pueden encontrar en tejidos formando agrupaciones conocidas como centros melanomacrófagos (Gorbach, 2001). El número normal de leucocitos en *P. mesopotamicus* es $2.77 \pm 0.97 \times 10^6/\mu\text{L}$ (Martins *et al.*, 2001).

Durante el control y manejo sanitario de los peces, los parámetros hematológicos cumplen una función importante. Son una herramienta que permite evaluar de manera confiable la condición sanitaria, la presencia de patógenos, interacción con nutrientes y agentes contaminantes que puedan estar inmunosuprimiendo al pez, causando cambios en los parámetros sanguíneos (Monroy, G. 2005).

3.5. Inmunoestimulantes

Son todos los compuestos o aditivos que tiene el potencial de promover la respuesta inmune optimizando la capacidad de defensa del individuo, activando mecanismos para contrarrestar algún patógeno (Anderson, 1992). Los parámetros más importantes que sirven de indicador para determinar la capacidad inmunoestimulante de un compuesto son: respuesta fagocítica (Burst respiratorio), cantidad de leucocitos en sangre, inmunoglobulinas (Igs), Proteínas totales, actividad lisozímica, cantidad de linfocitos circulantes, conteo de macrófagos, sistema de complemento, así como la evaluación de los parámetros productivos que su mejora indicarían buena condición física e inmunológica (Tort, *et al.*, 2005).

El Burst respiratorio (BR), conocido también como estallido respiratorio es un indicador de inmunidad innata, íntimamente relacionado con la fagocitosis proceso en el que ocurre un alto consumo de oxígeno. En los peces teleósteos este proceso es parecido al de los mamíferos describiéndose cinco etapas: reconocimiento, unión, incorporación, destrucción y digestión del (Ag) antígeno (Nielsen y Gassent 2006). Las células encargadas son los neutrófilos, los macrófagos y los linfocitos quienes realizan la presentación de antígenos y la secreción de citoquinas. Durante la fagocitosis ocurren varios mecanismos de destrucción; el B.R es el más importante, comprende la formación del anión superóxido, como radicales superóxido y peróxido de hidrógeno especies reactivas de oxígeno que se estimula mediante la opsonización; por ello, las lectinas, la proteína C reactiva, el complemento y los anticuerpos facilitan la fagocitosis (Travis J. 2009).

La lisozima, enzima lítica que actúa sobre el peptidoglicano de las paredes celulares de bacterias Gram (+) y como opsonina en bacterias Gram (-), catalizan la hidrólisis, haciendo que algunas bacterias no lleguen a ser patogénicas (Vocadlo *et al.*, 2001).

Las proteínas totales son macromoléculas esenciales para la vida, se clasifican por su función siendo estructurales y de transporte, pueden ser enzimas, hormonas, anticuerpos, factores de coagulación, etc (Davis, 2004).

En el sistema inmune actúan inactivando compuestos tóxicos y en la respuesta frente a antígenos. Evaluar proteínas totales sirve para monitorear los cambios que se presentan en el individuo en condiciones patológicas: pérdidas de la función renal, desnutrición infecciones prolongadas (Cnaani *et al.*, 2004). La determinación de la actividad bactericida sérica involucra la exposición de una suspensión de organismos viables a una concentración adecuada de anticuerpos y complemento (Wang *et al.*, 2016).

3.6.Fitoterapia:

Con origen místico-religioso es conocida como la primera medicina del hombre (Martinez, 2003). Los fitofármacos y sus principios activos fueron los medicamentos que utilizaron los antepasados para recuperar la salud y para prevenir las enfermedades (Morales, 2004). El uso de plantas con estos fines, está siendo cada vez más aceptada en todos los estratos sociales, a pesar de que, fue relegada a un segundo plano durante mucho tiempo (Farnsworth, 1989). En la actualidad, la información científica sobre la efectividad de las plantas frente a algunos patógenos es cada vez más abundante y la lista de plantas investigadas es cada vez mayor (Carhuapoma, 2002).

Se ha probado que las plantas además de causar la inhibición de bacterias tanto Gram (+) y (-), son antioxidantes y también interrumpen el desarrollo de levaduras (Augusto, 1975).

3.7. Aceite esencial (A.E)

Los aceites esenciales son una mezcla de compuestos aromáticos volátiles de base lipídica que pueden ser obtenidas de las plantas, se encuentran en raíces tallos, hojas, flores y frutos, los métodos de obtención son físicos o químicos (Martínez, 2003). La técnica más conocida es la de arrastre de vapor, el producto final es volátil (Cerpa, 2007). Se ha demostrado que algunas plantas tienen efecto bactericida y/o bacteriostático, sumado a eso se tiene evidencia de que algunas actúan como antifúngicos inhibiendo la germinación de esporas, inactivando enzimas (Carhuapoma *et al.*, 2009). Las plantas por excelencia para la producción de aceites esenciales son las que pertenecen a las familias Labiadas, Umbelíferas Compuestas, Mirtáceas, Laureáceas, Rutáceas y Pináceas debido a que alcanzan un mayor rendimiento (Ávila *et al.*, 2001).

3.8. Técnicas de extracción del A.E

Las técnicas de extracción de aceite esencial (A.E) más comunes son: destilación por arrastre de vapor, extracción con disolventes, por fluidos supercríticos, por microondas y por ultrasonido, cada uno con ventajas y desventajas (Peredo *et al.*, 2009). El método de extracción por fluidos es más rápido, consumen menos energía, tienen mayor rendimiento, sus desventajas son: requiere para su elaboración altos niveles de seguridad, equipo automatizado y es de mayor costo (Yamini *et al.*, 2008 y Bousbia *et al.*, 2009). El método de extracción con disolventes volátiles no es recomendable para el uso en la industria alimenticia ni la de perfumería, los disolventes son altamente tóxicos al ser consumidos o al tener contacto con la piel, además se pierden grasas y ceras con propiedades terapéuticas su elaboración resulta muy costosa por el precio de los disolventes los mismos con riesgo inminente de explosión (Orduño, 2006 y Thongson *et al.*, 2004).

El método de arrastre de vapor es uno de los más sencillos, de bajo costo, además no integra en su elaboración sustancias que pueden resultar tóxicas y no aptas para el consumo (Cerpa, 2007 y Banchio *et al.*, 2005).

3.9. Muña (*Minthostachys mollis*)

Planta nativa hemicriptófita, crece entre los 2500 – 3500 m.s.n.m., se encuentra en abundancia en las montañas de la sierra peruana, necesita tener cercanía a acequias y manantiales; sin embargo, no tiene una demanda alta de agua (Cano, 2007). Es una planta arbustiva, leñosa, posee un aroma característico, tiene flores hermafroditas pequeñas que pueden ser moradas o blancas dependiendo de la especie (García, 2007).

Reino: Vegetal

Sub reino: *Embryophyta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Methachlamydeae*

Orden: *Tubiflorae*

Familia: *lamiaceae* (labiadas)

Género: *Minthostachys*

Especie: *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb

Cuadro 1. Clasificación sistemática (Cronquist 1981)

Las bondades que se le adjudican a la muña son efectos antiespasmódicos, disminuye las flatulencias, es un buen antiemético; antiasmático, funciona como expectorante, existen reportes que le atribuyen características de antiséptico, analgésico, antiinflamatorio, y otras bondades más que aún no han sido probadas (Contreras, 1983). Existen reportes en el que se usa la muña como preservante de alimentos y repelente de mosquitos, además se utiliza como fumigante orgánico, se ha demostrado sus efectos contra el gorgojo, es así como se le atribuyen las propiedades de ser un antiparasitario que tiene acción contra los ectoparásitos y endoparásitos, no solo de los alimentos sino también de algunos animales domésticos (Alvarez., *et al* 2000).

IV. ANTECEDENTES:

En la ciudad de la Habana, Cuba, se evaluó *in vitro* las concentraciones inhibitorias mínimas del aceite esencial de *Eucalyptus sp*, *Schinus terebintifolius* y *Cassia alata* frente a tres bacterianas del género *Aeromona*: *A. salmonicida típica*, *A. salmonicida atípica* y *A. hydrophila*. Se empleó el método de diluciones seriadas dobles en medio líquido con una concentración bacteriana de 10^8 UFC/mL. Los resultados demostraron que *A. salmonicida atípica* tuvo la mayor sensibilidad al actuar con los tres extractos con valores de CIM entre 0.19 mg/mL y 0.32 mg/mL, además de que el extracto de *Eucalyptus sp* mostró actividad bactericida sobre el 100 % de las cepas probadas (Núñez *et al.*, 2001).

En Lima, Perú, se desarrolló un trabajo en colaboración de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – UNMSM y la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID). En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *M. mollis* “ruyaq muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*, demostrando tener una importante actividad antibacteriana (Carhuapoma *et al.*, 2009).

En Tarma, en el departamento de Junín, se realizó un estudio en el que se probó *in vitro* la actividad del aceite esencial de las hojas de *M. mollis* (muña) frente a *C. albicans*, *M. canis* y *T. mentagrophytes*, demostrando efectos antimicóticos favorables (Cano, 2007).

En este mismo lugar, se desarrolló otro estudio en el que se comparó las propiedades antimicóticas *in vitro* del A.E de muña frente al efecto del fluconazol para el tratamiento de *Candida albicans*, concluyendo que el aceite esencial de la planta es mucho mejor para el tratamiento *Candida albicans* (Alcalá *et al.*, 2011).

En Sonora, México, se evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) frente a los patógenos *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Vibrio mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus*, aisladas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) demostrándose un marcado efecto inhibitorio y un porcentaje de supervivencia significativo (*Litopenaeus vannamei*) (Sobenes *et al.*, 2012).

En Machala, Ecuador se evaluó el efecto del extracto de dos plantas medicinales: Hierba luisa (*Aloysia triphilla*) y Orégano (*Origanum vulgare*) sobre la presencia de *Vibrio sp.* en agua de estanque de cultivo de camarones peneidos, para este experimento se utilizó el extracto de las plantas en tres concentraciones distintas (6, 8, 10 mL/L) en 21 peceras con una capacidad de 2 litros, se trabajó con tres repeticiones y se dejó reaccionar a diferentes tiempos (12, 24, 48 h). El análisis estadístico indicó que sí existe efecto significativo entre las diferentes dosis de extractos de plantas y el tiempo de exposición. Se puede concluir con el estudio que los extractos de las plantas medicinales se pueden utilizar en el tratamiento de vibriosis, previo un estudio de interacción de estos con organismos acuáticos de interés comercial (Sorroza,2018).

V. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Dentro de todas las actividades productivas, la acuicultura representa una importante fuente de ingresos económicos para los países en desarrollo, es de rápido crecimiento, por lo que son cada vez más los centros de crianza intensiva, están aumentando la densidad de siembra generando condiciones de estrés, que están ocasionando inmunosupresión en los peces.

Aeromonas hydrophila es una de las principales bacterias en acuicultura, es parte normal de la microbiota intestinal de los peces, causa enfermedad a todos los organismos acuáticos. La patogenicidad está relacionada a condiciones de inmunosupresión por lo que probar inmunoestimulantes resulta importante.

El pacú (*P. mesopotamicus*) es un pez de importante valor comercial, el filete es valorado en el mercado, sus características anatómicas son comparables con peces de la amazonia peruana que actualmente no tienen valores inmunológicos referenciales a diferencia del pacú cuyos valores hematológicos normales ya están descritos permitiendo detectar alteraciones en futuros estudios, además es un buen modelo experimental, es resistente al estrés, es utilizado para probar raciones alimenticias ya que tiene un apetito voraz.

En la actualidad la tendencia al incremento de patógenos con resistencia antibiótica crece y son cada vez más frecuentes los reportes de plásmidos aislados de bacterias que son resistentes a un sin número de antibióticos, ocasionando altas mortalidades terminando con buena parte de la producción. Generando un problema serio en salud pública ya que expone al ser humano a nuevos fármacos genera que las bacterias adquieran resistencia a fármacos cada vez más potentes.

En la acuicultura el cuidado del recurso hídrico debe ser una prioridad ya que es un medio que favorece la diseminación de patógenos, compuestos tóxicos y antibióticos contaminando no solo centros piscícolas grandes, sino también a pequeños productores, regadíos de sembríos y abastecimiento de agua para la ganadería o para el propio ser humano.

Probar alternativas naturales frente a los patógenos que actualmente perjudican la acuicultura resulta necesario, además que el mercado (nacional y extranjero) exige un producto orgánico, libre de antibióticos, cuyo proceso de manufactura no contamine el medio ambiente.

Promover la fitoterapia es una alternativa atractiva al uso de antibióticos a su vez aprovechando nuestra biodiversidad promoviendo el consumo y fomentando la utilización de nuestras plantas nativas, no solo como aditivos alimenticios, sino como inmunoestimulantes que ayuden a la prevención y tratamiento de algunas enfermedades.

Este estudio tiene como finalidad evaluar las propiedades inmunoestimulantes del aceite esencial de *M. mollis* frente a *A. hydrophila* ofreciendo una alternativa al uso de antibióticos.

VI. HIPOTESIS

El aceite esencial de la planta nativa *M. mollis* (muña) frente al patógeno de *A. hydrophila* tiene efecto inmunoestimulante promoviendo el crecimiento y la ganancia de peso en *P. mesopotamicus* (pacú).

VII.OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto inmunoestimulante del aceite esencial de la planta nativa *M. mollis* (muña) frente al patógeno de *A. hydrophila* en *P. mesopotamicus*.

Objetivos específicos

- Determinar la composición del aceite esencial de *M. mollis* (muña).
- Determinar la cantidad de A.E a utilizar para cada grupo experimental.
- Evaluar los efectos del A.E de (muña) sobre los parámetros productivos del *P. mesopotamicus*.
- Evaluar valores hematológicos y respuesta inmune innata de los peces desafiados con el patógeno *A. hyprophila*.

VIII. METODOLOGÍA

1. Lugar de Estudio:

Laboratorio de Acuicultura, bioterio de experimentación en Ictiopatología, de la UNESP - Jaboticabal, Brasil donde se desarrolló toda la parte experimental y laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia UPCH donde se prepararon algunos materiales, se realizó la lectura de los frotis sanguíneos y se analizaron los resultados estadísticos.

2. Diseño del estudio:

Estudio experimental, aleatorizado.

ACEITE ESENCIAL (A.E)

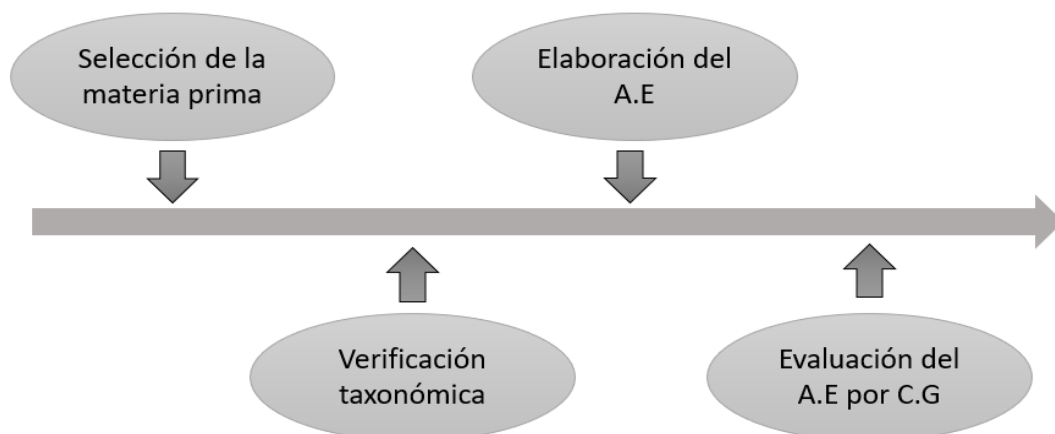


Gráfico 1. Procedimiento de elaboración del aceite esencial

Evaluación *in vivo*

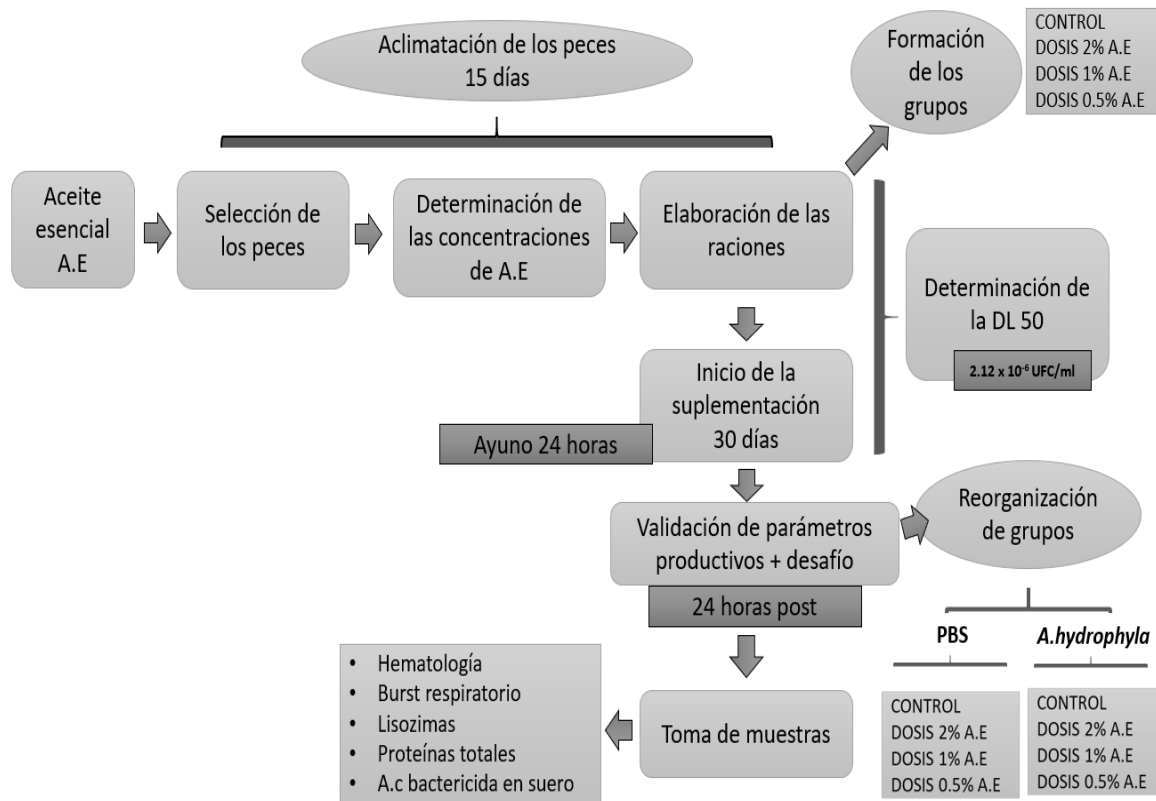


Gráfico 2. Esquema del proceso de experimentación

3. Población

La población objetivo fueron 180 peces juveniles de *P. mesopotamicus* (pacú) provenientes del bioterio del centro de experimentación CAUNESP con 2 meses de edad, de longitud: 15 +/- 5 cm y un peso de 125 gr +/- 25 gr.

3.1 Criterios de Inclusión:

Peces de *P. mesopotamicus* (pacús) pertenecientes al bioterio de experimentación del centro de experimentación CAUNESP sin lesiones, ni signos clínicos, con dos meses de edad con una longitud: 15 +/- 5 cm y un peso de 125 gr. +/- 25 gr.

4. Tamaño de muestra:

Se determinó el tamaño de muestra con el programa Win Epi (Ignacio de Blas. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 2006). Se utilizó la fórmula diferencia de proporciones con un nivel de confianza de 95%, una potencia de 85 y una proporción entre los grupos de 50 y 5 (Dos Santos *et al*, 2017). El tamaño de muestra ajustado para cada caja fue de 15. En este estudio se realizaron 3 repeticiones las que tuvieron las mismas características y fueron realizadas en simultaneo.

El N total fue de 180 peces distribuidos en 12 cajas cada una conteniendo 15 peces teniendo un total de 45 peces por grupo. (Anexo 1)

5. Procedimientos y técnicas:

5.1. Elaboración del aceite esencial:

Todo este procedimiento fue supervisado por el Ingeniero agrónomo Juan Tolentino Rodríguez el mismo que realizó la clasificación botánica de la planta (Anexo2).

El aceite esencial de muña fue elaborado el 20 de febrero del 2018 en las instalaciones de una empresa en Huancayo. Se utilizó el método directo de arrastre de vapor, técnica que permite separar sustancias orgánicas insolubles en agua, ligeramente volátiles (Cerpa, 2007). Se compró un total de 120 kilos de muña (*M. mollis*) del Mercado Modelo de la ciudad de Huancayo.

Se utilizaron las hojas y tallos frescos de la planta las que fueron cortadas y colocadas en la destiladora por arrastre de vapor de agua.

Fueron puestas a hervor con 14 litros de agua durante 5 horas a una temperatura de ebullición de 110°C. Durante este proceso el vapor fue transportado poco a poco por una tubería con un mecanismo de enfriamiento que permitió la condensación, luego fue depositado en una perilla de decantación en la que por peso molecular se precipitó el aceite de la extracción acuosa. Se obtuvieron 250 mL de aceite esencial el mismo que fue colocado en un frasco oscuro y almacenado a 4°C hasta su utilización.

5.2. Evaluación del aceite:

Se determinó la composición del aceite esencial obtenido utilizando el método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), el cual fue realizado por la Unidad de Investigación en productos Naturales del laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se utilizó el equipo: Cromatografía de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C.

Esta técnica determina los compuestos químicos del aceite esencial, el acoplamiento de un espectrómetro de masas permite identificar y cuantificar de manera fiable los componentes obteniendo un resultado no solo de composición sino también de proporciones (Santos y Galcerán 2002).

5.3. Selección de los peces:

De las pozas del bioterio de experimentación de CAUNESP (Centro de Acuicultura de la Universidad Estadual de Sao Paulo) se seleccionaron 180 pacús (*P. mesopotamicus*), con las siguientes características: 2 meses de edad, longitud: 15 +/- 5 cm y peso de 125 gr +/- 25 gr. Se excluyó del estudio a los peces que no cumplían con las particularidades mencionadas y los que tenían lesiones.

El procedimiento de selección consistió en retirar de diez en diez los peces con una red, para luego colocarlos en un balde de 0.1 g/L de benzocaína para ser pesados y medidos, por último, los peces que cumplían con las características mencionadas fueron colocados al azar en las cajas de experimentación por cada grupo CONTROL, DOSIS 2%, DOSIS 1% y DOSIS 0.5% de A.E

El promedio aproximado del peso para los grupos al inicio del experimento fue de 131.02 a 131.19 (gr) y el promedio de talla fue de 15.03 a 15.06 (cm).

El promedio de los pesos y tallas por caja de los grupos se muestran a continuación (Anexo 3) y (Anexo 4).

5.4. Determinación de la concentración de aceite esencial en la dieta:

Se realizó una revisión bibliográfica de trabajos similares en los que se utilizaron aceites esenciales o extruidos naturales como inmunoestimulantes en peces, tomando especial importancia en los que se trabajó con *P. mesopotamicus*. Se observó que la mayor dosis más usada fue de 5% (Heredia *et al.*, 2019), (Limma *et al.*, 2016) y (Wicki G. *et al.*, 2007).

Para la prueba de palatabilidad, se utilizó una caja experimental de 150 litros con 10 peces. Las características de este grupo fueron: peces *P. mesopotamicus* juveniles de 2 meses con un peso promedio de 117.8 gramos. Se preparó la ración para un día, considerando el peso total de la caja para los 10 peces de 1 178 gr. La cantidad total de alimento a una ración del 3% del peso vivo (PV) fue de 35, 34 gr. la misma que fue redondeada a 36 gr y suplementada con el 5% de aceite esencial (1.8 ml) el cual se incorporó al alimento con un rociador mezclándose por 10 segundos. Se realizó una observación rápida de los pelets para asegurar que todos estén embebidos con el aceite, utilizándose la técnica en la que se incorporan los antibióticos al alimento en acuicultura (Manual for International Training 1991).

Con la prueba de palatabilidad que consiste en evaluar la aceptación del alimento mediante la cantidad de consumo del mismo y midiendo los parámetros de calidad de agua se determinó las tres dosis a utilizar en el estudio.

Se determinó la dosis 2% como la mayor concentración de aceite esencial en el alimento aceptada por los peces y la que no modifica los parámetros de calidad de agua (Anexo 5).

5.5. Aclimatación:

Una vez distribuidos los peces en las cajas de experimentación y luego del periodo post anestesia de 24 horas (CONICYT, 2009), se realizó un análisis observacional revisando a los peces, que no tengan lesiones.

Durante 15 días se acostumbró a los peces a una alimentación de 3% del peso vivo (PV), distribuido en tres raciones al día en los horarios siguientes: 8:00, 12:00 y a las 16:00. La limpieza de las cajas se realizó inter diario mediante sifoneo (Sobenes *et al.*, 2012).

5.6. Preparación del alimento:

Se utilizó el alimento comercial de nombre NUTRIPISCIS constituido principalmente con harina de pescado y soya. La suplementación con el aceite tuvo una duración de 30 días.

El alimento fue preparado agregando el porcentaje de A.E correspondiente a cada grupo cada 7 días y fue almacenado a 4°C.

Se utilizó la técnica de medicación oral en alimento según el Manual for International Training 1991. Este método consiste en adicionar el medicamento en los pelets utilizando un mezclador, el tiempo de mezcla depende de la proporción de medicamento y alimento, luego se toma tres muestras de un puñado de la mezcla de distintos lados y mediante observación se asegurarse la homogeneidad.

El porcentaje de A.E para cada grupo, fue agregado con un rociador y mezclado por 10 segundos, luego fue realizada una observación rápida de los pelets para asegurarse que todos estuviesen embebidos con el aceite. Cada recipiente de alimento fue rotulado y almacenado a 4°C.

El laboratorio de nutrición de la UNESP, realizó el servicio del análisis bromatológico del alimento comercial solo y del adicionando con 2% y 1% de aceite esencial utilizando el procedimiento estándar (AOAC, 2000). No fue realizado el análisis del alimento con el 0.5% debido a que los resultados bromatológicos del alimento con 1% de A.E fueron similares al de la ración sin A.E. Los resultados se muestran de manera detallada en el Anexo 6.

La cantidad total de alimento en gramos suministrado a los peces durante los 30 días fue de 21 241.85 gr. en total para todos los grupos, los resultados se detallan en el Anexo 7 y la cantidad de A.E en (mL) suministrada en el alimento y la cantidad esperada de consumo del A.E total fue de 185,91 mL distribuidos en: 106.25, 53.09 y 26.57 mL para cada grupo experimental (Anexo 8).

5.7.Medición de parámetros productivos:

Fue realizado un día antes de culminar los 15 días de aclimatación. Para la medición de parámetros productivos se anestesió a los peces con Benzocaína sódica (0.1gr / L) durante 5 minutos (Comisión Europea, 1995). Cuando los peces alcanzaron la sedación (nado lento y pérdida de reacción), se les pesó (gr) y midió en cm (boca - pedúnculo caudal), luego fueron retornados a sus cajas.

Con los datos de peso y tamaño se obtuvo el promedio de peso por grupo de tal manera que las medias de nuestros grupos: (Control, Dosis 2%, Dosis 1% y dosis 0,5%) fueron similares. Finalmente, los peces pasaron por un periodo de 24 horas de ayuno, con esto se cumplieron los 15 días de aclimatación.

5.8. Bacteria y Dosis letal 50:

Se utilizó la cepa de *A. hydrophila* perteneciente al cepario del laboratorio de ictiopatología de la UNESP (CAUNES) la misma que fue obtenida de *P. mesopotamicus* con lesiones compatibles con aeromoniasis, esta cepa fue previamente aislada, identificada mediante el test bioquímico de oxidasa positiva y Gram negativo (Bactray III, Laborclinic, 98 Pinhais, Brazil), se realizó la identificación molecular de la bacteria utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard con el gen del ARN ribosomal 16S (Promega, Madison, UE). Se determinó la dosis letal 50 (LD50) siguiendo las recomendaciones (Oliveira *et al.*, 2011) para lo cual fue reactivada la cepa sumergiéndola en solución nutritiva e incubándola por 24 horas a 37 °C, luego fue sembrada por agotamiento en agar TSA incubándose por 24 horas a 37°C. Las colonias fueron colocadas en una solución de PBS estéril, para luego colocar 10 µL de la bacteria y por absorbancia utilizando el Espectrofotómetro SP - 22, fue determinada la densidad óptica (O.D). Se realizaron cuatro soluciones con diferentes (O.D): 0.75, 0.33, 0.105 y 0.099 estas fueron colocadas en una jeringa de tuberculina con 0.5 mL de PBS las que luego fueron inyectadas a todos los peces del estudio en cavidad celómica. Se determinó la concentración de 2.12×10^{-6} UFC/mL para el desafío (Anexo 9).

5.9. Validación de parámetros productivos y desafío:

Luego de los 30 días de alimentación al grupo control y los grupos experimentales, se dio un periodo de 24 horas de ayuno, después todos los peces fueron anestesiados uno por uno con Benzocaína sódica (0.1g/L de agua) por 5 minutos (Comisión Europea, 1995). Los peces fueron pesados y medidos uno por uno para recolectar los datos de peso y talla. A la par se realizó el desafío con la inoculación del patógeno a una concentración de 2.12×10^{-6} UFC/mL y de PBS en jeringas de tuberculina 0.5 mL por pez en cavidad celómica.

Por último, se hizo la redistribución de los peces en las nuevas cajas, para este procedimiento se preparó 8 cajas nuevas que fueron desinfectadas y rotuladas de la siguiente forma: Control (PBS y Bacteria), para Dosis 2% (PBS y Bacteria), Dosis 1% (PBS y Bateria) y Dosis 0.5% (PBS y Bacteria) tal como se detalla en el Anexo 10.

6. Toma de muestras:

Fue realizada a las 24 horas post desafío, tiempo en el que se da el pico de respuesta inmune innata en peces (Biller-Takahashi *et al.*, 2013) y la cantidad de lisozimas llegan al punto más alto de su producción (Yunis *et al.*, 2006).

Se hizo previa sedación de los peces con solución de benzocaína (Sigma-Aldrich Laboratory, Steinheim, Germany) (1:20,000) diluida en alcohol de 98° (0.1gr /L) se realizó la toma de muestra de sangre de todos los 180 peces pertenecientes al estudio, para esta fase se tomó una muestra de 2 mL de la vena caudal.

6.1. Hematología:

Se utilizaron 2mL de sangre de la vena caudal obtenidas en tubos heparinizados (10%).

El conteo de eritrocitos fue realizado en la cámara de Neubauer con una dilución de 1/200 de solución salina, se visualizaron en el microscopio y se contaron 5 cuadrantes utilizando el aumento de 100x, este procedimiento se realizó dos veces, para precisar el conteo (Collier, 1944).

El cálculo final para el numero de eritrocitos se determinó con la siguiente formula:

$$N = n^{\circ} \text{ de eritrocitos contados} \times 200 \times 10 \times 5$$

200 = Dilución

10 = Altura de la lámina y la cámara de Neubauer

5 = cuadrantes contados

El número de eritrocitos es expresado con ($\times 10^4$).

El hematocrito se determinó utilizando la técnica de capilaridad validada por Goldenfarb *et al.*, 1971 se homogenizó la sangre, se cargó los capilares y se llevó a centrifugar 12.000 rpm durante 5 minutos, luego utilizando la cartilla de referencia de los valores del hematocrito que van de 0 a 100% fue determinado el porcentaje de hematocrito.

El Volumen Corpuscular Medio (VCM): representa el volumen de los eritrocitos en sangre.

$$VCM = \frac{\text{hematocrito} \times 10}{\text{número de eritrocitos} \times (10^6 \mu L^{-1})} = fL$$

Hemoglobina Corpuscular Media (HCM): cantidad de hemoglobina existente en cada eritrocito.

$$HCM = \frac{\text{hemoglobina} \times 10}{\text{numero de eritrocitos}} = pg$$

Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM): relación entre la concentración del pigmento hemático en los eritrocitos.

$$CHCM = \frac{\text{concentracion de Hemoglobina} \times 100}{\text{hematocrito}} = g dL^{-1}$$

Para el conteo de Leucocitos primero se realizó un recuento en la cámara de Neubauer con una dilución de 1/200 de solución salina, fueron contados 5 cuadrantes utilizando el aumento de 100x, luego se realizó un frotis sanguíneo en el que se contaron también los trombocitos (Silva *et al.* 2015). Se preparó dos frotis sanguíneos utilizando una gota de sangre con anticoagulante se usó la tinción May-Grünwal-Giemsa-Wright, luego se observó al microscopio 2.000 células en un aumento de (100x) entre eritrocitos, leucocitos y trombocito dentro de este número se contabilizaron los leucocitos y trombocitos o plaquetas.

El número final de Leucocitos fue calculado con regla de tres simple considerandos el número total de células contadas en la cámara de Neubauer y el número total de leucocitos contados en frotis (Faria, 2016).

6.2. Burst Respiratorio:

Se usó una muestra de 2 mL de sangre de la vena caudal de 15 peces pertenecientes a cada grupo experimental.

Se utilizó la técnica semi-cuantitativa Nitroazul de Tetrazolium (NBT) de acuerdo con Castro *et al.* (2014). Las características del NBT fueron: concentración de 2×10^{-3} con *bufferfosfato*, pH de 7,2 y los neutrófilos ajustados a 5×10^6 mL (Clark, 1999), concentración que fue protegida de la luz por su fotosensibilidad.

Se incubó por 5 minutos a 37 °C el suero obtenido de la sangre de los peces y 100 μ L de NBT. El conteo se realizó en la cámara de Neubauer, se examinaron 100 neutrófilos por microscopía óptica (100X), considerando activados a los que presentaron un precipitado azul negrozco en su citoplasma. El rango considerado de referencia fue de 86 - 100% (Peñaloza, 2010).

6.3. Lisozima:

Se utilizó una muestra de 100 μ L de sangre heparinizada, de 15 peces pertenecientes a cada grupo experimental. Se centrifugó a (600 rpm por 10 minutos) la muestra fue conservada a -20 ° C. Se midió el nivel de lisozima utilizando el Ensayo Turbidimétrico y una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* 0.25 mg/mL (Takemura y Takano, 1995). Se usó Lisozima de clara de huevo (1 mg/lisozima mL⁻¹) como estándar, que fue incubada a 25 ° C por 12 horas, se prepararon diluciones para la curva estándar de lisozimas con una alícuota de solución estándar de 0,5g/mL congelada a -20 °C con agua estéril.

Para el ensayo se utilizó 950 μ L de sustrato tamponado más la suspensión de *M. lysodeikticus* 0.5g/mL a un pH de 6.2 solución que fue medida cada 30 segundos por 4 minutos.

La lectura fue realizada con una cubeta de cuarzo a $O. D_{140nm}$ con el espectrofotómetro Bioespectro SP-22 El resultado fue expresado en unidades de concentración g/mL de lisozima.

6.4. Conteo de Proteínas Totales:

Se utilizó el suero de las muestras de sangre pertenecientes a 90 peces, 15 de cada grupo experimental.

Las proteínas plasmáticas fueron determinadas por el método colorimétrico de Biuret según Sahoo *et al.*, (2005) En una cubeta conteniente con 3 centímetros cúbicos de albumina, se agregó 2 centímetros cúbicos de hidróxido de sodio al 20%, luego se agregó 5 gotas de solución de sulfato cúprico diluido al 1% en esta solución se colocó 100 μ L de suero de las muestras. Fue evaluado el cambio de coloración si viraba a violeta, se consideró positivo a la presencia de proteínas, las cuales luego fueron lecturadas por absorbancias a una longitud de onda de 540 nm con el espectrofotómetro Bioespectro SP-22.

Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Proteínas Totales} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times (4\text{g/dL})$$

Absorbancia del patrón

6.5. Actividad bactericida en suero:

La capacidad bactericida del suero fue medida de acuerdo con la metodología de Rao *et al* (2006). Brevemente, *A. hydrophila* fue centrifugada, lavada y suspendida en PBS, con ayuda del espectrofotómetro Biospectro SP-22 se determinó una concentración bacteriana de 0.75 O.D. Se preparó una solución conteniente de 90 µL de suero obtenido de una muestra de sangre de un pez perteneciente a un grupo experimental más 10 µL, con la que se realizó diluciones seriadas (1:10), se puso en reposo por 4 horas a 37°C y luego se sembraron en agar TSA tres repeticiones por concentración utilizando 5 µL de la solución, estas placas fueron incubadas por 24 horas a 37 ° C.

Posteriormente se determinó el número de bacterias viables mediante el conteo del número de colonias en cada placa sacando un promedio. Utilizando la dilución se determinó las UFC de cada muestra, determinando así la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano del suero con la UFC.

Para esta prueba sólo se utilizó el suero de un pez perteneciente a cada grupo experimental que no fue inoculado con el patógeno: Control, Dosis 2%, Dosis 1% y Dosis 0.5% de A.E seleccionado al azar.

IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS:

La presente investigación con código de registro SIDISI N° 101969 fue evaluada antes de su ejecución por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Durante la experimentación se siguieron los protocolos establecidos por la Comisión Europea, 1995 (Anexo 11).

X. PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto inmunoestimulante del A.E de muña midiendo los parámetros productivos (ganancia de peso y talla) e inmunológicos en el *P. mesopotamicus* suplementado durante 30 días con el A.E de muña dentro de su ración alimenticia. Para determinar si existió diferencia estadística significativa en la ganancia de ganancia de peso, hematocrito, Burst respiratorio sin bacteria, Lisozimas y Proteínas Totales entre los grupos sin A.E y la suplementación con 2%, 1% y 0.5% de A.E se utilizó la prueba de ANOVA con la prueba post hoc de Tukey con un valor de tabla de 7.8. La determinación de la diferencia estadística significativa entre la ganancia de talla y Burst respiratorio para los grupos inoculados con *A. hydrophila* y la suplementación de A.E se utilizó la prueba estadística de *Kruskall wallis*, los resultados fueron comparados entre los distintos grupos con la prueba post hoc de Dunn.

Todos los análisis estadísticos fueron evaluados con el software Microsoft Excel 2016 con un nivel de significancia del 0.05.

XI. RESULTADOS

Elaboración del aceite esencial:

Se compró un total de 120 kilos de muña silvestre a 4 vendedoras del Mercado Modelo de Huancayo, fue seleccionado y se utilizó 118 kilos de muña, que fueron trozados 10 cm de largo y colocados en la máquina de arrastre de vapor con 14 litros de agua. Se obtuvo un total de 250 mL de A.E (Tabla 1).

Este procedimiento tuvo la supervisión del Ingeniero agrónomo Juan Tolentino perteneciente a la empresa donde se realizó el A.E.

Tabla 1. Rendimiento de la materia prima de *M. mollis* (muña) para la elaboración de A.E

Selección	Volumen del aceite esencial (mL)	Rendimiento % v/p
120 kg		
↓	↓	↓
118 → 118000 gr	250 mL	0.2118

Formula de rendimiento:

$$P = (V/P) * 100$$

Dónde: V: cantidad de aceite en mL y P es la cantidad de materia seca en gramos y 100 factor de corrección (Quert *et al.*, 1998).

Tabla 2: En los resultados del análisis de composición del aceite esencial por Cromatografía de gases. Se describió 35 compuestos de los cuales los de mayor proporción fueron: Pulegona 42.09%, Mentona 23.52%, Carvacrol 9.07%, Limoneno 3.05%, Linalool 2.51% y 4.78 % de compuestos desconocidos.

ACEITE ESENCIAL DE “MUÑA”

Se identificaron 35 compuestos que comprenden el 100% de la composición total del aceite esencial.

Número	Nombre del compuesto (NIST08.L)	t_R (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	α-Felandreno	11.42	0.52
2	α-Pineno	11.72	0.64
3	3-metil-Ciclohexanona	12.29	0.14
4	Sabineno	12.87	0.17
5	β-Pineno	13.11	0.62
6	Mirceno	13.20	0.35
7	3-Octanol	13.39	0.37
8	α-terpineno	14.21	0.20
9	p-Cimeno	14.45	1.46
10	Limoneno	14.60	3.05
11	γ-Terpineneo	15.46	1.03
12	Linalol	16.61	2.51
13	Mentona	18.58	23.52
14	Desconocido (C ₁₀ H ₁₈ O)	18.85	2.37
15	Levomentol	18.95	0.25
16	Isopulegona	19.13	1.98
17	4-Carvomentenol	19.31	0.19
18	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	19.70	0.93

19	Dihidrocarvona	19.80	0.67
20	Desconocido (C ₁₁ H ₂₀ O)	20.42	0.37
21	Pulegona	21.05	42.09
22	D-Carvona	21.14	0.94
23	d-Piperitona	21.46	1.02
24	Timol	22.21	0.63
25	Carvacrol	22.49	4.79
26	Acetato de Timol	23.78	0.35
27	Verbenona	23.86	0.59
28	Acetato de carvacrol	24.33	4.28
29	Desconocido (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	24.54	0.63
30	α-Copaeno	24.91	0.17
31	β-Cariofileno	26.18	2.03
32	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	27.13	0.29
33	β-Cubebeno	27.78	0.27
34	Biciclogermacreno	28.16	0.39
35	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄ O)	38.74	0.19

*NIST08: Base de datos de cromatografía de gases

**t_R: Tiempo de retención de la sustancia en el sistema cromatográfico: periodo acontecido entre el tiempo de la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima, este parámetro sirve para identificar los elementos presentes (McNair and Miller, 1998).

Parámetros productivos

Para la variable ganancia de peso en gr. se aplicó la prueba estadística de ANOVA, en la que no se encontró diferencia estadística significativa ($P > 0.05$).

Tabla 3: Análisis estadístico de la ganancia de peso para los grupos experimentales.

Tratamiento	Promedio	DVS	Valor P
Control	24	11.765	0.58
Grupo 2% A.E	25		
Grupo 1% A.E	28		
Grupo 0.5% A.E	26		

Para la variable ganancia de talla comercial en cm, se utilizó la prueba de *Kruskal Wallis*, Al aplicar la prueba post hoc de Dunn se encontró que el grupo Dosis 1% expresó mayor ganancia de talla en cm frente a los otros grupos, siendo los grupos: Control, Dosis 2% y Dosis 0.5% iguales.

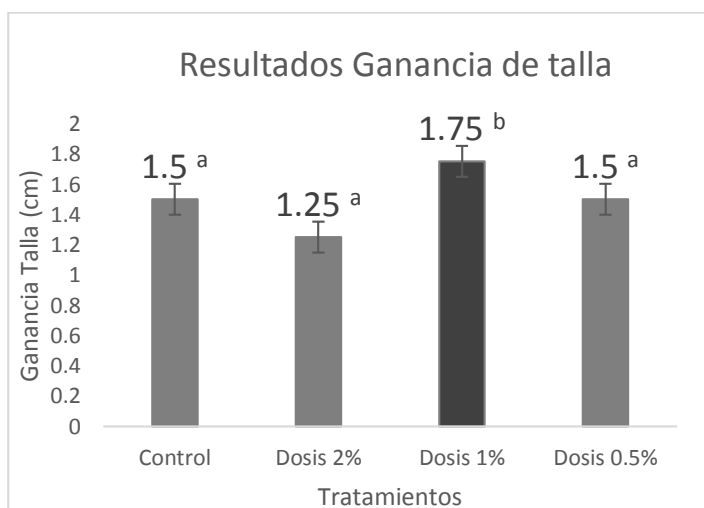


Gráfico 3: Resultado de la ganancia de talla comercial (cm) entre los grupos experimentales. Las letras en superíndice distintas significan que son diferentes estadísticamente. ($b > a$) ($p < 0.01$)

Hematocrito

Se aplicó la prueba estadística de ANOVA, al aplicarse la prueba post hoc de Tukey se encontró que los grupos suplementados con A.E. al 2% y al 1% fueron los que tuvieron un mayor porcentaje de hematocrito, mostrando diferencia estadística significativa.

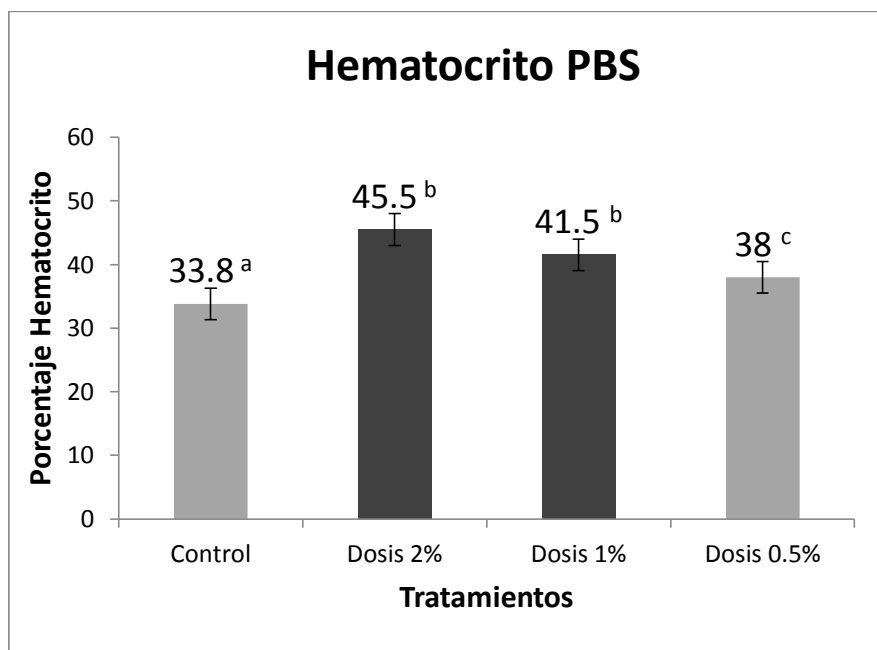


Gráfico 4: Porcentaje de Hematocrito para los grupos inoculados con PBS, diferencia estadística significativa ($p < 0.01$), las letras distintas en superíndice indican diferencia entre los grupos. ($b > a$), ($b > c$) y ($c > a$).

Para la variable hematocrito en el grupo infectado con *A. hydrophila*, se utilizó la prueba de ANOVA. Ante la prueba post hoc de Tukey los grupos suplementados con 2% y 1% de A.E fueron los que tuvieron un mayor porcentaje de hematocrito.

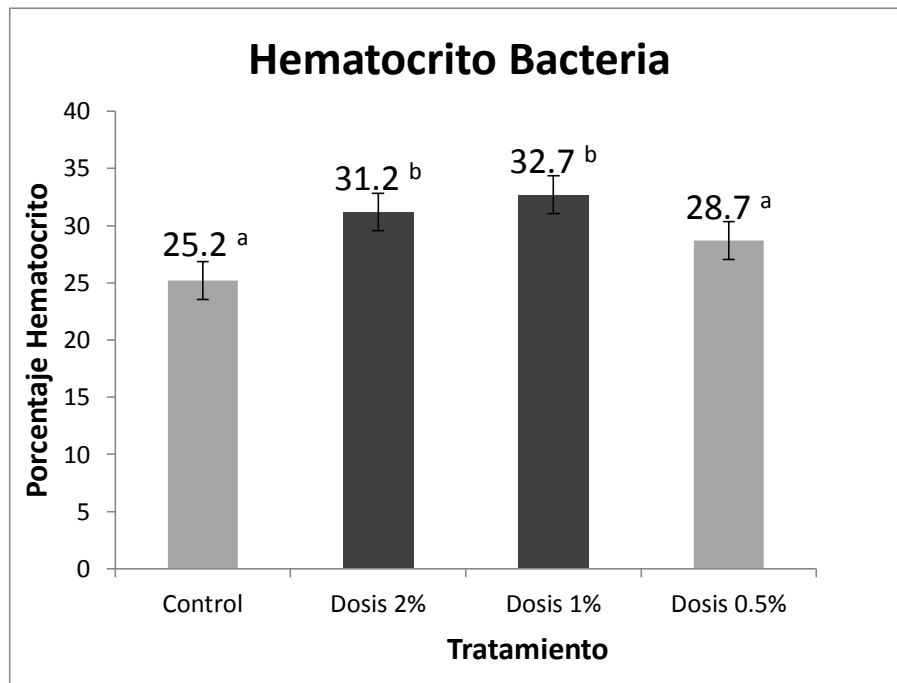


Gráfico 5: Resultado de porcentaje de hematocrito para los grupos inoculados con *A. hydrophila*, se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.01$), donde las letras en superíndice indican diferencia entre los grupos, ($b > a$)

Valores hematológicos de peces inoculados con PBS.

Se describe los resultados hematológicos de 5 peces de cada grupo experimental, seleccionados de manera aleatoria. Los resultados estadísticos para el conteo eritrocitario y leucocitario no tienen diferencia estadística significativa entre sí, siendo todos iguales para el grupo inoculado con PBS.

VALORES HEMATOLÓGICOS EN PECES CON PBS

VARIABLE	Valores Referenciales	GRUPO CONTROL	DOSIS 2%	DOSIS 1%	DOSIS 0.5%
Hematocrito (%)	31,9 ± 4,8*	37.2 ± 6.83 ^a	46.4 ± 5.18 ^a	41.8 ± 5.54 ^a	38.2 ± 3.11 ^a
Hemoglobina (g/dL)	8,9 ± 1,5*	11.53 ± 2.07 ^a	14.22 ± 1.59 ^a	12.92 ± 1.65 ^a	11.78 ± 0.99 ^a
Eritrocitos (x 10 ⁶ /μL)	2,964 ± 0,63*	3.14 ± 0.55 ^a	3.89 ± 0.43 ^a	3.51 ± 0.46 ^a	3.22 ± 0.25 ^a
VCM (fL)	125,0 ± 16,9*	118.15 ± 2.03	119.15 ± 0.82	118.93 ± 0.57	118.61 ± 0.82
CHCM (g/dL)	28,7 ± 2,9*	31.02 ± 0.83	30.66 ± 0.69	30.92 ± 0.46	30.84 ± 0.41
Leucocitos (x 10 ⁶ /μL)	2.77 ± 0.97**	2.15 ± 0.39 ^a	2,47 ± 0.37 ^a	2.42 ± 0.33 ^a	2.32 ± 0.34 ^a
Trombocitos (%)	***	68.16 ± 17.66 ^a	77.74 ± 22.33 ^a	76.83 ± 17.87 ^a	73.38 ± 18.53 ^a

*Valores referenciales según Tavares- Diaz & Mataqueiro (2004)

** Valores referenciales según Martins *et al.*, (2001)

*** Sin referencia

Las letras en superíndice iguales indican que no existe diferencia estadística significativa:

Hematocrito ($P = 0.059$)

Hemoglobina ($P=0.068$)

Eritrocitos ($P= 0.059$)

Leucocitos ($P=0.502$)

Trombocitos ($P=0.856$)

Cuadro 02: Valores hematológicos para los grupos inoculados con PBS

Valores hematológicos de peces inoculados con *A. hydrophila*.

Se describe los resultados hematológicos de 5 peces de cada grupo experimental, seleccionados de manera aleatoria. Se encontró diferencia estadística significativa para el conteo eritrocitario y la suplementación de A.E para los grupos.

VALORES HEMATOLÓGICOS EN PECES INOCULADOS CON *A. hydrophila*

VARIABLE	Valores Referenciales	GRUPO CONTROL	DOSIS 2%	DOSIS 1%	DOSIS 0.5%
Hematocrito (%)	31,9 ± 4,8*	24.6 ± 4.04 ^a	31.6 ± 5.18 ^{ab}	41.8 ± 5.54 ^b	38.2 ± 3.11 ^{ab}
Hemoglobina (g/dL)	8,9 ± 1,5*	7.28 ± 1.12 ^a	9,34 ± 1.55 ^{ab}	9.96 ± 1.11 ^b	8.5 ± 1.31 ^{ab}
Eritrocitos (x 10 ⁶ /μL)	2,964 ± 0,63*	2.01 ± 0.32 ^a	2.61 ± 0.46 ^{ab}	2.71 ± 0.31 ^b	2.34 ± 0.37 ^{ab}
VCM (fL)	125,0 ± 16,9	122.94 ± 1.21	121.22 ± 1.69	121.69 ± 1.07	120.59 ± 0.87
CHCM (g/dL)	28,7 ± 2,9	29.65 ± 0.66	29.57 ± 0.32	30.17 ± 0.33	30.15 ± 0.62
Leucocitos (x 10 ⁶ /μL)	2.77 ± 0.97**	2.71 ± 0.42 ^a	3.75 ± 0.74 ^a	3.54 ± 0.66 ^a	3.22 ± 0.54 ^a
Trombocitos (x 10 ⁶ /μL)	***	66.25 ± 16.52 ^a	77.36 ± 20.58 ^a	77.03 ± 17.04 ^a	73.68 ± 17.53 ^a

*Valores referenciales según Tavares- Diaz & Mataqueiro (2004)

** Valores referenciales según Martins *et al.*, (2001)

*** Sin referencia

Las letras distintas en superíndice indican diferencia estadística significativa entre los grupos

Siendo: (a = b), (b = ab) y (b > a)

Hematocrito ($P > 0.01$)

Hemoglobina ($P > 0.01$)

Glóbulos Rojos ($P > 0.01$)

Leucocitos ($P = 0.75$)

Plaquetas ($P = 0.75$)

Cuadro 03: Valores hematológicos para los grupos inoculados con *A. hydrophila*

Burst Respiratorio

Para esta variable se aplicó la prueba estadística de ANOVA. Se realizó la prueba post hoc de *Tukey* obteniéndose que los grupos con un mayor B. R son los de las Dosis 2% y el de 1% de A.E siendo los grupos Control y el suplementado con 0.5 % de A.E iguales para esta variable en este grupo.

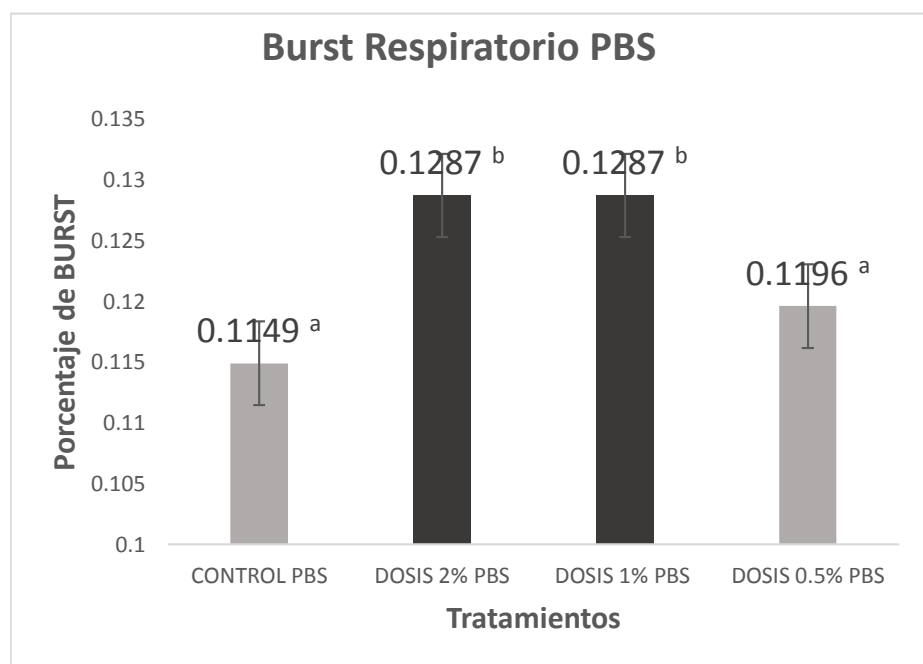


Gráfico 6: Burst Respiratorio para los grupos con PBS, existe diferencia estadística significativa entre los grupos ($p < 0.01$), la diferencia está indicada con las letras distintas en superíndice. ($b > a$)

Para los grupos inoculado con *A. hydrophila*, para la variable Bursts Respiratorio, se aplicó la prueba de *Kruskall Wallis*, se encontró diferencia estadística significativa, al aplicar la prueba post hoc de Dunn se observó que el grupo suplementado con el 1% de A.E tuvo un mayor BR frente a los otros grupos siendo el grupo Control y el suplementado con 2% de A.E iguales y el grupo suplementado con el 0.5% de A.E el menor para esta variable en este grupo experimental.

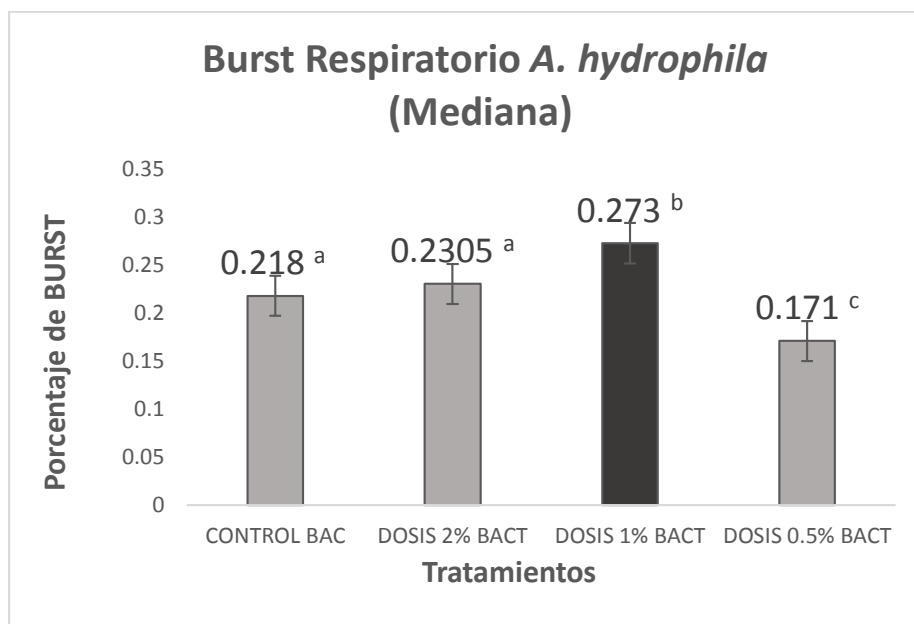


Gráfico 7: Resultado de Burst respiratorio para los grupos inoculados con *A. hydrophila*, encontrándose diferencia estadística significativa, la diferencia está indicada con las letras distintas en superíndice, Siendo: ($p < 0.01$) ($b > a$), ($a > c$) ($p < 0.05$) y ($b > c$) ($p > 0.01$)

Lisozimas

Para los grupos inoculados con PBS y la variable Lisozimas, se utilizó la prueba estadística de ANOVA, se encontró que no existe diferencia estadística significativa ($p= 0.545$).

Para los grupos inoculado con *A. hydrophila*, se aplicó ANOVA, y en la prueba post hoc de Tukey se encontró que el grupo suplementado con la Dosis al 1% de A.E es mayor que los grupos Control, Dosis 2% y 0.5% de A.E.

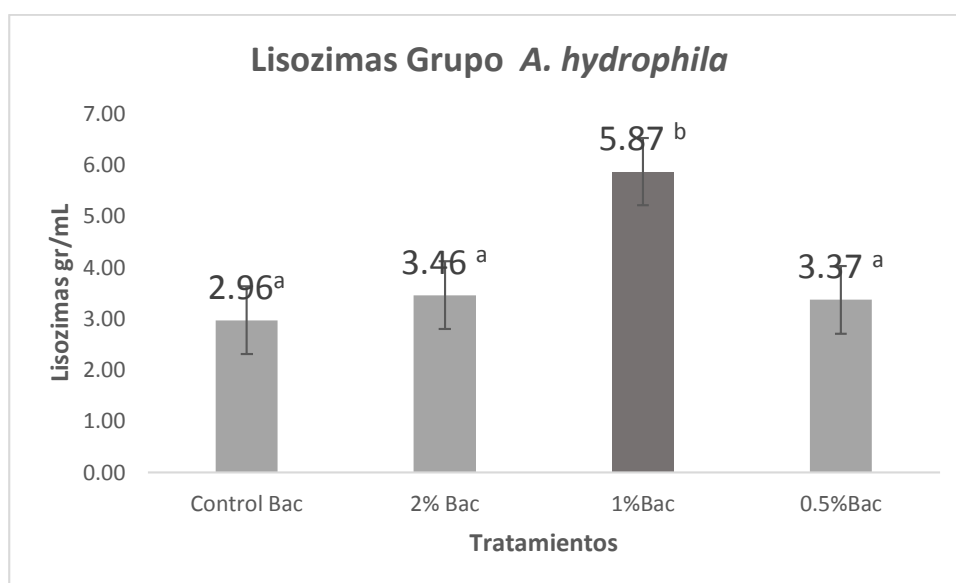


Gráfico 8: Lisozimas (gr/mL) del suero de los peces de los grupos inoculados con *A. hydrophila*. Significancia ($p < 0.05$) las letras en superíndice distintas significan diferencia entre los grupos siendo ($b > a$).

Proteínas Totales

Para esta variable en el grupo inoculado con PBS, se aplicó la prueba de ANOVA y se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.001$). Frente a la prueba post hoc de Tukey se encontró que los grupos Dosis 2% y 0.5% de A.E son los que tienen una mayor cantidad de proteínas totales siendo los grupos Control y 1% de A.E iguales para esta variable en este grupo experimental.

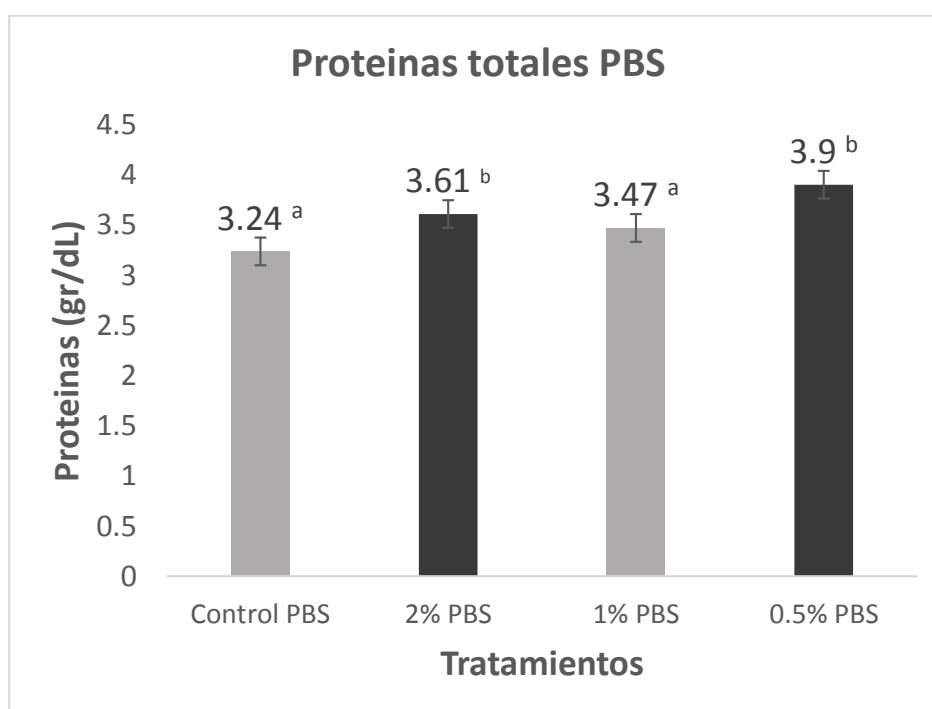


Gráfico 9: Proteínas Totales (g/dL) para los grupos inoculados con PBS, se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.01$), las letras distintas en superíndice señalan la diferencia siendo ($b > a$)

Para el grupo inoculado con *A. hydrophila*, se aplicó la prueba de ANOVA, no se encontró diferencia estadística significativa ($P = 0.789$).

Actividad Bactericida en suero:

Se utilizó 0.75 de O.D, el recuento se hizo en las concentraciones de 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} UFC/mL. Este gráfico descriptivo muestra que existe una relación inversamente proporcional entre las diluciones y el crecimiento bacteriano además se observó que para el grupo Dosis 2% de A.E se logró tener una inhibición total del crecimiento bacteriano en el suero.

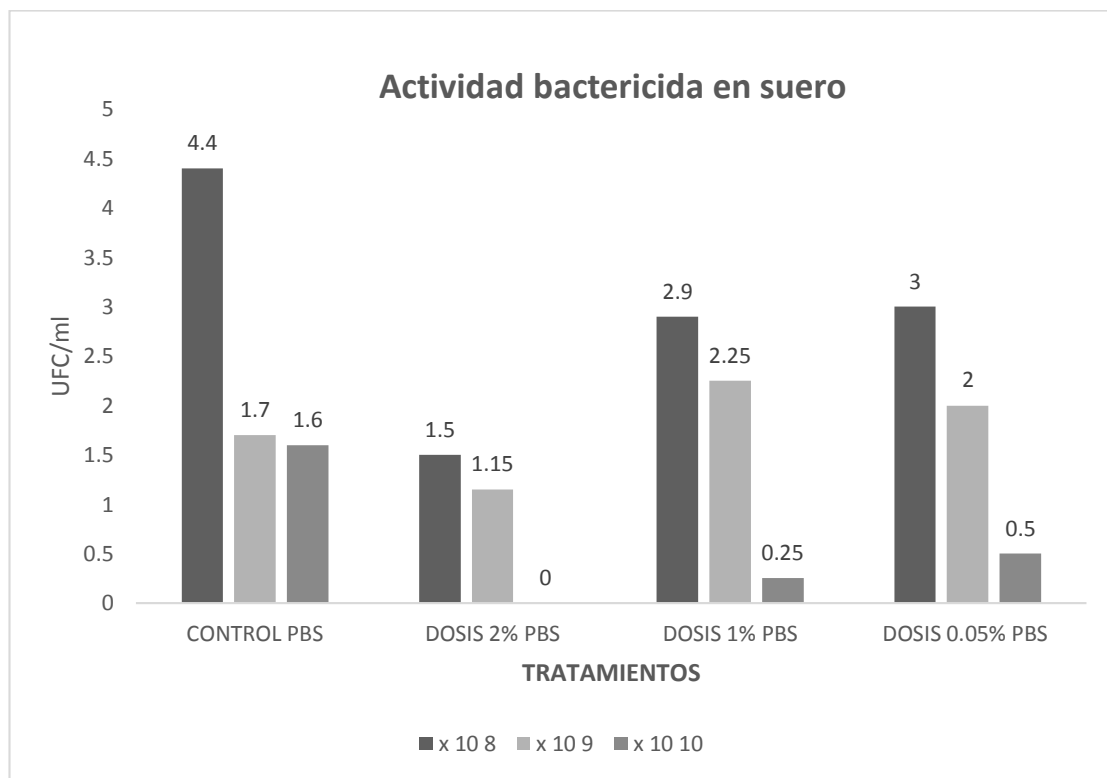


Gráfico 10: Resultado de la reacción bactericida en suero de los grupos experimentales: Control, 2%, 1% y 0.5% de A.E.

XII. DISCUSIÓN

En un estudio hecho por Fuertes y Murguía en el 2001 se describió el rendimiento de *M. mollis* (muña) de tres regiones del Perú para la producción de A.E, estos resultados comparados con nuestro estudio coinciden. El resultado del rendimiento es de 0.21%, según Lock (1994), se encuentra por encima de lo esperado que normalmente es de 0.18, concluyendo que nuestra materia prima y nuestro método de elaboración han logrado un buen rendimiento. La materia prima para la elaboración del A.E de este estudio según lo mencionado por las vendedoras, provenía de Pampas, que se encuentra en la región Quechua en el departamento de Huancavelica (INEI, 2005). Estos resultados tienen similitud con los obtenidos por Fuertes y Murguía (2001) en el que se observa un rendimiento del A.E. similar de las plantas provenientes de Pampas y Huaraz.

Se realizó el análisis de Cromatografía de gases (CG), técnica que permite identificar y cuantificar los principales componentes del A.E (Hoffmann y Stroobant, 1999). Los resultados identificaron 35 compuestos, acompañados de sus tiempos de retención (t_R) que representa el periodo acontecido entre el tiempo de la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Parámetro que sirve para identificar los elementos presentes (McNair and Miller, 1998). Los compuestos mostrados corresponden al 100% de la composición de A.E, siendo el compuesto presente en mayor cantidad la Pulegona, ($C_{10}H_{16}O$) representando el 42.09% de la muestra, con un (t_R) de 21,05. Farley, *et al.*, (2006) describen que este compuesto orgánico natural, clasificado como un monoterpeno, se ha encontrado en una variedad de plantas pertenecientes a la familia de las labiadas, como por ejemplo las mentas, el orégano, la muña, etc.

Isman (2000), destaca las bondades de la pulegona como carminativo y antiespasmódico, le atribuye la capacidad de calmar los cólicos disminuir flatulencias, actividad antimicrobiana, antifúngica y antioxidante. Parakrama (1998) y Shaaya y Rafaeli *et al.* (2007), describen las propiedades insecticidas estudiadas y probadas en distintas especies, sin embargo, describe que pulegona en altas concentraciones puede llegar a ser altamente tóxica, pero debido a su baja disponibilidad del compuesto en su materia prima, el uso y aprovechamiento de sus bondades es seguro.

El segundo compuesto a mayor concentración fue la Mentona ($C_{10}H_{18}O$) con 23.52% en la muestra y t_R de 18.58 min. Monoterpeno, íntimamente relacionado con el mentol, utilizado en la industria de la perfumería y la repostería por su aroma y sabor a menta (Moriya, 1881). Actualmente es uno de los principales componentes de un pesticida natural (Robert, 2001). El tercer compuesto de mayor cantidad encontrado fue el Carvacrol ($C_{10}H_{14}O$) con 4.79% y t_R 22.21 min. Este fenol monoterpeno es uno de los más importantes, se ha encontrado en A.E. de orégano en un 5% (Oliveira *et al.*, 2007). Se ha reportado propiedades antibacterianas de este compuesto frente a cepas de *E.coli* y *Bacillus cereus*, también se ha probado su acción antifúngica, por su particularidad de dañar la membrana celular de algunas bacterias e inhibir la proliferación de *P. aeruginosa* (Bouchra *et al.*, 2003).

El cuarto compuesto de importancia en el A.E. es el acetato de carvacrol que es simplemente la unión de un acetato al carvacrol (Sirisoma *et al.*, 2001). Se encuentra en la muestra con 4.28% con un t_R de 24.33 min. Otro compuesto es el Limoneno ($C_{10}H_{16}$) con 3.05% y un t_R de 14.60 min, compuesto orgánico natural del grupo de los terpenos, comúnmente encontrado en los aceites de las cáscaras de cítricos (INSH. 2005).

Diversos estudios demuestran sus cualidades como antioxidante, desinfectante, insecticida, desengrasante y en concentraciones mayores a 60% se ha comprobado el uso como disolvente (Virot, 2008).

El sexto compuesto es el Linalool ($C_{10}H_{18}O$) con un 2.51% y un t_R de 16.6 min, monoterpeno común en plantas aromáticas principalmente pertenecientes a la familia de las Lamiaceae, Lauraceae y Rutaceae, conocido también como β -linalool (Sirisoma *et al.*, 2001). Diversos estudios prueban sus efectos como anticonvulsivo siendo comparable con el efecto del diazepam, también se han demostrado sus bondades de anti-inflamatorio, antiespasmódico, sedante y antipirético (Augusto, 1975; Agapito T. y Sung I. 2003; Banchio *et al.*, 2005). A pesar de estos beneficios, existen estudios en los que se describe las reacciones adversas del linalool, Gordon *et al* (1982) describen la toxicidad de los monoterpenos en concentraciones iguales o mayores a 80% causando hepatotoxicidad convulsiones y abortos, resultados obtenidos luego de una experimentación en ratones. Así como este, existen muchos más estudios de las reacciones adversas de estos compuestos; sin embargo, todos coinciden que aparecen cuando hay un efecto acumulativo en concentraciones por encima de un 50% (Virot, 2008; Agapito T. y Sung I., 2003; Gordon *et al.*; 1982).

Al comparar los resultados del análisis del A.E con los de Fuertes y Munguía (2001) en el que describen tres A.E de *M. mollis* (muña) elaborados con la materia prima de tres lugares del Perú, nuestro A.E muestra mayor similitud con el resultado de la GC-MS y el t_R con el A.E con la materia prima proveniente de Pampas.

Respecto a otros estudios hechos por Cano (2007), Zegarra (2010), Azaña (2010) y Chaquilla *et al.* (2011), al igual que en nuestro estudio, ellos señalan a la Pulegona como el principal compuesto del A.E de muña.

Peña y Gutiérrez (2017), Orduño, (2006) y Oliveira, (2007), afirman que el A.E de muña tiene características y componentes semejantes al del orégano *Origanum vulgare* L., por la presencia de los principales componentes carvacrol, timol y pulegona por lo que se les podría atribuir propiedades terapéuticas similares estos resultados semejantes a los resultados del análisis del A.E del estudio.

Para evaluar la dosis utilizada de A.E en el alimento, según Castro *et al.*, (2014) los parámetros más importantes para medir la aceptación de una dieta nueva en una especie acuícola son: Consumo de alimento y calidad de agua (oxígeno disuelto y pH) los cuales fueron medidos una hora después de suministrar el alimento.

Con respecto a la ración con 5% de A.E, esta fue inmediatamente descartada debido a que los peces no la consumían, se formaba una película aceitosa en la superficie del agua alterando los parámetros esperados en el agua. La ración con 3% de A.E no alteró los parámetros de calidad de agua medibles, sin embargo, el consumo no fue al 100%, por lo que se probó la dosis de 2% de A.E, la misma que fue consumida inmediatamente por los peces sin formar ninguna película de grasa en la superficie, el oxígeno disuelto fue de 56.5 % y el pH de 7.2 siendo rangos óptimos para la crianza del *P. mesopotamicus* según Urbinati y Gonçalves (2005).

Los resultados del análisis bromatológico del alimento sin A.E coinciden con los datos del estudio que realizaron Wicki *et al.* (2007). Analizaron tres raciones de engorde para el pacú hechas con subproductos de maíz, girasol y ensilado de ácido. En este trabajo se utilizó un alimento base para comparar sus raciones, dichos resultados coinciden con los de nuestro análisis, además que el alimento base cumple con las características nutricionales básicas requeridas por el pacú (*P. mesopotamicus*) que describe Cantelmo (1993). Con respecto a los resultados obtenidos de la ración con el 2% de A.E se observó un mayor % de MS, lo que puede estar relacionado con el mayor porcentaje de grasas que tiene el alimento, así como también el porcentaje de PB, esto se debe a que al adicionar cualquier aditivo oleoso en la dieta ocasiona que el porcentaje de MS aumente, así como también el porcentaje de grasa y el aumento de carbohidratos. La razón que la humedad haya descendido se debe a la propiedad de los lípidos de ocupar el espacio del agua en materia seca, además de mantener por mucho más tiempo el pelet íntegro en el agua, así como lo menciona Valenzuela *et al.* (1997). En ese trabajo describen la absorción de ácidos grasos en la dieta.

No se realizó el análisis bromatológico del alimento con el 0.5% de A.E debido a que los resultados del análisis del alimento con el 1% de A.E fueron exactamente iguales a la ración sin A.E, esto para disminuir costos debido a que este análisis fue un servicio realizado.

En la metodología se describe la cantidad de A.E utilizada en el experimento. En el grupo con el 2% de A.E se suministró un total de 0.07 mL de A.E al día por pez entonces, la cantidad de aceite proporcionada a un pez durante los 30 días que duró el experimento fue de 2.36 mL, a este grupo se le proporcionó un total de 106.25 mL de A.E.

Sin embargo, no se puede asumir que son las cantidades de consumo del A.E por los peces en este grupo experimental ni en los otros debido a la forma en la que se adicionó el A.E en el alimento y por el comportamiento alimenticio de los peces, siendo los limitantes del estudio: No conocer la cantidad exacta de A.E consumida por los peces ni la certeza de que cada pelet contenga la misma cantidad de A.E en la ración.

Son pocos los estudios en los que se probaron los efectos inmunoestimulantes del A.E de *M. mollis*. (Luján, 2010) evaluó la propiedad inmunopotenciadora y mecanismos de acción del A.E de *Chondracanthus chamissoi* y *M. mollis* en la proliferación y diferenciación de los linfocitos y en la producción de anticuerpos en *Gallus gallus domesticus* y *Oryctolagus cuniculus* inoculados con *listeria monocytogenes* concluyendo que el A.E de “muña” y el de *C. chamissoi* estimulan la proliferación de los linfocitos y su diferenciación en Linfocito T y Linfocitos B aumentando la producción de anticuerpos evidenciado en el BR. Comportándose como sustancias inmunopotenciadoras o adyuvantes.

Los estudios en los que se prueban los efectos antibacterianos del A.E son muchísimo más Carhuapoma *et al.* (2009); Castaño *et al.*, (2010); Patra y Baek, (2016) y Rincón-Mejía *et al.* (2012), evidencian el potencial antibacteriano de los A.E frente al crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycoplasma pneumoniae*.

A la fecha no se ha encontrado bibliografía que pruebe las propiedades inmunoestimulantes del aceite esencial de *M. mollis* “muña” en *P. mesopotamicus* “Pacú” frente a *A. hydrophila in vivo*.

En Pacú, los trabajos que involucran aceites esenciales se basan principalmente en su uso como sedante o como tratamiento antiparasitario Cedraz *et al.* (2016); Limma-Netto *et al.*, (2016); Valladao *et al.* (2016); Torrenegra *et al.* (2016), Custódio *et al.* (2017) y Ventura *et al.* (2019).

Da Cunha *et al.* (2018) analizaron los efectos antibacteriales del A.E. de *Origanum majorana* a una concentración única de 3.6%; Dos Santos *et al.* (2017), evaluaron la resistencia y los cambios en los parámetros sanguínea del en Bagre suplementado la *Aloysia triphylla*, usando concentraciones de 0.025% y 0.2%. Ribeiro *et al.* (2016), evaluaron la respuesta hematológica del A.E. de *Mentha piperita* frente a *A. hydrophila* en la cachama negra, usando concentraciones de 0.5, 1 y 1.5% de A,E. en el alimento. Farsani *et al.* (2019), probaron la eficacia del A.E de la semilla de cilantro (*Coriandrum sativum*) en las respuestas fisiológicas, la inmunidad y la resistencia a la enfermedad de la trucha arco iris, utilizando las mismas concentraciones de aceite que en nuestro estudio. Como se mencionó anteriormente, no está establecido la concentración adecuada de A.E. en alimento para evaluar la respuesta inmune *in vivo* en el pez, las concentraciones usadas son muy variables entre los diferentes estudios y dependen principalmente de la influencia en la calidad de agua y el consumo del alimento. Razones por las que se usan concentraciones menores a 5% como en el presente estudio.

Un animal en buen estado y condición fisiológica va tener un óptimo crecimiento y ganancia de peso sobre todo en la etapa juvenil (Dos Santos *et al.*, 2017). La variable ganancia de peso está íntimamente relacionada con la condición inmunológica.

Para los resultados de ganancia de peso y la suplementación de A.E, no se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos, resultado que podría estar relacionado a la distribución variada de pesos al inicio del experimento. Si bien cada grupo empezó con una misma media, pero, la variabilidad entre el peso de cada individuo al inicio fue grande.

El no encontrar diferencia estadística significativa no implica que los peces no hayan ganado peso, si no que la suplementación de A.E para este parámetro no hace diferencia. EL factor tiempo puede ser condicionante, existen dos estudios en los que se evaluó la ganancia de peso en juveniles de *Piaractus brachypomus* Vásquez (2002) y en *P. mesopotamicus*, Carneiro (1983). Ellos evaluaron 3 y 4 dietas experimentales respectivamente, encontrando diferencia estadística significativa entre la variable dieta y ganancia de peso. Estas dietas fueron suplementadas durante 45 días.

Wicki, *et al.* (2004), realizaron una descripción del crecimiento compensatorio del *P. mesopotamicus* describiendo a las 4. 5 semanas un mayor crecimiento en cm y a las 12 semanas un pico de ganancia de peso.

Respecto a la ganancia de talla comercial se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos, ante la prueba post hoc de Dunn tenemos que el grupo suplementado con el 1% de A.E tuvo una mayor ganancia de talla en (cm) que los otros, resultados que podrían explicarse con la experiencia de Muñoz *et al.*, (2012). Trabajo que fue realizado con la misma especie y en el mismo lugar de experimentación (UNESP, *Jaboticabal*). Este trabajo probó el efecto de 5 dietas suplementadas con carbohidratos y lípidos como fuente de energía sobre parámetros productivos en juveniles de pacús, concluyendo que dicha suplementación lipídica mejora la utilización de las proteínas promoviendo un

mayor crecimiento en peces en la etapa juvenil, la razón que este estudio es comparable con esta investigación no es sólo porque tiene la misma especie ni porque fueron realizadas en las mismas instalaciones, si no que nuestro alimento conteniente del 2% de A.E en el análisis bromatológico. Se sabe que los A.E. mejoran la salud intestinal, aumentan la disponibilidad de nutrientes esenciales en el intestino y estimulan las secreciones digestivas favoreciendo la actividad en el tracto gastrointestinal (Franz *et al*, 2009). Basados en estas premisas la dosis que proporciona una mayor ganancia de talla comercial debería ser la de 2%, sin embargo, nuestra mejor dosis es la de 1% de A.E. Stradmeyer (1989). explica que el crecimiento y ganancia de peso están íntimamente relacionados con el consumo de alimento, el comportamiento alimenticio y las particularidades del peletizado.

Para que exista un consumo óptimo y aceptación completa del alimento este debe contar con ciertas características: la forma adecuada, tamaño, textura, tiempo de permanencia en el agua, olor y sabor, estas dos últimas peculiaridades importantes para nuestro estudio. Es bien sabido que los peces tienen el sentido del gusto desarrollado por lo que la dieta suplementada con el 2% de A.E pudo no ser aceptada por completo por los peces en estudio, debido a las características organolépticas del A.E (Fuertes y Murguía, 2001). La dieta de 1% de A.E fue la que tuvo mayor ganancia de talla, lo cual está en relación a la aceptación o la percepción del sabor y olor del A.E a esta concentración.

La importancia de realizar un análisis hematológico en peces radica en llevar un control en el estado sanitario y manejo nutricional en los peces de producción, así como también evaluar la interacción entre los nutrientes, la presencia de tóxicos, patógenos y sustancias contaminantes, las mismas que producen alteraciones causando inmunosupresión y cambios en la composición de la sangre (Barandica, 2010).

Las alteraciones en los parámetros hematológicos (hematocrito, hemoglobina, recuento leucocitario) suelen ser usadas como indicadores de contaminación (Hontela, 1998; Wahli, 2002) y de cambios en la condición fisiológica del pez debido a situaciones de estrés que ocasionan inmunosupresión y aparición de patógenos que desencadenan enfermedad (Wendelaar, 1997).

En el análisis hematológico los resultados para los grupos inoculados con PBS para la variable hematocrito, muestran diferencia estadística significativa entre ellos, siendo las dietas suplementadas con el 2% y 1% de A. E las que tienen mayor porcentaje de hematocrito con respecto al grupo Control y al 0.5% de A. E.

Según lo descrito por Anderson (1992), el efecto de los inmunoestimulantes, adyuvantes y vacunas en peces, luego de un tiempo de acción proveen al pez una mejor condición fisiológica mejorando los parámetros hematológicos.

En relación al resultado del análisis estadístico de hematocrito para los grupos inoculado con *A. hydrophila*, se observó diferencia estadística significativa, repitiéndose los resultados del grupo inoculado con PBS, sin embargo, el porcentaje mayor de hematocrito en el grupo inoculado con *A. hydrophila* fue menor con relación al grupo PBS, a pesar de esto no se puede asumir que existe diferencia estadística entre los grupos infectados y no infectados.

La razón por la cual se evaluaron los grupos por separado fue para observar el comportamiento de la variable hematocrito para los grupos experimentales en dos situaciones distintas: en un grupo de peces sanos y en un grupo de peces enfermos observando que en ambas circunstancias los grupos con el porcentaje de hematocrito mayor son los correspondientes a los grupos suplementados con 2 y 1% de A.E.

Collazos, (1996), describió la composición proximal de 100 g. de materia seca de muña *M. mollis*, entre los 14 componentes descritos sobresale la presencia de Calcio, Fosforo, Retinol y hierro compuestos que de mantenerse presentes en el A.E podrían ser la razón de los resultados obtenidos en el estudio. Los macronutrientes como el calcio, fosforo y hierro en los peces suelen tener efectos antioxidantes, inmunoestimulantes Fernández, (2004).

Otro gran limitante de este estudio fue que el análisis hematológico completo en el que se describió todos los valores (Hematocrito, hemoglobina, Glóbulos rojos, VCM, CHCM, leucocitos y Plaquetas) tanto para los grupos inoculados con PBS y los infectado con *A. hydrophila* fue realizado sólo de 5 muestras de sangre de 5 individuos por grupo respectivamente esto debido a la complejidad de la lectura de los frotis sanguíneos ya que este no puede ser automatizado debido a las características de los hematocritos que tienen núcleo central de cromatina condensada Tavares (2006) y Brown (1993). Con un tiempo de permanencia de no más de 24 horas para poder ser lecturadas Laboratorio Pathovet (2016) y Cadwell *et al.* (2006).

Otro motivo por el que no se realizó la diferenciación de la serie blanca fue que luego de hacer los frotis sanguíneos para el recuento celular diferenciando hematocritos, leucocitos y plaquetas, se llevó a centrifugación la sangre para realizar los otros análisis.

Se recomienda para realizar la diferenciación de la serie blanca utilizar el análisis de citometría de flujo para tener una mayor precisión (Campbell, 2017). Dicho ensayo no fue realizado en este estudio por lo que no se tiene el recuento diferencial de leucocitos.

El disminuir el N muestral para estas variables, ocasiona que el intervalo de confianza sea mayor aumentando el margen de error de los resultados frente a la prueba estadística (Díaz, 2009).

De igual manera fue realizado el análisis estadístico, los resultados para el conteo de frotis sanguíneo tanto para PBS y para los grupos inoculados con *A. hydrophila* se muestran en los cuadros 2 y 3 respectivamente en este se comparó los resultados entre los tratamientos (control, dosis 2%, 1% y 0.5% de A.E), a su vez fueron comparados con los valores referenciales establecidos por Tavares y Mataqueiro (2004) y los de Martins *et al.* (2001) establecidos en pacús sanos.

En relación a hematocrito, hemoglobina, glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas para los grupos con PBS se determinó que no existió diferencia estadística significativa entre nuestros grupos y el grupo control, sin embargo, al comparar los valores obtenidos en nuestros grupos suplementados con el A.E con los valores referenciales se observó que los valores de hematocrito y hemoglobina con respecto a los valores referenciales son mayores. Los valores de hematocrito están correlacionados con la actividad del pez, valores más bajo se observan en peces con menor actividad y valores mayores están relacionados a condiciones de adelgazamiento en juveniles antes de la diferenciación sexual y desove (Noro y Wittwer, 2012 y ThralL *et al.* 2012).

Se evaluó el efecto en la dieta del A.E. de *Lippia citrodora* en los parámetros hematológicos y se encontró crecimiento considerable del porcentaje de hematocrito en los peces con A.E. en la dieta, concluyendo que los peces suplementos con una base de plantas aumentan los parámetros hematológicos debido a su actividad inmunoestimulante (Gholoipourkanani *et al.*, 2017).

En los resultados del grupo inoculado con el patógeno *A. hydrophila* con respecto a los valores obtenidos con la serie roja se encontró diferencia estadística significativa entre el grupo control y los grupos suplementados con el A.E siendo el grupo 1% de A.E, el que tuvo mayor porcentaje de hematocrito, mayor cantidad de hemoglobina y recuento de glóbulos rojos respecto a los otros grupos experimentales a pesar de esto los valores se encontraron dentro de los valores referenciales considerados como normales.

Para la variable leucocitos y plaquetas no se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos, pero al comparar los valores de los grupos experimentales y los valores referenciales se determinó que los grupos suplementados con A.E están por encima de estos.

El aumento de leucocitos en general está relacionado a eosinofilia, monocitosis o linfocitosis estas patologías están asociadas a infecciones parasitarias, estimulaciones antigénicas, respuesta inflamatoria, presencia de un agente infeccioso (Weiss y Wardrop, 2010).

Al compararse los resultados obtenidos con los valores referenciales se podría inferir que los grupos suplementados con el 2 y 1% de A.E estarían presentando una mayor respuesta antigénica frente al patógeno a diferencia de los grupos Control y el suplementado con 0.5% de A.E, además de que tienen valores de hematocrito, hemoglobina y glóbulos rojos normales a pesar de la presencia del patógeno, esto concuerda con los resultados obtenidos en el grupo experimental donde se evaluó hematocrito del total de nuestro grupo, en donde se evidenció la diferencia estadística significativa entre los grupos siendo el grupo con 1% de A.E el que tuvo los valores mayores.

La importancia de medir los niveles de hemoglobina en peces proporciona información sobre la capacidad funcional de los eritrocitos para transportar oxígeno (Ciftci *et al.*, 2008). Bajo esta premisa, los peces del grupo Dosis 1% de A.E estaría demostrando poseer eritrocitos funcionales activos cuya función no se vio afectada por el patógeno.

El volumen corpuscular medio (VCM), indica el estado de la función respiratoria y la concentración corpuscular media (CHCM), representa el porcentaje que ocupa la hemoglobina en un eritrocito promedio (Avilez *et al.*, 2004). En el gráfico se muestra que los valores para este parámetro se han mantenido dentro del rango normal sin embargo, el grupo con los mayores valores para estos parámetros es el suplementado con el 1% de A.E, lo cual podría indicar una mejor respuesta y resistencia de los glóbulos rojos frente al patógeno y sugerir un mejor funcionamiento del sistema circulatorio de nuestros peces en este grupo (Campbell T, 2017).

Del mismo cuadro se puede concluir que el grupo control está presentando una anemia regenerativa microcítica hipocrómica (MH), Las posibles causas de esta patología en peces son: la disminución de la absorción de hierro en la dieta, la falla en los mecanismos de absorción de nutrientes en el intestino y la presencia de alguna infección que pueda estar causando hemorragia (Bakrim *et al.*, 2018 y Clauss *et al.*, 2008). Se descartó la deficiencia de hierro en la dieta ya que todos los grupos han consumido el mismo alimento, si este sería un factor, los resultados se evidenciarían en todos los grupos.

Sahu *et al.* (2007), evaluaron el efecto de *Allium sativum* en la inmunidad de *Labeo rohita* infectados con *A. hydrophila* y no encontraron diferencia entre los grupos suplementados con A.E. y el control post desafío, a diferencia de este estudio.

Por el contrario Farsani *et al.* (2019), evaluaron la eficacia del A.E de la semilla de cilantro (*Coriandrum sativum*) en las respuestas fisiológicas, la inmunidad y la resistencia a la enfermedad de la trucha arco iris, concluyendo que el mejor grupo es el suplementado con el 2% del A.E, el mismo que presentó valores significativamente más altos de tasa de crecimiento específico en comparación con el grupo control así como mejor peso final y factor de condición, también concluyen que dicha dosis mejora los índices inmunológicos a diferencia de nuestro estudio que la dosis 1% es la que tiene los mejores valores al respecto.

La disminución de la absorción de hierro, sumada a la presencia del patógeno *A. hydrophila* podrían ser las causas por las que se presenta la anemia MH, a diferencia de nuestros grupos suplementados con el A.E en los que ocurrió una mejor absorción de nutrientes tanto de hierro como otros presentes en la dieta.

Se ha demostrado las bondades del A.E de muña para mejorar la capacidad de absorción del intestino, mantener la integridad de la mucosa gástrica frente a *H. pylori* (Carhuapoma M y Bonilla R. 2007).

Con respecto a los valores obtenidos en los leucocitos se encuentra que no existe diferencia estadística significativa entre los grupos. Cabe mencionar que el número total de muestras para esta prueba se redujo, debido a la complejidad y procesamiento de los parámetros haciéndose 5 muestras por grupo siendo una de las razones por las que no se evidencia diferencia estadística significativa.

La capacidad del individuo para contrarrestar al antígeno (Ag) está en relación a la rapidez y la capacidad de los leucocitos en fagocitar al antígeno, lo cual puede ser medido con un incremento del consumo de oxígeno que es traducido como Burst respiratorio (BR). Los resultados de Burst para el grupo inoculado con PBS presentaron diferencia estadística significativa entre la producción de especies reactivas de oxígeno a pesar de no estar desafiados con una bacteria. Estos resultados no necesariamente implican que los peces estuvieron atravesando un proceso patológico, pero sí, la existencia de algún proceso de estrés que pudiese estar desencadenando el factor, evidenciando que los grupos suplementados con 2 y 1% de A.E están teniendo una respuesta mayor.

Tort *et al.* (2005) afirman que se incrementa la respuesta respiratoria de las células directamente proporcional a la capacidad de eliminar microorganismos. Si bien este grupo no fue inoculado con *A. hydrophila*, pero se conoce que esta bacteria es parte normal de la microbiota intestinal del pez y que las condiciones de estrés pueden desencadenar enfermedad, la manipulación de los peces, tanto para la reorganización de los grupos y la inoculación ya sea de PBS y del patógeno representa un proceso de estrés el cual estaría explicando estos resultados.

Para los resultados de BR en el grupo con *A. hydrophila* se encontró diferencias estadísticas significativas se puede observar que el grupo con el 1% de A.E presentó mayor BR frente a los otros grupos. En el trabajo de Yunis *et al.* (2006) probaron el efecto inmunoestimulante del extracto de camu camu en la dieta de los peces, midiendo BR, concluyendo que la respuesta inmunológica más eficiente provenía de los grupos suplementados con las cantidades más altas del producto, a diferencia de este estudio.

El grupo con el mayor BR corresponde a la dosis intermedia, esto concuerda con lo propuesto por Immanuel *et al.* (2009), que describe que el uso de A.E de algunas plantas como inmunoestimulantes no muestran una relación dosis/respuesta lineal, sino que: las concentraciones intermedias son las que tienen efectos favorables ya que algunas dosis elevadas pueden mostrar ausencia de efecto o incluso toxicidad.

Abreu *et al.* (2009) concluyen que el ensayo colorimétrico estandarizado para determinación de la actividad del Burst respiratorio de los leucocitos en pacú es una herramienta confiable para la evaluación del sistema inmune innato. Bajo esta premisa podemos concluir que la suplementación de nuestro aceite esencial al 1% está generando una respuesta inmune innata mayor frente al patógeno a diferencia de los otros grupos experimentales.

Los resultados de lisozimas de los grupos inoculados con PBS no presentaron diferencia estadística significativa entre los grupos suplementados con A.E y la cantidad de lisozimas a diferencia del grupo inoculado con *A. hydrophila*, en el que se encontró diferencia estadística significativa, siendo el grupo suplementado con el 1 % de A.E el que tuvo mayor cantidad de lisozimas frente a los otros grupos experimentales.

En un trabajo con tilapias del Nilo en el que se probó el *Aloe barbadensis* como inmunoestimulante se encontró diferencia estadística entre sus grupos experimentales, cantidad de lisozimas y BR esto puede deberse al diseño de su estudio en el que no se realizó un desafío con algún patógeno (Dotta *et al.*, 2014).

En otro estudio se evaluó la respuesta inmune de las Tilapias del Nilo con la suplementación de un estruido natural de camu camu, a distinto tiempo post inoculación midiendo lisozimas y BR, concluyen que para la variable lisozimas luego de las 6 horas post inoculación no existe cambios entre su grupo control y los suplementados; sin embargo, a las 24 horas sí (Yunis *et al.*, 2006).

El tiempo óptimo para medir respuesta inmune innata en peces es a partir de las 24 horas (Biller-Takahashi *et al.*, 2013), razones por las que el diseño se realizó de esa forma.

Con respecto a las mejores dietas para este parámetro en el trabajo de Yunis, *et al.* (2006) señalan que la cantidad de aceite esencial podría sugerir una relación directamente proporcional con la cantidad de lisozimas y la cantidad de camu camu en la dieta a diferencia de nuestro estudio que concuerda con lo explicado por Immanuel *et al.*, (2009) donde el grupo suplementado con el 1% de A.E es el que tiene mayor cantidad de lisozimas con respecto a los otros grupos experimentales.

Las proteínas Totales son macromoléculas esenciales para la vida (Davis, 2004), en el sistema inmune actúan inactivando compuestos tóxicos. Evaluar proteínas totales sirve para monitorear la respuesta y los cambios que se presentan en condiciones patológicas (Cnaani *et al.*, 2004). En los resultados de proteínas totales para el grupo inoculado con PBS se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos suplementados con A.E siendo el grupo 2% y 0.5% los grupos con la mayor cantidad de Proteínas totales con respecto al grupo control y al grupo con 1% de A.E, para el grupo inoculado con *A. hydrophila* no se encontró diferencia estadística significativa entre proteínas totales y los grupos suplementados con A.E.

Los parámetros referentes a bioquímica sérica no pueden ser comparados en peces de la misma variedad híbrida. Por ejemplo, *P. mesopotamicus* con *P. macropomum*, aun así, teniendo los datos de la misma especie, no se pueden comparar, se debe considerar algunas características importantes como el hábitad, el tipo de alimentación, la estación del año en el que fueron tomados los datos (Tavares – Díaz, 2010).

Se necesita tener variables referenciales de proteínas totales de los mismos pacús, para poder establecerse una condición normal o patológica frente a la cantidad de proteínas totales.

La determinación de la actividad bactericida sérica involucra la exposición de una suspensión de organismos viables a una concentración adecuada de anticuerpos y complemento (Wang *et al.*, 2016).

Por último, se evaluó la actividad bacteriana en suero, los resultados son inversamente proporcionales a la efectividad del A.E para inhibir el crecimiento bacteriano, el gráfico descriptivo muestra las UFC/mL, a este último análisis no se aplicó prueba estadística ya que los resultados corresponden a una muestra de suero de un pez de los grupos experimentales correspondientes al grupo inoculado con PBS. Se usó una disolución por grupo experimental cada uno con tres repeticiones para establecer una media y determinar las UFC, la razón por la que se muestran tres diluciones es para evidenciar el crecimiento inversamente proporcional entre las diluciones y la inhibición bacteriana.

Se puede asumir que el grupo suplementado con la dosis al 2% logró inhibir el crecimiento bacteriano por completo seguido del grupo con la concentración de 1% de A.E, si bien no logró inhibir el crecimiento por completo debido que a una de las tres repeticiones se observó una colonia pequeña, se puede inferir que de todas maneras los grupos suplementados con A.E presentan una mejor actividad bactericida sérica frente al patógeno *A. hydrophyla*.

Estos resultados podrían estar relacionados con los de Burts respiratorio, lisozimas y proteínas totales séricas, en esos resultados los valores más altos que indican una mayor respuesta frente al patógeno pertenecen a los grupos suplementados con A.E. Biller-Takahashi *et al.* (2013), Dotta *et al.* (2014), concuerdan que la inhibición bacteriana está íntimamente relacionada con la cantidad de lisozimas y de proteínas totales, parámetros los cuales fueron medidos en suero demostrando así que el suero de nuestros peces tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *A. hydrophila*.

Este trabajo de investigación tuvo cuatro limitantes. El método de integración del A.E debido a que no aseguró una homogeneidad del aceite en el alimento, la forma en la que se proporcionó las raciones alimenticias ya que no certifican que cada pez consumió la misma cantidad de A.E esperada, la disminución del N muestral en el análisis hematológico completo, y la no diferenciación leucocitaria.

La elección de la técnica de suplementación del A.E fue porque actualmente este es el método en el que se suplementan los fármacos en la industria acuícola tal como lo describe (Manual for International Training 1991), el mismo que para los fármacos establece concentraciones por encima del 5% teniendo como limitantes no conocer la cantidad exacta de fármaco consumido por el pez ni que cada pellet contenga la misma cantidad farmacológica. A diferencia de la suplementación de fármacos el uso de A.E como inmunoestimulantes no contribuye con la resistencia antibacteriana no contamina los recursos hídricos por lo que este método para el uso de A.E no tendría algún efecto desfavorable en el medio acuícola.

Se concluye con este estudio que la suplementación alimenticia con A.E en peces sobre los parámetros productivos e inmunológicos no tienen una relación directamente proporcional entre la concentración de A.E en la dieta y el efecto inmunoestimulante si no que son las concentraciones intermedias como la de 1% la que logra mayor ganancia de talla comercial, así como también sugiere proporcionar un mejor estado fisiológico y una respuesta antigénica mayor frente al patógeno

XIII. CONCLUSIONES

- Los principales compuestos del aceite esencial de *M. mollis* (muña) preparado son: Pulegona 42.09%, Mentona 23.52%, Carvacrol 9.07%,
- La dosis de 2% de A.E es la concentración más alta aceptada por los peces en el estudio, seguida de 1% y 0.5%.
- La concentración del 1% de A.E de muña suministrada por 30 días logra 25% de mayor crecimiento en los juveniles de *P.mesopotamicus* con respecto a los otros grupos.
- Para los peces inoculados con *A. hydrophila* se encontró que los grupos suplementados con el 1% y 2% A.E tienen una mayor cantidad de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina con respecto al grupos control y al suplementado con 0.5% de A.E.
- La suplementación del 1% de A.E proporciona una mayor producción de BR y lisozimas frente a los grupos experimentales control y dosis 2 % y 0.5% de A.E en peces inoculados con *A. hydrophila*
- El aceite esencial en concentraciones de 2 y 1% en la dieta tiene un efecto bactericida en el suero de la sangre de los peces frente al patógeno *A. hydrophila*.

XIV. RECOMENDACIONES

- Repetir el estudio suministrando el A.E por 45 días para descartar el factor tiempo en la influencia del parámetro ganancia de peso y realizar la diferenciación leucocitaria de los peces en el estudio.
- Realizar una revisión histológica del intestino para observar mucosas células caliciformes y microvellocidades para confirmar o descartas las bondades que le adjudican a la muña.
- Una evaluación organoléptica adicional del filete del pez luego de la alimentación con el aceite esencial, para descartar cambios de sabor en el filete a consecuencia de la adición del A.E.

XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu, JS., Marzocchi- Machado, CM., Urbaczek, AC., Fonseca, LM. and Urbinati, EC. 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Brazilian Journal of Biology, vol. 69, no. 4, p. 1133-9. PMID:19967185.
2. Agapito T. y Sung I. 2003. Fito Medicina 110 Plantas Medicinales. 1° edición. Lima: Editorial Isabel IRL.
3. Alcalá M., Katherine M, Alvarado A., Paredes G., Huayané E. 2011. Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña) comparado con el Fluconazol en el cultivo de *Candida albicans*. CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana ISSN: 1680-8398 I
4. Alderman DJ, Hastings TS. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance, potential for consumer health risks. Int J Food Sci Technol; 33: 139-55.
5. Álvarez, D.; Chang, G.; Mendizábal, R.; Roggero, M. 2000. Seminario de Agrogocios. Eucalipto. Universidad del Pacífico. pp. 17-33.
6. Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, G. 2001. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. In Anales de la Facultad de Medicina (Vol. 62, No. 2, pp. 156-161). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
7. Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. Annual Review of Fish Diseases. 2: 281-307.
8. Angulo F. 2000. Antimicrobial agents in aquaculture: Potential impact on public health. APUA Newslett; 18: 1,4-5
9. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 2000. Official methods of analysis of association of official analytical chemists. 17 ed. Arlington: AOAC, v. 1/2
10. Augusto W. 1975. Tesis de bachiller para Químico. “Fraccionamiento del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) y su aplicación en la inhibición del brotamiento de papa cultivar mariva” Lima: UNALM.
11. Ávila, Z. G. *et al.* 2001. Química Orgánica, Experimentos con un enfoque ecológico, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM, México.

12. Avilez I., Altran A., Aguiar L., Moraes G. 2004. Haematological responses of the neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 139: 135-139
13. Azaña, Isaac 2010. Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de odontología. E. A. P de Odontología. Lima- Perú
14. Bakrim S., Ouarour A., Jaidann K., Benajiba M., Masrar A. 2018. Profil de l'hémogramme et intérêt de la mesure de l'hémoglobine pré-don chez des donneurs de sang de la région Nord-Ouest du Maroc. *Transfus. Clin. Biol.* 25: 35-43.
15. Banchio E., Zygadlo J., Valladares G. 2005. "Effects of Mechanical wounding on essential oil and emission of volatiles from *Minthostachys mollis*". Centro de Investigaciones Entomológicas, FCEFYN, Universidad Nacional de Córdoba, *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 31, N°. 4
16. Barandica Cañón, L. 2010. Efectos de las dietas experimentales en la respuesta inmune de los peces.
17. Belo M., Schalch S., Moraes F., Soares V., Otoboni A., Moraes J. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in teleost fish *Piaractus mesopotamicus*. *J Comp Pathol* 133:146–154
18. Biller-Takahashi, JD, Takahashi, LS, Saita, MV, Gimbo, RY, and Urbinati, EC. 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacú *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 73(2), 425-429.
- Bouchra, Chebli.; Achouri, Mohamed; Idrissi Hassani, L.M; Hmamouchi, Mohamed *et al.* 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology* 89 (1): 165-169.
19. Bousbia, N., Vian, M., Ferhat, M., Petitcola E., Meklati, B. y Chemat F. 2009. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hidrodifusión and gravity. *Food Chemistry* 114:355-362.
20. Botero M. y Zoot, D. 2004. "Comportamiento de los peces en la búsqueda y la captura del alimento" Grupo de Piscicultura, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. *Rev Col Cienc Pec* Vol. 17:1.

21. Brown L. 1993. Acuicultura para veterinarios. Abbott Laboratories, North Chicago, USA.
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=638588&pid=S0301-732X201100030000500005&lng=es
22. Bushman A. 2001. Impactos de acuicultura: El estado del conocimiento en Chile y el mundo. Terram Publicaciones, Santiago.
23. Cabello Felipe C. 2003. Antibióticos y acuicultura. Un análisis de sus potenciales impactos para el medio ambiente y la salud humana y animal en Chile. Análisis de Políticas Públicas. Organización Terram, Publicación N° 17.
24. Cadwell S, J Rummer, C Brauner. 2006. Blood sampling techniques and storage duration: effects on the presence and magnitude of the red blood cell B-adrenergic response in rainbow trout
25. (Oncorhynchus mykiss). *Comp Biochem Physiol a Mol Integr Physiol* 162, 94-100
26. Cabello, Felipe C. 2004. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista médica de Chile*, 132(8), 1001-1006
27. Campbell T. 2017. Exotic animal hematology and cytology. 4ª ed. Wiley-Blackwell, USA, Pp 424.
28. Cantelmo, O.A. 1993. Niveis de proteina e energia em dietas para o crescimento do pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Dissertacao apresentada para obtencao do título do Mestre em Aquicultura. UFSC.
29. Cano C. M. 2007. Tesis de Maestría para Magister en recursos vegetales y terapéuticos “Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña)”. Lima- UNMS
30. Carhuapoma M 2002. Plantas medicinales aromáticas nativas de la provincia de Huamanga y sus perspectivas económicas” Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico UNSCH, Facultad de Ciencias Biológicas.
31. Carhuapoma M y Bonilla R. 2007. “Composición química, actividad anti *Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling Urca muña”. Tesis para optar el grado académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica de Químico Farmacéutico UNSCH, Unidad de post grado.
32. Carhuapoma M, López S, Roque M, Velapatiño B, Bell C. 2009. “Actividad Antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb frente a cuatro cepas de bacteria Gram negativas”. *Rev. Acad. Perú Salud*, 16: 2. Pág.: 51-53.

33. Carneiro O. J. 1983. Níveis de proteína e energia na alimentação do Pacú, *Piaractus mesopotamicus*. Dissertação para obtenção do título de mestre em ciências. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. Brasil. P 55
34. Chaquilla G., Waldir D.; Escalante E.; Torres V.; Ballinas M.; Gastélum M., Nevárez V. 2011. Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña *Minthostachys setosa* Briq. Epl. y anís *Pimpinella anísom* L. En Revista ECIPERÚ 107, Volumen 8, número 2.
35. Clark R. 1999. Activation of neutrophil respiratory bursts oxidase. J Infect Dis. Suppl2: 309-17.
36. Clauss T., Dove A., Arnold J. 2008. Hematologic disorders of fish. Vet. Clin. Exot. Anim. 11: 445-462.
37. Castaño H.I.P., Ciro G.G., Zapata J.E.M., Jiménez S.L.R. 2010. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. VITAE Rev. Fac. Quim. Farmac. 17:149-154.
38. Castro, M., Claudiano G., Bortoluzzi N., Garrido E., Fujimoto R., Belo M., Shimada M., Moraes J., Moraes F., 2014. *Chromium carbocholate* dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*, Aquaculture. 432, 114-118. 474
39. Carrillo W. 2013. Lisozima: Actividad Antibacteriana y alergenicidad. Actualización en Nutrición. 14(4): 314-326.
40. Cedraz A, Rivas F, Lima E, Heinzmann B, Baldisserotto B, Caron B, *et al.* 2016. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* X *Colossoma macropomum*). Aquaculture. 465: 374-379.
41. Cerpa Chavéz, M.G. 2007. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Tesis doctoral no publicado, Universidad de Valladolid, Valladolid, España <http://hydrodistiller.110mb.com/presentacion.html>
42. Chopra A, Houston C. 1999. Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. Review. Microbes infect; 1:1129-1137.
43. Ciftci S., Cicik B., Erdem C., Ay O. 2008. Effects of Lead Concentrations on Sera Parameters and Hematocrit Levels in *Anguilla anguilla* L, 1758. J. Fish Sci. Com. 2(4): 616-622.

44. Cipriano, R. C., & Bullock, G. L. 2001. Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. National Fish Health Research Laboratory.
45. Código Acuático, 2016. El Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la OIE (Código Acuático) establece las normas para mejorar la sanidad de los animales acuáticos y el bienestar de los peces de cultivo en el mundo, así como el comercio internacional seguro de animales acuáticos (anfibios, crustáceos, moluscos y peces) y de sus productos derivados. 19ª edición, Capítulo 5.1.
46. Codex Alimentarius Commission. 2001. Codex Standards and other related texts adopted by the Commission
<http://www.codexalimentarius.net/STANDARD/standard.htm> [cited 24 April 2002].
47. Collazos, C. 1996. Tabla peruana de composición de alimentos. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición.
7ma. Ed. Lima-Perú.
48. Comisión Europea, Directiva DGXI. (EEC) 1995. Disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Nº L358, ISSN 0378-6978). “Sacrificio de un animal con el mínimo sufrimiento físico y mental, dependiendo de las especies”. Artículo 2(1).
49. CONAPESCA, 2013. Desarrollo e importancia de la Acuicultura en los países en desarrollo.
http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/con_acuicultura
50. CONICYT, 2009. Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal.
<http://www.conicyt.cl/documentos/bioetica19nov.pdf>. Última consulta: 19 mayo 2011.
51. Cnaani, A; Tinman, S.; Avidar, Ron M. y Hulata, G. 2004. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquaculture Research*, v. 35, p.1434-1440,
52. Collier HB. 1944. Standardizations of blood haemoglobin determinations. *Can Med Assoc J* 50: 550-552
53. Contreras G. 1983. Actividad antimicrobiana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a bacterias enteropatógenas. Tesis para optar el Título de Biólogo UNALM. Lima; 52-73.

54. Coquet L., Cosette P., Quillet L., Petit F., Junter G. and Jouenne T. 2002 Occurrence and phenotypic characterization of *Yersinia ruckeri* strains with biofilm-forming capacity in a rainbow trout farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 470-475.
55. Cremonesini D y Thomson A. 2008. Lung colonization with *Aeromonas hydrophila* in cystic fibrosis believed to have come from a tropical fish tank. *J R Soc Med.*; 101: S44-45.
56. Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, Nueva York.
57. Custódio J, Moraes G, Pala G, Umeda S, Kotzent S, Miller A, *et al.* 2017. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacú *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*. 471: 72-79.
58. Da Cunha J, Avila C, Pedroso V, Willrich L, Henneman B, Piccinin C, *et al.* 2018. The antibacterial and physiological effects of pure and nanoencapsulated *Origanum majorana* essential oil on fish infected with *Aeromonas hydrophila*. *Microbial pathogenesis*. 124: 116-121.
59. Díaz, A. 2009. *Diseño estadístico de experimentos* 2a Ed. Universidad de Antioquia.
60. Dos Santos A, Sutili F, Heinzmann B, Cunha M, Brusque I, Baldisserotto B, *et al.* 2017. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish immunology*. 62: 213-216.
61. Dotta, G., de Andrade, J., Gonçalves, E., Brum, A., Mattos, J., Maraschin, M., Martins, M., 2014. Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in *Nile tilapia fed* 569
62. Farley, Derek R.; Valerie Howland 2006. «The natural variation of the pulegone content in various oils of peppermint». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31 (11): 1143-1151.
63. FARIA, B. (2016). Técnicas de contagem de leucócitos e parâmetros hematológicos para espécies nativas de peixes (Master's thesis, Universidade Federal do Espírito Santo).
64. Farnsworth, N. 1989. Las Plantas Medicinales en la Terapéutica Vol. of Sain Panama 107(4).

65. Farsani, M. N., Hoseinifar, S. H., Rashidian, G., Farsani, H. G., Ashouri, G., & Van Doan, H. 2019. Dietary effects of *Coriandrum sativum* extract on growth performance, physiological and innate immune responses and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Yersinia ruckeri*. *Fish & shellfish immunology*, 91, 233-240.
66. Flores H. y Rendíc., J. 2011. Conducta alimenticia, supervivencia y crecimiento de juveniles silvestres de *Graus nigra Philippi*, 1887 en cautiverio (*Perciformes: Kyphosidae*). *Latin american journal of aquatic research*, 39(3), 607-612
67. Food and Agriculture Organization (FAO). 2016. “El estado Mundial De La Pesca y Acuicultura”, Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos, Roma
68. Franz C, Husnu K, Windisch W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding- A European perspective. A review. *Flavour Fragr J*. 25: 327-340.
69. Froese Rainer y Pauly Daniel. 2005. En FishBase “*Piaractus mesopotamicus*”. N.p eds.: FishBase
70. Fuertes C y Murguía Y. 2001. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Rev. Ciencia e Investigación*; VI(1): 23-39.
71. Goldenfarb, P. B., Bowyer, F. P., Hall, E., & Brosious, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56(1), 35-39.
72. Gholipourkanani H, Jamali F, Jafaryan H, Gholamalipour A. Dietary effect of *Lippia citrodora* essential oil on some hematological, biochemical, growth performance and body composition of *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*. 3:1-15.
73. Gorbach SL. 2001. Antimicrobial use in animal feed. Time to stop. *N Engl J Med*; 345: 1202-3.
74. Gordon, W. Perry *et al.*; Valerie Howland 1982. «Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse». *Toxicology and Applied Pharmacology* 65 (3): 413-424.
75. Guan, W., Li, S., Yan, R., Thang, S. y Quan, C. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and the traditional extraction methods. *Food Chemistry*. 101:1558-1564.

76. Heredia-Ortíz, C. Y., Orozco-Guerrero, M. L., Rubiano, C. P., & Martin, D. A. (2019). Actividad antibacteriana de extractos alcohólicos de hojas de *Solanum dolichosepalum* (Bitter). *Informador Técnico*, 83(2), 121-130.
77. Hoffmann E, Stroobant V. 1999. *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. 2^a ed. Paris: Jonh Wiley & Sons LTD.
78. Hontela, A. 1998. Interrenal disfunction in fish from contaminated sites: In vivo and in vitro assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (1): 44-48.
79. Immanuel, R.P, Uma, P. Iyapparaj, T. Citarasu, S. *et al.*, 2009 Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus* Department of Marine Biotechnology, Centre for Marine Science and Technology, M. S. University, Rajakkamangalam-629 502, K. K. District, Tamil Nadu, India.
80. Instituto Nacional de Estadística e Informática 2005. Banco de Información Distrital». Archivado desde el original el 16 de febrero de 2009. Consultado el 16 de febrero de 2009.
81. Isman MB 2006 Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51: 45–66.
82. Janda, JM, Abbott SL. 2000. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2010; Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. Global Invasive Species Database. Publicado por el Grupo Especialista de Especies Invasoras (GEEI), de la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN), 12pp.23:35-73.
83. Jentoft S., Aastveit A., Torjesen P., Andersen O. 2005. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 141: 353-358.
84. Laboratorio Pathovet. 2016. Anestesia y toma de muestras de sangre para diagnóstico de patología clínica, 3ra ed.
85. Limma-Netto J, Cena A, Copatti C. 2016. Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogum flexuosus* in the sedation, anesthesia and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Male X *Colossoma macropomum* Female). *Bol Inst Pesca*. 42(3): 727-733.

86. Lock De Ugaz, O. 1994 Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Producto Naturales. 2da. Ed. Editorial de la Pontifica Universidad Católica del Perú, Lima. pp. 1 - 53, 281.
87. Luján Velásquez, M. N. 2010. Propiedad inmunopotenciadora y mecanismos de acción de *chondracanthus chamissoi* y *minthostachys mollis* en la proliferación y diferenciación de los linfocitos y en la producción de anticuerpos en *gallus gallus domesticus* y *oryctolagus cuniculus* inoculados con *listeria monocytogenes*.
88. Manual for International Training 1991. Course on Fresh-Water FISH Diseases and Intoxications: Diagnostics, Prophylaxis and THERAPY.
89. Martinez, A. 2003. Aceites esenciales. Universidad de Antioquia Medellín Colombia. Accesada: 04/12/2008.
<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>
90. Martins M., Moraes, F., Moraes J., Malqueiros E. 2001. Falha na resposta do cortisol estresse por captura e por carragenina B. Inst. Pesca, São Paulo, 29(2): 109 - 115, 2003 114 TAVARES-DIAS et al. em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Acta Scientiarum, 22: 545-552.
91. McNair, Harold M. and Miller, James M. 1998. *Basic Gas Chromatography*. Canada: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-17261-8
92. Morales S Miguel A. 2004. "En las Raíces está el Futuro". Fitomedicina y Fitoterapia, Anuario de Chile 2003/2004. Ediciones Universidad de Chile. Editores: Juan Pablo Cárdenas y Roberto Meza; Santiago de Chile, Edición de 196 páginas.
93. Monroy, G. 2005. Atlas básico de células sanguíneas normales y anormales de la tilapia cultivada. Hematología: Ambiente y nutrición en la salud de los peces. USSEC, ASA, USB.
94. Moriya M. 1881. «Contributions from the Laboratory of the University of Tôkiô, Japan. No. IV. On menthol or peppermint camphor». Journal of the Chemical Society, Transactions 39: 77-83.
95. Muñoz, D., de Fermín, Y. C., de Marín, C. G., & Marval, H. (2012). Prevalencia y susceptibilidad antibiótica de cepas móviles de *Aeromonas* aisladas del ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae*). Revista Científica, 22(6), 565-573.
96. Nielsen M. and Gassent M. 2006. The immune system: present knowledge and the need for research. J Fish Dis; 29:65-78
97. Noro M, Wittwer F. 2012. Hematología de Salmonídeos. 1ª ed. Imprenta America, Chile. Pp 45.

98. Núñez M., Pozo M. y Valladares J. 2001. Concentración Inhibitoria Mínima de tres extractos de plantas medicinales sobre bacterias del género *Aeromonas*, causante de enfermedades en peces.
99. Oliveira, S., Souza, R., Brasil, E. M., Andrade, J., Nunes, É., Ono, E., & Affonso, E. G. 2011. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Amazonica*, 41(2), 321-326.
100. Oliveira, D. et al., 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* HBK, *Food Chemistry*, 101(1), 236–240.
101. Orduño Sánchez, M. F. 2006. *Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes*. Alicante: AIYANA. España. 274p.
102. Patra J.K. and Baek K.H. 2016. Antibacterial activity and action mechanism of the essential oil from *Enteromorpha linza* L. against foodborne pathogenic bacteria. *Molecules*. 21:1-11.
103. Parakrama K. S. 1998. Insecticide resistance in insects: a review. *Ceylan Journal of Science* 25: 72–99
104. Peña S. y Gutiérrez R. 2017. “Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas”. *Rev. Ciencia y Tecnología*, v. 13, n. 3, pp. 55 – 66.
105. Peñaloza Castañeda, N. 2010. Estandarización de la técnica para la evaluación del estallido respiratorio de células fagocíticas mediante citometría de flujo (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).
106. Peredo H., Luna E., Palou, García, López A, Malo 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de alimentos* 3-1: 24- 32.
107. Sahoo P., Kumari J. and Mishra B. 2005. Non- specific immune responses in juveniles of Indian major carps- *Journal of Applied Ichthyology*. 21(2), 151-155.
108. Shaaya E and Rafaeli A. 2007. Essential oils as biorational insecticides – potency and mode of action. *Insecticides Design Using Advanced Technologies* (ed. by I Ishaaya, R Nauen &
109. Santos F. y Galcerán M. 2002. The application of gas chromatography to environmental analysis. *Trends Anal Chem.*; 21:672-85
110. Sobenes C., García L. A., Habit C. y Link L. 2012. Manutención de peces nativos dulceacuícolas de Chile en cautiverio: Un aporte a su conservación ex situ. *Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile, Universidad de Concepción, Barrio Universitario. Boletín de Biodiversidad de Chile* 7: 27–41.

111. Sorroza, L. S. 2018. Estudio preliminar de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura. *Revista AquaTIC*, (49), 1-7.
112. SINCHI – INADE. 1999. Compatibilización de la zonificación ecológica económica: Plan (Colombo- peruano – brasileño) para el desarrollo integral de la Cuenca del río Putumayo. Institutos Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI, Colombia/ Instituto Nacional de Desarrollo – INADE. CIDI/OEA 91 pp.
113. Stradmeyer LA. 1989. A behavioural method to test feeding responses of fish to pelleted diets. *Aquaculture*. 79:303-10.
114. Suárez, W., & Herrera, F. (2011). Isolation of *Aeromonas spp.* in fresh fish samples marketed in Pamplona (norte de Santander). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 7-13.
115. Rao Y., Das B., Jyotirmayee P., Chakrabarti R. 2006. Effect of *Achyranthes vaspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 20(3): 263-273.
116. Rhodes G, Huys G, Swings J, Mc Gann P, Hiney M, Smith P *et al.* 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 3883-9.
117. Ribeiro S, Castelo A, da Silva B, Cunha A, Proietti A, Oba-Yoshioka E. 2016. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Acta Amazonica*, 46: 99-106.
118. Rincón-Mejía, C.A., Castaño-Osorio, J. Carlos, and Ríos-Vázquez, E. 2012. Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *Rev. Cub. Plantas Med.* 17:160-171.
119. Robles, P. 2005. Manual de operaciones del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales: PEO extracción fraccionada, PEO concentración usando rotavapor, PEO extracción de aceites esenciales por Neoclevenger. Guatemala, USAC. p. 1-3.
120. Rodríguez, J. M. F., & Hernández, J. A. P. 1998. Aislamiento de *Aeromona hydrphila* en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinaria México*, 29(1), 117-119.
121. Sarkar, A., Mousumi S., Pranab R. 2012. Identification and typing of *Aeromonas hydrophila* through 16S rDNA-PCR fingerprinting. *J Aquac Res Development*.

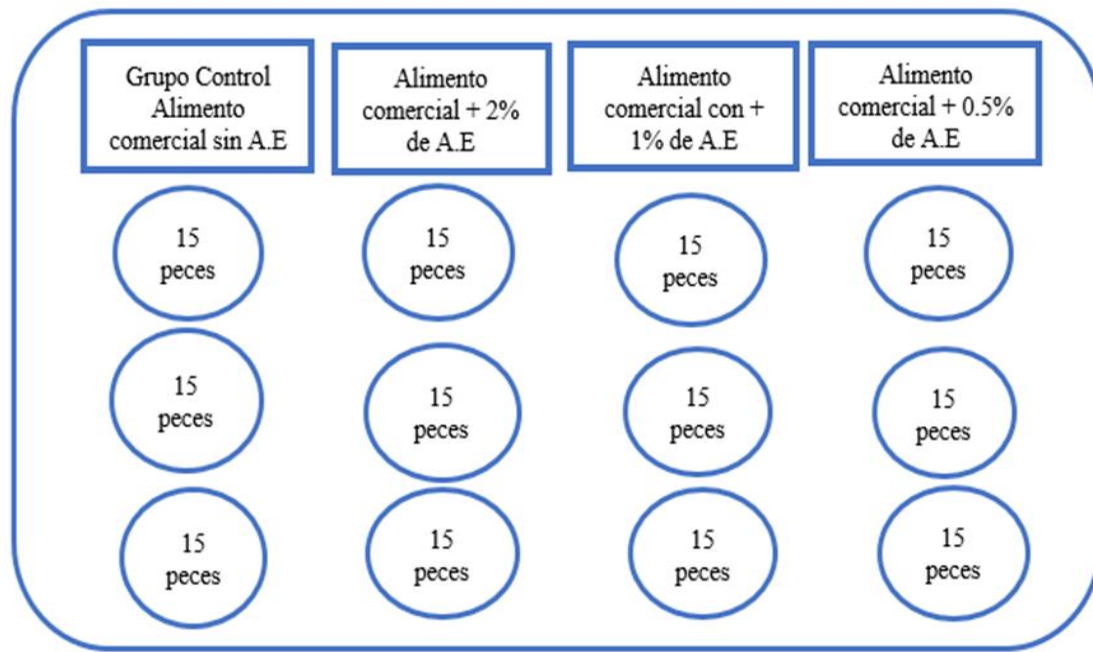
- 122.Sahu S, Das B, Mishra B, Pradhan J, Sarangi N. 2007. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *J Appl Ichthyol.* 23: 80-86.
- 123.Takemura, A., y Takano, K. 1995. Lysozyme in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): its purification and some biological properties. *Fish Physiol Biochem.* 14(5): 415-21
- 124.Tavares M., Teenani R. Gioli R. y Faustino D. 1999. Características hematológicas de teleósteos brasileiros - Parámetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) em policultivo intensivo. *Rev. Bras. Zool.* (Curitiba) 16(2): 423-431.
- 125.Tavares D. y Mataqueiro M. 2004. Características hematológicas bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmber, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo: *Acta scientiarum. Biological sciences.* 26:1577-62
- 126.Tavares-Dias M. 2006. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleost. *J Fish Biol* 68, 1822-1833.
- 127.Tavares-Dias, M., & Moraes, F. R. (2010). Parametros bioquímicos de *Piaractus mesopotamicus* E *Colossoma macropomum* (*Characidae*) e Híbrido Tambaquí (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*). *Ciência Animal Brasileira*, 11(2), 363-368.
- 128.Thongson, C. Davison P., Mahakarnchanakul W. y Weiss J. 2004. Antimicrobial activity of ultrasound- assisted and solvent- extracted spices. *Letters in Applied Microbiology.* 39: 401-406.
- 129.Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicolla D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.* Lippincott Williams & Wilkins, USA, Pp. 776
- 130.Teuber M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*; 4: 493-9
- 131.Tort L., Balasch J. and Mackenzie S. 2005. Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contributions to Science* 2-4, 443-454.
- 132.Torrenegra-Alarcón, M., Granados-Conde, C., Durán-Lengua, M., León-Méndez, G., Yáñez-Rueda, X., Martínez, C., y Pájaro-Castro, N. 2016. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia*, 20(1), 69-74.
- 133.Travis J. 2009. On the origin of the immune system. *Science*; 324:580-582.

134. Urbinati E. e. Gonçalves F. 2005. Pacú (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B., e L.C. Gomes (eds). Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil. UFMS. Santa Maria. Brasil. pp: 225–246.
135. Yamini Y., Khajeh M., Ghasem E., Mirza M. y Javidnia, K. 2008. Comparison of essential oil composition of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 108:341-346.
136. Yunis A., Fernandes D., Eto S., Claudiano G., Marcusso P., Marinho N., Fernandes J., Moraes F, Moraes J. 2006. Dietary camu camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia, Fish and Shellfish Immunology doi: 10.1016/j.fsi.2016.08.030
137. Valladao G, Gallani S, Ikefuti C, da Cruz C, Levy-Pereira N, Rodriguez M, *et al.* 2016 Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacú, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *Fish diseases*. 39(10): 1143-1152.
138. Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S. 1997. Digestión, absorción y transporte de los ácidos grasos: Una perspectiva diferente en la interpretación de sus efectos nutricionales. *Aceites y Grasas*; IX: 582-588.
139. Vasquez, T. W. 2001. Exigências de proteína, gordura e carboidratos em dietas para crescimento de juvenis de *Pirapitinga*, *Piaractus brachypomus*. Tese de Doutorado. Programa de Biología Tropical e Recursos Naturais. - Curso Biología de água Doce e Pesca Interior. Universidade de Amazonas-Instituto de Pesquisas da Amazônia, Tese de Doutorado. Manaus-Brasil. 89 p.
140. Ventura A, Sousa T, Zanon R, Kioshi L, Lima C. 2019. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical *Piaractus mesopotamicus* to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. *Int Aquat Res*. 11: <https://doi.org/10.1007/s40071-019-0215-z>.
141. Vocadlo D., Davies G., Laine R., Withers S. 2001. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412 (6849): 835-8
142. Wahli, T. 2002. Approaches to investigate environmental impacts on fish health. *Fish Biology* 24: 545-552.
143. Wang, X., Wang, Y., Li, Y., Huang, M., Gao, Y., Xue, X., ... and Gonçalves, R. A. 2016. Response of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) to different dietary concentrations of aflatoxin B1 and evaluation of an aflatoxin binder in offsetting its negative effects. *Ciencias Marinas*, 42(1), 15-29.

144. Weiss DJ, Wardrop KJ. 2010. Schalm's Veterinary Hematology. 6^a ed. Wiley-Blackwell, USA, Pp.1232.
145. Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
146. Wicki, G., Rossi, F. y Luchini, L. 2004. Crecimiento compensatorio en *Piaractus mesopotamicus* y su importancia en producción. In XI Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Tabasco, Mexico
147. Wicki G., Rossi F., Martín S, Panné S., Huidobro, Luchini L. 2007. Engorde final de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) con raciones basadas en subproductos de maíz, girasol y ensilado ácido. *Revista AquaTIC*, N° 26, pp. 1-8.
- Zegarra G. 2010. Actividad detergente y acaricida de principios activos de quinuas amargas, aceites esenciales y tarwi. Tesis para optar el Título de Licenciado en Química. Facultad De Ciencias E Ingeniería. Pontificia Universidad Católica Del Perú. Lima, 89 pp.

ANEXOS

1. Distribución inicial de los grupos experimentales.



2. Constancia de clasificación botánica.

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

Constancia de clasificación botánica

El Ingeniero agrónomo Juan Tolentino Rodríguez con experiencia en la clasificación taxonómica y selección de plantas para la producción de aceites, pulverizados, extracción acuosa y otros derivados deja constancia de que:

Las plantas de muña compradas en el Mercado Modelo de Huancayo por la Médico Veterinario Zootecnista alumna de la maestría de Sanidad Acuicola Fariva Trilce Vicuña Alvarado clasificadas como *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb, se encuentran aptas para la elaboración del aceite y todos los racimos comprados y destinados para la elaboración del aceite esencial tienen la siguiente clasificación taxonómica según el sistema de clasificación de Cronquist (1981)

Reino: Vegetal

Sub reino: *Embryophyta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Methachlamydeae*

Orden: *Tubiflorae*

Familia: *Lamiaceae* (labiadas)

Género: *Minthostachys*

Especie: *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb

Nombre vulgar: "Muña"

También constante que el proceso de elaboración del aceite esencial de muña ha sido realizado correctamente siguiendo la técnica de arrastre de vapor sin el uso de aditivos que puedan ser tóxicos por lo que el aceite obtenido puede ser utilizado para consumo.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudio e investigación.


JUAN TOLENTEINO RODRIGUEZ
INGENIERO AGRÓNOMO
Reg. del Colegio de Ingenieros No. 35311

Huancayo, 18 de febrero del 2018

3. Promedio de los pesos y tallas de los peces correspondiente a cada grupo experimental.

PARÁMETROS		PESO (gr)	TALLA (cm)
GRUPO			
CONTROL	Caja 1	126.5	15.2
	Caja 2	127.57	14.73
	Caja 3	139.5	15.27
DOSIS 2%	Caja 1	123.47	14.83
	Caja 2	110.33	14.83
	Caja 3	159.47	15.43
DOSIS 1%	Caja 1	121.47	14.57
	Caja 2	134.67	15.33
	Caja 3	136.93	15.23
DOSIS 0.5%	Caja 1	110.93	14.57
	Caja 2	136.93	15.27
	Caja 3	145.73	15.27

4. Promedio de peso y talla de los grupos al inicio del experimento.

PARÁMETROS		PROMEDIO	
GRUPOS		PESO (gr)	TALLA (cm)
	CONTROL		131.19
DOSIS 2%		131.09	15.03
DOSIS 1%		131.02	15.04
DOSIS 0.5%		131.19	15.03

5. Resultados de la prueba de palatabilidad para determinar la mayor concentración de A.E aceptada por los peces.

PARÁMETROS DOSIS	CONSUMO DE ALIMENTO	CALIDAD DE AGUA		
		SUPERFICIE	OXÍGENO DISUELTO	pH
5%	NADA	Aceitosa / turbia	35,5 %	5.7
3%	1/4	Poco aceitosa	45,6 %	6.6
2%	TODO	Limpia	56,5%	7.2

6. Resultados del análisis bromatológico del alimento sin y con A.E

Alimento	% MS	% PB	% GRASA	% FIBRA B	% CH	% CENIZA	% HUMEDAD
Ración	89.39	35.18	7.6	6.3	13.71	13,7	10,2
Ración 2%	89.58	35.65	8.0	6.3	13.83	13,7	9,8
Ración 1%	89.39	35.18	7.6	6.3	13.71	13,7	10,2

Donde:

*Ración: alimento peletizado sin aceite esencial

*Ración 2%: alimento peletizado con 2% de aceite esencial

*Ración 1%: alimento peletizado con 1% de aceite esencial

% MS: porcentaje de materia seca

%PB: porcentaje de proteína bruta

% FIBRA B: porcentaje de fibra bruta

% CH: porcentaje de carbohidratos

7. Cantidad de alimento en gramos suministrado a los peces durante los 30 días del experimento

GRUPOS	1PEZ (gr)	3%PV	# PEZ/CAJA	30 días 1 pez	TOTAL GRUPO	# 30 DIAS
CONTROL	131.19	3.94	59.04	118.07	177.11	5 313.20
DOSIS 2%	131.09	3.93	58.99	117.98	176.97	5 309.15
DOSIS 1%	131.02	3.93	58.96	117.92	176.88	5 306.31
DOSIS 0.05%	131.19	3.94	59.04	118.07	177.11	5 313.20
TOTAL				472.04	708.06	21 41.85

*PV: peso vivo

8. Cantidad de A.E en (mL) suministrada en el alimento y la cantidad esperada de consumo del A.E por pez y por grupo.

GRUPOS	1 PEZ A.E	30 días A.E	Total, A.E Grupo
DOSIS 2%	0.0787	2.361	106.25
DOSIS 1%	0.0393	1.179	53.091
DOSIS 0.05%	0.0197	0.59	26.57
TOTAL			185.91 mL

9. Resultados del ensayo para determinar la concentración bacteriana a utilizar en el estudio.

PARÁMETROS	TIEMPO DE MUERTE	SIGNOS CLÍNICOS POS 24 H	CARACTERÍSTICAS DEL AGUA
UFC/mL			
5.20×10^{-6} UFC/mL	7 horas	Sin signos	Sin cambios
3.50×10^{-6} UFC/mL	24 horas	Nado errático	Poca turbidez
3.05×10^{-6} UFC/mL	= 72 horas	Nado errático, lesiones en piel	Turbidez, abundante mucosidad
2.12×10^{-6} UFC/mL	> 72 horas	Nado errático, lesiones en piel	Turbidez y mucosidad

