

Actividad antibacteriana de extractos hexánico y etanólico de macroalgas marinas de la Bahía de Ancón, Lima – Perú

Antibacterial activity of hexane and ethanolic extracts of marine macroalgae of the Bay of Ancón, Lima – Peru

Ramón Muñoz A.¹, Selma Santome², Jorge León Q.^{1,3}

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron las actividades antimicrobianas de extractos etanólicos y hexánicos de nueve especies de macroalgas marinas recolectadas en la zona intermareal de la playa San Francisco, Ancón, de Lima, Perú. La evaluación se realizó *in vitro* frente a un panel de bacterias estándar Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Enterococcus faecalis* ATCC 51922) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028). Los extractos etanólicos fueron de mayor rendimiento (67%) en comparación a los hexánicos (33%), en especial frente a los Gram positivos, siendo el extracto obtenido de *Ulva enteromorpha* var. *intestinalis* y *U. nematoidea* los más activos frente a *S. aureus* ATCC 6538 (74.1 y 78.2 % de inhibición, respectivamente). Los extractos etanólicos de *Cladophora* sp y *U. nematoidea* frente a *B. subtilis* ATCC 6633 presentaron inhibiciones entre moderada y baja (52.5 y 33%, respectivamente). Los extractos etanólicos de *U. enteromorpha* y *Cladophora* sp frente a *S. Typhimurium* presentaron solo 40% de inhibición. El extracto etanólico de *Cladophora* sp fue el único que presentó actividad antimicrobiana frente a las cinco cepas bacterianas y fue elegida para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que resultó en 12.5 y 25 mg/ml frente a *B. subtilis* ATCC 6633 y *S. aureus* ATCC 6538, respectivamente. Se concluye que, la mayoría de las macroalgas estudiadas contienen compuestos inhibitorios, cuyos extractos etanólico y hexánico son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas.

Palabras clave: algas marinas, extractos orgánicos, patógenos de humanos, actividad antimicrobiana

¹ Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

³ E-mail: jleonq@unmsm.edu.pe

Recibido: 4 de mayo de 2019

Aceptado para publicación: 23 de marzo de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

ABSTRACT

The antimicrobial activities of ethanolic and hexane extracts of nine species of marine macroalgae collected in the intertidal zone of the San Francisco beach, Ancón, in Lima, Peru were evaluated. It was performed *in vitro* against a panel of standard Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Enterococcus faecalis* ATCC 51922) and Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Salmonella* Typhimurium 14028). The ethanolic extracts were of higher yield (67%) compared to hexanes (33%), especially against the Gram-positive, being the extract obtained from *Ulva enteromorpha* var. *intestinalis* and *U. nematoidea* the most efficient against *S. aureus* ATCC 6538 (74.1 and 78.2% inhibition, respectively). The ethanol extracts of *Cladophora* sp and *U. nematoidea* against *B. subtilis* ATCC 6633 showed moderate to low inhibitions (52.5 and 33%, respectively). The ethanolic extracts of *U. enteromorpha* and *Cladophora* sp against *S. Typhimurium* showed only 40% inhibition. The ethanol extract of *Cladophora* sp was the only one that presented antimicrobial activity against the five bacterial strains and therefore it was chosen to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), which resulted in 12.5 and 25 mg/ml against *B. subtilis* ATCC 6633 and *S. aureus* ATCC 6538, respectively. It is concluded that most of the macroalgae studied contain inhibitory compounds, whose ethanolic and hexane extracts are capable of inhibiting the growth of pathogenic bacteria.

Key words: seaweed, organic extracts, human pathogens, antimicrobial activity

INTRODUCCIÓN

Las algas marinas son consideradas como una rica fuente de metabolitos secundarios con estructuras y funciones muy diversas. En su ambiente natural, tales metabolitos estarían involucrados en la defensa contra organismos herbívoros e invasión de patógenos, así como en la protección contra la radiación UV y como agentes alelopáticos (Watson y Cruz-Rivera, 2003).

Las algas marinas o macroalgas proporcionan una gran variedad de metabolitos y compuestos bioactivos naturales como polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, florotaninos y otros compuestos fenólicos y carotenoides (Pérez *et al.*, 2016). Muchas especies han mostrado tener sustancias con efectos antimicrobianos, en especial bactericidas o bacteriostáticos (Taskin *et al.*, 2010), cuyas estructuras corresponden a ciertos tipos de aminoácidos, terpenoides, florotaninos, ácido acrílico, compuestos

fenólicos, esteroides, cetonas y alcanos halogenados, así como polisulfuros cíclicos y ácidos grasos (Watson y Cruz-Rivera, 2003). La gran variedad de algas marinas hace de este recurso una fuente potencial de fármacos y un campo abierto a la investigación en farmacognosia marina (De Lara-Isassi y Lozano, 1989).

Las investigaciones actuales sobre estas sustancias están orientadas a la búsqueda de nuevos metabolitos con propiedades biomédicas y farmacológicas y sus aplicaciones en el área de la salud pública (Gutiérrez *et al.*, 2016, Montoya *et al.* 2017). Las algas marinas, en especial las macroalgas, han recibido especial atención por ser potenciales fuentes de compuestos bioactivos con amplio espectro de actividades biológicas que incluyen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antiparasitarias y antioxidantes, entre otras (Magallanes *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2007; Ríos *et al.*, 2009; Cox *et al.*, 2010, Pérez *et al.*, 2016).

El gran potencial que tienen actualmente las algas marinas en la producción de nuevos compuestos naturales y sus posibles aplicaciones como medicamentos, ingredientes biológicos o farmacológicos, nutraceuticos, ingredientes alimentarios funcionales, etc. ha provocado en muchas partes del mundo el interés por este recurso natural (Freile & Morales, 2004; Montoya *et al.*, 2017).

Por otro lado, es ampliamente conocido el problema de la multi-resistencia antibiótica en el tratamiento de los principales patógenos, debido principalmente por el uso excesivo de fármacos que han facilitado la proliferación de microorganismos altamente resistentes a varios quimioterápicos (Shanmughapriya *et al.*, 2008; Shafay *et al.*, 2015). En este sentido, las investigaciones sobre la actividad antibacteriana de extractos de algas marinas abren un abanico de posibilidades en la búsqueda de nuevas moléculas bio-activas que pueden ser alternativas para enfrentar a las bacterias patógenas drogo-resistentes (Gutiérrez *et al.*, 2016). La revisión bibliográfica sobre el potencial terapéutico de macroalgas marinas indica que producen una amplia variedad de metabolitos secundarios que podrían ser aprovechados en el marco de la biotecnología marina (Troncoso *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2016).

En Perú son pocos los estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de macroalgas, donde Balta (1988) reportó *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) y *Polysiphonia paniculata* (Rhodophyta) con capacidad antibacteriana y Magallanes *et al.* (2003) mencionó a *Grateloupia doryphora*, *Ahnfeltiopsis durvillaei*, *Prionitis decipiens*, *Petalonia fascia* y *Bryopsis plumosa*. Así, el presente trabajo de investigación buscó determinar la actividad antimicrobiana de extractos hexánicos y etanólicos obtenidos a partir de macroalgas marinas colectadas en la Bahía de Ancón (Lima, Perú).

MATERIALES Y MÉTODOS

Macroalgas Marinas

Las muestras de macroalgas fueron recolectadas manualmente en septiembre de 2013 en horas de marea baja en la zona intermareal de la Playa San Francisco (11°46'42" LS 77°11' LW) - Bahía de Ancón, Lima, Perú. Inmediato a la colecta se procedió a la limpieza de las muestras para remover las epífitas, partes necróticas y otros materiales extraños. Se lavaron cuidadosamente hasta tres veces con agua de mar estéril y llevadas al laboratorio en bolsas estériles de cierre hermético y refrigerado en hielo.

Las muestras fueron nuevamente enjuagadas con agua de mar estéril en el laboratorio y secadas en una estufa a 40°C por 24 h. Una parte de cada muestra fue destinada para la identificación, según el protocolo de identificación de macroalgas del laboratorio de Ficología Marina, Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Cepas de Bacterias Testigo

Se utilizaron como cepas testigo bacterias estándares de American Type Culture Collection (ATCC) de las especies *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Enterococcus faecalis* ATCC 51922, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Ecología Microbiana de la FCB-UNMSM.

Extractos Orgánicos

Las muestras secas se procesaron según Torres *et al.* (2017) con modificaciones. Se cortaron en trozos pequeños y luego fueron sometidos a molienda fina hasta obtener

un material pulverizado. Las muestras en polvo se remojaron con un solvente polar (etanol) y apolar (hexano), respectivamente (25 g/75 ml) y se mantuvieron durante 24 h en recipiente cerrado y en agitación constante de 120 rpm a temperatura de laboratorio. Luego el macerado se filtró utilizando papel Whatman N.º 1. El filtrado obtenido se sometió a concentración a presión reducida en un rotavapor (Buchi, R-3000) a 40 °C hasta obtener volúmenes más pequeños (5-10 ml). Estas muestras se llevaron a sequedad en un horno a 40 °C, y fueron almacenadas en refrigeración en recipientes de color ámbar hasta su uso en pruebas de actividad antibacteriana. Todo el proceso se llevó a cabo en esterilidad.

Inóculos Bacterianos

Los inóculos bacterianos se prepararon reactivando las cepas testigo en 10 ml de Caldo Cerebro Corazón (BHI) e incubando por 24 h a 37 °C. A partir de este cultivo se prepararon los inóculos por suspensión en solución salina (0.85% NaCl) estéril, equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland.

Actividad Antibacteriana

Esta prueba se determinó por el método modificado de difusión en pocillos en «doble capa» de agar (León *et al.*, 2010). Se realizaron en Agar Tripticasa Soya (TSA) más la adición de una segunda capa de agar semisólido al 0.73% conteniendo alícuotas de una suspensión bacteriana según la escala McFarland 0.5. Luego de la solidificación se prepararon pocillos (4 mm de diámetro) utilizando un sacabocado estéril. Para las pruebas, tanto el extracto hexánico como el etanólico fueron previamente re-suspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO) e inoculados (25 µl) a cada pocillo preparado. Las pruebas se realizaron por triplicado. Se pre-incubaron a 4 °C por 1 h, luego a 37 °C por 24 h. La pre-

sencia de halos de inhibición fue considerada como positiva de acción antibacteriana. Como control positivo se utilizó la estreptomina (500 mg/ml) y como negativo el DMSO.

El porcentaje de inhibición (%) de los extractos se determinó aplicando la fórmula (Cruz *et al.*, 2010): %Inhibición = $(DM-DB/DC-DB) \times 100$, donde DM: diámetro de la muestra (mm), DB: diámetro del blanco (mm) (DMSO), DC: diámetro del control positivo (mm) (estreptomina, 500 mg/ml). Una acción antibacteriana fue considerada alta cuando su porcentaje de inhibición es >70%, intermedia entre 50 y 70% y baja cuando es <50% (Ramírez, 2007).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se realizó siguiendo la metodología de microdilución en caldo (Boisvert *et al.*, 2015). Los extractos de macroalgas fueron re-suspendidos en DMSO y diluidos en proporciones de 1:2 (p/v). Las muestras (10 µl) de cada dilución se colocaron en pocillos de microplacas con adiciones de caldo tripticasa soya (80 µl) y la suspensión bacteriana (10 µl) (0.5 de escala McFarland). Luego de una incubación a 37 °C por 18 h se adicionó la solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (40 µl) a cada pocillo, para volver a incubar a 37 °C por 30 min adicionales. El viraje del medio a rojo indicó crecimiento microbiano. La estreptomina se utilizó como control positivo. La CMI se determinó como la concentración más baja del extracto que muestra inhibición del crecimiento del microorganismo ensayado.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba t de Student para la comparación de dos muestras independientes usando el programa IBM SPSS Statistics 21.0 y Excel v. 2010.

Cuadro 1. Macroalgas intermareales recolectadas en la Bahía de Ancón

División	Orden	Especie
Rhodophyta	Gigartinales	<i>Asterfilopsis furcellata</i>
		<i>Chondracanthus chamissoi</i>
	Ceramiales	<i>Polysiphonia</i> sp.
	Halymeniales	<i>Grateloupia doryphora</i>
Chlorophyta	Rhodymeniales	<i>Rhodymenia corallina</i>
	Cladophorales	<i>Cladophora</i> sp.
		Ulvales
		<i>Ulva lactuca</i>
		<i>Ulva enteromorpha</i> var. <i>intestinalis</i>

RESULTADOS

Las macroalgas fueron identificadas de pertenecer a nueve especies comprendidas en seis órdenes y dos divisiones (Cuadro 1) (Figura 1). Las principales características macroscópicas de estas algas se muestran en el Cuadro 2.

Los miembros de la División Chlorophyta, entre ellos los del Orden Ulvales y Cladophorales, fueron los principales productores de metabolitos bioactivos, cuyos extractos tanto hexánico como etanólico mostraron los halos de inhibición de mayor tamaño. De los 18 extractos de macroalgas que se ensayaron frente a seis bacterias indicadoras, 13 (72.2%) tuvieron actividad antimicrobiana al menos frente a un patógeno (Cuadro 3), siendo los más sensibles los Gram positivos *S. aureus* ATCC 6538 y *B. subtilis* ATCC 6633, seguido por el Gram negativo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. *E. coli* ATCC 25922 fue la única bacteria que mostró resistencia a la totalidad de

los extractos ensayados. Asimismo, los extractos de *Asterfilopsis furcellata* y *Chondracanthus chamissoi* no mostraron ninguna actividad antimicrobiana.

Del total de extractos ensayados, el etanólico de *U. nematoidea* y *U. enteromorpha* presentaron halos de inhibición de mayor tamaño y altos porcentajes de inhibición (17.3 y 16.6 mm y 78.2 y 74.1%, respectivamente), en ambos casos frente a cultivos de *S. aureus* ATCC 6538 (Figura 2A); en tanto que los extractos etanólicos de *U. lactuca*, *Polysiphonia* sp y *U. enteromorpha* var. *intestinalis* mostraron buena actividad, especialmente sobre *S. Typhimurium* ATCC 14028 (Figura 2B). *Cladophora* sp fue otra macroalga con mayor bioactividad, inhibiendo al menos 5 de las 6 cepas indicadoras y provocando halos de inhibición considerables, resaltando los extractos etanólicos por su actividad frente a *B. subtilis* ATCC 6633 (14.5 mm) (Figura 2C) y *S. Typhimurium* ATCC 14028. Por otro lado, *Polysiphonia* sp presentó considerable actividad frente a 5 cepas indicadoras, aunque

Cuadro 2. Características de macroalgas colectadas en la Playa San Francisco de la Bahía de Ancón (Lima, Perú)

Nombre científico	Características
<i>Asterfilopsis furcellata</i> (C. Agardh) M.S. Calderon & S.M. Boo	Presenta alternancia de fases heteromórfica. Los gametofitos son de color marrón rojizo, macroscópicos, con ramificación dicotómica que se hace irregular hacia la parte distal, de ejes cilíndricos y rígidos. Generalmente, la parte terminal de los ejes son aplanados. Esporofitos costrosos.
<i>Chondracanthus chamissoi</i> (C. Agardh) Kützing	Talos de color verde azulado, a distintas tonalidades de rojo, aplanado y de ramificación irregular. En los bordes y a veces en la superficie presentan proliferaciones con forma de papilas. Es comercializada con el nombre de “yuyo” para el consumo humano directo, así como para la extracción de carragenano.
<i>Polysiphonia</i> sp	Talo filamentosos ramificados de color rojo vinoso, En corte transversal presenta una célula central y con 8-10 células pericentrales. Los espermacios se ubican en una rama del tricoblasto. El cistocarpo es externo y globoso, contiene carposporas diploides. La fase tetrasporofítica es similar a la gametofítica, pero tiene tetrasporangios en varios segmentos de sus ramas terminales, lo cuales están divididos en forma tetraédrica.
<i>Grateloupia doryphora</i> (Montagne) M. Howe	Algas de color rojo oscuro de morfología laminar variable, encontrándose talos delgados y largos o anchos. Los bordes son lisos o con numerosas proliferaciones. Disco de fijación pequeño. Talo de consistencia elástica. Pueden llegar a medir hasta 1 m de longitud.
<i>Rhodymenia corallina</i> (Bory) Greville	Algas de color rojizo. Talo membranoso aplanado con ramificación dicotómica de ápices redondeados. Forma flabelada.
<i>Cladophora</i> sp	Alga filamentosos uniseriada y ramificada de coloración verde a verde amarillento. El crecimiento es apical y/o intercalar.
<i>Ulva nematoidea</i> Bory	Talo laminar alargado de color verde claro con bordes ondulados, alcanza longitudes superiores a 30 cm. En corte transversal, se observa un talo biestromático. Crece abundantemente en verano y otoño. Actualmente es comercializada bajo el nombre de “lechuga de mar”. Se utilizan como fertilizantes en la agricultura. Su biomasa se incrementa en presencia de materia orgánica.
<i>Ulva lactuca</i> Linnaeus	Talo laminar redondeado de color verde claro con bordes lisos. En corte transversal, se observa un talo biestromático. Es comercializada bajo el nombre de “lechuga de mar”. Se utilizan como fertilizantes en la agricultura. Su biomasa se incrementa en presencia de materia orgánica.
<i>Ulva enteromorpha</i> var. <i>intestinalis</i> (Linnaeus) Le Jolis	Talos tubulares con un grosor de una célula en la base y comprimido hacia el ápice formando un talo biestromático. Usualmente unidos a un sistema de células rizoidales que se extienden para formar un disco de fijación. Desarrolla muy rápidamente en verano y otoño. Su abundancia está relacionada a la contaminación orgánica.

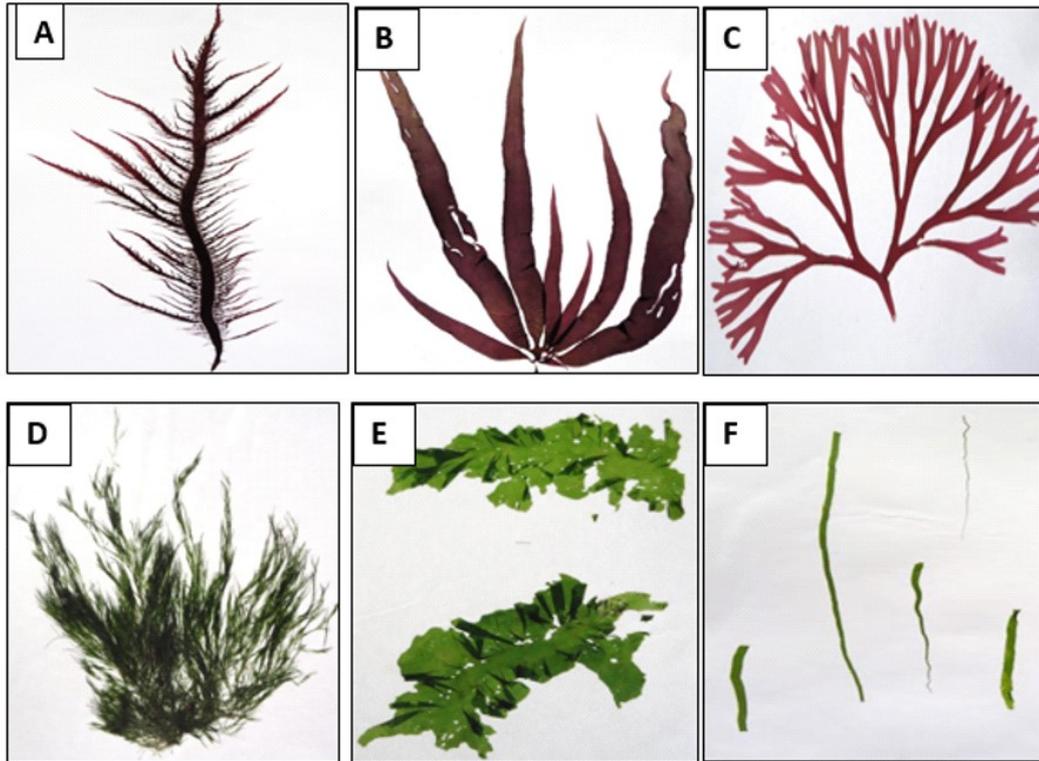


Figura 1. Macroalgas marinas: (A) *Chondracanthus chamissoi*, (B) *Grateloupia doryphora*, (C) *Rhodymenia corallina*; (D) *Cladophora* sp; (E) *Ulva nematoidea*, (F) *Ulva enteromorpha* var. *intestinalis*

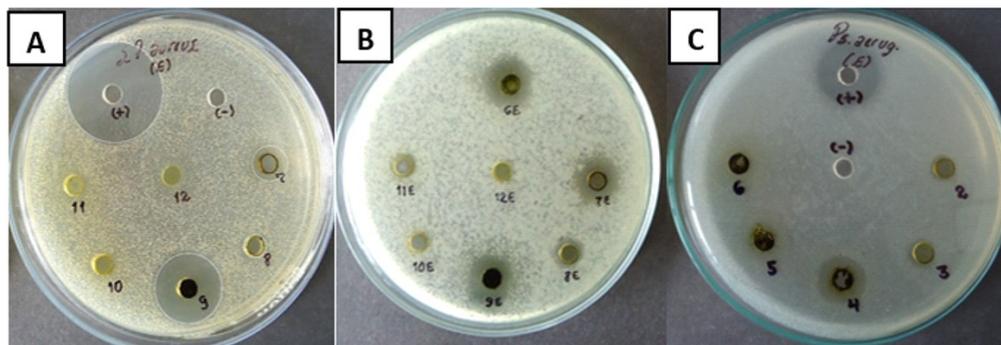


Figura 2. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de algunas macroalgas marinas. En A: sobre *St. aureus* ATCC 6538 con gran actividad inhibitoria de *U. enteromorpha* var. *intestinalis* (9). En B: sobre *S. Typhimurium* ATCC 14028, resaltando *U. lactuca* (6E), *Polysiphonia* sp (7E) y *U. enteromorpha* var. *intestinalis* (9E). C: halos de inhibición del extracto de *Cladophora* sp (4) sobre cultivos de *Ps. aeruginosa* ATCC 9027. Control positivo: Estreptomicina (500 mg/ml), control negativo: DMSO

Cuadro 3. Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos de macroalgas intermareales (colectadas en la Bahía de Ancón, Lima – Perú) frente a un panel de bacterias patógenas

Alga	Extracto	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51922
<i>Asterfilopsis furcellata</i>	Hexánico	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Etanólico	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Chondracanthus chamosoi</i>	Hexánico	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Etanólico	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Polysiphonia</i> sp	Hexánico	(-)	(-)	7.5	7.0	6.0	(-)
	Etanólico	(-)	6.3	10.0	8.5	7.0	6.0
<i>Grateloupia doryphora</i>	Hexánico	(-)	(-)	7.0	4.6	(-)	(-)
	Etanólico	(-)	7.0	7.5	6.6	7.0	(-)
<i>Rhodymenia corallina</i>	Hexánico	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Etanólico	(-)	6.8	6.5	6.6	(-)	6.6
<i>Cladophora</i> sp	Hexánico	(-)	(-)	10.5	9.6	11.0	8.3
	Etanólico	(-)	9.5	12.0	10.3	14.5	9.6
<i>Ulva nematoidea</i>	Hexánico	(-)	(-)	10.5	8.3	9.5	8.6
	Etanólico	(-)	(-)	10.5	17.3	10.6	5.0
<i>Ulva lactuca</i>	Hexánico	(-)	(-)	8.5	7.6	8.3	9.0
	Etanólico	(-)	7.0	10.0	12.3	9.6	6.0
<i>Ulva enteromorpha</i>	Hexánico	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
var. <i>intestinalis</i>	Etanólico	(-)	(-)	12.0	16.6	9.0	(-)

(-) no actividad; Valores promedio de halos de inhibición (en mm) entre paréntesis

con halos de inhibición de menor tamaño, resaltando entre otros frente a *S. Typhimurium* ATCC 14028 (10.0 mm). En general, los extractos etanólicos presentaron mejor actividad inhibitoria en comparación a los extractos hexánicos.

Con relación a la actividad inhibitoria de los extractos frente a *S. aureus* ATCC 6538, el etanólico mostró mejor actividad antibacteriana que el hexánico, alcanzando halos de inhibición media de 8.9 y 5.8 mm de diámetro, respectivamente. Los extractos

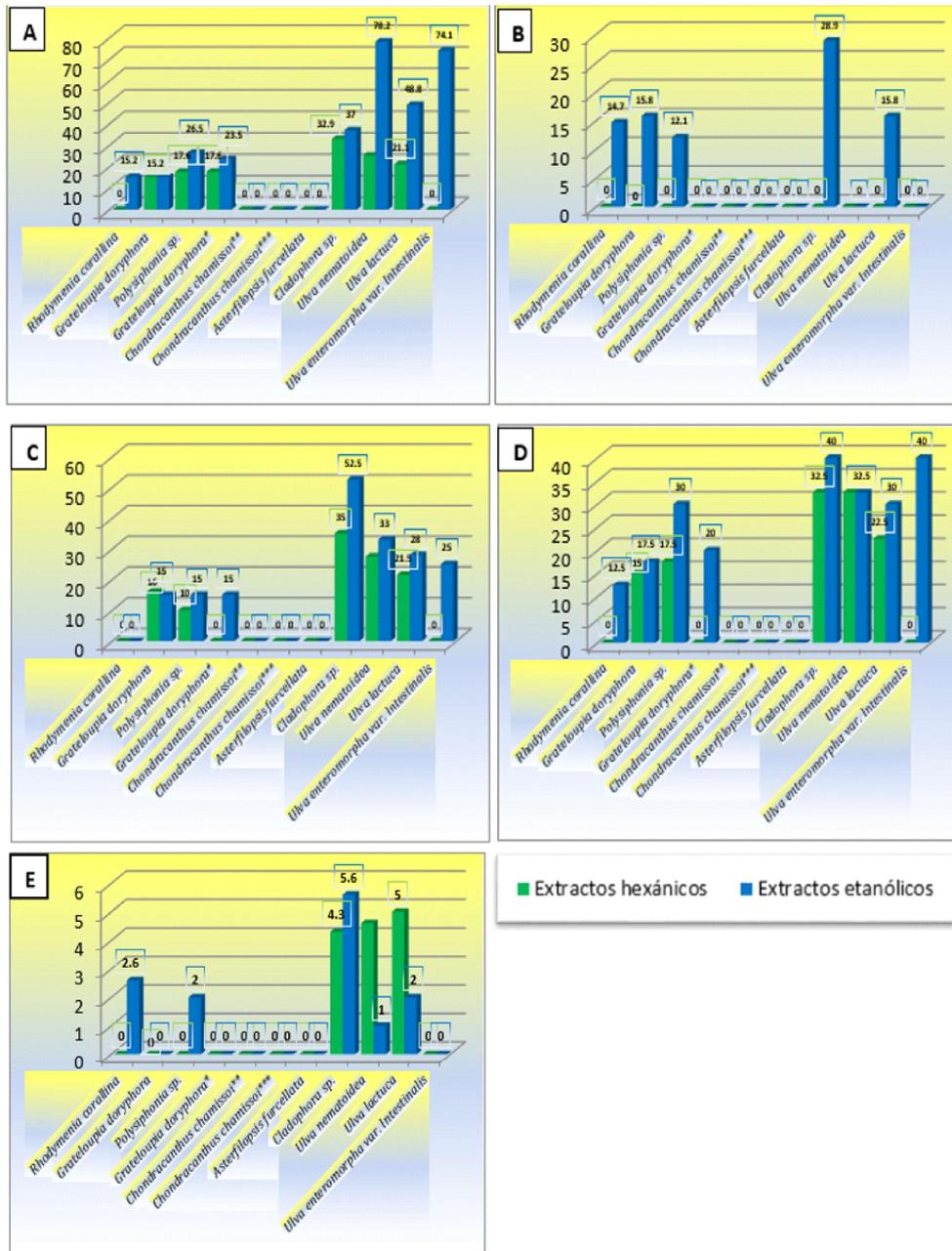


Figura 3. Porcentajes de inhibición de los extractos hexánicos y etanólicos de especies de macroalgas marinas frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (A); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (B); *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (C); *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 (D) y *Enterococcus faecalis* ATCC 51922 (E)

etanólicos de *U. enteromorpha* y *U. nematoidea* presentaron porcentajes de inhibición de 78.2 y 74.1% frente a *S. aureus* ATCC 6538, respectivamente. En contraste, *Chondracanthus chamissoi* y *Asterfilopsis furcellata* no presentaron actividad inhibitoria frente a la misma cepa (Figura 3A).

Frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, al igual que en los casos anteriores, los extractos etanólicos tuvieron mejor rendimiento inhibitorio (una media de 5.5 mm de diámetro de halo de inhibición); en tanto que *Cladophora* sp fue la que presentó mejor actividad frente a este patógeno (28.9%) (Figura 3B). Los extractos hexánicos de otras macroalgas presentaron baja o ninguna actividad inhibitoria.

Los extractos macroalgales frente a *B. subtilis* ATCC 6633 tuvieron comportamientos variables. Los extractos etanólicos lograron generar halos de inhibición (7.3 mm); en cambio, los extractos hexánicos mostraron halos de inhibición menores (6.0 mm). El extracto etanólico y el hexánico de *Cladophora* sp fueron los más efectivos alcanzando porcentajes de inhibición de 52.5 y 35%, respectivamente, mientras el etanólico de *U. nematoidea* solo alcanzó 33% de inhibición (Figura 3C).

La actividad de los extractos sobre *S. Typhimurium* ATCC 14028 fue similar a los casos anteriores. Los halos de inhibición de los extractos etanólico y hexánico alcanzaron medias de 8.0 y 6.2 mm de diámetro, respectivamente. El extracto etanólico de *U. enteromorpha* y *Cladophora* sp mostraron 40% de inhibición (Figura 3D). Asimismo, *S. Typhimurium* ATCC 14028 se mostró como una de las cepas testigo de mayor sensibilidad a la mayoría de los extractos, tanto hexánico como etanólico, aunque los porcentajes de inhibición fueron bajos.

La actividad de los extractos frente a *E. faecalis* ATCC 51922 fueron menores en comparación a los anteriores, con medias de halos de inhibición de los extractos hexánico

y etanólico de 5.26 y 5.20 mm, respectivamente. Asimismo, los máximos porcentajes de inhibición alcanzados por el extracto etanólico y hexánico de *Cladophora* sp y *U. lactuca* fue de 5.6 y 5.0%, respectivamente (Figura 3E). Ninguno de los extractos macroalgales mostraron actividad inhibitoria sobre los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922.

De los 47 extractos crudos que mostraron actividad antimicrobiana, el 63.8% corresponden a extractos etanólicos y 36.2% son extractos hexánicos. Por otro lado, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. aureus* ATCC 6538 fueron las cepas más sensibles a ambos tipos de extractos (Cuadro 3). En general, las macroalgas de la División Chlorophyta presentaron mayor actividad teniendo como principales representantes a *U. nematoidea* y *U. enteromorpha* con los mayores porcentajes de inhibición de *S. aureus* ATCC 6538 (Figura 3A).

El extracto etanólico de *Cladophora* sp fue elegido por su mayor espectro de actividad para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), el cual fue de 12.5 mg/ml frente a *B. subtilis* ATCC 6633 y de 25 mg/ml frente a *S. aureus* ATCC 6538 (Figura 4).

DISCUSIÓN

El potencial antibacteriano de los compuestos algales es atribuido a la presencia de múltiples metabolitos, tales como los diterpenos en las algas verdes, terpenos halogenados en las rojas y metabolitos mixtos terpeno-aromáticos en las algas pardas (Carvalho y Roque, 2000). Por otro lado, en la extracción de estos metabolitos activos se recurre al uso de diversos solventes orgánicos de diferentes polaridades. La actividad antimicrobiana de amplio espectro de los extractos macroalgales señalados en diversos trabajos (Magallanes *et al.*, 2003; Ríos *et al.*, 2009; Troncoso *et al.*, 2015) y ratificado en el presente, permite afirmar la presencia de

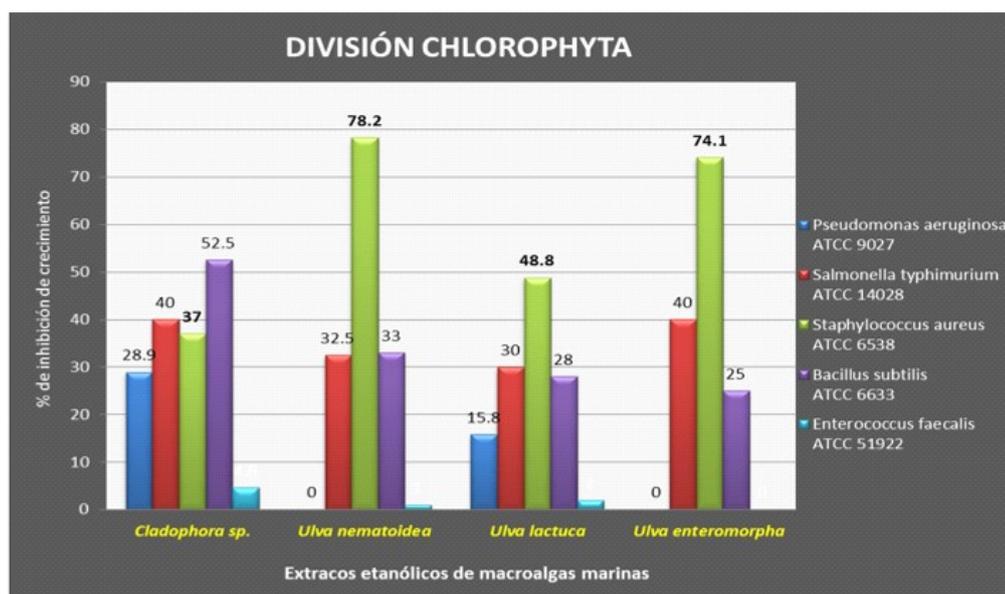


Figura 4. Porcentajes de inhibición de los extractos etanólicos de especies de macroalgas marinas de la División Chlorophyta frente a bacterias estándar ATCC

metabolitos bioactivos de naturaleza diversa afines a solventes de distinta polaridad, siendo tal vez los extractos etanólicos los de mayor importancia.

Nylund *et al.* (2008) mencionan que el efecto antimicrobiano de los extractos de macroalgas marinas puede atribuirse al contenido de compuestos fenólicos, entre ellos taninos, flavonoides, terpenos y algunos ácidos grasos que se encuentran presentes en los mismos. Estos metabolitos secundarios presentan una mayor solubilidad en solventes orgánicos polares como el metanol, acetona y etanol. Con estos solventes polares es posible extraer dichos compuestos, los cuales se encuentra unidos a proteínas y sales (Gonzales del Val *et al.*, 2001). Esta afirmación concuerda con el presente estudio, ya que los extractos etanólicos (polar) tuvieron una actividad antibacteriana (63.8%) frente a los extractos hexánicos (apolar) (36.2%).

La polaridad del solvente también es confirmada por Coronado *et al.* (2015), quienes al evaluar extractos crudos de una macroalga marina encontraron la presencia, entre otros, de alcaloides y glicósidos cianogénicos en extractos etanólicos, mientras que solo detectaron flavonoides en extractos hexánicos. Sin embargo, estos autores consideran que la mayor actividad antibacteriana del extracto etanólico podría deberse a las sales presentes en la macroalga, que al ser componentes hidrofílicos, son fácilmente disueltas en extracciones al emplear un disolvente de mayor polaridad (etanol), originando un ligero incremento de masa en este extracto.

Los extractos etanólicos de las algas de la División Chlorophyta presentaron una mayor acción antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas en comparación a las Gram negativas. Similar resultado fue obtenido por Freile-Peligrin y Morales (2004) al

evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de macroalgas de las costas de Yucatán, México. Abu-Ghannam y Rajauria (2013) indican que la susceptibilidad de bacterias Gram positivas al extracto de algas se debe al alto contenido de los metabolitos bioactivos ricos en compuestos fenólicos, terpenoides y alcaloides, que dañan la estructura de la pared celular y su composición; sin embargo, en las Gram negativas, la membrana externa actúa como una barrera que impide el ingreso de sustancias que incluyen antibióticos.

Por otro lado, Dhanya *et al.* (2016) al evaluar la actividad antimicrobiana de extractos hexánicos de *Ulva reticulata* frente a patógenos humanos como *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. typhi* y *B. subtilis* determinaron acción eficaz contra todos los patógenos probados, especialmente frente a *S. aureus* y *E. coli*. En este sentido, los extractos hexánicos del presente estudio mostraron menor eficacia.

Vila *et al.* (2007) mencionan que uno de los mecanismos de resistencia bacteriana serían los cambios en la bicapa lipídica, alterando la permeabilidad de la membrana, especialmente por cambios en las porinas. Estas estructuras, en las bacterias Gram negativas, regulan la entrada de algunos elementos externos, entre ellos los compuestos antibacterianos, de allí que cambios en su conformación pueden limitar su paso al espacio periplásmico. En el presente estudio, los extractos macroalgales no mostraron actividad inhibitoria frente a un Gram negativo como *E. coli* ATCC 25922, y baja con otras Gram negativas como *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *S. Typhimurium* ATCC 14028. Así mismo, Ríos *et al.* (2009) tampoco encontraron actividad inhibitoria de *E. coli* con los extractos etanólicos y hexánicos.

Un estudio realizado por Razarinah *et al.* (2018), utilizando extractos metanólicos del alga verde *Halimeda* colectada en la Península de Malasia y enfrentadas a cultivos de bacterias Gram positivas y Gram ne-

gativas, señalan también mayor actividad inhibitoria de *B. subtilis*, *S. aureus* y *B. cereus*, y mínima o nula actividad frente a *Ps. aeruginosa* y *E. coli*. Además, se determinó la Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de 18.75; 9.38 y 9.3 mg/ml del extracto frente a *B. subtilis*, *S. aureus* y *B. cereus* respectivamente. En este estudio, el ensayo permitió determinar la CMI de 12.5 mg/ml frente a *B. subtilis* ATCC 6633 y de 25 mg/ml frente a *S. aureus* ATCC 6538.

En el presente estudio, los extractos algales tuvieron mayor rendimiento antimicrobiano sobre los Gram positivos; siendo el extracto de *U. nematoidea* el más eficaz sobre *S. aureus* ATCC 6538 y *B. subtilis* ATCC 6633 con porcentajes de inhibición de 78.2 y 52.5 % respectivamente. Asimismo, el extracto de *U. enteromorpha* tuvo una eficacia de 74.1% de inhibición sobre *S. aureus* ATCC 6538. Resultados que concuerdan con Magallanes *et al.* (2003), quienes encontraron mayor susceptibilidad a *S. aureus* ATCC 6636 y *S. aureus* ATCC 25923 a los extractos etanólicos, aunque no hallaron efecto inhibitorio por efecto de *U. nematoidea*, posiblemente debido al uso de las macroalgas marinas en estaciones diferentes. En este sentido, Marinho-Soriano *et al.* (2006) llegan a establecer que las especies de algas muestran variaciones muy amplias en su composición química (proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales y vitaminas) con relación a factores ambientales como la estación, temperatura, luz, salinidad, etc. Asimismo, la actividad antibacteriana dependería de la sensibilidad del patógeno, del solvente de extracción, de la especie macroalgal (Troncoso *et al.*, 2015), hábitat, estado de desarrollo del alga y método experimental, entre otros (Gutierrez *et al.*, 2016).

De las nueve especies de macroalgas marinas reportadas en el presente estudio, los resultados indican que las especies pertenecientes a la División Chlorophyta (*Cladophora* sp., *Ulva nematoidea*, *Ulva lactuca* y *Ulva enteromorpha* var. *intestinalis*) son macroalgas marinas peruanas con actividad

antibacteriana. Las macroalgas pertenecientes a la división Rhodophyta presentaron menor actividad antimicrobiana, principalmente frente a las bacterias Gram positivas. En ambos casos, se tratan de especies intermareales que abundan en nuestro litoral costero, y dada la importancia de su actividad biológica frente a bacterias patógenas amerita un estudio profundo para conocer aspectos básicos de sus propiedades y posible aplicación en el campo de la salud pública y dentro del marco de la biotecnología marina.

CONCLUSIONES

- Los extractos etanólicos de las especies de macroalgas de la División Chlorophyta y Rhodophyta presentan mayor actividad antimicrobiana que sus respectivos extractos hexánicos.
- Los extractos de *Cladophora* sp, *Ulva nematoidea*, *U. lactuca* y *U. enteromorpha* var. *intestinalis* mostraron la mayor actividad antibacteriana, en especial frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; sin embargo, fue menor frente a las Gram negativas o nula como fue el caso de *Escherichia coli*.

Agradecimientos

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, por el financiamiento parcial a través del Estudio de Investigación CON CON 2016 (R.R. N.º 00836-R-16).

LITERATURA CITADA

1. **Abu-Ghannam N, Rajauria G 2013.** Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. In Domínguez H (ed). Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. p 287-306.
2. **Balta M. 1988.** Producción de compuestos antimicrobianos en algas marinas peruanas. En: *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) y *Polysiphonia paniculata* (Rhodophyta). Tesis de Biólogo. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 24 p.
3. **Boisvert C, Beaulieu L, Bonnet C, Pelletier E. 2015.** Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of three species of edible seaweeds. *J Food Biochem* 39: 377-387. doi: 10.1111/jfbc.12146
4. **Carvalho L, Roque N. 2000.** Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Quim Nova* 23: 757-763.
5. **Coronado W, Valerio-González L, D'Armas H. 2015.** Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana preliminar de los extractos de la macroalga *Laurencia dendroidea*, J. Agardh, 1841 (Rhodomelaceae: Rhodophyta). *Saber* 27: 61-66.
6. **Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S. 2010.** An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Int Food Res J* 17: 205-220.
7. **Cruz-Carrillo A, Rodríguez N, Rodríguez CE. 2010.** Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Rev. UDCA Act & Div Cient* 13: 117-124.
8. **De Lara-Issasi G, Lozano, M. 1989.** Evaluación de la actividad antibiótica de las macroalgas de la costa de Michoacán, México. *Bol Inst Ocean Venezuela, Univ Oriente* 28: 99-104.
9. **Dhanya KI, Swati VI, Vanka KS, Osborne WJ. 2016.** Antimicrobial activity of *Ulva reticulata* and its endophytes. *J. Ocean U China* 15: 363-369. doi: 10.1007/s11802-016-2803-7
10. **Freile-Pelegrín Y, Morales JL, 2004.** Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. *Bot Mar* 47: 140-146. doi: 10.1515/BOT.2004.014

11. **González del Val A, Platas G, Basilo A, Cabello A, Gorrochategui J. 2001.** Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int Microbiol* 4: 35-40. doi: 10.1007/s101230100006
12. **Gutiérrez R, González K, Valdés Iglesias O, Hernández Y, Acosta Y. 2016.** Algas marinas como fuente de compuestos bioactivos en beneficio de la salud humana: un artículo de revisión. *Biotecnia* 18: 20-27.
13. **León J, Liza L, Soto I, Torres M, Oroscó A. 2010.** Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 27: 215-221.
14. **Magallanes C, Córdova C, Orozco R. 2003.** Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa del Perú. *Rev Peru Biol* 10: 125-132.
15. **Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MA, Moreira WS. 2006.** Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technol* 97: 2402-2406. doi: 10.1016/j.biortech.2005.10.014
16. **Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT. 2007.** Marine pharmacology in 2003-4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Phys C* 145: 553-581. doi: 10.1016/j.cbpc.2007.01.015
17. **Montoya E, García Y, Lira C. 2017.** Usos y aplicaciones de las macroalgas marinas: una revisión. *Bol Inst Ocean Venezuela* 56: 89-101
18. **Nylund G, Cervin G, Persson F, Hermansson M, Steinberg P, Pavia H. 2008.** Seaweed defense against bacteria: a poly-brominated 2-heptanone from the red alga *Bonnemaisonia hamifera* inhibits bacterial colonisation. *Mar Ecol Prog Ser* 369: 39-50. doi: 10.3354/meps07577
19. **Pérez MJ, Falqué E, Domínguez H. 2016.** Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. Review. *Mar Drugs* 14: 52. doi: 10.3390/md14030052
20. **Ramírez L. 2007.** Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del «ruibarbo» (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica* 13: 397-400.
21. **Razarinah W, Ross R, Farinna A, Syazana B, Radzum K. 2018.** Antimicrobial activity of marine green algae extract against microbial pathogens. *Malays J Biochem Mol Biol* 2: 42-46.
22. **Ríos N, Medina G, Jiménez J, Yáñez C, García MY, Di-Bernardo M, Gualtieri M. 2009.** Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Rev Perú Biol* 16: 97 - 100.
23. **Shafay SME, Ali SS, El-Sheekh MM. 2015.** Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria. *Egypt J Aquat Res* 42: 65-74. doi: 10.1016/j.ejar.2015.11.006
24. **Shanmughapriya S, Manilal A, Sujith S, Selvin J, Seghal G, Natarajaseenivasan K. 2008.** Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Ann Microbiol* 58: 535-541. doi: 10.1007/BF03175554
25. **Taskin E, Caki Z, Ozturk M, Taskin E. 2010.** Assessment of *in vitro* antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean Sea. *Afr J Biotechnol* 9: 4272-4277.