



Universidad Nacional  
**SAN LUIS GONZAGA**



## **Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional**

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>



**UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA**



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACEÚTICO**

**EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DEL ALGA  
MARINA "*CAULERPA FILIFORMIS (SUHR) HERING*" RECOLECTADA  
EN LA PLAYA "EL CHACO" PROVINCIA DE PISCO.**

**AUTOR:**

**Bach. Laura Santa María, Santiago Humberto Rolando**

**ASESORA:**

**Dra. Chávez Orellana, Haydeé.**

**CO – ASESORES:**

**Mg. Valle Campos, Manuel Alfredo**

**Dr. Surco Laos, Felipe Artemio**

**ICA - PERÚ**

**2018**

***A mis padres y hermano***

***Rolando, Luisa y Luren***

*Por apoyarme en cada momento difícil de la vida, por enseñarme a creer en mis sueños, por cuidar siempre de mí y guiar mis pasos, por motivarme a ser cada día mejor y ser mi gran apoyo y mis amigos en estos cinco años de estudio, somos una gran y hermosa familia feliz. A ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.*

*¡Arriba, siempre arriba, hasta las estrellas!*

***Santiago***

## AGRADECIMIENTOS:

*Mi sincero agradecimiento, al Dr. Manuel Alfredo Valle Campos, por sus enseñanzas, consejos e incondicional apoyo. Siempre es un gusto platicar con usted.*

*A la, Dra. Santos Haydee Chávez Orellana, por su paciencia, sus consejos y por guiarnos en cada paso durante nuestra vida universitaria.*

*Al Dr. Felipe Artemio Surco Laos, por brindarnos sus conocimientos y motivarnos siempre a realizar nuestros sueños. Gracias por su apoyo durante el desarrollo de la tesis.*

*A la Dra. Carmen Huayanca de Padilla, por brindarme su apoyo incondicional durante el desarrollo de la tesis. Fue un gusto haber aprendido con usted.*

*A Ernesto García Huasasquiche, Araceli Canales Matta y la Familia Vila Toledo, por enseñarme el valor de la confianza y trabajo en equipo. Fue un gusto haber trabajado con ustedes y haber compartido gratos momentos. Dios los bendiga siempre.*

*No podría terminar sin agradecer a mi querida Asociación Científica de Investigación Farmacéutica (ACIF), la cual me abrió las puertas de este bonito mundo que es la investigación y me dio grandes enseñanzas. Gracias por siempre considerarme parte de esta gran familia.*

*De igual manera, agradezco a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron con su apoyo en cada etapa de mi crecimiento personal y profesional. Los llevaré por siempre en mi corazón. Santiago*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN .....	viii
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Descripción de la realidad problemática.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Formulación del Problema. ....</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Justificación e importancia.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Objetivos de la Investigación.....</b>	<b>12</b>
□ <b>General:.....</b>	<b>12</b>
□ <b>Específicos:.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. Hipótesis y variables.....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO II: BASES TEÓRICAS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Antecedentes de la Investigación.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Marco Teórico.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1. Descripción morfológica del Género “Caulerpa”.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.2. Hábitat y ubicación geográfica de la especie “<i>Caulerpa filiformis</i>         (Suhr) Hering”.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.3. Cepas bacterianas utilizadas en el estudio.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3.1. Bacterias Gram – Positivas .....</b>	<b>19</b>

2.2.3.2. Bacterias Gram – Negativas.....	20
2.2.4. Fármaco utilizado en el ensayo.....	22
2.3. Marco Conceptual.....	25
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....</b>	<b>27</b>
3.1. Materiales, equipos y reactivos .....	27
3.2. Recolección y secado del alga marina.....	29
3.3. Estudio Microbiológico.....	41
3.4. Método de difusión en agar (Pozo).....	45
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>48</b>
4.1. RESULTADOS.....	48
4.2. DISCUSIÓN.....	56
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>FUENTES DE INFORMACIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## RESUMEN

*El objetivo de la presente investigación fue demostrar que los extractos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” presentan actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-).*

*Los extractos se obtuvieron por el método de maceración; los metabolitos secundarios se identificaron a través del Screening Fitoquímico y reacciones de coloración y precipitación; en los cuales se encontró en mayor presencia Triterpenos y/o esteroides en su composición.*

*La actividad antibacteriana se llevó a cabo por el método de difusión en agar (Pozo), los extractos se diluyeron a concentraciones de 10, 20, 30 y 40% (100, 200, 300 y 400 mg/mL). El control positivo fue el antibiótico Ciprofloxacino a la concentración de 5 µg/mL y el control negativo Tween 80 y Metanol puro (85:15). Se realizaron dos ensayos por extracto y cada ensayo fue por triplicado.*

*La concentración del 20% del extracto etanólico resultó ser más eficaz para bacterias Gram (-) y el etéreo para Gram (+), estos resultados se confirmaron al determinar el Porcentaje de Inhibición Relativo (PIR) para cada extracto (54,4% y 64,2% respectivamente) frente al antibiótico utilizado.*

*Se concluye que los extractos etéreo y etanólico al 20% poseen mayor efectividad antibacteriana que el control positivo, esto podría deberse a la presencia de los metabolitos secundarios presentes en la especie marina (triterpenos y/o esteroides), abriéndonos así las puertas para descubrir nuevas alternativas de cómo frenar la resistencia bacteriana.*

**Palabras Claves:** *Actividad antibacteriana, Caulerpa filiformis (Suhr) Hering, algas marinas, bacterias Gram positivas (+) y Gram negativas (-).*

## ABSTRACT

*The objective of the present investigation was to demonstrate that the extracts of the seaweed "Caulerpa filiformis (Suhr) Hering" have antibacterial activity against pathogenic bacteria Gram positive (+) and Gram negative (-).*

*The extracts were obtained by the maceration method; the secondary metabolites were identified through the Phytochemical Screening and coloration and precipitation reactions, in which Triterpenes and / or sterols were found in their composition.*

*The antibacterial activity was carried out by the diffusion method in agar (Well), the extracts were diluted to concentrations of 10, 20, 30 and 40% (100, 200, 300 and 400 mg / mL). The positive control was the antibiotic Ciprofloxacin at the concentration of 5 µg / mL and the negative control Tween 80 and pure Methanol (85:15). Two tests per extract were made and each assay was in triplicate.*

*The 20% concentration of the ethanolic extract proved to be more effective for Gram (-) bacteria and the ethereal for Gram (+), these results were confirmed when determining the Relative Inhibition Percentage (PIR) for each extract (54.4% and 64.2% respectively) compared to the antibiotic used.*

*It is concluded that the ethereal and ethanolic extracts at 20% have greater antibacterial effectiveness than the positive control, this could be due to the presence of the secondary metabolites present in the marine species (triterpenes and / or sterols), thus opening the doors to discover new alternatives of how to stop bacterial resistance.*

**Key Words:** *Antibacterial activity, Caulerpa filiformis (Suhr) Hering, marine algae, Gram positive (+) and Gram negative (-) bacteria.*

## INTRODUCCIÓN

*Antiguamente, la antibiosis de las algas marinas fue ignorada como fuente potencial de medicamentos. Sin embargo, desde principios de este siglo, las propiedades antibióticas de las algas están siendo estudiadas, probándose que los extractos de algas marinas funcionan como inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas para el hombre.* <sup>1,2</sup>

*El recrudecimiento de las afecciones de origen bacteriano, fúngico y viral, en los últimos años, ha sido causado no sólo por la aparición de nuevas enfermedades sino también por la resistencia adquirida por las distintas cepas microbianas a los medicamentos tradicionalmente usados.<sup>3</sup> Esta situación ha conducido a la búsqueda de nuevos compuestos. Es por ello, que nos vemos en la necesidad de realizar un estudio que permita evaluar la actividad biológica de las algas que habitan en las costas de nuestra región, logrando identificar los tipos de compuestos bioactivos a los cuales podemos atribuir su actividad.*

*Existen aproximadamente 30 000 especies de algas distribuidas en todo el mundo, produciéndose en lugares donde hay luz y humedad; y se encuentran en mayor abundancia en el mar<sup>4</sup>, estas son capaces de producir una increíble diversidad de metabolitos secundarios, que pueden ser utilizados de forma beneficiosa, para el desarrollo de biofármacos con una amplia aplicación medicinal<sup>5</sup>, demostrando ser una fuente de aminoácidos, terpenos, florotaninos, esteroides, compuestos fenólicos, cetonas y alcanos halogenados y polisulfuros cíclicos.<sup>6</sup>*

*La producción de metabolitos secundarios del género *Caulerpa* está asociada principalmente a la defensa contra organismos herbívoros, ya que suelen sintetizar sustancias repulsivas y tóxicas para evitar ser consumidas. La mayoría de estos*

*compuestos incluyen terpenos (Caulerpenina), polifenoles, aminoácidos y compuestos halogenados; los que han demostrado considerable actividad en diferentes ensayos biológicos.<sup>7,8</sup>*

*El sesquiterpeno Caulerpenina es el principal metabolito sintetizado por las algas verdes de este género, el cual juega un papel importante en su defensa química. Este compuesto ha mostrado propiedades antibióticas, efectos citotóxicos en las células de mamíferos, actividad antiproliferativa e inhibición de la división celular en huevos de erizo de mar.<sup>8,9</sup>*

*En nuestra región las algas marinas por su diversidad y abundancia son un recurso de gran importancia y una alternativa en la búsqueda de nuevas fuentes de agentes antimicrobianos. Basándonos en estos antecedentes y teniendo en cuenta que en nuestro país no se reportan estudios sobre la actividad antibacteriana sobre esta alga marina, nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Presentan efectividad antibacteriana los extractos del alga marina Caulerpa filiformis (Suhr) Hering que se recolectaron de la Playa “El Chaco”, provincia de Pisco?*

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

#### 1.1. Descripción de la realidad problemática.

*Desde 1928, año en que Fleming descubrió la penicilina, se inicia la era de los antibióticos y desde aquella fecha se ha ido incrementando de manera progresiva y en forma exponencial la creación de nuevos fármacos, especialmente en los países desarrollados.*

*En los años recientes, la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de manera considerable por el uso indebido y abusivo de estos fármacos, lo cual ha ocasionado que estos microorganismos (bacterias, virus, hongos y protozoarios) sufran mutaciones, generando mecanismos defensivos, con el fin de evadir la acción destructiva de estas sustancias. De acuerdo con **Elliot TS**, la rapidez con que surgen los microorganismos multirresistentes no es igual a la velocidad con que surgen nuevos antibióticos, por lo tanto, se concibe que pronto no habrá nuevos agentes para tratar a pacientes con sepsis graves<sup>10</sup>, considerándosele ya como un problema de dimensiones mundiales.*

*Desde el punto de vista clínico, se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de éste en el lugar de la infección es al menos 4 veces superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM). Una concentración por debajo de la CIM califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios de moderadamente sensibles. Los conceptos de sensibilidad y resistencia son relativos. Cuando ya no se pueden tratar las infecciones con los antibióticos de primera línea es necesario emplear otros tipos de fármacos, los cuales muchas veces tienen un alto costo. A mayor*

*duración de la enfermedad y del tratamiento (a menudo en el medio hospitalario) incrementa los costos de la atención sanitaria y la carga económica para las familias (sobre todo de menores recursos) y la sociedad. Es por ello que en los últimos años se han buscado nuevas formas de inhibir el crecimiento de estos microorganismos y, a través de las numerosas investigaciones que se vienen realizando, se da la posibilidad que las algas marinas pueden tener metabolitos que actúen disminuyendo el crecimiento bacteriano, por lo que el objetivo de este trabajo es demostrar que los extractos obtenidos del alga “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” presentarán actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias patógenas tipificadas, pudiendo ser usada como una alternativa para combatir las principales infecciones bacterianas que hay en la actualidad, que cada vez son más comunes en la población que no tiene acceso a los sistemas de salud y que son de bajos recursos.*

## **1.2. Formulación del Problema.**

*¿Presentan efectividad antibacteriana los extractos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” que se recolectarán de la playa “El Chaco” provincia de Pisco?*

## **1.3. Justificación e importancia**

*El presente trabajo de investigación se enfocará en encontrar una alternativa natural y asequible a las personas que los ayude a combatir las principales infecciones bacterianas que se dan en la actualidad. Las enfermedades*

*bacterianas cada vez son más comunes en la población de recursos medios y bajos y no todas pueden acceder a los medicamentos necesarios para combatir estas enfermedades, pudiendo tener al alcance de la mano una alternativa natural y efectiva de tratar estas infecciones a causa de bacterias. Es por ello que se realiza esta investigación, como un pequeño aporte a la búsqueda de más metabolitos presentes en el ecosistema marino que nos puedan ayudar a inhibir el crecimiento bacteriano y formar parte de la solución a este problema mundial que viene siendo letal en los países más pobres del mundo.*

#### **1.4. Objetivos de la Investigación**

- **General:**

*Demostrar que los extractos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” presentan actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas Gram positivas (+) y Gram negativas (-).*

- **Específicos:**

- *Identificar los metabolitos secundarios presentes en el alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” a los que se le puede atribuir la actividad antibacteriana.*
- *Comparar la efectividad antibacteriana de los extractos obtenidos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” frente al Ciprofloxacino (Control positivo).*

- *Establecer cuál de los extractos presenta mayor actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas Gram positivas (+) y Gram negativas (-).*

### **1.5. Hipótesis y variables**

*Los extractos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” presentan gran efectividad antibacteriana frente a bacterias patógenas Gram positivas (+) y Gram negativas (-).*

- ***Variable independiente:***

- *Extractos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering”.*

- ***Variable dependiente:***

- *Efecto antibacteriano frente a bacterias Gram positivas (+) y Gram negativas (-).*

## CAPÍTULO II

### BASES TEÓRICAS

#### 2.1. Antecedentes de la Investigación

*La habilidad de las macroalgas para producir metabolitos secundarios de interés potencial ha sido extensamente documentada. Hasta el 2005, las macroalgas habían proporcionado casi 3 mil productos naturales, representando aproximadamente el 20% de los productos naturales marinos (Blunt et al., 2006)<sup>11</sup>.*

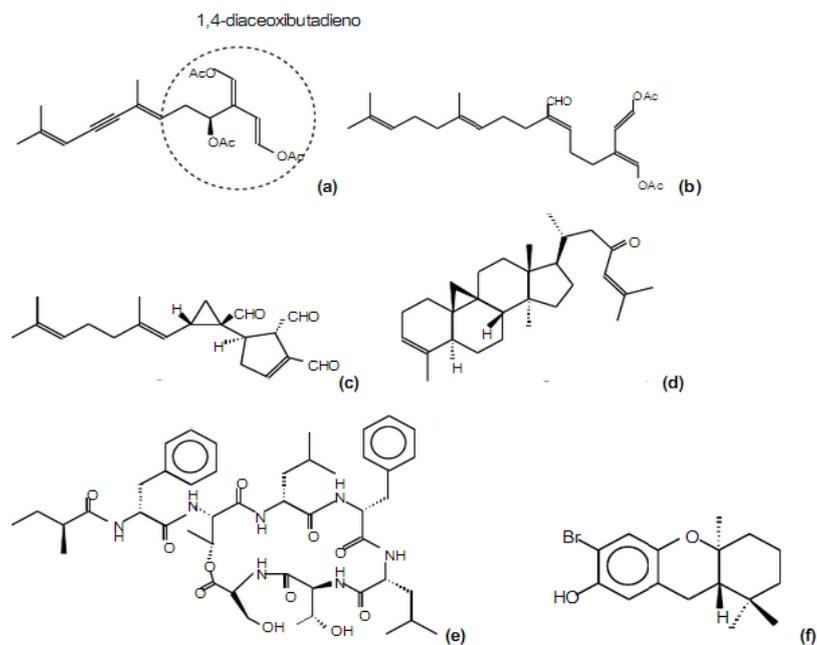
*Éstas, al igual que los organismos terrestres, producen metabolitos secundarios que muchas veces son utilizados como parte de sus estrategias de supervivencia. No obstante, algunos de ellos no tienen análogos terrestres, ya que son producidos en condiciones ambientales muy distintas, con altas fuerzas iónicas, bajos niveles de luz, bajas temperaturas, competencia por espacio, entre otras. Estas características han llevado a los organismos marinos, incluyendo a las macroalgas, a biosintetizar metabolitos únicos, que pueden ser bases para nuevos fármacos (Libes, 1992).<sup>12</sup>*

*De acuerdo con Freile-Pelegrín & Morales (2004) estos compuestos pueden actuar como mecanismos de defensa contra epibiontes y/o para mantener la capacidad de recuperación y regeneración rápida después del daño ocasionado por predadores o por abrasión.<sup>13</sup>*

*La habilidad de las macroalgas para producir metabolitos secundarios de interés potencial ha sido extensamente documentada; existen numerosos reportes de compuestos con un amplio rango de actividades ecológicas y biológicas, aunque muy pocas de ellas son del todo conocidas. Los compuestos*

reportados incluyen compuestos antibacterianos, antivirales, citotóxicos y antiinflamatorios, entre otros. Los tipos de estructura química aislados incluyen esteroides, isoprenoides y moléculas relacionadas (Del Val et al., 2001); polisacáridos sulfatados, péptidos cíclicos (con propiedades farmacológicas diversas) y macrólidos (con propiedades antiépifíticas).<sup>14</sup>

De todas las macroalgas, las Chlorophyta o algas verdes son los productores menos prolíficos de productos naturales, con menos de 300 compuestos conocidos y pocos metabolitos secundarios reportados anualmente (Blunt et al., 2007).<sup>15</sup> Se sabe que estas algas producen compuestos similares a los de las algas rojas, principalmente di y sesquiterpenos, pero sin la halogenación típica de las Rodofitas (Fig 1). La característica química de Chlorophyta es la presencia de 1,4-Diaceoxibutadieno, un éster dienolato encontrado en muchos terpenos de algas verdes. Una gran cantidad de los metabolitos reportados son compuestos terpénicos (Munro & Blunt, 2005).<sup>16</sup>



**Figura 1.:** Estructuras representativas de las algas verdes - *Caulerpenina* (a)

*La división Chlorophyta, que comprende las algas verdes, constituye otro gran grupo de macroalgas de interés farmacológico. Estas especies se encuentran en gran abundancia en los ambientes acuáticos y habitan tanto en aguas dulces como saladas, encontrándose también en ambientes terrestres (rocas, lodos, troncos de árboles); contienen los pigmentos Clorofila A y B, B-carotenos y diversas Xantofilas (es decir, la misma combinación de las plantas terrestres); además, de ser ricas en ácido acrílico, aldehídos y terpenoides (Vidotti & Rollemberg, 2004; Martínez, N et al., 1966).<sup>17, 18</sup>*

*Las familias Codiaceae, Udoteaceae y Caulerpaceae, han mostrado una amplia bioactividad en ensayos farmacológicos, aislándose aproximadamente 70 metabolitos secundarios de estas algas (Fenical, W. 1981)<sup>19</sup>; sin embargo, hay muy pocos reportes de nuevos metabolitos secundarios en las chlorophytas, respecto a otras divisiones algales (Martínez, A., 2012).<sup>20</sup>*

*El difenil éter aislado del alga Cladophora fascicularis por diferentes métodos cromatográficos, constituye el primer ejemplo de este tipo de compuesto aislado en las algas verdes. Esta sustancia presentó propiedad antiinflamatoria al suprimir la inflamación causada por la administración a ratones de una toxina de serpiente; además, fue activo en la inhibición del crecimiento de Escherichia coli, Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus (El Gamal, A. 2010).<sup>21</sup>*

## **2.2. Marco Teórico**

*El mar representa más del 90% de toda la biosfera y contiene una enorme biodiversidad; 33 de 34 Phyla animales actuales están representados en el medio marino y 13 de ellos son exclusivos de este medio. Esta biodiversidad*

*está ligada a una gran quimiodiversidad. Durante millones de años de evolución los organismos marinos han desarrollado distintas rutas metabólicas y complejos mecanismos bioquímicos, incluyendo la producción de diversas moléculas con actividad biológica, a las cuales se les ha denominado metabolitos bioactivos.<sup>22</sup>*

*En los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de compuestos bioactivos en organismos marinos<sup>23</sup>, siendo las algas una de las principales productoras de compuestos bioactivos<sup>24</sup>, en algunos casos con estructuras moleculares no encontradas en otros organismos<sup>25</sup> con posibles usos como antibacterianos, anticancerígenos, cardiotónicos, antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y anticoagulantes entre otros<sup>26</sup>.*

*Es así como, en la actualidad, las algas, han atraído la atención de investigadores como fuentes de compuestos biológicamente activos; sus propiedades biológicas, la diversidad de sus moléculas muchas con estructuras químicas complejas y novedosas que resultan difíciles de sintetizar, así como el número de moléculas con efectos similares y/o sinérgicos en un organismo determinado refuerzan esta tendencia.<sup>27</sup>*

*La producción de metabolitos secundarios en las especies del género *Caulerpa*, está asociada principalmente a la defensa contra organismos herbívoros, ya que suelen sintetizar sustancias repulsivas y tóxicas para evitar ser consumidas. La mayoría de estos compuestos incluyen terpenos, polifenoles, bases aminoácidas, compuestos halogenados y caulerpenina.<sup>7</sup>*

*Los diferentes metabolitos encontrados en el alga de este género han demostrado considerable actividad en diferentes ensayos biológicos,*

*encontrándose en algunos casos niveles similares de actividad biológica. El sesquiterpeno, es el principal metabolito sintetizado por las algas verdes del género Caulerpa, el cual juega un papel importante en su defensa química.*<sup>28,</sup>

29

*El compuesto ha mostrado propiedades antibióticas, efectos citotóxicos en las células de mamíferos, actividad antiproliferativa e inhibición de la división celular en huevos de erizo de mar.*<sup>9,28</sup>

### **2.2.1. Descripción morfológica del Género “Caulerpa”.**

*Caulerpa es un género que se incluyen dentro de las algas verdes, de la Familia Caulerpaceae, El término proviene del griego, de caulos (tallo) y erpo (yo repto).*

*En el género Caulerpa se observa diversos órganos (rizoides, cauloides y filoides), se caracteriza por presentar talo de organización sifonal (normalmente no hay tabiques separando células), y talo pseudoparenquimático formado por sifones cilíndricos gruesos y otros anchos de aspecto laminar cuyas paredes están conectadas internamente por trabéculas de xilano. Su pared celular conteniendo diversos polisacáridos (con variaciones dentro del ciclo biológico): xilano, celulosa, manano y glucano. Además, presenta reproducción asexual con zoosporas estefanocontas. Es capaz de crecer hasta una longitud de sesenta o cien centímetros.*<sup>30</sup>

### **2.2.2. Hábitat y ubicación geográfica de la especie “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering”.**

*Las especies marinas Caulerpa filiformis (Suhr) Hering y Caulerpa racemosa constituyen las dos únicas especies de nuestra flora marina representantes del género Caulerpa, siendo la primera la más frecuente y conspicua. El área de distribución de Caulerpa filiformis es global tropical a subtropical en el Perú es como sigue: Islas Lobos de Afuera (Lambayeque), Sechura, Matacaballo, Parachique, Paita y Máncora (Piura).*<sup>31</sup>

*Caulerpa filiformis es común en el norte del Perú. A nivel mundial ha sido registrada en las costas este y oeste de Sudáfrica, India Subcontinental e India Oceánica.*<sup>32</sup>

*Su gran abundancia se debe al tipo de reproducción (asexual) del género. Además, cuando el alga es arrancada, cada uno de los fragmentos puede readherirse al sustrato y regenerar en una nueva planta. Crece hasta los 20 m de profundidad, dependiendo de la claridad de las aguas y disponibilidad de luz.*<sup>33</sup>

### **2.2.3. Cepas bacterianas utilizadas en el estudio**

#### **2.2.3.1. Bacterias Gram – Positivas**

##### **2.2.3.1.1. *Bacillus cereus* (ATCC 11778)**

*Bacillus cereus es un microorganismo gram-positivo, posee forma de bastón alargado, es aerobio facultativo y formador de esporas, pero estas no son liberadas del esporangio. Crece en condiciones de oxígeno normales. No crece por debajo de 4,4 °C y se destruye por cocinado normal, pero las esporas al ser termorresistente pueden sobrevivir. Se puede encontrar en el suelo, polvo y especias. Bacillus*

*cereus* produce dos enterotoxinas durante su crecimiento exponencial: la toxina diarreica y la toxina emética que dan lugar a dos formas clínicas distintas de intoxicación alimentaria.<sup>34, 35</sup>

#### **2.2.3.1.2. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)**

*Los integrantes del género Staphylococcus, son cocos Gram positivos de 0,5 – 1,5 µm de diámetro,<sup>36</sup> distribuido en grupos irregulares a manera de racimos; posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Son inmóviles, facultativamente anaerobios. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis; infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales; el 40 a 50% de los seres humanos aproximadamente son portadores nasales de Staphylococcus aureus, estas se encuentran en las ropas personales de cama o de ambientes humanos. En la actualidad las cepas de Staphylococcus aureus, tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes.<sup>34, 36</sup>*

#### **2.2.3.2. Bacterias Gram – Negativas**

##### **2.2.3.2.1. *Escherichia coli* (ATCC 25922)**

*Escherichia coli* es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un

*microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.*<sup>37</sup>

*Producen una potente toxina y puede ocasionar enfermedades graves como el síndrome urémico hemolítico y puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía.*<sup>34, 38</sup>

#### **2.2.3.2.2. *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)**

*Es un bacilo gram-negativo, catalasa positiva, oxidasa negativa, se encapsula, es decir, una capa de polisacárido que está presente fuera de la pared celular de la bacteria; es un anaerobio facultativo y tiene una característica: de ser tanto aeróbica como anaeróbica, dependiendo de la situación. Es un microorganismo patógeno, oportunista, colonizador de la piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Esta bacteria es uno de los principales microorganismos causantes de infecciones intrahospitalarias. Esta *Klebsiella pneumoniae* es muy difícil de tratar.*<sup>39</sup>

#### **2.2.3.2.3. *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853)**

*Son bastoncillos aerobios gram-negativos, aerobios estrictos, oxidasa positiva, no fermenta la glucosa; forman colonias lisas redondas de color verdosa, tiene como hábitat el agua, así como los ambientes húmedos de los hospitales, produce enfermedades por sus*

*propiedades invasivas y toxigénicas. Presentan una gran susceptibilidad a las infecciones por este microorganismo los lactantes y prematuros, pacientes quemados y los que han sufrido intervenciones quirúrgicas o diagnósticas. La Pseudomona aeruginosa causa infecciones de heridas (donde origina una pus verde – azulado de donde proviene su nombre común bacilo piociánico), meningitis, septicemia, infecciones urinarias, neumonía, cistitis, conjuntivitis, etc. Es muy resistente a los antibióticos.*<sup>39</sup>

#### **2.2.3.2.4. Shigella dysenteriae (ATCC 13313)**

*Las shigelas son bacilos gram-negativos delgados, las formas cocobacilares se presentan en cultivos jóvenes. Su hábitat natural está limitado al tubo digestivo de seres humanos y otros primates donde producen disentería bacilar. Son anaerobios facultativos, pero se multiplican mejor en condiciones aeróbicas. Las colonias convexas, circulares, transparentes con bordes intactos alcanzan un diámetro de casi 2 mm en 24 h. Todas fermentan glucosa, con excepción de Shigella sonnei. Esto las distingue en los medios diferenciadores. Forman ácidos a partir de hidratos de carbono, pero pocas veces producen gas.*<sup>39</sup>

#### **2.2.4. Fármaco utilizado en el ensayo.**

##### **2.2.4.1. Ciprofloxacino<sup>40</sup>**

*Es uno de los derivados de las fluoroquinolonas más potentes. Es bactericida y tiene un amplio espectro extendido contra la mayoría de las bacterias aeróbicas gram-negativas, incluso Pseudomonas, Chlamydia trachomatis, Hemophilus, Neisseria y contra bacterias aeróbicas gram-positivas, incluso los estafilococos productores de penicilinasas y los resistentes a la meticilina, S. pneumoniae es susceptible a las concentraciones mayores de ciprofloxacino.*

**Farmacocinética:** *Se absorbe muy bien después de su administración oral y se distribuye de manera extensa en los tejidos del cuerpo. Su concentración sérica máxima se alcanza en las primeras 3 horas después de una dosis oral de 400 mg. Los alimentos no modifican la absorción oral, pero aumentan el intervalo que transcurren hasta alcanzar la concentración sérica máxima. La semivida sérica es de 3 a 4 horas. El volumen de distribución es elevado y se ha detectado ciprofloxacino en leche materna humana. Se elimina a través de los riñones.*

**Farmacodinamia:** *El ciprofloxacino tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana frente a gérmenes patógenos aerobios gram-positivos y gram-negativos.*

*El ciprofloxacino inhibe la síntesis bacteriana del ácido desoxirribonucleico y es bactericida. A causa de su potente actividad, es activo frente a organismos que son resistentes al ácido nalidixico, oxonilico y pipemidico, cinoxacina y compuestos relacionados.*

**Indicaciones terapéuticas:** *Tratamiento de las infecciones del tracto urinario superior e inferior, incluyendo cistitis, pielitis y cistopielitis, causadas por bacterias sensibles. Tratamiento de la prostatitis, tratamiento de ETS como gonorrea y chancroide. Tratamiento de infecciones digestivas causadas por microorganismos sensibles al ciprofloxacino.*

#### **2.2.5. Pruebas de susceptibilidad in vitro.<sup>41, 42</sup>**

*Esta se refiere a los experimentos que se hacen con inóculos de microorganismos en medios de cultivo sólidos y semisólidos como el agar o líquidos como el caldo nutritivo, estos ensayos se realizan en el laboratorio y permiten medir la susceptibilidad de microorganismos patógenos y fitopatógenos frente a una sustancia o la mezcla de sustancias desconocidas de origen vegetal con potencial antimicrobiano. La evaluación de la eficacia antimicrobiana se realiza determinando la inhibición del crecimiento microbiano. Existen técnicas para evaluar los antimicrobianos como: métodos de difusión en agar, métodos de dilución, entre otros.*

##### **2.2.5.1. Método de difusión en Agar.<sup>41, 42</sup>**

*Se basa fundamentalmente en incorporar al medio de cultivo el antibiótico o el microorganismo en concentración conocida para que luego de solidificarse el medio se adicione la contraparte, luego incubarlo a temperatura y tiempo determinados, finalizado el periodo de incubación, observar la inhibición de crecimiento o halos de inhibición según la técnica utilizada. Ésta técnica también abarca el llamado,*

método de difusión o de discos de papel y el llamado método de difusión en placa excavada. Las ventajas de los métodos de difusión son que utilizan una pequeña cantidad de la muestra a evaluar y ofrecen la posibilidad de ensayar varias sustancias o concentraciones en un mismo organismo.

#### **2.2.5.2. Método de dilución**

También llamado turbidimétrico, consiste en hacer diluciones seriadas del extracto en  $\mu\text{g/mL}$  en caldo de cultivo con una suspensión calibrada del microorganismo y se incuban a temperatura y tiempo determinados, finalizado el periodo de incubación, los tubos se examinan visualmente para comprobar la existencia o no de la turbidez.<sup>41, 42</sup>

### **2.3. Marco Conceptual**

- ***Caulerpa filiformis (Suhr) Hering:*** Especie de la familia *Caulerpaceae* que se distribuye a través de las costas de América del Sur. Presenta una gran variedad de especies, las mismas han sido poco estudiadas o permanecen aún por descubrir.
- **Bacterias:** Son organismos unicelulares microscópicos, que prosperan en ambientes diversos. Pueden vivir en el suelo, en el océano y en el interior del intestino humano. Estas son procariotas.
- **Actividad antibacteriana:** Método por el cual se demuestra la efectividad de un metabolito o principio activo frente a una bacteria u organismo patógeno, disminuyendo su proliferación.

- **Bioseguridad:** *Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente, frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánico.*
- **Antibiótico:** *Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos.*
- **Escala de Mc. Farland:** *Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.*
- **Concentración Inhibitoria Mínima (CMI):** *Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación.*
- **Medios de cultivo:** *Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana in vitro.*
- **Gram positivas:** *aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de gram. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana*
- **Gram negativas:** *aquellas bacterias que **no** se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura **didérmica** dada por la envoltura celular, pues presenta doble membrana celular (una externa y la otra citoplasmática), lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana.*

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1. Materiales, equipos y reactivos

- **Material biológico:**
  - **Alga marina:** “*Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering”.
  - **Bacterias Gram positivos (+)**
    - *Bacillus cereus* (ATCC 11778)
    - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
  - **Bacterias Gram negativos (-)**
    - *Echerichia coli* (ATCC 25922)
    - *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)
    - *Pseudomona aureginosa* (ATCC 27853)
    - *Shiguella dysenteriae* (ATCC 13313).
- **Medios de cultivo:**
  - *Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón)*
  - *Agar Müller Hinton*
- **Materiales**
  - *Los necesarios para la realización de la investigación.*
- **Equipos:**
  - *Agitador VORTEX IKA Genios 3*
  - *Plancha Calefactora con agitador magnético*
  - *Cabina de Seguridad Biológica Clase II, Tipo A2 ESCO.*
  - *Refrigeradora*

- *Sonicador*
- *Espectrofotómetro (marca UNICO-UV 2100).*
- *Evaporador rotatorio (BUCHI).*
- *Balanza Analítica (marca SARTORIUS).*
- *Balanza digital*
- *Equipo de Baño María.*
- *Estufa BINDER, modelo BD.*
- *Autoclave (marca GREET MED MODELO YX -280 D).*
- *Incubadora PRECISION SCIENTIFIC THELCO Modelo 2.*
- *Micropipeta DRAGON LAB. VOL. Variable 10  $\mu$ L – 100  $\mu$ L,*
- **Reactivos y solventes:**
  - *Ciprofloxacino 5  $\mu$ g/mL.*
  - *Etanol 96°*
  - *Éter de petróleo 30° - 60°.*
  - *Agua destilada.*
  - *Tween 80.*
  - *Solución Salina Fisiológica.*
  - *Alcohol medicinal 70°.*
  - *BaCl<sub>2</sub>.*
  - *H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cc.*
  - *Reactivo de Dragendorff.*
  - *Reactivo de Kedde.*

- *Reactivo de Mayer.*
- *Reactivo de Wagner*
- *Reactivo de Liebermann-Burchard*
- *Reactivo de Arnow*
- *Reactivo de Baljet*
- *y demás utilizados para realizar las reacciones de coloración e identificación*

- **Otros**

- *Algodón*
- *Guantes quirúrgicos*
- *Gafas protectoras*
- *Mascarilla N 95*
- *Papel Krafts*
- *Viales*
- *Jeringas*
- *Tuberculinas*
- *Gorro protector*
- *Ron de quemar*

### **3.2. Recolección y secado del alga marina.**

#### **3.2.1. Recolección del material vegetal**

*Para la presente investigación, se recolectó el alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” proveniente de la playa “El chaco” (bahía de Paracas – Pisco), aprovechando las horas de marea baja, durante los meses*

*de verano (Enero a Marzo 2018). Éstas se lavaron con agua de mar para remover el exceso de arena y organismos epífitos. Se colocó en bolsas de plástico para drenar el exceso de agua por gravedad. Posteriormente fueron transportadas para su secado a la ciudad de Ica.*



**Figura 2.** Alga “*Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering”

### **3.2.2. Secado y conservación de la muestra**

*Parte de la muestra fue separada y debidamente tratada. Posteriormente se seleccionaron las algas en buen estado, separando de forma manual las deterioradas, manchadas y/o contaminadas. Para luego secarlas por un periodo de 30 días (bajo sombra), obteniéndose aproximadamente 10 Kg de alga seca.*

### **3.2.3. Clasificación Taxonómica.**

*Como resultado de la clasificación taxonómica, según el sistema Clasificación de Guiry, M. D. & Guiry, G. M. (2014) y determinado por el Blgo. Mario Benavente Palacios del Museo de Historia Natural de la*

Universidad Nacional Mayor de San Marcos, la muestra vegetal tiene la siguiente clasificación taxonómica.

**DIVISIÓN:** *CHLOROPHYTA*

**CLASE:** *ULVOPHYCEAE*

**ORDEN:** *BRYOPSIDALES*

**FAMILIA:** *CAULERPACEAE*

**GÉNERO:** *Caulerpa*

**ESPECIE:** *Caulerpa filiformis (Suhr) Hering.*

**Nombre vulgar:** “*Caulerpa*”.

#### **3.2.4. Obtención de los extractos: etéreo y etanólico.**

*Los extractos etéreo y etanólico se obtuvieron del alga seca y triturada de la siguiente manera:*

- ✓ **Extracto de éter de petróleo:** *Se maceró en un envase de vidrio opaco de 4000 mL, (se colocó 50 g de alga seca y 2000 mL de éter de petróleo), durante 7 días. Posteriormente se filtró y se llevó a concentrar a un evaporador rotatorio (BUCHI) a presión reducida, hasta sequedad, a una temperatura de 25 °C.*
- ✓ **Extracto etanólico:** *Se utilizó el marco de la extracción de éter de petróleo (los 50 g del alga utilizada anteriormente y 2000 mL de etanol de 96°), durante 7 días. Posteriormente se filtró y se llevó a concentrar a un evaporador rotatorio (BUCHI) a presión reducida, hasta sequedad, a una temperatura de 45 °C.*

*Se obtuvo 10 g del extracto seco de éter de petróleo y 8 g de extracto seco de etanol, de color verde oscuro, estos fueron utilizados en la*

*marcha fitoquímica y la preparación de las distintas concentraciones para la actividad antibacteriana.*

### **3.2.5. Screening fitoquímico<sup>43</sup>:**

*Consiste en la extracción de metabolitos secundarios con solventes apropiados y la aplicación de las reacciones de coloración y precipitación, orientada a la determinación cualitativa de los grupos de constituyentes químicos presentes en el extracto.*

*Para la determinación cualitativa de los principales grupos de constituyentes químicos presentes en el extracto, se realizó una marcha fitoquímica con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración, obteniéndose 6 fracciones denominadas A, B, C, D, E y F.*

#### **Obtención de Fracciones:**

*A partir de extracto etanólico obtenido se separó la **fracción A**, aproximadamente 2 g para efectuar las reacciones e identificación y el resto se extrae con HCL al 1%, se filtra y se obtiene dos partes:*

- **Insoluble:** *se lavó hasta pH neutro con agua destilada seguidamente se disolvió con 5 ml de diclorometano, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, este filtrado constituye la **Fracción B**.*

- **Solución Ácida:** *se filtró y se alcalinizó con amoníaco y se extrajo con diclorometano obteniéndose 2 fases:*

- 1. FASE DICLOROMETÁNICA:** *se lavó con 10 ml de agua destilada, luego la fase diclorometánica se secó con sulfato de sodio anhidro, filtramos y se obtuvo la **Fracción C**.*

**2. FASE ACUOSA:** se saturó con 5 g de sulfato de sodio anhidro y se extrajo con diclorometano: etanol (3:2). Se obtuvo 2 fases:

• **Fase Orgánica (diclorometanicaetanólica):** se lavó con solución de sulfato de sodio anhidro, reuniendo las fases acuosas. Seguidamente la fase orgánica se deshidrató con un gramo de sulfato de sodio anhidro, se filtró, y esto constituyó la **Fracción D**.

• **Fase Acuosa:** a éste se adicionó los residuos acuosos obtenidos del lavado de la fase orgánica esto constituyó la **Fracción E**.

### **3.2.5.1. Detección de grupos funcionales y metabolitos secundarios.**

Separadas las fracciones se procedió a realizar sobre estas reacciones de coloración o precipitación para identificar grupos funcionales y metabolitos secundario.

#### **FRACCIÓN A**

##### **Detección de Taninos:**

- **Reacción de Gelatina- sal:** Se vierte 0,5 mL de extracto sobre 5 mL de solución de NaCl 5%, gelatina 1% y gelatina-sal la precipitación con este último reactivo o con ambos el 1º y 2º es indicativo de la presencia de taninos, si solamente ocurre con el 1º, podría ser un falso positivo.

- **Reacción de Cloruro Férrico:** En un tubo de ensayo se colocó 0.5 mL de la Fracción A y se le agregó una gota de solución acuosa de FeCl<sub>3</sub> 1%. La reacción es positiva cuando aparecen colores azul-negro, verde o azul verdoso.

### **Detección de Aminoácidos:**

- **Reacción de Ninhidrina:** *Sobre tiras de papel de filtro se coloca con una pipeta capilar:*

- *Una gota de Fracción A + una gota del reactivo Ninhidrina al 2%.*
- *Blanco: Solución etanólica de ninhidrina al 2%.*
- *Testigo: una gota de solución de metionina 5%.*

*Luego del secado a temperatura ambiente las tiras de papel se colocan en la estufa a 110 - 120°C hasta la aparición de un color en el blanco. Se compara con la mancha azul violácea de la solución testigo.*

*La reacción es positiva si el papel de la muestra presenta un color azul violáceo.*

### **Detección de Flavonoides:**

- **Reacción de Shinoda:** *En una placa se vertieron 3 gotas de la Fracción A, 5 limaduras de Mg, y 2 gotas de HCl concentrado. La reacción es positiva cuando aparecen tonos de color rojo, anaranjado y violeta.*

### **FRACCIÓN B**

#### **Detección de Triterpenoides y/o Esteroides:**

- **Reacción de Liebermann Burchard:** *Sobre 1 mL de la Fracción se vertieron 5 gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético/ácido sulfúrico (50:1). La reacción es positiva si aparecen colores verdes, azul verdoso (vías rojo o azul).*

### **Detección de Antraquinonas:**

- **Reacción de Bornträger:** *Sobre el resto de la Fracción B se agregan 5 mL de NaOH 5% y se agita suavemente. La reacción es positiva si la fase acuosa toma un color rojo.*

### **FRACCIÓN C**

#### **Detección de Esteroides y/o Triterpenoides:**

- **Reacción de Liebermann Burchard**

#### **Detección de Cardenólidos:**

- **Reacción de Kedde:** *Solución A: ácido 3,5-dinitrobenzoico 2% en metanol. B: Hidróxido de potasio 5.7% en agua. Mezclar a + b, volúmenes iguales esto constituye el reactivo (R). Colocar en un tubo de ensayo 1mg de muestra + 2 gotas del reactivo. Si la reacción es positiva se formará un color púrpura o violáceo.*

#### **Detección de Alcaloides:**

*El resto de la Fracción C se evapora a sequedad y luego se agrega 2 mL de HCl 1%, filtrar. Se realizan las reacciones de precipitación, de Dragendorff, Mayer, Hager, Wagner. La reacción es positiva si aparece un precipitado.*

### **FRACCIÓN D**

*Se evaporó a sequedad y luego se agregó 2,5 mL de etanol, efectuándose las siguientes reacciones:*

#### **Detección de Flavonoides:**

- *Reacción de Shinoda*

**Detección de Leucoantocianidinas y catequinas:**

- *Reacción de Rosenheim:* A 0,2 mL de la Fracción D se agregó 0,1 mL de HCl concentrado, se calienta durante 10 minutos a 100°C, se enfría y se adiciona 2 mL de agua y 0,4 mL de alcohol amílico, agitar y observar el color en la fase amílica. La reacción se considera positiva si aparece un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro. Si es rojo indica presencia de antocianidinas. Si es marrón indica presencia de catequinas.

**Detección de Cardenólidos:**

- *Reacción de Kedde*

**Detección de Esteroides y/o Triterpenoides:**

- *Reacción de Liebermann Burchard.*

**Detección de Alcaloides:**

- *Reacción de Mayer, Dragendorff, Hager y Wagner*

**FRACCIÓN E**

**Detección de Flavonoides:**

- *Reacción de Shinoda.*

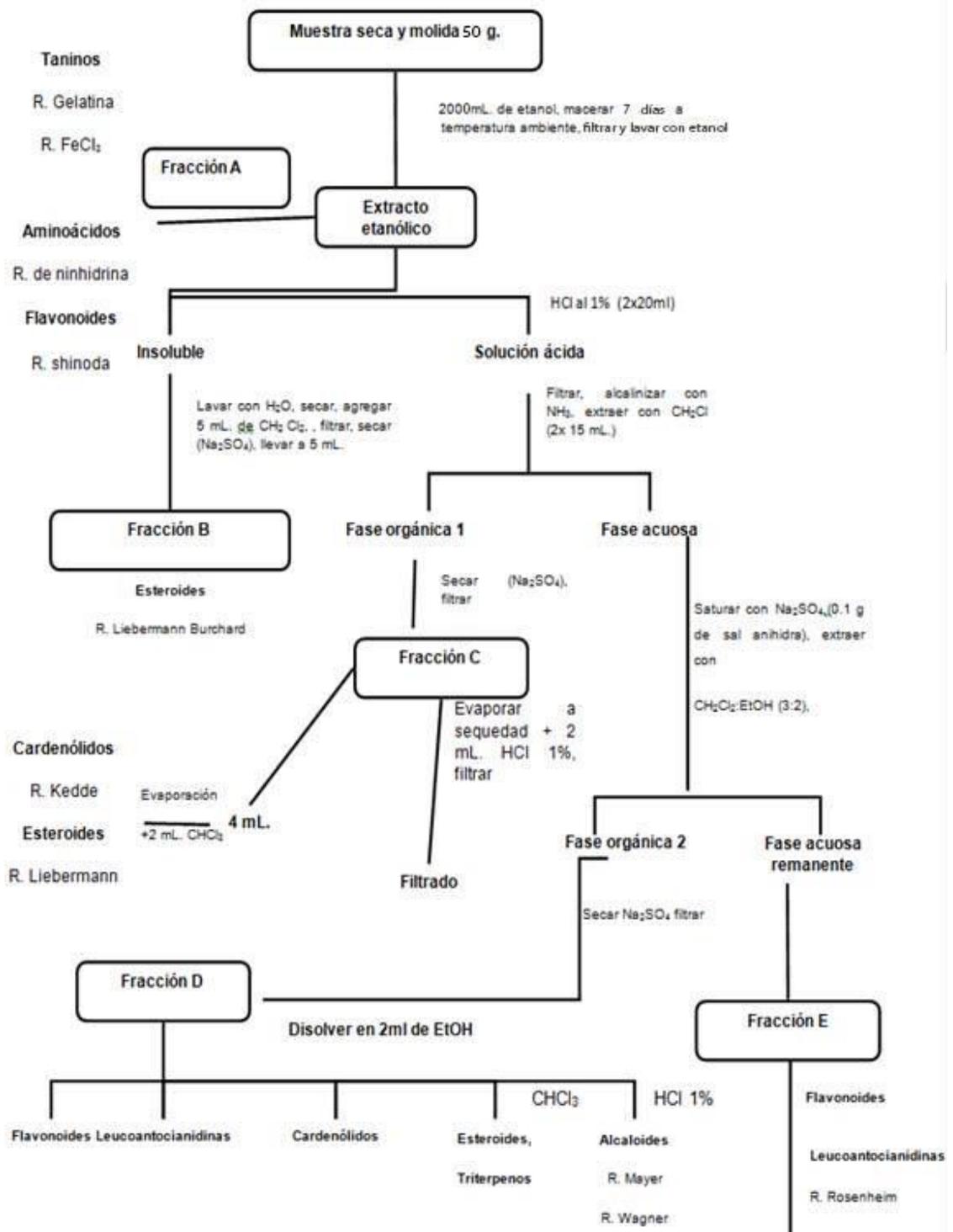
**Detección de Leucoantocianidinas:**

- *Reacción de Rosenheim*

**FRACCIÓN F**

**Detección de Saponinas:**

- *Prueba de espumas.*



**Figura 3. Flujograma del Screening fitoquímico de “*Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering”**

**3.2.6. Identificación de los metabolitos secundarios para el extracto etéreo<sup>44</sup>:**

• **Taninos**

*En dos tubos de ensayos, se colocaron 0,5 g del extracto y 1 mL de solución de gelatina-sal (solución de gelatina al 1% en NaCl al 10%). en el primer tubo se añadió 0,5 mL del reactivo gelatina-sal y el segundo tubo sirvió como control. La formación de un precipitado indicará la presencia de taninos.*

• **Polifenoles**

*La detección de polifenoles, se llevó a cabo evaporando a sequedad el extracto crudo, el cual se retomó en agua destilada y se filtró. Seguidamente, el extracto filtrado se hizo reaccionar con una solución de cloruro de hierro (III) al 1 %. La prueba de polifenoles se considerará positiva por el cambio de la solución a una coloración verde, azul o parda.*

• **Flavonoides**

*A 1 mL del extracto disuelto, se le agregó 0,5 g de virutas de Mg y, HCl concentrado gota a gota, hasta que terminó el desprendimiento de hidrógeno y durante 10 minutos se observarán cambios de color en la solución. La aparición de una coloración amarilla a roja positiva nos indicará presencia de flavonoides.*

• **Glicósidos Cianogénicos y Cardiotónicos**

*La presencia de glicósidos cianogénicos se detectará añadiendo al material fresco macerado unas gotas de cloroformo y calentando entre 50*

*a 70°C en un tubo de ensayo cerrado; los vapores serán puestos en contacto con un papel de filtro impregnado en una solución al 1% de Ácido Pírico en Carbonato de Sodio al 10%.*

*Los compuestos cianogénicos se identificarán por la aparición de una mancha roja sobre el papel de filtro.*

*Los glicósidos cardiotónicos se detectaron por la reacción con una mezcla 1:1 recién preparada, de Ácido 3,5- Dinitrobenzoico (2%) y KOH (0,5 mol·L<sup>-1</sup>). La presencia de los glicósidos cardiotónicos será detectada por la aparición de un color rojo violeta.*

- **Cumarinas**

*El extracto crudo se disolverá en etanol, y se tapará con un papel de filtro impregnado en una solución diluida de NaOH; posteriormente, se llevará a baño maría a 100°C por algunos minutos. Transcurrido este tiempo, se removerá el papel filtro y se observará bajo la luz UV. Una fluorescencia amarilla observada en el papel de filtro será el indicativo para la presencia de cumarinas.*

- **Antraquinonas**

*Los extractos crudos se extraerán con KOH (0,5 mol·L<sup>-1</sup>); luego, serán filtrados y acidificados con ácido acético, y después, la solución preparada se agitará con benceno. La aparición de una coloración roja en las capas orgánicas al alcalinizar con Hidróxido de Amonio demostrará la presencia de antraquinonas.*

- **Metilencetonas**

*El extracto crudo se disolverá en agua destilada, se filtrará y luego será tratado con el Reactivo de Baljet (mezcla de 1:1 de 1 g de Ácido Pícrico en 25 mL de etanol y 2 g de NaOH en 25 mL de agua). La aparición de una coloración roja nos indicará la presencia de metilcetonas.*

• **Alcaloides**

*El extracto casi seco se retomará con HCl al 10% y se agitará con cloroformo. El empleo del solvente poco polar permitirá la separación de la sal formada de los compuestos orgánicos presentes. La fase acuosa, luego de alcalinizada, se extraerá con cloroformo. Las dos fases se analizarán por separado con el Reactivo de Meyer (Tetrayodomercuriato de potasio), de Dragendorff (Tetrayodobismutato de potasio), o Ácido Yodoplatínico, el cual permitirá detectar los alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio. La aparición de un precipitado marrón-rojizo será el indicativo para la detección de alcaloides.*

• **Saponinas**

*Se utilizaron aproximadamente 0,5 g del extracto crudo y se transvasó a un tubo de ensayo con 2 mL de agua destilada. Posteriormente, la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos. La Presencia de saponinas será positiva cuando aparezca una espuma persistente durante 10 minutos, en una zona de 3 cm por encima de la superficie del líquido.*

• **Esteroles Insaturados y Triterpenos Pentacíclicos**

*Una parte del crudo total se hidrolizará con HCl al 10%, luego el hidrolizado se concentrará y se extraerá con cloroformo. Tanto el crudo*

*como el extracto orgánico proveniente de la hidrólisis, se analizarán para esteroides y triterpenos empleando el reactivo de Liebermann-Burchard (1 gota de ácido sulfúrico a 1 mL de cloroformo), una coloración azul o verdosa nos indicará la presencia de esteroides. Mientras que la producción de una coloración roja o violeta se considerará positiva para triterpenos.*

• **Fenilpropanoides**

*Una pequeña cantidad del extracto crudo se disolverá en etanol y se añadirá 1 mL de la solución del extracto etanólico en tres tubos de ensayo. El primer tubo servirá como patrón de comparación, al segundo se le añadirá 2 mL de HCl 0,5 mol·L<sup>-1</sup>, 2 mL de la solución acuosa de Nitrito de sodio al 10% (Reactivo de Arnow) y 2 mL de la solución acuosa de NaOH 2 mol·L<sup>-1</sup>, y, en el tercer tubo, se le adicionarán todos los reactivos sin la muestra, que también servirán como testigo para la comparación ante los cambios de coloración. Al haber presencia de fenilpropanoides, el Reactivo de Arnow mostrará una coloración naranja y después de la adición del NaOH cambiará a un rosado púrpura, lo que se considera positivo para esta prueba.*

**3.3. Estudio Microbiológico<sup>34</sup>:**

*Se realizó en el laboratorio de Análisis Clínicos y Microbiológicos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Para el presente estudio, las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” de Ica.*

*Se utilizaron como principales medios de crecimiento y cultivo el Agar Müller Hinton y el caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) que describimos a continuación:*

- **Agar Müller Hinton (AMH):** *Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), antiguamente llamado National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para utilizarlos en los antibiogramas en medio sólido.*
- **Caldo BHI (Brain Heart Infusion):** *Infusión Cerebro Corazón, es un medio líquido de enriquecimiento (contiene infusiones de tejidos de cerebro y corazón, además de peptonas que suministran proteínas) indicado para el cultivo de una gran variedad de microorganismos exigente nutricionalmente, tanto aerobios como anaeróbios, así como de hongos y levaduras, tanto de muestras clínicas como no clínicas.*

### **3.3.1. Preparación de medios, cepas y concentración de los extractos<sup>34</sup>:**

#### **a) Preparación de las concentraciones de los extractos:**

*El extracto seco se pesó para cada una de las concentraciones en una balanza analítica (Sartorius). Se pesaron por separado el extracto de alta polaridad y el extracto de baja polaridad. Las dos muestras se mezclaron con Tween 80 y se completó con metanol puro. Para su mejor homogenización se llevó al ultrasonido.*

*Los extractos de etanol y éter de petróleo se diluyeron a las concentraciones de 100 mg/mL (10%), 200mg/mL (20%), 300 mg/mL (30%) y 400 mg/mL (40%).*

*Para el control positivo se utilizó el medicamento comercial Ciprofloxacino en la concentración de 5 µg/mL.*

*Para el control negativo se diluyó Metanol Puro + Tween 80 en la proporción 85:15 respectivamente para ambos extractos.*

**b) Preparación de los medios de cultivo<sup>34, 41</sup>:**

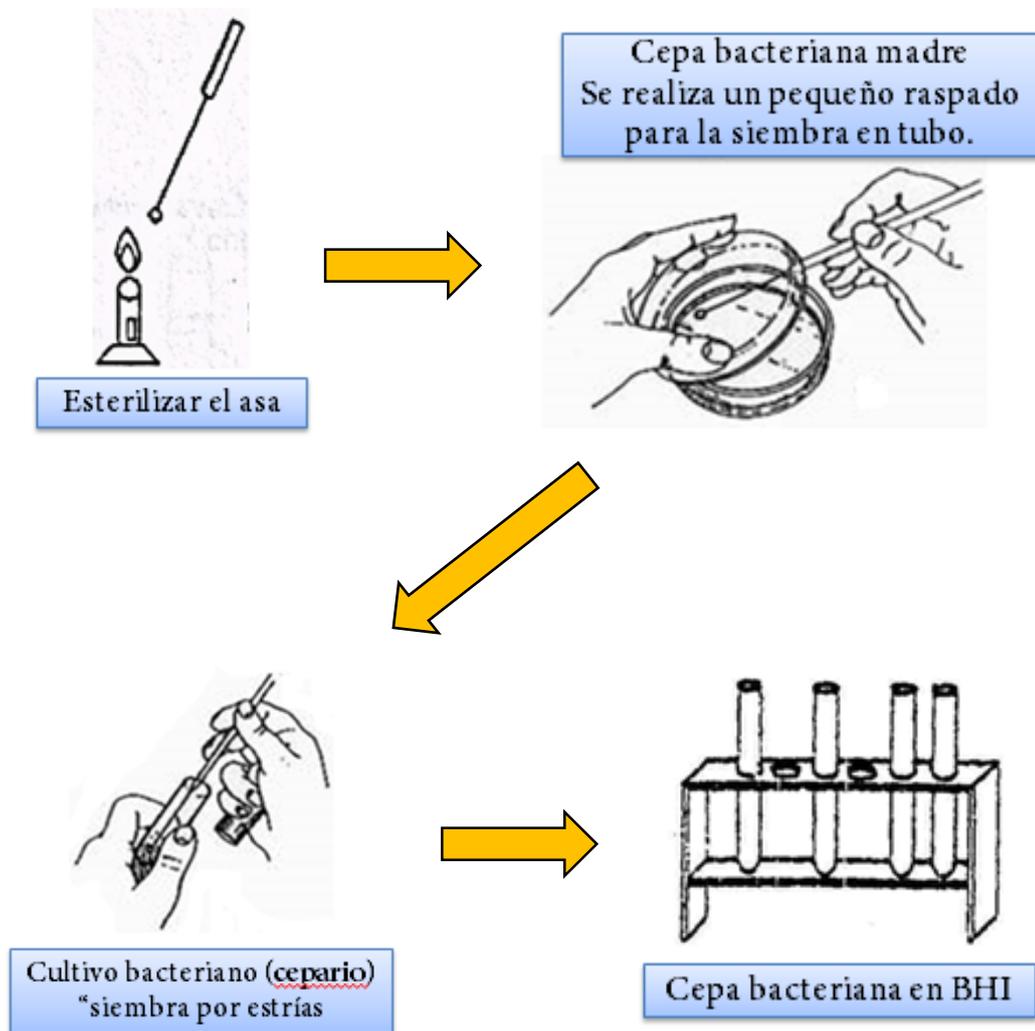
*Todos los materiales de vidrio utilizados se envolvieron con papel Kraft y fueron llevados a la cámara de secado (esterilizadora), en donde se les dejó a la T° de 180°C por un tiempo de 120 minutos, concluido este proceso estaban estériles y listos para la preparación de los medios.*

*Se disolvió la cantidad requerida del medio de cultivo (polvo) en gramos por litro de agua destilada. Luego se mezcló hasta uniformizar. Se calentó agitando frecuentemente unos minutos hasta que se disolvió, se distribuyó en frascos Boeco de aproximadamente 250 mL, se llevó a autoclave 30 minutos a 121°C, a 15 lb de presión.*

**c) Replicación de las cepas madres<sup>34, 41</sup>:**

*Para el proceso de réplica (trasplante) de todas las cepas puras, se utilizó el método de siembra por "Agitación", utilizando para esto el caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) preparado previamente, se distribuyó la cantidad de 5 mL aprox. en tubos de ensayo esterilizados. Se incubará durante 24 horas a 37°C.*

**Figura 4:** *Flujograma de la replicación de las cepas madres a las cepas bacterianas.*

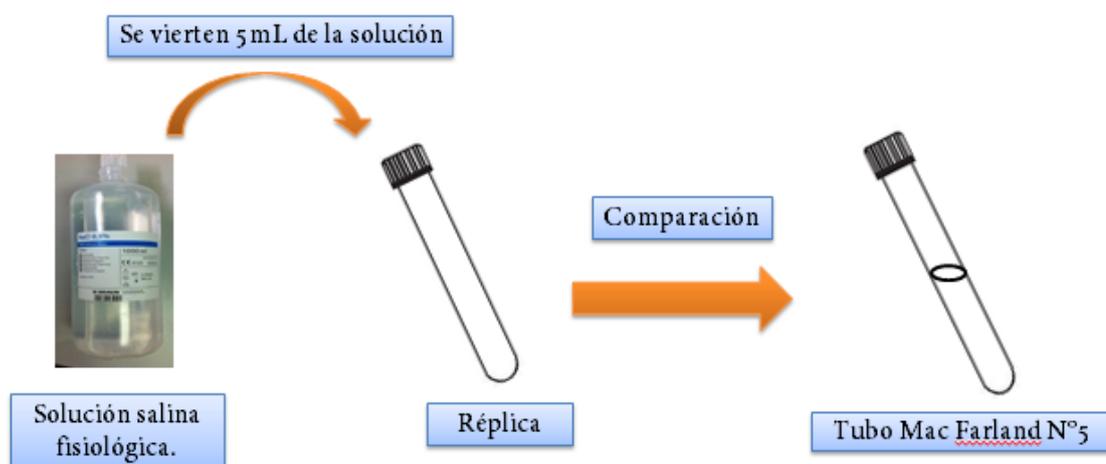


#### d) Preparación del Inóculo bacteriano.<sup>34, 41</sup>

*En tubos de ensayo con 9 mL de solución fisiológica estéril, se colocó el inóculo de cada microorganismo ajustándolo al patrón de turbidez N° 5 de la Escala de Mac Farland, turbidez que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.*

*Luego se tomó con una jeringa estéril de 20 mL del medio Agar Müller Hinton de los frascos Boeco y se colocó en los tubos de tapa rosca para finalmente incorporar 1 mL (1000  $\mu$ L) de cada inóculo microbiano estandarizado, se mantuvo a una temperatura de 37°C.*

**Figura 5.** *Flujograma del sembrado de la bacteria.*



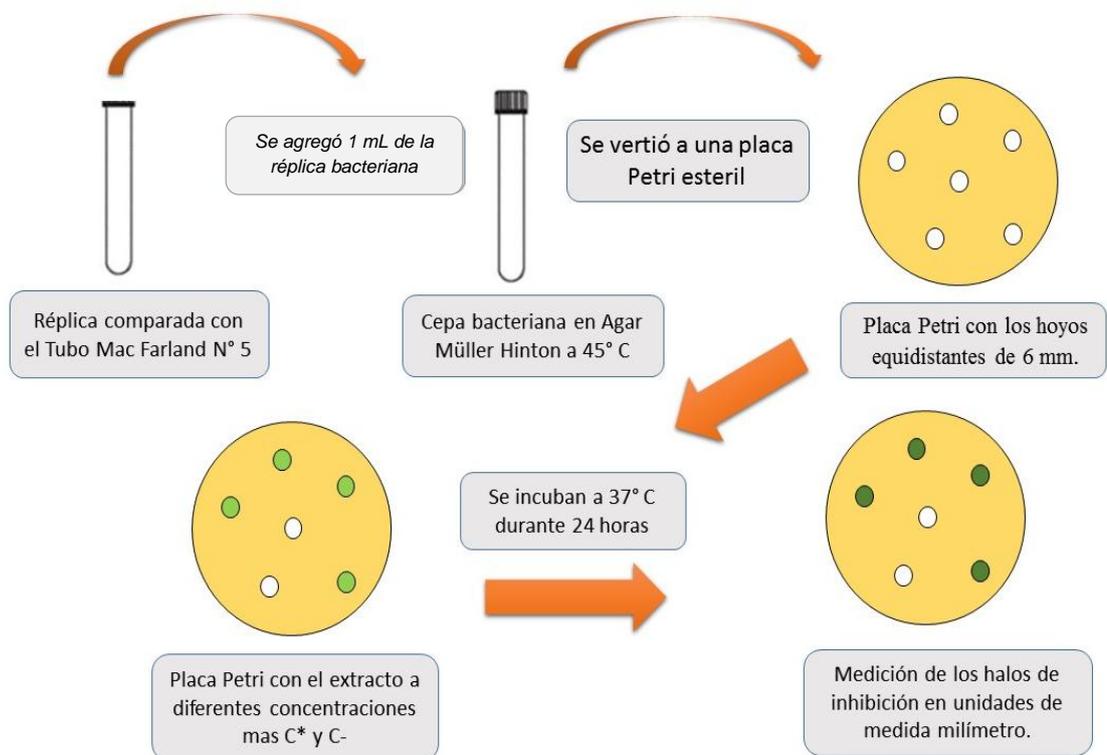
#### 3.4. Método de difusión en Agar (Pozo).<sup>34, 41</sup>

**Principio:** *Este método se fundamenta en la dilución del extracto en medio sólido, en zonas alrededor de la excavación a una extensión tal que le permitirá inhibir el crecimiento de los microorganismos sensibles.*

**Técnica:** *Se procedió de la siguiente manera:*

Se agitó por rotación cada tubo con el medio Müller Hinton inoculado, y se vertió en una placa petri vacía estéril, dejándolo solidificar a temperatura ambiente. Se realizó con un sacabocado estéril pozos de acuerdo al número de diluciones a ensayar, el diámetro de cada pozo fue de 6 mm, el control negativo y el control positivo. Se colocó en cada pozo 25  $\mu$ L, de las diluciones de los extractos, del control negativo y control positivo, previamente se selló cada pozo con 10  $\mu$ L de agar. Luego se llevó a incubación a 37 °C durante 16 a 18 horas. Transcurrido el tiempo se leen los halos de inhibición de crecimiento bacteriano. Fueron dos ensayos para cada extracto y se realizó por triplicado, en cc de 100, 200, 300 y 400 mg/mL (10%, 20%, 30% y 40%). 5

**Figura 6.** Flujograma del Método de Difusión en Agar.



### 3.4.1. Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR).<sup>34, 41</sup>

*Para determinar del Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR), se utilizaron los resultados obtenidos por los extractos frente a los obtenidos por el antibiótico Ciprofloxacino en la concentración de 5 µg/mL.*

$$\text{PIR (\%)} = \frac{AX100}{B}$$

*A= Promedio del diámetro del halo de inhibición de la muestra.*

*B= Promedio del diámetro del halo de inhibición del antibiótico.*

## CAPÍTULO IV

### 4.1. RESULTADOS

#### 4.1.1. SCREENING FITOQUÍMICO

**Tabla 1.** *Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico obtenido a partir del alga Caulerpa Filiformis (Suhr) Hering.*

FRACCIONES	METABOLITOS	RESULTADOS
<b>A</b>	<i>Taninos</i>	-
	<i>Aminoácidos</i>	-
	<i>Flavonoides</i>	-
<b>B</b>	<i>Triterpenos y/o Esteroides</i>	+
	<i>Quinonas</i>	-
<b>C</b>	<i>Alcaloides</i>	-
	<i>Triterpenos y/o Esteroides</i>	+
<b>D</b>	<i>Alcaloides</i>	-
	<i>Flavonoides</i>	-
	<i>Triterpenos y/o esteroides</i>	+
	<i>Leucoantocianidinas</i>	-
<b>E</b>	<i>Leucoantocianidinas y/o Catequinas</i>	-
	<i>Flavonoides</i>	-
<b>F</b>	<i>Saponinas</i>	-

**Leyenda:** signo (+) indica presencia, signo (-) indica ausencia.

**Fuente:** El autor/ / Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA

**Tabla 2.** *Metabolitos secundarios presentes en el extracto de éter de petróleo obtenido a partir del alga Caulerpa Filiformis (Suhr) Hering.*

<b>METABOLITOS</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>Taninos</b>	-
<b>Polifenoles</b>	-
<b>Flavonoides</b>	-
<b>Glicósidos Cianogénicos</b>	-
<b>Glicósidos Cardiotónicos</b>	-
<b>Cumarinas</b>	-
<b>Antraquinonas</b>	-
<b>Metilencetonas</b>	-
<b>Alcaloides</b>	-
<b>Saponinas</b>	-
<b>Triterpenos y/o esteroides</b>	+
<b>Fenilpropanoides</b>	-

**Leyenda:** signo (+) indica presencia, signo (-) indica ausencia.

**Fuente:** *El autor/ / Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA*

#### 4.1.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

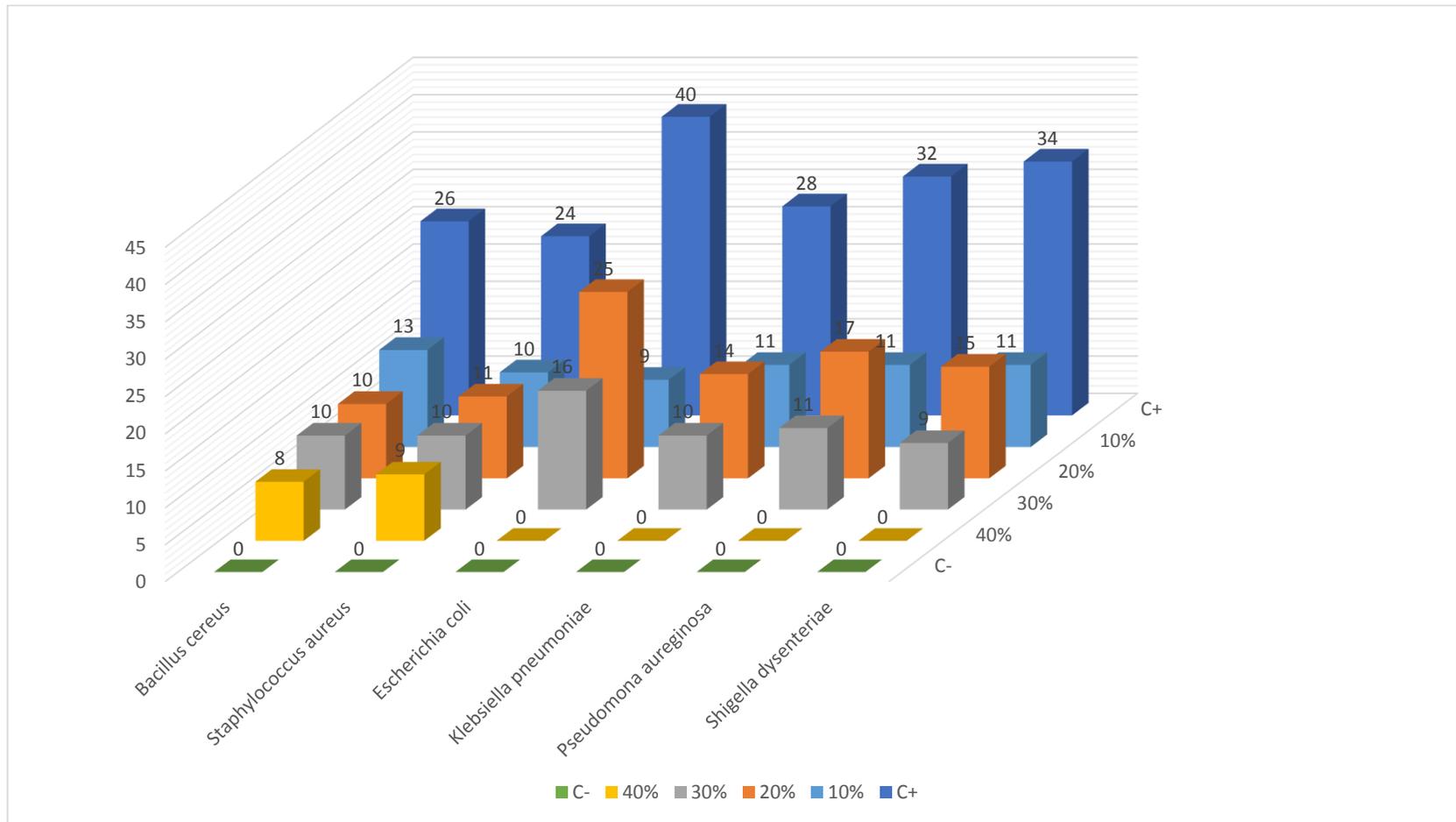
**Tabla 3.** Actividad antibacteriana mediante el método de Difusión en Agar en el extracto de Etanólico, a concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40 %.

<i>Extracto Etanólico</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Al 10%</i>	<i>13 mm</i>	<i>10 mm</i>	<i>9 mm</i>	<i>11 mm</i>	<i>11 mm</i>	<i>11 mm</i>
<i>20%</i>	<i>10 mm</i>	<i>11 mm</i>	<i>25 mm</i>	<i>14 mm</i>	<i>17 mm</i>	<i>15 mm</i>
<i>30%</i>	<i>10 mm</i>	<i>10 mm</i>	<i>16 mm</i>	<i>10 mm</i>	<i>11 mm</i>	<i>9 mm</i>
<i>40%</i>	<i>8 mm</i>	<i>9 mm</i>	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>--</i>
<i>C +</i>	<i>26 mm</i>	<i>24 mm</i>	<i>40 mm</i>	<i>28 mm</i>	<i>32 mm</i>	<i>34 mm</i>
<i>C -</i>	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>--</i>

a. Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del sacabocado (6 mm); valor promedio de tres pruebas independientes.

b. Volumen usado del extracto etanólico 25 µL.

**Fuente:** El autor/ / Laboratorio de Análisis Clínico y Microbiológicos de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA



**Gráfico 1.** Diámetro de los halos de inhibición de los extractos Etanólico en mm. Vs. cepas bacterianas.

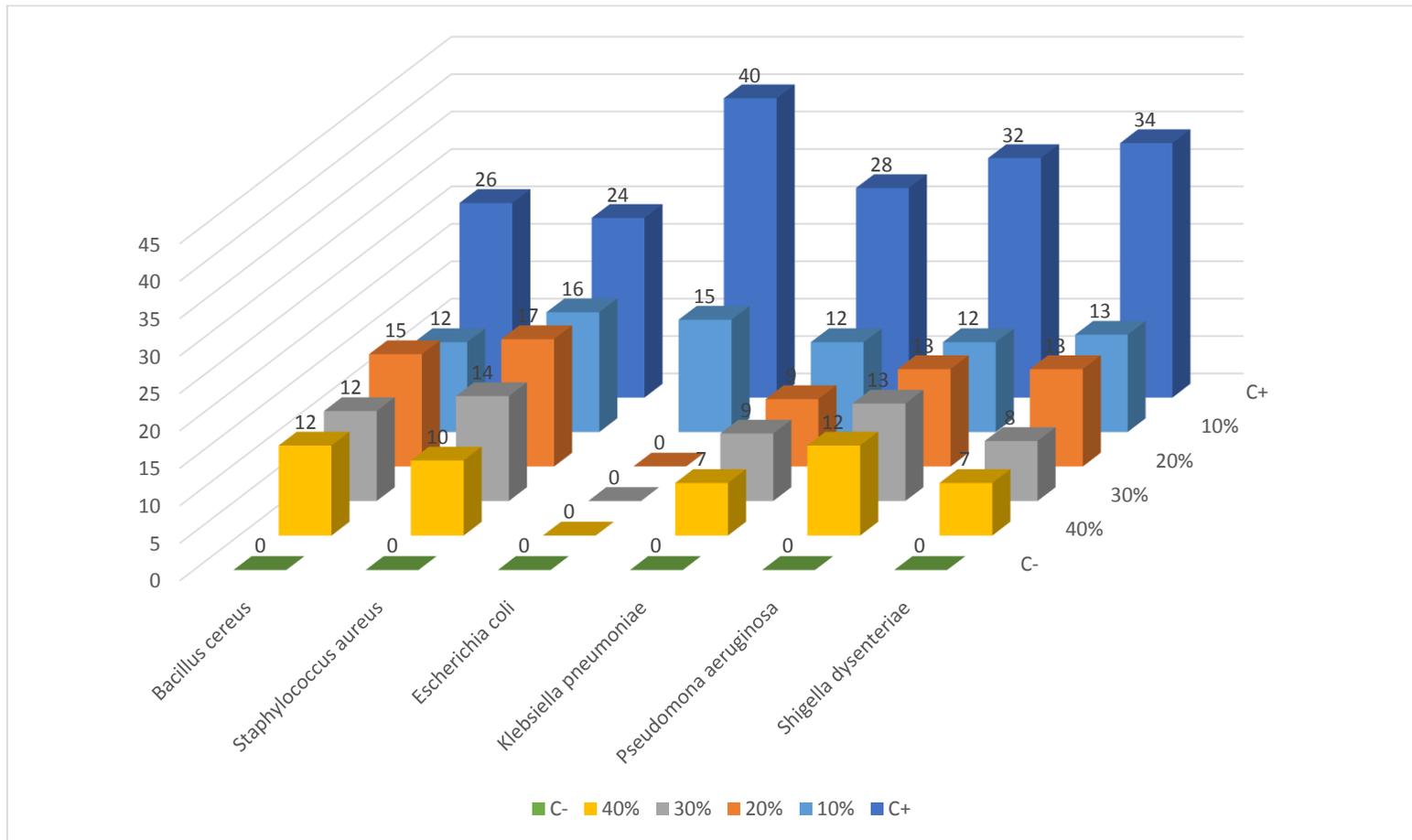
**Tabla 4.** Actividad antibacteriana mediante el método de Difusión en Agar en el extracto de Éter de Petróleo, a concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40 %.

<i>Extracto Etéreo</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<b>Al 10%</b>	12 mm	16 mm	15 mm	12 mm	12 mm	13 mm
<b>20%</b>	15 mm	17 mm	--	9 mm	13 mm	13 mm
<b>30%</b>	12 mm	14 mm	--	9 mm	13 mm	8 mm
<b>40%</b>	12 mm	10 mm	--	7 mm	12 mm	7 mm
<b>C +</b>	26 mm	24 mm	40 mm	28 mm	32 mm	34 mm
<b>C -</b>	--	--	--	--	--	--

a. Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del sacabocado (6 mm); valor promedio de tres pruebas independientes.

b. Volumen usado del extracto etéreo 25 µL.

**Fuente:** El autor/ / Laboratorio de Análisis Clínico y Microbiológicos de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA

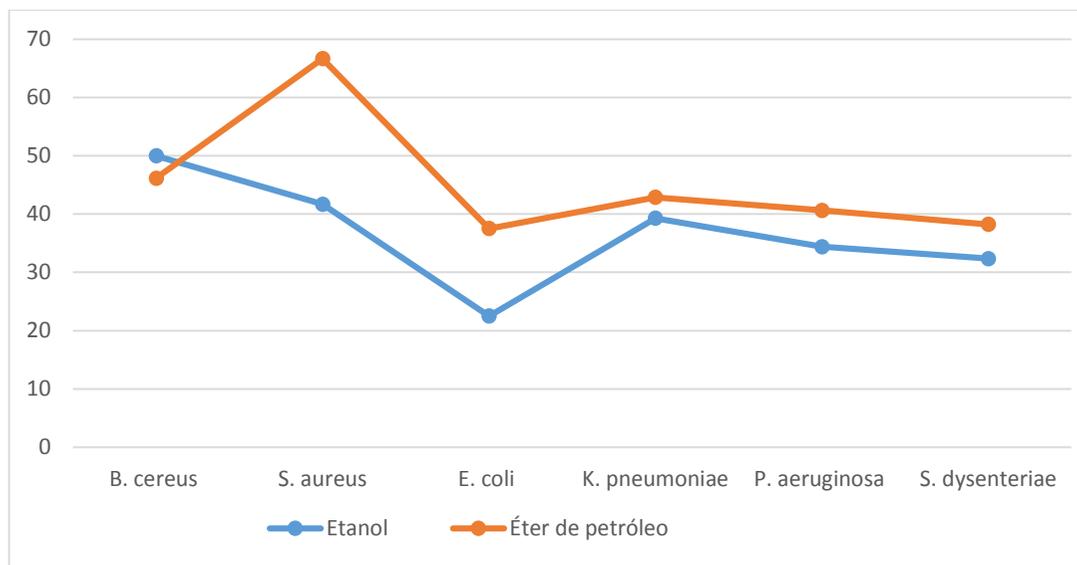


**Gráfico 2.** Diámetro de los halos de inhibición de los extractos *Etéreo* en mm. Vs. cepas bacterianas.

**Tabla 5.** Valores del Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) frente a los extractos a concentración de 100 mg/mL

<i>PIR (%)</i> <i>Extracto de 100 mg/mL</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Etanol</i>	50.00	41.67	22.50	39.29	34.38	32.35
<i>Éter de petróleo</i>	46.15	66.67	37.50	42.86	40.63	38.24

**Fuente:** El autor/ / Laboratorio de Análisis Clínico y Microbiológicos de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA

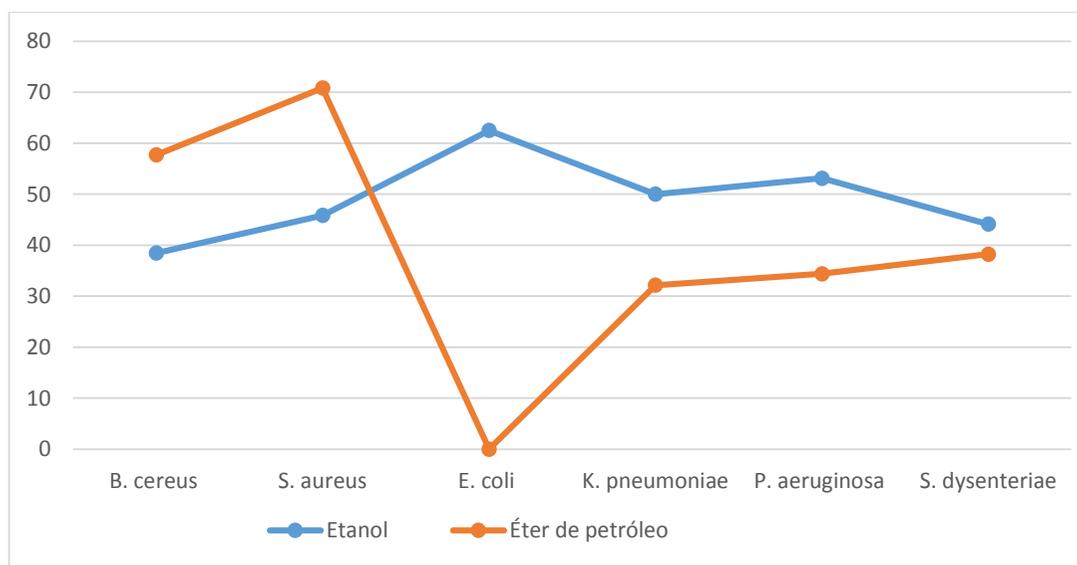


**Gráfico 3.** Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) de los extractos a concentración de 100 mg/mL.

**Tabla 6.** Valores del Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) frente a los extractos a concentración de 200 mg/mL

<i>PIR (%)</i> <i>Extracto de 200 mg/mL</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Etanol</i>	38.46	45.83	62.50	50.00	53.12	44.12
<i>Éter de petróleo</i>	57.69	70.83	---	32.14	34.38	38.24

**Fuente:** El autor/ / Laboratorio de Análisis Clínico y Microbiológicos de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA



**Gráfico 4.** Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) de los extractos a concentración de 200 mg/mL.

## 4.2. DISCUSIÓN

*Desde hace varias décadas, las algas han sido reconocidas como una de las fuentes más ricas de nuevos compuestos bioactivos, gracias a una serie considerable de análisis e investigaciones, descubriéndose en algunos casos estructuras moleculares únicas que manifiestan actividad antibacteriana, anticancerígena, cardiotónica, antiviral, antitumoral, antiinflamatoria, anticoagulante, entre otros.*<sup>11, 25</sup>

*El género *Caulerpa* tiene estudios confirmados de diversas propiedades terapéuticas, una de ellas es la antibacteriana; cabe resaltar que para la especie *Caulerpa Filiformis* (Suhr) Hering, no se han reportado estudios de actividad antibacteriana, es por ellos que se realizó la presente investigación, buscando las respuestas necesarias frente al problema propuesto.*

*Los resultados obtenidos con respecto a la caracterización fitoquímica de los extractos etéreo y etanólico, coinciden parcialmente con los reportados por **Martínez S. (2012)**<sup>45</sup> para la especie *Caulerpa Racemosa* y **Arteaga y De Silvestri (1985)**<sup>46</sup> para *Caulerpa spp*, quienes determinaron en su composición metabolitos secundarios como triterpenos y esteroides, a los cuales se les hace responsables de la actividad antibacteriana de la especie marina *Caulerpa Filiformis* (Suhr). Así mismo, la adición del extracto en pocillos realizados en el agar es un método, que a diferencia del uso de discos de papel, concentra una mayor cantidad del extracto, facilitando la evaluación del potencial antibacteriano (**Magallanes et al. 2003**).<sup>47</sup>*

*El efecto antibacteriano de esta especie está ligado a su capacidad de sintetizar diterpenos y terpenos halogenados como el sesquiterpeno *Caulerpenina* o*

*Caulerpicina*<sup>48</sup>, encontrándose entre ellos al 5'-Hidroxi-isoavrainvilleol<sup>49</sup>, además de diferentes metabolitos de origen terpeno-aromático.<sup>50</sup>

Los cinco diferentes mecanismos de acción conocidos de esta alga, por el cual sus metabolitos secundarios presentes en ella pueden disminuir el crecimiento bacteriano, son bien conocidos: inhibición de la síntesis de la pared celular, interrupción del metabolismo de ADN, inhibición de la síntesis de proteínas, alteración de la permeabilidad de la membrana celular e inhibición del metabolismo celular.<sup>51</sup>

El extracto etanólico de *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering solo dio resultados positivos para bacterias Gram (-). Obteniéndose un halo de inhibición a la concentración de 20%, cercano al antibiótico que utilizamos como control positivo para comparar con las bacterias *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. dysenteriae*, justificando su uso en la terapéutica tradicional al desnaturalizar la membrana externa, la cual recubre por completo a la célula bacteriana, incluyendo en su interior a la membrana citoplasmática, la pared celular, y el periplasma, que es la región entre la pared celular y la membrana externa.

Mientras que el extracto etéreo de *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering nos dio resultados positivos para bacterias Gram (+), obteniéndose un halo de inhibición a la misma concentración (20%), teniendo resultados cercanos al control positivo utilizado para *B. cereus* y *S. aureus*, debido a que la pared celular de estas bacterias está en contacto directo con el exterior, careciendo de membrana externa y haciéndola más sensible frente a este tipo de sustancias.

Como era de esperarse, el antibiótico Ciprofloxacino presentó mayores halos de inhibición que los extractos etéreo y etanólico, considerándose así, que los

*compuestos activos puros y estandarizados tienen mayor actividad antibacteriana que los extractos vegetales.*<sup>41</sup>

*Deduciendo así, que los extractos a la concentración del 20% son más efectivos frente a bacterias Gram (+) y Gram (-), teniendo un Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) de 54,44% para el extracto etanólico y 64,26% para el extracto etéreo.*

*Esto se debe posiblemente al sinergismo originado entre los metabolitos secundarios de *Caulerpa* en los extractos crudos, al momento de la extracción por maceración. Ya que en ocasiones los solventes no polares suelen proporcionar mayor eficacia en la extracción de compuestos con actividades antimicrobianas, en comparación con los solventes polares.*<sup>52</sup>

*De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos deducir la necesidad de continuar las investigaciones de cada compuesto encontrado en la especie marina *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering, a fin de aislarlas, sintetizarlas y usarlas como un método alternativo y eficaz contra las infecciones bacterianas.*

## CONCLUSIONES

*Al término del presente trabajo de investigación sobre el estudio microbiológico in vitro, se llegó a las siguientes conclusiones:*

- 1. Mediante el Screening Fitoquímico realizado a los extractos etéreo y etanólico de la especie vegetal *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering, se identificó para ambos extractos la presencia de triterpenos y/o esteroides.*
- 2. Los extractos etéreo y etanólico de *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering, mediante la técnica de difusión en agar (pozo) presentaron actividad para las cepas bacterianas Gram (+) y Gram (-) utilizadas en este estudio.*
- 3. Al comparar la actividad de los extractos obtenidos y el control positivo (Ciprofloxacino) frente a bacterias patógenas se observó, que el control positivo tuvo un mayor efecto inhibitorio frente a estas bacterias que los extractos que obtuvimos.*
- 4. La capacidad inhibitoria que tienen los extractos etéreos al 20% frente a las bacterias patógenas Gram positivas (+) *B. cereus* y *S. aureus* tienen un PIR promedio de 64.2%, mientras que para el extracto etanólico mostró mayor capacidad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas (-) como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. dysenteriae*, teniendo un PIR promedio de 54.4%, siendo esta la concentración de elección a utilizar.*

## RECOMENDACIONES

1. *Continuar con la investigación fitoquímica y farmacológica de otras actividades biológicas atribuidas a la especie.*
2. *Elucidar el o los metabolitos responsables de la actividad antibacteriana del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering”, de tal manera que podamos conocer la estructura química de los componentes responsables de la actividad antibacteriana.*
3. *Continuar la investigación antibacteriana “in vivo” en animales de experimentación, a fin de determinar su eficacia y toxicidad.*
4. *Incentivar el estudio de las algas marinas presentes en nuestra costa, tal que podamos estudiar los diversos componentes que la conforman y encontrar nuevas soluciones a los problemas de resistencia bacteriana.*

## FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Lara G., Álvarez S., Lozano C. *Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano. Organization for Tropical Studies, Rev. Biol. Trop. 1996; 44(2):895-898.*
2. Rios N., Medina G., Jimenez J., Yanez C., García M., Di Bernardo M., Gualtieri M., *Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. Rev. peru. biol. Agosto 2009;16(1):097- 100.*
3. Vivot, E; Muñoz, JD; Cruañes, MC; Cruañes, MJ; Bendersky, D. *Estudio de las actividades antifúngica y antigotosa de extractos vegetales de la flora de Entre Ríos. Ciencia, Docencia y Tecnología. 2003; XIV (27):131-144.*
4. Bhakuni, D. y Rawat, D. 2005. *Bioactive marine natural products. Editorial Anamaya. India.*
5. Valdés-Iglesias, O.; Díaz, N.; Cabranes, Y.; Acevedo, M.; Areces, A.; Graña, L. y Díaz, C. *Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. Avicennia. 2003; 16:36-45.*
6. Patra, J.; Patra, A.; Mahapatra, N.; Thatoi, H.; Das, S.; Sahu, R. y Swain, G. *Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from Chilika Lake, Orissa, India. Malaysian Journal of Microbiology. 2009; 5(2):128-131.*
7. Centeno A. *Ecología de Caulerpales: Fauna y Biomarcadores. [Tesis doctoral] Palma: Universidad de las Islas Baleares. Instituto Mediterráneo de Estudios avanzados; España – 2008.*

8. Paul, V.; M. Littler, D. Littler y W. Fenical. Evidence for chemical defense in tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (Caulerpaceae: Chlorophyta). *J. Chem. Ecol.* 1987; 13(5):1171-1185.
9. Sureda, A.; Box, A.; Enseñat, M.; Alou, E.; Tauler, P.; Deudero, S. y Pons, A. Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerpenyne. *Comparative Biochemistry and Physiology, Parte C: 1-6.* 2006.
10. Elliot TS. Antibacterial resistance in the intensive care unit. Mechanisms and management. *Br Med Bull.* 1999; 55(1):259-76.
11. Blunt, J. W., B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote & M. R. Prinsep. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2006; (23):26–78.
12. Libes, S. M. *An Introduction to Marine Biogeochemistry.* Academic Press, Amsterdam; 1992. p. 909.
13. Freile-Pelegrín, Y. & J. L. Morales. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. En: Gruyter, W. (Ed). *Botanica Marina* Springer, New York. 2004. pp. 140–146.
14. Del Val, A. G., G. Platas, A. Basilio, A. Cabello, J. Gorrochategui, I. Suay, F. Vicente, E. Portillo, M. Jiménez del Río, G. García-Reina & F. Peláez. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Internatl. Microbiol.* 2001; (4):35-40.
15. Blunt, J. W., B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote & M. R. Prinsep. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2007; (24):31–86.

16. Munro M. H. G. & J. W. Blunt. *MarinLit, a marine chemical literature database, versión 12.5. Marine Chemistry Group, University of Canterbury, Christchurch, NZ. 2005.*
17. Vidotti EC, Rollemberg MDCE. *Algae: From aquatic environment economy to bioremediation and analytical chemistry. Quim Nova. 2004; 27: 139-145.*
18. Martínez, N.; Casillas, C.; Rodríguez, L.; Rodríguez, J. y Torres, L. *Antibiotic properties of marine algae. Botanica Marina. 1966; 9:21-26.*
19. Fenical W. *Ichthyotoxic and cytotoxic metabolites of the tropical brown alga Stypopodium zonale (Lamouroux) Papenfuss. Journal of Organic Chemistry. 1981; 46:22-27.*
20. Martínez, A.; Arias, L.; Rueda, J.; Díaz, M. y Bula-Meyer, G. *Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólicos de algunas macroalgas del Caribe Colombiano. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 2002; 9(2):49-55.*
21. El Gamal, A. A. *Biological importance of marine algae. Saudi Phar. 2010; 18(1):1-25.*
22. Sánchez-Puelles, J.M., P. Berga, E. Díez y F. Peláez. 2003. *La Farmacia del Mar: nuevos conceptos antitumorales de origen marino. Investigación y siglo XXI. III / IV ciclo de conferencias. Real Academia Nacional de Farmacia.*
23. Aruoma O.I., T. Bahorun & L.S. Jen. *Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. Mutation Research, 2003; 544:203-215.*

24. Bhakuni D. & M. Silva. *Biodynamic substances from marine flora. Botanica Marina. 1974; 27:40-51.*
25. Carlucci M., L. Scolaro & E. Damonte. *Inhibitory Action of Natural Carrageenans on Herpes Simplex Virus Infection of Mouse Astrocytes. Chemotherapy, 1999; 45:429-436.*
26. Freile Y. *Algas en la "Botica". Rev. Avance y Prespectiva. 20, 283-293. <http://www.eclipse.red.Cinvestav.mx/publicaciones/avaper/sepoct/ALGAS.pdf> (Acceso 22/02/2004).*
27. Jiménez-Escrig A, Goñi I. *Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. Arch Latinoam Nutr. 1999; 49(2):114-120.*
28. Paul, Valerie J., Arthur, Karen E., Ritson-Williams, Raphael, Ross, Cliff and Sharp, Katy. *Chemical Defenses: From Compounds to Communities, Biological Bulletin, 2007; 213(3):226-251.*
29. Paul, V.; M. Littler, D. Littler y W. Fenical. *Evidence for chemical defense in tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (Caulerpaceae: Chlorophyta). J. Chem. Ecol. 1987; 13(5):1171-1185.*
30. C. Romero Zarco - Universidad de Sevilla, 2001-2003. *Prácticas de Biología marina: algas verdes macroscópicas. Página publicada el 3-04-2001, © C, Universidad de Sevilla - Actualizada el 24-07-2003. Disponible en: <http://www.aloj.us.es/carromzar/algas/Caulerpales.htm>*
31. Acleto C y Zúñiga R. *Introducción a las algas.6. Universidad Mayor de San Marcos: Breña.1998.*
32. Imarpe. *Com [Internet]. Perú: Imarpe; 2008 [actualizado 2008; citado abr 2014]. Disponible en:*

[http://www.imarpe.pe/imarpe/index.php?id\\_seccion=I0139010000000000](http://www.imarpe.pe/imarpe/index.php?id_seccion=I0139010000000000)  
000000

- 33.** Pacheco M, Pacheco I, Miranda J, Cetz N y Soto J. Presencia del género *Caulerpa* en la Bahía de Campeche, Camp. [Internet].2010 [citado Abril 2013]; 20(1):1- 5. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188->
- 34.** Ramírez, M. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de acetato de etilo obtenido de tallos de la especie *Baccharis tricuneata* (L.f.) Pers “Taya” frente a bacterias patógenas. [Tesis]. Ica: Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquímica; Perú - 2013.
- 35.** Bennet J., Dolin R., Blaser M. Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases. 7ª ed. Canadá: Elsevier; 2014.
- 36.** Todar K. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease Online Textbook of Bacteriology. Madison. 2008. [on line]. [Fecha de acceso 17 de febrero del 2015]. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>
- 37.** Rodríguez G., Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. 2002; 44(5):464-475.
- 38.** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Fact sheet N° 125. WHO; 2011. [Fecha de acceso 12 de febrero del 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>

39. Jawetz, Melnick, Adelberg. *Microbiología Médica*, 25<sup>a</sup> edición. Editorial Mc Graw Hill S.A. México D.F.; 2011.
40. Brunton L., Chabner B., Knollman B. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw Hill México D.F.; 2011.
41. García JA., Cantón R., García J., Gómez M., Martínez L., Rodríguez C., et al. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los Antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología clínica*. Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. España; 2002.
42. Mendo RM. *Medios de Cultivo en Microbiología*. 4<sup>a</sup> ed. Lima: Ediciones Laborales SRL; 2003.
43. Hernández G.; Huamaní S.; Mirano C. *Efecto fotoprotector y calidad del gel cosmético a base del extracto del alga marina "Caulerpa filiformis (Suhr) Hering" recolectada en la provincia de Pisco – Ica*. [Tesis]. Ica: Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquímica; Perú - 2015.
44. Murillo, E. y Méndez, J. *Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios*. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Tolima, Colombia. 2007.
45. Martínez, S. *Evaluación de los metabolitos secundarios y la actividad biológica del alga invasora Caulerpa racemosa* [Tesis]. Cumaná: Universidad de Oriente. Escuela de Ciencias Químicas; Venezuela – 2012.

46. Arteaga C., De Silvestri. *Estudio de las sustancias con propiedades antimicrobianas extraordinarias de algas marinas pertenecientes al litoral atlántico colombiano. Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.* 1985; 4(2): 47-52,
47. Magallanes C., C. Córdova, R. Orozco. *Actividad antibacteriana de extractos etanolicos de macroalgas marinas de la costa del Perú. Revista peruana de Biología.* 2003; 10:125-132.
48. Ríos, N.; Medina, G.; Jiménez, J.; Yáñez, C.; García, M.; Di Bernardo, M. y Gualtieri, M. *Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. Revista Peruana de Biología.* 2009; 16(1):097-100.
49. Colon, M, Guevara P, Gerwick WH, Ballantine D. *5'-Hydroxyisoavrainvilleol, a new diphenylmethane derivative from the tropical green alga Avrainvillea nigricans. Journal of Natural Products.* 1987; 50:368-374.
50. Hernández, M.; Hernández, M. y Troccoli, L. 2008. *Actividad antibacteriana y antimicótica de Spirobranchus giganteus giganteus (Serpulidae: Polychaeta) de Guayacán, Península de Araya, estado Sucre, Venezuela. Saber.* 2008; 20 (3): 283-288.
51. Baker, B. y Kerr, R. (eds). *Marine Natural Products-Diversity and Biosynthesis. Springer, Germany.* 1993.
52. Inci, T., H.C. Bilge, U. Dilek and S. Atakan. *“Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey)”.* *Turkish Journal of Biology.* 2006; 30:171-175.



**ANEXO 01: Matriz de consistencia**

<b>PROBLEMA</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>VARIABLES</b>	<b>INDICADORES</b>	<b>INSTRUMENTO</b>	<b>FUENTE</b>
¿Presentan efectividad antibacteriana los extractos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” que se recolectarán de la playa “El Chaco” provincia de Pisco – Ica?	Demostrar que los extractos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” presentan actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-).	Identificar los metabolitos secundarios presentes en el alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” a los que se le puede atribuir la actividad antibacteriana.	Los extractos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” poseerán gran efectividad antibacteriana frente a bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-).	Extractos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering”.	Concentraciones de extracto a utilizar en diluciones.	Técnicas Experimentales	Alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering”
		Comparar la efectividad antibacteriana de los extractos obtenidos del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering” frente al Ciprofloxacino (Control positivo).					
		Establecer cuál de los extractos presenta mayor actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-).					
				Efecto antibacteriano frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).	Nivel de Efectividad. % de inhibición de crecimiento.	Técnicas experimentales	Alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr) Hering”

## ANEXO 02

### Clasificación taxonómica del alga marina "*Caulerpa Filiformis (Suhr) Hering*"



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

### CONSTANCIA N° 185-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (algas) recibida de Santiago Humberto Rolando LAURA SANTA MARIA estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica, ha sido estudiada y clasificada como: *Caulerpa tongaensis* Papenfuss, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Guiry, M.D & Guiry G.M. 2017, Algas Base:

**DIVISION: CLOROPHYTA**

**CLASE: ULVOPHYCEAE**

**ORDEN: BRYOPSIDALES**

**FAMILIA: CAULERPACEAE**

**GENERO: *Caulerpa***

**ESPECIE: *Caulerpa tongaensis* Papenfuss**

Determinado por: Blgo. Mario Benavente Palacios  
Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 17 mayo de 2018



Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

### ANEXO 03

**Playa El Chaco – Paracas:** *Ubicación del lugar donde se recolectó el alga.*



## ANEXO 04

*Obtención del extracto etéreo del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr)*

*Hering”*



*Recolección del vegetal*



*Macerado*



*Filtrado*



*Concentrado*



*Extracto etéreo*

## ANEXO 05

*Obtención del extracto etanólico del alga marina “Caulerpa filiformis (Suhr)*

*Hering”*



*Marco*



*Macerado*



*Filtrado*



*Concentrado*



*Extracto etanólico*

## ANEXO 06

*Certificado de obtención de las Bacterias Tipificadas por parte de la facultad de Ciencias Biológicas de la UNICA.*



UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
Av. Los Maestros (Altura Km. 305-Panamericana Sur)



LOS JEFES DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

### HACE CONSTAR

Que el Bachiller: **LAURA SANTA MARÍA**, Santiago Humberto Rolando; ha adquirido CEPAS certificadas del laboratorio de esta Facultad en el mes de marzo del presente año, para el desarrollo de la parte experimental de su tesis titulada: **EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE ALGAS MARINA "CAULERPA FILIFORMIS (SUHR) HERING" RECOLECTADA EN LA PLAYA "EL CHACO" PROVINCIA DE PISCO – ICA.** Según detalle:

- Bacillus cereus (ATCC 11778)
- Staphylococcus aureus (ATCC 25923)
- Escherichia coli (ATCC 25922)
- Klebsiella pneumoniae (ATCC 700603)
- Pseudomona aeruginosa (ATCC 27853)
- Shigella dysenteriae (ATCC 13313)

Se expide la presente **CONSTANCIA**, a solicitud de la parte interesada, para los fines que crea conveniente. Dado en Ica, a los trece días del mes de abril del año dos mil dieciocho.

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
Av. Los Maestros (Altura Km. 305-Panamericana Sur)

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
Av. Los Maestros (Altura Km. 305-Panamericana Sur)



A. Dilución del extracto etanólico a diferentes concentraciones más el control negativo



B. Dilución del extracto etéreo a diferentes concentraciones más el control negativo



C. Dilución de Ciprofloxacino (control positivo)

Figura N° 07. Diluciones de los extractos y el control positivo.



**A.** *Cabina de seguridad biológica marca LABCULTURE*



**B.** *Autoclave marca GEMMY – 232X*



**C.** *Esterilizadora marca BINDER*

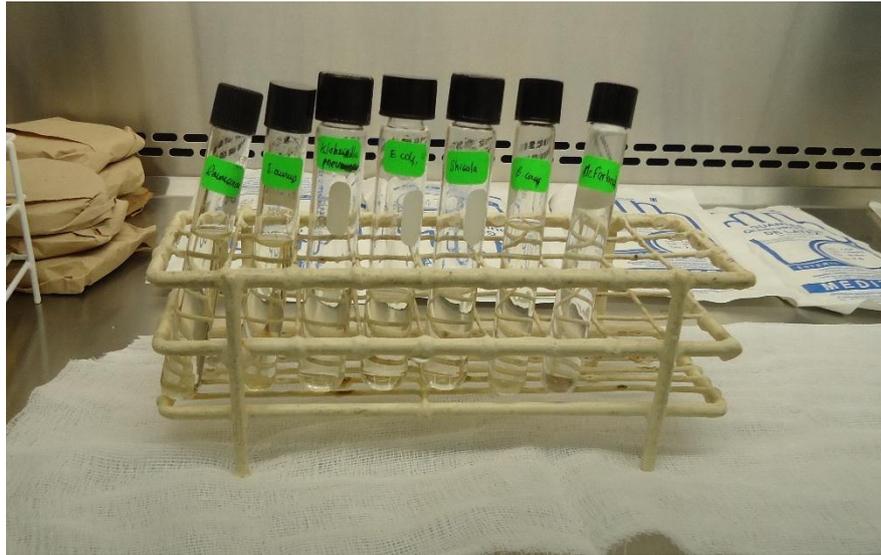


**D.** *Incubadora, PRECISIÓN THELCO*



**E.** *Rotavapor marca BUCHI*

**Figura N° 08.** *Equipos que se usaron para la Actividad antibacteriana.*



**Figura N° 09.** *Cepario de bacterias estudiadas*



**A.**

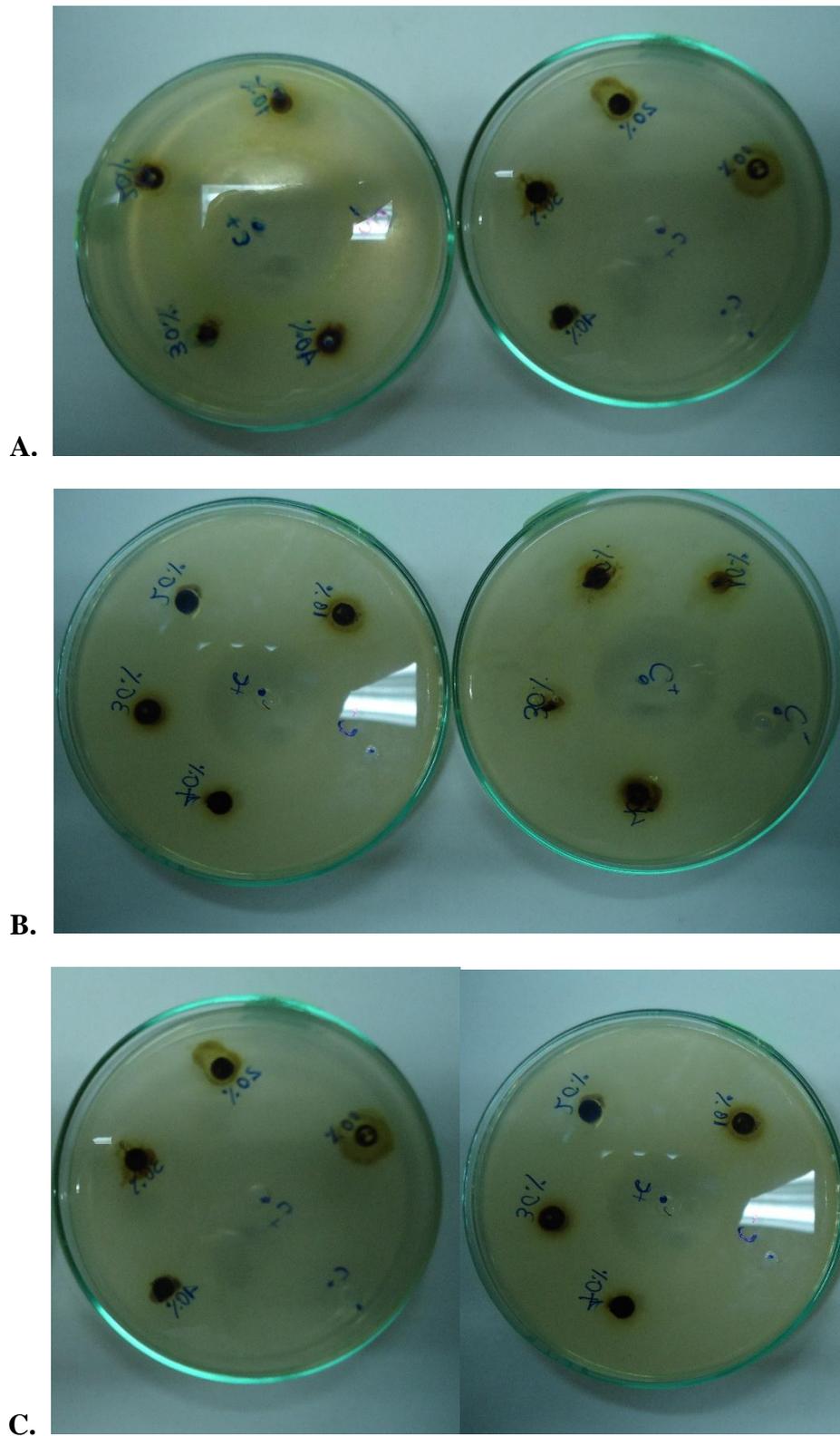


**B.**

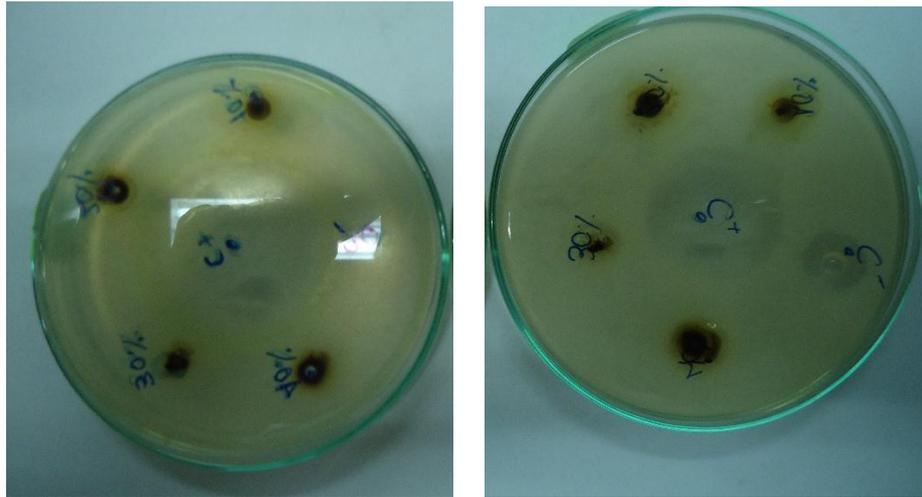


**C.**

**Figura N° 10.** *Llevando a cabo la actividad antibacteriana. (A., B., C.)*

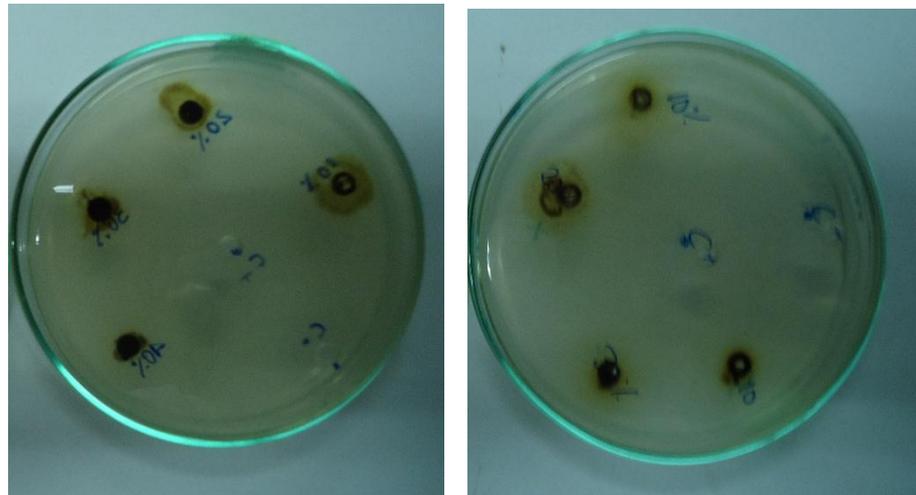


**Figura N° 11.** Actividad antibacteriana del extracto etanólico frente a: A.- *E. coli*, B- *K. pneumoniae* y C.- *P. aeruginosa*

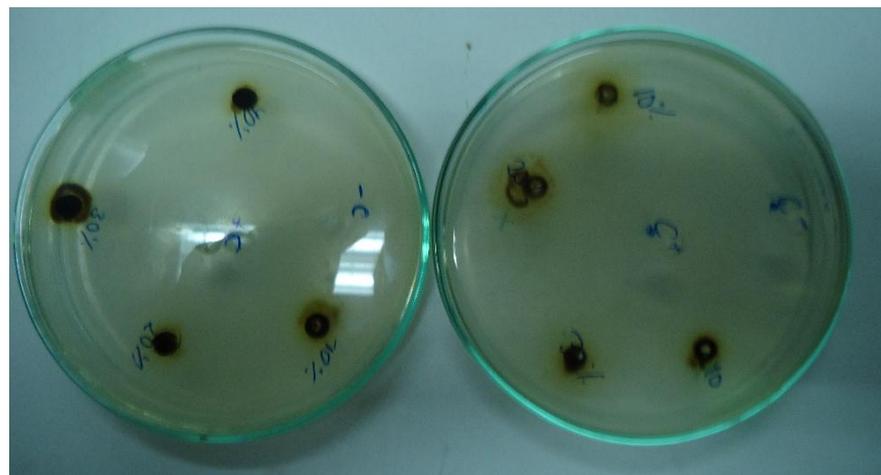


A.

**Figura N° 12.** Actividad antibacteriana del extracto etanólico frente a: A.- *S. dysenteriae*.



A.



B.

**Figura N° 13.** Actividad antibacteriana del extracto etéreo frente a: A.- *B. cereus* y B.- *S. aureus*.