



UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

Evaluación de la Bioactividad Antibiótica y Antifúngica de los extractos orgánicos de las macroalgas del Género *Ulva sp.* y *Padina sp.* presentes en La playa de Ballenita

TRABAJO DE TITULACIÓN

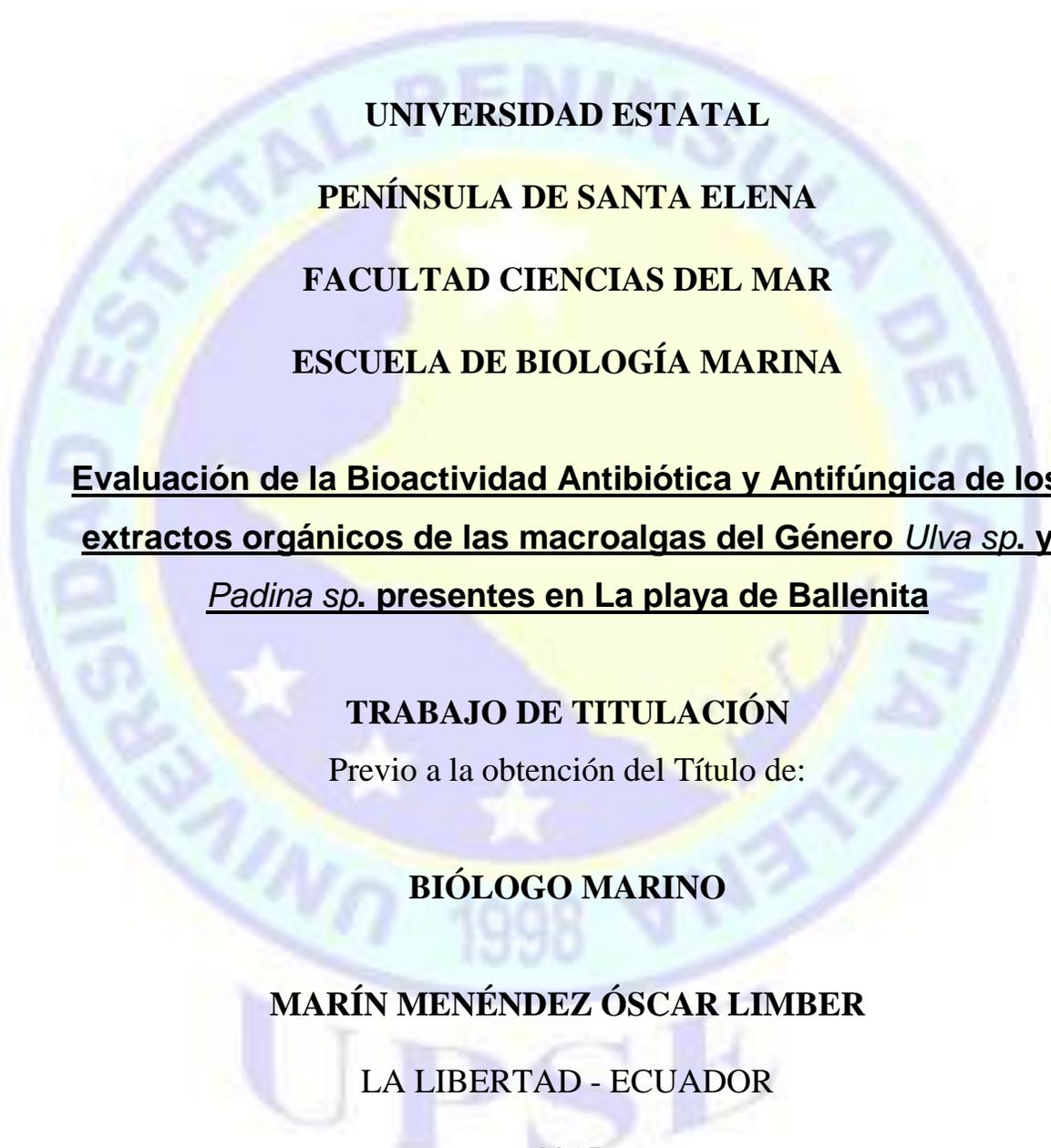
Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

MARÍN MENÉNDEZ ÓSCAR LIMBER

LA LIBERTAD - ECUADOR

2015



**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA**

**Evaluación de la Bioactividad Antibiótica y Antifúngica de los
extractos orgánicos de las macroalgas del Género *Ulva sp.* y
Padina sp. presentes en La playa de Ballenita**

TRABAJO DE TITULACIÓN
Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

MARÍN MENÉNDEZ ÓSCAR LIMBER

LA LIBERTAD - ECUADOR

2015

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad de esta investigación y los hechos expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma le corresponde a la Universidad Estatal Península de Santa Elena”

Óscar Limber Marín Menéndez.

C. I 0924548050

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir, por permitirme cristalizar mi anhelo y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres que con amor me guiaron por el sendero de la superación. Mi madre María Menéndez y mi padre Bosco Marín, por incentivar me alcanzar una carrera profesional, ser un ejemplo a seguir. Por su apoyo incondicional a quienes debo el triunfo profesional por su trabajo y dedicación en darme esa formación humana afianzada en los caminos de Dios. De ellos es el triunfo y para ellos es mi agradecimiento.

A mi amada esposa Karen Sanchez por su comprensión. A mi hijo David por ser mi alegría y la razón de seguir esforzándome cada día. Por ser ese pilar fundamental en mi vida por acompañarme en cada nueva etapa.

A mis hermanos, Cielo, Edison, José y Johnny, gracias por su cariño y apoyo incondicional hoy es posible terminar este gran trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A través de este trabajo dejo expresado mi eterna gratitud a DIOS, todo poderoso impulsador y guía de nuestras acciones.

A las autoridades, docentes y personal Académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena de manera especial al Blgo. Richard Duque M. por liderar el proceso de formación profesional.

Al Biólogo Galo Menéndez quien colaboro con el área del laboratorio de ciencias biológicas para la realización de los bioensayos y pruebas experimentales.

En particular a la Bióloga Mayra Cuenca Zambrano mi tutor de tesis porque con sus ideas científicas profesionales oriento la presente investigación.

Óscar Limber Marín Menéndez

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ocean. Johnny Chavarría V. M.Sc.

Decano Facultad Ciencias del Mar

Blga. Dennis Tomalá S. M.Sc

Director Escuela Biología Marina

Acuacultor. José Melena C. PhD.

Docente Área

Blga. Mayra Cuenca Z. Mgt.

Docente Tutor

Ab. Joe Espinoza Ayala

Secretario General

ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN EXPRESA	1
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	6
ÍNDICE GENERAL	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS	11
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	12
CABREVIATURAS	14
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	17
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVOS	21
HIPÓTESIS.....	22
CAPÍTULO I	23
MARCO TEORICO.....	23
1. 1 Importancia de las macroalgas.....	23
1. 2 Características Generales	25
1. 3 Ciclo de vida, reproducción y longevidad	27
<i>Ulva sp.</i>	27
1. 4 Taxonomía	30
1. 5 Rol ecológico	31
1. 6 Distribución geográfica.....	33
1. 7 Potencial Biotecnológico y perspectivas en el uso no convencional	35
CAPÍTULO II	38
MARCO METODOLÓGICO.....	38
2. 1 Materiales.....	38
2. 1. 1 Material biológico vegetal	38
2. 1. 2 Material biológico bacteriano	38

2. 1. 3 Material biológico Fúngico	38
2. 1. 4 Equipos y Accesorios.....	39
2. 1. 5 Reactivos.....	40
2. 1. 6 Medios de Cultivo.....	41
2. 2 Metodología	41
2. 2. 1 Área de estudio.....	41
3. 2 Colecta de macroalgas	43
3. 4. Tratamiento de las macroalgas en el laboratorio.....	44
3. 4 Elaboración de los extractos	44
3. 5 Preparación de medios de cultivo	47
Concentración de cepas bacterianas utilizadas	51
3.6.1 Antibiogramas.....	52
3.6.4 Antifungigrama	54
CAPITULO III.....	58
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	58
3. 1 Colecta y transporte de las macroalgas	58
3. 2 Elaboración de extractos	59
3.3 Evaluación de actividad antibiótica	60
3.4 Evaluación de desempeño frente al antibiótico convencional	62
3. 4 Evaluación de actividad antifúngica	65
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de muestreo playa de Ballenita.

Figura 2. Macroalgas del genero *Ulva*

Figura 3. Macroalgas del genero *Padina*

Figura 4. Desempeño porcentual de los extractos en antibiograma de *Pseudomonas*.

Figura 5. Desempeño porcentual de los extractos en antibiograma de *Vibrios a*.

Figura 6. Desempeño porcentual de los extractos en antibiograma de *Vibrios v*.

Figura 7. Desempeño porcentual de los extractos en los antifungigramas realizados a *Cladosporium sp*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas de sitio de muestreo.

Tabla 2. Lista de cepas y sus concentraciones utilizadas para los bioensayos

Tabla 3. Lista de algunos antibióticos y la interpretación de resultados

Tabla 4. Lista de algunos antimicóticos y la interpretación de sus resultados

Tabla 5. Porcentajes de rendimiento de las macroalgas en sus extractos

Tabla 6. Resultados generales de los antibiogramas con 10µg de oxy en los discos

Tabla 7. Resultados generales de los antibiogramas con 25µg de oxy en los discos

Tabla 8. Resultados generales de los antibiogramas con 50µg de oxy en los discos.

Tabla 9. Resultados de antibiogramas con 10µg de oxy en los discos frente a

Pseudomonas sp

Tabla 10. Resultados de antibiogramas con 10µg de oxy en los discos frente a

Vibrios a.

Tabla 11. Resultados de antibiogramas con 10µg de oxy en los discos frente a

Vibrios v

Tabla 12. Resultados generales de los antifungigramas.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Anisogamia: tipo de reproducción sexual con dimorfismo en los gametos.

Antibiograma: Método o prueba que determina la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos.

Antifungigrama: Método o prueba que determina la sensibilidad de los hongos y mohos a los antimicóticos.

Gametas: Son las células sexuales haploides de los organismos pluricelulares originadas por la meiosis a partir de las células germinales (o meiocitos en el caso de células diploides).

Haploide: Relativo a la célula que presenta en su núcleo una serie simple de cromosomas.

Inhibición: Disminución o detención de las funciones normales de un organismo por medios químicos.

Isogamia: Variedad de reproducción sexual en la que los gametos tanto masculino y femenino son iguales. Es propia de vegetales superiores (algas) y protozoos.

Metabolitos secundarios: son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo.

Oogamia: Fecundación en la que un gameto femenino inmóvil es fecundado por un gameto masculino móvil de menor tamaño.

CABREVIATURAS

cm:	Centímetro
CO2:	Dióxido de Carbono
DNA:	Acido desoxirribonucleico
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g:	gramo
INOCAR:	Instituto Oceanográfico de la Armada
L:	litro
m:	metro
ml:	mililitro
mm:	milímetro
OIE:	Oficina Internacional de Epizootias
OMS:	Organización mundial de la Salud
Oxy:	Oxytetraciclina
RNA:	Ácido ribonucleico

Sp.:	Especie no definida
UFC:	Unidades formadoras de colonias
μ:	Micra
μg:	Microgramo
μl:	microlitro
μm:	micrómetro
TCBS:	Agar tiosulfato citrato de sales biliares
°C:	Grados Celsius
R:	Resistente
I:	Intermedio
S:	Susceptible

RESUMEN

Las macroalgas son organismos marinos con una exitosa capacidad colonizadora, reproductiva y disuasiva ante predadores o competidores para defender su nicho ecológico. Por lo que han debido evolucionar sustancias químicas en su estructura interna llamados también metabolitos secundarios, los mismos que poseen una bioactividad específica y que de ser extraídos e identificados se les pueden dar aplicaciones en beneficio de ser humano que van desde el campo alimenticio, nutricional hasta farmacológico. Más a falta de información sobre estas sustancias en las macroalgas de nuestro medio y la utilización de estas se realizó ensayos de antibiogramas y antifugigramas con los extractos extraídos de dos macroalgas y comparándolos con compuestos presentes en el mercado como la oxytetraciclina y el fungirex. Como producto de esta investigación se destaca que los metabolitos secundarios del extracto de una de las algas en este caso la *ulva sp.* presento una bioactividad considerable ante cepas bacterianas y fúngicas respectivamente. No así el de la *Padina sp.* debido a que pertenece a otra división taxonómica.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación en términos generales destaca las cualidades de las macroalgas como potenciales fuentes de metabolitos secundarios y compuestos activos que se pueden utilizar como antibióticos y antifúngico frente a una variedad de cepas bacterianas y fúngicas (**Alan et. al. 2009**). En los últimos años se viene realizando este tipo de investigaciones con la finalidad de conocer cuan viable es la extracción y aplicación de los metabolitos secundarios de diferentes organismos vegetales, tal es el caso de los extractos de las macroalgas seleccionadas, identificando la bioactividad de los metabolitos que contiene y su capacidad inhibitoria (**Cardozo, et. al. 2006**).

Luego de realizar investigaciones bibliográficas y observaciones de campo se opto por coleccionar, elaborar los extractos y evaluar la capacidad de inhibición que poseen los metabolitos secundarios existentes en las algas del genero *Ulva sp.* y *Padina sp.* mediante la eliminación de impurezas, seguido de una trituración hasta pulverizarlas por completo y mediante el uso del etanol al 98% de concentración como vehículo de extracción y obtención de sus metabolitos secundarios. Para ser sometidos a bioensayos del tipo antibiograma y antifungigrama, con la finalidad de que estos extractos puedan sustituir el uso de compuestos antibióticos y antifúngicos sintéticos de origen artificial posibles agentes causantes del deterioro de los ambientes naturales.

Para nuestras experimentaciones empleamos los talos de la macroalga para elaborar los extractos, que se obtuvieron luego de ser macerados hasta pulverizar por completo. Una vez pulverizados se añadió el etanol al 98% en relación de 1 a 1 es decir 10 g de alga 10ml de etanol y se dejó reposar por 20 minutos antes de ser filtrado. Se utilizó 18 discos de papel filtro con diámetro de 6mm para cada bioensayo que luego fueron hidratados 6 con 10 µl de extracto del alga 6 con 10 µl de oxytetraciclina y los últimos 6 con 10 µl de fungirex. Para luego realizar los antibiogramas y antifungigramas frente a cepas bacterianas y fúngicas preseleccionadas.

Donde se pudo comprobar que el extracto del alga *ulva sp.* posee características antibióticas y antifúngicas de efectos considerables. Ya que sus halos de inhibición fueron muy representativos como se puede apreciar en las tablas (6 y 12). De igual manera se utilizaron los controles positivos oxitetraciclina y fungirex y negativos (etanol al 65%). Relacionando los halos de inhibición alcanzados por los extractos en los antibiogramas así como en los antifungigramas con el de los controles positivos. Se determinó que el desempeño del extracto del alga *ulva sp.* como antibiótico alcanzó un halo de inhibición del 40% comparado con el rendimiento presentado por el Oxy en los Antibiogramas. Pero como antifúngico dio mejores resultados ya que superó el 55% comparando su halo de inhibición con el del Fungirex.

Estos datos develan un potencial mayor en los metabolitos secundarios existentes en las macroalgas del genero *Ulva sp.* que el presentado en las del genero *Padina sp.* Los

mismos que son de gran interés para la comunidad científica interesada en la obtención de biomedicinas y/o bioproductos amigables con el medio llamados también biodegradables que podrán mejorar y replicar a escalas industriales las experimentaciones con el énfasis hacia uso en farmacología para el bienestar humano.

JUSTIFICACIÓN

El sentido que nos orientó a realizar este trabajo fue determinar la actividad antibiótica y antifúngica de los metabolitos secundarios contenidos por la macroalga *ulva sp.* Con la finalidad de obtener un producto antibacteriano y antifúngico biodegradable, ya que en la actualidad el descubrimiento de nuevos fármacos se ha dirigido hacia los compuestos orgánicos utilizando los metabolitos secundarios de algunas especies vegetales entre ellas las macroalgas. Además, evaluaremos los resultados de desempeño para en un futuro inmediato posicionar su aplicación, como tratamiento natural ante cepas de hongos y bacterias. Para lo cual, se debería masificar su producción mediante cultivos intensivos de macroalgas o en maricultura para la producción de estos productos para la industria de fármacos.

Por último observamos que esta es una forma saludable y eficiente de biocontrolar hongos y bacterias en diferentes tipos de cultivos evitando contravenciones planteadas por organismos de comercio y sanidad internacional. Debido a que La FAO, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) y varios gobiernos nacionales que han planteado ya la cuestión del uso irresponsable de antibióticos sintéticos en todos los sectores de la producción, con especial referencia a los riesgos potenciales para la salud pública sobre el uso de ellos. Porque pueden presentar bioacumulación en los organismos cultivados y afectar al consumidor final.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la bioactividad antibiótica y antifúngica de los extractos orgánicos de las macroalgas *Ulva sp.* y *Padina sp.* aplicando a cepas de bacterias y hongos comparando el efecto inhibitor de estos frente al de oxytetraciclina y fungirex.

Objetivos Específicos

- Determinar la relación peso seco vs. etanol para obtener la mayor concentración de metabolitos secundarios de las macroalgas de los generos *Ulva sp.* y *Padina sp.* en los extractos para realizar los antibiogramas y antifungigramas.
- Evaluar in-vitro la bioactividad de los extractos tanto de *Ulva sp.* como de *Padina sp.* frente a 3 cepas bacterianas y una fúngica, para medir su capacidad inhibitoria.
- Comparar el halo inhibitor de los extractos de las algas *Ulva sp.* y *Padina sp.* con los productos Oxyteraciclina en tres concentraciones (10, 25 y 50 µg) y fungirex, para determinar su desempeño como antibiótico y antifúngico.

HIPÓTESIS

Los extractos orgánicos de las macroalgas *Ulva sp.* y *Padina sp.* poseen metabolitos secundarios con bioactividad antibiótica y antifúngica con características similares al presentado por la oxytetraciclina y el fungirex.

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1. 1 Importancia de las macroalgas

Las algas marinas constituyen un recurso renovable con un grado de importancia muy alto para el hombre. Debido a que su distribución a nivel mundial es muy amplia. En especial las del grupo de las *chlorophytas* por su intervención en la oxigenación y la respiración. Las algas juegan un rol benéfico en la naturaleza ya que ellas representan la productividad primaria de materia orgánica en ambientes acuáticos debido a sus actividades fotosintéticas. Su desaparición significa la ausencia de la primera fuente de alimento y energía para animales acuáticos. Además, oxigenan el agua durante el día, reduciendo los niveles de CO₂ de la atmosfera y aportando productos que ellas contienen como polisacáridos, aminoácidos, DNA, RNA, enzimas y otras proteínas al medio que sirven directamente a los organismos asociados a ellas.

Las macroalgas en estas últimas décadas han sido objeto de estudios, por las propiedades encontradas en el campo de la farmacéutica, cosmetología y hasta como alimento para el hombre. En la actualidad son utilizadas dentro de las industrias, para elaboración alimentos, aglutinantes, medicinas, harinas de algas para alimentación de

animales, fertilizantes orgánicos, biocombustibles y para el tratamiento de aguas residuales, (**Velasco, 2008**).

Existe un significativo número de especies verdes que se cultivan en laboratorios y líneas marinas o granjas. Algunas se colectan en grandes cantidades en las áreas rocosas donde proliferan. Estas también son usadas como alimento para ganado y para la elaboración de alimentos consumidos por el hombre directamente. Pero en la actualidad no se destacan solo con fines alimenticios sino por su empleo en biotecnologías como la farmacología donde se extraen los metabolitos o las sustancias que contiene o se producen en ellas.

La cantidad de macroalgas procesadas anualmente en todo el mundo es de 14 millones de toneladas en peso fresco (**Anuario FAO, 2006**). El 50% de la producción se utiliza en la alimentación humana. Las presentaciones de las algas para la alimentación humana pueden ser frescas, secas o aliñadas según se desee presentar el producto. De toda la producción mundial varias especies del género *Ulva* se destacan entre las clorofíceas con mayor uso en el sector culinario de Asia y Europa.

1. 2 Características Generales

Ulva sp.

Las macroalgas del género *ulva sp.* son conocidas como lechuga de mar por tener la forma de su talo laminar fino, lobulado, lanceolado y el característico color verde dependiendo de la estación y sexo puede ser verde oscuro o verde amarillento. Crecen en la zona intermareal preferentemente en sustrato rocoso muy cerca de la zona de rompiente donde se fijan mediante rizoides. Algunas por su ubicación o área de colonización durante la baja mar quedan completamente expuestas al aire así aprovechan la energía lumínica y eliminan organismos epífitos como invertebrados u otras algas con las que compiten por el área, que suelen ser sitios con variaciones en su salinidad y grandes aportes nitrogenados.

También pueden encontrarse a profundidades de 1m durante la baja mar donde alcanza tallas mayores de hasta 25 cm pero su capacidad colonizadora es inversamente proporcional a la profundidad, es decir a mayor profundidad se encuentran menos especímenes por m² y posee más organismos epífitos entre los que destacan invertebrados como los gasterópodos y poliquetos hasta otras algas como el *gelidium sp.*

Padina sp.

Las algas de este género se caracterizan por tener los talos siempre erectos, que va desde una hasta varias láminas aplanadas en forma de abanico de una coloración que van del café claro al oscuro, de 10 cm a 30 cm en longitud y de 15 a 40 cm de amplitud. La superficie de las láminas puede tener áreas pelosas que en algunos casos puede formar bandas concéntricas no calcificadas ya que no son fijadoras de carbonato de calcio, se les puede apreciar bandas claras y oscuras, pueden presentarse enteras o divididas ya que se caracterizan por la presencia de talos con o sin rupturas, en algunos talos desde las primeras tallas ya se encuentran con rasgaduras y otros ejemplares que han alcanzado su talla máxima no presentan rasgaduras. La reproducción es por esporangios y oogonios distribuidos sobre ambas superficies de la lámina, con una leve tendencia a la formación de zonaciones concéntricas. Las bases de estas algas son perennes, mientras que las láminas se dividen y epífitan. Esta especie tiene potencial como alimento humano y es factible que pueda ser utilizada en farmacología, tal como otras macroalgas.

1. 3 Ciclo de vida, reproducción y longevidad

Ulva sp.

Con unas buenas condiciones ambientales los talos jóvenes de las algas del genero *Ulva sp.* crecen entre 3 mm y 5 mm en menos de un mes y se tornan adultas entre 3 y 4 meses. Su ciclo de vida es corto, se estima que dura entre 5 y 8 meses. El ciclo reproductivo de la lechuga de mar tiene dos formas. La reproducción asexual es por zoosporas bi o cuatriflageladas y la sexual generalmente es por anisogamia u oogamia (**Wiencke et al., 2004**). El esporofito de esta alga es diploide constituido por una lámina celular delgada con escasos milímetros de diámetro. Algunas de sus células se diferencian y sufren meiosis y citocinesis, que producen esporas haploides móviles llamadas zoosporas. Éstas nadan alejándose, cada una impulsada por cuatro flagelos y algunas finalmente encuentran un lugar apropiado para establecerse. Las esporas pierden luego sus flagelos y comienzan a dividirse por mitosis, produciendo un filamento delgado que evoluciona a una lámina amplia de dos células de espesor, (**Kapraun, 1970**).

En el caso de estas macroalgas unos gametofitos se dedica a la producción exclusiva de gametas masculinas y otros las femeninas, nunca se encuentran produciendo ambos a la vez. Sus gametas se crean por mitosis en el interior de células individuales (conocidos como gametangios), es decir que no se encuentran en una estructura

multicelular especializada, como en las plantas terrestres. Los dos tipos de gametas poseen dos flagelos (diferenciándose de la espora haploide que posee cuatro flagelos) constituyéndose en gametas móviles. La mayoría de las especies de *Ulva* presenta gametos masculinos y femeninos similares estructuralmente, por lo que a estas especies se las denomina isogámicas; es decir, tienen gametas de igual aspecto. Se debe considerar que otras clorofíceas, incluidas una minoría de especies de *Ulva*, son anisogámicas, presentando sus gametas femeninas de apariencia más grandes que las masculinas. Para ser exitosa su función las gametas femeninas y masculinas se deben aproximar y mientras van perdiendo su flagelo a medida que el cigoto se forma y se establece. Luego de una breve pausa, el cigoto inicia su división mitótica, de esta manera se crea un esporofito multicelular. las gametas que no encuentran una pareja tienen la capacidad de establecerse en un sustrato conveniente, pierde sus flagelos, inducir una mitosis y producir directamente un nuevo gametofito; claramente se puede decir que, los gametos también pueden funcionar como zoosporas.

Padina sp.

Las macroalgas del género *padina* se reproducen en verano, y los órganos reproductores están situados sobre las bandas concéntricas de los pelos. Suelen haber varios individuos agrupados que han crecido a partir de un estolón. Ellas se caracterizan por tener sus talos dioicos con los gametangios alineados u ordenados en forma de

soros, que se encuentran sobre la superficie de la hoja. Los oogonios miden de 58 a 60 μ de largo por 25 a 30 μ de ancho y la cápsula mide de 170 a 175 μ , se localizan en la región subapical entre las bandas de paráfisis, se caracterizan por ser ovalados y están llenos al 100%; los anteridios miden de 5 a 10 μ de ancho por 40 a 45 μ de largo y la capsula mide de 85 a 90 μ , se encuentran sobre las bandas de paráfisis en la región apical son filamentos cortos pluriloculares, específicamente en el margen enrollado y los esporangios miden de 165 a 170 μ con todo y cápsula y solo el esporangio mide de 40 a 45 μ de ancho y de 60 a 65 μ de largo, están entre las bandas de paráfisis, pero a lo largo de todo el talo, estos son muy similares en forma y tamaño pero en la parte apical tienen una región translúcida y están subdivididos igual que en la especie anterior. En general las algas de este género tiene reproducción sexual y sus gametos masculino y femenino se encuentran en lados diferentes de los talos y todos sus órganos reproductores se encuentran cubiertos por una cápsulas.

1. 4 Taxonomía

Desde el punto de vista taxonómico la ubicación del género *Ulva* es el siguiente:

Reino: *Protistas*

División: *Chlorophytas*

Clase: *Bryopsidophyceae*

Orden: *Ulvales*

Familia: *Ulvaceae*

Género: *Ulva*



Se da el nombre de *Ulva* por la gran cantidad de pigmentos verdes clorofila a y b que le da la típica coloración “verde pasto”. Además contienen, otros tipos de pigmentos como son carotenoides β carotenos, luteína, sinfonoxantina, una xantofila especial. En principio el género *Ulva* fue uno de los primeros nombrado por Linnaeus. Posteriormente, a la delineación taxonómica se incorporan otros caracteres más estables que incluyen detalles acerca de la reproducción, el desarrollo e hibridación potencial (**Van den Hoek, 1981**). Este hecho provocó una notable reducción de sus especies.

En la actualidad, la sistemática y taxonomía del grupo se han perfilado mediante el empleo de técnicas moleculares y los estudios más recientes (**Hayden, 2001**), han contribuido a reducir el número de sus especies.

Desde el punto de vista taxonómico la ubicación del género *Padina* es el siguiente:

Reino: *Protistas*

División: *Heterocontophyta*

Clase: *Isogeneratae*

Orden: *Dictyotales*

Familia: *Dictytaceae*

Género: *Padina*



1. 5 Rol ecológico

Ulva sp.

Las algas del genero *Ulva* juegan roles significativos en las comunidades marinas del mundo, destacando las áreas tropicales de aguas cálidas y salinidades variables. Estos roles funcionan tanto en lo espacial como temporalmente y operan en los ambientes ya sea, influyendo en la riqueza específica y biodiversidad o brindando una función trófica para los ecosistemas como fuente de productividad clave y complementando con su estructural para que otros organismos puedan definir sus nichos, esto añadido a que

contribuyen a la formación de arrecifes y evitan la erosión de la zona somera previniendo la remoción del sustrato. Gran parte de la energía producida por las algas marinas bentónicas es consumida directamente por los consumidores de primer orden entre los cuales destacan moluscos y peces herbívoros, entre otros. Sumado a ello desempeñan otros roles ecológicos no productivos como servir de sustrato, lugar de refugio, lugar de asentamiento larval y crianza de juveniles para numerosos invertebrados y peces litorales.

Este género forma parte de las comunidades marinas costeras de la zona intermareal baja y poco profunda del litoral rocoso. Contribuyen en la formación de rocas y sedimentos marinos. Además son productoras de materia orgánica, y desempeñan un papel decisivo en la producción y concentración de algunos elementos o compuestos químicos y fertilizantes en pequeña proporción, que son necesarios para la vida marina, algunas especies herbívoras las consumen para sintetizar las sustancias que contiene y producir toxinas y metabolitos potentes como disuasivos de la depredación (**Hay et al., 1990**).

Adicionalmente, los conjuntos de este género de macroalgas a menudo responden a cambios en condiciones del ambiente funcionando entonces como bioindicadores de otros procesos en desarrollo. La respuesta puede ser directa por enriquecimiento de nutrientes debido a influencia de corrientes marinas que los remueven o transportan,

periodos prolongados de agujeros, por fugas o mal manejo de insumos de la agricultura y también las respuestas indirectas, como la desaparición dramática de la cobertura de algas debido a derrames o mal manejo de residuos industriales en cercanías a sus ambientes.

Padina sp.

Cumplen además una serie de funciones ecológicas no productivas, como servir de sustrato, lugar de desove y de refugio a muchos peces e invertebrados marinos. Por otra parte, son fuente directa de alimento para el hombre y otros animales consumidores, producen antibióticos, hormonas y otras sustancias de uso medicinal. Constituyen también fertilizante de suelos para cultivos agrícolas y algunas producen y concentran en sus paredes celulares sustancias químicas del tipo polisacáridos, como el agar, la carragenina y el ácido algínico. Estos coloides o gomas vegetales, debido a sus propiedades espesantes, estabilizantes y emulsionantes, sirven de materia prima para la producción de una variedad de productos industriales.

1. 6 Distribución geográfica

Ulva sp.

Las algas del género *Ulva* están casi siempre presentes en la ficóflora marina de todo el mundo. Muchas especies de este género son cosmopolitas y se encuentran en una

gran diversidad de hábitats con grandes diferencias de salinidad, temperatura, turbidez y composición química. En particular, la *Ulva fasciata*, se extiende por las costas de Australia, Nueva Zelanda, las islas del Pacífico y Suramérica (**Hayden, et al., 2003**).

La distribución batimétrica de los representantes de este género se enmarca desde el supralitoral hasta una profundidad de 8 m a 10 m, aunque se han observado talos de *U. lactuca* fijos a 23 m de profundidad (**Kopp, 1977**). Las poblaciones más densas se sitúan en los espacios intermareales y en las aguas someras. Este género se localiza comúnmente en áreas de aportes nitrogenados considerables y se fijan sobre rocas, diques y boyas, siendo pocas las especies que son encontradas en costas expuestas. La longitud y la textura de los talos se presentan de acuerdo a las características del lugar.

Padina sp.

Esta especie es la más común en la zona rocosa, ya que las especies del género se distribuyen particularmente en la zona intermareal y submareal superior, entre un rango de profundidades de (0,5 m hasta - 50 m), se desarrolla en diferentes hábitats comunes como: el rocoso formado por piedra madre, arenoso y rocoso-arenoso. Se presenta generalmente formando mantos de gran extensión monoespecíficos, pero hacia mayor profundidad se encuentra asociada a los mantos de *Sargassum sp.* De acuerdo a su longevidad se puede considerar como un alga permanente durante todo el año ya que

mientras unas están desarrollándose en primeros estadíos otras están pereciendo. Por lo que en las diferentes localidades con zonas rocosas se encuentran en diferentes estadíos dentro de una misma región, por lo que no se puede generalizar épocas reproductivas. Se pueden encontrar en una misma localidad a la fase esporofítica y gametofítica, desarrollándose primero los gametos femeninos y posteriormente los masculinos.

1. 7 Potencial Biotecnológico y perspectivas en el uso no convencional

Desde hace décadas las algas marinas han sido cosechadas en el Extremo Oriente y los países del Pacífico asiático, donde se utilizan en la industria alimenticia, práctica que se ha extendido hasta América del Norte y también a Europa según (**McHugh 2003**). Las algas verdes, pardas y rojas contienen varios compuestos orgánicos e inorgánicos que son benéficos para la salud humana por su alto valor nutricional y sus propiedades curativas de muchas enfermedades (tuberculosis, artritis, resfriados e influenza, infestaciones de bacterianas, fúngicas, parásitos y tumores). Algunas de las especies de algas estudiadas han mostrado variaciones amplias en la composición química (proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales y vitaminas), las cuales se relacionan con factores ambientales como las temporadas estacionales, temperatura, luz, salinidad, localización y condiciones de almacenamiento (**Dawes 1998**).

En términos generales, las algas se cosechan y/o cultivan artesanal e industrialmente para varios usos entre ellos mencionaremos: alimentos para humanos y animales, cosméticos, fertilizantes, biocombustibles, etc. la aplicación industrial se restringe principalmente a la extracción de ficocoloides (agar, carragenina y alginatos) que han alcanzado importancia comercial como aditivos alimentarios.

Actualmente, las algas marinas han recibido mucha atención por ser fuentes potenciales de compuestos bioactivos ya que son capaces de producir varios metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividades biológicas interesantes, incluyendo propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antioxidantes. El gran potencial para la explotación de estos compuestos naturales radica en la diversidad de aplicaciones que puede tener en campos como las medicinas, ingredientes antibióticos o antifúngicos, nutricionales, ingredientes para desarrollar alimentos funcionales, etc. Han aumentado el interés por extraer nuevos compuestos bioactivos de algas cosechadas o colectadas en varios sitios del mundo.

Sin embargo entre los países que rodean los Mares de Suramérica, no existen estudios sobre la explotación de la biomasa algal varada en sus aguas costeras. La cosecha y el desarrollo de procesos de tratamiento de algas podrían contribuir a la concepción de nuevos productos biotecnológicos. Hoy en día, los estudios encaminados a elucidar la

abundancia, la disponibilidad, la composición química y las propiedades de algas se han vuelto indispensables. Potentes actividades antioxidantes han sido descubiertas en los últimos años a partir de especies del genero *Ulva sp.* las cuales han sido asociadas al alto contenido en compuestos fenólicos presentes en estos vegetales. El valor potencial de las macroalgas en biomedicina está bien documentado, particularmente en la zona tropical. Los extractos obtenidos de especies del género *Padina sp.* Mostraron acciones como analgésicos y anti-inflamatorios mientras que la evaluación de los extractos manifestó la presencia de sustancias con propiedades neurofarmacológicas **(García et al., 2003)**.

La producción de biomasa metanizable a partir de algas marinas mostró muy buenos resultados. *Ulva sp.* por ejemplo se emplea con ese propósito pues debido a su composición en glúcidos y proteínas, ofrece la ventaja de fermentarse rápidamente y de generar más metano que otras materias primas. También se aprovechan para purificar las aguas ya que son capaces de remover los nutrientes, procedentes del maricultivo, las aguas industriales. Algunas especies de *Ulva*, revelaron excelentes resultados como biofiltros en sistemas de cultivo de peces.

CAPÍTULO II

MARCO METODOLÓGICO

2. 1 Materiales

2. 1. 1 Material biológico vegetal

50 gramos del alga *Ulva sp.*

50 gramos del alga *Padina sp.*

2. 1. 2 Material biológico bacteriano

Cepa de *Vibrio alginolyticus*

Cepa de *Vibrio vulnificus*

Cepa de *Pseudomonas sp.*

2. 1. 3 Material biológico Fúngico

Cepa de hongo *Cladosporium sp.*

2. 1. 4 Equipos y Accesorios

1 Agitador magnético

2 Asas de Platino

1 Autoclave

1 Balanza digital

1 Incubadora

30 Cajas biPetri 140X15mm

30 Cajas triPetri 140X15mm

1 Caja de guantes estériles

1 Caja de mascarilla

1 Caja de parafilm

1 Cámara de newbauer

1 Cámara fotográfica

1 Centrifuga

1 Computadora

1 Cuaderno de apuntes

1 Espátula

1 Estufa

12 Hisopos estériles

2 Jeringa de (60 ml)

1 Lápiz

3 Marcadores permanente punta fina

1 Mechero

1 Micro pipeta automática de 10 μ l (micro litros)

1 Micro pipeta automática de 20 a 200 μ l (micro litros)

1 Microscopio óptico

2 Pipeta de 10 ml

2 Pliegos de papel filtro

1 Calentador eléctrico

3 Vasos de precipitación de 100

2 Vasos de precipitación de 200ml

3 Matraz de 250ml

Matraz de 1000ml

Mortero de porcelana de 250ml con pistilo

2. 1. 5 Reactivos

Agua destilada

Alcohol potable

Etanol 98%

Capsulas de Oxytetraciclina de 250 mg

Fungirex liquido incoloro 100ml

2. 1. 6 Medios de Cultivo

Agar Nutritivo

Agar sabouraud

Agar TCBS

Agar Peptona

2. 2 Metodología

2. 2. 1 Área de estudio

El área de estudio comprendió una estación de muestreo, en el área rocosa de la zona intermareal. En la playa de Ballenita-Santa Elena-Ecuador.

Ballenita, es una localidad que se encuentra en la parte oeste del cantón Santa Elena, su playa tiene una longitud de 1600 metros incluidos 200 metros de zona rocosa y 300 metros de zona mixta (arena y roca).

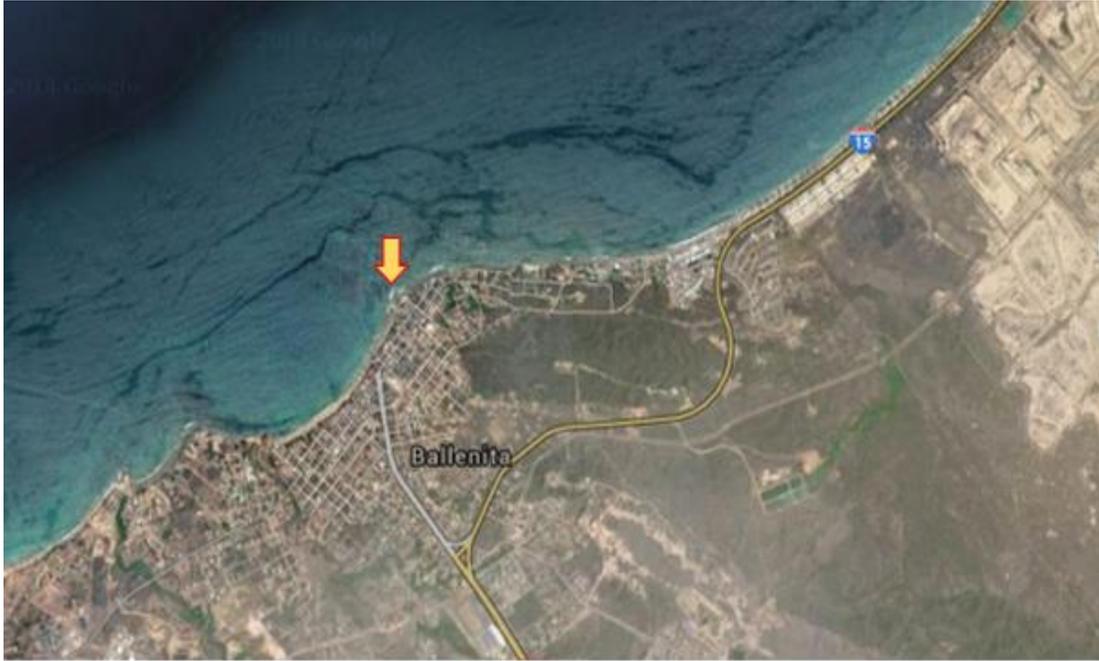


Figura 1. Sitio de muestreo playa de Ballenita.

Se determinó como estación de muestreo el área rocosa de la parte norte de la playa con las siguientes coordenadas geográficas:

Ubicación geográfica del Sitio de Colecta	
Latitud	Longitud
2° 12' 10.60" S	80° 52' 05.85" O

Tabla 1. Coordenadas geográficas de sitio de muestreo.

3. 2 Colecta de macroalgas

Luego de revisar la tabla de mareas emitida por el INOCAR y constatar el ciclo de mareas para dicho día específicamente la baja mar procedimos a realizar la colecta de las macroalgas. Esto se realizó en un área no mayor a los 100m² es decir cubriendo un radio de 5 m máximo. En el lugar donde se observó una gran colonización empezamos a extraer las macroalgas utilizando una espátula de 1 pulgada para removerlas del sustrato rocoso en la zona de la rompiente que es donde proliferan y extrajimos un total de 18 especímenes que alcanzaban pesos de entre 2.5 y 4 g cada una.

Las muestras colectadas fueron colocadas en 2 recipientes plásticos rectangulares de 200 ml con una porción de 100ml de agua de mar. Para su Transporte y preservación se colocaron las muestras en una hielera de 12 litros para mantener estable el parámetro de la temperatura y evitar desnaturalizar las muestras hasta llegar al laboratorio de la Universidad donde las colocamos en refrigeración a 4°C hasta su utilización en la elaboración de los extractos.

3. 4. Tratamiento de las macroalgas en el laboratorio

Se tomó las muestras de las macroalgas que se encontraban en refrigeración para ser separadas en 2 partes, una parte se colocó de nuevo en el refrigerador y la otra se lavó con agua dulce para de esta manera ir separando los organismos epífitos y la gran cantidad de arena que contenía. Una vez lavadas y liberadas de todas las impurezas externas estas fueron exprimidas suavemente para dejarlas secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez retirada la mayor cantidad de líquido se cortaron en pedazos pequeños con el fin de obtener porciones uniformes de los talos que facilitaron el proceso de trituración en el mortero para la extracción de los metabolitos.

3. 4 Elaboración de los extractos

Para obtener la mayor concentración de metabolitos en el extracto utilizamos un mortero de porcelana de 250ml donde procedemos a macerar nuestras muestras hasta pulverizarlas completamente. Para lo cual describimos el proceso que seguimos hasta alcanzar la mayor concentración posible.

Luego de varios ensayos se determinó que la relación que mejor se desempeñaba para alcanzar mayor concentración de metabolitos fue la relación 1 a 0.8 (10 g de alga para 8 ml de etanol 98%) donde alcanzamos un 50% de rendimiento del alga vs el del vehículo utilizado.

Para lo cual utilizamos la ecuación siguiente:

$$\% E = \frac{(W_i - W_f)}{V_f} \times 100$$

Donde:

V_f = es el resultante de la trituración de los talos de las algas + el volumen del vehículo en este caso el etanol 98%.

W_i = Masa del alga utilizada.

W_f = Masa obtenida luego de extraer los metabolitos mediante el etanol al 98%.

$$V_f = V_i + E_a$$

V_i = volumen del Etanol al 98%.

$$E_a = V_f - V_i$$

E_a = extracto que se supone ha sido obtenido de la trituración de los talos de las algas.

$\%E$ = es la concentración de metabolitos del alga relacionados entre la masa algal y el etanol.

Se tomó el material algal una vez descongelado y con la menor cantidad de líquido posible, se pesó se disminuyó el tamaño de partícula de forma manual. Cortando las algas en pedazos muy pequeños para luego tritararlos hasta lograr pulverizarlos por completo.

Se añadió el solvente como vehículo para obtener los metabolitos secundarios del alga.

Esta pasta fue filtrada por una película triple de papel filtro previamente introducida en una jeringa de 60ml.

La presión que ejerció el embolo nos dio el mejor rendimiento por esta razón se hizo uso de este.

Este extracto se guardó por 48 horas en un vial colector ámbar de 30 ml previamente etiquetado.

Este extracto es el que luego aplicamos a las placas con las bacterias y hongos experimentales determinando su desempeño antibiótico o antifúngico.

Los extractos obtenidos fueron almacenados hasta el momento de utilizarlos a 4 °C. según el protocolo de (**Torres 2007**).

3. 5 Preparación de medios de cultivo

Los pasos para la preparación de cada medio de cultivo utilizado fue:

Agar Peptona.- viene en presentación microparticulada (en polvo) para disolver en proporción de 25,5g /l.

- De esta manera tomamos 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitación de 250ml.
- Medimos en la balanza digital 2,5 g del agar nutritivo para preparar 100ml de este medio.
- Añadimos el medio en polvo a los 100ml de agua destilada y colocamos esta solución al calentador eléctrico a una temperatura de 150 °C.
- Mientras calienta se mueve suavemente hasta que se torne traslucido y hierva por 1 minuto.
- Luego dejamos enfriar hasta que llegue a una temperatura de 45 a 40 °C.
- Luego tomamos una jeringa de 10 ml, pero sin la aguja y procedemos a colocar 10ml del medio en los tubos de ensayo.
- Dejamos enfriar hasta que se encuentre a temperatura ambiente para inocular las bacterias que necesitamos en estado líquido para poder contar antes de inocular y probar los tratamientos.
- De este medio es que vamos a contar las bacterias y diluir hasta llegar a la concentración deseada.

Agar Nutritivo.- viene en presentación microparticulada (en polvo) para disolver en proporción de 23g /l.

- De esta manera tomamos 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitación de 250ml.
- Medimos en la balanza digital 2,3 g del agar nutritivo para preparar 100ml de este medio.
- Añadimos el medio en polvo a los 100ml de agua destilada y colocamos esta solución al calentador eléctrico a una temperatura de 150 °C.
- Mientras calienta se mueve suavemente hasta que se torne traslucido y hierva por 1 minuto.
- Luego dejamos enfriar hasta que llegue a una temperatura de 45 a 40 °C.
- Luego tomamos una jeringa de 10 ml, pero sin la aguja y procedemos a colocar 6ml del medio en cada sección de la caja tripetri o 10 si es bipetri.
- Dejamos solidificar y que se encuentre a temperatura ambiente para inocular las cepas a probar.
- Deberíamos utilizar el medio de cultivo Muller Hinton pero este debe ser encargado 45 días de anticipación vía importación. De manera que utilizamos el agar nutritivo que fue el que nos prestó cualidades similares a las del medio antes mencionado.

Agar sabouraud.- viene en presentación microparticulada (en polvo) para disolver en proporción de 65g /l.

- De esta manera tomamos 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitación de 250ml.
- Medimos en la balanza digital 6,5 g del agar sabouraud para preparar 100ml de este medio.
- Añadimos el medio en polvo a los 100ml de agua destilada y colocamos esta solución al calentador eléctrico a una temperatura de 150 °C.
- Mientras calienta se mueve suavemente hasta que se torne traslucido y hierva por 1 minuto.
- Luego dejamos enfriar hasta que llegue a una temperatura de 45 a 40 °C.
- Luego tomamos una jeringa de 10 ml, pero sin la aguja y procedemos a colocar 6ml del medio en cada sección de la caja tripetri o 10 si es bipetri.
- Dejamos solidificar y que se encuentre a temperatura ambiente para inocular las cepas a probar.
- En este medio solo se debió realizar un raspado a frutas que contenían el *cladosporium sp.* y diluirlo en agua destilada antes de realizar las inoculaciones.

Agar TCBS.- viene en presentación microparticulada (en polvo) para disolver en proporción de 89g /l.

- De esta manera tomamos 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitación de 250ml.
- Medimos en la balanza digital 8,9 g del agar TCBS para preparar 100ml de este medio.
- Añadimos el medio en polvo a los 100ml de agua destilada y colocamos esta solución al calentador eléctrico a una temperatura de 150 °C.
- Mientras calienta se mueve suavemente hasta que se torne traslucido y hierva por 1 minuto.
- Luego dejamos enfriar hasta que llegue a una temperatura de 45 a 40 °C.
- Luego tomamos una jeringa de 10 ml, pero sin la aguja y procedemos a colocar 6ml del medio en cada sección de la caja tripetri o 10 si es bipetri.
- Dejamos solidificar y que se encuentre a temperatura ambiente para inocular agua de mar y poder aislar las cepas de *vibrios* a probar.

Concentración de cepas bacterianas utilizadas

Las cepas bacterianas y fúngicas que se utilizaron, fueron:

Concentración de cepas utilizadas	
Bacterias	Concentración
	X10 ⁷ UFC
<i>Pseudomonas sp.</i>	1
<i>Vibrio vulnificus</i>	1.2
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1
Hongos:	X10 ⁷ UFC
<i>Cladosporium sp.</i>	1

Tabla 2. Lista de cepas y sus concentraciones utilizadas para los bioensayos

El método de dilución fue utilizado para obtener las concentraciones deseadas:

El método de dilución consistió en tomar una colonia de bacterias del medio sólido o cepa y la colocamos en el medio líquido (agar Peptona) por el lapso de 24 a incubación a 30°C.

Luego de esto realizamos el conteo utilizando el microscopio y la cámara de newbauer. Y para llegar a la concentración deseada tomamos 1 ml del medio que contiene la bacteria y lo diluimos añadiendo agua destilada.

Y ya esta lista nuestra muestra para ser aplicada a las placas.

3.6.1 Antibiogramas

Para realizar los antibiogramas las cepas bacterianas fueron obtenidas de aislamiento local de laboratorios de producción de larvas. Una vez en el laboratorio fueron inoculadas en medio de cultivo agar Pectona de donde se obtuvo la concentración deseada.

Cada cepa de bacteria fue inoculada utilizando una micropipeta automática ajustada a un contenido de 50 µl de la solución de bacterias a una concentración de 1×10^7 en las placas bi o tripetri que contiene 20ml de agar nutritivo solidificado a temperatura ambiente.

Una vez colocados los 50 µl de la solución de bacteriana sobre el agar esparcimos por toda la placa mediante un ligero movimiento circular hasta alcanzar esparcir todo el contenido en la mayor cantidad de área.

Luego de 2 horas se procedió a la siguiente experimentación:

Como forma de estandarizar los Bioensayos se hizo uso de una perforadora de papel común la cual utilizamos para producir 90 discos de papel filtro con un diámetro de 6mm. Que luego 12 fueron hidratados con 10µl de extracto de *padina sp.* 12 más fueron hidratados con 10µl de extracto de *Ulva sp.* 12 con 10µl de control positivo oxytetraciclina, 12 con 10µl de control positivo fungirex y 12 con 10µl de control negativo etanol al 65%.

Luego de 10 minutos estamos listos para colocar los discos de papel filtro que contienen los extractos de cada alga, los controles positivos antibiótico y el control negativo etanol al 65% en cada placa inoculada 2 horas antes.

Nota el producto oxytetraciclina viene en capsulas de 250mg, para lo cual debimos diluirla en agua destilada y obtener las concentraciones deseadas:

- Una tableta en 50 ml nos garantizaba 50 µg en 10 µl.
- Una tableta en 100 ml nos garantizaba 25 µg en 10 µl.
- Una tableta en 250 ml nos garantizaba 10 µg en 10 µl.
- El fungirex no necesito ser diluido ya que hay en el mercado en presentación liquida.

Luego para el control positivo (+) antibiótico 4 discos fueron hidratados con 10 µl de oxy con una concentración de 10 µg, seguido de 4 más a 20 µg de concentración y por

ultimo 4 discos más a 50 µg de concentración. Y 4 discos hidratados con 10 µl de fungirex.

Para el control negativo (-) se realizó lo mismo pero con etanol al 65% suponiendo el valor del 30% del extracto algal.

De la misma forma se hidrato los discos para la experimentación antifungica con 10 µl de su extracto y control respectivo.

Luego en las cajas que contenían el agar se inoculó con 50µl de la bacteria a una concentración de 1×10^7 UFC/ml en toda su superficie. Después de 2 horas se le colocó los discos previamente hidratados con 10µl de la solución correspondiente.

Colocamos las placas inoculadas con sus respectivos discos dentro de la incubadora a una temperatura de 30°C por el lapso de 24 horas.

Cumplidas las 24 horas revisamos las placas y procedemos a medir con un calibrador pie de rey o vernier los halos de inhibición producidos en cada control y en especial en nuestras cajas con los extractos experimentales.

3.6.4 Antifungigrama

Para realizar los antifungigramas la cepa seleccionada fue obtenida de aislamiento de los puestos de frutas del mercado local. Una vez en el laboratorio fueron colectadas las

colonias utilizando una espátula y colocadas en 10 ml de agua destilada para luego ser llevadas a la cámara de Neubauer y luego de contabilizarse fueron sembradas directamente o inoculadas en medio de cultivo agar Sabouraud, a una concentración de $0,2 \times 10^7$ en las placas bi o tripetri que contiene 20ml de agar Sabouraud solidificado a temperatura ambiente.

De la misma manera que en los antibiogramas una vez colocados los 50 μ l de la solución de micótica sobre el agar esparcimos por toda la placa mediante un ligero movimiento circular hasta alcanzar esparcir todo el contenido en la mayor cantidad de área.

Luego de 2 horas se procedió a la siguiente experimentación:

Como forma de estandarizar los Bioensayos se hizo uso de una perforadora de papel común la cual utilizamos para producir los discos de papel filtro con un diámetro de 6mm. Que luego 12 fueron hidratados con 10 μ l de extracto de *Padina sp.* 12 más fueron hidratados con 10 μ l de extracto de *Ulva sp.* 12 con 10 μ l de control positivo oxytetraciclina, 12 con 10 μ l de control positivo fungirex y 12 con 10 μ l de control negativo etanol al 65%.

Luego de 10 minutos estamos listos para colocar los discos de papel filtro que contienen los extractos de cada alga, los controles positivos antifúngico y el control negativo etanol al 65% en cada placa inoculada 2 horas antes.

Interpretación

Finalmente luego que se ha procedido a colocar los discos de cada extracto y control antibiótico positivo y negativo a una distancia mayor a 2.5 cm el uno del otro, para permitir la diferenciación del halo de inhibición de forma independiente.

Los resultados de las mediciones al cabo de 24 horas se comparan con los sugeridos para cada uno de los antibióticos y se define a cuales son sensibles (S), Intermedios (I) y/o resistentes (R).

Según la siguiente tabla:

Interpretación de Antibiogramas y sus halos en mm					
antibiótico	Nombre común	concentración (μg)	R	I	S
Cloranfenicol		30	≤ 12	13 - 17	18
Oxytetraciclina	Oxy	30	≤ 14	15 - 18	19
Trimethoprim	Bactrin	1.25/23.75	≤ 10	11 - 15	16
Florfenicol	Nuflor	30	≤ 16	17 - 20	21
Enrofloxacin		5	≤ 15	16 - 20	21

Fuente: Dr. Bruno Gómez-Gil, CIAD, AC.

Tabla 3. Lista de algunos antibióticos y la interpretación de resultados

Para los resultados de las mediciones de los antifungigramas se deben realizar de preferencia al cabo de 48 horas se comparan con los sugeridos para cada uno de los antifungicos y se define a cuales son sensibles (S), Intermedios (I) y/o resistentes (R).

Según la siguiente tabla:

Interpretación de Antifungigramas y sus halos en mm					
Antimicótico	Siglas	Concentración de disco	Resistente	Intermedio	Susceptible
Fluconazol	FCA	10 µl	≤14	15 – 18	≥19
Voriconazol	VCZ	10 µl	≤13	14 – 16	≥17
Ketoconazol	KET	10 µl	10	10 – 20	20
Fungirex	10 µl	≤12	13 - 15	≥16

Tabla 4. Lista de algunos antimicóticos y la interpretación de sus resultados

CAPITULO III

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Nuestro trabajo estuvo comprendido por tres fases la primera obtener las macroalgas de la playa de ballenita lugar de donde se extrajo dos muestras de macroalgas que corresponden a los géneros *Padina sp.* y *Ulva sp.* respectivamente. La segunda fase la obtención de los extractos con la mayor concentración para mejor desempeño de sus metabolitos secundarios donde se obtuvo un 40% de rendimiento del alga vs el vehículo etanol 98%. La tercera fase fue realizar los bioensayos tanto antibióticos frente tres cepas bacterianas como antifúngicos ante una cepa.

3. 1 Colecta y transporte de las macroalgas

Se colectaron 50 gramos de cada macroalga y fueron transportadas guardando los lineamientos antes mencionados en nuestra metodología.



Figura 2. Macroalgas del género *Ulva*



Figura 3. Macroalgas del género *Padina*

3. 2 Elaboración de extractos

La elaboración de los extractos se llevó a cabo experimentando proporciones diferentes tanto de alga como del vehículo, dando como resultados que las de mejor desempeño fueron las siguientes:

Rendimiento de Extractos					
Macroalga	Cantidad inicial(g)	Volumen inicial (etanol)ml	Cantidad final(g)	Volumen final (ml)	rendimiento
<i>Ulva sp.</i>	10,0	8,0	3,5	16,0	41%
<i>Padina sp.</i>	10,0	10,0	3,0	15,0	47%

Tabla 5. Porcentajes de rendimiento de las macroalgas en sus extractos.

Cabe recalcar que el extracto de la *Padina sp.* fue al que mayor concentración se le pudo obtener no obstante el desempeño de sus metabolitos en relación a su concentración no alcanzo el rendimiento deseado ya que el alga *Ulva sp.* presentó mejores resultados a pesar de su menor concentración.

3.3 Evaluación de actividad antibiótica

De los extractos utilizados solo el obtenido a partir de *ulva sp.* mostró resultados significativos frente a las cepas bacterianas propuestas ya que llevados a la práctica quedarían como antibióticos de efecto intermedio según la tabla interpretativa antes descrita

El extracto de *Padina sp.* muestra una ligera tendencia antibiótica pero no deja de presentarse una resistencia por parte de las cepas patógenas empleadas según se puede apreciar en las siguientes tablas:

Resultados generales de los antibiogramas			
Halos de inhibición en milímetros (mm)			
Tratamiento	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Vibrios a.</i>	<i>Vibrios v.</i>
Control 1(+) Oxy 10µg	23	25	22
Control 2(+) FUNGIREX 10µl	6	6	6
Extracto de <i>Ulva sp.</i>	14	14	13
Extracto de <i>Padina sp.</i>	11	9	10
control(-) etanol 65%	7	7	6

Tabla 6. Resultados generales de los antibiogramas con 10µg de oxy en los discos.

Resultados generales de los antibiogramas			
Halos de inhibición en milímetros (mm)			
Tratamiento	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Vibrios a.</i>	<i>Vibrios v.</i>
Control 1(+) Oxy 25µg	25	25	25
Control 2(+) FUNGIREX 10µl	6	6	6
Extracto de <i>Ulva sp.</i>	14	13	14
Extracto de <i>Padina sp.</i>	10	9	10
control(-) etanol 65%	7	7	6

Tabla 7. Resultados generales de los antibiogramas con 25µg de oxy en los discos.

Resultados generales de los antibiogramas			
Halos de inhibición en milímetros (mm)			
Tratamiento	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Vibrios a.</i>	<i>Vibrios v.</i>
Control 1(+) Oxy 50µg	28	30	30
Control 2(+) FUNGIREX 10µl	6	6	6
Extracto de <i>Ulva sp.</i>	14	14	14
Extracto de <i>Padina sp.</i>	10	9	11
control(-) etanol 65%	7	7	6

Tabla 8. Resultados generales de los antibiogramas con 50µg de oxy en los discos.

3.4 Evaluación de desempeño frente al antibiótico convencional

Tomando como referencia los antibiogramas con el antibiótico oxy a una concentración de 10 µg en cada disco el desempeño de nuestros extractos fue el siguiente:

Bioensayo frente a <i>Pseudomonas sp.</i>			
Tratamiento	Halo de inhibición	Desempeño	Eficiencia
Control 1(+) Oxy 10µg	23	17	100%
Control 2(+) FUNGIREX 10µl	6	0	0%
Extracto de <i>Ulva sp</i>	14	8	47%
Extracto de <i>Padina sp.</i>	11	5	29%
control(-) etanol 65%	7	1	6%

Tabla 9. Resultados de antibiogramas con 10µg de oxy en los discos frente a *Pseudomonas sp.*

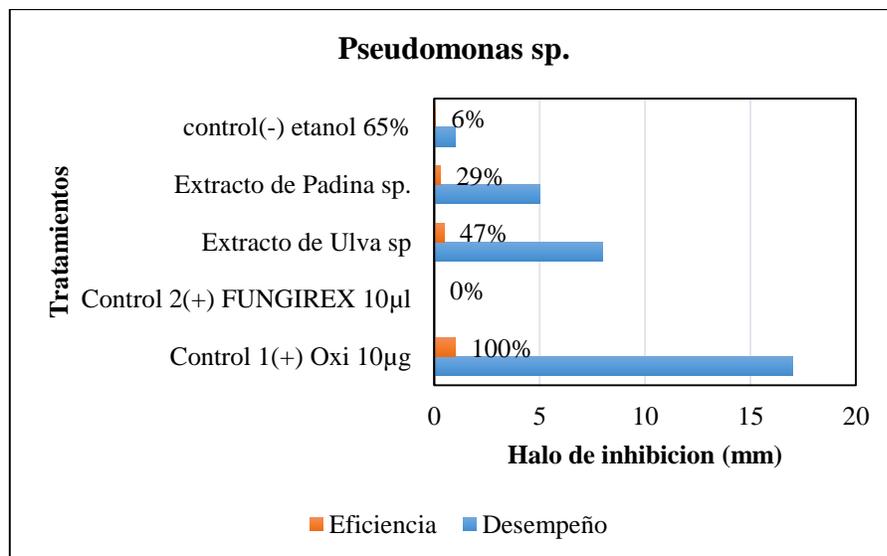


Figura 4. Desempeño porcentual de los extractos en antibiograma de Pseudomonas.

Bioensayo frente a <i>Vibrios a.</i>			
Tratamiento	Halo de inhibición	Desempeño	Eficiencia
Control 1(+) Oxi 10µg	25	19	100%
Control 2(+) FUNGIREX 10µl	6	0	0%
Extracto de <i>Ulva sp</i>	14	8	42%
Extracto de <i>Padina sp.</i>	9	3	16%
control(-) etanol 65%	7	1	5%

Tabla 10. Resultados de antibiogramas con 10µg de oxy en los discos frente a *Vibrios a.*

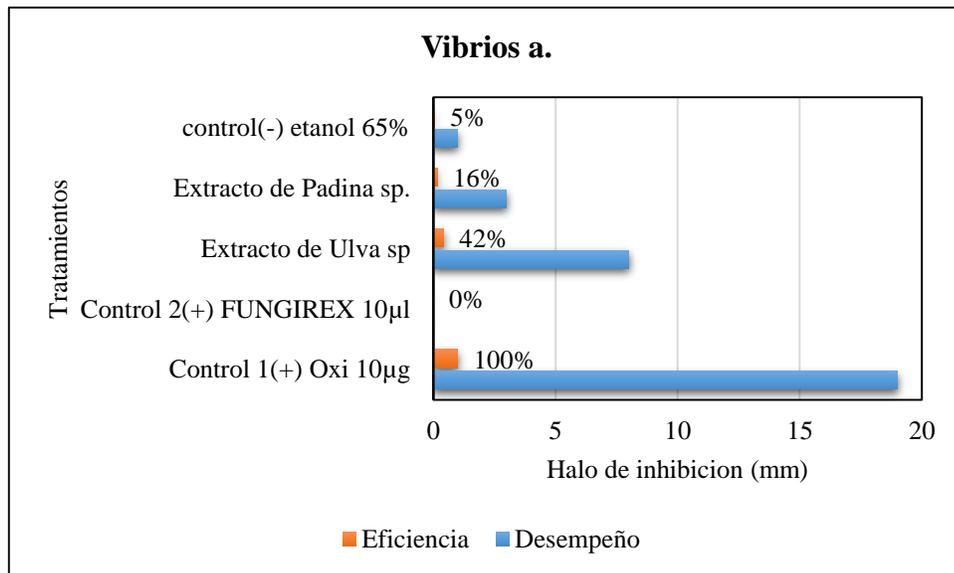


Figura 5. Desempeño porcentual de los extractos en antibiograma de *Vibrios a.*

Bioensayo frente a <i>Vibrios v.</i>			
Tratamiento	Halo de inhibición	Desempeño	Eficiencia
Control 1(+) Oxi 10μg	22	16	100%
Control 2(+) FUNGIREX 10μl	6	0	0%
Extracto de <i>Ulva sp</i>	13	7	44%
Extracto de <i>Padina sp.</i>	10	4	25%
control(-) etanol 65%	7	1	6%

Tabla 11. Resultados de antibiogramas con 10μg de oxy en los discos frente a *Vibrios v.*

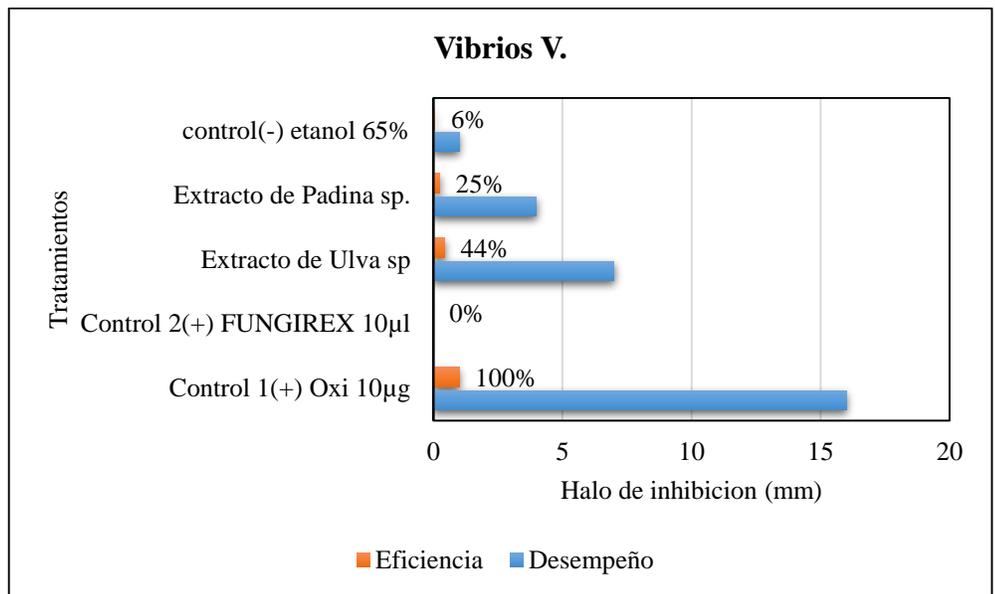


Figura 6. Desempeño porcentual de los extractos en antibiograma de *Vibrios v.*

En todo caso los resultados muestran que los extractos obtenidos de las macroalgas del género *Ulva* siempre alcanzaron un desempeño por encima del 40% frente al oxy mas la *Padina* en su mejor presentación no alcanzo ni el 30%.

3. 4 Evaluación de actividad antifúngica

De los extractos utilizados solo el obtenido a partir de *Ulva sp.* mostró buenos resultados significativos frente a la cepa fúngica *Cladosporium sp.* ya que llevados a la práctica quedarían como antifúngico o antimicótico de efecto intermedio a susceptible según la tabla interpretativa antes descrita

El extracto de *Padina sp.* no muestra una actividad antifúngica ya que la cepa de *Cladosporium sp.* presentó una resistencia muy significativa según se puede apreciar en las siguiente tabla:

Bioensayo frente a Hongo (<i>Cladosporium sp.</i>)			
Tratamiento	Halo de inhibición	Desempeño	Eficiencia
Control 1(+) Oxi 10µg	8	2	22%
Control 2(+) FUNGIREX 10µl	15	9	100%
Extracto de <i>Ulva sp.</i>	11	5	56%
Extracto de <i>Padina sp.</i>	7	1	6%
control(-) etanol 65%	6	0	0%

Tabla 12. Resultados generales de los antifungigramas.

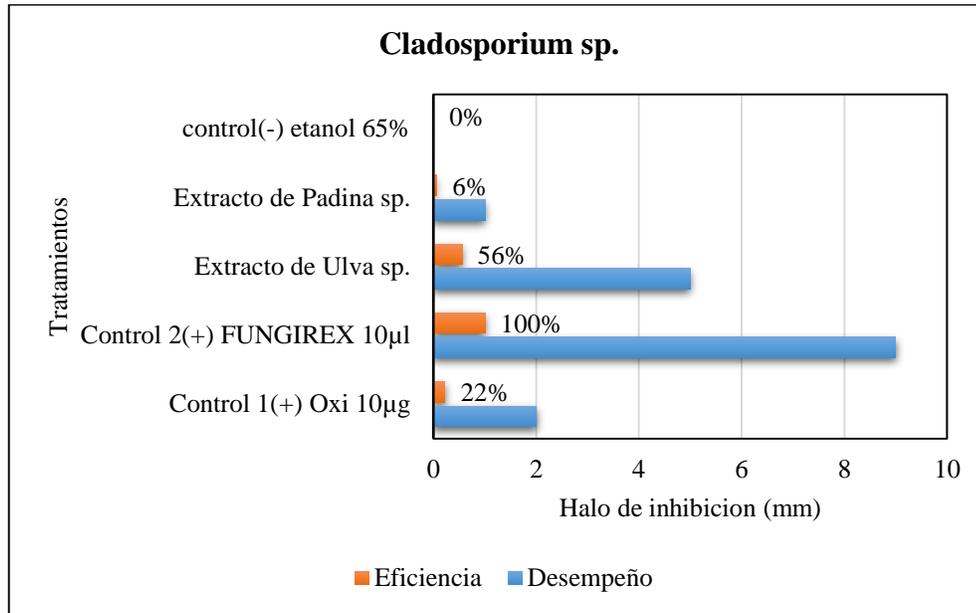


Figura 7. Desempeño porcentual de los extractos en los antifungigramas realizados a *Cladosporium sp.*

De igual manera que en los antibiogramas aquí los resultados muestran que los extractos obtenidos de las macroalgas del género *Ulva* alcanzaron un desempeño por encima del 55% frente al de fungirex un antimicótico comprobado y de venta libre en el mercado más la *Padina* no presentó una buena presentación ya que no alcanzó ni el 25% de eficiencia.

CONCLUSIONES

- De las proporciones experimentadas de alga Vs. Etanol dos de ellas fueron las que mayor concentración de metabolitos presentaron con mejores condiciones para su uso en las pruebas antibióticas y antifúngica.
- Los extractos obtenidos de las macroalgas *ulva sp.* actúan significativamente como antibióticos y antifúngicos, no así los de las macroalgas *Padina sp.* esto se debe por que presentan variantes en sus metabolitos y/o sustancias químicas.
- Los metabolitos secundarios de las macroalgas *Ulva sp.* y *Padina sp.* presentan una bioactividad considerable con efectos inhibitorios antifúngicos y antibióticos que pueden ser explotados a nivel industrial para sustituir productos como el oxytetraciclina.
- En general el proceso de extracción de los metabolitos secundarios de la *Ulva sp.* de manera manual revela que implementando nuevas técnicas y/o instrumentos se puede obtener mayores concentraciones reflejando mayor eficiencia.

RECOMENDACIONES

- Los bioensayos evaluativos de este tipo deben extenderse hacia otros grupos de macro y micro algas con énfasis a su aplicación en los campos de la nutrición, la farmacología y la biorremediación.
- Es necesario la elaboración de nuevos procesos e instrumentos de mayor eficiencia que permitan la extracción de los metabolitos secundarios en mayores concentraciones.
- A partir de estos resultados realizar ensayos para obtener las moléculas puras responsables de la bioactividad en estas macroalgas y de ser posibles llegar a sintetizarlas.

BIBLIOGRAFÍA

Alan, G., R. Kaur, A. Singh, P. Budlakoti, A. Singh y P. Singla. 2009. Antimicrobial Activity of *Ulva lactuca* Extracts and its fractions. *Pharmacology on line*. 3: 107-117

Anuario, FAO, 2006 Anuario estadísticas FAO Roma, Italia. Colección FAO Estadística No. 190 560 p.

Cardozo, K., T. Guarotini M.P. Barros, 2006 Metabolites from algae with economical impact. *Comparative biochemistry and physiology Part C* www.sciencedirect.com 19 p

Dawes, C. 1986 *Botánica Marina*. Ed. Linnusa S.S de C., 673p. De Lara- Isassi, G. y S. Álvarez-Hernández. 1994. Actividad biológica de las macroalgas marinas mexicanas. *Rev. Soc. Mex. HistNat.*, 45: 51-60

García T., S. Mora, A. Garateix, A. Palmero, O. Valdés, F. Guzmán, Y. Hernández, M.T. Buznego y H. Pérez-Saad. 2003. Efectos farmacológicos de extractos de algas marinas (2003) *Memorias VI Congreso Ciencias del Mar, MARCUBA*.

Hay, ME., J.E. Duffy, W. Fenical 1990 Host-plant specialization decreases predation on a marine amphipod: an herbivore in plant's clothing. *Ecology* 71: 733-743

Hayden, H. S., 2001. Systematics of Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) and genus *Ulva* L. based on nuclear and chloroplast sequence data. PhD dissertation, University of Washington, Seattle.

Hayden, H.S; J. Blomster; C. A. Maggs, P. C. Silva, M.J. Stanhope y J.R. Waaland, 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. Eur J. Phycol. (38): 217-294.

Kapraun, D. F. 1970 Field and cultural studies of *Ulva* and *Enteromorpha* in the vicinity of Port Arausa. Contrib. Mar Sci., 15: (205-285), Texas.

Kopp J. 1977 Etude du phénomène de “Maree verte” affectant les baies de Lannion et de saint Brieu. Rap. Ins Peches Marit, 102 p

McHugh, D.J 2003 A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries technical Paper No. 441.

Torres, C. M. 2007. *Investigación en procesos de transformación de sustancias de interés presentes en hojas, tubérculos, semillas y frutos de especies andinas, para generar productos agroindustriales que pueden ser destinados a nivel industrial, medicinal o alimenticio*. Segundo Informe Técnico. Jardín Botánico José Celestino Mutis –Subdirección Científica. Bogotá, D.C.

Van den Hoek C., D.G. Mann, H.M. Jahns 1995 *Algae: An introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Velasco, M. 2008. *Introducción Al Estudio De Las Algas*. Universidad De Guayaquil. 1° Edición. 213 Pp.

Wiencke C.; M.N. Clayton y M. Schoenwaelder 2004 Sensitivity and acclimation to UV radiation of zoospores from five species of Laminariales from the Arctic Marine Biology 145:31-39.

ANEXOS



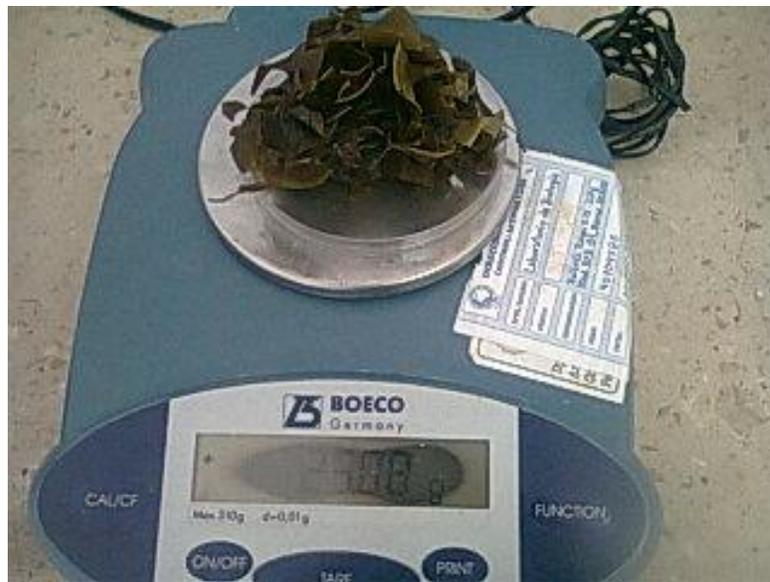
Anexo 1. Vista panorámica de la zona rocosa.



Anexo 2. Macroalgas del género *Ulva* adheridas al sustrato rocoso.



Anexo 3. Hielera de 12 litros con las muestras colectadas.



Anexo 4. Masa de un organismo de *Padina sp.*



Anexo 5. Pulverizado manual de las macroalgas.



Anexo 6. Filtración de la pasta por 3 láminas de papel filtro.



Anexo 7. Residuos de algas después de la filtración.



Anexo 8. Almacenamiento de los extractos en envases color ámbar de 30ml.



Anexo 9. Preparación de los medios de cultivo sólidos y líquidos.



Anexo 10. Cepas bacterianas utilizadas.



Anexo 11. Cepas bacterianas en medio líquido.



Anexo 12. Capsulas de Oxytetraciclina de 250 mg utilizadas.



Anexo 13. Fungirex líquido envase de 100ml.



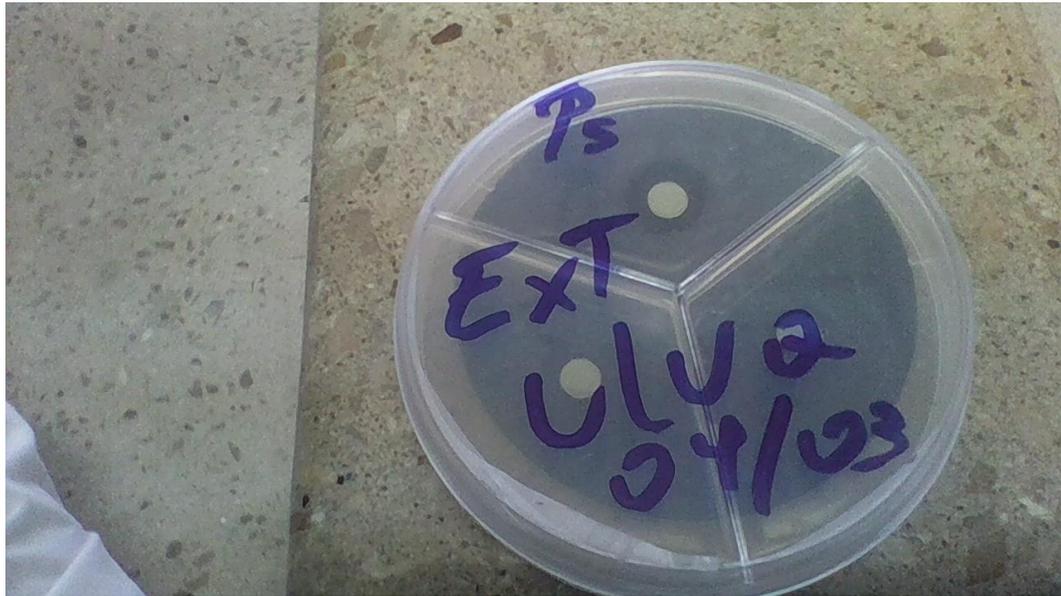
Anexo 14. Discos de papel filtro listos para ser hidratados.



Anexo 15. Hidratación de discos de papel mediante micro pipeta automática.



Anexo 16. Halo de inhibición del antibiótico Oxytetraciclina.



Anexo 17. Halo de inhibición del extracto de *Ulva* frente a *Pseudomonas sp*



Anexo 18. Halo de inhibición del extracto de *Ulva* frente a *Vibrios v.*



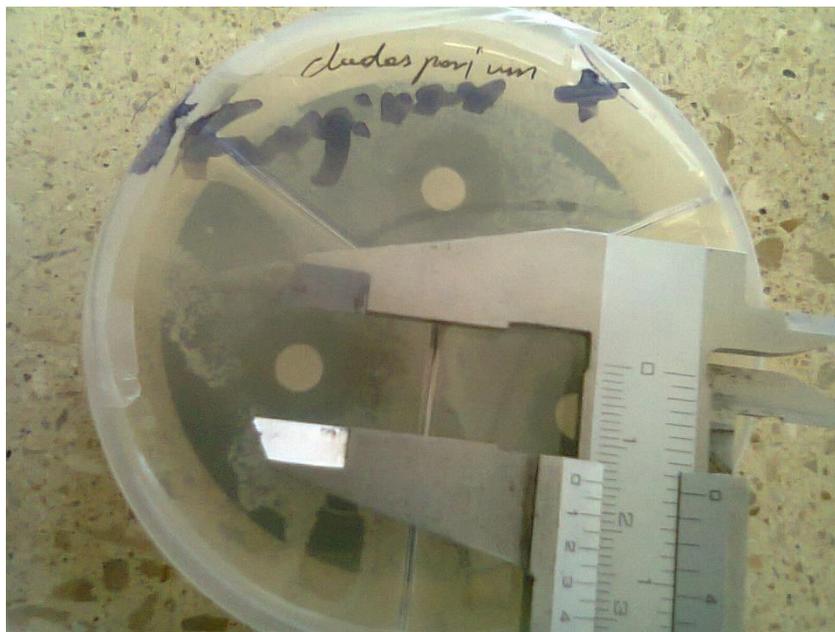
Anexo 19. Halo de inhibición del extracto de *Ulva* frente a *Vibrios a.*



Anexo 20. Halo de inhibición del extracto de *Padina* frente a *Vibrios v.*



Anexo 21. Halo de inhibición del extracto de *Padina* frente a *Vibrios a.*



Anexo 22. Halo de inhibición del antimicótico fungirex frente al *Cladosporium sp.*



Anexo 23. Halo de inhibición del extracto de *Ulva* frente al *Cladosporium sp*



Anexo 24. Halo de inhibición del extracto de *Padina sp.*