

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ACETONA-AGUA DE *Macrocystis pyrifera* (C. AGARDH 1820) EN BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA

Marlon Morales¹,
Paola Nunja¹,
Lina Burga¹,
Santiago Justo¹,
José Ávila²,
Alcides Guerra¹.

RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto acetona-agua de *Macrocystis pyrifera*. Se seleccionaron cuatro cepas de importancia clínica: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica* del Laboratorio de Microbiología. Los extractos fueron obtenidos de los filoides, esporófilo y del alga entera de una muestra seca de la especie; y, a su vez, de una muestra fresca. La prueba de sensibilidad se realizó mediante discos de difusión cargados con 30 µl de cada extracto; se utilizaron discos con 10 mg de Gentamicina como control. Ningún extracto presentó actividad antibacteriana en ninguna de las cepas evaluadas; por otro lado, todas las cepas se mostraron sensibles ante la acción de la Gentamicina. Se concluye que *Macrocystis pyrifera* no posee una actividad antimicrobiana ante las cepas de importancia clínica evaluadas.

Palabras Clave: *Macrocystis pyrifera*, discos de difusión, Gentamicina.

¹ Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma.

² Laboratorio de Biología Marina y Continental, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma
Correo electrónico: marlom1410@gmail.com

ABSTRACT

Antibacterial activity of the acetone-water extract of *Macrocystis pyrifera* was evaluated. Four strains of clinical importance were selected: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* from the Laboratory of Microbiology. The extracts were obtained from the leaves, sporophyte and the whole kelp from a dried sample; and from a fresh sample. The sensibility test was realized through discs of diffusion charged with 30 μ l of each extract; we used 10 mg for each disc of Gentamicin as a control. Neither the extracts present an antibacterial activity nor were the strains evaluated affected. In the other hand, Gentamicin was effective as a control inhibiting the development of all the bacteria. It is concluded that *Macrocystis pyrifera* doesn't have an antibacterial activity in the strains evaluated.

Key words: *Macrocystis pyrifera*, discs of diffusion, Gentamicin.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias se han adaptado a un sinfín de hábitats con diferentes mecanismos de sobrevivencia. Actualmente la resistencia bacteriana a antibióticos es un problema de gran importancia en el área clínica. A raíz de este fenómeno es que cada cierto tiempo se necesita sintetizar nuevos antibióticos para combatir a estos microorganismos.

Las algas marinas son consideradas una parte importante en los ambientes acuáticos, ya que cumplen un nicho ecológico fundamental equilibrando los niveles de oxígeno en el agua, por medio de fotosíntesis; participando en las redes tróficas; y produciendo metabolitos secundarios que poseen diferentes propiedades, entre ellas, la actividad antimicrobiana. Estos últimos, más específicamente denominados compuestos bioactivos, que, en su ambiente natural, les sirve de protección ante herbívoros marinos; disminución de epífitos y disminución de organismos patogénicos (Nagayama *et al.*, 2002; Wisespongpan y Kuniyoshi, 2003; Cardozo, *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008).

Macrocystis pyrifera es una macroalga de importancia económica a nivel mundial. Pertenece a la división de las Phaeophytas, conocidas como algas pardas, las cuales son conocidas por producir sustancias como diterpenos, florotaninos, fucoxantinas, acetogeninas, entre otros metabolitos. De estos, los florotaninos son los que han recibido mayor atención en los últimos 5 años por las diversas propiedades de interés biomédico que poseen. No obstante, los estudios relacionados a la actividad antibacteriana de extractos de algas pardas no abundan en la literatura científica, y menos aún en *Macrocystis pyrifera*.

Partiendo del concepto que ciertas algas producen sustancias bioactivas que impiden el crecimiento de organismos patógenos en su hábitat natural resulta interesante el uso de metabolitos obtenidos de dichos organismos como antibióticos alternativos. En este sentido, el presente trabajo busca evaluar la actividad antibacteriana de dos extractos obtenidos de diferentes partes anatómicas de *Macrocystis pyrifera* en bacterias patógenas de importancia clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron ejemplares juveniles flotantes de *Macrocystis pyrifera* (DMR < 20 cm) de la bahía de Pucusana (12°28'38"LS 76°47'53"LO) en los meses de enero y julio de 2014. Los ejemplares fueron transportados en bolsas negras sin agua de mar al Laboratorio de Biología Marina y Continental de la Universidad Ricardo Palma, donde se limpiaron de epífitos y sales con agua de caño. Previo a la extracción, las muestras (filoides, esporófilos y toda el alga) se secaron en una estufa a 60°C hasta obtener un peso constante. 1 g se maceró en oscuridad por 1 hora en 10 ml de acetona: agua (7:3) a temperatura ambiente con agitación cada 15 minutos. Se realizó un tratamiento más utilizando 10 g de alga fresca siguiendo el procedimiento antes mencionado. El extracto se filtró en papel filtro (Rundfilter 125 mm), luego se evaporó el solvente en estufa, se resuspendió en agua destilada y, finalmente, se filtró a 0.22 µm (Merck Millipore). Para relacionar la actividad antibacteriana con el contenido de polifenoles de los extractos, estos se cuantificaron usando el método de Folin-Ciocalteu usando como estándar floroglucinol. El contenido de fenoles totales (CFT) fueron expresados en mg equivalentes de floroglucinol/100 g de alga seca (mg PGE/100 g).

La actividad antimicrobiana se evaluó empleando la técnica del antibiograma por el método de discos de difusión en agar (INS, 2002). Se usaron discos de papel de filtro Whatman N° 42 y se cargaron asépticamente con 30 μ l del extracto algal. Se cargaron discos con 10 mg de Gentamicina que se usó como control y se dejó en absorción durante 2-3 horas.

Se usaron 4 cepas bacterianas aisladas de diferentes hospitales de Lima: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Pseudomonas aeruginosa*. Cada cepa fue reactivada en Caldo CASO; posteriormente, se procedió con la preparación del estándar para el inóculo. El inóculo se ajustó hasta una turbidez de 0.08 OD a 0.1 OD en 625 nm, usando cubetas esterilizadas con radiación U.V. Luego del ajuste del estándar las cepas fueron sembradas en placas con Agar Mueller-Hinton e incubadas a 37°C por 24 horas.

Los halos de inhibición obtenidos fueron medidos con vernier. La actividad antibacteriana se clasificó como Resistente (R), Sensible (S) e Intermedia (I) (Tabla 1). Este procedimiento se realizó con tres repeticiones para cada uno de los extractos.

RESULTADOS

El extracto realizado a partir de toda el alga fresca (AF) tuvo el mayor CTF, lo cual fue estadísticamente mayor en comparación al resto de extractos (Tabla 2).

De los extractos evaluados, ninguno presentó una actividad antimicrobiana. El control presentó un diámetro de inhibición esperado lo que permite validar la prueba, además según dicho diámetro, las cepas fueron clasificadas como sensibles a gentamicina (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La actividad antibacteriana de distintas algas pertenecientes al grupo de las Phaeophytas se ha evaluado constantemente en diferentes laboratorios alrededor del mundo. Las sustancias bioactivas de estas algas les permiten defenderse, en su medio natural, contra organismos microbianos y

epífitos; entre estas sustancias se encuentran los florotaninos, los cuales son los responsables de la alta actividad antibacteriana de varias algas pardas, tal como lo reportó (Jeong, L. 2014) en su trabajo con *Eisenia bicyclis*. La mayoría de algas pardas a las que se les atribuye actividad antibacteriana lo realizan mediante los florotaninos. En nuestro trabajo se usó *Macrocystis pyrifera*, la cual posee aproximadamente 34,4 mg/g de taninos en épocas de verano y 0.547 mg/g en épocas de invierno del total de polifenoles que existen en el alga lo cual influye en su capacidad antibacteriana (Castro-González M.1993).

Por otro lado, la acción de los solventes en los extractos de algas también influye de alguna manera en los resultados que se obtienen. Es así que la extracción acuosa de algas como *Sargassum wightii* y *Padina tetrastromatica* presentaron actividad antimicrobiana ante cepas patógenas tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y en cepas patógenas de peces como *Vibrio fischeri*, *Vibrio alginolithicus*. (Johnsi. G. 2011).

El método por discos de difusión es uno de los más usuales cuando se realiza un antibiograma y se encuentra actualmente estandarizado por el Instituto Nacional de Salud del Perú (2002), en la cual se recomienda el uso de antibióticos obligatorios según las cepas que se evalúan. Entre estos, la gentamicina, es uno de los antibióticos de uso oftálmico que se usan para todas las cepas que se evaluaron en este trabajo. Además se ha usado esta sustancia como control en cultivos de *Escherichia coli* a una concentración de 2 mg/ml, tal como se realiza en nuestro trabajo (Chávez Torres, L. 2008).

Los discos de difusión fueron cargados con 30 μ l del extracto algal y colocados en el medio de cultivo. En otros estudios, se usaron 20 μ l de extracto acuoso en los discos, los cuales presentaron un resultado positivo de actividad antimicrobiana ante cepas clínicas (Johnsi, G. 2011). Sin embargo, también existe el método de pocillos de 6 mm en el medio de cultivo, los cuales fueron cargados con 50 μ l del extracto algal, permitiendo también la obtención de resultados positivos (Magallanes, C. 2003). El uso de ambos métodos permite la difusión de los extractos.

Finalmente, varias especies emparentadas con *Macrocystis pyrifera* presentan una actividad antibacteriana tratadas con diferentes métodos de extracción y de antibiograma. No obstante, nuestra especie no presentó ningún resultado positivo durante la investigación, tal como un trabajo realizado en nuestro país donde trabajaron con extractos etanólicos de *M. pyrifera* evaluado mediante el método de pocillos, sin encontrar actividad antibacteriana en cepas clínicas y no clínicas. Estos resultados los atribuyeron a que posiblemente existe una concentración mínima de sustancias bioactivas en estas algas las cuales son solubilizadas en el ambiente acuático (Magallanes C. 2003).

CONCLUSIONES

El extracto acetona-agua de los filoides, esporófilos, y alga entera seca y fresca de *Macrocystis pyrifera* no posee actividad antibacteriana ante cepas de importancia clínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cardozo, K.; Guaratini, T.; Barros, M.; Falcão, V.; Tonon, A.; Lopes, N.; Campos, S.; Torres, M.; Souza, A.; Colepicolo, P. y Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. Comparative Biochemistry and Physiology. Parte C, 146: 60-78.
- Castro M, Carrillo S, Pérez F. 1994. Composición química de *Macrocystis pyrifera* (Sargazo Gigante) recolectada en verano e invierno y su posible empleo en la alimentación animal. Ciencias Marinas. 20 (1): 33-40.
- Dae L, Min K, Hye H, Sung E, Ji Y, Myung L, Won L, You J, Yae C, Young K. 2008. Synergistic effect between Dieckol from *Ecklonia stolonifera* and β -lactams against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biotechnology and Bioprocesses Engineering 13: 758-764.
- García, A; Gutiérrez, M; Acedo, E.; Burgos, A.; López, M.; Valdés, M.; y Burboa, M. 2013. Las algas y otros organismos marinos como fuente de moléculas bioactivas. Rev. Biotecnia. 15 (1): 25-32.

- Instituto Nacional de Salud del Perú. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de discos de difusión. Serie de Normas 30: 30-36.
- Jeong, L.; Sung, E.; Eun, L.; Yeoun, J.; Hyo, K.; Mi, J.; Kwang, S.; Hee, L.; Ji, K.; Myung, L.; y Young, K. 2014. *In vitro* antibacterial and synergistic effect of phlorotannins isolated from edible brown seaweed *Eiseniabicyclis* against acne-related bacteria. *Algae*. 29 (1): 47-55.
- Jhonsi, G.; Lipton, A.; Aishwarya, M.; Sakira, A. y Udayakumar, A. 2011. Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of India. *Seaweed Res. Utiln.* 33 (1-2): 67-75.
- Kayalvizhi, K.; Vasuki, S.; Anantharaman, P. y Kathiresan K. 2013. Antimicrobial activity of seaweeds from the gulf of Mannar. *Int. Journal of Pharm. App.* 3 (2): 306-314.
- Lara-Issasi G. 1991. Propiedades antibióticas de algunas algas marinas bentónicas. *Hidrobiológica*. 1 (2): 21-28.
- Lara-Issasi G, Álvarez J, Lozano C, Hernández N. 1999. Nuevas adiciones al conocimiento de la actividad antibiótica de macroalgas marinas mexicanas. *Hidrobiológica*. 9 (2): 159-169.
- Lee, D.; Kang, M.; Hwang, H.; Eom, S.; Yang, J.; Lee, M.; Lee, W.; Jeon, Y., Choi, J. y Kim, Y. 2008. Synergistic Effect between Dieckol from *Ecklonia stolonifera* y β -Lactams against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13: 758-764.
- Magallanes, C.; Córdova, C. y Orozco, R. 2003. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Rev. peru. biol.* 10 (2): 125-132.
- Manivannan, K.; Karthikai, G.; Anantharaman, P. y Balasubramanian, T. 2011. Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. *Asian Pac. Journal of Trop. Bio.* 10 (11): 114-120.

- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I. y Nakamura, T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 50: 889-893.
- Ríos, N.; Medina, G.; Jiménez, J.; Yáñez, C.; García, M.; Di, Bernardo, M. y Gualtieri M. 2009. Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos algales de algas marinas venezolanas. Rev. peru. biol. 16 (1): 97 -100.
- Seenivasan R, Rekha M, Indu H, Geetha S. 2012. Antibacterial activity and phytochemical analysis of selected seaweeds from Mandapam Coast, India. Journal of App. Pharm. Sci. 2 (10): 159-169.
- Srivastava, N.; Saurav, K.; Mohanasrinivasan, V.; Kannabiran, K. y Singh, M. 2010. Antibacterial potential of macroalgae collected from Madappam coast, India. Brit. Journal of Pharm. and Toxic. 1 (2): 72-76.
- Sung, E.; Min, K. y Young, K. 2008. Antibacterial activity of the Phaeophyta *Ecklonia stolonifera* on Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Fish. Sci. Tec. 11 (1): 1-6.
- Wispongpan P, Kuniyoshi M. 2003. Bioactive phloroglucinols from the brown alga *Zonariadiesingiana*. Journal of App. Phyc. 15: 225-228.
- Zbakh, H.; Chiheb, H.; Bouziane, H; Motilva, V. y Riadi, H. 2012. Antibacterial activity of benthic marine algae extracts from the Mediterranean coast of Morocco. J. of Mic.Biotec.and Food Sci. 2 (1): 219-228.

Tabla 1
Clasificación de la actividad antibacteriana con Gentamicina

Clasificación	Diámetro del halo de inhibición formado por Control
Resistente (R)	12mm \geq DHI
Intermedia (I)	12mm \leq DHI < 14mm
Sensible (S)	DHI \geq 15mm

*d: diámetro menor del halo de inhibición. D: diámetro mayor del halo de inhibición. DHI: diámetro de inhibición de la sustancia evaluar.

Tabla 2
Contenido Total de Fenoles (CTF) de los diferentes extractos evaluados.

Extracto	CTF (mg PGE/100 g alga seca)
AF	385.12 \pm 8.13 ^a
A	201.87 \pm 20.87 ^b
E	373.87 \pm 4.93 ^c
F	327.57 \pm 0.94 ^d

A: Extracto de alga entera seca. E: Extracto de los esporófilos de una muestra seca. F: Extracto de Filoides de una muestra seca. AF: Extracto de una alga fresca. Las letras indican diferencias altamente significativas ($p < 0.01$)

Tabla 3

Promedio del diámetro de los halos de inhibición formados en el ensayo con los extractos acetona-agua de *Macrocystis pyrifera*

Cepas Bacterianas	1° Repetición (mm)					2° Repetición (mm)					3° Repetición				
	C	A	E	F	AF	C	A	E	F	AF	C	A	E	F	AF
<i>S. aureus</i>	24,7	-	-	-	-	23.3	-	-	-	-	24.1	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	22	-	-	-	-	24.3	-	-	-	-	21.1	-	-	-	-
<i>S. enterica</i>	26	-	-	-	-	23.7	-	-	-	-	22.5	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	21	-	-	-	-	19.7	-	-	-	-	21	-	-	-	-

*C: Control (Gentamicina). A: Extracto de alga entera seca. E: Extracto de los esporófilos de una muestra seca. F: Extracto de Filoides de una muestra seca. AF: Extracto de una alga fresca.