

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P CIENCIAS BIOLÓGICAS

Potencial antibacteriano de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú

TESIS Para optar el título de: BIÓLOGO Con mención en MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

AUTOR

Claudio Alberto Magallanes Reyes

LIMA – PERÚ 2003

**A mis padres, Isabel y Alfredo, por apoyarme e
incentivarme en todos mis estudios y proyectos
a lo largo de mi vida.**

A mis tíos, Consuelo, Yolanda, Leonor, Jorge y
Alfonso por estimularme en mis estudios y estar
siempre a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento especial al MsSc. César Córdova C., por las enseñanzas y recomendaciones brindadas como asesor durante el trabajo de tesis.

A la Blga. Rita Orozco M. y demás miembros del Laboratorio de Microbiología del Instituto del Mar del Perú, por toda su ayuda durante mi permanencia en esta institución.

Al profesor Marco Guerrero A., de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por todo el apoyo brindado durante la realización de mi trabajo.

Al Dr. César Acleto O., por su colaboración en la identificación de las especies de macroalgas.

Al Dr. Juan Tarazona B., del laboratorio de Ecología Marina de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el apoyo prestado para la culminación del trabajo.

A la MsSc. Martha Valdivia C., del laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal; MsSc. Débora Alvarado I., del laboratorio de Microbiología Molecular y al Blgo. José Pino G., del laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por toda la ayuda proporcionada.

Un eterno agradecimiento a la Srta. Patricia Carbajal E., quien esta siempre presente con su apoyo y aliento, fortaleciéndome en cada momento.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	8
Objetivo General	8
Objetivos Específicos	8
ANTECEDENTES	9
MATERIAL Y MÉTODOS	15
Lugares de recolección	15
Cepas bacterianas de referencia	17
Estandarización del protocolo de extracción de sustancias bioactivas de macroalgas marinas	17
Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos algales	18
Cálculo y análisis estadístico de los datos	19
RESULTADOS	21
Estandarización del protocolo de extracción de sustancias bioactivas de macroalgas marinas	21
Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos algales	23
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	33
RECOMENDACIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Proceso de molienda de algas y extracción etanólica _____ 20
2. Distribución del potencial antibacteriano dentro de los grupos de macroalgas ensayados _____ 24
3. Halos de inhibición de extractos algales frente a las cepa *S. aureus* ATCC 6633 y cepas clínicas *E. faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 25923 _____ 24
4. Potencial antibacteriano de extractos algales frente a la cepa *S. aureus* ATCC 6633 _____ 26
5. Potencial antibacteriano de extractos algales frente a las cepas clínicas *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212 _____ 26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

I. Ubicación de las áreas de recolección del material algal _____	15
II. Listado de especies de macroalgas ensayadas, indicando su respectiva clasificación _____	16
III. Listado de cepas bacterianas que se enfrentaron a los extractos de macroalgas estudiadas _____	17
IV. Modificación del protocolo con la finalidad de lograr obtener una cantidad significativa de extracto con actividad biológica _____	21
V. Diámetro promedio de los halos de inhibición (mm) producidos por el extracto etanólico de <i>G. doryphora</i> con los 4 protocolos ensayados _____	22
VI. Análisis de varianza (ANOVA) para los valores de halo obtenidos con los extractos algales ensayados _____	23
VII. Distribución en ordenes y número de especies de macroalgas estudiadas con potencial antibacteriano _____	25

RESUMEN

El potencial antibacteriano de las algas se debe a su capacidad para sintetizar una gran variedad de compuestos químicos, entre los que podemos citar compuestos nitrogenados y diterpenos en las algas verdes, terpenos halogenados en las algas rojas y metabolitos mixtos de origen terpeno-aromático en las algas pardas.

La obtención de las sustancias bioactivas de las algas se realizó con el protocolo de extracción según Vlachos *et al.*, 1996; y, para determinar su potencial antibacteriano, se utilizó la técnica de difusión en agar.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten caracterizar a *Grateloupia doryphora*, *Ahnfeltiopsis durvillaei*, *Prionitis decipiens* (Rhodophyta), *Petalonia fascia* (Phaeophyta) y *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta) como macroalgas marinas peruanas productoras de sustancias

bioactivas con potencial antibacteriano y se confirma además que esta propiedad esta distribuida entre los tres grupos de macroalgas.

Solamente las bacterias grampositivas reportaron susceptibilidad a los extractos algales ensayados. La cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6633 y las cepas clínicas *S. aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fueron sensibles.

B. plumosa (Chlorophyta) presenta el mayor potencial antibacteriano contra ambas cepas de *S. aureus*, y *P. fascia* (Phaeophyta) produce metabolitos secundarios con el mayor espectro antibacteriano.

ABSTRACT

Antibacterial potential of algae is due to their ability to synthesize great variety of chemical compounds, between these we can mention nitrogenated and diterpens compounds in green algae, halogenated terpens in red algae and complex metabolites originated of aromatic-terpens in brown algae.

To obtain bioactive substances of seaweeds employed Vlachos's protocol (1996); and to determine their antibacterial potential used diffusion agar technique.

Results obtained in this study permit to characterize *Grateloupia doryphora*, *Ahnfeltiopsis durvillaei*, *Prionitis decipiens* (Rhodophyta), *Petalonia fascia* (Phaeophyta) and *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta) as peruvian seaweeds producer of bioactive substances with antibacterial

potential and confirm that this activity is distributed between all macroalgal groups.

Only Gram positive bacteria reported susceptibility in algal extracts assay. *Staphylococcus aureus* ATCC 6633 and clinic strains *S. aureus* ATCC 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 showed sensibility.

B. plumosa (Chlorophyta) showed the most antibacterial potential to both *S. aureus* strains, and *Petalonia fascia* (Phaeophyta) produced secondary metabolites with the highest antibacterial spectrum.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la biodiversidad marina como fuente de productos biológicos activos y como modelo para la producción de nuevas drogas, ha derivado en un amplio número de revisiones, muchas de las cuales consideran a las algas como uno de los principales grupos productores de estos compuestos. En este sentido, destacan los trabajos realizados por Bhakuni & Silva (1974); Faulkner (1984); Stein & Borden (1984); Glombitza & Koch (1989); Hay (1996) y González & Silva (2001).

Entre los principales grupos de compuestos bioactivos producidos por las algas marinas se encuentra una amplia gama de metabolitos secundarios, cada uno con una función específica dentro de su medio, aunque principalmente se les atribuye importancia en la defensa química contra herbívoros (Hay *et al.*, 1987a; 1987b; Paul *et al.*, 1987; Pereira *et al.*, 1994).

Alternativamente, algunos de estos metabolitos producen la disminución de la cantidad de epífitos e inhiben organismos competidores o patógenos microbianos, entre otras funciones (Hay, 1996; Vlachos *et al.*, 1997).

Estudios realizados en diferentes partes del mundo confirman que los exudados de algunas especies de Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta presentan actividad antimicrobiana, siendo los dos últimos grupos los que presentan mayor número de especies bioactivas (Caccamese *et al.*, 1980; Rao & Parekh, 1981; Vlachos *et al.*, 1996; 1997). También ha cobrado gran importancia el potencial antiviral de algunas algas. Sin embargo, hasta la fecha no se han logrado identificar con precisión las sustancias que les confieren esta propiedad, aunque la mayoría de trabajos la atribuyen principalmente a los polisacáridos sulfatados de la pared celular de algunas algas rojas (Neushul, 1990; Bourgougnon *et al.*, 1993; Cáceres *et al.*, 2000).

En el Perú, son pocos los estudios realizados sobre la actividad biológica de macroalgas marinas. Al respecto, podemos citar a Balta (1988), quien trabajó con extractos crudos de dos macroalgas marinas peruanas, *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) y *Polysiphonia paniculata* (Rhodophyta), encontrando capacidad antibacteriana en ambas especies.

El potencial antibacteriano de las algas se debe a su capacidad para sintetizar una gran variedad de compuestos químicos, únicos del ambiente marino, entre los que podemos citar compuestos nitrogenados y diterpenos en las algas verdes, terpenos halogenados en las algas rojas y metabolitos mixtos

de origen terpeno-aromático en las algas pardas (Bhakuni & Silva, 1974; Fenical, 1975; Vlachos *et al.*, 1997; Carvalho & Roque, 2000).

Las macroalgas marinas producen una gran variedad de sustancias bioactivas encargados de cumplir funciones específicas dentro de su hábitat. Numerosas investigaciones han demostrado que muchos de estos compuestos también poseen capacidad antibacteriana, antimicótica y/o antiviral lo cual abre un camino hacia la búsqueda de nuevos productos naturales con potencial farmacéutico que podrían, en el futuro, reemplazar a los antibióticos convencionales. Por esta razón, es necesaria la realización de estudios que rastreen compuestos con potencial bioactivo en macroalgas, permitiendo obtener un registro de especies peruanas promisorias dentro de este campo.

Las macroalgas son una fuente potencial de sustancias bioactivas, compuestos involucrados en la estabilidad ecológica del ecosistema marino. En el futuro, dichos compuestos podrían emplearse en el control de enfermedades, tanto en acuicultura como en patología humana y animal. El empleo de las algas dentro de este campo se ve favorecido por su comprobada inocuidad, debido a su difundido uso en alimentación humana y animal, su aplicación en medicina y en la industria de ficocoloides (agar, carragenano y ácido algínico).

En la actualidad, la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas, tanto en patología humana como animal, se realiza principalmente empleando antibióticos convencionales, obviando los riesgos que estos pueden generar para la vida y el medio ambiente. Por esta razón, los

productos naturales bioactivos son una excelente alternativa en los ensayos de prevención de infecciones microbianas. Esto convierte a las algas marinas en una fuente promisoría de nuevas sustancias bioactivas con potencial farmacéutico y agroquímico.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Detectar la presencia de sustancias bioactivas con potencial antibacteriano en 12 especies de macroalgas marinas de la costa central del Perú.

Objetivos Específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción etanólica de sustancias bioactivas de macroalgas.
- Evaluar el potencial antibacteriano de extractos de macroalgas marinas peruanas frente a cepas bacterianas patrón.

ANTECEDENTES

Los organismos marinos están sujetos a una serie de presiones adaptativas a causa de las diversas interacciones que se presentan en su medio. Algunos han logrado sobrellevar muchas de estas barreras biológicas gracias a su capacidad de producir compuestos únicos, involucrados con la estabilidad ecológica de su medio (Hay & Fenical, 1996; Cronin, 2001). Dentro de la amplia diversidad de organismos marinos, las algas ocupan un lugar importante; además, son consideradas productoras potenciales de compuestos biológicamente activos, destacando principalmente sus metabolitos secundarios (Glombitza & Koch, 1989; González & Silva, 2001).

Inicialmente el estudio de los metabolitos secundarios de algas se orientó principalmente hacia su efecto disuasivo contra herbívoros (Hay, 1996), por ser ésta la característica de mayor notoriedad en el medio natural.

De acuerdo con Paul *et al.* (1987) y Pereira *et al.* (1994), esta actividad es más evidente en especies de regiones tropicales que soportan mayor presión de pastoreo. En este sentido, las algas pardas (Phaeophyta) y, más específicamente, aquéllas pertenecientes al orden Dictyotales, son una gran fuente de metabolitos terpénicos. Dentro de este tipo de compuestos químicos están los diterpenos, entre los que destacan el pachidictiol-A, dictiol-B, dictiol-E y dictiol-H, todos con actividad disuasiva sobre diferentes herbívoros (Hay *et al.*, 1987a). Cabe mencionar que esta actividad no es exclusiva de las algas pardas, sino que se encuentra ampliamente distribuida en todos los grupos algales. Así por ejemplo, podemos citar algunos sesquiterpenos y diterpenos bromados producidos por las algas rojas, entre los que tenemos al laurencin, laurinterol, paciferol (sesquiterpenos), concinndiol e irieol A (diterpenos), encontrados en varias especies del género *Laurencia* (Bhakuni & Silva, 1974; Fenical, 1975, Faulkner, 1984). Entre las algas verdes tenemos el caso del género *Caulerpa*, que produce caulerpina y caulerpicina, ambos anillos heterocíclicos nitrogenados de comprobada actividad biológica (Bhakuni & Silva, 1974).

A partir del año 1950, se abordaron con mayor interés los estudios orientados a rastrear compuestos bioactivos de algas, estandarizándose una serie de ensayos para probar y caracterizar la capacidad bioactiva de sus metabolitos. Entre las principales pruebas se encuentran los ensayos de actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, entre otras (Glombitza & Koch, 1989).

Una de las propiedades bioactivas más ensayadas es la referida a la actividad antibacteriana, debido a la importancia de la terapia antibiótica y a la disponibilidad de métodos de ensayo sencillos. La actividad antibacteriana de extractos de algas ha sido confirmada por Hornsey & Hide (1974); Caccamese *et al.* (1980); Rao & Parekh (1981); Vlachos *et al.* (1996), Devi *et al.* (1997), entre otros. Los ensayos sobre su capacidad antimicrobiana permitieron llegar a la conclusión de que las algas son una fuente potencial de metabolitos con gran actividad antagónica, sumamente útiles por su posible uso como antibióticos para la eliminación de bacterias, hongos y virus (Bhakuni & Silva, 1974; Stein & Borden, 1984; Glombitza & Koch, 1989; González & Silva, 2001).

En lo que respecta a su actividad antiviral, hasta la fecha no se han logrado identificar con precisión las sustancias que le confieren esta propiedad. Sin embargo, Ehresmann *et al.* (1977), trabajando con los órdenes Cryptonemiales y Ceramiales (Rhodophyta), encontró que la mayoría de especies con actividad antiviral pertenecen a la Familia Dumontiaceae (Cryptonemiales). Estudios posteriores han evidenciado que los polisacáridos aislados de algunas algas rojas presentan inhibidores selectivos contra algunos virus encapsulados, incluyendo patógenos humanos tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus *Herpes simplex* (HSV), citomegalovirus, entre otros (Neushul, 1990; Bourgougnon *et al.*, 1993; Cáceres *et al.*, 2000).

Tradicionalmente, las preparaciones crudas y los extractos de algunas algas se han utilizado por sus propiedades medicinales (Stein & Borden, 1984). Sin embargo, la naturaleza de sus principios activos y su mecanismo de acción sólo se conocen superficialmente.

Hornsey & Hide (1974) comprobaron que el efecto antibacteriano de algunas especies de macroalgas se debe única y exclusivamente a los exudados que éstas liberaban sobre el medio de cultivo. Concluyen, además, que esta capacidad está ampliamente distribuida entre las Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta. Sin embargo, al analizar diferentes especies de un mismo orden, determinaron que especies relativamente cercanas entre sí podían o no presentar sustancias antimicrobianas; ejemplos de ello los constituyen *Chondrus crispus* (activa) y *Gigartina stellata* (no activa), y *Laminaria digitata* (activa) y *Laminaria hyperborea* (no activa). Esto demuestra que existe una alta variación en la producción de estos compuestos dentro de los diferentes grupos algales.

Rao & Parekh (1981) sostienen que dentro de las Phaeophyta, son las Fucales y Dictyotales las que presentan un mayor número de especies con actividad antimicrobiana. En las Rhodophyta, el orden Ceramiales es el de mayor número de especies activas; mientras que el número de especies activas en las Cryptonemiales y Gigartinales es pequeño.

En lo que se refiere al espectro antibacteriano de los extractos de algas, Vlachos *et al.* (1997) sostienen que las algas pardas son las más activas, seguidas de las algas rojas y verdes. Esto concuerda con lo reportado por

Caccamese & Azzolina (1979) y Pesando & Caram (1984) para estudios de algas del Mediterráneo. También se ha determinado que los extractos de algas rojas inhiben a la mayoría de las bacterias grampositivas, pero tienen poca actividad contra bacterias gramnegativas, levaduras y hongos; mientras que los extractos de la mayoría de las algas verdes sólo muestran actividad contra algunas bacterias grampositivas (Caccamese & Azzolina, 1979; Pesando & Caram, 1984).

Balta (1988) cita dos especies peruanas con potencial antibacteriano, *E. intestinales* (Chlorophyta) y *P. paniculata* (Rhodophyta), siendo esta actividad mayor en la primera especie.

En cuanto a la variación estacional en la producción de estas sustancias antimicrobianas, cabe destacar los trabajos realizados por Chester & Stott (1956), quienes sostienen que cada especie puede tener un periodo de máxima actividad antimicrobiana y un periodo de ausencia de actividad durante el año. Por su parte, Baslow (1969) y Hornsey & Hide (1976a) manifiestan que, cuantitativamente, existe una marcada variación estacional de la actividad antibiótica en algas, siendo generalmente mayor en su época de mayor crecimiento y proliferación.

Trabajos realizados sobre distribución de sustancias bioactivas dentro del talo algal, sostienen que son las regiones con crecimiento activo las que presentan una mayor concentración. Roos (1957) menciona que los tejidos jóvenes presentan mayor actividad antibiótica. Por su parte, Conover & Sieburth (1964) demostraron que los ápices de *Sargassum natans* son los

únicos libres de epibiontes debido, posiblemente, a la mayor concentración de sustancias bioactivas. Hornsey & Hide (1976b) indican que existen varios patrones de distribución de la actividad antimicrobiana dentro del talo algal, la cual puede ser agrupada principalmente en tres patrones: máxima actividad concentrada en tejidos jóvenes (regiones de crecimiento activo), actividad uniformemente distribuida en todo el talo, y máxima actividad en las regiones de mayor edad.

De acuerdo con Hornsey & Hide (1976a) la elevada actividad metabólica de los tejidos jóvenes no tiene relación con su mayor concentración de sustancias antibióticas. Al realizar ensayos con extractos mensuales de algas, demostraron que *Chondrus crispus* presenta su máxima actividad en invierno, cuando el metabolismo probablemente es mínimo; mientras que en *Dilsea carnosa*, la máxima actividad se observa en los extractos de primavera, y en *Laminaria digitata* la distribución es incierta. Los diferentes patrones de distribución antes citados sugieren que posiblemente numerosos compuestos estén involucrados con su acción antibiótica.

En las macroalgas, el número de especies estudiadas alcanza alrededor de un 2% y los compuestos químicos caracterizados están entre mil y dos mil, pero sólo de algunos se ha podido establecer claramente su mecanismo de acción. De esto se deduce el gran potencial que queda por explorar en la diversidad de moléculas de las macroalgas (González & Silva, 2001).

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugares de recolección

El material algal empleado en el presente estudio se recolectó durante las horas de baja marea de la zona intermareal de seis playas de la costa central: playa Atenas, Laguna Grande, Pucusana, San Francisco, playa Hermosa y Los Yuyos (Tabla I).

Tabla I. Ubicación de las áreas de recolección del material algal.

LUGARES DE RECOLECCIÓN	UBICACIÓN	LOCALIDAD
Playa Atenas	Bahía de Paracas	Pisco
Playa Laguna Grande	Bahía Independencia	Pisco
Playa Pucusana	Bahía de Pucusana	Lima
Playa San Francisco	Bahía de Ancón	Lima
Playa Hermosa	Bahía de Ancón	Lima
Playa Los Yuyos	Chorrillos	Lima

Recolección y procesamiento del material biológico

Se recolectaron manualmente plantas completas, incluyendo disco de fijación, de 12 especies de macroalgas marinas representativas de las Rhodophyta, Phaeophyta y Chlorophyta (Tabla II).

Tabla II. Listado de especies de macroalgas ensayadas, indicando su respectiva clasificación.

DIVISIÓN	ORDEN	ESPECIE
Rhodophyta	Rhodymeniales	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> (Bory) Montagne
	Cryptonemiales	<i>Grateloupia doryphora</i> (Montagne) Howe
	Cryptonemiales	<i>Prionitis decipiens</i> Taylor
	Cryptonemiales	<i>Cryptopleura</i> sp.(Sonder) Howe
	Gigartinales	<i>Ahnfeltiopsis durvillaei</i> (Bory) Silva y deCrew
	Gracilariales	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> (Weber van Bosse) Dawson, Acleto y Foldvik
	Bangiales	<i>Porphyra columbina</i> Montagne
Phaeophyta	Scytosiphonales	<i>Petalonia fascia</i> (Muller) Kuntze
	Desmarestiales	<i>Desmarestia</i> sp. (Turner) Lamouroux
	Laminariales	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) C. Agardh
Chlorophyta	Bryopsidales	<i>Bryopsis plumosa</i> (Hudson) C. Agardh
	Ulvales	<i>Ulva nematoidea</i> Bory

La recolección se realizó durante el periodo comprendido entre agosto y octubre del 2001 y en marzo del 2002. El material algal recién extraído se transportó fresco al laboratorio, donde cada muestra se sometió a una limpieza mecánica para eliminar arena, epífitos, etc.; se lavó con agua corriente y enjuagó con agua destilada. Finalmente, las algas se secaron durante 24 horas bajo luz artificial a 24 °C y luego durante 24 horas en una estufa a 40 °C. En todos los casos, los extractos se prepararon utilizando una mezcla de fases del alga.

Cepas bacterianas de referencia

En el presente estudio se trabajó con 11 cepas bacterianas patrón (Tabla III), 6 cepas no clínicas proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Instituto del Mar del Perú y 5 cepas de origen clínico proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Tabla III. Listado de cepas bacterianas que se enfrentaron a los extractos de macroalgas estudiadas.

	CEPAS NO CLÍNICAS	CEPAS CLÍNICAS
GRAM POSITIVAS	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6633	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
GRAM NEGATIVAS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 <i>Aeromonas sobria</i> P-281 <i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17803	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Salmonella paratyphi</i> A CDC 1

Estandarización de la extracción etanólica de sustancias bioactivas de macroalgas marinas

Las algas secas se sometieron a una premoilienda en un molinillo eléctrico (Moulinex Luxe 843); luego se molieron con un pilón en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Cada muestra se almacenó a -25 °C hasta el momento de su empleo. El proceso de extracción se realizó según Vlachos *et al.*, 1996. Se mezclaron 10 g de polvo de alga y 20 ml de etanol al 80%, esta mezcla se calentó a 80 °C en una manta eléctrica durante 4 horas, luego se filtró en papel Whatman # 1 y el volumen de extracto recuperado se enrasó a 5 ml adicionando más etanol al 80 % (Fig. 1).

Para estandarizar el método experimental de extracción se ensayaron 4 metodologías: el protocolo I según Vlachos *et al.* (1996), y tres variantes de éste. En los nuevos protocolos, sólo se modificó la cantidad y los tiempos de adición de etanol. En el protocolo II se adicionaron 10 ml de etanol al 80% dos horas después de iniciado el proceso; en el III, 5 ml cada hora, y en el protocolo IV se agregaron 5 ml una hora antes de culminar el proceso.

El ensayo experimental para la estandarización del protocolo se realizó con *G. doryphora* y *S. aureus* ATCC 6633 (cepa control).

Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos algales

La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos se evaluó empleando la técnica de difusión en agar. Con un sacabocados estéril se hicieron pocillos de 6 mm de diámetro en placas con 10 ml de medio TSA (agar tripticasa de soya). En cada pocillo se adicionaron 50 µl del extracto, además se utilizó un pocillo con etanol 80% como control en cada ensayo. Luego se agregó una segunda capa de TSA licuado (5 ml), previamente inoculado con la cepa patrón (0,1 ml de caldo TSB de 24 horas). Esta segunda capa se suplementó con 1% (p/v) de NaCl para las especies de *Aeromonas* y *Vibrio*. Las placas se dejaron por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la difusión del extracto. Finalmente, las placas se incubaron a 30 °C (especies de *Vibrio*) y a 37 °C (otras cepas) por 24 horas.

Las pruebas se realizaron por triplicado para cada cepa y extracto ensayado. La presencia de un halo de inhibición definido alrededor del extracto indicó actividad antibiótica positiva.

La lectura de las placas se realizó después de 24 horas. Para cuantificar el potencial antibacteriano de cada extracto, los halos de inhibición se midieron en tres diámetros, empleando un vernier, por la cara inferior de la placa. Los valores obtenidos se promediaron y se halló el diámetro medio que corresponde al índice de actividad de los extractos. Si los controles producen halo de inhibición, el tamaño de éste se resta al diámetro promedio obtenido por los extractos algales ensayados.

Cálculo y análisis estadístico de los datos

El índice de actividad antibacteriana se determinó promediando los tres valores de diámetro obtenidos de cada placa y las tres réplicas realizadas por cada cepa bacteriana y extracto de alga.

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó para los protocolos con actividad positiva, con los datos totales de diámetro. Con estos datos se realizó el ANOVA y la significancia se reportó con un nivel de confianza del 95%.



Fig. 1. Proceso de molienda de algas y extracción etanólica. a) Equipo para molienda (tanque de nitrógeno líquido y mortero de porcelana). Adición de nitrógeno líquido sobre el alga trozada. b) Molienda del alga hasta obtener un polvo fino. c) Pesado de 10 g de polvo de alga para preparar el extracto. d) La extracción en caliente se realizó en una manta eléctrica a 80 °C. e) El extracto se filtró en papel Whatman # 1 para eliminar restos de alga.

RESULTADOS

Estandarización del protocolo de extracción de sustancias bioactivas de macroalgas

Previo al rastreo de las sustancias bioactivas de macroalgas marinas se modificó el protocolo de extracción recomendado por Vlachos *et al.* (1996) para los ensayos de actividad antibacteriana de macroalgas. Las adaptaciones realizadas en el protocolo se resumen en la Tabla IV.

Tabla IV. Modificación del protocolo con la finalidad de lograr obtener una cantidad significativa de extracto con actividad biológica.

#	ENSAYOS	RESULTADO
I	Protocolo original	Muy poco volumen de extracto (0,5 ml), con actividad antibacteriana positiva
II	Adición de 10 ml de etanol dos horas después de iniciada la extracción	Se obtuvo mayor volumen de extracto (2 ml), pero sin evidencia de actividad antibacteriana
III	Adición de 5 ml de etanol cada hora	El volumen de extracto fue mayor (3 ml), pero no se reportó efecto positivo
IV	Agitación constante del recipiente con el extracto y adición de 5 ml de etanol al 80% una hora antes de terminado el proceso	Se recuperó un volumen adecuado de extracto (5 ml), se reportó actividad antibacteriana positiva

Debido a los resultados presentados en la Tabla IV, se comparó el potencial antibacteriano de los extractos I y IV. El diámetro promedio de los halos de inhibición obtenidos con el extracto etanólico de *G. doryphora* frente a la cepa patrón *S. aureus* ATCC 6633 en ambos protocolos, original y modificado, fue de 7,9 mm como se muestra en la Tabla V.

Tabla V. Diámetro promedio de los halos de inhibición (mm) producidos por el extracto etanólico de *G. doryphora* con los 4 protocolos ensayados.

Protocolos Medidas	I	II	III	IV
1	8,0	*	*	7,7
2	8,0	*	*	8,0
3	8,1	*	*	8,0
4	7,5	*	*	8,5
5	7,6	*	*	7,8
6	8,0	*	*	7,5
7	8,0	*	*	8,0
8	8,2	*	*	7,5
9	7,4	*	*	8,0
Promedio	7,9			7,9

* Extractos sin actividad

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se determinó que no existen diferencias significativas entre ambos (Tabla VI). Basándose en estos resultados se optó por utilizar el protocolo modificado (IV) de Vlachos *et al.* (1996), por permitir recuperar una cantidad de extracto adecuada para las pruebas de antibiosis.

Tabla VI. Análisis de varianza (ANOVA) para los valores de halo obtenidos con los extractos algales ensayados.

PROTOCOLOS	df	F	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
Entre protocolos	1	0,05	0,82
Total	17		

Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos algales

El rastreo de metabolitos secundarios con capacidad antibacteriana se realizó por extracción etanólica. La distribución del potencial antibacteriano dentro de cada grupo reveló porcentajes iguales (50%) entre las especies activas y no activas ensayadas (Fig. 2). En todos los casos en que se reportó actividad antibacteriana, se trató únicamente de bacterias grampositivas (Fig. 3).

La única cepa no clínica susceptible a los extractos de las especies bioactivas fue *S. aureus* ATCC 6633 (Fig. 4), mientras que las cepas clínicas que reportaron sensibilidad son *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212 (Fig. 5).

En lo referente a la distribución de la actividad antibacteriana, se encontró que la producción de sustancias bioactivas era cubierta por los tres grupos de macroalgas (Tabla VII). En las Rhodophyta, son *G. doryphora*, *P. decipiens* (Cryptonemiales) y *A. durvellaei* (Gigartinales) las especies con potencial antibacteriano. En las Phaeophyta, se registró actividad en el alga

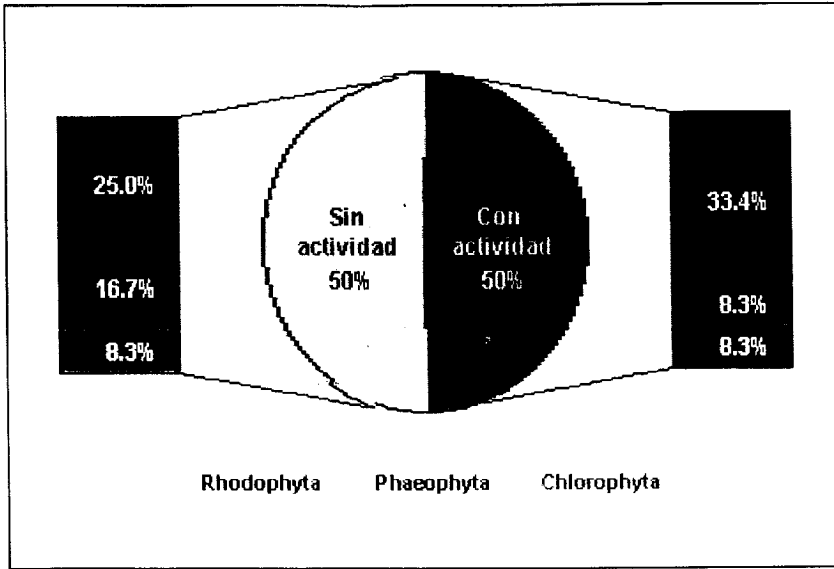


Fig. 2. Distribución del potencial antibacteriano dentro de los grupos de macroalgas ensayados en el estudio.

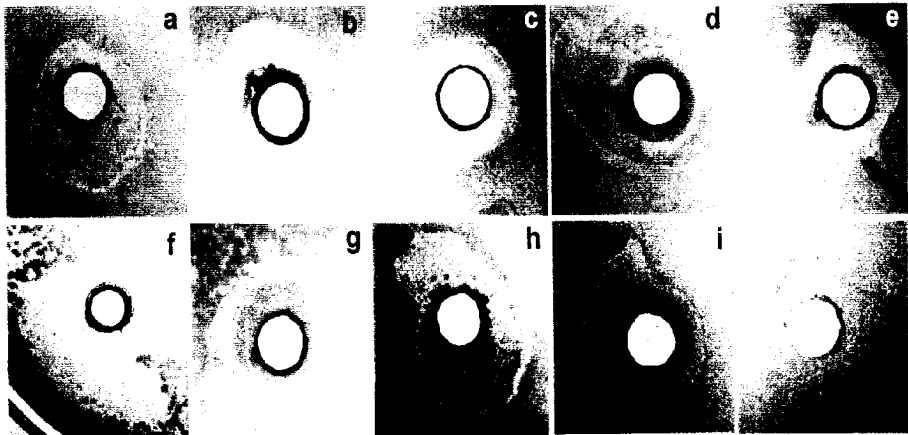


Fig. 3. Halos de inhibición de extractos algales frente a las cepas ambiental *S. aureus* ATCC 6633 (a-e), y clínicas *E. faecalis* ATCC 29212 (f, g) y *S. aureus* ATCC 25923 (h, i). a, h: *B. plumosa*; b: *P. decipiens*; c: *A. durvillae*; d, g, i: *P. fascia*; e, f: *G. doryphora*; j: etanol 80 % (control). Diámetro de pocillos 6 mm.

P. fascia (Scytosiphonales); y en las Chlorophyta en *B. plumosa* (Briopsidales).

Tabla VII. Distribución en órdenes y número de especies de macroalgas estudiadas con potencial antibacteriano.

DIVISIÓN	ORDEN	NÚMERO DE ESPECIES	ESPECIES BIOACTIVAS
Rhodophyta	Rhodymeniales	1	0
	Cryptonemiales	3	2
	Gigartinales	1	1
	Gracilariales	1	0
	Bangiiales	1	0
Phaeophyta	Scytosiphonales	1	1
	Desmarestiales	1	0
	Laminariales	1	0
Chlorophyta	Bryopsidales	1	1
	Ulviales	1	0
Total		12	5

En el caso de la cepa *S. aureus* ATCC 6633, las especies *P. fascia* (Phaeophyta) y *B. plumosa* (Chlorophyta) presentaron los mayores halos de inhibición, con 13,8 mm y 13,9 mm de diámetro promedio, respectivamente. Entre las Rhodophyta se encontraron tres especies con potencial antibacteriano contra esta cepa, *G. doryphora*, *A. durvillaei* y *P. decipiens*, con halos de inhibición de 8,2 mm, 12,5 mm y 12,1 mm, respectivamente (Fig. 4).

La cepa *S. aureus* ATCC 25923 fue inhibida por el extracto etanólico de *P. fascia* (Phaeophyta) y *B. plumosa* (Chlorophyta) con halos de 13,3 mm y 17,1 mm, respectivamente. Los extractos de *G. doryphora* y *P. fascia* también inhibieron el crecimiento de *E. faecalis* ATCC 29212 con halos de 15.7 mm y 11.7 mm respectivamente (Fig. 5).

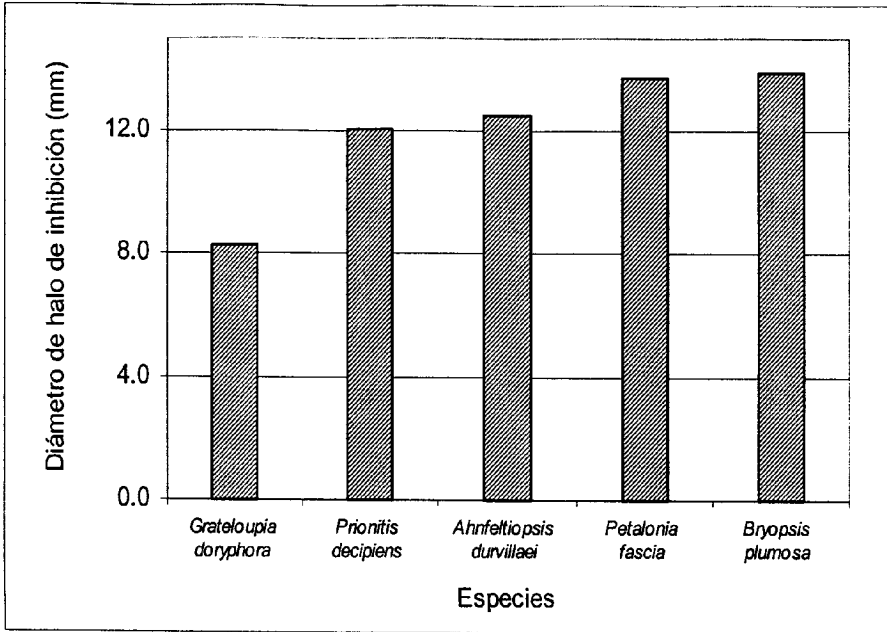


Fig. 4. Potencial antibacteriano de extractos algales frente a la cepa *S. aureus* ATCC 6633

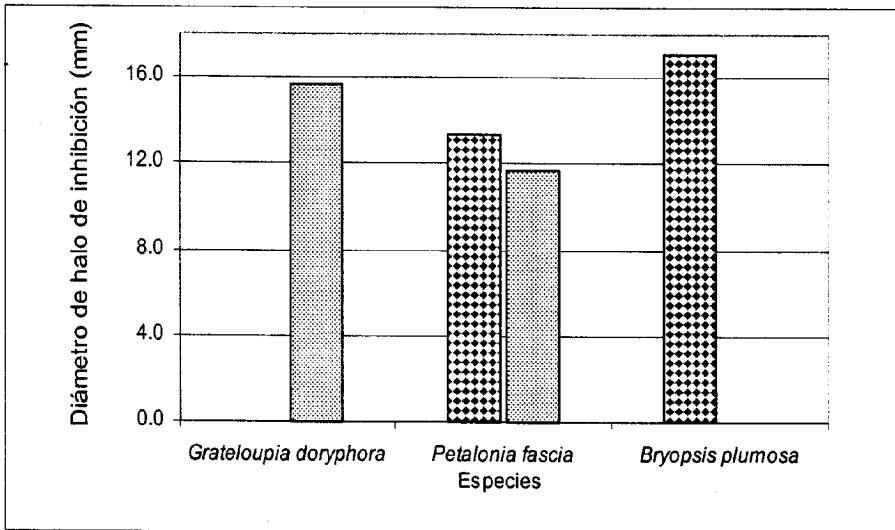


Fig. 5. Potencial antibacteriano de extractos algales frente a las cepas clínicas *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212

Los resultados reportados en el presente estudio permiten concluir que la bacteria grampositiva *S. aureus* ATCC 6633, es la cepa más sensible a los extractos etanólicos de macroalgas marinas, siendo *B. plumosa* (Chlorophyta) la especie que presentó el mayor potencial antibacteriano contra dicha cepa. Además, *P. fasciata* (Phaeophyta) es la macroalga que produce sustancias bioactivas con un mayor espectro antibacteriano.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo es evaluar y comparar la capacidad de diferentes macroalgas de la costa central del Perú para producir compuestos bioactivos de interés como agentes para la prevención de infecciones bacterianas en cultivos marinos y en humanos. La producción de compuestos antimicrobianos es considerada como un indicador de la capacidad de las algas para sintetizar metabolitos secundarios bioactivos (González *et al.*, 2001).

Las doce especies de macroalgas marinas seleccionadas para el presente estudio pertenecen a los mismos géneros de especies en los que previamente se ha reportado actividad antibacteriana (Hornsey & Hide, 1974; Caccamese *et al.*, 1980; 1985; Vlachos *et al.*, 1997; Carvalho & Roque, 2000; González *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten caracterizar a *G. doryphora*, *A. durvillaei*, *P. decipiens*

(Rhodophyta), *P. fasciata* (Phaeophyta) y *B. plumosa* (Chlorophyta) como especies de macroalgas marinas peruanas productoras de sustancias bioactivas con efecto antibacteriano. Las especies reportadas en el presente estudio se suman a las previamente registradas por Balta (1988), *E. intestinales* y *P. paniculata*, como algas promisorias por su potencial bioactivo.

Las cepas bacterianas enfrentadas contra los diferentes extractos algales han sido usadas en diversos estudios sobre capacidad antibacteriana de metabolitos secundarios de macroalgas. *S. aureus* es una bacteria grampositiva reportada previamente como una cepa susceptible a extractos algales (Hornsey & Hide, 1974, 1976a, 1976b; Rao & Parekh, 1981; Balta, 1988; Vlachos *et al.*, 1996, 1997, 2001).

La extracción alcohólica en caliente es uno de los métodos que ofrece mayores ventajas en la extracción de sustancias bioactivas con potencial antibacteriano de macroalgas marinas. Por esta razón, se utilizó etanol como solvente, pues además ofrece la ventaja de poseer baja volatilidad, tal como lo indican estudios previos (Rao & Parekh, 1981; Vlachos *et al.*, 1996, 1997; González *et al.*, 2001).

Para evaluar la capacidad antibacteriana de los extractos etanólicos se utilizó la técnica de difusión en agar, adicionando el extracto en pocillos realizados en el agar. Este método concentra una mayor cantidad de extracto, facilitando la evaluación de su potencial antibacteriano (Vlachos *et al.*, 1996, 1997).

La alta frecuencia de actividad antibacteriana contra bacterias grampositivas es reportada en la mayoría de investigaciones realizadas con extractos crudos de algas marinas (Rao & Parekh, 1981; Caccamese *et al.*, 1985; Vlachos *et al.*, 1996, 1997; González *et al.*, 2001). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde las bacterias grampositivas *S. aureus* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212 fueron susceptibles a los extractos etanólicos.

En el presente estudio, se registró un mayor número de especies de algas rojas con potencial antibacteriano, *A. durvillaei*, *P. decipiens* y *G. doryphora*, siendo esta última la que presentó el mayor espectro de actividad dentro de este grupo. Otros estudios con especies afines han obtenido diversos resultados. Así, por ejemplo, el extracto de *Grateloupia proteus* demostró tener actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (Caccamese *et al.*, 1980), mientras que *G. filicina* no mostró efecto inhibitorio contra ninguna de las bacterias grampositivas y negativas ensayadas (Vlachos *et al.*, 1997). A diferencia de lo reportado en el presente estudio, González *et al.*, 2001 encontraron que *G. doryphora* no presentaba actividad antibacteriana contra *S. aureus* ni contra *B. subtilis*. Otro caso similar es el de *Prionitis*, que en el presente estudio registró actividad antibacteriana, mientras que Vlachos *et al.* (1997), reportaron que la especie *P. nodifera* no tenía capacidad inhibitoria. Caccamese *et al.* (1980), demostraron que *Porphyra linearis* inhibe el crecimiento de *B. subtilis*, mientras que *P. columbina*, especie ensayada en el presente estudio, no mostró efecto alguno contra las cepas probadas.

El alga parda *P. fascia* es la especie con mayor espectro de actividad antibacteriana entre los tres grupos de macroalgas. Este resultado difiere de lo reportado por Caccamese *et al.*, (1985), quienes para esta misma especie no encontraron actividad antibacteriana cuando enfrentaron su extracto a *B. subtilis* y *Escherichia coli*. Hornsey & Hide (1974), demostraron que *Desmarestia ligulata* presentaba actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *Streptococcus pyogenes*. Sin embargo, en el presente estudio, la especie *Desmarestia* sp. no tuvo efecto contra las cepas ensayadas.

En el presente estudio, el alga verde *B. plumosa* demostró tener capacidad inhibitoria frente a ambas cepas de *S. aureus*. Esto concuerda con Hornsey & Hide (1974), quienes reportaron que *B. plumosa* tiene un gran espectro de actividad antibacteriana; sin embargo, en su caso registraron actividad tanto contra bacterias grampositivas como negativas. *Ulva nematoidea*, especie ensayada en este estudio, no tuvo efecto inhibitorio contra ninguna de las cepas bacterianas ensayadas. Esto se contradice con los trabajos de Hornsey & Hide (1974) y González *et al.* (2001), quienes reportaron que *U. lactuca* y *U. rigida* tienen gran actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis*.

Estudios realizados al sur de África e Italia, consideran a las algas pardas y rojas como los grupos con mayor número de especies con potencial antibacteriano, siendo las primeras las que tienen un mayor número de especies con actividad antibacteriana (Caccamese *et al.*, 1985; Vlachos *et al.*, 1997). Esto concuerda con la distribución de la capacidad antibacteriana

registrada en las cinco especies de macroalgas peruanas. Sin embargo, en este caso fue *B. plumosa* (Chlorophyta) la especie que presentó los mayores halos de inhibición para las cepas de *S. aureus*.

CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú sólo presentaron efecto antibacteriano contra las cepas grampositivas. Las bacterias gramnegativas fueron resistentes a todos los extractos ensayados. El potencial antibacteriano reportado en el presente trabajo demuestra que dicha actividad se encuentra distribuida entre los tres grupos de macroalgas (Rhodophyta, Phaeophyta y Chlorophyta).

El ensayo del potencial antibacteriano de los extractos algales muestra que *P. fascia* (Phaeophyta) tiene un mayor espectro de actividad entre todas las algas en estudio, mientras que *G. doryphora* (Rhodophyta) presenta el mayor espectro dentro de las algas rojas. *S. aureus* ATCC 6633 es la cepa más sensible a los extractos etanólicos de las macroalgas marinas peruanas ensayados. Entre las cepas clínicas, fue *E. faecalis* ATCC 29212 la que evidenció mayor inhibición.

Los extractos etanólicos de *Rhodymenia flabellifolia*, *Cryptopleura* sp., *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Porphyra columbina* (Rhodophyta), *Desmarestia* sp., *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta) y *Ulva nematoidea* (Chlorophyta) no presentaron actividad antibacteriana contra ninguna de las cepas patrón ensayadas.

RECOMENDACIONES

Es necesario realizar más estudios para evaluar el potencial antibacteriano de las sustancias bioactivas de macroalgas, con el fin de seleccionar especies promisorias y realizar los estudios químicos para caracterizar los compuestos que le confieren al alga esta capacidad.

Se deben ensayar diversos protocolos de extracción, debido a que no existe un único protocolo que proporcione los resultados positivos para todas las especies de macroalgas, sino que estos deben ser adaptados de acuerdo a las características de nuestras especies y al objetivo que se busque en la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Balta, M. 1988. Producción de compuestos antimicrobianos en algas marinas peruanas. En: *Enteromorpha intestinales* (Chlorophyta) y *Polysiphonia paniculata* (Rhodophyta). Tesis para optar el grado académico de Bachiller en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, Perú. 24 pp.
- Baslow, M. 1969. Chlorophyta, Phaeophyta and Rhodophyta. In: Marine Pharmacology. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. pp. 56-85 (no visto; citado por Rao & Parekh, 1981).
- Bhakuni, D. y Silva, M. 1974. Biodynamic substances from marine flora. Bot. Mar. 27 (1): 40-51.
- Bourgougnon, N., Lahaye, M., Chermann, J. y Kornprobst, J. 1993. Composition and antiviral activities of sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). Bioorganic & Medical Chemistry Letters. 3 (6): 1141-1146.
- Caccamese, S. y Azzolina, R. 1979. Screening for antimicrobial activities in marine algae from Eastern Sicily. Planta Med. 37: 333-339 (no visto; citado por Caccamese *et al.*, 1985).
- Caccamese, S., Azzolina, R., Furnari, G., Cormaci, M. y Grasso, S. 1980. Antimicrobial and antiviral activities of extracts from mediterranean algae. Bot. Mar. 23 (5): 285-288.
- Caccamese, S., Toscano, R., Furnari, G. y Cormaci, M. 1985. Antimicrobial activities of red and brown algae from southern Italy coast. Bot. Mar. 28 (11): 505-507.
- Cáceres, P., Carlucci, M., Damonte, E., Matsuhira, B. y Zuñiga, E. 2000. Carrageenans from chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. Phytochemistry. 53: 81-86.

- Carvalho, L. y Roque, N. 2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Química Nova*, 23(6): 757-763.
- Chester, C. y Stott, J. 1956. Production of antibiotic substances by seaweeds. *Int. Seaweed Symp.* 2: 49-54. (no visto; citado por Rao & Parekh, 1981).
- Conover, J. y Sieburth, J. 1964. Effect of *Sargassum* distribution on its epibiota and antibacterial activity. *Bot. Mar.* 6: 147-157. (no visto; citado por Hornsey & Hide, 1976b).
- Cronin, G. 2001. Resource allocation in seaweeds and marine invertebrates: chemical defense patterns in relation to defense theories. *In*: McClintock, J., Baker, B. (eds.) *Marine Chemical Ecology*. CRC Press. pp. 325-353.
- Devi, P., Solimabi, W., D'Souza, L., Sonak, S., Kamat, S. y Singbal, S. 1997. Screening of some marine plants for activity against marine fouling bacteria. *Bot. Mar.* 40: 87-91.
- Ehresmann, D., Deig, E., Hatch, M., DiSalvo, L. y Vedros, N. 1977. Antiviral substances from California marine algae. *J. Phycol.* 13: 37-40.
- Faulkner, D. 1984. Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Nat. Prod. Rep.* 1: 251-280.
- Fenical, W. 1975. Halogenation in the Rhodophyta: a review. *J. Phycol.* 11: 245-259.
- Glombitza, K. y Koch, M. 1989. Secondary metabolites of pharmaceutical potential. *In*: Cresswell, R., Rees, T., Shah, N. (eds.), *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Great Britain. 338 pp.
- González, A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., Jiménez, M., García, G. y Peláez, F. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.* 4: 35-40.
- González, F. y Silva, M. 2001. Biodiversidad química de macroalgas marinas. *In*: Alveal, K., Antezana, T. (eds.) *Sustentabilidad de la biodiversidad, un problema actual. Bases científico-técnicas, teorizaciones y proyecciones*. Chile. 896 pp.
- Hay, M., Duffy, J., Fenical, W. y Gustafson, K. 1987a. Chemical defense against different marine herbivores: are amphipods insect equivalents? *Ecology*. 68 (6): 1567-1580.
- Hay, M., Fenical, W. y Gustafson, K. 1987b. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. *Ecology*. 68 (6): 1581-1591.
- Hay, M. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 200: 103-134.
- Hay, M. y Fenical, W., 1996. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. *Oceanography* 9 (1): 10-19.
- Hornsey, I. y Hide, D. 1974. The production of antimicrobial compounds by British marine algae I. Antibiotic-producing marine algae. *Br. Phycol. J.* 9: 353-361.

- British marine algae II. Seasonal variation in production of antibiotics. *Br. Phycol. J.* 11: 63-67.
- Hornsey, I. y Hide, D. 1976b. The production of antimicrobial compounds by British marine algae III. Distribution of antimicrobial activity within the algal thallus. *Br. Phycol. J.* 11: 175-181.
- Neushul, M. 1990. Antiviral carbohydrates from marine red algae. *Hydrobiologia* 204/205: 99-104.
- Paul, V., Littler, M., Littler, D. y Fenical W. 1987. Evidence for chemical defense in tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (Caulerpaceae: Chlorophyta). *J. Chem. Ecol.* 13 (5): 1171-1185.
- Pereira, R., Teixeira, V. y Kelecom, A. 1994. Chemical defenses against herbivores in marine algae. 1. The brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux from Brazil. *An. Acad. Bras. Ci.* 66 (2): 229-235.
- Pesando, D. y Caram, B. 1984. Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity. *Bot. Mar.* 27: 381-386. (no visto; citado por Devi *et al.*, 1997).
- Rao, P. y Parekh, K. 1981. Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. *Bot. Mar.* 24 (11): 577-582.
- Roos, H. 1957. Untersuchungen über das vorkommen antimikrobieller substanzen in meeresalgen. *kieler meeresforsch.* 13: 41-48. (no visto; citado por Rao & Parekh, 1981).
- Stein, J. y Borden, C. 1984. Causative and benefical algae in human disease conditions: a review. *Phycologia.* 23 (4): 485-501.
- Vlachos, V., Critchley, A. y von Holy A. 1996. Establishment of protocol for testing antimicrobial activity in southern African macroalgae. *Microbios.* 88: 115-123.
- Vlachos, V., Critchley, A. y von Holy A. 1997. Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine algae. *South African Journal of Science.* 93: 328-332.
- Vlachos, V., Critchley, A. y von Holy, A. 2001. Effect of post-collection storage time and season on the antibacterial activity of selected southern African marine macroalgae. *In: Chen, S. (ed.) Algae and their biotechnological potential.* Kluwer Academic Publishers B. V. Belgium.