



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN

CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE



TESIS

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA MACROALGA *Chara globularis* Thuill

PRESENTADA POR:

EVELIN AMPARO YANA NEIRA

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

PUNO, PERÚ

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE
TESIS

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA
MACROALGA *Chara globularis* Thuill

PRESENTADA POR:

EVELIN AMPARO YANA NEIRA

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE



APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

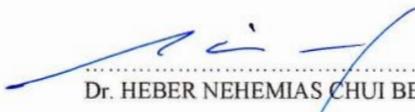
PRESIDENTE


.....
Dr. MARCELINO JORGE ARANIBAR ARANIBAR

PRIMER MIEMBRO


.....
Dr. ALEJANDRO APAZA TARQUI

SEGUNDO MIEMBRO


.....
Dr. HEBER NEHEMIAS CHUI BETANCUR

ASESOR DE TESIS


.....
Dr. JUAN MARCOS ARO ARO

Puno, 18 de Julio de 2022

ÁREA: Ciencias Biomédicas

TEMA: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la macroalga *Chara globularis* Thuill

LÍNEA: Recursos Naturales y Medio Ambiente



DEDICATORIA

A Dios por la vida y por guiarme en cada paso.

A mis padres por su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanas y a mi sobrina, por todo su cariño y por siempre estar a mi lado.



AGRADECIMIENTOS

- Al Proyecto Concytec – Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia [contrato número 01-2018-FONDECYT/BM-Programas de Doctorados en Áreas Estratégicas y Generales], por haber financiado mis estudios doctorales otorgándome una beca.
- A mi asesor de tesis el Dr. Marco Aro por su disposición de tiempo, orientación y apoyo recibido durante el desarrollo del trabajo de investigación.
- Al Dr. Jaeson S. Calla Choque de la Universidad de California San Diego (UCSD) por su mentoría y participación activa en el desarrollo de esta tesis, principalmente por su disponibilidad, paciencia y por su valioso aporte académico.
- Al Químico Jorge Choquenaira Pari de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) por desarrollar el tipo de extracción seleccionado, por toda su ayuda, disponibilidad y recomendaciones, por siempre estar presto a contestar todas mis consultas y en general durante gran parte de la realización de este trabajo.
- Al Dr. Massuo Jorge Kato y a la Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo, por el apoyo en los análisis de HPLC-MS del extracto etanólico, su colaboración fue de gran ayuda en los resultados obtenidos.
- A la Dra. Ingrit Collantes Díaz de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) por su amistad, consejos y por su apoyo en la interpretación de datos.
- A la Mg. Elisa Roncal Ríos del Laboratorio Lansier y a la Mg. Maribel Riveros Ramírez del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humbolt por la donación de cepas para el desarrollo de este trabajo de investigación.
- Al gerente de la Clínica Americana de Juliaca, el CPC José Luis Ramos Catachura, al licenciado Mario Quispe Chambi y a todo su equipo humano de trabajo, por brindarme los permisos y el acceso al laboratorio para desarrollar la actividad experimental de esta investigación.



- A mi familia y amigos, por su motivación y por ser mi soporte emocional.
- A todos muchas gracias por todo el apoyo brindado, nunca lo olvidaré!!!



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
REVISIÓN DE LITERATURA	
1.1 Marco teórico	3
1.1.1. Las algas	3
1.1.2. Clasificación de las algas	3
1.1.3. Compuestos bioactivos de algas	6
1.1.4. Extracción de principios activos	11
1.1.5. Análisis fitoquímico	13
1.1.6. Técnicas para la identificación de metabolitos	13
1.1.7. Actividad antibacteriana	14
1.1.8. Método de difusión en disco	16



1.2 Antecedentes	18
------------------	----

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema	22
2.2 Enunciados del problema	22
2.2.1 Enunciado general	22
2.2.2 Enunciados específicos	22
2.3 Justificación	23
2.4 Objetivos	24
2.4.1 Objetivo general	24
2.4.2 Objetivos específicos	24
2.5 Hipótesis	24
2.5.1 Hipótesis general	24
2.5.2 Hipótesis específicas	24

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio	25
3.2 Población	26
3.3 Muestra	26
3.4 Método de investigación	27
3.5 Descripción detallada de métodos por objetivos específicos	27
3.5.1. Recolección y preparación de la muestra	27
3.5.2. Marcha fitoquímica preliminar	28
3.5.3. Identificación de metabolitos secundarios	29



3.5.4. Preparación del extracto	31
3.5.5. Productos químicos y cultivos bacterianos	31
3.5.6. Actividad antibacteriana	32
3.5.7. Concentración mínima inhibitoria	32
3.5.8. Prueba estadística	33
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Identificación de metabolitos secundarios	34
4.1.1. Marcha fitoquímica preliminar	34
4.1.2. Determinación de compuestos volátiles	35
4.1.3. Determinación de ácidos grasos	39
4.1.4. Determinación de compuestos fenólicos	41
4.2. Actividad antibacteriana	43
4.3. Concentración mínima inhibitoria	47
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Disolventes más utilizados para la extracción de metabolitos secundarios	12
2. Reacción a la gota para determinar la presencia de metabolitos secundarios	28
3. Determinación cualitativa de los fitoquímicos de <i>Chara globularis</i> Thuill	34
4. Compuestos orgánicos volátiles de la macroalga <i>Chara globularis</i>	35
5. Compuestos de ácidos grasos de la macroalga <i>Chara globularis</i>	39
6. Actividad antibacteriana (mm) del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> .	44
7. Actividad antibacteriana (mm) del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	45
8. Actividad antibacteriana (mm) del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228.	45
9. Actividad antibacteriana (mm) del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633.	46
10. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> .	48



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. <i>Chara globularis</i> Thuill	6
2. Factores de estrés que inducen la producción de metabolitos secundarios	8
3. Estructura química del fenol	9
4. Estructura química de los terpenos, a) monoterpenos, b) sesquiterpenos, c) diterpenos, d) triterpenos y e) tetraterpenos.	10
5. Estructura química de un alcaloide	11
6. Estructura de la pared celular de las bacterias gram positivas	15
7. Estructura de la pared celular de las bacterias gram negativas	16
8. Esquema del método de difusión en disco (Kirby Bauer)	17
9. Ubicación del punto de muestreo de <i>Chara globularis</i> en el lago Titicaca.	26
10. Cromatograma de compuestos volátiles extraídos de <i>Chara globularis</i> por SMPE-GC-MS	37
11. Perfil cromatográfico de los ácidos grasos de <i>Chara globularis</i> mediante la técnica GC-MS	40
12. Estructura química del ácido galoilquínico	42
13. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a cepas bacterianas	43
14. Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a cepas bacterianas.	48

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Espectro de masas ESI- en modo negativo de [M-H]- m/z 343,2187 del ácido galoilquínico a los 18,4 min.	66
2. Análisis de varianza para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> .	66
3. Prueba de rango múltiple de Duncan para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> .	66
4. Análisis de varianza para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	67
5. Prueba de rango múltiple de Duncan para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	67
6. Análisis de varianza para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228.	67
7. Prueba de rango múltiple de Duncan para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228.	68
8. Análisis de varianza para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633.	68
9. Prueba de rango múltiple de duncan para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chara globularis</i> frente a <i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633.	68



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ATCC	: American Type Culture Collection
CMI	: Concentración mínima inhibitoria
TR	: Tiempo de retención
mL	: Mililitro
mg	: Miligramo
μ L	: Microlitro
mg	: Miligramo
HS	: Espacio de cabeza (del inglés: Headspace)
SPME	: Microextracción en fase sólida (del inglés: Solid phase microextraction)
GC	: Cromatografía de gases (del inglés: Gas Chromatography)
MS	: Espectrometría de masas (del inglés: Mass Spectrometry)
HPLC	: Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés: High performance liquid chromatographic)
Mm	: Milímetros
N	: Normalidad

RESUMEN

Chara globularis es un alga verde ampliamente distribuida, esta especie se caracteriza por su elevada biomasa. Sin embargo, se conoce poco del uso de este recurso a pesar que escasos estudios reportan su actividad contra los microorganismos. El objetivo fue determinar la composición fitoquímica de *Chara globularis* y la actividad antibacteriana del extracto etanólico frente a cepas bacterianas. Se realizó una marcha fitoquímica preliminar para determinar los grupos de metabolitos secundarios presentes en *C. globularis*, y los compuestos volátiles y ácidos grasos se analizaron por HS-SPME-GC-MS y GC-MS, respectivamente. Además, se evaluó la actividad antibacteriana de *C. globularis*; primeramente, se realizó una extracción por maceración en etanol al 70%, para identificar los metabolitos presentes en el extracto etanólico se efectuó un análisis de HPLC-MS, y para comprobar la actividad del extracto frente a cepas bacterianas se utilizó la técnica de difusión en disco. La marcha fitoquímica reveló la presencia de triterpenos y compuestos fenólicos, mediante GC-MS se identificó 27 compuestos volátiles y 24 ácidos grasos, y en el extracto etanólico se identificó el ácido galoilquínico. El extracto etanólico presentó actividad antibacteriana frente a *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 25923, y *B. spizizenii* ATCC 6633, con halos de hasta 12.39 mm de diámetro. La concentración mínima inhibitoria se observó a partir de 0.5 mg/ml en *S. aureus* ATCC 25923 y *B. spizizenii* ATCC 6633. El extracto etanólico de *C. globularis* posee actividad antibacteriana sobre bacterias gram positivas, observándose una mayor inhibición a medida que se incrementa la concentración.

Palabras clave: Ácido galoilquínico, actividad antibacteriana, *Chara globularis*, compuestos volátiles, macroalga.

ABSTRACT

Chara globularis is a widely distributed green alga, this species is characterized by its high biomass. However, little is known about the use of this resource and there are few studies that report its activity against microorganisms. The objective was to determine the phytochemical composition of *Chara globularis* and the antibacterial activity of the ethanolic extract against bacterial strains. A preliminary phytochemical analysis was performed to determine the secondary metabolite groups present in *C. globularis*, volatile compounds and fatty acids were analyzed by HS-SPME-GC-MS and GC-MS, respectively. In addition, the antibacterial activity of *C. globularis* was evaluated; first, an extraction by maceration in 70% ethanol was performed, to identify the metabolites present in the ethanolic extract an HPLC-MS analysis was performed, and to check the activity of the extract against bacterial strains, the disk diffusion technique was used. The phytochemical analysis revealed the presence of triterpenes and phenolic compounds, by GC-MS 27 volatile compounds and 24 fatty acids were identified, and in the ethanolic extract galloylquinic acid was identified. The ethanolic extract showed antibacterial activity against *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 25923, and *B. spizizenii* ATCC 6633, with halos up to 12.39 mm in diameter. The minimum inhibitory concentration was observed from 0.5 mg/ml for *S. aureus* ATCC 25923 and *B. spizizenii* ATCC 6633. The ethanolic extract of *C. globularis* possesses antibacterial activity on gram-positive bacteria, with higher inhibition observed with increasing concentration.

Keywords: Antibacterial activity, *Chara globularis*, galloylquinic acid, macroalgae and volatile compounds.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se cuenta con una gran biodiversidad de algas que aún no han sido descritas y que están ampliamente distribuidas pues habitan cuerpos de agua dulce, salobres o saladas. Actualmente en Perú, se aprovecha una escasa cantidad de especies de macroalgas, las cuales son empleadas en la industria alimenticia y farmacológica.

El crecimiento excesivo de las macroalgas puede afectar a otras especies de vida vegetal acuática, estas floraciones en masa bloquean la luz solar que es indispensable para su desarrollo, además se da un mayor consumo de oxígeno. En el lago Titicaca encontramos macrófitas con importancia económica y ecológica, entre las cuales se tiene a la totora (*Schoenoplectus tatora*) como la especie más resaltante, seguida de los llachales que son asociaciones de plantas acuáticas de los géneros *Eloдея*, *Myriophyllum* y *Potamogeton*, éstas macrófitas proporcionan alimento y refugio a una gran cantidad de especies de aves, peces y anfibios. Además, una especie que también podemos encontrar y en mayor cantidad son los carófitos, no representan importancia socioeconómica, pero influyen en la dinámica y comportamiento de la diversidad biológica acuática.

Los carófitos pertenecen al grupo de algas verdes y estas especies representan la tercera parte de la diversidad de las macrófitas que habitan las aguas del lago Titicaca, dentro de las diferentes especies de carófitos podemos encontrar a *Chara globularis* Thuill, la cual posee un efecto alelopático que puede influir sobre otras plantas o microorganismos de forma benéfica o dañina.

Actualmente se buscan productos naturales a partir de las plantas y algas, pues estas especies poseen una amplia gama de propiedades, las cuales son beneficiosas para la salud del hombre, por lo cual el propósito de esta investigación fue identificar los metabolitos secundarios y comprobar la actividad antibacteriana de un extracto etanólico purificado obtenido de la macroalga *Chara globularis*, a través de un análisis de marcha fitoquímica preliminar para conocer los grupos de metabolitos presentes en esta especie, para identificar los compuestos contenidos en el extracto de *C. globularis* se utilizaron técnicas de HPLC/MS y GC/MS, luego se evaluó la actividad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria del extracto.



Este trabajo consta de cuatro capítulos: Capítulo I: Revisión bibliográfica: Marco teórico y antecedentes de la investigación. Capítulo II: Planteamiento del problema: Identificación del problema, enunciados del problema, justificación, objetivos e hipótesis de la investigación. Capítulo III: Materiales y Métodos: Lugar de estudio, población y muestra, descripción detallada de métodos por objetivos. Capítulo IV: Resultados y Discusión: Donde se da a conocer los resultados obtenidos para cada objetivo. Por último, consideran las conclusiones, recomendaciones, referencias bibliográficas y los anexos correspondientes.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico

1.1.1. Las algas

Las algas son un grupo con una amplia diversidad de especies, son organismos autótrofos capaces de realizar fotosíntesis, por lo que son considerados como los productores primarios que se encargan de proporcionar oxígeno y compuestos orgánicos como subproductos de la fotosíntesis en ecosistemas acuáticos (Bankova *et al.*, 2001; Inthasotti y Thiamdao, 2020; Messyasz *et al.*, 2018). Poseen una distribución muy extensa debido a que habitan aguas marinas, aguas dulces, ambientes con humedad, zonas con nieve, desiertos e incluso aguas termales (Nuño-Romo *et al.*, 2017; Leandro *et al.*, 2020; Unpaprom *et al.*, 2020).

1.1.2. Clasificación de las algas

Las algas se clasifican en dos grupos, las microalgas y las macroalgas, el primer grupo están conformadas por Bacillariophyta (diatomeas), Dinophyta (dinoflagelados), Prasinophyta, Prymnesiophyta, Cryptophyta, Chrysophyta y Rhaphidiophyta (flagelados amarillo-marrones y verdes) y las Cyanophyta (microalgas verde-azules) (Jimenez-Lopez *et al.*, 2021). Por otra parte, se encuentran las macroalgas que se distribuyen en ambientes marinos, de agua dulce y salobres (Allen *et al.*, 2018). Existen más de 15.000 especies de macroalgas distribuidas en distintos grupos de acuerdo a su color; Phaeophyta (algas pardas), Rhodophyta (algas rojas) y Chlorophyta y Streptophyta (algas verdes), (Leliaert *et al.*, 2012; Vuong *et al.*, 2018; Leandro *et al.*, 2020).

1.1.2.1.1. Algas pardas

Las algas pardas o marrones habitan aguas marinas y están agrupadas en la división Phaeophyta, su color característico se debe a la presencia de fucoxantinas. Estas algas varían de tamaño pequeño a mediano, además presentan formas filamentosas, tubulares, en forma de cojín, de saco, hasta grandes estructuras complejas (Abbott y Hollenberg, 2022). En la actualidad, esta división cuenta con aproximadamente unas 2000 especies, las cuales han sido identificadas y crecen en zonas de aguas templadas a frías (S. Wang *et al.*, 2020).

1.1.2.1.2. Algas rojas

Las algas rojas pertenecen a la división Rhodophyta, siendo el grupo de macroalgas más rico, pues comprende aproximadamente con unas 6000 especies que habitan zonas intertropicales (S. Wang *et al.*, 2020). Son algas marinas multicelulares, filamentosas, ramificadas y no ramificadas, cilíndricas y comprimidas, estas algas deben su color rojo a pigmentos como la ficobilina y ficoeritrina, en algunos casos también se encuentra la ficocianina el cual les da a las algas un color gris acero (Abbott y Hollenberg, 2022b).

1.1.2.1.3. Algas verdes

Las algas verdes se encuentran agrupadas en dos divisiones: Chlorophyta y Streptophyta, las cuales abarcan una gran diversidad de algas verdes y plantas embriofitas (Becker, 2013). La división Chlorophyta consta de 12 clases de algas verdes que habitan aguas marinas, mientras que la división Streptophyta se desarrolla mayormente en aguas dulces y abarca cinco clases, dentro de esta división encontramos a la clase Charophyceae, que son consideradas morfológicamente más complejas (Becker, 2013; Duncan y Rouse-Miller, 2017).

a. Clase Charophyceae

Las especies que conforman esta clase son algas verdes, consideradas como ancestros de las plantas terrestres (Sheath y Wehr, 2015; Duncan y Rouse-Miller, 2017; Begum *et al.*, 2017; Saber *et al.*, 2021), están ampliamente

distribuidas en todos los continentes a excepción de la Antártida (Karol *et al.*, 2018). Conocidas como “stoneworts” en virtud a las incrustaciones de CaCO_3 que poseen (Duncan y Rouse-Miller, 2017). Estas especies macroscópicas poseen estructuras parecidas al de una planta superior, viven sumergidas en aguas dulces, duras y pobres en oxígeno (Manikanta y Malammanavar, 2018; Sviben *et al.*, 2018). Cuentan con una capa protectora que recubre los órganos reproductivos y tienen un talo diferenciado, la mayoría de estas especies crecen hasta los 30 cm de altura, sin embargo algunas llegan a medir 1m (Duncan y Rouse-Miller, 1990; Schneider *et al.*, 2015). Las Charophytas forman densos prados que actúan como sumideros de nutrientes, los cuales permanecen almacenados en la biomasa vegetal por un mayor tiempo en comparación que sus contrapartes vasculares, y se descomponen muy lentamente (Kufel y Kufel, 2002).

i. Chara o purima

En el lago Titicaca habitan diferentes especies de chara, las cuales son conocidas por los pobladores con el nombre común de “chara o purima”. Estas especies pertenecen a la familia Characeae, donde se encuentran desde especies unicelulares hasta multicelulares, además poseen estructuras semejantes a las plantas terrestres como tallo y hojas (Leliaert *et al.*, 2012). *Chara globularis* (Figura 1) crece como una macrófita sumergida, su importancia se debe a que provee alimento y refugio a macroinvertebrados, peces y aves (Gao y Yan, 2012). Asimismo, poseen talos frágiles con una medida de 0.3 a 0.8 mm de diámetro y pueden ser hallados hasta por debajo de los 10 m de profundidad (Sviben *et al.*, 2018).

ii. Clasificación taxonómica

Reino : Plantae
Filo : Charophyta
Clase : Charophyceae

Orden : Charales
Familia : Characeae
Género : *Chara* Linnaeus, 1753
Especie : *Chara globularis* Thuill.



Figura 1. *Chara globularis* Thuill

1.1.3. Compuestos bioactivos de algas

Las algas han sido utilizadas desde hace mucho tiempo en la medicina tradicional (Phukan *et al.*, 2020), debido a los beneficios que aportan a la salud y en la prevención contra enfermedades (Patra *et al.*, 2019). En estas especies podemos encontrar una gran fuente de compuestos bioactivos de origen secundario denominados metabolitos secundarios (Singh y Thakur, 2016). Muchos estudios han confirmado la presencia de actividades biológicas por parte de las algas, entre las que se mencionan; actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, (Vahdati *et al.*, 2022), antifúngicas,

antibacterianas, antimicrobianas, entre otras (Hassanzadazar *et al.*, 2019). Sin embargo, estos compuestos bioactivos cumplen diferentes funciones que no son vitales para la planta o alga, y se presentan en diferentes proporciones entre especies (Sosa-Hernández *et al.*, 2018).

1.1.3.1. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas y algas se encuentran distribuidos en células, tejidos y órganos, que varían su contenido durante las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, sin embargo no cumplen funciones esenciales en ellas (Li *et al.*, 2020). Estos fitoquímicos tienen como función principal la defensa de las plantas contra microorganismos, herbívoros y la competencia contra otras especies vegetales (Kong *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2019).

La composición química de las algas depende mucho de los factores bióticos y abióticos de su entorno (Figura 2; Polyak y Sukharevich, 2019). La variabilidad de la producción de estos metabolitos, principalmente se le atribuye al estrés biótico, donde la combinación de muchos factores juegan un papel muy importante, como la luz, agua, temperatura, el suelo, entre otros (Kong *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020).

A estas sustancias se les atribuye una gran cantidad de actividades biológicas (Korzeniowska *et al.*, 2018; Saadaoui *et al.*, 2020; Ślusarczyk *et al.*, 2021), siendo los metabolitos secundarios más importantes en la industria farmacológica; los fenoles, terpenos y alcaloides (Li *et al.*, 2020).

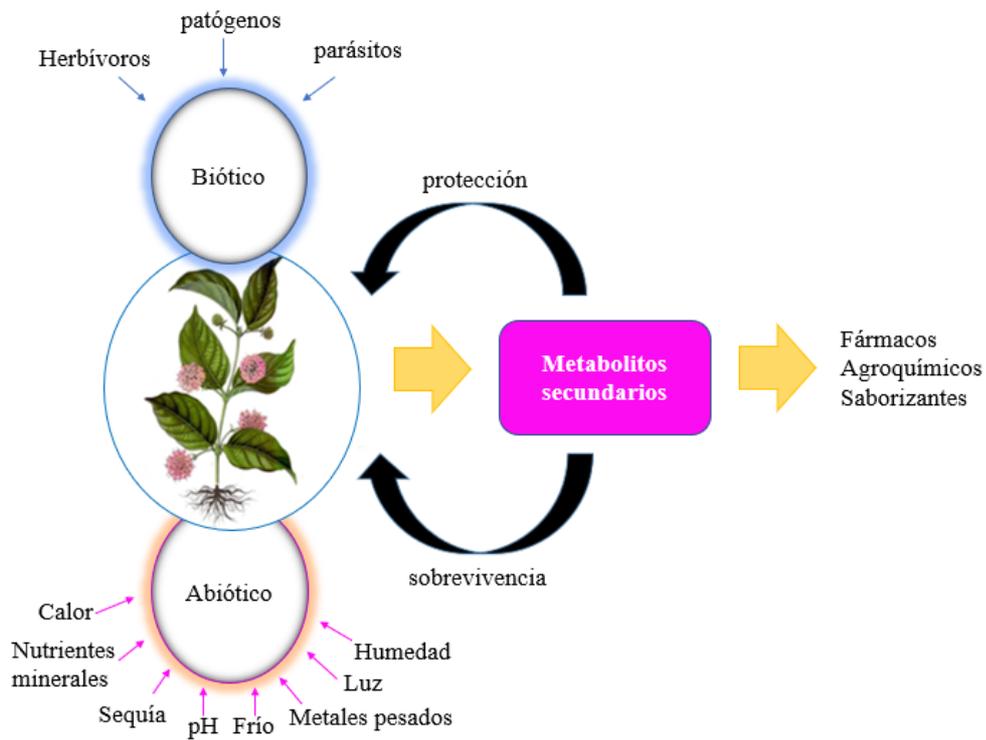


Figura 2. Factores de estrés que inducen la producción de metabolitos secundarios
Fuente: (Correa y Ramos, 2017).

a. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (Figura 3) son el grupo más numeroso y diverso de metabolitos secundarios, que se encuentran ampliamente distribuidos (Santos *et al.*, 2019). Estos compuestos se localizan en diferentes partes de las estructuras vegetales, las cuales tienen la función de proteger a las algas y plantas terrestres contra la radiación ultravioleta y agentes patógenos (Liu *et al.*, 2020). Además poseen vastas actividades biológicas (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2019). Los compuestos fenólicos encontrados en macroalgas han demostrado tener efecto antibacteriano frente a bacterias patógenas (Scania y Chasani, 2021).

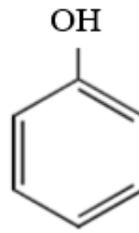


Figura 3. Estructura química del fenol

b. Terpenos

Las plantas y algas son capaces de producir compuestos volátiles, constituidos por una mezcla de terpenos que provienen de ácidos grasos y compuestos aromáticos (Cantúa *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019). Los terpenos cumplen funciones de señalización, pigmentación y también actúan como aromatizante (Shoker, 2020). Además, pueden atraer a polinizadores o dispersores de semillas, repelen insectos, evitan la colonización de bacterias y la función principal es la de ser mensajeros intra e interespecíficos (Cantúa *et al.*, 2019). Este grupo de metabolitos se encuentra distribuido en diferentes clases, dependiendo del número de isoprenos, se clasifican en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (Figura 4; Radwan *et al.*, 2021), los cuales son muy utilizados en la elaboración de medicamentos, pues poseen beneficios terapéuticos muy extensos (Shoker, 2020).

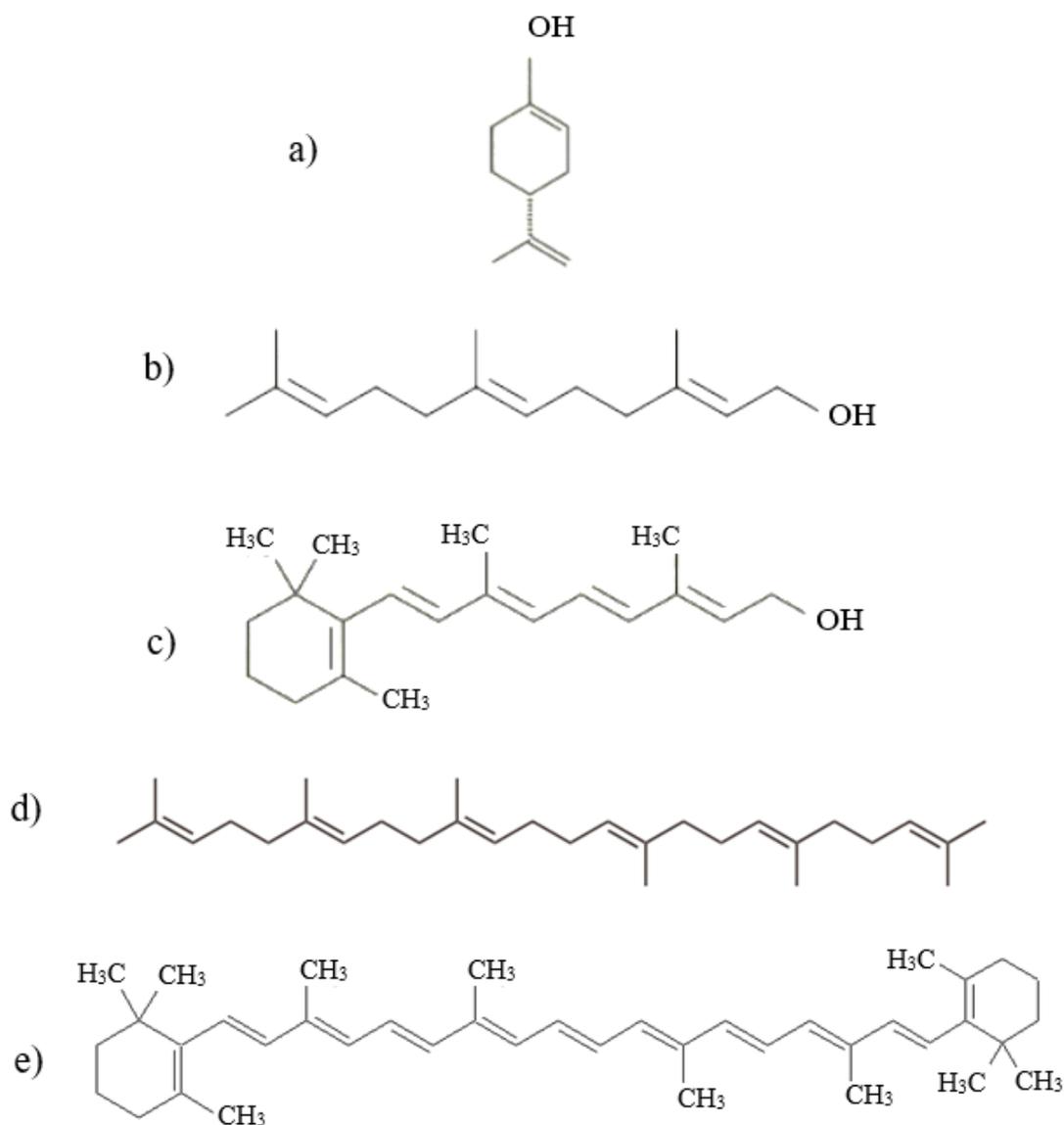


Figura 4. Estructura química de los terpenos, a) monoterpénos, b) sesquiterpenos, c) diterpenos, d) triterpenos y e) tetraterpenos.

c. Alcaloides

En la naturaleza los alcaloides (Figura 5) son tóxicos, sin embargo, estos compuestos nitrogenados tienen propiedades médicas con efectos benéficos sobre la salud, entre estos compuestos se encuentran; la cocaína, morfina,

cafeína, y muchos más, por esto son de importancia en el área farmacológica (Shoker, 2020). También se ha reportado que los alcaloides poseen actividad antimicrobiana, citotóxica (Rinaldi *et al.*, 2017), neuroprotectora, anticancerígena y anti-biopelícula (Iqbal *et al.*, 2018).

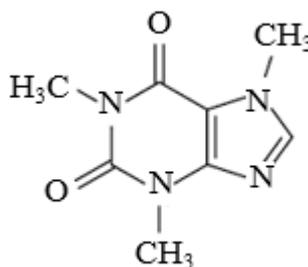


Figura 5. Estructura química de un alcaloide

1.1.4. Extracción de principios activos

La extracción es usualmente el proceso más empleado para obtener y aprovechar los compuestos bioactivos de una planta (Marcante *et al.*, 2020), pues de este proceso depende el contenido y la actividad biológica de los compuestos químicos conseguidos (Wong *et al.*, 2018).

El material vegetal primeramente debe ser lavado, para ser sometido a un proceso de secado o liofilización (Espinosa-Leal y Garcia-Lara, 2019), la temperatura de secado debe mantenerse por debajo de los 30°C, evitar el contacto con la luz y el exceso de humedad, pues estos factores podrían degradar los compuestos químicos de interés (Sarker y Nahar, 2012). Terminado este proceso, se pulveriza la muestra para homogenizarla y garantizar un mayor contacto del material vegetal con el solvente.

Existe una diversidad de métodos de extracción que pueden ser empleados en la obtención de los principios activos de plantas y algas, como la extracción con solventes, calentamiento a reflujo, extracción Soxhlet, maceración y percolación (Espinosa-Leal

y Garcia-Lara, 2019). Los métodos más convencionales, sencillos y económicos son; la maceración y la percolación (Sarker y Nahar, 2012), ambos métodos utilizan solventes orgánicos como hexano, diclorometano, etanol, entre otros (Tabla 1), los cuales actuarán sobre la estructura de las células vegetales (Wong *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

Sin embargo, también existen métodos de extracción moderna no convencionales como la extracción asistida por microondas, extracción supercrítica, extracción de fluidos (Dirar *et al.*, 2019; Marcante *et al.*, 2020), técnicas en fase sólida, de líquido presurizado y mediadas por surfactantes (Espinosa-Leal y Garcia-Lara, 2019).

Tabla 1

Disolventes más utilizados para la extracción de metabolitos secundarios

Disolventes							
	Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Éter	Acetona	Hexano
Compuestos a extraer	Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoles	Alcanos
	Almidones	Polifenoles	Terpenoides	Flavonoides	Terpenoides		Ácidos grasos
	Taninos	Poliacetilenos	Saponinas		Cumarinas		Ceras
	Saponinas	Flavonoles	Quasinoideas		Ácidos grasos		Esteroides
	Terpenoides	Terpenoides	Flavonas				Terpenoides
	Polipéptidos	Esteroides	Polifenoles				Cumarinas
	Lectinas	Alcaloides	Taninos				Alcaloides

Fuente: Murphy (1999).

1.1.4.1.Maceración

La maceración es una técnica de extracción sólido-líquido, con la cual se obtienen extractos de compuestos vegetales no volátiles a partir de materia prima vegetal (Safdar *et al.*, 2017), el mayor porcentaje de estudios sobre actividades biológicas se ha obtenido con disolventes orgánicos (Wong *et al.*, 2018), como en la obtención de compuestos fenólicos donde se emplean disolventes como el metanol, etanol, acetona y agua (Vieitez *et al.*, 2017). La maceración es un método muy utilizado en la obtención de compuestos de macroalgas, puesto que se obtienen mayores rendimientos y se pueden adaptar para la extracción de una variedad de moléculas

de acuerdo a la combinación de disolventes, temperatura y agitación (García-Vaquero *et al.*, 2020).

1.1.4.2. Percolación

La percolación es un método eficiente en la extracción de compuestos a partir de material vegetal, el cual es empapado con un disolvente en un percolador, luego se agrega el disolvente hasta que cubra toda la muestra y se deja en remojo por algunas horas, una vez transcurrido el tiempo se colecta lentamente el disolvente, para asegurar una mayor concentración, seguidamente se repite el proceso (Sarker y Nahar, 2012).

1.1.5. Análisis fitoquímico

La fitoquímica es el estudio de los metabolitos secundarios que poseen las especies vegetales, lo que incluye la identificación y aislamiento de los compuestos químicos, para comprobar su potencial bioactivo *in vitro* e *in vivo* (Saxena *et al.*, 2013). El análisis fitoquímico es el punto de partida para obtener de forma preliminar la composición del grupo de metabolitos secundarios presentes en una especie vegetal, a través de diferentes reacciones químicas (Pujol *et al.*, 2020).

1.1.6. Técnicas para la identificación de metabolitos

Para determinar los compuestos presentes en las plantas y algas se utilizarán diferentes técnicas cromatográficas como; la cromatografía de gases, cromatografía en capa delgada, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrometría de masas, espectrometría infrarroja, etc (Zhao-Hui *et al.*, 2010).

1.1.6.1. HPLC/MS

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas es una técnica química analítica combinada, donde se realiza una separación de los componentes de la muestra por HPLC en función a su relación de masa/carga (m/z), de acuerdo a su distribución en la fase estacionaria y móvil, y el espectrómetro de masas determina la masa molecular de un compuesto (Rigo *et al.*, 2018).

1.1.6.2.GC/MS

La cromatografía de gases/espectrometría de masas es una esta técnica que separa mezclas químicas e identifica molecularmente los componentes. A través de la cromatografía de gases se separan individualmente las sustancias de una muestra cuando se calientan a una temperatura elevada, por lo que se requiere que el analito sea volátil y térmicamente estable, luego estas sustancias fluyen hacia el espectrómetro de masas donde se identifica a un compuesto por su masa molecular (Pico *et al.*, 2019).

1.1.7. Actividad antibacteriana

Para poder determinar la sensibilidad de bacterias frente a extractos de productos naturales existen bioensayos *in vitro* que deben de realizarse para comprobar la actividad biológica de los compuestos (Sánchez-García *et al.*, 2016). Los principales métodos de evaluación son el método de difusión en disco y el de difusión en pozos de agar, es necesario utilizar mayores concentraciones de los extractos para poder inhibir el crecimiento de bacterias y así estandarizar la concentración adecuada, asimismo la concentración de bacterias a utilizarse debe estar ajustada en 5×10^5 UFC/ml, que equivale a un patrón de 0.5 en la escala de MacFarland (Ramirez y Marin, 2009). Los medios de cultivo utilizados para la técnica de difusión en pozo varían de acuerdo a los microorganismos utilizados, siendo los más empleados el agar McConkey y agar Saboreaud-Dextrosa, para el método de difusión en disco generalmente se utiliza el agar Muller Hinton (Sánchez-García *et al.*, 2016).

1.1.7.1.Bacterias Gram positivas

Se denominan bacterias Gram positivas a aquellos microorganismos que al realizar la tinción de Gram se tiñen de color azul-violeta, debido a la estructura de la pared celular (Rodríguez y Arenas, 2018). Este tipo de bacterias cuentan con una membrana celular con ácidos lipoteicoicos, además poseen una pared celular muy gruesa la que está compuesta con peptidoglicano y tienen ácidos teicoicos acoplados que conforman aproximadamente el 50 % de la masa de la pared celular bacteriana (Figura 6; Caudill *et al.*, 2020).

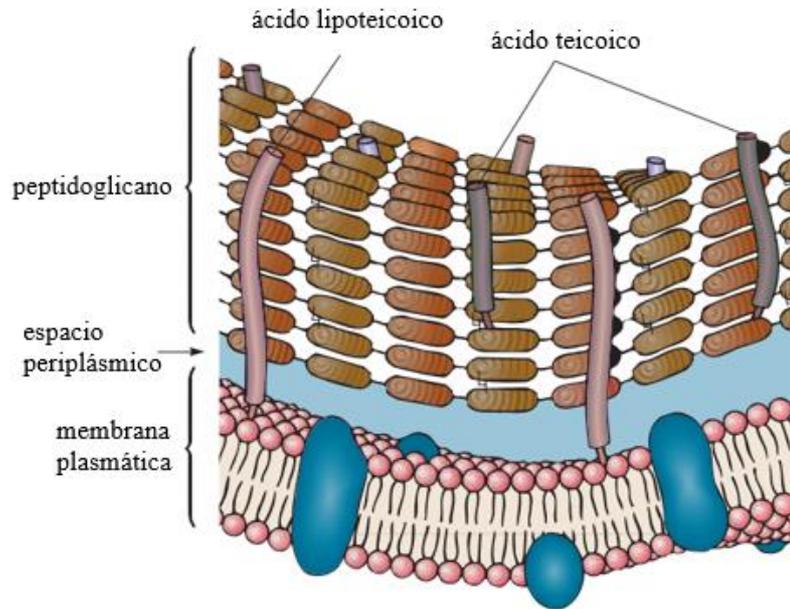


Figura 6. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas

Fuente: (Prescott *et al.*, 2002)

1.1.7.2. Bacterias Gram negativas

Se denominan bacterias Gram negativas a aquellas bacterias que no retienen el colorante cristal violeta aplicado durante la tinción de Gram, en cambio se tiñen de color rosa con la safranina (Mollinedo y Gonzáles, 2014). Las bacterias Gram negativas se caracterizan por tener una capa delgada de peptidoglicano y una bicapa de lipoproteínas (Figura 7; Rodríguez y Arenas, 2018). La membrana plasmática tiene en su estructura fosfolípidos, proteínas y enzimas, la pared celular tiene un espesor de 10 nm y es más compleja que las Gram positivas, asimismo se atribuye a estas bacterias una mayor patogenicidad debido a los lipopolisacáridos que se ubican en la parte externa de la membrana celular (Mollinedo y Gonzáles, 2014). Del mismo modo la parte lipídica es poco permeable, lo que le proporciona una mayor resistencia a agentes antimicrobianos (Kosanić *et al.*, 2015).

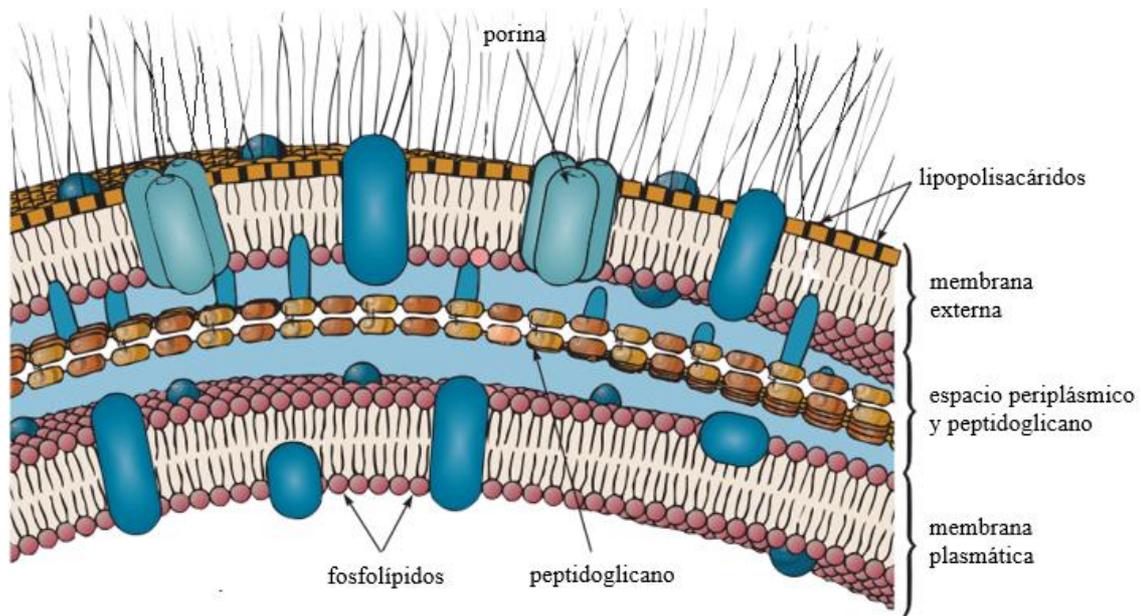


Figura 7. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas

Fuente: (Prescott *et al.*, 2002)

1.1.8. Método de difusión en disco

El método de difusión en disco de Kirby Bauer (Figura 8), consiste en inocular bacterias sobre placas Petri que contengan agar Muller-Hinton, a continuación, se colocarán los discos que estarán previamente impregnados con los extractos vegetales a evaluar, conjuntamente con los controles positivos y negativos, las placas Petri se incubarán a 37°C por 24 h, luego de transcurrido ese tiempo se procederá a medir las zonas de inhibición, cada ensayo deberá de realizarse por triplicado (Ishola *et al.*, 2018; Lalthanpuii y Zarzokimi, 2019; Walean *et al.*, 2020).

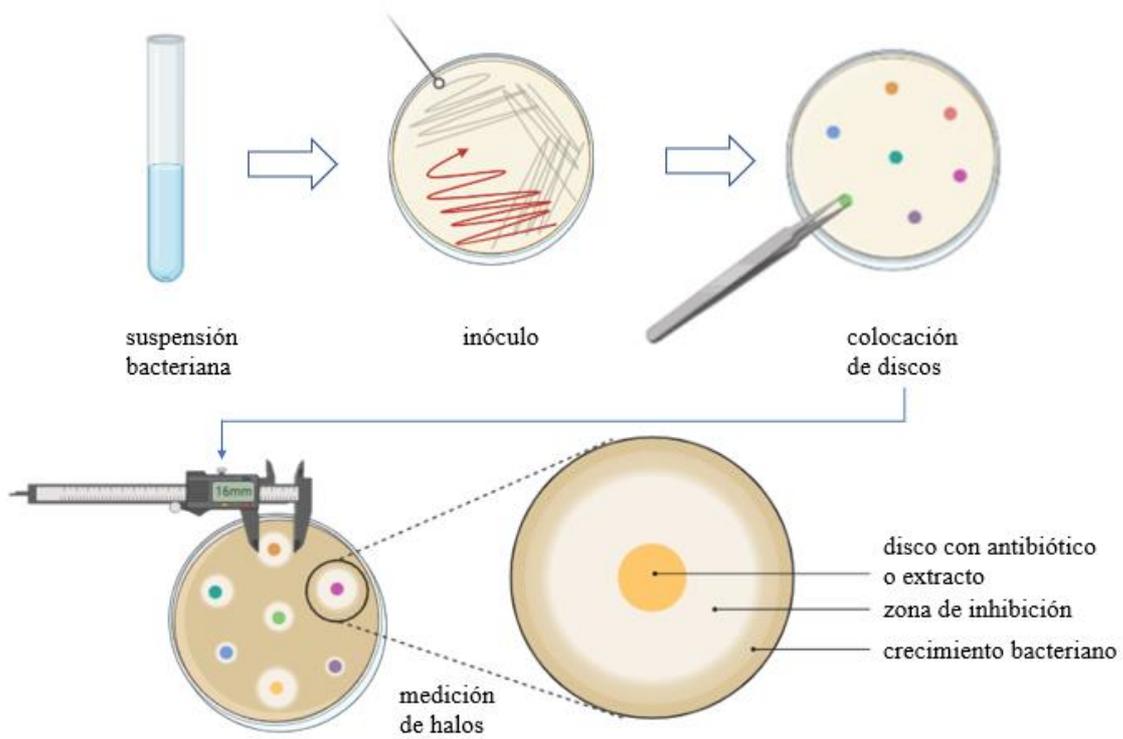


Figura 8. Esquema del método de difusión en disco (Kirby Bauer)

1.2 Antecedentes

Se comprobó por primera vez la actividad antibacteriana de extractos de cloroformo y ácidos grasos en benceno de clorelina de la especie *Chlorella vulgaris*, capaces de inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas y gram negativas, posteriormente se realizaron investigaciones en algas del género *Scenedesmus* y otras algas más, encontrándose varios grupos funcionales químicos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, sin embargo el potencial bioactivo de otras algas sigue siendo incierto (Shannon y Abu-Ghannam, 2016).

El Wahidi *et al.* (2015), estudió la actividad antimicrobiana de extractos de diclorometano y etanol de diez macroalgas marinas contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, empleando el método de difusión en disco de agar, seis de los extractos de las macroalgas presentaron actividad para al menos una de las bacterias evaluadas y cinco de los extractos resultaron ser activos contra dos levaduras, para ambos casos la zona de inhibición fue mayor a 15 mm, las diferentes especies mostraron tener potencial antibacteriano.

También se demostró el potencial antioxidante, antimicrobiano y citotóxico en extractos de acetona obtenidos de *Ulva Lactuca* y *Enteromorpha intestinalis*, comprobándose la actividad antimicrobiana contra *Bacillus mycoides* y *Bacillus subtilis* con una concentración mínima inhibitoria entre 0.156 y 5 mg/ml, sin embargo, a comparación de los antibióticos utilizados la actividad fue relativamente baja. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium purpurenses* no presentaron actividad antimicrobiana, asimismo se encontró la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides (Kosanić *et al.*, 2015).

Un grupo bastante estudiado es *Cladophora*, el cual cuenta con más de 183 especies, estas poseen una gran variedad de metabolitos secundarios que se encargan de proteger a esta alga de la variación de temperatura, la radiación ultravioleta y los nutrientes, asimismo, presenta propiedades biológicas como actividades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, antiparasitarias, citotóxicas entre otras (Munir *et al.*, 2019). En un estudio se evaluó el potencial antimicrobiano de *Cladophora glomerata* mediante la obtención de extractos metanólicos (200 µg/ml) contra bacterias y hongos, comprobándose un amplio espectro antimicrobiano y antifúngico, presentando mayor sensibilidad frente a *Staphylococcus*

aureus (Unpaprom *et al.*, 2020). Por otra parte se obtuvieron extractos en acetona, extractos acuosos fríos y calientes de *Cladophora glomerata*, en concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 mg/ml, contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo el extracto de acetona caliente el que mostró mejor eficiencia con zonas de inhibición desde 7.5 hasta 18 mm, los compuestos químicos encontrados fueron alcaloides, fenoles, taninos, flavonas, resinas y taninos, además se utilizó GC-MS para identificar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, estos fueron metadona, benzonitrilo, bromobutiloxicalcona, bencenetanamina y ciclodecasiloxano (Rusl y Dwaish, 2018).

Se investigó la bioactividad de los constituyentes de ácidos grasos de *Chaetomorpha vieillardii* y *Cladophora glomerata* como agentes antimicrobianos naturales, a partir de extractos obtenidos con hexano en concentraciones de 0, 1, 10, 25, 75 y 100 mg ml⁻¹, contra *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. La concentración mínima inhibitoria de los extractos de *C. vieillardii* y *C. glomerata* contra *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* respectivamente fue de 1-10 mg ml⁻¹. Ambas algas mostraron la presencia de alcaloides, terpenoides, esteroides flavonoides y cumarinas, asimismo el extracto de *C. vieillardii* presentó mejor actividad (El-Adl *et al.*, 2022).

Se comprobó la presencia de compuestos fenólicos en extractos de *Ulva lactuca*, *Sargassum polycystum* y *Palmaria palmata*, además se determinó el efecto antibacteriano de cada extracto contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, presentando una mejor inhibición el extracto de *Sargassum polycystum* frente a *E. coli* y *S. typhi* con un diámetro de la zona de inhibición de 11 y 11.5 mm correspondientemente. Los compuestos fenólicos que poseen algunas especies de macroalgas pueden tener un efecto antibacteriano, esto dependerá de la temperatura a la que se obtenga el extracto y del tipo de bacterias que se utilice (Scania y Chasani, 2021).

Azizi *et al.* (2020), evaluaron la actividad antibacteriana de compuestos esteroideos aislados de *Ulva fasciata*, a través de dilución en caldo sobre bacterias gram negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, los compuestos aislados no presentaron actividad antibacteriana sobre las bacterias gram negativas, en cambio para las bacterias gram positivas

presentaron una fuerte actividad con concentraciones mínimas inhibitorias desde 200 hasta 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Dwaish (2018), confirmó la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos en frío y caliente de la especie *Enteromorpha ralsii* de las cuales aplicó concentraciones de 12,5, 25, 50 y 100 mg/ml, contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo más eficaz el extracto metanólico en caliente con una zona de inhibición entre 9 y 23 mm, asimismo, mediante los análisis químicos se detectó la presencia de taninos, terpenoides, flavonoides y saponinas, siendo caracterizados por GC-MS.

Alaguprathana y Poonkothai (2017), analizaron extractos del alga verde *Pithophora varia*, obtenidos con acetona, benceno, cloroformo, y etanol por separado, para verificar la actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas; *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, y gram negativas; *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, mediante el método de difusión en pozos de agar, siendo el extracto etanólico el que presentó una actividad significativa con una zona de inhibición de 18 a 20 mm, los fitoquímicos que se hallaron en su composición fueron alcaloides, fenoles, aminoácidos, saponinas, taninos, esteroides, flavonoides y quinonas.

Latifah *et al.* (2020), determinaron el potencial antimicrobiano de extractos de n-hexano, acetato de etilo y metanol de *Halimeda macroloba* las cuales contenían esteroides, terpenoides y alcaloides, los extractos obtenidos con acetato de etilo exhibieron una mejor actividad antimicrobiana en una concentración de 4 μg , frente a *Aeromonas hydrophilla* presentó una zona de inhibición de 8.27 mm y para *Vibrio harveyi* fue de 8.23 mm.

Pereira *et al.* (2021), indican que en España existen algas invasoras de las cuales *Caulerpa taxifolia*, *Codium fragile* y *Caulerpa racemosa* son algas verdes, por lo que la valorización como fuente de compuestos bioactivos podría ser una estrategia para reducir su población y al mismo tiempo obtener beneficios, pero antes es necesario evaluar su composición química y nutricional, los extractos de *Codium fragile* presentaron compuestos fenólicos y taninos, los cuales mostraron actividades antioxidantes, anticancerígenas y anticoagulantes.

Begum *et al.* (2017), reportaron la actividad antifúngica, antibacteriana e insecticida de *Chara schweinitzii* mediante la obtención de extractos de n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol, presentando mayor inhibición del crecimiento bacteriano los extractos de metanol. Además se ha comprobado el potencial *in vitro* de una especie de *Chara* recolectada en la India, para la cual se aplicó el método de maceración con metanol durante dos semanas, comprobándose su actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas y reportando la presencia de metabolitos primarios y secundarios, como taninos, flavonoides, saponinas, esteroides, alcaloides y ácidos grasos (Manikanta y Malammanavar, 2018).

Snehalatha y Digamber (2017), examinaron la actividad antimicrobiana de *Chara vulgaris* mediante extractos con acetona, cloroformo, metanol, éter de petróleo y agua, los diferentes extractos presentaron un efecto antimicrobiano contra los diferentes patógenos utilizados, lo que demuestra que ésta especie es una fuente potencial de compuestos bioactivos. Asimismo, Cai *et al.* (2013), confirmó la actividad antimicrobiana de extractos de *Nitellopsis obtusa* y *Chara vulgaris* frente a bacterias gram negativas y positivas, presentando el extracto de etanol los valores más altos de inhibición contra bacterias gram negativas y levaduras.

El análisis químico de *Chara vulgaris*, reveló la presencia de alcaloides, fenoles, terpenos, esteroides, flavonas, resinas, saponinas y taninos, además se realizó un análisis de masas GC, donde se observó la presencia de muchos compuestos con actividad antimicrobiana (Dwaish *et al.*, 2018).

Otro estudio realizado en extractos metanólicos de *Chara vulgaris*, *Cladophora glomerata* y *Spirogyra crassa* para comprobar la actividad antibacteriana, insecticida, citotóxica y fitotóxica, reportaron que los extractos obtenidos de *S. crassa* tuvieron mayor bioactividad, además en los resultados de GC-MS se evidenció la existencia de ácidos grasos, como alcanos y alquenos (Shah *et al.*, 2022). En *Chara globularis* se analizaron esteroides, compuestos volátiles y ácidos grasos, donde se llegó a identificar cinco esteroides y 12 ácidos grasos, comprobándose también la actividad antibacteriana de extractos obtenidos con diferentes solventes después de 72 horas de incubación (Bankova *et al.*, 2001).

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema

El lago Titicaca alberga una gran biodiversidad de especies de flora y fauna, dentro de las especies de flora destacan principalmente las macrófitas, donde se encuentran las carofíceas, que son un grupo de macrófitas que llegan a ocupar aproximadamente la tercera parte de la superficie vegetal. *Chara globularis* pertenece a este grupo, por lo que podría considerarse como una especie dominante. Conforman nichos ecológicos para muchas especies en el lago, además son fijadoras de calcio, almacenan carbono y nutrientes en su biomasa, han sido utilizadas en procesos de fitorremediación y son buenas indicadoras de la calidad del agua. Pese a la gran cantidad de biomasa producida por los carófitos y su importancia ecológica, no se les conoce un uso comercial y los estudios de su fitoquímica son limitadas. Sin embargo, se sabe que las algas son productoras de una variedad de metabolitos secundarios que pueden ser utilizados en beneficio del hombre y aún no se han realizado estudios de esas propiedades en esta especie que habita las aguas del lago Titicaca.

2.2 Enunciados del problema

2.2.1 Enunciado general

¿Cuál será la composición fitoquímica de *Chara globularis* y el efecto del extracto etanólico frente a cepas bacterianas?

2.2.2 Enunciados específicos

- ¿Qué metabolitos secundarios presentará la macroalga *Chara globularis*?

- ¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a cepas bacterianas?
- ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *C. globularis* capaz de inhibir el crecimiento bacteriano?

2.3 Justificación

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado las propiedades de las plantas en su beneficio, por lo cual en las últimas décadas las algas han sido un recurso de interés en investigaciones científicas debido a la amplia gama de compuestos bioactivos que ellas poseen, mediante procesos que permiten la extracción e identificación de sus principios activos. Los cuerpos de agua son una fuente de recursos por descubrir y es aquí donde las diferentes especies sintetizan muchos metabolitos secundarios con diferentes propiedades biológicas que pueden ser utilizadas en beneficio de la salud.

Debido a la importancia de los metabolitos secundarios producidos por las algas que poseen diferentes efectos en los organismos vivos, como actividades antimicrobianas, antibacterianas, antivirales, citotóxicas, insecticidas, entre muchas otras y a la aún escasa investigación de estas propiedades de macroalgas en Perú, esta investigación será de gran aporte a la investigación científica, con la cual se generará una línea base sobre los metabolitos secundarios presentes en la especie *Chara globularis*, esto a su vez permitirá continuar o desarrollar nuevas investigaciones sobre el potencial de los metabolitos secundarios y sus bioactividades, pues la diversidad de sustancias activas contenidas en una sola especie es muy amplia, además la composición y contenido de metabolitos secundarios varía de acuerdo a las condiciones geográficas, de clima, suelo y estado vegetativo. Asimismo, *C. globularis* es una macrófita que tiene la capacidad de producir una gran cantidad de biomasa por lo que se la puede ver conformando densos prados en diferentes zonas del lago Titicaca, debido a estas características este recurso podría ser una alternativa sostenible, en el reemplazo del uso de productos químicos para combatir microorganismos patógenos.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Determinar la composición fitoquímica de *Chara globularis* y la actividad antibacteriana del extracto etanólico frente a cepas bacterianas.

2.4.2 Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en la macroalga *Chara globularis*.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a cepas bacterianas.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Chara globularis* capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis general

Chara globularis posee metabolitos secundarios que tienen actividad antibacteriana frente a bacterias gram positivas.

2.5.2 Hipótesis específicas

- Los metabolitos secundarios presentes en *Chara globularis* serán fenoles y terpenos.
- El extracto etanólico de *Chara globularis* presenta inhibición frente a bacterias gram positivas.
- La concentración mínima inhibitoria será de 0.4 mg/μl.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

La macroalga *Chara globularis* fue recolectada en la Península de Chucuito (S 15°52'56.15", W 69°53'22.732" (Figura 9), la cual se encuentra unida al territorio peruano por un istmo de 1.5 km de ancho y está localizada a orillas del lago Titicaca. El distrito de Chucuito conjuntamente con Platería, abarcan la península, estas se ubican al sur de la provincia en el departamento de Puno a una altitud de 3882 msnm. Chucuito presenta un clima templado y semiseco, las precipitaciones se dan durante los meses de diciembre a marzo, las temperaturas más bajas se producen en el mes de julio y el mes más cálido es noviembre.

Asimismo, los análisis de compuestos volátiles, ácidos grasos y la obtención del extracto etanólico se llevó a cabo en el laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, los compuestos del extracto etanólico fueron analizados en el Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo en Brasil y las pruebas de actividad antibacteriana se realizaron en el Laboratorio de la Clínica Americana de la ciudad de Juliaca.

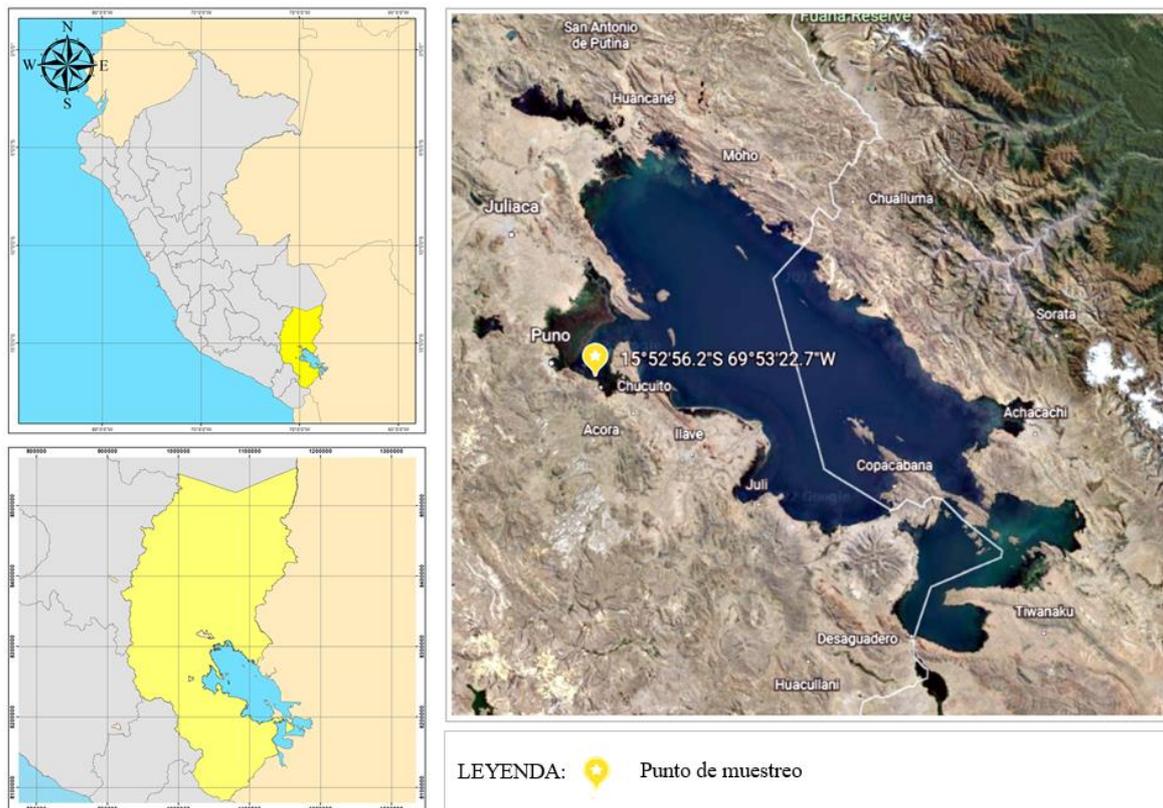


Figura 9. Ubicación del punto de muestreo de *Chara globularis* en el lago Titicaca.

3.2 Población

Población vegetal: está constituida por la macroalga *Chara globularis* recolectada del lago Titicaca.

Población bacteriana: está constituida por las siguientes cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus spizizenii* ATCC 6633.

3.3 Muestra

La muestra en estudio estuvo conformada por 10 kilos de la macroalga *Chara globularis*, además de cuatro cepas bacterianas; una bacteria gram negativa *Escherichia coli* y tres bacterias gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus subtilis* subsp *spizizenii* ATCC 6633, asimismo se utilizó diferentes

concentraciones: 0.12 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 1 mg/mL y 2 mg/mL del extracto etanólico de *Chara globularis* Thuill.

3.4 Método de investigación

La investigación es de tipo experimental *in vitro* y descriptiva, la identificación de metabolitos secundarios se realizó mediante el uso de diversos métodos cromatográficos y químicos, donde se obtuvo los diferentes compuestos presentes en la macroalga. La parte experimental microbiológica tuvo un diseño completamente al azar (DCA), para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico, se preparó un extracto obtenido por maceración en etanol lo que permitió la extracción de metabolitos secundarios, para comprobar la actividad antibacteriana frente a *E. coli*, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *B. spizizenii* ATCC 6633. Se observó la capacidad de inhibición del extracto, midiendo los halos de inhibición de cada tratamiento del extracto aplicado a las diferentes bacterias *in vitro*. Para establecer la concentración mínima inhibitoria del extracto por el método de difusión en disco, se trabajó con 4 unidades experimentales, conformado por 3 repeticiones para cada dosis utilizada, cada unidad experimental estuvo conformada por determinadas concentraciones del extracto etanólico de *C. globularis* (0.12 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 1 mg/mL y 2 mg/m). Además, para cada unidad experimental se contó con un control positivo que estuvo representado por el fármaco para garantizar la validez de cada prueba y un control negativo que consta de discos embebidos con el disolvente.

3.5 Descripción detallada de métodos por objetivos específicos

3.5.1. Recolección y preparación de la muestra

La macroalga *Chara globularis* fue recolectada a una profundidad de 3 m aproximadamente, durante el mes de febrero del 2021 en la península de Chucuito ubicada a una latitud 15°52'56.15" S, longitud 69°53'22.732" W. El espécimen fue identificado por el ficólogo César Acleto Osorio del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). La macroalga fue lavada *in situ*, luego se colocaron en bolsas de polietileno para ser transportadas al laboratorio, donde se lavaron con agua corriente y agua destilada para quitar todo material no deseado como arena, epífitas y fauna acompañante. La muestra vegetal fue deshidratada a temperatura

ambiente y pulverizada hasta que se obtuvo un polvo fino, posteriormente se almacenó en un frasco cubierto por papel aluminio y se refrigeró a 4 °C hasta el momento de su uso.

3.5.2. Marcha fitoquímica preliminar

Para la detección preliminar de los diferentes metabolitos secundarios presentes en la especie *C. globularis*, se tomó 50 gr de la muestra molida de la macroalga (talo, ramas y rizoides). Para los análisis de la marcha fitoquímica se tomó como referencia a Look de Ugaz (1994). La muestra se sometió a una extracción asistida por ultrasonido por separado con agua destilada (H₂O), agua acidulada (H₂O⁺), etanol (ETOH) y cloroformo (CHCl₃), en una relación de peso/volumen de 1:10. Posteriormente cada extracto fue filtrado y se procedió con los ensayos fitoquímicos correspondientes. La identificación de los metabolitos secundarios se realizó mediante pruebas cualitativas de reacción a la gota (Tabla 2).

Tabla 2

Reacción a la gota para determinar la presencia de metabolitos secundarios

Metabolitos	Reactivos	Procedimiento	Reacción positiva
Alcaloides	Dragendorff	Ex. H ₂ O ⁺ + Dragendorff	Precipitado naranja
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	Ex. ETOH + FeCl ₃ 10%	Color verde o azul
Quinonas y antraquinonas	Borntrager	Ex. CHCl ₃ + C ₇ H ₈ NaOH 5%	Coloración roja
Saponinas	Agua destilada	Ex. Acuoso	Formación de espuma
Taninos	Gelatina	Ex. Acuoso + 1 gota de gelatina	Precipitado blanco
Triterpenos y esteroides	Buerchard	Ex. CHCl ₃ + anhídrido acético + H ₂ SO ₄ cc	Triterpenos: coloración rojo naranja Esteroides: coloración verde azulado

3.5.3. Identificación de metabolitos secundarios

3.5.3.1. Determinación de compuestos volátiles

a. Aparatos y fibra SPME

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con un detector de espectrometría de masas (MSD) modelo 5963B Agilent Technologies. La columna capilar que se utilizó fue una Agilent HP-5MS 5% Fenil Metil Siloxano 30m x 0.25id x 0.5um film. La fibra empleada para el análisis fue de polidimetilsiloxano PDMS (fibra no polar para la extracción de analitos no polares) con un grosor de película de 100 μm (Peña *et al.*, 2008).

b. Microextracción en fase sólida

Se colocó 0.85 gr de la muestra fresca congelada en un vial de 20 ml (Headspace Agilent), el mismo que fue sellado con una tapa de aluminio con septa PTFE/silicone, 20 mm, Agilent a presión y se colocó en un horno (Agilent Network Headspace Sampler G 1888) a 40 °C por 20 horas. La extracción se realizó introduciendo la fibra SPME 50/30um Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDM) Supelco 57328-U en el espacio de cabeza durante 10 minutos a 40 °C para establecer el equilibrio entre el espacio de cabeza y la muestra, luego la fibra se introdujo en el puerto del inyector del GC y el tiempo de desorción fue de 5 minutos a 250 °C. (Peña *et al.*, 2008).

c. Condiciones del GC-MS

Para el inyector del cromatógrafo se consideró una temperatura de 250 °C, y se utilizó helio (pureza 99.9995%) a un flujo continuo de 1mL/min. La temperatura del horno se estableció a 40 °C durante 5 min, posteriormente incrementándose 1.5 °C/min hasta 80 °C, para finalizar con 5 °C/min hasta 200 °C. Se mantuvo la temperatura final por 0.5 min. La inyección se realizó en modo splitless por 2 min a 250 °C de temperatura, utilizando una guía de entrada SPME y septas. (Peña *et al.*, 2008).

3.5.3.2. Determinación de ácidos grasos

Se pesó 1.0 g de muestra en un tubo de ensayo de 20 ml con tapa rosca, se adicionó 10 mL de hexano (J.T. Baker), se homogenizó en un vortex (VWR Vortex Mixer 945302) y se centrifugó a 4000rpm (Greetmed, GT119-100T, China) por 10 minutos, a la fase orgánica se añadió 100 μ L de hidróxido de potasio (J.T. Baker) 2N en metanol (J.T. Baker) (11,2 g en 100 mL) para obtener los ésteres metílicos de ácidos grasos. Se cerró el tubo y se agitó en vortex durante 30 segundos, luego se centrifugó por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante transparente a un vial de 2 ml para el análisis por GC/MS. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con un detector GC/MSD Agilent 5975B e inyector automático Agilent 7683B. Se utilizó una columna Agilent DB-23, 60m x I.D 0.250 x 0,15 μ m Film. La temperatura del horno se programó a 140 °C, con un incremento de 5°C cada minuto hasta 230 °C, 10 min a 230 °C y el tiempo de análisis fue de 33 minutos, la temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C, 0.6 mL/min de flujo de arrastre (helio) y el volumen de inyección fue de 1.0 μ L (David *et al.*, 2002).

La identificación para todos los compuestos volátiles y ácidos grasos se realizaron en base al tiempo de retención y los espectros de masa, mediante la comparación con la base de datos de espectros de masas del National Institute of Standards and Technology versión 11 (NIST v11) donde se reporta el % de coincidencia.

3.5.3.3. Análisis de compuestos fenólicos por HPLC-MS

La muestra fue analizada por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS). El cromatógrafo de líquidos fue de la marca Shimadzu (Kyoto, Japón), el cual consta de dos bombas modelo LC-20AD, con un muestreador automático SIL-20AHT y un detector UV/Vis SPD-20A, horno de columna CTO-20A y un controlador CBM-20A. La columna fue una Phenomenex Luna PFP (2) 5 μ m, 100 A, 150 \times 2 mm. La fase móvil estuvo compuesta por solvente A: H₂O y B: MeOH, el gradiente utilizado fue de 0 min - 10 % de B, 2 min - 10 % de B, 2 a 15 min, 10 a 25 % de B, 15 a 50 min del 30 al 100 % de B, mantener el 100 % durante 3 min. Los análisis se realizaron a 254 nm y 330 nm, el horno de la columna se ajustó

a 40 °C y el flujo de la fase móvil al espectrómetro de masas fue de 10 µL/min. El espectrómetro de masas (Bruker MicroTOF-QII) funcionó en modo MS/MS positivo con gas N₂ para nebulización y secado a 4 bar y 8 L/min, respectivamente. La temperatura de secado se programó a 200 °C, la energía de colisión y cuadrupolo fueron de -12 y 6 eV, respectivamente, y la energía capilar fue de 4500 V. Los conos RF1 y RF2 se programaron a 400 y 200 Vpp, respectivamente, y el hexapolo RF se estableció en 200 Vpp. Para el modo negativo la programación fue la misma a excepción de la energía capilar que fue de 3500 V (Millones-Gómez *et al.*, 2021).

3.5.4. Preparación del extracto

Se utilizó el método de maceración, se mezcló 100 g de *Chara globularis* en polvo con 500 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 h, luego se filtró el extracto utilizando un papel filtro Whatman N° 1 y se repitió la extracción hasta agotamiento y completar la proporción de 1:10 (p/v), luego se evaporó a sequedad, para lo cual se concentró el extracto a una presión reducida de 45° C en un evaporador rotatorio (IKA RV-10, IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Alemania) a 30 rpm. El extracto seco disolvió en etanol al 70% y se procedió a realizar una partición con cloroformo para separar la fase acuosa donde se encuentran los fenoles, azúcares, ácidos orgánicos y compuestos solubles en agua, de los compuestos no polares, seguidamente se diluyó con acetónitrilo y agua. El extracto se filtró y evaporó hasta sequedad, luego se diluyó en metanol y agua. Posteriormente se purificó la parte acuosa utilizando un cartucho Biotage SNAP C18 de 12 g, la muestra obtenida se evaporó a sequedad, se pesó y almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso (Rodríguez-Saona y Wrolstad, 2001).

3.5.5. Productos químicos y cultivos bacterianos

Los medios de cultivos utilizados fueron Agar Mueller Hinton (Merck) y Caldo de Tioglicolato (Merck). Para el ensayo se utilizaron microorganismos tipificados por la American Type Culture Collection (ATCC), como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus spizizenii* ATCC 6633. La cepa clínica de *Escherichia coli* se obtuvo del laboratorio de la Clínica Americana de Juliaca. El antibiótico utilizado fue gentamicina (GEN) de 10 µg (BIODISC SAC).

3.5.6. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del extracto etanólico de *C. globularis*, se evaluó mediante el método de difusión en disco sugerido por el Clinical and Laboratory Standards Institute en agar Mueller-Hinton (Merck) (CLSI, 2022). Se pesó 50 mg del extracto etanólico y se disolvió en 2,5 ml de metanol, luego se impregnaron discos estériles de 6 mm para obtener concentraciones de 0.125, 0.25, 0.50, 1.00 y 2.0 mg/disco (Mostafa *et al.*, 2018). Con un asa estéril se cogió de tres a cuatro colonias que se transfirieron a un tubo que contenía 5 ml de solución salina (0.9% NaCl), para las pruebas se utilizaron concentraciones finales de 1.5×10^8 UFC/mL de cada inóculo, ajustadas a 0,5 del estándar de McFarland. Con la ayuda de un hisopo estéril empapado de las suspensiones bacterianas se inocularon las placas de Agar Mueller Hinton, por triplicado para cada cepa (Barbosa *et al.*, 2020). En la parte superior del agar se colocaron los discos con las diferentes concentraciones, además se utilizaron discos con 10 µg de gentamicina como control positivo y discos impregnados con metanol como control negativo. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas, transcurrido este tiempo se procedió a medir los halos de inhibición con un vernier digital (Pérez-Peralta *et al.*, 2019), cada ensayo se realizó por triplicado. La actividad antibacteriana se determinó midiendo la zona de inhibición que se produjo alrededor de cada disco (incluyendo el diámetro del disco), luego se calculó el porcentaje de inhibición, en base al valor promedio de las mediciones (Ramírez y Díaz, 2007).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Ø halo del extracto} - \text{Ø halo blanco})}{(\text{Ø halo control positivo} - \text{Ø halo blanco})} \times 100$$

Donde:

Ø control positivo = Gentamicina en mm

Ø control negativo = Metanol 6mm

3.5.7. Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria es la concentración más baja de un agente antibacteriano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano después de una incubación de

24 horas. Por lo cual la CIM se estableció como la concentración más baja del extracto etanólico de *C. globularis* a la que no se observó crecimiento visible, aplicado mediante el método de difusión en disco en las placas Petri luego de una incubación a 37°C durante 24h (Mostafa *et al.*, 2018).

3.5.8. Prueba estadística

El programa estadístico que se utilizó fue R Studio, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk y Levene para comprobar los supuestos de Normalidad y Homogeneidad. Se utilizó el análisis de varianza en una vía, considerando como factor de estudio las concentraciones de extracto etanólico de *Chara globularis* frente a bacterias patógenas, la variable de respuesta fue la inhibición expresada en la formación del halo de inhibición. Cuando el análisis de varianza resultó significativo ($p < 0.05$) se procedió a ejecutar la prueba de rango múltiple de Duncan para las comparaciones específicas entre concentraciones.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de metabolitos secundarios

4.1.1. Marcha fitoquímica preliminar

Los resultados de la marcha fitoquímica preliminar permitieron determinar de manera cualitativa la presencia de ciertos grupos de metabolitos secundarios en las diferentes partes anatómicas de *C. globularis* (talo, ramas y rizoides); como los compuestos fenólicos y triterpenos y/o esteroides, siendo este último grupo de compuestos los más abundantes. Por el contrario, no encontró la presencia de alcaloides, quinonas, antraquinonas, saponinas y taninos (Tabla 3).

Tabla 3

Determinación cualitativa de los fitoquímicos de Chara globularis Thuill

<i>Chara globularis</i>	Alcaloides	Compuestos fenólicos	Quinonas y antraquinonas	Saponinas	Taninos	Triterpenos y esteroides
Talo	-	++	-	-	-	+++
Ramas	-	++	-	-	-	+++
Rizoides	-	++	-	-	-	+++

Negativo (-), poco (+), moderado (++), abundante (+++).

Anthoni *et al.* (1987), encontraron en *Chara globularis* un alcaloide al cual denominaron Charamin, asimismo un estudio realizado en la misma especie pero recolectada en el continente Europeo no presentó compuestos fenólicos en su composición, pero sí

compuestos clorados, esteroides y terpenoides (Bankova *et al.*, 2001). Sin embargo, en *Chara* sp especie recolectada en la India, se reportó la presencia de alcaloides, esteroides, flavonoides, saponinas, taninos y ácidos grasos (Manikanta y Malammanavar, 2018). En cambio, esta investigación realizada en *C. globularis*, especie que fue recolectada del lago Titicaca, se encontró la presencia de compuestos fenólicos y triterpenos. La variabilidad de los grupos de metabolitos secundarios presentes para una misma especie y entre las diferentes especies que conforman un mismo grupo taxonómico, podrían atribuirse a factores de desarrollo, los cuales influyen en la biosíntesis y almacenamiento de los metabolitos secundarios (Kong *et al.*, 2018). Entre los factores de desarrollo, se tiene los cambios bióticos y abióticos que presenta cada hábitat, entre los componentes abióticos se puede mencionar el agua, la luz, la temperatura y factores ambientales, la interacción de todos factores determinarán la fluctuación de los metabolitos secundarios (Kong *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020).

4.1.2. Determinación de compuestos volátiles

Se identificaron un total de 49 compuestos en el espacio de cabeza de la muestra de *Chara globularis* utilizando el método SPME-GC-MS (Tabla 4). Cada pico se identificó comparando el espectro con los registrados en la biblioteca de espectros de masas del National Institute of Standards and Technology (NIST). Se consideraron los compuestos con una coincidencia mayor al 70%, los cuales fueron 27 compuestos que representaron el 63.25% del total de las áreas de pico integradas. Se encontraron compuestos como alcoholes, aldehídos, hidrocarburos, cetonas, ésteres, furanos, alcanos y terpenos. Los compuestos volátiles más abundantes fueron: 1-Pentano-3-ol (3.97%); Hexanal (8.35%); 2-Hexenal, (E)- (3.35%); 1-Hexanol (3.17%); Benzaldehído (7.39%); 1-Octen-3-ol (8.97%); 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil- (5.28%) y 1-Mentona (5.60%).

Tabla 4

Compuestos orgánicos volátiles de la macroalga Chara globularis

Pico	TR (min)	Nombre del compuesto	CAS	Qual	Contenido relativo %
1	1.9339	Etanol	000064-17-5	64	16.7987
2	4.0333	Butanal, 3-metilo-	000590-86-3	91	2.0106



3	4.7118	1-Pentano-3-ol	000616-25-1	83	3.9757
4	7.5875	2-Pentenal, (E)-	001576-87-0	59	0.4691
5	8.1849	Toluene	000108-88-3	94	2.7462
6	10.0684	Hexanal	000066-25-1	90	8.3573
7	13.8521	2-Hexenal, (E)-	006728-26-3	98	3.359
8	15.0976	Benceno, 1,3-dimetil-	000108-38-3	90	0.2988
9	15.2528	1-Hexanol	000111-27-3	90	3.1703
10	16.8831	1,3,5,7-Cyclooctatetraeno	000629-20-9	94	0.5644
11	17.8147	Heptano, 3,4,5-trimetil-	020278-89-1	38	0.4367
12	23.2287	Benzaldehído	000100-52-7	97	7.3851
13	24.5552	Ácido oxálico, éster pentílico isobutilo	1000309-37-0	36	0.2842
14	24.8623	2-Pentanol, propanoato	054004-43-2	40	5.5644
15	25.4733	1-Octen-3-ol	003391-86-4	90	8.9708
16	26.1922	5-Hepten-2-ona, 6-metil-	000110-93-0	50	2.3972
17	26.6107	Furano, 2-pentilo-	003777-69-3	58	1.7592
18	27.0731	3-Octanol	000589-98-0	78	0.4704
19	27.4849	Decano	000124-18-5	95	1.098
20	27.7583	Propano, 1-isocianato-	000110-78-1	38	0.2736
21	29.4426	Benceno, 1-etil-3-metilo-	000620-14-4	80	0.3942
22	29.7734	Nonano, 2,6-dimetil-	017302-28-2	47	0.5395
23	30.1852	D-Limoneno	005989-27-5	98	2.8822
24	30.7286	Ciclohexanona, 2,2,6-trimetil-	002408-37-9	76	0.2258
25	32.4736	Benceno, 1-metil-3-propil-	001074-43-7	72	0.342
26	32.6998	1H-Pirrol, 1-butil-	000589-33-3	28	0.4066
27	33.0778	1H-Pirrol, 1-butil-	000589-33-3	59	0.7839
28	33.7461	Decano, 2-metil-	006975-98-0	47	0.4539
29	34.2423	Decano, 3-metil-	013151-34-3	49	0.3365
30	35.4743	(2,2-Dimetilciclopropil)-metanol	1000222-14-0	27	0.2454
31	35.9131	1-Nonen-4-ol	035192-73-5	50	0.9487
32	36.2776	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	000078-70-6	86	5.283
33	36.5476	Nonanal	000124-19-6	68	0.6575
34	36.6759	Ciclohexanol, 2,6-dimetil-	005337-72-4	58	1.6357
35	37.1417	Benceno, 2-etil-1,4-dimetil-	001758-88-9	74	0.2287
36	38.2083	Pentilciclohexano	004292-92-6	87	0.3853
37	38.4243	(E)-1-Fenil-1-buteno	001005-64-7	38	0.3473
38	38.7281	2,6,6-Trimetil-2-ciclohexeno-1,4-diona	001125-21-9	58	0.5465
39	39.1331	Benceno, 1-etil-2,3-dimetil-	000933-98-2	91	0.2462
40	39.2749	1-Mentona	014073-97-3	98	5.5959
41	40.0782	3-metilundecano	001002-43-3	72	0.32
42	41.6646	1,14-Tetradecanodiol	019812-64-7	27	0.675
43	41.992	Undecano, 2,6-dimetil-	017301-23-4	86	0.9419
44	42.3633	1-Ciclohexeno-1-carboxaldehído, 2,6,6-trimetil-	000432-25-7	97	0.5632

45	43.1261	Ciclohexanona, 5-metil-2-(1-metiletilideno)-	015932-80-6	97	1.1739
46	44.2636	2,6-dimetiloctano, -	002051-30-1	59	0.5189
47	44.8509	Anetol	000104-46-1	98	1.6796
48	45.2222	1H-Indeno, 1-etilideno-	002471-83-2	52	0.3395
49	51.2403	trans-beta.-Ionona	000079-77-6	98	0.5828
50	56.4856	Tetradecano	000629-59-4	58	0.331

En la figura 10 se pueden observar los espectros de masas relacionados con la abundancia de cada compuesto en relación a la masa/carga. Cada pico corresponde a un compuesto diferente, los cuales se presentan en diferentes tiempos, mientras mayor es el tiempo que requiera el compuesto para atravesar la columna mayor será el tiempo en el que aparecerá. Y a mayor altura del compuesto mayor será la abundancia de iones que se generarán al fraccionarse.

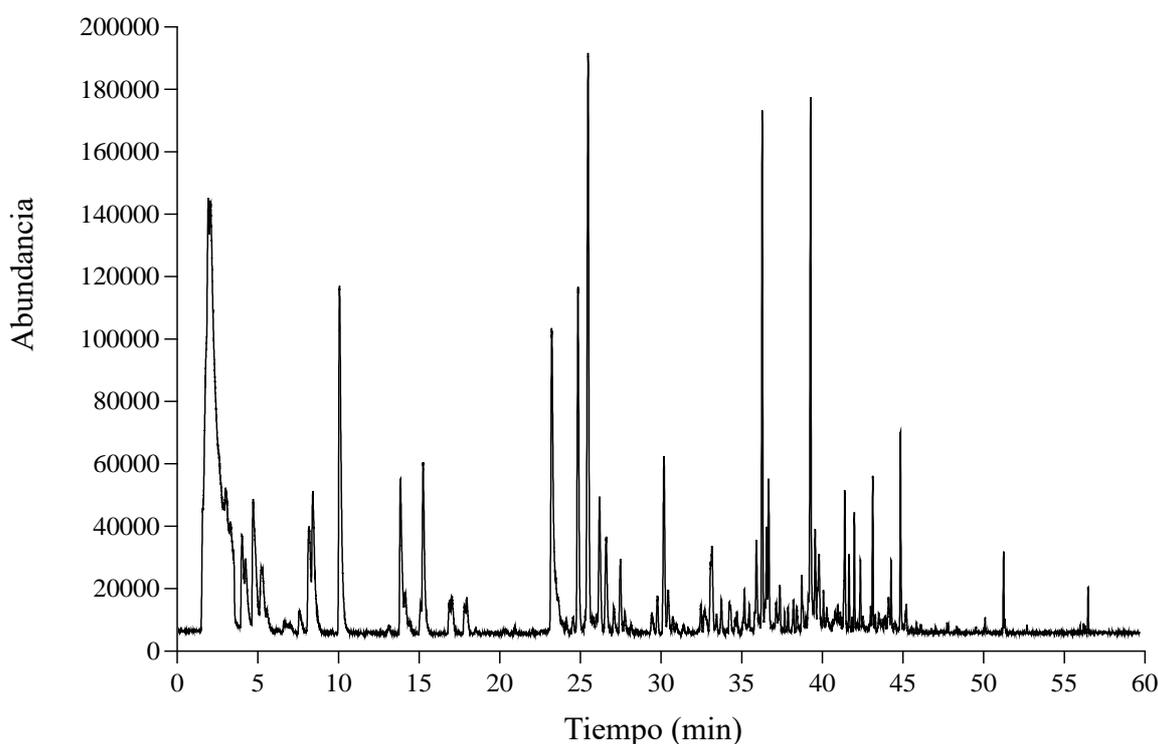


Figura 10. Cromatograma de compuestos volátiles extraídos de *Chara globularis* por SMPE-GC-MS

Los compuestos orgánicos varían en función a la especie analizada, por ejemplo; en un estudio se evaluó tres especies de *Chara* las cuales son *Chara inconnexa* 1 y 2, *Chara vulgaris* y *Nitellopsis obtusa*, se hallaron 27, 33, 37 y 31 compuestos volátiles respectivamente, haciendo un total de 43 compuestos entre las tres especies (Zhang *et al.*, 2010). En comparación con los compuestos hallados en este estudio para *Chara globularis* se asemejan seis compuestos, siendo estos 1-Pentano-3-ol; tolueno; hexanal; 2-hexanal, (E)-; 1-hexanol y tetradecano, de los cuales se saben que tiene propiedades repelentes. De manera similar, se halló compuestos volátiles como 4-metiltiol-1,2-ditio y S-metiltiol-1,2,3-tritio y S-metiltiol-1,2,3-tritio en *Chara globularis*, con propiedades insecticidas (Jacobsen y Pedersen, 1983). Por otra parte, Rzama *et al.* (2002) reportó n- heptadecano, 7-heptadeceno, fitol, 6,10,14-trimetilpentadecano-2-ona y metil undecanoato como los compuestos volátiles más abundantes encontrados en *Chara vulgaris*.

Los compuestos hallados cuentan con diferente potencial bioactivo, como por ejemplo se tiene al compuesto volátil E-2-hexenal que está presente en plantas incluidas las algas (Nafis *et al.*, 2021), que cumple una función en la transferencia de información entre plantas e insectos y su producción se da ante una situación de estrés o en caso de generarse daño vegetal (Spyropoulou *et al.*, 2017). Otro compuesto volátil es el benzaldehído, que presenta actividad antibacteriana e insecticida (Neto *et al.*, 2021), en la industria tiene un valor económico pues es utilizado en la fabricación de cosméticos, fragancias y también es un precursor de aditivos de plásticos (Huang *et al.*, 2022). También se halló D-limoneno, este compuesto es un terpeno, componente principal de los cítricos, considerado un disolvente natural, limpiador y desengrasante (Robichaud *et al.*, 2005), la producción de este compuesto podría atribuirse a la variabilidad de la luz y temperatura (Meskhidze *et al.*, 2015). Asimismo, se registró la presencia de anetol, que es una clase de aceite vegetal aromático no comestible, altamente volátil y mayormente es utilizado como perfume en la industria cosmética y como un aromatizante en alimentos, además se ha reportado propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y anestésicas (Tao *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

La diferencia entre los compuestos hallados podría atribuirse a la diferencia de especies y al hábitat de procedencia (Zhang *et al.*, 2010), otros factores que influyen en la emisión

de COV son la luz, la temperatura, las condiciones de nutrición, el estrés químico y físico del medio ambiente acuático en el que se desarrolla el alga (Ye *et al.*, 2018; Zuo, 2019), además del clima y condiciones geográficas que varían de un lugar a otro (Islam *et al.*, 2018; Hassanzadazar *et al.*, 2019).

4.1.3. Determinación de ácidos grasos

Se identificaron 25 compuestos distribuidos en diferentes tiempos de retención (Tabla 5 y Figura 11), de los cuales 24 compuestos presentaron en su mayoría un porcentaje de semejanza mayor al 90% con un 99.42% del total de las áreas de pico integradas. Entre los componentes con mayor abundancia se presentó el ácido 9, 12-octadecadienoico, éster metílico con un área pico de 11.50% en un tiempo de retención de 22.33 minutos, seguido del ácido hexadecanoico, éster etílico a los 17.71 minutos, con un área pico de 11.37% y el ácido 9-Octadecenoico (Z)-, éster metílico con un área pico de 10.40% que apareció en un tiempo de retención de 21.54 minutos.

Tabla 5

Compuestos de ácidos grasos de la macroalga Chara globularis

Pico	TR (min)	Nombre del compuesto	CAS	Qual	Contenido relativo %
1	8.1959	Biciclo [2.2.1] heptan-2-ol, 1,7,7-trimetil-, acetato, (1S-endo)-	005655-61-8	97	0.4144
2	8.3354	Biciclo [2.2.1] heptan-2-ona, 1,7,7-trimetil-, (1S)-	000464-48-2	98	0.2955
3	11.2997	Biciclo [3.1.1] hept-3-en-2-ona, 4,6,6-trimetil-, (1S)-	001196-01-6	98	0.8407
4	14.0271	Tetradecanoato metilo	000124-10-7	98	0.6429
5	14.8982	Ácido hexadecanoico, éster etílico	000628-97-7	93	0.3959
6	15.8793	Norpseudoefedrina	036393-56-3	43	0.5813
7	17.4777	2-Pentadecanona, 6,10,14-trimetil-	000502-69-2	91	0.4121
8	17.7145	Ácido hexadecanoico, éster metílico	000112-39-0	98	11.3724
9	18.2389	Ácido 7-hexadecenoico, éster metílico, (Z)-	056875-67-3	98	0.8272
10	18.5179	Ácido hexadecanoico, éster etílico	000628-97-7	98	9.7214
11	19.0169	9-hexadecenoato de etilo	054546-22-4	97	0.8791
12	19.4567	Ácido hexadecanoico, 14-metil-, éster metílico	002490-49-5	94	0.3055
13	21.1313	Estearato de metilo	000112-61-8	99	3.0524
14	21.5414	Ácido 9-Octadecenoico (Z)-, éster metílico	000112-62-9	99	10.4003
15	21.6556	Ácido cis-13-Octadecenoico, éster de metilo	1000333-58-3	99	1.1366
16	21.8332	Ácido octadecanoico, éster etílico	000111-61-5	99	2.3546
17	22.2138	Ácido 9-Octadecenoico, éster etílico	006512-99-8	95	6.1729

18	22.3322	Ácido 9,12-Octadecadienoico, éster metílico	002462-85-3	99	11.5033
19	22.9792	Éster etílico del ácido linoleico	000544-35-4	99	7.2459
20	23.2413	Fitol	000150-86-7	95	8.0861
21	23.2963	Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico, (Z,Z,Z)-	000463-40-1	95	9.5189
22	23.9433	Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico, éster etílico, (Z,Z,Z)-	001191-41-9	99	7.9064
23	24.6199	Tetracosano	000646-31-1	98	1.4481
24	27.8463	Heptadecano, 9-octil-	007225-64-1	94	3.1568
25	31.8974	Heneicosano	000646-31-1	93	1.3294

En los resultados se presentan una variedad de terpenos, ácidos grasos saturados, insaturados, poliinsaturados, ésteres metílicos, alcanos y un alcaloide.

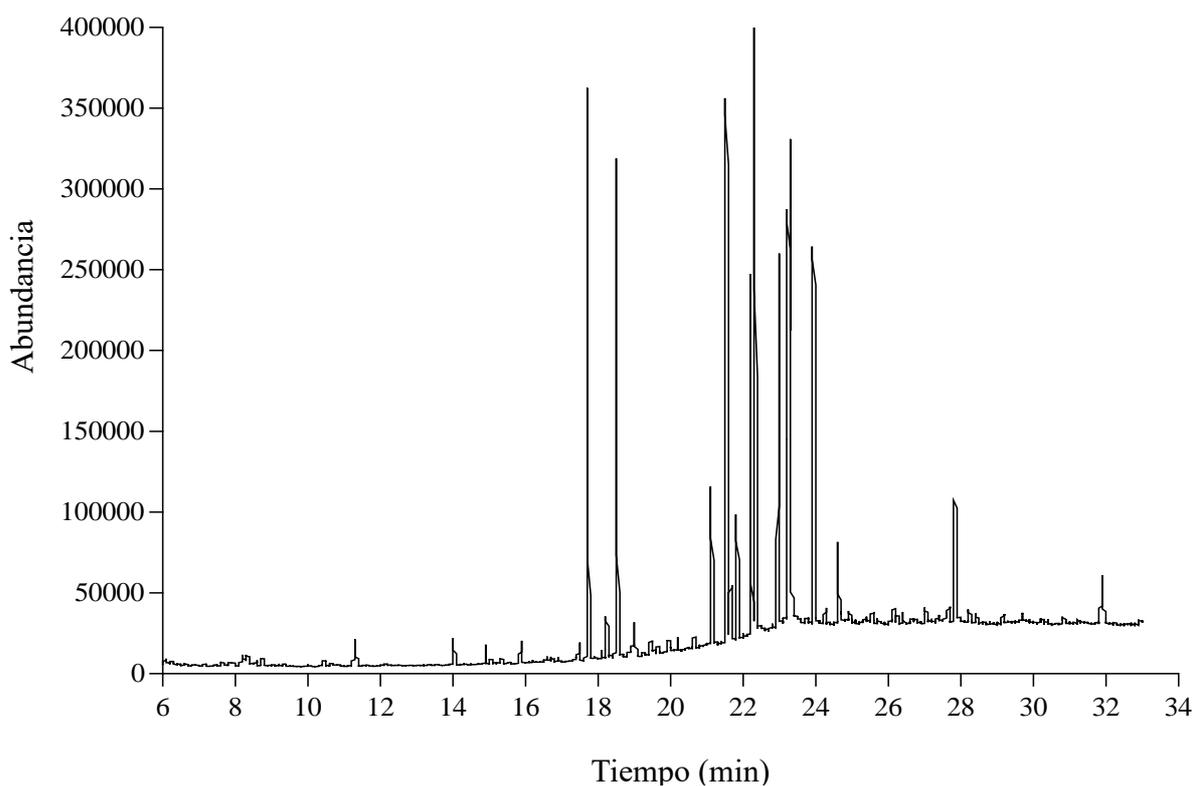


Figura 11. Perfil cromatográfico de los ácidos grasos de *Chara globularis* mediante la técnica GC-MS

Algunos de los compuestos reportados en este estudio también han sido hallados en el extracto metanólico de *Chara vulgaris*, como tetradecanoato de metilo, éster etílico del ácido linoleico, éster etílico del ácido hexadecanoico, fitol, ácido 9,12-octadecadienoico, éster metílico y ácido 9,12,15-octadecatrienoico, (Z,Z,Z)-.(Shah *et al.*, 2022). Otro estudio realizado en *Chara vulgaris*, reveló la presencia de ácidos grasos como 9, 12 – Octadecadienoico, tetradecanoico y hexadecanoico (Saxena *et al.*, 2021). Asimismo, Bankova *et al.* (2001) reportó ácidos grasos los cuales contenían entre 14 a 22 átomos de carbono para *C. globularis*, sin embargo en este estudio se encontraron ácidos grasos que tenían en su composición desde 10 a 25 átomos de carbono. Entre los compuestos hallados en esta investigación, se tiene el éster metílico del ácido hexadecanoico, el cual posee propiedades antibacterianas comprobadas frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae* (Lalthanpuii y Zartzokimi, 2019; Shaaban *et al.*, 2021). Otro compuesto es el fitol, que es un componente de la clorofila el cual ha sido empleado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Carvalho *et al.*, 2020), posee propiedades anticancerígenas y refuerza el sistema inmunológico, además tiene un efecto crioprotector contra el estrés oxidativo por lo que es un ingrediente empleado en la elaboración de productos antienviejecimiento (Jeong, 2018).

La fluctuación y el contenido de la composición de ácidos grasos en las algas es determinado por la condiciones a las cuales está expuesta durante su crecimiento y desarrollo (Munir *et al.*, 2019). Además, los ácidos grasos extraídos se ven influenciados por el tipo de método, condiciones de extracción, variabilidad de parámetros y solventes que se utilizan para extraerlos, cabe resaltar que con el paso del tiempo se han implementado nuevas técnicas automatizadas de extracción (Duarte *et al.*, 2014; Ciko *et al.*, 2018; Cvitković *et al.*, 2021).

4.1.4. Determinación de compuestos fenólicos

El extracto etanólico particionado y purificado por C18 de *Chara globularis*, fue analizado a través de HPLC-MS y se pudo observar la presencia de compuestos fenólicos, donde se identificó el ácido galoilquinico con la fórmula molecular $C_{14}H_{16}O_{10}$ (Figura 12;

Wyrepkowski *et al.*, 2014), en el espectro de masas en el modo negativo de $[M-H]^-$ m/z 343,2187 a los 18,4 min (Anexo 1).

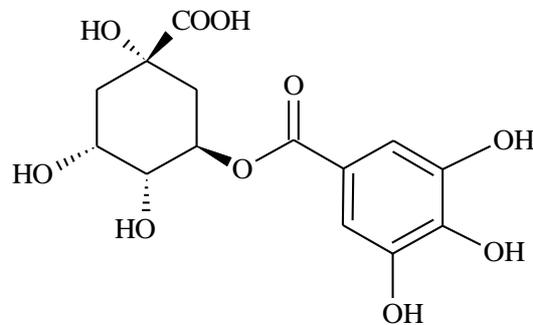


Figura 12. Estructura química del ácido galoilquínico

Nutautaité *et al.* (2022), encontraron tres ácidos fenólicos (gálico, p -cumárico y p -hidroxibenzoico) en la biomasa de *Cladophora glomerata*. Asimismo, se determinó la presencia de fenoles en extractos del alga *Thalassiophyllum clathrus*, como el ácido gálico y flavonoles, la extracción se realizó con disolventes de diferente polaridad, siendo el extracto etanólico el que presentó un mayor número compuestos fenólicos (Aminina *et al.*, 2020). Las macroalgas verdes, pardas y rojas presentan una gran variedad de compuestos fenólicos, desde moléculas simples como el ácido gálico hasta las más complejas como los florotaninos, de las cuales se conocen muchas actividades biológicas como propiedades bactericidas, antiproliferativas, antiinflamatorias, entre otras (Santos *et al.*, 2019).

Las algas producen compuestos fenólicos, los cuales cumplen una función de protección, esto se da en respuesta al estrés que es influenciado por factores abióticos, depredadores y patógenos, además la producción de estos compuestos varía en relación de la especie, genética y etapa de crecimiento (Mannino y Micheli, 2020). La extracción de compuestos fenólicos es más efectiva con disolventes polares, siendo el etanol el más efectivo, pues nos da una mayor cantidad de compuestos (Aminina *et al.*, 2020). Asimismo, dichos metabolitos secundarios participan en diferentes funciones fisiológicas de las plantas,

entre ellas se encuentran la germinación de semillas, la protección ultravioleta y la defensa contra microorganismo (Liu *et al.*, 2020).

4.2. Actividad antibacteriana

El extracto etanólico de *C. globularis* mostró actividad antibacteriana contra las bacterias gram positivas; *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 25923 y *B. spizizenii* ATCC 6633 y ninguna actividad contra la bacteria gram negativa *E. coli* (Figura 13). De la misma forma, se observa el efecto inhibitor del crecimiento bacteriano del antibiótico (gentamicina) utilizado como control positivo para las diferentes cepas bacterianas y el control negativo (metanol).

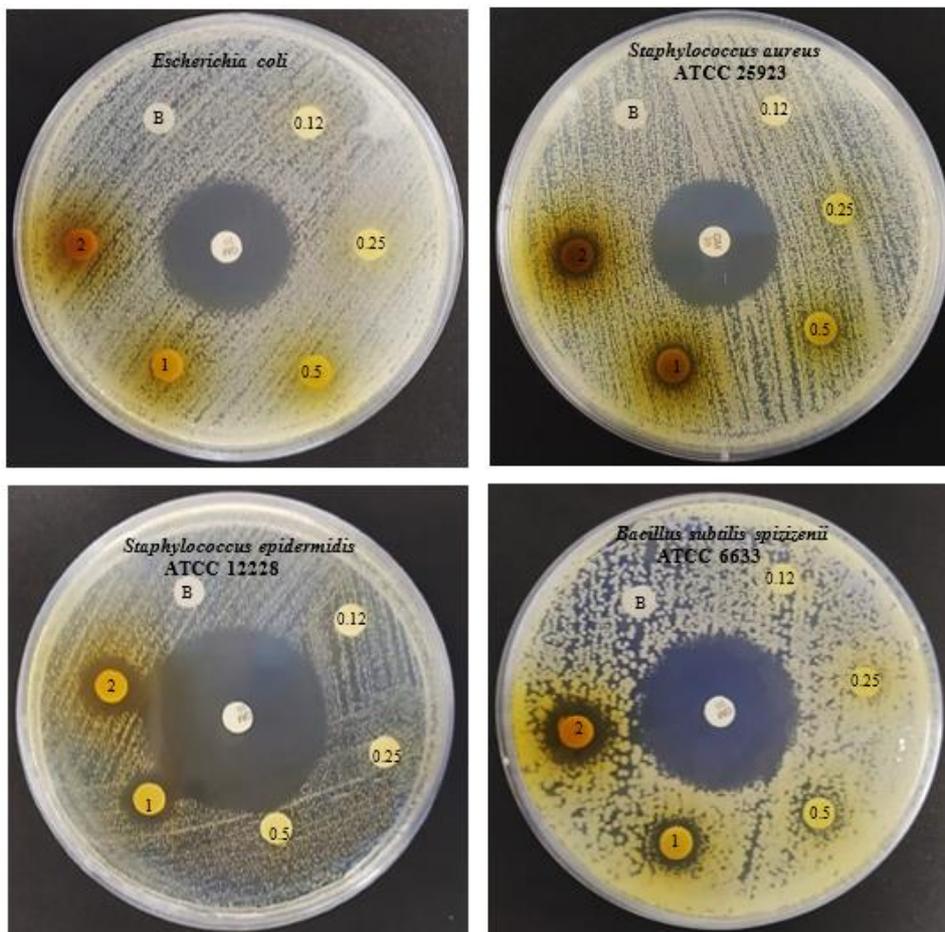


Figura 13. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a cepas bacterianas

En la Tabla 6, no se observó actividad antibacteriana del extracto etanólico frente a *Escherichia coli*, puesto que ninguna de las concentraciones aplicadas mostró la formación de halos de inhibición, obteniéndose un porcentaje del 0% para todas ellas. Además, el análisis de varianza (Anexo 2) indicó que existe significancia estadística ($p=0.0001$), lo que revela que por lo menos alguno de los tratamientos tiene un efecto diferente respecto a los halos de inhibición. Estas diferencias se verificaron con la prueba de rango múltiple (Anexo 3), donde el control positivo (Gentamicina) presentó el mayor efecto bactericida, mientras que las diferentes concentraciones de extracto etanólico de *Chara globularis* no mostraron ningún efecto bactericida.

Tabla 6

Actividad antibacteriana (mm) del extracto etanólico de Chara globularis frente a Escherichia coli.

Concentración	0.12 mg/mL	0.25 mg/mL	0.50 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
N	3	3	3	3	3
Mínimo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Máximo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Media	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D.E.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Inhibición (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

En la Tabla 7, se muestra la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, las concentraciones 0.12 y 0.25 mg/mL no exhibieron la formación de halos de inhibición, mientras que para las concentraciones 0.50, 1 y 2 mg/mL se obtuvo una media de 6.65, 8.92 y 10.96 mm de halos correspondientemente. El porcentaje de inhibición fue mayor para la concentración de 2 mg/mL con un 25.20 %. El análisis de varianza (Anexo 4), demostró que existe significancia estadística ($p=0.0001$) para las diferentes concentraciones y de acuerdo al análisis de rango múltiple de Duncan (Anexo 5), el control positivo (Gentamicina) presentó el mayor valor de actividad antibacteriana en comparación a las diferentes concentraciones utilizadas del extracto etanólico, seguido de la concentración de 2 mg/mL.

Tabla 7

Actividad antibacteriana (mm) del extracto etanólico de Chara globularis frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923.

Concentración	0.12 mg/mL	0.25 mg/mL	0.50 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
N	3	3	3	3	3
Mínimo	0.00	0.00	6.32	8.48	10.37
Máximo	0.00	0.00	7.15	9.42	11.29
Media	0.00	0.00	6.65	8.92	10.96
D.E.	0.00	0.00	0.44	0.47	0.51
Inhibición (%)	0.00	0.00	3.25	14.87	25.20

En la Tabla 8, se muestra la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, las concentraciones de 0.12, 0.25 y 0.50 mg/mL no presentaron formación de halos de inhibición, mientras que las concentraciones 1 y 2 mg/mL presentaron una media de 8.98 y 11.47 mm de halo de inhibición respectivamente. El porcentaje de inhibición fue mayor para la concentración de 2 mg/mL con un 19.03 %. Mediante el análisis de varianza (Anexo 6), se observó que existe significancia estadística ($p=0.0001$) y de acuerdo al análisis de rango múltiple de Duncan (Anexo 7), el control positivo (Gentamicina) presentó el mayor valor de actividad antibacteriana, seguido de la concentración de 2 mg/mL.

Tabla 8

Actividad antibacteriana (mm) del extracto etanólico de Chara globularis frente a Staphylococcus epidermidis ATCC 12228.

Concentración	0.12 mg/mL	0.25 mg/mL	0.50 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
N	3	3	3	3	3
Mínimo	0.00	0.00	0.00	7.60	10.77
Máximo	0.00	0.00	0.00	10.61	12.39
Media	0.00	0.00	0.00	8.98	11.47
D.E.	0.00	0.00	0.00	1.52	0.83
Inhibición (%)	0.00	0.00	0.00	10.33	19.03

En la Tabla 9, se muestra la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, se observa que las concentraciones más bajas de 0.12 y 0.25 mg/mL no presentaron la formación del halo de inhibición, mientras que para las concentraciones de 0.50, 1 y 2 mg/mL se obtuvo una media de 7.74, 9.77 y 11.68 mm de halo inhibitorio respectivamente. El porcentaje de inhibición fue mayor para la concentración de 2 mg/mL con un 22.69 %. El análisis de varianza (Anexo 8) demostró que existe significancia estadística ($p=0.0001$) para las diferentes concentraciones y de acuerdo al análisis de rango múltiple de Duncan (Anexo 9), el control positivo (Gentamicina) presentó el mayor valor de actividad antibacteriana a diferencia del resto de concentraciones del extracto etanólico, seguido de la concentración de 2 mg/mL.

Tabla 9

Actividad antibacteriana (mm) del extracto etanólico de Chara globularis frente a Bacillus spizizenii ATCC 6633.

Concentración	0.12 mg/mL	0.25 mg/mL	0.50 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
N	3	3	3	3	3
Mínimo	0.00	0.00	7.37	8.57	11.32
Máximo	0.00	0.00	8.12	10.60	12.01
Media	0.00	0.00	7.74	9.77	11.68
D.E.	0.00	0.00	0.38	1.07	0.35
Inhibición (%)	0.00	0.00	6.91	15.00	22.69

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de *C. globularis* se asemejan con los estudios reportados por Bankova *et al.* (2001), donde se observó que la actividad antibacteriana de los extractos de *C. globularis* obtenidos con diferentes disolventes contra *S. aureus*, presentaron una media de halos de inhibición desde 6.3 hasta 10.7 mm y al igual que en este estudio no se observa actividad antibacteriana de los extractos contra *E. coli*. Cai *et al.* (2013), obtuvo extractos de *Nitellopsis obtusa* y *Chara vulgaris*, los cuales presentaron actividad frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*), sin embargo, las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Proteus vulgaris*) no mostraron actividad alguna. Begum *et al.* (2017), demostró la actividad antibacteriana de extractos de *Chara schweinitzii* (n-hexano,

cloroformo, acetato de etilo y un extracto crudo), contra *Clavibacter*, *Xanthomonas campestris* y *E. coli*, el extracto obtenido con cloroformo fue el más eficaz contra las cepas en estudio. Asimismo, Snehalatha y Digamber (2017), obtuvieron extractos de *Chara globularis* con acetona, cloroformo, metanol, éter de petróleo y agua, comprobando la mayor actividad antibacteriana del extracto crudo de acetona contra *Micrococcus luteus* con una media de halos de inhibición de 15.33 mm. Igualmente, Manikanta y Malammanavar (2018), comprobaron la actividad antibacteriana de *Chara* contra *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas* y *Agrobacterium tumefaciens*, obteniendo una mayor inhibición para *P. syringae* con un halo de inhibición de 12 mm de diámetro.

En estos estudios se observa una variación en la medida de los halos de inhibición para los diferentes agentes bacterianos empleados, lo que podría atribuirse a los métodos y los solventes utilizados en la obtención de extractos, asimismo estos estarían influenciados por los componentes encontrados en las especies estudiadas (Mostafa *et al.*, 2018). Por otra parte, el extracto de *C. globularis* no fue capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli*, resultado que coincide con el reportado por Bankova *et al.* (2001) y Cai *et al.* (2013).

Los compuestos fenólicos del extracto etanólico de *C. globularis* como el ácido galoilquínico tienen importancia como un agente antimicrobiano, se conoce que los compuestos fenólicos son capaces de causar daños químicos a nivel de la membrana celular de la bacteria (Granato *et al.*, 2016). La diferencia en la inhibición entre bacterias gram positivas y negativas, podría deberse a la estructura y composición de la pared celular de las bacterias gram negativas, siendo más complejas, pues poseen una membrana externa y una gruesa capa de mureína que actúa como barrera e impide el ingreso de sustancias externas (Vieitez *et al.*, 2017; Madkour *et al.*, 2019; Camacho-Campos *et al.*, 2019).

4.3. Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *C. globularis* se realizó por el método de difusión en disco, de esta manera se determinó la concentración necesaria del extracto etanólico para inhibir el crecimiento bacteriano. El efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico se observa en la Figura 14.

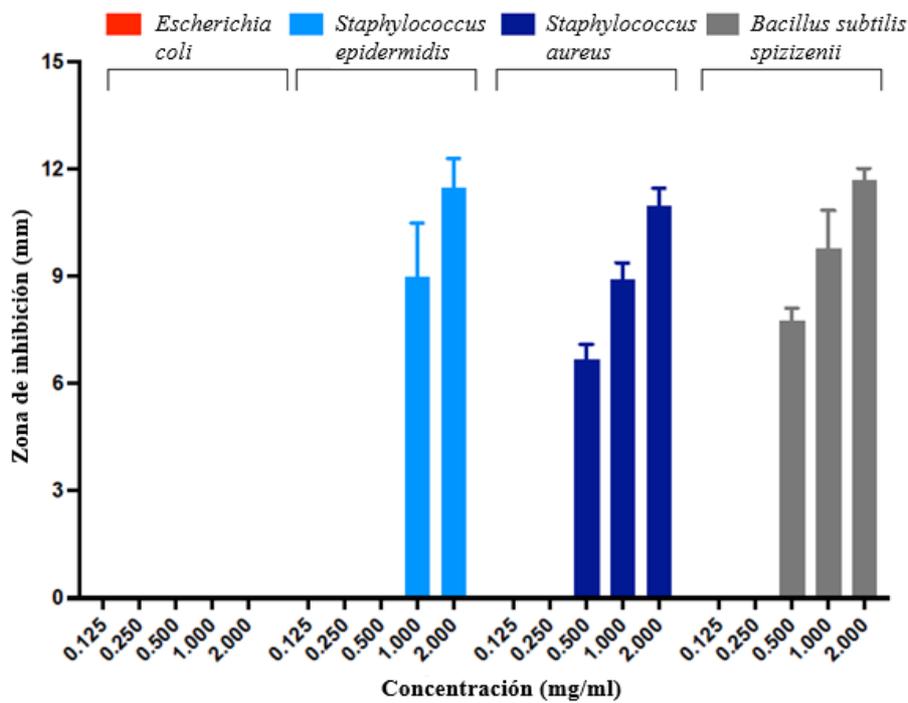


Figura 14. Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a cepas bacterianas.

La concentración mínima inhibitoria (CMI), se estableció de acuerdo a la observación del efecto bactericida por el extracto etanólico de *Chara globularis* frente al crecimiento bacteriano, para *Escherichia coli* no se observó ningún efecto por parte del extracto, mientras que para *S. aureus* ATCC 25923 y *B. spizizenii* ATCC 6633 la CMI fue de 0.50 mg/mL, y para *S. epidermidis* ATCC 12228 fue de 1 mg/mL (Tabla 10).

Tabla 10

Cálculo de la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Chara globularis*.

Bacteria	CMI	Halo promedio	Inhibición (%)
<i>Escherichia coli</i>	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.50 mg/mL	6.65	3.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.00 mg/mL	8.98	10.33
<i>Bacillus spizizenii</i>	0.50 mg/mL	7.74	6.91

NA: No se observó actividad antibacteriana.

Mostafa *et al.* (2018), obtuvieron una concentración mínima inhibitoria de extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum*, el efecto inhibitor de *P. granatum* inició a de 2.5 mg/ml y la zona de inhibición fue de 9.6 mm para *Staphylococcus aureus* y de 8.3 mm para *Pseudomona aeruginosa*, en tanto para el extracto etanólico de *S. aromaticum* la inhibición del crecimiento bacteriano para ambas bacterias comenzó a partir de una concentración de 5 mg/ml con 11.4 y 9.2 mm respectiva. Ishola *et al.* (2018), determinó la concentración mínima inhibitoria para los extractos de *Plocamium rigidum* y *Plocamium cornutum* obtenidos con seis disolventes contra cinco cepas bacterianas, siendo más eficiente el extracto de *P. rigidum* contra cuatro de los organismos estudiados, *E. faecalis*, *S. epidermis* y *E. coli* los cuales presentaron una CMI a partir de una concentración de 10 µg/ml con una zona de inhibición de 7.41, 6.21 y 7.42 mm, mientras que *S. sonnei* presentó una CMI a partir de 20 µg/ml con 6.88 mm de zona de inhibición.

En muchos estudios se ha comprobado la actividad de los extractos de plantas y algas, los cuales son eficientes en el control del crecimiento de una variedad de microorganismos, atribuyéndoles estas actividades y la variación de la concentración mínima inhibitoria a los compuestos bioactivos como terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos (Mostafa *et al.*, 2018; Shoker, 2020; Pereira *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

Los metabolitos secundarios presentes en la macroalga *Chara globularis* fueron compuestos fenólicos y triterpenos, dentro del primer grupo se identificó el ácido galoilquínico y en el segundo grupo se identificó varios compuestos volátiles y ácidos grasos, como alcoholes, aldehídos, hidrocarburos, alcanos, terpenos, entre otros. Muchos de estos compuestos son de interés en la fitoquímica.

En la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* se determinó que el extracto no presentó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mostró actividad antibacteriana de 25.20 % con una concentración de 2 mg/mL del extracto, frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 se presentó actividad antibacteriana de 19.03 % a la concentración de 2 mg/mL de extracto, frente a *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 también exhibió actividad antibacteriana de 22.69 % con 2 mg/mL de extracto, en todos los casos el control positivo de gentamicina presentó mayor actividad bactericida ($p < 0.05$) que las cinco concentraciones de extracto evaluadas.

Se estableció que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Chara globularis* fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano a partir de la concentración 0.5 mg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, mientras que *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, presentó un efecto inhibitor a partir de 1 mg/ml, excepto para *Escherichia coli* frente al cual no se evidenció ningún efecto bactericida del extracto.



RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio más detallado de la macroalga, donde se incluya evaluar otros parámetros y condiciones de análisis, como la temperatura, el tiempo, el tipo de columna capilar, entre otros. Asimismo, para la evaluación de la actividad antibacteriana, se recomienda investigar el efecto del extracto obtenido con otros disolventes. Además, esta especie posee metabolitos que tienen la capacidad de repeler insectos, lo que podría ser aplicado en el sector agrícola. Es necesario realizar futuros estudios, donde se aislen los compuestos del extracto etanólico para comprobar su actividad biológica con otras metodologías aplicadas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, I. A., & Hollenberg, G. J. (2022a). PHAEOPHYTA. In *Marine Algae of California* (pp. 121–278). Press, Redwood City: Stanford University. <https://doi.org/10.1515/9781503621053-005>
- Abbott, I. A., & Hollenberg, G. J. (2022b). RHODOPHYTA. In *Marine Algae of California* (pp. 279–746). Press, Redwood City: Stanford University. <https://doi.org/10.1515/9781503621053-006>
- Alaguprathana, M., & Poonkothai, M. (2017). Antimicrobial and Phytochemical Analysis of *Pithophora varia*. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 1–7. <https://doi.org/10.9734/ajrimps/2017/37245>
- Allen, J. L., Ten-Hage, L., & Leflaive, J. (2018). Regulation of Fatty Acid Production and Release in Benthic Algae: Could Parallel Allelopathy Be Explained with Plant Defence Theories? *Microbial Ecology*, 75(3), 609–621. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1082-z>
- Aminina, N. M., Karaulova, E. P., Vishnevskaya, T. I., Yakush, E. V., Kim, Y. K., Nam, K. H., & Son, K. T. (2020). Characteristics of Polyphenolic Content in Brown Algae of the Pacific Coast of Russia. *Molecules*, 25(17), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25173909>
- Bankova, V., Stefanov, K., Dimitrova-Konaklieva, S., Keremedchieva, G., Frette, X., Nikolova, C., Kujungiev, A., & Popov, S. (2001). Secondary metabolites and lipids in *Chara globularis* Thuill. *Hydrobiologia*, 457, 199–203. <https://doi.org/10.1023/A:1012243904247>
- Barbosa, V. M., Pitondo-Silva, A., Oliveira-Silva, M., Martorano, A. S., Rizzi-Maia, C. de C., Corrêa, Y. T., Spinola, L. M., & Raucci, W. (2020). Antibacterial activity of a new ready-to-use calcium silicate-based sealer. *Brazilian Dental Journal*, 31(6), 611–616. <https://doi.org/10.1590/0103-6440202003870>
- Becker, B. (2013). Snow ball earth and the split of Streptophyta and Chlorophyta. *Trends in Plant Science*, 18(4), 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.010>
- Begum, U., Ahmad, U., & Ahmad, I. (2017). Antifungal, antibacterial and insecticidal potential of *Chara schweinitzii* (A. Braun) Kützing in Charsadda, Pakistan. *Pure and Applied Biology*, 6(1), 87–96. <https://doi.org/10.19045/bspab.2017.60001>

- Cai, J., Xie, S., & Feng, J. (2013). Antimicrobial activities of *Nitellopsis obtusa* (Desvaux) Groves and *Chara vulgaris* L. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86(1), 24–32. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.004>
- Camacho-Campos, C., Pérez-Hernández, Y., Vladivia-Ávila, A., Ramírez-Pérez, H., & Gómez-Brisuela, L. (2019). Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de *Tagetes erecta* L. (Asteraceae). *Revista Cubana de Química*, 31(1), 53–64.
- Cantúa, J. A., Flores Olivas, A., & Valenzuela Soto, J. H. (2019). Volatile organic compounds of plants induced by insects: current situation in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3), 729–742. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342019000300729&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-09342019000300729&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Carvalho, A. M. S., Heimfarth, L., Pereira, E. W. M., Oliveira, F. S., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M., Picot, L., Antonioli, A. R., Quintans, J. S. S., & Quintans-Júnior, L. J. (2020). Phytol, a Chlorophyll Component, Produces Antihyperalgesic, Anti-inflammatory, and Antiarthritic Effects: Possible NFκB Pathway Involvement and Reduced Levels of the Proinflammatory Cytokines TNF-α and IL-6. *Journal of Natural Products*, 83, 1107–1117. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01116>
- Caudill, E. R., Tapia Hernandez, R., Johnson, K. P., O'Rourke, J. T., Zhu, L., Haynes, C. L., Feng, Z. V., & Pedersen, J. A. (2020). Wall teichoic acids govern cationic gold nanoparticle interaction with Gram-positive bacterial cell walls. *Chemical Science*, 11(16), 4106–4118. <https://doi.org/10.1039/c9sc05436g>
- Ciko, A. M., Jokić, S., Šubarić, D., & Jerković, I. (2018). Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, 16(10), 20. <https://doi.org/10.3390/md16100348>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2022). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100* (32th ed).
- Correa H, L. J., & Ramos V, A. C. (2017). Producción De Fármacos Provenientes De Las Plantas. *Revista Orinoquía, Ciencia y Sociedad*, 2(2), 12–15. <http://investigacion.unitropico.edu.co/wp-content/uploads/2017/07/CUERPO->

REVISTA-12-15

- Cvitković, D., Dragović-Uzelac, V., Dobrinčić, A., Čož-Rakovac, R., & Balbino, S. (2021). The effect of solvent and extraction method on the recovery of lipid fraction from Adriatic Sea macroalgae. *Algal Research*, 56, 9. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102291>
- David, F., Pat, S., & Wylie, P. (2002). Improving the analysis of fatty acid methyl esters using retention time locked methods and retention time databases. *Agilent Technologies-Application*, 12. <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5988-5871EN.pdf>
- Dirar, A. I., Alsaadi, D. H. M., Wada, M., Mohamed, M. A., Watanabe, T., & Devkota, H. P. (2019). Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 120, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.003>
- Duarte, K., Justino, C. I. L., Pereira, R., Freitas, A. C., Gomes, A. M., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2014). Green analytical methodologies for the discovery of bioactive compounds from marine sources. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 3, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.11.001>
- Duncan, E. J., & Rouse-Miller, J. (2017). Chara sp. an Unfamiliar Algal Element in our Biodiversity. *Living World*, 6. <https://ttfnc.org/livingworld/index.php/lwj/article/view/583/594>
- Dwaish, A. (2018). Evaluation of Antibacterial Activity and Qualitative Phytochemical Analysis of Enteromorpha Ralfsii. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 9(10), 920–924. <https://doi.org/10.5958/0976-5506.2018.01249.4>
- Dwaish, A., Mohammed, D., Hamdan, A., & Lefta, S. (2018). Anti-dermatophytes activity of some algal extracts isolated from Baghdad City-Iraq. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(12), 5449–5454. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00993.9>
- El-Adl, M. F., Deyab, M. A., El-Shanawany, R. S., & Abu Ahmed, S. E. (2022). Fatty acids of Cladophora glomerata and Chaetomorpha vieillardii (Cladophoraceae) of different niches inhibit the pathogenic microbial growth. *Aquatic Botany*, 176, 11. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2021.103461>
- El Wahidi, M., El Amraoui, B., El Amraoui, M., & Bamhaoud, T. (2015). Screening of

- antimicrobial activity of macroalgae extracts from the moroccan Atlantic coast. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 73(3), 190–196.
<https://doi.org/10.1016/j.pharma.2014.12.005>
- Espinosa-Leal, C. A., & Garcia-Lara, S. (2019). Current Methods for the Discovery of New Active Ingredients from Natural Products for Cosmeceutical Applications. *Planta Medica*, 85, 535–551. <https://doi.org/10.1055/a-0857-6633>
- Gao, Y., & Yan, X. (2012). Response of *Chara globularis* and *Hydrodictyon reticulatum* to lead pollution: Their survival, bioaccumulation, and defense. *Journal of Applied Phycology*, 24(2), 245–251. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9673-4>
- Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., & Tiwari, B. (2020). Conventional extraction techniques: Solvent extraction. In *Sustainable Seaweed Technologies* (pp. 171–189). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817943-7.00006-8>
- Granato, D., do Prado-Silva, L., Alvarenga, V. O., Zielinski, A. A. F., Bataglion, G. A., de Moraes, D. R., Eberlin, M. N., & Sant'Ana, A. de S. (2016). Characterization of binary and ternary mixtures of green, white and black tea extracts by electrospray ionization mass spectrometry and modeling of their in vitro antibacterial activity. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.037>
- Hassanzadazar, H., Yousefizadeh, S., Ghafari, A., Fathollahi, M., & Aminzare, M. (2019). Antimicrobial Effects of the Nanoemulsion of Rosemary Essential Oil against Important Foodborne Pathogens. *Journal of Human, Environment, and Health Promotion*, 5(2), 79–85. <https://doi.org/10.29252/jhehp.5.2.6>
- Huang, X. Q., Li, R., Fu, J., & Dudareva, N. (2022). A peroxisomal heterodimeric enzyme is involved in benzaldehyde synthesis in plants. *Nature Communications*, 13(1), 15. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28978-2>
- Inthasotti, T., & Thiamdao, S. (2020). Diversity of Freshwater Green Macroalgae in Phu Wua Wildlife Sanctuary. *Progress in Applied Science and Technology*, 1, 245–260.
- Iqbal, E., Lim, L. B. L., Salim, K. A., Faizi, S., Ahmed, A., & Mohamed, A. J. (2018). Isolation and characterization of aristolactam alkaloids from the stem bark of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) and their biological activities. *Journal of King Saud University - Science*, 30(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.12.008>
- Ishola, A., Knott, M., & Misihairabgwi, J. (2018). In vitro antimicrobial activities of

- Plocamium rigidum* and *Plocamium cornutum* from the Namibian coast line. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 12(10), 121–129. <https://doi.org/10.5897/ajpp2018.4642>
- Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., Chandra Shill, M., Karmakar, U. K., Yarla, N. S., Khan, I. N., Billah, M. M., Pieczynska, M. D., Zengin, G., Malainer, C., Nicoletti, F., Gulei, D., Berindan-Neagoe, I., Apostolov, A., Banach, M., ... Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.032>
- Jacobsen, N., & Pedersen, L.-E. (1983). Synthesis and Insecticidal Properties of Derivatives of Propane-1,3-dithiol (Analogues of the Insecticidal Derivatives of Dithiolane and Trithiane from the Alga *Chara globularis* Thuillier). *Pesticide Science*, 90–97.
- Jeong, S. H. (2018). Inhibitory effect of phytol on cellular senescence. *Biomedical Dermatology*, 2, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s41702-018-0025-8>
- Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., Garcia-Oliveira, P., Cassani, L., Fraga-Corral, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food Chemistry*, 341(February 2020), 128262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128262>
- Karol, K. G., Alix, M. S., Scribailo, R. W., Skawinski, P. M., Sleith, R. S., Sardina, J. A., & Hall, J. D. (2018). New records of the rare North American endemic *Chara brittonii* (Characeae), with comments on its distribution. *Brittonia*, 70(3), 277–288. <https://doi.org/10.1007/s12228-018-9527-3>
- Kong, C. H., Xuan, T. D., Khanh, T. D., Tran, H. D., & Trung, N. T. (2019). Allelochemicals and Signaling Chemicals in Plants. In *Molecules (Basel, Switzerland)* (Vol. 24, Issue 15, pp. 1–19). <https://doi.org/10.3390/molecules24152737>
- Kong, C. H., Zhang, S. Z., Li, Y. H., Xia, Z. C., Yang, X. F., Meiners, S. J., & Wang, P. (2018). Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06429-1>
- Korzeniowska, K., Górká, B., Lipok, J., & Wiczorek, P. P. (2018). Algae and Their Extracts in Medical Treatment. *Algae Biomass: Characteristics and Applications*, 73–87.

- https://doi.org/10.1007/978-3-319-74703-3_7
- Kosanić, M., Ranković, B., & Stanojković, T. (2015). Biological activities of two macroalgae from Adriatic coast of Montenegro. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.004>
- Kufel, L., & Kufel, I. (2002). Chara beds acting as nutrient sinks in shallow lakes - A review. *Aquatic Botany*, 72(3–4), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00204-2)
- Lalthanpuii, P. B., & Zazokimi, K. L. (2019). Chemical profiling, antibacterial and antiparasitic studies of imperata cylindrica. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(12), 117–121. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.91216>
- Latifah, L. A., Soekamto, N. H., & Tahir, A. (2020). Green algae Halimeda macroloba in Spermonde archipelago: Phytochemical and in vitro antibacterial studies. *Pharmacognosy Journal*, 12(5), 1000–1004. <https://doi.org/10.5530/PJ.2020.12.141>
- Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2020). Diverse applications of marine macroalgae. *Marine Drugs*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/md18010017>
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Liu, Y., Zhao, G., Li, X., Shen, Q., Wu, Q., Zhuang, J., Zhang, X., Xia, E., Zhang, Z., Qian, Y., Gao, L., & Xia, T. (2020). Comparative analysis of phenolic compound metabolism among tea plants in the section Thea of the genus Camellia. *Food Research International*, 135, 11. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109276>
- Madkour, F. F., El-Shoubaky, G. A., & Ebada, M. A. (2019). Antibacterial activity of some seaweeds from the red sea coast of Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(2), 265–274. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.31016>
- Manikanta, G., & Malammanavar, S. (2018). Phytochemistry and anti-microbial activity of Chara. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(6), 2047–2050. <http://www.phytojournal.com/archives/2018/vol7issue6/PartAJ/7-6-138-571.pdf>
- Mannino, A. M., & Micheli, C. (2020). Ecological function of phenolic compounds from

- mediterranean furoid algae and seagrasses: An overview on the genus *Cystoseira sensu lato* and *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(1), 12–17. <https://doi.org/10.3390/jmse8010019>
- Marcante, M., Saorin, B., Dal'Maso, F., Umpierrez, A., Zeni, J., Cansian, R. L., Mignoni, M. L., & Toniazzo, G. (2020). Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red arañá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). *Arabian Journal of Chemistry*, 13(6), 5800–5809. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.04.017>
- Meskhidze, N., Sabolis, A., Reed, R., & Kamykowski, D. (2015). Quantifying environmental stress-induced emissions of algal isoprene and monoterpenes using laboratory measurements. *Biogeosciences*, 12, 637–651. <https://doi.org/10.5194/bg-12-637-2015>
- Messyasz, B., Pikosz, M., & Treska, E. (2018). Biology of Freshwater Macroalgae and Their Distribution. *Algae Biomass: Characteristics and Applications*, 17–31. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74703-3_3
- Millones-Gómez, P. A., Tay Chu Jon, L. Y., Maurtua Torres, D. J., Bacilio Amaranto, R. E., Collantes Díaz, I. E., Minchón Medina, C. A., & Calla Choque, J. S. (2021). Antibacterial, antibiofilm, and cytotoxic activities and chemical compositions of Peruvian propolis in an in vitro oral biofilm. *F1000Research*, 10, 1–23. <https://doi.org/10.12688/f1000research.73602.1>
- Mollinedo Patzi, M. A., & Gonzáles Villalobos, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica*, 49, 113–134. <https://doi.org/10.2307/j.ctvkjb56f.8>
- Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., & Bakri, M. M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>
- Munir, M., Qureshi, R., Bibi, M., & Khan, A. M. (2019). Pharmaceutical aptitude of *Cladophora*: A comprehensive review. *Algal Research*, 39, 10. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101476>
- Murphy C, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582. <https://doi.org/10.3109/9781420019919-17>
- Nafis, A., El Khalloufi, F., Aknaf, A., Oudra, B., Marraiki, N., Al-Rashed, S., Elgorban, A., Syed, A., Hassani, L., & Custodio, L. (2021). In vitro antimicrobial and synergistic

- effect of essential oil from the red macroalgae *Centroceras clavulatum* (C. Agardh) Montagne with conventional antibiotics. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 11(9), 414–420. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.321129>
- Neto, L. J. de L., Ramos, A. G. B., de Freitas, T. S., Barbosa, C. R. D. S., de Sousa Júnior, D. L., Siyatpanah, A., Nejat, M., Wilairatana, P., Coutinho, H. D. M., & da Cunha, F. A. B. (2021). Evaluation of benzaldehyde as an antibiotic modulator and its toxic effect against *Drosophila melanogaster*. *Molecules*, 26, 14. <https://doi.org/10.3390/molecules26185570>
- Nuño-Romo, T., Enciso, I., & Hernández, R. (2017). Uso potencial de algas marinas presentes en el litoral de Jalisco, México 1. *E-Cucba*, 4, 5–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i8.78>
- Nutautaitė, M., Racevičiūtė-Stupelienė, A., Bliznikas, S., Jonuškienė, I., Karosienė, J., Koreivienė, J., & Vilienė, V. (2022). Evaluation of Phenolic Compounds and Pigments in Freshwater *Cladophora glomerata* Biomass from Various Lithuanian Rivers as a Potential Future Raw Material for Biotechnology. *Water (Switzerland)*, 14(7), 18. <https://doi.org/10.3390/w14071138>
- Patra, A. K., Amasheh, S., & Aschenbach, J. R. (2019). Modulation of gastrointestinal barrier and nutrient transport function in farm animals by natural plant bioactive compounds—A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(20), 3237–3266. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1486284>
- Peña, R. M., Barciela, J., Herrero, C., & García-Martín, S. (2008). Headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatiles in orujo spirits from a defined geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2788–2794. <https://doi.org/10.1021/jf073481f>
- Pereira, A. G., Fraga-Corral, M., Garcia-Oliveira, P., Lourenço-Lopes, C., Carpena, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). The use of invasive algae species as a source of secondary metabolites and biological activities: Spain as case-study. *Marine Drugs*, 19(4), 21. <https://doi.org/10.3390/md19040178>
- Pérez-Peralta, P. J., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Trejo-Téllez, L. I., Cruz-Ortega, R., & Silva-Rojas, H. V. (2019). Responses of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and *Rhizobium tropici* CIAT899 symbiosystem to induced allelopathy by *Ipomoea purpurea*

- L. Roth. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(1), 47–55.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.006>
- Phukan, H., Brahma, R., & Mitra, P. K. (2020). An endophytic fungus associated with *Kayea assamica* (King & Prain): A study on its molecular phylogenetics and natural products. *South African Journal of Botany*, 134, 314–321.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.006>
- Pico, Y., Alfarhan, A. H., & Barcelo, D. (2019). How recent innovations in gas chromatography-mass spectrometry have improved pesticide residue determination: An alternative technique to be in your radar. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 122, 28. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115720>
- Polyak, Y. M., & Sukcharevich, V. I. (2019). Allelopathic Interactions between Plants and Microorganisms in Soil Ecosystems. *Biology Bulletin Reviews*, 9(6), 562–574.
<https://doi.org/10.1134/s2079086419060033>
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiology* (T. C. McGraw–Hill (ed.); 5th Editio).
- Pujol, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., & Sierra, G. (2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba. *Revista Bionatura*, 5(3), 1209–1214. <https://doi.org/10.21931/RB/20120.05.03.7>
- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & Elsohly, M. A. (2021). Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis. *Molecules*, 26(9).
<https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
- Ramírez, L., & Díaz, H. (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia*, 33, 397–400.
<https://doi.org/10.22517/23447214.6151>
- Ramirez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 42, 263–268.
- Rigo, B., Canalias, F., Esteve, S., Gella, F., González, B., & López, R. (2018). Revista del Laboratorio Clínico. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 11(3), 137–146.
- Rinaldi, M. V. N., Díaz, I. E. C., Suffredini, I. B., & Moreno, P. R. H. (2017). Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.006>

- Robichaud, C. O., Tanzie, D., Weilenmann, U., & Wiesner, M. R. (2005). Relative risk analysis of several manufactured nanomaterials: An insurance industry context. *Environmental Science and Technology*, 39(22), 8985–8994. <https://doi.org/10.1021/es0506509>
- Rodriguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Duran, C., Grimaldo-Juarez, O., & Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.005>
- Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, isolation and purification of Anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.05.022>
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166–167. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Rusl, A. R., & Dwaish, A. (2018). Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of *Cladophora glomerata*. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 9(2), 120–123. <https://doi.org/10.25258/ijpqa.v9i2.13633>
- Rzama, A., San-miguel, B. A., & Ettalibi, M. (2002). Lipids metabolites and essential oil from the green alga *Chara vulgaris*. *Actes Inst. Agron. Vet*, 22, 65–70.
- Saadaoui, I., Rasheed, R., Abdulrahman, N., Bounnit, T., Cherif, M., Al Jabri, H., & Mraiche, F. (2020). Algae-derived bioactive compounds with anti-lung cancer potential. *Marine Drugs*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/md18040197>
- Saber, A. A., Gontcharov, A. A., Nikulin, A. Y., Nikulin, V. Y., Rayan, W. A., & Cantonati, M. (2021). Integrative Taxonomic, Ecological and Genotyping Study of Oases and Sinai Peninsula. *Plants*, 10.
- Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>

- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S. L., & García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. In C. Rivas-Morales, O.-C. M.A., & M. J. Verde-Star (Eds.), *Investigación en plantas de importancia médica* (pp. 77–100). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.334>
- Santos, S. A. O., Félix, R., Pais, A. C. S., Rocha, S. M., & Silvestre, A. J. D. (2019). The quest for phenolic compounds from macroalgae: A review of extraction and identification methodologies. *Biomolecules*, 9(12), 1–56. <https://doi.org/10.3390/biom9120847>
- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2012). Natural Products Isolation. In *[Methods in Molecular Biology] Natural Products Isolation* (Vol. 864, pp. 341–366). [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(98\)01266-5](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(98)01266-5)
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 168–182. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3912-7_4
- Saxena, M., Singh, N., Kumar, S., Dobhal, M., & Datta, S. (2021). Potent pharmaceutical products from aquatic plants-Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 14, 48–63. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2021.v14i1.39992>
- Scania, A. E., & Chasani, A. R. (2021). The anti-bacterial effect of phenolic compounds from three species of marine macroalgae. *Biodiversitas*, 22(6), 3412–3417. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220649>
- Schneider, S. C., García, A., Martín-Closas, C., & Chivas, A. R. (2015). The role of charophytes (Charales) in past and present environments: An overview. *Aquatic Botany*, 120(PA), 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.10.001>
- Shaaban, M. T., Ghaly, M. F., & Fahmi, S. M. (2021). Antibacterial activities of hexadecanoic acid methyl ester and green-synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 61, 557–568. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100061>
- Shah, Z., Badshah, S. L., Iqbal, A., Shah, Z., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2022). Investigation of important biochemical compounds from selected freshwater macroalgae and their role in agriculture. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00273-0>

- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/md14040081>
- Shoker, R. M. (2020). A review article: The importance of the major groups of plants secondary metabolism phenols, alkaloids and terpenes. *Internacional Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 7, 5.
- Singh, A., & Thakur, N. (2016). Significance of investigating allelopathic interactions of marine organisms in the discovery and development of cytotoxic compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 243, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.009>
- Ślusarczyk, J., Adamska, E., & Czerwik-Marcinkowska, J. (2021). Fungi and algae as sources of medicinal and other biologically active compounds: A review. *Nutrients*, 13(9), 1–24. <https://doi.org/10.3390/nu13093178>
- Snehalatha, D., & Digamber, B. (2017). Antibacterial activity of freshwater green-algae, *Chara vulgaris*. *International Journal Og ChemTech Research*, 10(6), 749–753. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097284>
- Sosa-Hernández, J. E., Escobedo-Avellaneda, Z., Iqbal, H. M. N., & Welti-Chanes, J. (2018). State-of-the-art extraction methodologies for bioactive compounds from algal biome to meet bio-economy challenges and opportunities. *Molecules*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112953>
- Spyropoulou, E. A., Dekker, H. L., Steemers, L., Van Maarseveen, J. H., de Koster, C. G., Haring, M. A., Schuurink, R. C., & Allmann, S. (2017). Identification and characterization of (3Z):(2E)-hexenal isomerases from cucumber. *Frontiers in Plant Science*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01342>
- Sviben, S., Matoničkin Kepčija, R., Vidaković-Cifrek, Ž., Sertić Perić, M., Kružić, P., Popijač, A., & Primc, B. (2018). *Chara* spp. exhibit highly heterogeneous light adaptation, calcite encrustation and epiphyton patterns in a marl lake. *Aquatic Botany*, 147(February), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.01.007>
- Tao, Y., He, F., Jin, K., Wang, J., Wang, Y., Zhou, J., Sun, J., & Fang, Q. (2017). Facile conversion of plant oil (anethole) to a high-performance material. *Polymer Chemistry*, 8, 2010–2015. <https://doi.org/10.1039/c7py00047b>
- Unpaprom, Y., Whangchai, N., Prasongpol, P., & Ramaraj, R. (2020). Antibacterial ,

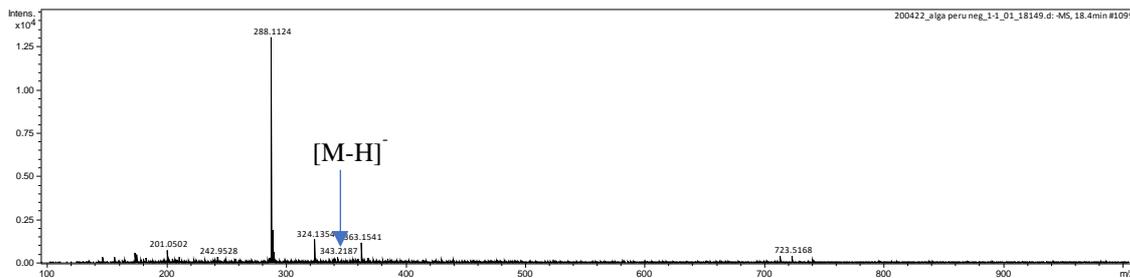
- Antifungal Properties and Chemical Composition of Freshwater Macroalgae ,
Cladophora glomerata. *Journal of Biology and Medicine*, 1(1), 1–11.
- Vahdati, S. N., Behboudi, H., Tavakoli, S., Aminian, F., & Ranjbar, R. (2022). Antimicrobial Potential of the Green Microalgae Isolated from the Persian Gulf. *Iranian Journal of Public Health*, 51(5), 1134–1142.
- Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., & Alborés, S. (2017). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *Journal of Supercritical Fluids*, 133, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>
- Vuong, D., Kaplan, M., Lacey, H. J., Crombie, A., Lacey, E., & Piggott, A. M. (2018). A study of the chemical diversity of macroalgae from South Eastern Australia. *Fitoterapia*, 126(October 2017), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.10.014>
- Walean, M., Melpin, R., Rondonuwu, M., Pinontoan, K. F., Maliangkay, H. P., & Astriani, M. (2020). Phytochemical screening and biological activities of pakoba (*Syzygium luzonense*) stem bark ethanol extract. *Biodiversitas*, 21(6), 2377–2382. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210606>
- Wang, C., Sun, J., Tao, Y., Fang, L., Zhou, J., Dai, M., Liu, M., & Fang, Q. (2020). Biomass materials derived from anethole: Conversion and application. *Polymer Chemistry*, 11(5), 954–963. <https://doi.org/10.1039/c9py01513b>
- Wang, S., Zhao, S., Uzoejinwa, B. B., Zheng, A., Wang, Q., Huang, J., & Abomohra, A. E. F. (2020). A state-of-the-art review on dual purpose seaweeds utilization for wastewater treatment and crude bio-oil production. *Energy Conversion and Management*, 222(August), 113253. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113253>
- Wong, J. E., Rubio, C., Reyes, A., Aguilar, C., & Carrillo, M. L. (2018). Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hamelia patens* obtained by different extraction methods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.018>
- Wyrepkowski, C. C., Maldonado, D. L., Sinhörin, A. P., Vilegas, W., De Grandis, R. A., Resende, F. A., Varanda, E. A., & Campaner, L. (2014). Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. *Molecules*, 19(10), 16039–16057.

<https://doi.org/10.3390/molecules191016039>

- Ye, C., Yang, Y., Xu, Q., Ying, B., Zhang, M., Gao, B., Ni, B., Yakefu, Z., Bai, Y., & Zuo, Z. (2018). Volatile organic compound emissions from *Microcystis aeruginosa* under different phosphorus sources and concentrations. *Phycological Research*, *66*, 15–22. <https://doi.org/10.1111/pre.12201>
- Zhang, H., Li, M., Wang, C., Huang, G., Liu, M., Sun, J., & Fang, Q. (2021). A highly heat-resistant phthalocyanine resin based on a bio-based anethole. *European Polymer Journal*, *157*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110645>
- Zhang, M., Xie, S., Han, X., He, Y., Feng, J., & Shi, Y. (2010). Volatile constituents of charophytes as oviposition deterrents of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Phycology*, *46*, 390–395. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00769.x>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, *13*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhao-Hui, L., Qiang, W., Xiao, R., Cun-De, P., & De-An, J. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, *15*(12), 8933–8952. <https://doi.org/10.3390/molecules15128933>
- Zuo, Z. (2019). Why algae release volatile organic compounds - The emission and roles. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00491>

ANEXOS

Anexo 1. Espectro de masas ESI- en modo negativo de [M-H]⁻ m/z 343,2187 del ácido galoilquínico a los 18,4 min.



Anexo 2. Análisis de varianza para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Escherichia coli*.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Concentraciones	5	1521.522	304.304	4120.575	< 0.0001
Error	12	0.886	0.074		
Total	17	1522.408			

Anexo 3. Prueba de rango múltiple de Duncan para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Escherichia coli*.

Concentración	Medias LS	Error estándar	Grupos Duncan
Gentamicina	24.670	0.157	A
1	0.000	0.157	B
2	0.000	0.157	B
0.12	0.000	0.157	B
0.25	0.000	0.157	B
0.5	0.000	0.157	B

Anexo 4. Análisis de varianza para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Concentraciones	5	1350.960	270.192	1036.763	< 0.0001
Error	12	3.127	0.261		
Total	17	1354.088			

Anexo 5. Prueba de rango múltiple de Duncan para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Concentración	Medias LS	Error estándar	Grupos
Gentamicina	25.717	0.295	A
2	10.963	0.295	B
1	8.920	0.295	C
0.5	6.650	0.295	D
0.12	0.000	0.295	E
0.25	0.000	0.295	E

Anexo 6. Análisis de varianza para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	5	2731.690	546.338	1058.498	< 0.0001
Error	12	6.194	0.516		
Total	17	2737.883			

Anexo 7. Prueba de rango múltiple de Duncan para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Concentraciones	Medias LS	Error estándar	Grupos
Gentamicina	34.723	0.415	A
2	11.470	0.415	B
1	8.977	0.415	C
0.12	0.000	0.415	D
0.25	0.000	0.415	D
0.5	0.000	0.415	D

Anexo 8. Análisis de varianza para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Bacillus spizizenii* ATCC 6633.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Concentraciones	5	1952.461	390.492	1286.960	< 0.0001
Error	12	3.641	0.303		
Total	17	1956.102			

Anexo 9. Prueba de rango múltiple de Duncan para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chara globularis* frente a *Bacillus spizizenii* ATCC 6633.

Concentraciones	Medias LS	Error estándar	Grupos
Gentamicina	31.043	0.318	A
2	11.683	0.318	B
1	9.773	0.318	C
0.5	7.737	0.318	D
0.12	0.000	0.318	E
0.25	0.000	0.318	E