

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE PESQUERÍA



**“USO POTENCIAL DEL ALGA *Caulerpa filiformis* (CHLOROPHYTA),
PROCEDENTE DE LAS BAHÍAS DE PARACAS Y SECHURA, COMO
FUENTE DE PRINCIPIOS ACTIVOS”**

Presentado por:

JOYCE ELIZABETH MAMANI HILASACA

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO PESQUERO**

Lima - Perú

2019

A mis queridos padres, Nestor y Eufracia por el amor, la comprensión y el apoyo incondicional que me brindaron durante todos estos años, además de inculcarme los valores que encaminan mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mí asesora, la Dra. Patricia Gil-Kodaka, por brindarme la oportunidad de desarrollar un trabajo de investigación dentro del marco del proyecto FONDECYT 129-2015 “Diversidad de macroalgas de la costa central del Perú usando códigos de barras de ADN, en la perspectiva de sus usos potenciales y aplicaciones biotecnológicas”, además de la orientación y el apoyo brindado en la ejecución del presente trabajo de investigación.

Un especial agradecimiento a mí co-asesor de tesis, el Mg.Sc. Jorge Chávez Pérez por la confianza, orientación y el apoyo incondicional durante la ejecución de esta investigación, además de facilitarme las instalaciones, los equipos y materiales de los laboratorios del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular (IIBBM), en donde se llevó cabo el desarrollo experimental.

A mí gran amigo, el Mg.Sc. Ernesto Pariona Icochea por contribuir con sus conocimientos sobre la especie en estudio y apoyar en la realización del análisis estadístico de los datos, además de brindarme su apoyo incondicional durante todo el proceso de desarrollo de la tesis.

Al Ing. Felix Cárdenas Gago, por su desinteresada colaboración y por la información brindada para la re4alización del ensayo enzimático.

A mis amigos del IBBM, principalmente a los Biólogos Eder Apumayta Suárez, Ángel Rodríguez Huamán, Jessenia Melo Saca y Rosario Javier Astete, quienes contribuyeron eventualmente con sus conocimientos durante el desarrollo experimental de la tesis. También agradecer a mis amigos estudiantes de biología: Alondra Ibriza, Brenda Maynetto, Kelly Siadén, Yesenia Quispe y María Morón por tener la disposición de ayudar en el procedimiento experimental cuando se encontraban en el IBBM y a la Sra. María Luz Carhuaz por sus consejos alentadores.

A mis queridas hermanas, Luisa y Mary, y a mis preciados padres por la paciencia, comprensión, motivación y apoyo incondicional, brindados en todo momento.

Al Convenio de subvención FONDECYT 129-2015 por el financiamiento para la realización del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. <i>Caulerpa filiformis</i> (Suhr) Hering	3
2.1.1. Clasificación taxonómica	3
2.1.2. Distribución geográfica y hábitat	3
2.1.3. Descripción morfológica.....	5
2.1.4. Reproducción.....	5
2.1.5. Aspectos ecológicos.....	6
2.2. USO DE CAULERPA	6
2.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE CAULERPA	7
2.4. METABOLITOS SECUNDARIOS	8
2.5. COMPUESTOS FENÓLICOS.....	8
2.5.1. Síntesis de compuestos fenólicos	9
2.5.2. Clasificación de los compuestos fenólicos.....	10
2.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	11
2.6.1. Estrés oxidativo	11
2.6.2. Radicales libres.....	11
2.6.3. Mecanismo de los antioxidantes.....	11
2.7. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA VÍA LIPOXIGENASA	12
2.7.1. Procesos inflamatorios	12
2.7.2. Lipoxigenasa	13
2.7.3. Mecanismo de acción de la lipoxigenasa.....	13
2.7.4. Inhibidores de la lipoxigenasa	14
2.8. ALELOPATÍA	15
2.8.1. Definición de alelopatía	15
2.8.2. Agentes alelopáticos	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	17
3.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	17
3.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	18

3.4.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	18
3.4.1.	Materiales.....	18
3.4.2.	Equipos.....	18
3.4.3.	Reactivos.....	19
3.5.	PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	19
3.5.1.	Tratamiento de la muestra.....	19
3.5.2.	Preparación del extracto metanólico.....	20
3.6.	SCREENING FITOQUÍMICO	21
3.7.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES	24
3.8.	ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	25
3.8.1.	Método de captación del radical DPPH.....	25
3.8.2.	Método de captación del radical ABTS	26
3.9.	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA LIPOXIGENASA	28
3.10.	BIOENSAYO DE CRECIMIENTO DE RADÍCULAS E HIPOCÓTILOS DE LECHUGA Y TOMATE.....	30
3.11.	PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1.	RENDIMIENTOS DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS	32
4.2.	SCREENING FITOQUÍMICO	32
4.3.	CONTENIDO DE FENOLES TOTALES.....	34
4.4.	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	35
4.5.	INHIBICIÓN DE LA LIPOXIGENASA-1	39
4.6.	BIOENSAYO DE CRECIMIENTO DE RADÍCULAS E HIPOCÓTILOS DE LECHUGA Y TOMATE	40
V.	CONCLUSIONES.....	46
VI.	RECOMENDACIONES	47
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
VIII.	ANEXOS	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Clasificación general de los compuestos fenólicos.....	10
Cuadro 2: Rendimientos de los extracto metanólicos de <i>C. filiformis</i>	32
Cuadro 3: Screening fitoquímico del extracto metanólicos de <i>C. filiformis</i> de las bahías de Sechura y Paracas.	33
Cuadro 4: Actividad antioxidante del extracto metanólico de <i>C. filiformis</i> mediante el ensayo de ABTS.	36
Cuadro 5: Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de <i>C. filiformis</i> mediante el ensayo de DPPH.	38
Cuadro 6: Longitud y porcentaje de crecimiento de hipocótilos de <i>L. sativa</i>	42
Cuadro 7: Longitud y porcentaje de crecimiento de radículas de <i>L. sativa</i>	42
Cuadro 8: Longitud y porcentaje de crecimiento de hipocótilos de <i>S. lycopersicum</i>	45
Cuadro 9: Longitud y porcentaje de crecimiento de radículas de <i>S. lycopersicum</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de la distribución de <i>C. filiformis</i> en la costa del Perú.....	4
Figura 2: Componentes morfológicos del talo de <i>C. filiformis</i>	5
Figura 3: Estructura química del Fenol.....	8
Figura 4: Rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos.	9
Figura 5: Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes.	12
Figura 6: Mecanismo enzimático de lipoxigenasa-1 de soya en condiciones aeróbicas. ...	14
Figura 7: Ubicación de los lugares de colecta de las muestras de <i>C. filiformis</i>	17
Figura 8: Esquema de la obtención del extracto metanólico de <i>C. filiformis</i> , y la prueba química y biológica correspondiente.	20
Figura 9: Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>C. filiformis</i>	21
Figura 10: Curva de calibración del ácido gálico.....	34
Figura 11: Contenido de fenoles totales en el extracto metanólico de <i>C. filiformis</i> de bahía Sechura y bahía Paracas.	34
Figura 12: Porcentaje de inhibición del radical ABTS en presencia del extracto metanólico de <i>C. filiformis</i> de Sechura y Paracas.....	35
Figura 13: Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de <i>C. filiformis</i> mediante el ensayo de ABTS.....	36
Figura 14: Porcentaje de inhibición del radical DPPH del extracto metanólico de <i>C. filiformis</i> de Sechura y Paracas.....	37
Figura 15: Capacidad antioxidante del extracto metanólico de <i>C. filiformis</i> mediante el ensayo de DPPH.	38
Figura 16: Capacidad inhibitoria (IC ₅₀) del extracto metanólico <i>C. filiformis</i> de Sechura y de Paracas, y el estándar quercetina sobre la LOX-1.....	39
Figura 17: Efecto del extracto metanólico de <i>C. filiformis</i> de Sechura y Paracas, sobre el crecimiento de hipocótilos y radículas de <i>L. sativa</i> . El Control se muestra como concentración de 0 mg muestra seca/mL.	41
Figura 18: Efecto del extracto metanólico de <i>C. filiformis</i> de Sechura y Paracas, sobre el crecimiento de hipocótilos y radículas de <i>S. lycopersicum</i> . El Control se muestra como concentración de 0 mg muestra seca/mL.	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Constancia de clasificación taxonómica de <i>C. filiformis</i>	57
Anexo 2: Colecta y secado de alga <i>C. filiformis</i>	58
Anexo 3: Preparación del extracto metanólico de <i>C. filiformis</i>	58
Anexo 4: Screening fitoquímico del talo de <i>C. filiformis</i> de Sechura.	59
Anexo 5: Screening fitoquímico del talo de <i>C. filiformis</i> de Paracas.....	59
Anexo 6: Cuantificación de fenoles totales de <i>C. filiformis</i>	60
Anexo 7: El estándar ácido gálico y su absorbancia en la cuantificación de fenoles totales.	60
Anexo 8: ANOVA de un factor del contenido de fenoles totales entre el extracto metanólico de <i>C. filiformis</i> de Sechura y Paracas.....	60
Anexo 9: Evaluación de la antioxidante de <i>C. filiformis</i> de Sechura y Paracas por el método ABTS.	61
Anexo 10: Evaluación de la actividad antioxidante de <i>C. filiformis</i> de Sechura y Paracas por el método DPPH.	61
Anexo 11: Análisis estadístico de la actividad antioxidante, por el método de captación del radical ABTS y DPPH.	61
Anexo 12: Análisis de correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante.	62
Anexo 13: Análisis estadístico de la inhibición de la enzima lipoxigenasa-1.	63
Anexo 14: Bioensayo de crecimiento de radículas e hipocótilos de lechuga y tomate.	63
Anexo 15: Análisis estadístico del crecimiento de radículas e hipocótilos de <i>L. sativa</i> y <i>S. lycopersicum</i>	64

RESUMEN

Caulerpa filiformis es una alga marina catalogada como una especie invasora. En el Perú, durante años, su distribución estuvo considerada a la costa norte (isla Lobos de Afuera, y Piura), recientemente se ha reportado en la costa central (Ancash, Lima e Ica). Especies del género *Caulerpa*, como *C. filiformis*, producen metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas, antifúngicas, antivirales y alelopáticas; no obstante, en nuestro país no se han realizado estudios de este tipo en esta especie. Por lo tanto, la presente investigación tiene como objetivo evaluar el uso potencial de *C. filiformis*, procedente de las bahías de Paracas y Sechura, como fuente de principios activos. A partir del alga seca y pulverizada, se preparó el extracto metanólico. El screening fitoquímico del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas revelaron la presencia de hidratos de carbono, polifenoles, taninos, flavonoides, lípidos, alcaloides, esteroides y triterpenos, para ambos extractos. El contenido de fenoles totales del extracto de *C. filiformis* de Sechura (39.31 ± 0.39 mg de AGE/g extracto) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el de Paracas (18.78 ± 0.31 mg de AGE/g extracto). En los ensayos ABTS y DPPH, con cada muestra, la capacidad antioxidante del extracto de *C. filiformis* de Sechura ($IC_{50} = 3.49 \pm 0.01$ y 2.18 ± 0.02 mg/mL) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) al de Paracas ($IC_{50} = 6.41 \pm 0.02$ y 2.42 ± 0.04 mg/mL). En el ensayo de inhibición de la lipoxigenasa, la inhibición del extracto de *C. filiformis* de Sechura fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el de Paracas. En el bioensayo de crecimiento de radícula e hipocótilo, el extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas, generó un efecto positivo en la elongación del hipocótilo tanto en las plántulas de lechuga como de tomate. En conclusión, *C. filiformis* produce compuestos fenólicos y otros compuestos químicos con potencial antioxidante, antiinflamatorio y bioestimulante de plantas.

Palabras clave: *Caulerpa filiformis*, screening fitoquímico, contenido fenólico, actividad antioxidante, lipoxigenasa, alelopatía.

ABSTRACT

Caulerpa filiformis is a marine algae cataloged as an invasive species. In Peru, for years, its distribution was considered to the north coast (Isla Lobos de Afuera, and Piura), recently it has been reported in the central coast (Ancash, Lima and Ica). Species of the *Caulerpa* genus, such as *C. filiformis*, produce secondary metabolites with antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antibacterial, antifungal, antiviral and allelopathic properties; However, no studies of this type have been carried out in this species in our country. Therefore, the present investigation aims to evaluate the potential use of *C. filiformis*, from the bays of Paracas and Sechura, as a source of active principles. From the dried and powdered algae, the methanolic extract was prepared. Phytochemical screening of the methanolic extract of *C. filiformis* from Sechura and Paracas revealed the presence of carbohydrates, polyphenols, tannins, flavonoids, lipids, alkaloids, steroids and triterpenes, for both extracts. The content of total phenols of the extract of *C. filiformis* of Sechura (39.31 ± 0.39 mg of AGE/g extract) was significantly higher ($p < 0.05$) than that of Paracas (18.78 ± 0.31 mg of AGE/g extract). In the ABTS and DPPH assays, with each sample, the antioxidant capacity of Sechura *C. filiformis* extract ($IC_{50} = 3.49 \pm 0.01$ and 2.18 ± 0.02 mg/mL) was significantly higher ($p < 0.05$) than that of Paracas ($IC_{50} = 6.41 \pm 0.02$ and 2.42 ± 0.04 mg/mL). In the inhibition assay of lipoxygenase, the inhibition of *C. filiformis* extract from Sechura was significantly higher ($p < 0.05$) than that of Paracas. In the bioassay of radicle and hypocotyl growth, the methanolic extract of *C. filiformis* from Sechura and Paracas, generated a positive effect in the elongation of the hypocotyl in both the lettuce and tomato seedlings. In conclusion, *C. filiformis* produces phenolic compounds and other chemical compounds with antioxidant, anti-inflammatory and plant biostimulant potential.

Keywords: *Caulerpa filiformis*, phytochemical screening, phenolic content, antioxidant activity, lipoxygenase, allelopathy.

I. INTRODUCCIÓN

Las macroalgas marinas son una fuente potencial de productos naturales bioactivos. Se han utilizado desde la antigüedad como alimento, forraje, fertilizante y medicina, principalmente en los países asiáticos (Kolanjinathan *et al.* 2014). Las algas contienen una amplia gama de compuestos, tales como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, minerales, vitaminas del grupo B, fibra dietética; compuestos naturales de crecimiento de plantas, tales como auxinas, giberelinas y citoquininas (Ibañez *et al.*; Khan *et al.*, citados por Michalak y Chojnacka 2015). Además producen compuestos bioactivos, tales como polifenoles, terpenoides, carotenoides y tocoferoles, los cuales poseen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales y alelopáticas (Michalak y Chojnacka 2015, Choi y Choi 2016) .

En la costa peruana encontramos una gran diversidad de macroalgas marinas (Gil-Kodaka *et al.* 2002, IMARPE y PRODUCE 2016), la que constituye una fuente potencial de compuestos biológicamente activos, con diversas aplicaciones principalmente en las industrias alimentaria y farmacéutica. Por ejemplo, las algas del género *Caulerpa* han despertado interés por sus metabolitos secundarios que presentan propiedades antivirales (Nicoletti *et al.* 1999), antitumorales (Cavas *et al.* 2006), antioxidantes (Nguyen *et al.* 2011), antimicrobianas (Vairappan 2004), y antiinflamatorias (Stirk *et al.* 2003). En nuestro país, la especie *Caulerpa filiformis* sería la única representante de este género.

Caulerpa filiformis había sido descrita inicialmente por Howe (1914) y Acleto (1986) para la costa norte (isla Lobos de Afuera y Piura); sin embargo, fue posteriormente introducida en la costa central (Ancash, Lima e Ica) (Acosta y Vargas 2012). Dicha introducción habría sido facilitada por el transporte del bivalvo *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” desde la bahía de Sechura a otras zonas de cultivo (Pariona 2018). Debido a su rápida propagación, *C. filiformis* ha sido reconocida como una especie exótica invasora en los nuevos hábitats colonizados, como la Bahía de Paracas (MINAM 2014, Ramsar 2015).

Actualmente, *C. filiformis* no es objeto de ningún tipo de uso, y existen muy pocos estudios sobre su bioquímica y/o propiedades farmacológicas (Egg *et al.* 2015, Hernández *et al.* 2015). En cambio, su alta productividad en lugares como la bahía de Paracas, hace que una gran cantidad de esta alga quede varada en las orillas, donde se acumula y descompone, generando malos olores, contaminación e impacto paisajista (observación personal).

Por lo tanto, el objetivo general de la presente investigación fue: evaluar el uso potencial del alga *C. filiformis* procedentes de las bahías de Sechura y Paracas, como fuente de principios activos. De esta manera, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en el extracto metanólico de *C. filiformis* mediante screening fitoquímico.
- Determinar la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales del extracto metanólico de *C. filiformis*.
- Determinar la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de *C. filiformis* mediante la inhibición de la lipoxigenasa.
- Determinar el efecto alelopático del extracto metanólico de *C. filiformis* frente a semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Solanum lycopersicum* (tomate).

Para responder a estos objetivos se plantearon las siguientes hipótesis:

- H1: El extracto metanólico de *C. filiformis* presenta actividad antioxidante.
- H2: El extracto metanólico de *C. filiformis* presenta actividad antiinflamatoria vía inhibición de la lipoxigenasa.
- H3: El extracto metanólico de *C. filiformis* presenta efectos alelopáticos sobre las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Solanum lycopersicum* (tomate).
- H4: La actividad antioxidante, antiinflamatoria y los efectos alelopáticos del extracto metanólico son diferentes según el hábitat de procedencia de *C. filiformis*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering

2.1.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo al Sistema de Clasificación de Guiry, MD y Guiry GM (2011), la macroalga *C. filiformis* presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Viridiplantae
Phylum	:	Chlorophyta
Subphylum	:	Chlorophytina
Clase	:	Ulvophyceae
Orden	:	Bryopsidales
Familia	:	Caulerpaceae
Género	:	Caulerpa
Especie	:	<i>Caulerpa filiformis</i> (Suhr) Hering

2.1.2. Distribución geográfica y hábitat

A nivel mundial *C. filiformis* se encuentra distribuida en Sudáfrica (Leliaert *et al.* 2000), al sur de Mozambique (Silva *et al.*, citado por Guiry y Guiry, 2011), New South Wales (NSW) al sudeste Australia (Zhang *et al.* 2014), Indonesia (Atmadja y Prud'homme van Reine, citados por Guiry y Guiry, 2011) y Perú (Acleto 1986; Acosta y Vargas 2012).

En el Perú *C. filiformis* fue reportada por primera vez por Howe (1914), para las islas Lobos de Afuera, frente a Lambayeque; y posteriormente reportada porACLEto (1986) para diversas localidades de la costa de Piura. Desde el primer hallazgo de *C. filiformis*, su rango de distribución en la costa norte del Perú se mantuvo durante más de 90 años a temperaturas entre 17.5°C a 24°C (Acosta y Vargas 2012).

Actualmente, esta especie ha sido reportada en la costa central del Perú, extendiendo su distribución hacia el sur a Bahía Samanco y Bahía Tortugas en Ancash; Pucusana en Lima; Pisco (Acosta y Vargas 2012) y Paracas (Laguna Grande) en Ica (IMARPE 2016).

Por lo tanto, el actual límite de la distribución de *C. filiformis* se encuentra al sur, a más de 1000 km de su hábitat original, encontrando a las principales praderas en las bahías protegidas donde se realiza cultivo de concha de abanico (Pariona 2018). En la figura 1 se muestra la distribución de *C. filiformis* a lo largo de la costa peruana.

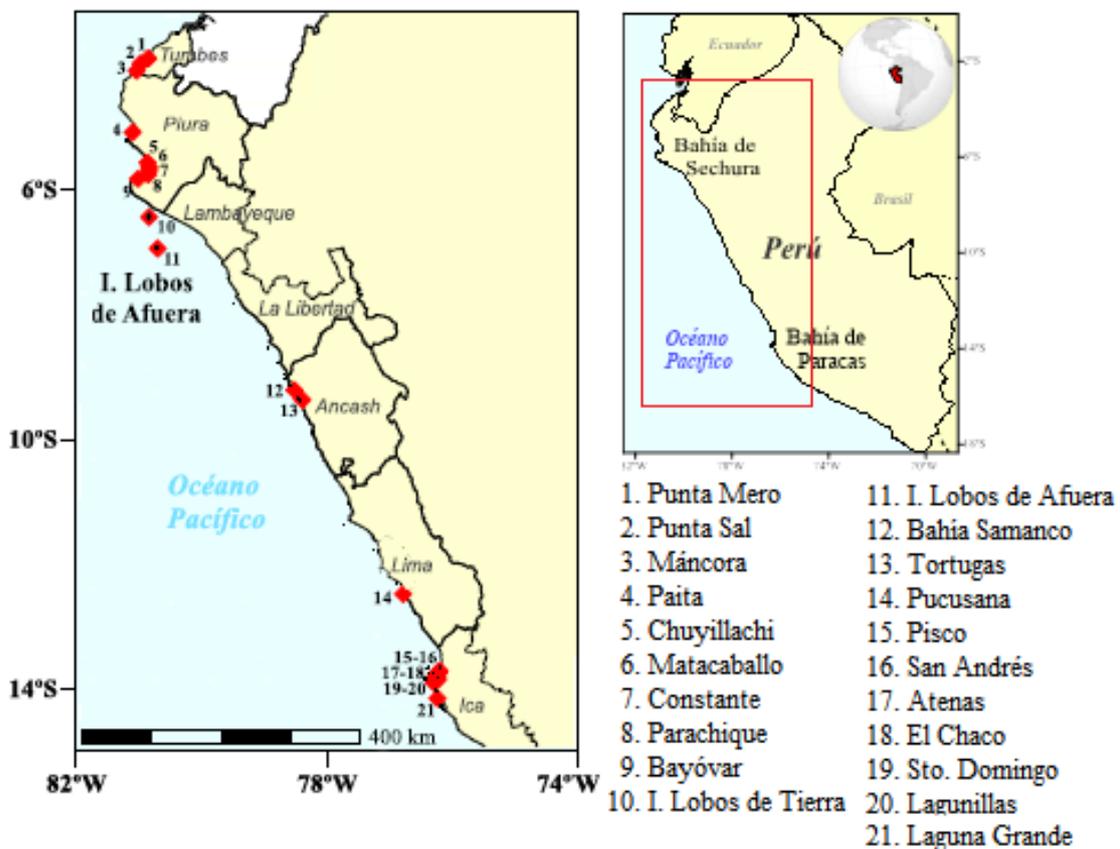


Figura 1: Mapa de la distribución de *C. filiformis* en la costa del Perú.

FUENTE: Adaptado de Pariona 2018.

En New South Wales, Australia, *C. filiformis* crece en sustratos blandos como arena fina consolidada y en sustratos rocosos del intermareal y submareal somero (Zhang *et al.* 2014). En la costa norte del Perú, esta especie se encuentra habitando los fondos submareales someros, creciendo generalmente sobre sustrato arenoso o areno fangoso (IMARPE 2007a).

2.1.3. Descripción morfológica

Caulerpa filiformis pertenece al grupo de las algas verdes, cuyo talo es una célula multinucleada gigante (cenocito), constituido por frondas planas y verticales con dicotomía de una a tres veces, presenta una estructura anillada en la base de la fronda junto al estolón, este último se fija muy bien al sustrato por medio de los rizoides (Figura 2). En Australia, las frondas de *C. filiformis* pueden llegar a medir hasta 60 cm de longitud (Khou *et al.* 2007), formando densas praderas tanto en sustratos blandos (arena) como en sustratos duros (Zhang *et al.* 2014).

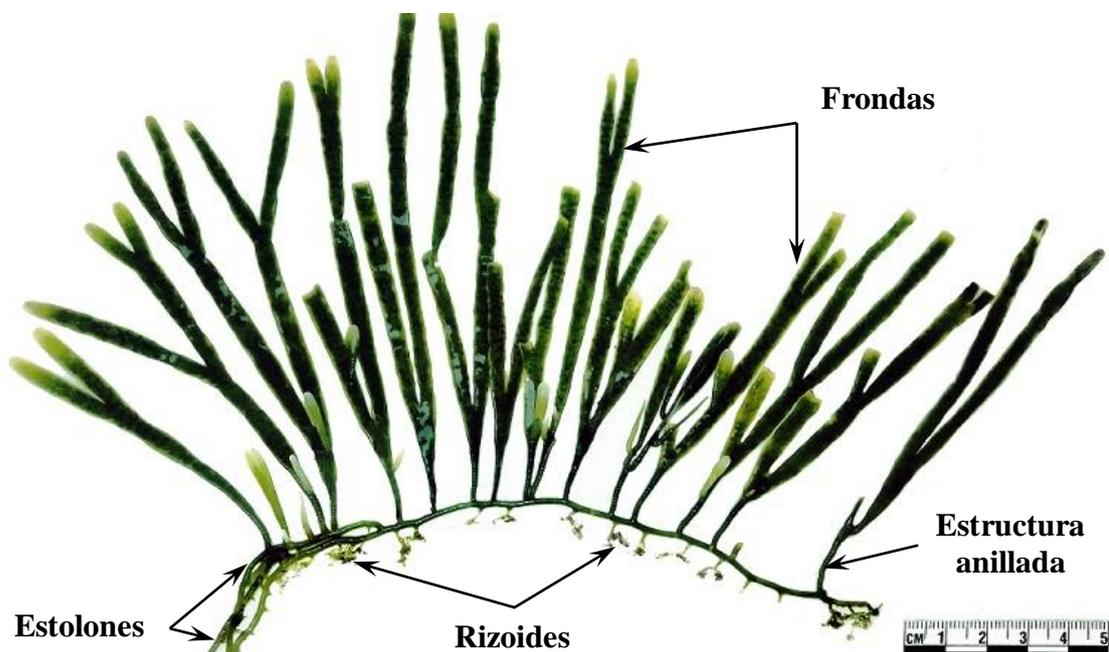


Figura 2: Componentes morfológicos del talo de *C. filiformis*.

FUENTE: Elaborado en base a Khou *et al.* 2007.

2.1.4. Reproducción

La reproducción asexual por fragmentación del talo es la más importante en el género *Caulerpa*, debido a que cada fragmento es capaz de formar un nuevo individuo; en cambio la reproducción sexual es poco común. Este último consiste en la conversión de casi todo el protoplasto del talo en gametos que serán liberados a través de las papilas provocando la muerte del alga (Williams 2002).

Los mecanismos de expansión más importantes de esta especie son por fragmentación y crecimiento vegetativo, por ello pueden propagarse de forma rápida y con gran facilidad, ésta característica convierte a este género en el grupo más exitoso de especies invasoras (Zhang *et al.* 2014, Khou *et al.* 2007); posee un crecimiento vegetativo muy activo por estolones, cuyos rizoides se fijan muy bien a diferentes tipos de sustratos, ya sea blando como arena consolidada fina y sustratos duros (Zhang *et al.* 2014, Khou *et al.* 2007).

Es así que *C. filiformis*, debido al rápido incremento en abundancia en comparación con otras algas del submareal somero en el sureste de Australia, ha sido listada como una especie invasora por las pesquerías de New South Wales (Pollard y Pethebridge, citado por Khou *et al.* 2007).

2.1.5. Aspectos ecológicos

Caulerpa filiformis, es la especie dominante en las praderas de macroalgas, presenta una amplia distribución en la bahía de Sechura, tiene una gran importancia en el asentamiento de las semillas de concha de abanico y constituye refugio para los estados juveniles de muchas especies faunísticas bentónicas (IMARPE 2007b). Al igual que en Sechura, *C. filiformis* es la especie de macroalga dominante en la bahía de Paracas, alberga una gran abundancia y diversidad de fauna epibentónica, se distribuye en el rango de temperatura de 14.9 a 23.8 °C; está asociada a sedimentos arenosos y con altos contenidos de materia orgánica (Pariona 2018).

2.2. USO DE CAULERPA

Algunas especies de *Caulerpa*, tales como *C. lentillifera*, *C. racemosa*, *C. peltata* y *C. cupressoides*, son utilizadas como parte de la alimentación humana, sobre todo en los países asiáticos (Nagappan y Vairappan 2013, De Gaillande *et al.* 2017). Otra especie de *Caulerpa*, como *C. taxifolia*, es utilizada en Filipinas, en hierbas medicinales, como agente antifúngico e hipertensivo (Ninomiya *et al.*, citado por Stirk *et al.* 2003). También han sido utilizadas como alga decorativa de acuarios (Meinesz *et al.* 2001); en refugios de acuarios marinos como filtros biológicos para eliminar nitratos y fosfatos (Gaitán *et al.* 2017).

2.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE CAULERPA

Los compuestos químicos aislados de las algas marinas han evidenciado la capacidad que tienen estas para producir metabolitos secundarios, diferentes a los encontrados en especies terrestres (Cardozo *et al.* 2007). La producción de estos compuestos pueden variar según la especie, el hábitat, la madurez y en parte por la influencia que ejercen los factores ambientales y geográficos sobre ellas (Bramarambica *et al.* 2014).

Es así que los metabolitos secundarios reportados por Azhagu Raj *et al.* (2015) para el extracto metanólico de *Caulerpa racemosa* difirieron con los reportados por Shibu y Dhanam (2016) para el extracto etanolito de la misma especie, procedentes de Tirunelveli y del golfo de Mannar, en Tamil Nadu, India, respectivamente. Los metabolitos comunes fueron esteroides, grupos fenólicos, saponinas, taninos, flavonoides, terpenoides. Los metabolitos secundarios producidos por las especies del género caulerpa son diversos, sin embargo se han detectado metabolitos terpenoides como constituyentes comunes en *C. trifaria*, *C. brownii*, *C. felxilis*, *C. peltata* y *C. racemosa* (Capon *et al.* 1983).

Los extractos de especies Caulerpa, tales como *C. peltata*, *C. racemosa*, *C. lentillifera* y *C. cupressoides* contienen en su estructura proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y minerales; y producen metabolitos secundarios, tales como hidratos de carbono (xilano), compuestos fenólicos, taninos, alcaloides (caulerpina), terpenoides (Caulerpenina, fitol), esteroides y saponinas (Capon *et al.* 1983, Vairappan 2004, Maeda *et al.* 2012, Movahhedín *et al.* 2014, De Gaillande *et al.* 2017) los cuales poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas, antivirales y antifúngicas.

Asimismo, extractos de Caulerpa y otras algas han mostrado tener actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígeno y antioxidante (Stirk *et al.* 2003, Nguyen *et al.* 2011, Gany *et al.* 2014), encontrándose en algunos estudios, mayor bioactividad de los extractos de las algas verdes en comparación con las algas rojas y pardas. Además, estudios previos también han evidenciado que extractos de Caulerpa y otras algas marinas verdes poseen compuestos químicos con potencial alelopático que afectan el crecimiento de plantas marinas y terrestres (Inderjit y Dakshini 1994, Choi y Choi 2016).

2.4. METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas sintetizan una gran variedad compuestos orgánicos, entre ellas los metabolitos secundarios, los cuales no participan de forma directa en el crecimiento y desarrollo de las plantas, algunos de estos son responsables de olores y colores de los vegetales, otros de las virtudes culinarias, medicinales o venenosas. La distribución de estos metabolitos secundarios es restringida y diferenciada entre los grupos taxonómicos del reino vegetal. También es conocido que intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente: protegiendo a las plantas de la ingestión por herbívoros y la infección por patógenos microbianos, incluso las plantas lo producen para atraer polinizadores y dispersadores de semillas, y como agentes en la competencia planta-planta (Taiz y Zeiguer 2006).

Los metabolitos secundarios de las plantas se dividen en tres grandes grupos: los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos nitrogenados o alcaloides (Váldez y Balvín, citado por García 2004).

2.5. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides, constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios, una gran variedad de estos metabolitos son sintetizados por las plantas. Su estructura básica es un grupo fenol, el cual está compuesto por un anillo aromático (fenil) unida a un grupo hidroxilo (OH) (Ávalos y Pérez-Urria 2009) (Figura 3). Frecuentemente, ocurren como glicósidos, combinado con unidades de azúcar, son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua (Lock de Ugaz 1994).

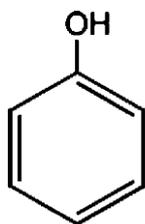


Figura 3: Estructura química del Fenol.

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides (Ávalos y Pérez-Urria 2009).

Los compuestos fenólicos intervienen en las funciones metabólicas en las plantas, como el crecimiento, reproducción, en la protección contra patógenos externos, y el estrés ocasionado por la radiación UV y los depredadores; también son responsables del color, aroma y sabor de los alimentos (Peñarrieta *et al.* 2014) ; además están relacionados con la prevención de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias; y presentan propiedades antidiabéticas, anticancerígenas, antiinflamatorias, vasodilatadoras, antitrombóticas y antioxidantes (Muñoz y Ramos 2007).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su estructura química, el cual tiene la capacidad de secuestrar a los radicales libres (scavengers) y de quelar metales (Urquiaga y Leighton 2000), formando radicales intermedio más estables y menos reactivo. También, tienen la capacidad de inhibir la actividad de la lipoxigenasa (Yasumoto *et al.* 1970).

2.5.1. Síntesis de compuestos fenólicos

La compuestos fenólicos en las plantas surgen biogenéticamente de dos rutas principales: la ruta del shikimato que origina directamente fenilpropanoides, tales como los ácidos hidroxicinámicos y cumarinas; y la ruta del acetato que produce fenoles simples y también muchas quinonas. A partir de la combinación de estas dos rutas se biosintetizan los flavonoides, el grupo más grande de los compuestos fenólicos (Figura 4) (Harborne 1989).

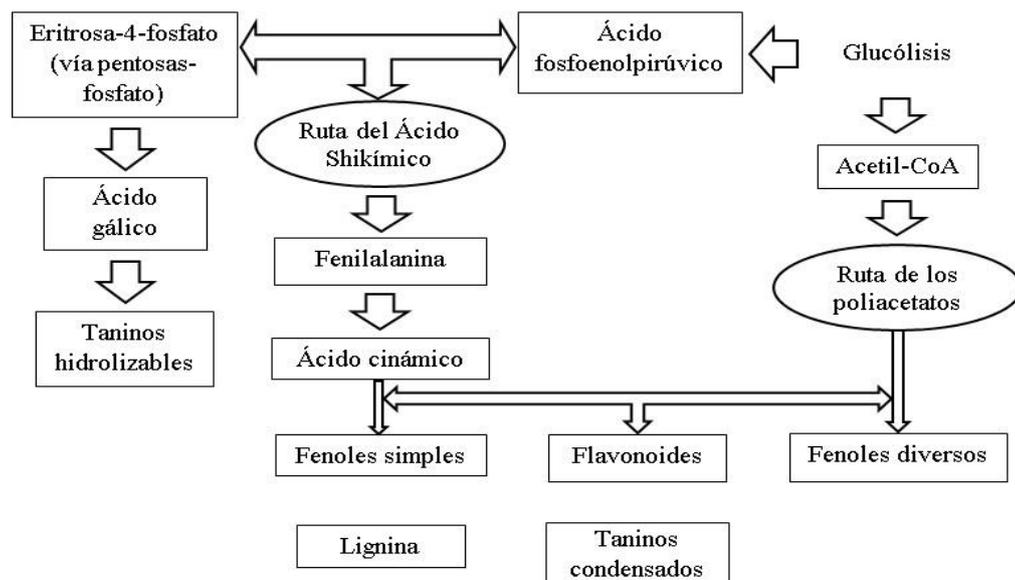


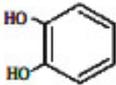
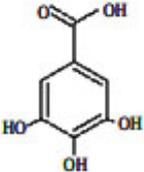
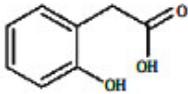
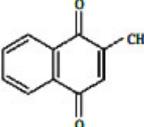
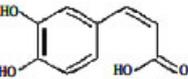
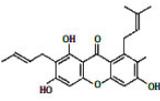
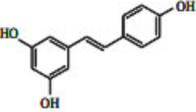
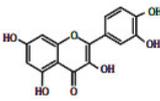
Figura 4: Rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos.

FUENTE: Ávalos y Pérez-Urria 2009.

2.5.2. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se clasifican en ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. Solo se han identificado alrededor de 8.000 compuestos fenólicos y la mayoría de estos poseen una estructura de tres anillos (dos aromáticos y uno heterociclo oxigenado) y los más sencillos poseen solo un anillo aromático, conforme aumenta el número de sustituyentes, se va incrementando la complejidad de la estructura. En el cuadro 1, se muestra la clasificación de los compuestos fenólicos agrupado en familias (Mercado-mercado *et al.* 2013).

Cuadro1: Clasificación general de los compuestos fenólicos.

Clase	Estructura	Ejemplo	Clase	Estructura	Ejemplo
Fenoles simples	C ₆	 Catecol	Ácidos hidroxibenzoicos	C ₆ -C ₁	 Ácido gálico
Ácidos Fenilacéticos	C ₆ -C ₂	 Ácido 2-hidroxifenilacético	Naftoquinonas	C ₆ -C ₄	 Menadiona
Ácidos hidroxicinámicos	C ₆ -C ₃	 Ácido caféico	Xantomas	C ₆ -C ₁ -C ₆	 Mangostina
Estibenos	C ₆ -C ₂ -C ₆	 Resveratrol	Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆	 Quercetina

FUENTE: Mercado-mercado *et al.* 2013.

2.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.6.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo en sistemas biológicos es causado por la generación y exposición prolongada a agentes oxidantes como las especies reactivas del oxígeno (ERO), o a una disminución de la capacidad antioxidante del sistema, o a ambas. (San-Miguel y Martin-Gill 2009). Por lo tanto, un desequilibrio en el sistema antioxidante puede producir daño celular, que con frecuencia están implicadas en la patología de enfermedades como el cáncer, arterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y en los procesos de envejecimiento prematuro (Rawson *et al.* 2013).

2.6.2. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas capaces de existir de forma independiente, contienen un electrón desapareado en un orbital atómico. La mayoría de estos radicales son inestables y altamente reactivos, por lo tanto, pueden donar o aceptar un electrón de otras moléculas, es decir se comportan como oxidantes o reductores (Cheeseman y Slater, citado por Lobo *et al.* 2010).

Los radicales libres como las ERO son moléculas altamente reactivas debido a que presentan electrones desapareados en su estructura, estos electrones reaccionan con varias macromoléculas biológicas de la célula como los carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, y alteran sus funciones (Birben *et al.* 2012). Entre las ERO destacan los radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), alcoxilo ($ROO\cdot$) y óxido de nitrógeno. Un segundo grupo de ROS lo constituyen los no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$) (San-Miguel y Martin-Gill 2009).

2.6.3. Mecanismo de los antioxidantes

Los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante pueden clasificarse en función a la especie oxidante (ROS/RNS o radicales estables no biológicos), al sustrato utilizado (químico o biológico) o por el mecanismo de acción del antioxidante (capacidad secuestradora de radicales libres, capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica, capacidad de reducir metales, etc.) (Rawson *et al.* 2013).

Los antioxidantes pueden inhibir o retardar la oxidación de dos maneras: ya sea eliminando los radicales (antioxidante primario), o mediante un mecanismo que no implica la eliminación directa de los radicales libres (antioxidante secundario). Los antioxidantes primarios se consumen durante el período de inducción. En cambio los antioxidantes secundarios funcionan mediante diversos mecanismos, que incluyen la unión de iones metálicos, la eliminación de oxígeno, la conversión de hidroperóxido a especies no radicales, la absorción de radiación UV o la desactivación de oxígeno singlete (Rawson *et al.* 2013; Krinsky, citado por Lobo *et al.* 2010)

Los métodos más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* son el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) y ABTS (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico) el cual está basado en la reducción del radical por captación de un electrón o un átomo hidrógeno, al añadir el antioxidante (Figura 5). Estos métodos se utilizan para determinar toda la eficacia antiradicalaria de los compuestos fenólicos (Ugartondo Casadevall 2009).

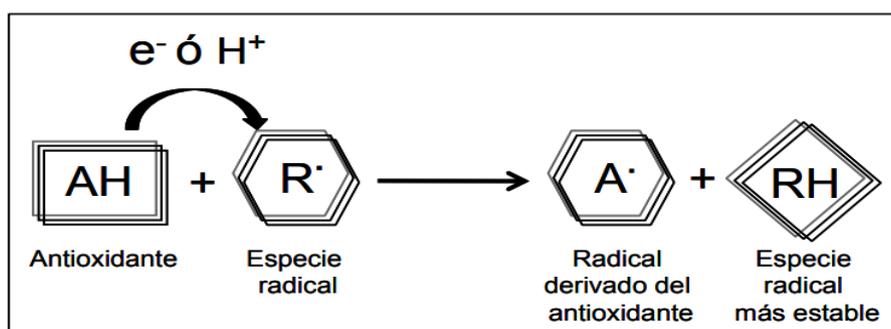


Figura 5: Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes.

FUENTE: Ugartondo 2009.

2.7. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA VÍA LIPOXIGENASA

2.7.1. Procesos inflamatorios

La inflamación se origina como un mecanismo de defensa del organismo ante estímulos perjudiciales. La mayoría de estos estímulos inflamatorios promueven la activación de una enzima llamada Fosfolipasa A₂, la cual actúa sobre los fosfolípidos de las membranas celulares y estimula la liberación del ácido araquidónico. Una vez liberada esta molécula, puede ser transformada en mediadores químicos de los procesos inflamatorios y seguir dos vías fundamentalmente de transformación, a través de la lipoxigenasa (5-LOX) y de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) (Menendez *et al.* 2010).

2.7.2. Lipoxigenasa

En las plantas, la lipoxigenasa (Ácido linoleico: oxígeno oxido-reductasa, EC 1.13.11.12) es un tipo de dioxigenasa que cataliza la adición de oxígeno molecular en ácidos grasos poliinsaturados que contengan al menos un sistema cis, cis-1,4-pentadieno, generando como producto primario *cis, trans* hidroperóxidos conjugados, ópticamente activos (Sanz *et al.* 1992).

En los animales, la 5-lipoxigenasa (5-LOX) es la enzima clave en la biosíntesis de los leucotrienos (LTs) y cataliza los pasos iniciales en la conversión del ácido araquidónico a leucotrienos biológicamente activos. Los leucotrienos se consideran mediadores potentes de reacciones inflamatorias y alérgicas, y en relación con sus propiedades proinflamatorias, la inhibición de la vía de la 5-lipoxigenasa se considera interesante en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias. Además de los inhibidores de la 5-lipoxigenasa, los fármacos capaces de bloquear la 5-lipoxigenasa, así como la ruta metabólica de la ciclooxigenasa, también tienen valor terapéutico (Schneider y Bucar 2005).

La lipoxigenasa de los animales y las plantas son similares en cuanto a la actividad enzimática primaria y la especificidad de la enzima (Sanz *et al.* 1992), debido a que siguen el mismo mecanismo catalítico. Sin embargo la mayoría son regio y estereoespecíficas en el lugar de ataque del oxígeno. A pesar de esta contradicción, la lipoxigenasa de soya (LOX-1) es como un punto de control debido a que se asemeja a las LOXs de los mamífero tanto estructuralmente como funcionalmente, es por ello que es usado a menudo para estudios de inhibición como enzimas modelo (Chedea y Jisaka 2011).

2.7.3. Mecanismo de acción de la lipoxigenasa

Las lipoxigenasas catalizan la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico (C18:2, ω -6), linolénico (C18:3, ω -3), araquidónico (C20:4, ω -6)) que contengan al menos un sistema cis, cis-1,4-pentadieno, generando como producto primario hidroperóxidos conjugados *cis, trans*, ópticamente activos (Sanz *et al.* 1992). El hierro desempeña un papel esencial dentro de la acción catalítica de lipoxigenasa (LOX), por lo tanto, cada molécula de LOX contiene un átomo de hierro en el centro activo, que alterna entre los estados de oxidación Fe(II) y Fe(III) durante el proceso catalítico (Belitz *et al.* 2009).

En el ciclo catalítico de la LOX, la enzima es activada por su producto de oxidación, de manera que el Fe (II) se oxida a Fe (III), este último oxida el grupo metileno del sistema 1,4-pentadieno del sustrato, para dar lugar a un radical pentadienilo y un protón, reduciéndose el hierro a la forma inactiva Fe (II). El radical pentadienilo unido a la enzima se adiciona a un sistema dieno conjugado y reacciona con oxígeno molecular para formar un radical peróxido, que es reducido por el Fe (II) para dar el anión peróxido y la consiguiente oxidación del hierro a la forma Fe(III). Luego tras la adición de un protón al anión peróxido se forma el hidroperóxido, completando el ciclo (Figura 6) (Prigge *et al.* 1997, Belitz *et al.* 2009).

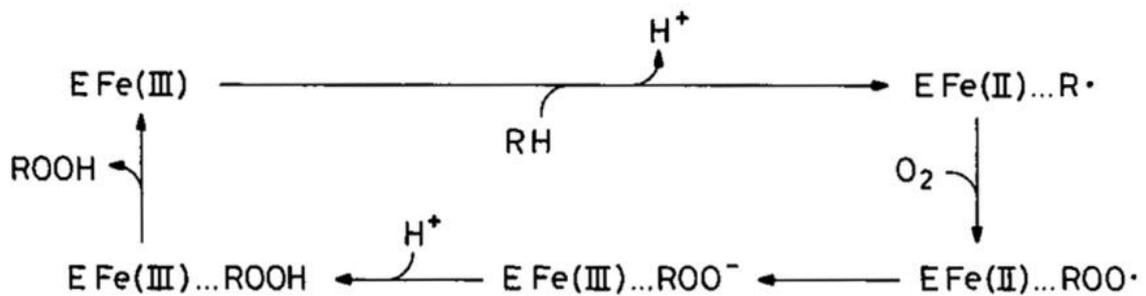


Figura 6: Mecanismo enzimático de lipoxigenasa-1 de soja en condiciones aeróbicas.

FUENTE : Vliegenthart *et al.* 1983.

2.7.4. Inhibidores de la lipoxigenasa

Debido a que las isoformas de las LOXs están implicadas en la patogénesis de las principales enfermedades humanas, los inhibidores LOX son de interés médico y como posibles fármacos. Según el mecanismo de inhibición, los inhibidores de LOX pueden clasificarse en cinco grupos principales (Kuhn *et al.* 2015):

- a. **Inhibidores de redox:** Interfieren con el cambio de valencia del hierro no hemo durante el ciclo catalítico. Se ha demostrado que el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) causa interrupción del ciclo catalítico. lipoxigenasa de soja, reduciendo al Fe⁺³ activo en Fe⁺² inactivo.

- b. Quelantes de hierro:** Complejan el ion hierro en el sitio activo. Ejemplo: la deferoxamina y desferrioxamina.
- c. Sondas de sitio activo:** Compiten el sustrato en la cavidad de unión al sustrato. Ejemplo: OPP (4-(2-oxapentadeca-4-yne) phenylpropanoic acid) y BW755C (3-amino-1-[m(trifluoromethyl)phenyl]-2-pyrazoline).
- d. Sustratos suicida:** Conducen a la inactivación irreversible de la enzima. Ejemplo: ETYA (5, 8, 11, 14-eicosatetraynoic acid) y ODYA (9, 12-octadecadiynoic acid).
- e. Los inhibidores alostéricos** que se unen a un sitio distinto de la cavidad de unión al sustrato, HODE (ácido hidroxioctadecadienoico).

La investigación realizada por Yasumoto *et al.* (1970), revelaron que ciertos antioxidantes convencionales también son inhibidores de la actividad de la lipoxigenasa, Entre los antioxidantes más potentes que inhiben la actividad de la lipoxigenasa son α -tocoferol, hidroquinona, galato de propilo, ácido nordihidroguaiarético, hidroxitolueno butilado y hidroxianisol butilado.

Una fuente potencial de nuevos inhibidores de la 5-lipoxigenasa es sin duda proporcionada por la abundancia de plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional (Schneider y Bucar 2005); así como de algas.

2.8. ALELOPATÍA

2.8.1. Definición de alelopatía

La alelopatía es un mecanismo de interferencia química entre dos seres vivos; en otras palabras, es cualquier proceso que implique metabolitos secundarios producidos por plantas, microorganismos y hongos, que una vez liberados al ambiente, ejercen influencia en el crecimiento y el desarrollo de sistemas biológicos naturales o implantados, ya sea de forma positiva o negativa. Por lo tanto, estos metabolitos pueden provocar efectos perjudiciales o benéficos sobre germinación, crecimiento o desarrollo de otra planta (da Silva *et al.* 2007).

2.8.2. Agentes alelopáticos

Los efectos de muchas sustancias con actividad alelopática, dependen de la concentración de dichas sustancias. Es así que pueden presentar efectos benéficos a muy bajas concentraciones, y cuando superan un determinado umbral, actúan negativamente sobre la planta receptora. Sin embargo, los efectos negativos son predominantes (Oliveros-Bastidas 2008). La naturaleza química de los compuestos alelopáticos es variable y diversa, los compuestos más estudiados son los compuestos alifáticos, lactonas simples no saturadas, cumarinas, quinonas, flavonoides, taninos, alcaloides, terpenoides y esteroides, que actúan como inhibidores de la germinación y del crecimiento o ambas (Zamorano 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo investigación se desarrolló en los laboratorios de Bioquímica Vegetal y análisis instrumental, del Instituto de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (IIBBM), en la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

3.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de *C. filiformis* fueron colectadas del submareal somero, mediante buceo en apnea, en dos zonas del litoral del Perú: en playa Blanca, Bayóvar, provincia de Sechura, región Piura ($5^{\circ} 49' 50.8''$ S; $81^{\circ} 0' 21.2''$ W); y en playa Atenas, Paracas, provincia de Pisco, región Ica ($13^{\circ} 49' 13.5''$ S; $76^{\circ}18'1.8''$ W) (Figura 7), en los meses de setiembre y octubre del 2017 (primavera). Las muestras fueron lavadas *in situ* con agua de mar para eliminar el exceso de arena y organismos epífitos, luego colocadas en un cooler con refrigerantes para su conservación y transporte.

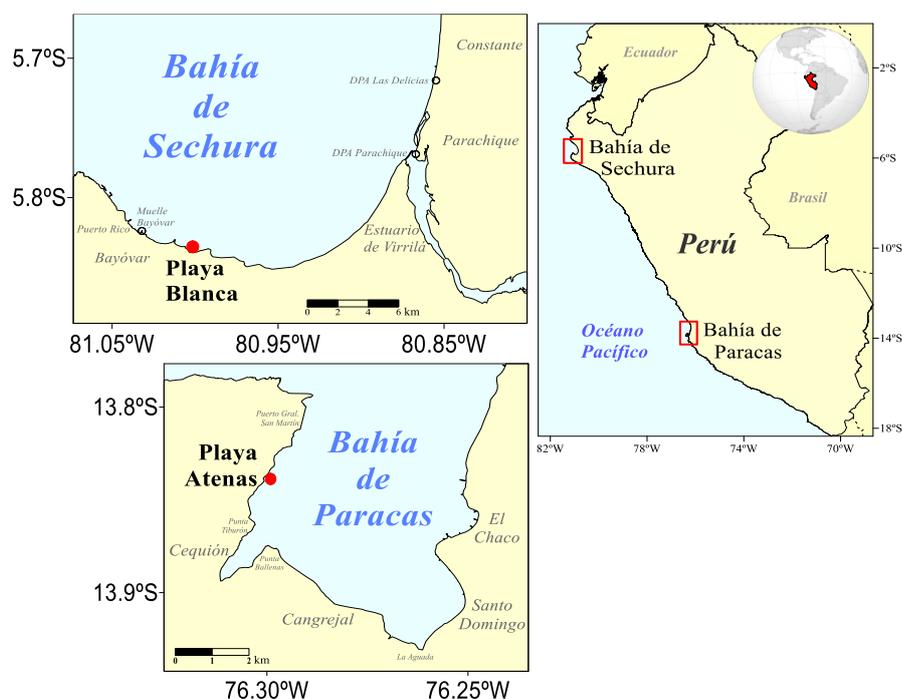


Figura 7: Ubicación de los lugares de colecta de las muestras de *C. filiformis*.

3.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según el sistema de clasificación de Wendy Guiry in Guiry, M.D. & Guiry G.M. 2017, Algae Base (Anexo 1).

3.4. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.4.1. Materiales

- Fiolas de 5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL,
- Beackers de 50 mL, 100 mL, 250 mL y 500 mL
- Pipetas de 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml
- Probetas de 10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml y 250 ml
- Micropipetas de 2-20 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L
- Cubetas de cuarzo para mediciones espectrofotométricas
- Tubos de ensayo de 5 y 10 ml
- Tubos de centrífuga 100 ml (Falcon)
- Propipeta
- Placas Petri
- Gradillas
- Botellas de vidrio color ámbar con tapa

3.4.2. Equipos

- Balanza analítica marca SARTORIUS, con precisión de 0.0001g
- Estufa de convección eléctrica marca BINDER
- Agitador magnético modelo MS-H-Pro
- Agitador Vortex marca Thermo Scientific
- Centrífuga refrigerada modelo Rotofix 32, marca Hettich
- Rotavapor marca HERAEUS-Labofuge 400R
- Espectrofotómetro modelo Pharo300-Spectroquant
- Incubadora modelo FOC 225I, marca VELP SCIENTIFICA
- Potenciómetro digital
- Cocina eléctrica
- Congelador
- Refrigerador

3.4.3. Reactivos

- Cloroformo p.a. (ACS.ISO)
- Mercurio(II) cloruro p.a. (EMSURE® ACS)
- Ácido L(+)-tartárico L(+)-p.a. (EMSURE® ACS,ISO)
- Hierro(III) cloruro hexahidrato para análisis (EMSURE®)
- Yodo resublimado para análisis (ACS.ISO)
- Ácido clorhídrico 37% (J.T. Baker)
- Ácido 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS•+) (Sigma-Aldrich)
- Trolox (Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (Merck)
- DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) (Merck)
- Metanol puro 99.9% (TEDIA)
- Etanol gradoACS (J.T. Baker)
- Persulfato de potasio
- Carbonato de sodio al 20%
- Hidróxido de sodio en perlas (J.T. Baker)
- Lipoxigenasa de Soya tipo I (Sigma-Aldrich)
- Buffer borato de sodio 2N, pH 9
- Ácido linoleico (Sigma-Aldrich)
- Tween 20
- Agua destilada

3.5. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

3.5.1. Tratamiento de la muestra

En el laboratorio, las muestras de *C. filiformis* fueron lavadas inmediatamente con agua potable, y limpiadas para remover el exceso de sales y organismos epífitos adheridos; en seguida, las muestras fueron escurridas y secadas bajo techo, a temperatura ambiente, durante tres días. Luego fueron secadas en una estufa a temperatura constante de 40°C y finalmente almacenadas hasta su uso.

3.5.2. Preparación del extracto metanólico

Para la preparación del extracto se usó un solvente universal; metanol, debido a que es el más utilizado por solubilizar la mayoría de los compuestos presentes en las plantas. Primero las muestras de alga seca, tanto las de Sechura como las de Paracas, fueron pulverizadas en una licuadora. Luego se tomaron 5g de cada pulverizado y se adicionó 100 mL de metanol; la mezcla se mantuvo en agitación constante, a temperatura ambiente, durante de 24 horas. Después la mezcla fue centrifugada a 4500 rpm durante 20 min, del centrifugado se tomó el sobrenadante, el cual constituyó el extracto metanólico al 5% peso/volumen (Figura 8). Finalmente, el extracto fue almacenado en un frasco ámbar a -20°C hasta su uso.

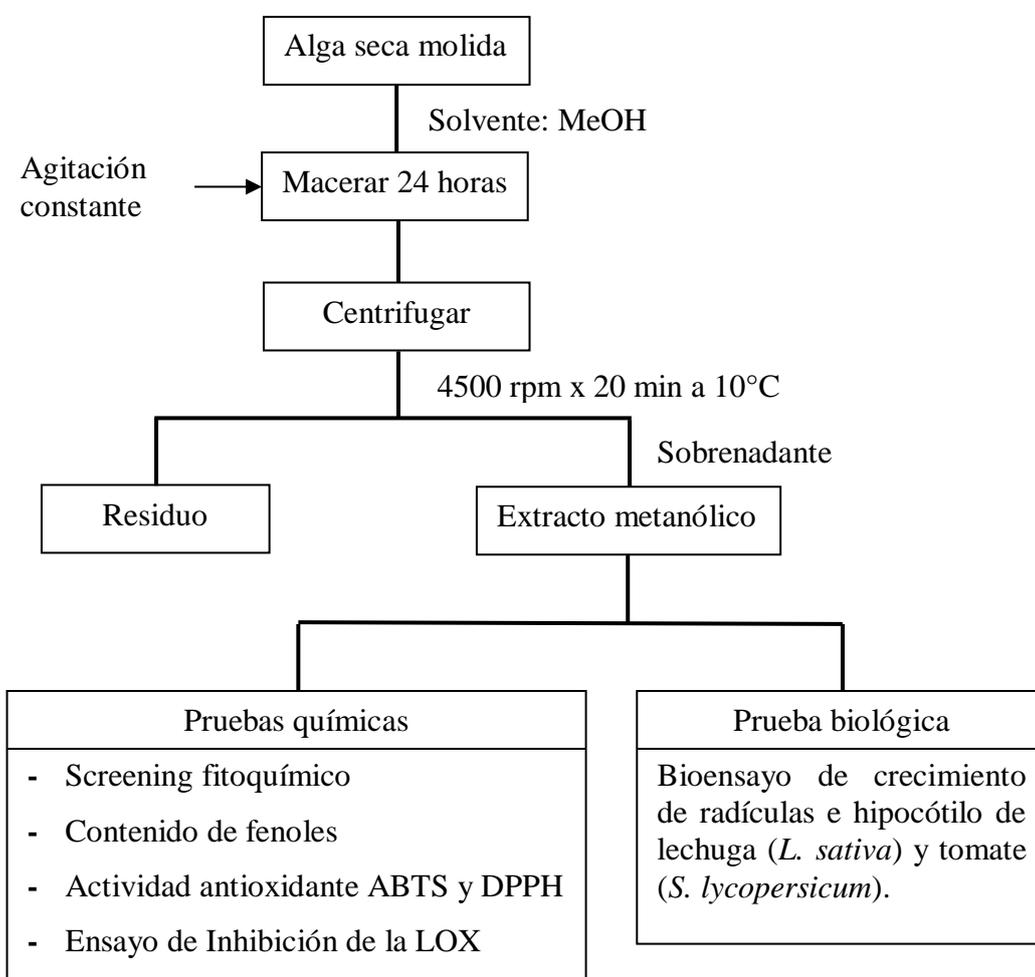


Figura 8: Esquema de la obtención del extracto metanólico de *C. filiformis*, y la prueba química y biológica correspondiente.

Para calcular el rendimiento del extracto, en porcentaje, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Rendimiento} = \left(\frac{\text{Peso del extracto seco}}{\text{Peso de la muestra seca y molida}} \right) \times 100$$

El extracto metanólico obtenido de cada muestra fue utilizado para realizar screening fitoquímico; determinar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante por el método ABTS y DPPH; para realizar el ensayo de inhibición de la lipoxigenasa y el bioensayo de crecimiento de radículas e hipocótilo de lechuga y tomate.

3.6. SCREENING FITOQUÍMICO

Para la detección de los principales grupos de compuestos químicos, se utilizó la metodología propuesta por Rondina y Coussio (1969). Este método consistió en fraccionar el extracto metanólico, para luego aplicar reacciones químicas cualitativas de coloración y precipitación a cada fracción obtenida.

a. Obtención de las fracciones

El extracto metanólico de *C. filiformis* fue fraccionado mediante un cambio de pH y particionado con un solvente de menor polaridad (cloroformo), obteniéndose cuatro fracciones, denominadas fracciones A, B, C y D (Figura 9).

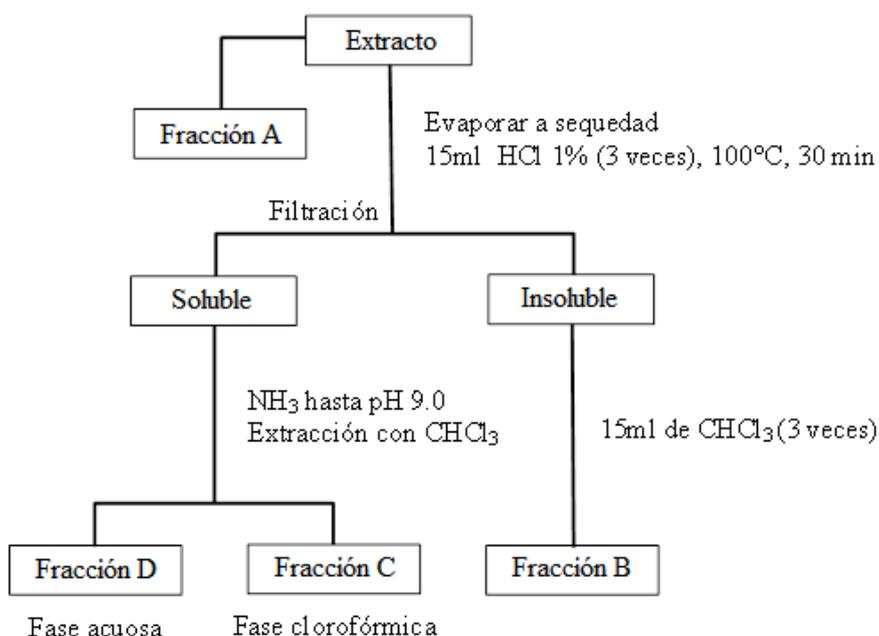


Figura 9: Fraccionamiento del extracto metanólico de *C. filiformis*.

FUENTE: Adaptado de Rondina y Coussio 1969.

b. Detección de los principales grupos químicos

Para determinar los principales grupos de compuestos químicos en cada fracción obtenida se aplicaron las siguientes reacciones:

Fracción A:

- **Molisch (Hidratos de carbono):** Se tomaron 2 mL de cada fracción y se añadió 2 gotas del reactivo de Molisch, luego se agregó ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por las paredes del tubo. La aparición de un anillo de color púrpura violáceo en la interfase, indica una reacción positiva.

- **Shinoda (Flavonoides):** Se llevó a sequedad 0.5 mL de cada fracción y se resuspendió con igual volumen de agua destilada, luego se adicionó unas granallas de zinc y 0.2 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado. La reacción positiva se evidencia por la aparición de color púrpura que puede variar desde el rosa tenue hasta el color rojo escarlata.

- **Vapores de I_2 (Lípidos):** Gotas de cada fracción se dispuso sobre papel de filtro y enseguida este se expuso a vapores de yodo. La reacción positiva se evidencia mediante coloración marrón o parda sobre el papel de filtro.

- **Dicromato de potasio (Polifenoles, taninos):** Sobre 0.5 mL de cada fracción se agregó una solución acuosa de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 0.5%, luego se observó cambio de color producidos por la reducción del dicromato. La reacción positiva se evidencia mediante el cambio de coloración al anaranjado o amarillo.

- **Gelatina (Taninos):** Sobre 5 mL de cada fracción se agregó una solución acuosa de gelatina al 0.5%. La formación de precipitado y turbidez en la disolución indica una reacción positiva.

- **$FeCl_3$ (oxhidrilos fenólicos):** Sobre 0.5 mL de cada fracción se agregó gotas de una solución acuosa de tricloruro de hierro ($FeCl_3$) al 2%. La reacción es positiva por la aparición del color amarillo, verde grisáceo o azul negro, el cual es detallado a continuación:

- Amarillo → 1 OH
- Verde grisáceo → 2 OH
- Azul negro → 3 OH

Fracción B:

- **Bornträger (Antraquinonas):** Se agitó suavemente 3 mL de cada fracción con 5 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) al 5%. La reacción positiva se evidencia por la aparición de una coloración rojiza o anaranjada en la fase acuosa.
- **Liebermann-Burchard (Esteroides y/o triterpenos):** En un baño de hielo se enfrió la mezcla de 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo (CHCl₃). A continuación, sobre 2 mL de cada fracción se agregó dicha mezcla, y luego se adicionó por las paredes del tubo 1 mL de H₂SO₄ previamente enfriado a 0°C. La reacción es positiva para esteroides si se observa color azul o verde petróleo, y para triterpenos si se colorea a marrón o pardo.
- **Kedde (Cardenólidos):** Se dispuso una gota de cada fracción sobre papel de filtro, el cual fue secado y luego retomado con etanol, enseguida se agregó 0.1 mL del reactivo preparado con volúmenes iguales de las soluciones de Kedde I (ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en metanol) y Kedde II (KOH al 5.7% en agua destilada). La reacción es positiva si se observa coloración rosa, púrpura o violeta.

Fracción C:

- **Dragendorff (Alcaloides):** Se llevaron a sequedad 0.2 mL de cada fracción y se resuspendió con 2 mL de HCl al 1% luego se adicionó 2 gotas del reactivo Dragendorff. La reacción positiva se evidencia por la aparición de precipitado de color naranja.
- **Mayer (Alcaloides):** Se llevaron a sequedad 0.5 mL de cada fracción y se resuspendió con 2 mL de HCl al 1%, luego se adicionó 2 gotas del reactivo Mayer. La reacción positiva se evidencia por la aparición de precipitado de color blanco o amarillo claro.
- **Wagner (Alcaloides):** Se llevaron a sequedad 0.5 mL de cada fracción y se resuspendió con 2 ml de HCl al 1%, luego se agregó 2 gotas del reactivo Wagner. La reacción positiva se evidencia por la aparición de precipitado.
- **Kedde (Cardenólidos):** Se realizó como se indicó anteriormente.

- **Rosenheim (Leucoantocianidinas):** Se llevaron a sequedad 2 mL de cada fracción y se resuspendió con igual volumen de una solución acuosa de HCl al 1%, luego se agregó 1 mL de HCl concentrado, en seguida se mezcló y calentó en baño de agua a 100°C durante 10 min. A la mezcla enfriada se agregó un volumen igual de alcohol amílico. Una coloración rosa suave hasta carmesí en la fase orgánica, indica reacción positiva.

Fracción D:

Dragendorff (en este caso para detectar sales de amonio cuaternario), Shinoda y Liebermann-Burchard. Los procesos de cada una de las reacciones han sido indicados líneas arriba.

3.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

El contenido de fenoles totales en los extractos de *C. filiformis* fue determinado de acuerdo al ensayo de Folin ciocalteu realizado por López *et al.* (2011). El cual está basado en una reacción colorimétrica entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu (como agente oxidante de óxido-reducción), dando origen a una coloración azul verdoso que puede de ser medido en un espectrofotómetro a 765 nm.

- **Curva de calibración:**

La curva de calibración se realizó utilizando el estándar ácido gálico. Se preparó una solución concentrada de ácido gálico de 10 mg/mL en agua destilada, a partir de esta, se prepararon soluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido gálico de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm.

Se dispuso de una batería de tubos de ensayo, en cada tubo previamente rotulado se colocaron: 100 µL de la solución de ácido gálico (diferentes concentraciones); 8.4 mL de agua destilada; 1 mL de una solución acuosa de Na₂CO₃ al 20% p/v; luego se homogenizaron las mezclas, y en seguida a cada tubo se adicionó 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu, las mezclas se mantuvieron en oscuridad y agitación constante durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de la reacción en un espectrofotómetro a 765 nm. Para el blanco se utilizaron todos los reactivos adicionados a excepción de la solución patrón, en su lugar se agregó agua destilada.

- **Contenido de fenoles totales en la muestra**

En un tubo de ensayo previamente rotulado se colocaron: 100 µL del extracto metanólico de *C. filiformis*; 8.4 mL de agua destilada; 1 mL de una solución acuosa de Na₂CO₃ al 20% p/v, se homogenizó la mezcla y se adicionó 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu, se volvió a homogenizar la mezcla, protegida de la luz, en agitación constante durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron las lecturas de absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro.

Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados del contenido de fenoles totales se expresaron en mg de ácido gálico equivalente (AGE)/g extracto de la muestra.

3.8. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de los extractos de *C. filiformis* fue determinada por los métodos de captación de los radicales 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH) y 2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS). Ambos ensayos son rápidos y simples, pero el ensayo ABTS es el más completo, debido a que se evalúan los componentes que se encuentran tanto en el medio lipofílico como el medio hidrofílico (Álvarez-Gómez *et al.* 2016).

3.8.1. Método de captación del radical DPPH

El ensayo con el radical DPPH fue realizado de acuerdo al método desarrollado por Mensor *et al.* (2001). Este método consistió en la reducción del radical DPPH en presencia de una sustancia captadora de radicales libres, produciendo una reacción de decoloración de violeta a amarillo pálido, que es susceptible a ser medido en un espectrofotómetro a 517 nm.

- **Procedimiento:**

Se preparó una solución del radical DPPH en etanol, a una concentración de 0.118 mg/mL, y se colocó en un frasco ámbar. Esta solución se mantuvo estable durante 24 horas a temperatura de 4°C, protegido de la luz.

A partir de una solución concentrada del estándar ácido gálico (0.05 g/mL en etanol) se prepararon soluciones diluidas de concentraciones crecientes de 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL en etanol.

Luego se dispuso de una batería de tubos de ensayo, en cada tubo previamente rotulado se colocaron 2 mL del extracto metanólico de *C. filiformis* o del estándar ácido gálico, a diferentes concentraciones, y 0.8 mL de la solución DPPH, enseguida se agitó la mezcla y se mantuvo en reposo durante 30 min, en oscuridad. Transcurrido este tiempo se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 517 nm. El blanco DPPH (control), y el blanco del extracto y la solución estándar; se prepararon agregando etanol en lugar de la solución DPPH y metanol en lugar del extracto y la solución estándar, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

La actividad antioxidante expresada en porcentaje de inhibición del radical DPPH, se determinó usando la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{A_C - (A_M - A_{BM})}{A_C} \times 100$$

Donde:

A_C : Absorbancia del control

A_M : Absorbancia de la reacción con la muestra o solución estándar

A_{BM} : Absorbancia del blanco muestra o blanco de la solución estándar

Se determinó el IC_{50} (mg/mL) del estándar ácido gálico y del extracto metanólico de *C. filiformis* de las muestras de Sechura y Paracas, cuyo valor corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50 por ciento de los radicales libres DPPH.

3.8.2. Método de captación del radical ABTS

El ensayo con el radical ABTS, fue realizado de acuerdo al método adaptado por Arnao *et al.* (2001). Este método consistió en la reducción del radical $ABTS^+$ en presencia de una sustancia captadora de radicales libres, produciendo una reacción de decoloración de azul verdoso a incoloro, que es susceptible a ser medido en un espectrofotómetro a 734 nm. Este método es aplicable para antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

- **Procedimiento**

Se preparó una solución stock de ABTS en agua destilada, a una concentración de 7.84 mg/mL y otra solución acuosa de persulfato de potasio a una concentración de 1.32 mg/mL. Para activar el radical ABTS se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones preparadas, se dejó reaccionar por 12 horas, en oscuridad, a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se tomó 1 mL de la solución ABTS activada y se diluyó con metanol al 80%, hasta obtener una absorbancia de 1.1 ± 0.02 en un espectrofotómetro a 734 nm. Esta solución ABTS diluida es estable durante 4 horas, protegido de la luz y a temperatura ambiente.

A partir de una solución concentrada del estándar trolox de 0.2503 mg/mL en metanol al 80%, se prepararon soluciones diluidas de concentraciones crecientes de trolox de 25, 50, 75, 100 y 125 $\mu\text{g/mL}$.

Luego se dispuso de una batería de tubos de ensayos, en cada tubo previamente rotulado se colocaron 150 μL del extracto metanólico de *C. filiformis* o del estándar de trolox, a diferentes concentraciones, y 2850 μL de la solución diluida de ABTS en cada tubo, en seguida se agitaron las mezclas, y luego se dejó reaccionar en reposo durante 30 min, en oscuridad. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 734 nm. El blanco ABTS (control), el blanco del extracto y de la solución estándar; se prepararon agregando metanol al 80% en lugar de la solución ABTS, del extracto y la solución estándar, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

La actividad antioxidante expresada en porcentaje de inhibición del radical ABTS, se determinó usando la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{A_C - (A_M - A_{BM})}{A_C} \times 100$$

Donde:

A_C : Absorbancia del control

A_M : Absorbancia de la reacción con la muestra o solución estándar

A_{BM} : Absorbancia del blanco muestra o blanco de la solución estándar

Se determinó el IC_{50} (mg/mL) del estándar trolox y del extracto metanólico de *C. filiformis* de las muestras de Sechura y Paracas, cuyo valor corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres ABTS.

Los resultados obtenidos de los ensayos DPPH y ABTS corresponden a los valores promedio de tres repeticiones con su respectiva desviación estándar. Estos resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición y concentración de inhibición media (IC₅₀) en mg de extracto de la muestra/mL de solvente.

3.9. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA LIPOXIGENASA

La inhibición de la LOX-1 fue determinada de acuerdo al método descrito por Wu (1996). Este método consistió en medir la producción de un cromóforo en presencia de un compuesto inhibidor. Los hidroperóxidos procedentes de la oxidación enzimática (catalizada por la LOX-1) presentan un cromóforo característico que absorbe a 234 nm (Axeirod *et al.* 1981). De este modo, la medición de la producción de cromóforos fue realizada mediante lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible a 234 nm.

- **Procedimiento**

Solución sustrato:

Se preparó una solución de linoleato de sodio 10mM, el cual se preparó mezclando 14 mg de ácido linoleico con igual peso de tween-20, 2 ml de agua libre de O₂ (se homogenizó la mezcla moviendo con una pipeta pasteur, evitando formar burbujas de aire), 110 µL aprox. de NaOH 0.5 N (lo suficiente para aclarar la mezcla), y luego se enrasó con agua destilada en una fiola de 5 mL. Para almacenar la disolución linoleato de sodio esta se dividió en porciones de 3 mL en pequeños viales con tapa rosca los cuales se mantuvieron en refrigeración durante su uso.

Solución enzimática:

La solución de la enzima lipoxigenasa de soya tipo I-B se disolvió en buffer borato (0.2 M, pH 9), a una concentración final de 3000 U/mL.

- **Preparación de patrón o estándar**

Se preparó una solución estándar de quercetina de 100 ppm en metanol, a partir de este se prepararon disoluciones diluidas de 50, 70 y 100µg/mL.

Todos los reactivos preparados se mantuvieron en hielo y protegido de la luz durante todo el tiempo que duró el experimento.

- **Determinación de la actividad de inhibición enzimática**

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz, se mezclaron: 2880 μL de buffer borato de sodio (0.2 M, pH 9), 20 μL de la solución lipoxigenasa de soya (3000 U/mL) y 70 μL del extracto de la muestra, luego se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min. Transcurrido este tiempo la reacción fue iniciada con la adición de 30 μL de la solución sustrato (10 mM). La medición del cambio de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro UV-vis a 234 nm en intervalos de tiempo de un minuto durante 6 minutos. La quercetina se usó como estándar positivo; y el blanco tanto para la muestra como para el estándar positivo no contenía solución sustrato, en su lugar se adicionó 30 μL de buffer borato de sodio.

Se preparó otra mezcla de la reacción para medir la actividad de la LOX (control), siguiendo el mismo procedimiento explicado para el ensayo de actividad de inhibición enzimática, pero en lugar del extracto de la muestra o estándar positivo se adicionó 70 μL de metanol.

El ensayo se realizó por triplicado y el porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{A_C - (A_M - A_{BM})}{A_C} \times 100$$

Donde:

A_C : Absorbancia del control

A_M : Absorbancia de la reacción con la muestra o solución estándar

A_{BM} : Absorbancia del blanco muestra o blanco de la solución estándar

Se determinó el IC_{50} del extracto metanólico de *C. filiformis* y del estándar quercetina.

El ensayo fue realizado por triplicado y los resultados mostrados corresponden a los valores promedio de las repeticiones con su respectiva desviación estándar. Los resultados obtenidos del ensayo fueron expresados en porcentaje de inhibición y concentración de inhibición media (IC_{50}) en mg/mL.

3.10. BIOENSAYO DE CRECIMIENTO DE RADÍCULAS E HIPOCÓTILOS DE LECHUGA Y TOMATE

El bioensayo de crecimiento de *Lactuca sativa* (lechuga) se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por (Ono *et al.* 2011) y el de *Solanum lycopersicum* (tomate) fue adaptado a este método. Este método consiste en determinar el efecto alelopático de los extractos vegetales, en el proceso de desarrollo de las plántulas de plantas sensibles a factores externos adversos en los primeros días de crecimiento, tales como la lechuga y tomate.

- **Procedimiento:**

Se utilizaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa* cv. Great Lakes 366, Takii Co. Ltd., Kyoto, Japan) y tomate (*Solanum lycopersicum*, Hortus S.A.), para evaluar el efecto del extracto de las muestras en el crecimiento de radículas e hipocótilos.

Se colocó papel filtro en una placa Petri de vidrio pequeña (27 mm de diámetro), sobre esta se agregó una serie de concentraciones del extracto metanólico de *C. filiformis*, luego se evaporó el solvente a temperatura ambiente, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se volvió a humedecer con 0.7 mL de agua destilada, inmediatamente se colocaron cinco semillas pre-germinadas de *Lactuca sativa* (20 horas a 20°C en la oscuridad) en cada placa de Petri, que fueron incubadas durante 52 horas a 20°C en oscuridad. Para el tratamiento control solo se utilizó 0.7 mL agua destilada. El mismo procedimiento se realizó con las semillas pre-germinadas de *Solanum lycopersicum* (48 horas a 25°C en la oscuridad), pero con un tiempo de incubación de 120 horas a 25°C en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron la longitud de las radículas (R) e hipocótilos (H) para calcular el porcentaje de crecimiento en relación con el control.

Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{\text{Long. R/H del tratamiento} - \text{Long. R/H del control}}{\text{Long. R/H del control}} \times 100$$

El ensayo fue realizado por triplicado y los resultados fueron expresados en porcentaje de crecimiento. Estos resultados corresponden a los valores promedio de las repeticiones y su respectiva desviación estándar.

3.11. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En general, los datos obtenidos en cada uno de los ensayos fueron procesados y graficados en una hoja de cálculo Excel.

Los promedios del contenido de fenoles totales, de la actividad antioxidante y de la inhibición de la lipoxigenasa, se compararon entre las muestras de Sechura y Paracas, mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, usando programa PAST (PAleontological STatistics) versión 2.17 (Hammer *et al.* 2001).

Para comparar el efecto alelopático de *C. filiformis* sobre las plantulas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Solanum lycopersicum* (tomate); teniendo en cuenta diferentes concentraciones del extracto metanólico, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, y su consiguiente prueba de pares de Tukey, empleando el programa PAST (PAleontological STatistics) versión 2.17 (Hammer *et al.* 2001).

Para comparar el efecto alelopático de *C. filiformis* entre los extractos metanólicos de Sechura y Paracas, se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores; considerando como primer factor la procedencia de la muestra (Sechura y Paracas); mientras que el segundo factor estuvo representado por las concentraciones de los extractos metanólicos. De igual manera, para este análisis se empleó el programa PAST (PAleontological STatistics) versión 2.17 (Hammer *et al.* 2001).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RENDIMIENTOS DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS

Los rendimientos de los extractos metanólicos de la muestra de *C. filiformis*, procedente de las bahías de Sechura y Paracas se muestran en el cuadro 2. Se observa que el rendimiento del extracto metanólico de *C. filiformis* de Paracas (15.72%) es mayor que en el extracto de las muestras de Sechura (8.32%).

Cuadro 2: Rendimientos de los extractos metanólicos de *C. filiformis*.

Procedencia de la muestra	Peso del alga seca (g)	Concentración del extracto (mg/mL)	Rendimiento (%)
Bahía de Sechura	5.00	4.16	8.32
Bahía de Paracas	5.00	7.86	15.72

4.2. SCREENING FITOQUÍMICO

Mediante el screening fitoquímico de los extractos metanólicos de *C. filiformis*, se detectó nueve grupos de compuestos químicos, tanto en las muestras de *C. filiformis* procedentes de la bahía de Sechura como de Paracas. Estos grupos fueron hidratos de carbono, lípidos, esteroides, fenoles, taninos, oxhidrilos fenólicos, triterpenos, alcaloides y flavonoides; en cambio los resultados fueron negativos para antraquinonas, cardenólidos y leucoantocianidinas (Cuadro 3). Tales resultados concuerdan con estudios realizados en la India, en *Caulerpa racemosa* y *C. scalpelliformis*, (Azhagu Raj *et al.* 2015, Nagaraj y Osborne 2014, Shibu y Dhanam 2016, Karthick *et al.* 2014), cuyos extractos evidenciaron a los grupos fenólicos, taninos, flavonoides, carbohidratos, alcaloides, terpenoides, esteroides y saponinas, como compuestos comunes en las algas mencionadas.

Además, los resultados del screening fitoquímico cualitativo sugiere una mayor presencia de esteroides y lípidos en las muestras de *C. filiformis* de Sechura en comparación con la de Paracas; y una menor presencia de flavonoides en ambas muestras.

Cuadro 3: Screening fitoquímico del extracto metanólicos de *C. filiformis* de las bahías de Sechura y Paracas.

Fracción	Grupos químicos	Reactivos	Bahía Sechura	Bahía Paracas
A	Hidratos de carbono	Molisch	++	++
	Flavonoides	Shinoda	+	+
	Lípidos	Vapores I ₂	+++	++
	Polifenoles y taninos	K ₂ Cr ₂ O ₇	++	++
	Taninos	Gelatina	++	++
	Compuestos fenólicos	FeCl ₃	++	++
B	Antraquinonas	Borntrager	-	-
	Esteroides	Liebermann-Burchard	+++	++
	Triterpenos		++	++
	Cardenolidos	Kedde	-	-
C	Alcaloides	Dragendorff	-	-
	Alcaloides	Mayer	++	++
	Cardenolidos	Kedde	-	-
D	Leucoantocianidinas	Rosenheim	-	-
	Alcaloides	Dragendorff	-	-
	Esteroides	Liebermann-Burchard	-	-
	Triterpenos		-	-
	Flavonoides	Shinoda	-	-

(-) Negativo; (+) Positivo leve; (++) Positivo moderado; (+++) Positivo marcado.

4.3. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

En la figura 10 se muestra la curva de calibración obtenida con concentraciones crecientes del estándar ácido gálico (AG) y su respectiva absorbancia; la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación R^2 obtenidos mediante un análisis de regresión lineal simple.

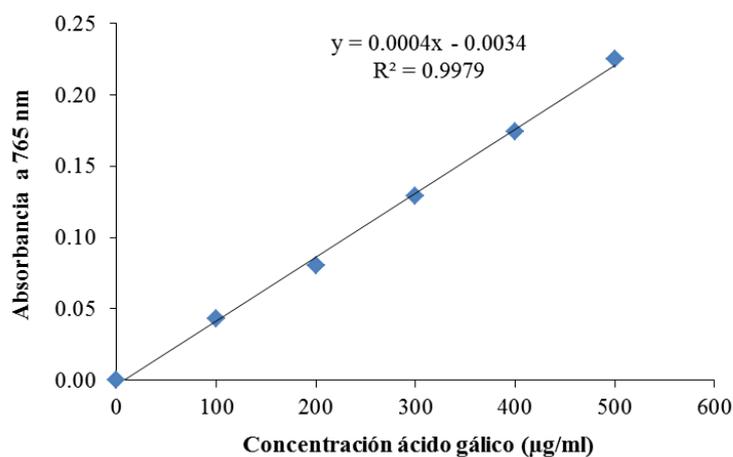


Figura 10: Curva de calibración del ácido gálico.

Los resultados mostraron que el contenido de compuestos fenólicos en el extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura (39.31 ± 0.39 mg AGE/g de extracto) fue significativamente mayor ($p < 0.05$, Anexo 8) al de Paracas (18.78 ± 0.31 mg AGE/ g extracto) (Figura 11).

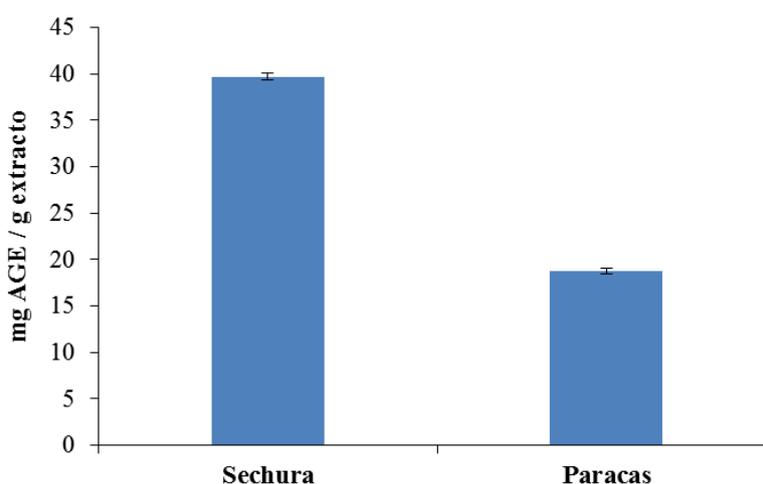


Figura 11: Contenido de fenoles totales en el extracto metanólico de *C. filiformis* de bahía Sechura y bahía Paracas.

Valores similares de fenoles totales en el rango de 23.12 a 38.93 mg AGE/g de extracto, fueron encontrados en otras especies de Caulerpa, como *C. racemosa*, *C. peltata* y *C. taxifolia*, en la India (Vinayak *et al.* 2011); así como en el alga parda *Dictyota dichotoma*, en la Costa de Ceará, Brasil (de Lima *et al.* 2016). Sin embargo, en otras algas verdes, como por ejemplo, *Chlorodesmis fastigiata*, *Codium elongatum*, *Ulva fasciata*, *Caulerpa cupressoides* se han reportado contenidos menores de fenoles totales (Vinayak *et al.* 2011, Dotulong *et al.* 2013, de Lima *et al.* 2016, Osuna-Ruiz *et al.* 2016); e inclusive en algas rojas, como *Spyridia filamentosa*, *Gracilaria vermiculophylla*, *Amansia multifida*, *Cryptonemya crenulata*, *Laurencia tronoi*; y también en algas pardas como *Padina durvillaei*, *Sargassum vulgare*, *Padina australis* (Dotulong *et al.* 2013, de Lima *et al.* 2016, Osuna-Ruiz *et al.* 2016).

4.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los resultados del ensayo ABTS para el extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas, obtenidos con un mismo peso de alga seca (5 mg alga seca/100 mL), evidenciaron una actividad antioxidante significativamente mayor ($p < 0.05$, Anexo 11A) en la muestra de Paracas ($79.60 \pm 0.40\%$), en comparación con la muestra de Sechura ($78.49 \pm 0.32\%$) (Figura 12).

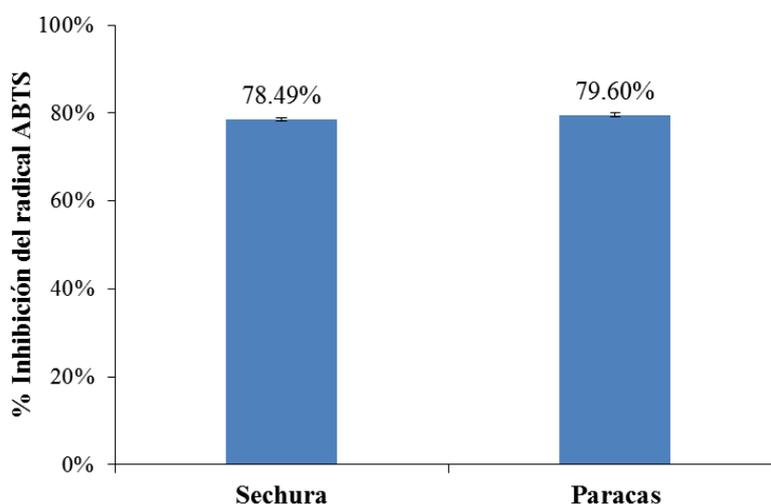


Figura 12: Porcentaje de inhibición del radical ABTS en presencia del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas.

En cambio, la capacidad antioxidante en términos de IC₅₀ (mg/mL), del extracto metanólico de la muestra de Sechura fue significativamente mayor ($p < 0.05$, Anexo 11C) en comparación con la muestra de Paracas. Sin embargo, la capacidad antioxidante de ambas muestras de *C. filiformis* fueron significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con el estándar trolox. En el cuadro 4 y la figura 13, se muestran el potencial antioxidante de *C. filiformis* de Sechura y Paracas, junto con el estándar trolox, obtenido con el ensayo ABTS.

Cuadro 4: Actividad antioxidante del extracto metanólico de *C. filiformis* mediante el ensayo de ABTS.

Muestras	Concentración de la muestra (mg/mL)	Actividad Antioxidante (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
<i>C. filiformis</i> de Sechura	0.50	11.39 ± 0.25	2.546 ± 0.007
	1.00	20.83 ± 0.22	
	2.00	45.12 ± 0.70	
	4.00	78.49 ± 0.32	
<i>C. filiformis</i> de Paracas	1.00	13.30 ± 0.12	4.624 ± 0.014
	2.00	23.43 ± 0.10	
	4.00	49.33 ± 0.35	
	8.00	79.60 ± 0.40	
Estándar Trolox (mg/mL)			0.070 ± 0.001

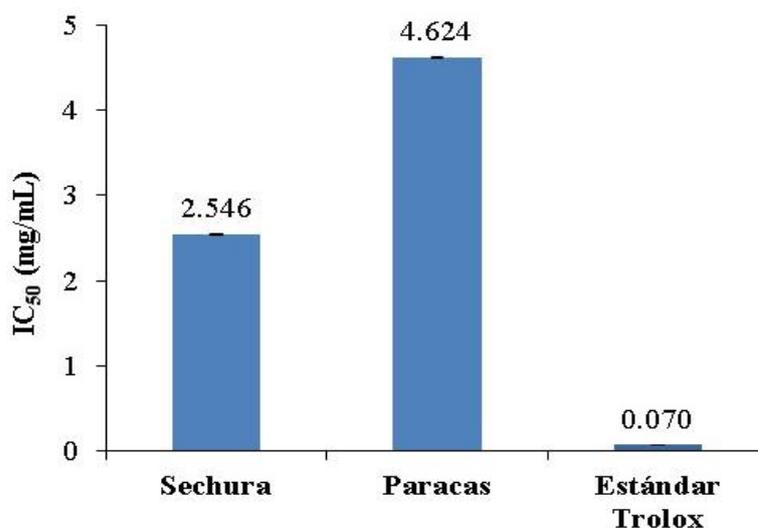


Figura 13: Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de *C. filiformis* mediante el ensayo de ABTS.

Igualmente, los resultados del ensayo DPPH para el extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas, obtenidos con un mismo peso de alga seca (5 mg alga seca/ 100 mL), mostraron una actividad antioxidante significativamente mayor ($p < 0.05$, Anexo 11B) con la muestra de Paracas (84.65 ± 1.56 %), con relación a la muestra de Sechura (72.53 ± 1.50 %) (Figura 14).

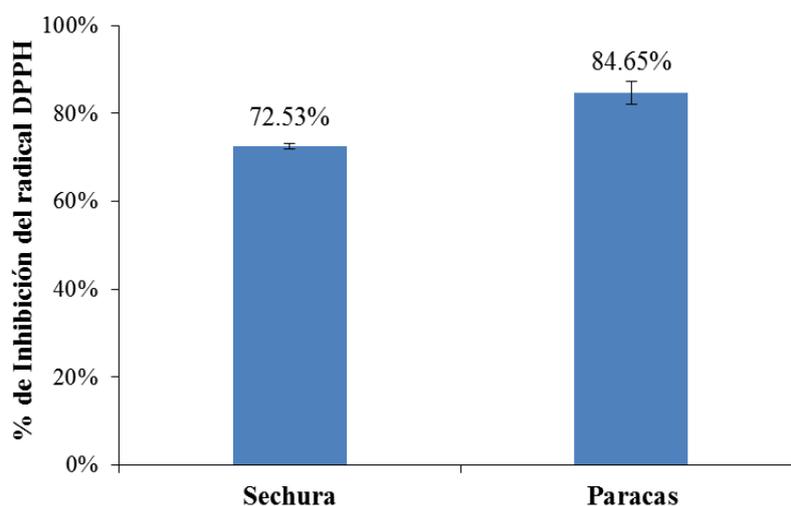


Figura 14: Porcentaje de inhibición del radical DPPH del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas.

Al igual que en el ensayo ABTS, la capacidad antioxidante en términos de IC_{50} (mg/mL), del extracto metanólico de la muestra de Sechura fue significativamente mayor ($p < 0.05$, Anexo 11C) en comparación a la muestra de Paracas. Sin embargo, los resultados de la actividad antioxidante obtenidas con ambas muestras de *C. filiformis*, fueron bajos en comparación con el estándar ácido gálico. En el cuadro 5 y la figura 15, se muestran el potencial antioxidante de *C. filiformis* de Sechura y Paracas, junto con el estándar ácido gálico, obtenido con el ensayo DPPH.

Cuadro 5: Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *C. filiformis* mediante el ensayo de DPPH.

Muestras	Concentración de la muestra (mg/mL)	Actividad Antioxidante (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
Sechura	0.50	13.06 ± 0.35	2.194 ± 0.021
	1.00	28.20 ± 0.20	
	2.50	65.01 ± 0.29	
	5.00	88.26 ± 0.46	
	0.70	14.84 ± 0.36	
Paracas	1.30	25.41 ± 0.49	3.218 ± 0.054
	3.30	54.89 ± 0.35	
	6.70	83.43 ± 0.34	
Estándar ácido gálico (mg/mL)			0.0088 ± 0.0001

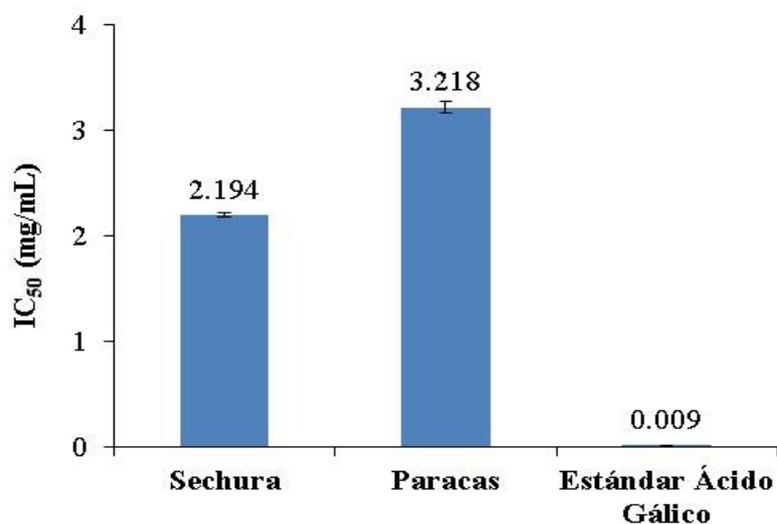


Figura 15: Capacidad antioxidante del extracto metanólico de *C. filiformis* mediante el ensayo de DPPH.

Además, estos resultados también mostraron que el extracto metanólico de *C. filiformis* tiene una menor capacidad antioxidante en comparación con otras especies de macroalgas. Por ejemplo, para el extracto metanólico de *Caulerpa racemosa*, Gany *et al.* (2014) determinaron valores de IC₅₀, por los métodos de ABTS y DPPH, de 0.709±0.02 y 1.31±0.04 mg/mL, respectivamente. De manera similar ocurrió en las algas pardas *Padina*

australis (1.392 ± 0.01 y 0.649 ± 0.03 mg/mL) y *Sargassum polycystum* (0.849 ± 0.02 y 0.611 ± 0.02 mg/mL) (Gany *et al.* 2014).

Estudios realizados por Chew *et al.* (2008) y Abdallah *et al.* (2017) indican que la actividad antioxidante de los extractos de macroalgas, podría estar relacionada principalmente con su contenido de compuestos fenólicos, sin descartar la acción sinérgica entre sus compuestos. Esto pudo ser verificado en la presente investigación al establecerse una correlación directa y significativa entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante, tanto para el ensayo de ABTS (ρ de Spearman = 0.641, $p = 0.025$) como para DPPH (ρ de Spearman = 0.625, $p = 0.03$) (Anexo 12).

4.5. INHIBICIÓN DE LA LIPOXIGENASA-1

Los extractos metanólicos de *C. filiformis* de Sechura y Paracas mostraron un efecto de inhibición en la actividad de la lipoxigenasa de soya (Figura 15). Sin embargo, el efecto de inhibición del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura ($IC_{50} = 2.98 \pm 0.09$ mg/mL) fue significativamente mayor ($p < 0.05$, Anexo 13) que el de Paracas ($IC_{50} = 7.08 \pm 0.16$ mg/mL). Además, estos resultados de actividad de ambos extractos de *C. filiformis* fueron bajos en comparación con la estándar quercetina.

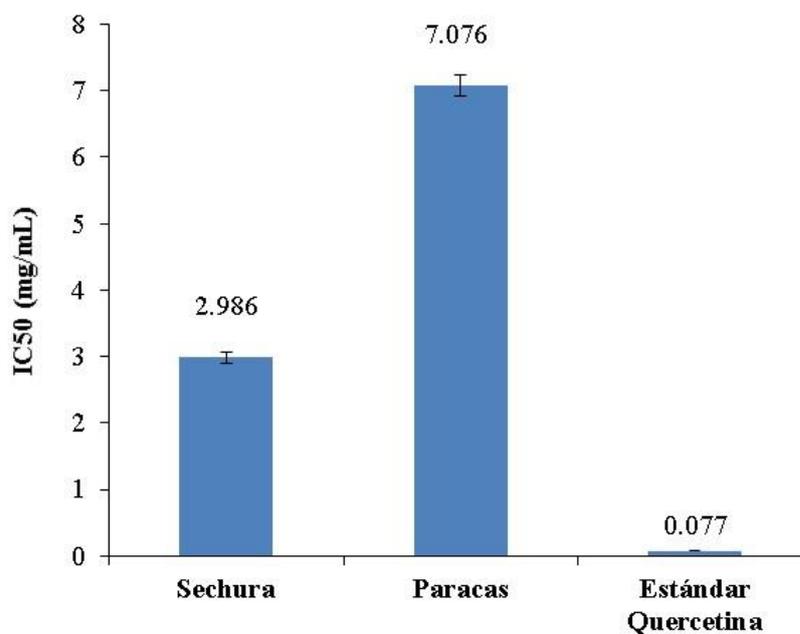


Figura 16: Capacidad inhibitoria (IC_{50}) del extracto metanólico *C. filiformis* de Sechura y de Paracas, y el estándar quercetina sobre la LOX-1.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura presenta mayor efecto de inhibición de la lipoxigenasa en comparación con otras especies de *Caulerpa*. Por ejemplo, Cengiz *et al.* (2011) encontraron que el extracto metanólico de *C. prolifera* y *C. racemosa*, en una concentración final de 48 mg /mL, mostraron un efecto de inhibición de la lipoxigenasa en 78.8 ± 2.2 % y 15.1 ± 3.9 %, respectivamente. Además el extracto metanólico de *C. prolifera* redujo notablemente la actividad de la lipoxigenasa, con un valor $IC_{50} = 19$ mg/mL.

4.6. BIOENSAYO DE CRECIMIENTO DE RADÍCULAS E HIPOCÓTILOS DE LECHUGA Y TOMATE

- **Efecto alelopático en plántulas de *Lactuca sativa***

El ensayo mostró un efecto alelopático positivo significativo (ANOVA, $p < 0.05$) que favoreció el crecimiento de los hipocótilos de *L. sativa* a concentraciones entre 10 y 80 mg de muestra seca/mL del extracto metanólico de *C. filiformis*, tanto de Sechura como de Paracas (Anexo 15A y 15C). De esta manera, a una concentración de 30 mg de muestra seca/mL, se observaron incrementos máximos con respecto al control de 33.10 ± 5.59 % y 35.07 ± 4.66 % para los extractos de Sechura y Paracas, respectivamente (Figura 17 A, Cuadro 6).

Así mismo, al evaluar el porcentaje de crecimiento de hipocótilos, tomando en cuenta las muestras (Sechura y Paracas), así como los tratamientos (concentraciones de extractos metanólicos); no se encontraron diferencias significativas entre las muestras, ni en la interacción entre las muestras y los tratamientos (ANOVA de 2 factores, $p > 0.05$) (Anexo 15P). De esta manera, el efecto alelopático sobre el crecimiento de hipocótilos de *L. sativa* fue el mismo con los extractos metanólicos de Sechura como de Paracas.

El crecimiento de radículas de *L. sativa*, en cambio, no evidenció ningún efecto alelopático; excepto a la concentración máxima ensayada de 80 mg de muestra seca/mL, y solamente en presencia del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura, disminuyendo significativamente (ANOVA, $p < 0.05$) en un 20.69 ± 5.18 % con respecto al Control (Figura 17, Cuadro 7, Anexo 15F).

En cambio, al evaluar el porcentaje de crecimiento de radículas, tomando en cuenta las muestras (Sechura y Paracas), así como los tratamientos (concentraciones de extractos metanólicos); se encontraron diferencias significativas entre las muestras, así como en la interacción entre las muestras y los tratamientos (ANOVA de 2 factores, $p < 0.05$) (Anexo 15Q). De esta manera, el efecto alelopático sobre el crecimiento de radículas de *L. sativa* fue diferente según el extracto metanólico empleado (Sechura o Paracas).

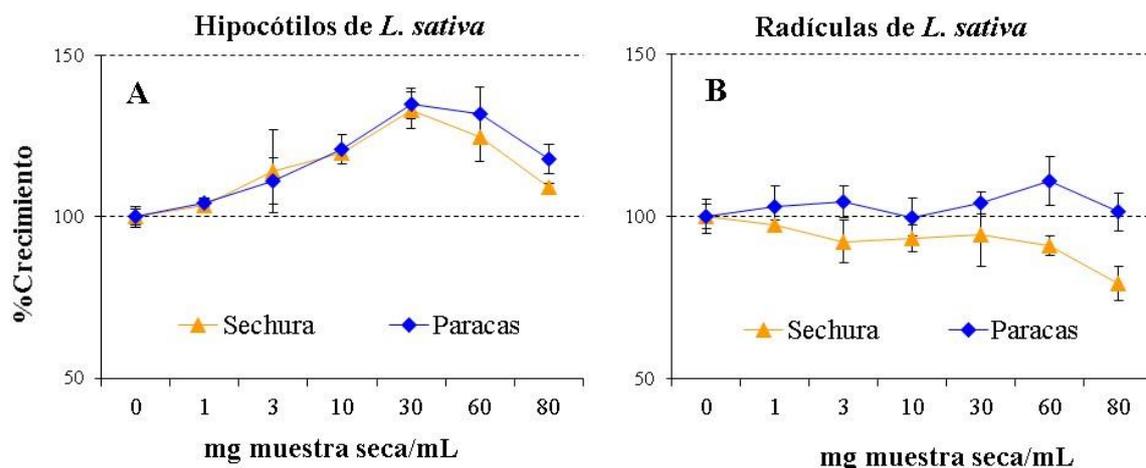


Figura 17: Efecto del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas, sobre el crecimiento de hipocótilos y radículas de *L. sativa*. El Control se muestra como concentración de 0 mg muestra seca/mL.

Cuadro 6: Longitud y porcentaje de crecimiento de hipocótilos de *L. sativa*

Muestras		Control	Concentración del extracto metanólico (mg muestra seca/mL)					
			1	3	10	30	60	80
Sechura	Longitud (mm)	9.47 ± 0.31	9.80 ± 0.20	10.80 ± 1.22	11.33 ± 0.12	12.60 ± 0.53	11.80 ± 0.72	10.33 ± 0.12
	%Crecimiento	100 ± 3.23	103.52 ± 2.11	114.08 ± 12.85	119.72 ± 1.22	133.10 ± 5.59	124.65 ± 7.62	109.15 ± 1.22
Paracas	Longitud (mm)	8.93 ± 0.23	9.33 ± 0.12	9.93 ± 0.64	10.80 ± 0.40	12.07 ± 0.42	11.80 ± 0.72	10.53 ± 0.42
	%Crecimiento	100 ± 2.59	104.48 ± 1.29	111.19 ± 7.20	120.90 ± 4.48	135.07 ± 4.66	132.09 ± 8.07	117.91 ± 4.66

Cuadro 7: Longitud y porcentaje de crecimiento de radículas de *L. sativa*

Muestras		Control	Concentración del extracto metanólico (mg muestra seca/mL)					
			1	3	10	30	60	80
Sechura	Longitud (mm)	21.27 ± 1.10	20.73 ± 0.31	19.60 ± 1.39	19.80 ± 0.87	20.07 ± 2.08	19.33 ± 0.64	16.87 ± 1.10
	%Crecimiento	100 ± 5.18	97.49 ± 1.44	92.16 ± 6.52	93.10 ± 4.10	94.36 ± 9.79	90.91 ± 3.02	79.31 ± 5.18
Paracas	Longitud (mm)	20.93 ± 0.81	21.53 ± 1.33	21.87 ± 1.01	20.87 ± 1.22	21.80 ± 0.69	23.20 ± 1.56	21.20 ± 1.22
	%Crecimiento	100 ± 3.86	102.87 ± 6.36	104.46 ± 4.81	99.68 ± 5.84	104.14 ± 3.31	110.83 ± 7.46	101.27 ± 5.81

- **Efecto alelopático en semillas de *Solanum lycopersicum***

El incremento significativo (ANOVA, $p < 0.05$) en el crecimiento de los hipocótilos de *S. lycopersicum*, evidenció un efecto alelopático positivo a concentraciones superiores a 10 mg de muestra seca/mL, tanto para los extractos metanólicos de Sechura como de Paracas (Anexo 15I Y 15K). De esta manera, se registró un incremento máximo de 48.63 ± 5.21 % con respecto al Control, a 30 mg de muestra seca/mL del extracto metanólico de Paracas (Figura 18 A, Cuadro 8).

Luego, al evaluar el porcentaje de crecimiento de hipocótilos, tomando en cuenta las muestras (Sechura y Paracas), así como los tratamientos (ANOVA de 2 factores); se encontraron diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$), pero no en la interacción entre las muestras y los tratamientos ($p > 0.05$) (Anexo 15R). De esta manera, el efecto alelopático sobre el crecimiento de hipocótilos de *S. lycopersicum* fue el mismo con los extractos metanólicos de Sechura como de Paracas.

La tasa de crecimiento de las radículas de *S. lycopersicum* mostró un efecto alelopático positivo significativo (ANOVA, $p < 0.05$) en presencia del extracto metanólico de Paracas, con incrementos de 23.40 ± 3.62 % y 20.48 ± 3.62 % a concentraciones de 60 y 80 mg de muestra seca/mL, respectivamente. Mientras que con el extracto de Sechura se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de 17.18 ± 6.43 % a 30 mg de muestra seca/mL (Anexo 15M y 15O). En cambio, a mayores concentraciones del extracto no hubo efecto alelopático significativo ($p > 0.05$) (Figura 18 B, Cuadro 9).

Finalmente, al evaluar el porcentaje de crecimiento de radículas, tomando en cuenta las muestras (Sechura y Paracas), así como los tratamientos; se encontraron diferencias significativas entre las muestras, así como en la interacción entre las muestras y los tratamientos (ANOVA de 2 factores, $p < 0.05$) (Anexo 15S). De esta manera, el efecto alelopático sobre el crecimiento de radículas de *S. lycopersicum* fue diferente según el extracto metanólico empleado (Sechura o Paracas).

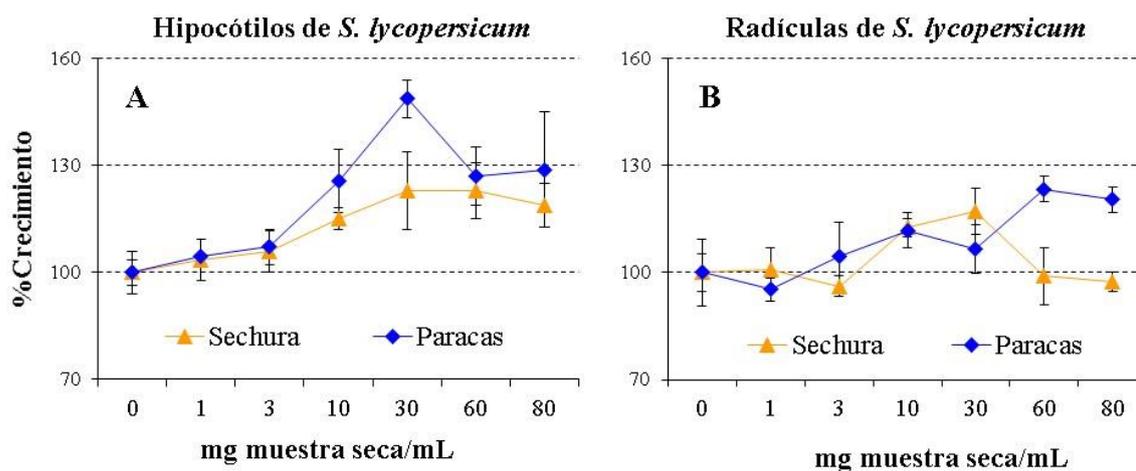


Figura 18: Efecto del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas, sobre el crecimiento de hipocótilos y radículas de *S. lycopersicum*. El Control se muestra como concentración de 0 mg muestra seca/mL.

De manera similar, en un estudio realizado con otras algas verdes evidenciaron que bajas concentraciones de extracto metanólico de diferentes especies de algas verdes como *Capsosiphon fulvescens*, *Cladophora sakaii*, *Codium arabicum*, *Codium fragile*, *enteromorpha compressa*, *enteromorpha linza*, *Monostroma nitidum*, *Ulva pertusa* y *Ulva* sp., promueven la germinación y crecimiento de las semillas de lechuga. Sin embargo, una concentración elevada inhibe la germinación y crecimiento en semillas de lechuga (Choi y Choi 2016).

Es necesario mencionar que la composición química de *Caulerpa* y sus propiedades, muestran variaciones estacionales (Box *et al.* 2010). Por lo tanto, es de suponer que la estacionalidad ejerce un efecto sobre la composición química de *C. filiformis* y sus propiedades. Sin embargo los resultados mostrados en la presente investigación corresponden a *C. filiformis*, obtenida en la estación de primavera.

No obstante, estos resultados podrían diferir con los resultados de otros estudios en el tratamiento de las muestras, las condiciones a la que el solvente fue utilizado y a las condiciones en que se realizaron los ensayos.

Cuadro 8: Longitud y porcentaje de crecimiento de hipocótilos de *S. lycopersicum*.

Muestras		Control	Concentración del extracto metanólico (mg muestra seca/mL)					
			1	3	10	30	60	80
Sechura	Longitud (mm)	40.07 ± 1.42	41.47 ± 2.32	42.40 ± 2.27	46.13 ± 1.22	49.20 ± 4.40	49.25 ± 3.11	47.60 ± 2.51
	%Crecimiento	100 ± 3.54	103.49 ± 5.79	105.82 ± 5.67	115.14 ± 3.05	122.80 ± 10.98	122.92 ± 7.76	118.80 ± 6.25
Paracas	Longitud (mm)	38.80 ± 2.31	40.60 ± 0.20	41.53 ± 1.89	48.73 ± 3.41	57.67 ± 2.02	49.25 ± 3.11	49.93 ± 6.28
	%Crecimiento	100 ± 5.94	104.64 ± 0.52	107.04 ± 4.87	125.60 ± 8.78	148.63 ± 5.21	126.93 ± 8.02	128.69 ± 16.18

Cuadro 9: Longitud y porcentaje de crecimiento de radículas de *S. lycopersicum*.

Muestras		Control	Concentración del extracto metanólico (mg muestra seca/mL)					
			1	3	10	30	60	80
Sechura	Longitud (mm)	43.40 ± 4.06	43.80 ± 2.62	41.70 ± 1.25	48.90 ± 1.10	50.86 ± 2.79	42.97 ± 3.45	42.27 ± 1.22
	%Crecimiento	100 ± 9.35	100.92 ± 6.04	96.08 ± 2.89	112.67 ± 2.53	117.18 ± 6.43	99.00 ± 7.96	97.39 ± 2.82
Paracas	Longitud (mm)	41.67 ± 2.20	39.67 ± 1.29	43.53 ± 4.05	46.58 ± 2.07	44.42 ± 2.90	51.42 ± 1.51	50.20 ± 1.51
	%Crecimiento	100 ± 5.29	95.20 ± 3.09	104.48 ± 9.71	111.79 ± 4.96	106.60 ± 6.97	123.40 ± 3.62	120.48 ± 3.62

V. CONCLUSIONES

- El rendimiento del extracto metanólico de *C. filiformis* de Paracas fue mayor que el obtenido con la muestra de Sechura, en un mismo peso de alga seca molida.
- En el screening fitoquímico, el extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas evidenciaron los mismos grupos de compuestos químicos, con mayor presencia de lípidos y esteroides en las muestras de Sechura.
- El extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas contienen compuestos fenólicos. Sin embargo, el contenido de fenoles en la muestra de Sechura fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con la de Paracas.
- El extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas contiene compuestos químicos con actividad antioxidante. Sin embargo la muestra de Sechura presenta una capacidad antioxidante ($IC_{50} = 3.49 \pm 0.01$ y 2.18 ± 0.02 mg/mL) significativamente mayor ($p < 0.05$) que la de Paracas ($IC_{50} = 6.41 \pm 0.02$ y 2.42 ± 0.04 mg/mL), tanto con el método ABTS como DPPH.
- El extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas contienen compuestos fenólicos con actividad antioxidante.
- El extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas presentan efecto de inhibición de la lipoxigenasa, pero el extracto de la muestra de Sechura fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el de Paracas, con $IC_{50} = 2.98 \pm 0.09$ mg/mL.
- El extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas presenta un efecto alelopático positivo en el crecimiento de hipocótilos de lechuga y tomate, con incrementos máximos a una concentración de 30 mg de muestra seca/ mL.
- La macroalga *C. filiformis* procedente de la bahía de Sechura y Paracas producen compuestos fitoquímicos con potencial antioxidante, antiinflamatorio (vía lipoxigenasa) y como estimulante del crecimiento de plántulas de lechuga y tomate..

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda profundizar los estudios en la caracterización de la estructura de los compuestos químicos presentes en *C. filiformis*, para identificar las moléculas responsables de las actividades biológicas determinadas, teniendo en cuenta el factor de estacionalidad.
- Evaluar el uso de los compuestos de *C. filiformis* como antioxidantes naturales para la conservación de alimentos, como antiinflamatorio y como bioestimulante del crecimiento de las plantas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah, R; Ben, H; Hamza, A; El feki, A; Belguith, K; Allouche, N; El feki, L. 2017. Characterization and evaluating of antioxidant and antihypertensive properties of green alga (*Codium fragile*) from the coast of Sfax. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 186 (62): 186-191.

Acleto, C. 1973. Algas marinas del Perú. *Boletín de la Sociedad Peruana Botánica* 6 (1y2): 163.

Acosta, JF; Vargas, JB. 2012. Ecología y nueva distribución en la costa peruana de *Caulerpa filiformis* (Suhr.) Hering, Caulerpaceae, Chlorophyta. Informe final de investigación. Perú. p.12.

Arnao, M; Cano, A; Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73: 239-244.

Ávalos, A; Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. REDUCA (Biología).Serie Fisiología Vegetal.2 (3): 119-145.

Azhagu Raj, R; Mala, K; Prakasam, A. 2015. Phytochemical analysis of marine macroalga *Caulerpa racemosa* (J. Agardh) (Chlorophyta-Caulerpales) from Tirunelveli district, Tamil Nadu, India. *Journal of Global Biosciences* 4 (8): 3055-3067.

Belitz, HD; Grosh, W; Schieberle, P. 2009. *Química de los alimentos*. 3 ed. Zaragoza. Acribia, 910 p.

Birben, E; Sahiner, UM; Sackesen, C; Erzurum, S; Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal* 5: 9-19.

Box, A; Sureda, A; Tauler, P; Terrados, J; Marba, N; Pons, A. 2010. Seasonality of caulerpenyne content in native *Caulerpa prolifera* and invasive *C. taxifolia* and *C. racemosa* var . *cylindracea* in the western Mediterranean Sea. *Botánica Marina* 53 (4): 367-375.

- Bramarambica, K; Murthy, JVVS; Harasreeramulu, S. 2014. A study on the geographical variation of nutritive aspects of *Caulerpa*- a marine alga of Visakhapatnam coast, India. *Journal of Algal Biomass Utilization* 5(4): 44-49.
- Capon, R; Ghisalberti, E; Jefferies, P. 1983. Metabolites of the green algae, *caulerpa* species. *Phytochemistry* 22 (6): 1465-1467.
- Cardozo, KHM; Guaratini, T; Barros, MP; Falcão, VR; Tonon, AP; Lopes, NP; Campos, S; Torres, MA; Souza, AO; Colepicolo, P; Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology part C Toxicology and Pharmacology* 146 (1-2): 60-78.
- Cavas, L; Baskin, Y; Yurdakoc, K; Olgun, N. 2006. Antiproliferative and newly attributed apoptotic activities from an invasive marine alga: *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 339 (1): 111-119.
- Cengiz, S; Cavas, L; Yurdakoc, K; Pohnert, G. 2011. The sesquiterpene caulerpenyne from *Caulerpa* spp. is a lipoxygenase inhibitor. *Marine Biotechnology* 13 (2): 321-326.
- Chedea, V; Jisaka, M. 2011. Inhibition of soybean lipoxygenases-structural and activity models for the lipoxygenase isoenzymes family (en línea). Consultado 20 set. 2018. Disponible en <https://www.intechopen.com/books/recent-trends-for-enhancing-the-diversity-and-quality-of-soybean-products/inhibition-of-soybean-lipoxygenases-structural-and-activity-models-for-the-lipoxygenase-isoenzymes-f>
- Chew, YL; Lim, YY; Omar, M; Khoo, KS. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT - Food Science and Technology* 41 (6): 1067-1072.
- Choi, J; Choi, I. 2016. Inhibitory effect of marine green algal extracts on germination of *Lactuca sativa* seeds. *Journal of Environmental Biology* 37: 207-213.
- Williams, E (ed). 2002. International *Caulerpa Taxifolia* Conference proceedings. Colladovides, L. Morphological of some *Caulerpa* invasive potential plasticity and species. California, USA, National Sea Grant College Program.

Dotulong, V; Widjanarko, SB; Mamahit, LP. 2013. Antioxidant activity of three-marine algae methanol extract collected from North Sulawesi Waters, Indonesia. *International Journal of Science and Engineering Investigations* 2 (23): 26-30.

Egg, K; Avia, S; Villalobos, L; Wong, Y; Gonzales, H. 2015. Efecto in vitro del extracto etanólico de *Caulerpa filiformis* en parámetros seminales humanos. *Revista de ciencias* 11: 7-19.

De Gaillande, C; De Payri, C; Remoissenet, G; Zubia, M. 2017. *Caulerpa* consumption , nutritional value and farming in the Indo-Pacific region. *Journal of Applied Phycology* 29: 2249-2266.

Gaitán, V; Rodríguez, L; Cánovas, A. 2017. Corales y marinos: refugios en los acuarios marinos (en línea). p 62-70 Consultado 24 set. 2018. Disponible en https://www.coralesymarinos.com/wpcontent/uploads/2017/09/CoralesyMarinos_N3_OCT_UBRE-2017.pdf.

Gany, SA; Tan, SC; Gan, SY. 2014. Anti-Neuroinflammatory Properties of Malaysian Brown and Green Seaweeds. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation* 8 (11): 1234-1240.

García, DE. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes* 27(1): 1-12.

Gil-Kodaka, P; Mendo, J; Fernández, E. 2002. Diversidad de macroalgas del submareal en la Reserva Nacional de Paracas y notas sobre su uso potencial.

Guiry, M; Guiry, G. 2011. Algaebase: *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering (en línea). Consultado 3 set. 2017. Disponible en http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=U3e736da28ce8392a

Harborne, JB. 1989. General Procedures and measurement of total phenolics. *Methods in Plant Biochemistry* 1: 1-28.

Hernández, P; Huamaní, L; Mirano, M. 2015. Efecto fotoprotector y calidad del gel cosmético a base del extracto del alga marina *Caulerpa filiformis* (Subr) Hering recolectada en la Provincia de Pisco - Ica. Tesis Químico Farmacéutico.UnicaSLG, Ica, Perú. 93 p.

IMARPE (Instituto del Mar del Perú). 2007a. Estudio bioecológico y pesquero-comercial de *Hippocampus ingens* "caballito de mar" en el litoral del Perú (Tumbes y Piura) con fines de conservación. Dirección de investigaciones de recursos demersales y litorales. Unidad de Investigaciones en biodiversidad. Informe anual. 11p.

IMARPE (Instituto del Mar del Perú). 2007b. Estudio de la línea base de la bahía d Sechura. 14-28 enero 2007. Centro Regional IMARPE-Piura, Perú. 116 p.

IMARPE (Instituto del Mar del Perú); PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2016. Evaluación del plan operativo IV trimestre 2016. 263p.

Inderjit; Dakshini, K. 1994. Algal allelopathy. The Botanical Review 60 (2): 182-196.

Karthick, N; Fathimal, MA; Ramesh, K; Sridhar, H; Natrajan, M; Divya, V; Umavanith, M; Umamaheswari, S. 2014. Screening of phytochemicals and antimicrobial activity of *Caulerpa scalpelliformis* collected from Manapad Coast, Tuticorin District, Tamilnadu, South India. Journal of Coastal Life Medicine 2 (2): 107-111.

Khou, M; Paul, NA; Wright, JT; Steinberg, PD. 2007. Intrinsic factors influence the attachment of fragments of the green alga *Caulerpa filiformis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 352 (2): 331-342.

Kolanjinathan, K; Ganesh, P; Saranraj, P. 2014. Pharmacological importance of seaweeds : a review. World Journal of Fish and Marine Sciences 6 (1): 1-15.

Álvarez-Gómez, F; Korbee, N; Figueroa, FL. 2016. Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. Ciencias Marinas 42 (4): 271-288.

Kuhn, H; Banthiya, S; Van Leyen, K. 2015. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. Biochimic et Biophysica Acta 1851(4): 308-330.

Leliaert, F; Anderson, RJ; Bolton, JJ; Coppejans, E. 2000. Subtidal Understorey Algal Community Structure in Kelp Beds around the Cape Peninsula (Western Cape, South Africa). *Botanica Marina* 43 (4): 359-366.

De Lima, RL; dos Santos Pires-Cavalcante, KM; de Alencar, DB; Viana, FA; Sampaio, AH; Saker-Sampaio, S. 2016. In vitro evaluation of antioxidant activity of methanolic extracts obtained from seaweeds endemic to the coast of Ceara, Brazil. *Acta Scientiarum-Technology* 38(2): 247-255.

Lobo, V; Patil, A; Phatak, A; Chandra, N. 2010. Free radicals , antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4 (8): 118-126.

Lock de Ugaz, O. 1994. Investigación fitoquímica; métodos en el estudio de productos naturales. 2 ed. Lima, PUCP, 300 p.

López, A; Rico, M; Rivero, A; Tangil, MS De. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry* 125: 1104-1109.

Maeda, R; Ida, T; Ihara, H; Skamoto, T. 2012. Immunostimulatory Activity of Polysaccharides Isolated from *Caulerpa lentillifera* on Macrophage Cells. 76 (3): 501-505.

Meinesz, A; Belsher, T; Thibaut, T; Antolic, B; Mustapha, BK; Boudouresque, C-F; Chiaverini, D; Cinelli, F; Cottalorda, J-M; Djellouli, A; El Abed, A; Orestano, C; Grau, AM; Ivesa, L; Jaklin, A; Langar, H; Massuti-Pascual, E; Peirano, A; Tunesi, L; De Vaugelas, J; Zavodnik, N; Zuljevic, A. 2001. The introduced green alga *Caulerpa taxifolia* continues to spread in the Mediterranean. *Biological Invasions* 3: 201-210.

Menendez, R; Fernández, M; García, N. 2010. Las algas marinas como fuente de nuevos agentes anti-inflamatorios. *Revista Electronica de la Agencia del Medio Ambiente* 10 (19): 1-10.

Mensor, LL; Menezes, FS; Leitao, GG; Reis, AS; dos Santos, Tereza, C; Coube, cintia S; Leitao, SG. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical Method. *Phytotherapy Research* 15: 127-130.

- Mercado-Mercado, G; Laura, de la R; Wall-medrano, A; López, JA; Álvarez-Parrilla, E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria* 28 (1): 36-46.
- Michalak, I; Chojnacka, K. 2015. Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences* 15 (2): 160-176.
- MINAM (Ministerio Nacional de Ambiente). 2014. Quinto informe nacional ante el convenio sobre la diversidad biológica: Perú (2010-2013). Viciministerio de Desarrollo Estratégico de los Recursos Naturales. Dirección General de Diversidad Biológica. Proyecto PNUD-GEF (Programas de las Naciones Unidas para el Desarrollo-Global Environment Facility). 198 p.
- Movahhedin, N; Barar, J; Azad, FF; Barzegari, A; Nazemiyeh, H. 2014. Phytochemistry and biologic activities of *caulerpa peltata* native to Oman sea. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 13 (2): 515-521.
- Muñoz, A; Ramos, F. 2007. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista Horizonte Médico* 7 (1): 23-31.
- Nagappan, T; Vairappan, CS. 2013. Nutritional and bioactive properties of three edible species of green algae, genus *Caulerpa* (Caulerpaceae). *Journal of Applied Phycology* 26: 1019-1027.
- Nagaraj, SR; Osborne, JW. 2014. Bioactive compounds from *Caulerpa racemosa* as a potent larvicidal and antibacterial agent. 9 (4): 300-305.
- Nguyen, VT; Ueng, J-P; Tsai, G-J. 2011. Proximate Composition, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Seagrape (*Caulerpa lentillifera*). *Journal of Food Science* 76 (7): C950-C958.
- Nicoletti, E; Della Pieta', F; Calderone, V; Bandecchi, P; Pistello, M; Morelli, I; Cinelli, F. 1999. Antiviral properties of a crude extract from a green alga *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh. *Phytotherapy Research* 13 (3): 245-247.

Oliveros-Bastidas, A de J. 2008. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Química viva* 7 (1): 2-34.

Ono, I; Miyaura, R; Kamo, T; Hiradate, S; Chávez, JA; Fujii, Y. 2011. Isolation of Umbelliferone as a principal allelochemical from the Peruvian medicinal plant *Diplostephium foliosissimum* (Asteraceae). *Revista Sociedad Química del Perú* 77(4): 2011.

Osuna-Ruiz, I; López-Saiz, CM; Burgos-Hernández, A; Velázquez, C; Nieves-Soto, M; Hurtado-Oliva, MA. 2016. Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. *Pharmaceutical Biology* 54 (10): 2196-2210.

Pariona, EP. 2018. Dinámica comunitaria macrobentónica en áreas colonizadas por *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering (Bryopsidales, Chlorophyta) en bahía Paracas-Perú. Tesis Mg. Sc., Lima, Perú, UNALM. 95 p.

Peñarrieta, JM; Tejeda, L; Mollinedo, P; Vila, JL; Bravo, JA. 2014. Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química* 31 (2): 68-81.

Prigge, ST; Faig, M; Doctor, KS; Gaffney, BJ; Amzel, LM. 1997. Structure and mechanism of lipoxygenase. *Biochimie* 79 (11): 629-636.

Ramsar. 2015. Informe Nacional sobre la aplicación de la convención de Ramsar sobre los humedales (en línea). Consultado 15 nov. 2018. Disponible en https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/importftp/COP13NR_Ecuador_s.pdf

Rawson, A; Patras, A; Oomah, DB; Rocio, C-V; Hossain, MB; Oomah, BD; Campos-Vega, R; Hossain, MB; Oomah, DB; Rocio, C-V; Hossain, MB. 2013. Antioxidant activity of phytochemicals and their method of analysis. *Advances in Food Science and Nutrition* 153-256.

San-Miguel, A; Martin-Gill, F. 2009. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao* 106: 106-113.

Sanz, LC; Pérez, AG; Olías, JM. 1992. La lipoxigenasa en el reino vegetal. *Grasas y Aceites* 43 (4): 231-239.

Shibu, A; Dhanam, S. 2016. Phytochemical screening of *Caulerpa racemosa* collected from Gulf of Mannar, Tamil Nadu. Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research 5 (3): 41-45.

Da Silva, F; de Lima, E; Takaki, M. 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer). Acta Botanica Brasilica 21 (3): 697-705.

Stirk, WA; Schwalb, AN; Light, ME; Medková, J; Lenobel, R; Strnad, M; van Staden, J; Sym, SD. 2003. Potential medicinal value of some South African seaweeds. South African Journal of Botany 69 (4): 462-468.

Taiz, L; Zeiguer, E. 2006. Fisiología vegetal (en línea). Universitat Jaume I. 1338 p. Consultado 21 oct. 2018 Disponible en https://books.google.com.pe/books/about/Fisiolog%C3%ADa_vegetal.html?hl=es&id=7QIbYg-OC5AC

Ugartondo Casadevall, V. 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis Dr. Barcelona, España. Consultado 30 jul. 2018. Disponible en <https://www.tesisenred.net/handle/10803/1837>

Urquiaga, I; Leighton, F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biological Research 33 (2): 55-64.

Vairappan, CS. 2004. Antibacterial activity of major secondary metabolites found in four species of edible green macroalgae genus *Caulerpa*. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences 6 (2): 197-201.

Vinayak, RC; Sudha, SA; Chatterji, A. 2011. Bio-screening of a few green seaweeds from India for their cytotoxic and antioxidant potential. Journal of the Science of Food and Agriculture 91 (13): 2471-2476.

Vliegthart, JFG; Veldink, GA; Verhagen, J; Slappendel, S. 1983. Lipoxigenases from plant and animal Origin. Department of Bio-organic Chemistry.

Wu, H. 1996. Affecting the activity of soybean lipoxigenase-1. Journal of Molecular Graphics 14 (6): 331-337.

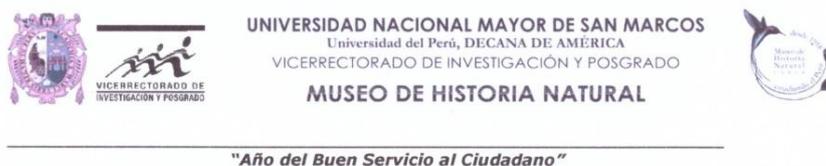
Yasumoto, K; Yamamoto, A; Mitsuda, H. 1970. Effect of phenolic antioxidants on lipoxygenase reaction. *Agricultural and Biological Chemistry* 34 (8): 1162-1168..

Zamorano, C. 2006. Alelopatía : Un nuevo reto en la ciencia de las arvenses en el trópico. *Revista Ciencia Agronómica*. 14 (1): 7-15.

Zhang, D; Glasby, TM; Ralph, PJ; Gribben, PE. 2014. Mechanisms influencing the spread of a native marine alga. *PLOS ONE* 9 (4): 2-11.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Constancia de clasificación taxonómica de *C. filiformis*.



CONSTANCIA N° 252-USM-2017

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

La muestra vegetal (macroalga marina verde) recibida de **Joyce Elizabeth MAMANI HILASACA**, estudiante de la Facultad de Pesquería, de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ha sido estudiada y clasificada como: ***Caulerpa filiformis*** (Suhr) Hering, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Wendy Guiry in Guiry, M.D & Guiry G.M. 2017, Algae Base:

PHYLUM: CHLOROPHYTA

SUB PHYLUM: CHLOROPHYTINA

CLASE: ULVOPHYCEAE

ORDEN: BRYOPSIDALES

FAMILIA: CAULERPACEAE

GENERO: Caulerpa

ESPECIE: *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering

Determinado por: Blgo. Mario Benavente Palacios

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 31 de octubre de 2017

ACE/ddb


MG. ASUNCIÓN CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



Anexo 2: Colecta y secado de alga *C. filiformis*

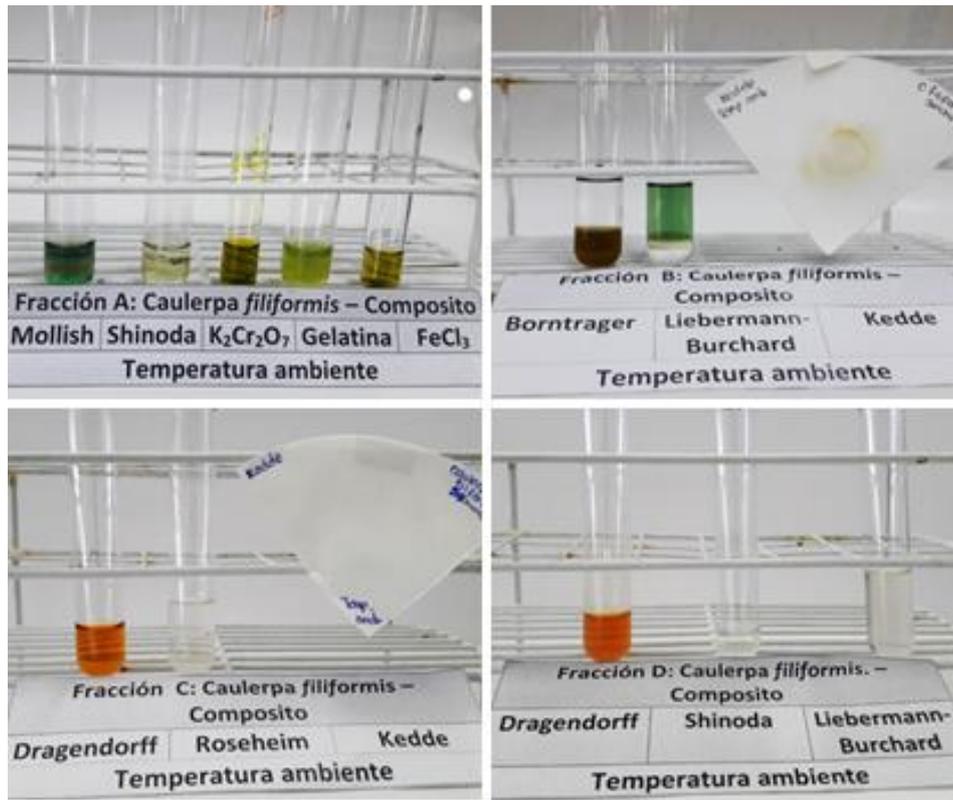


Anexo 3: Preparación del extracto metanólico de *C. filiformis*

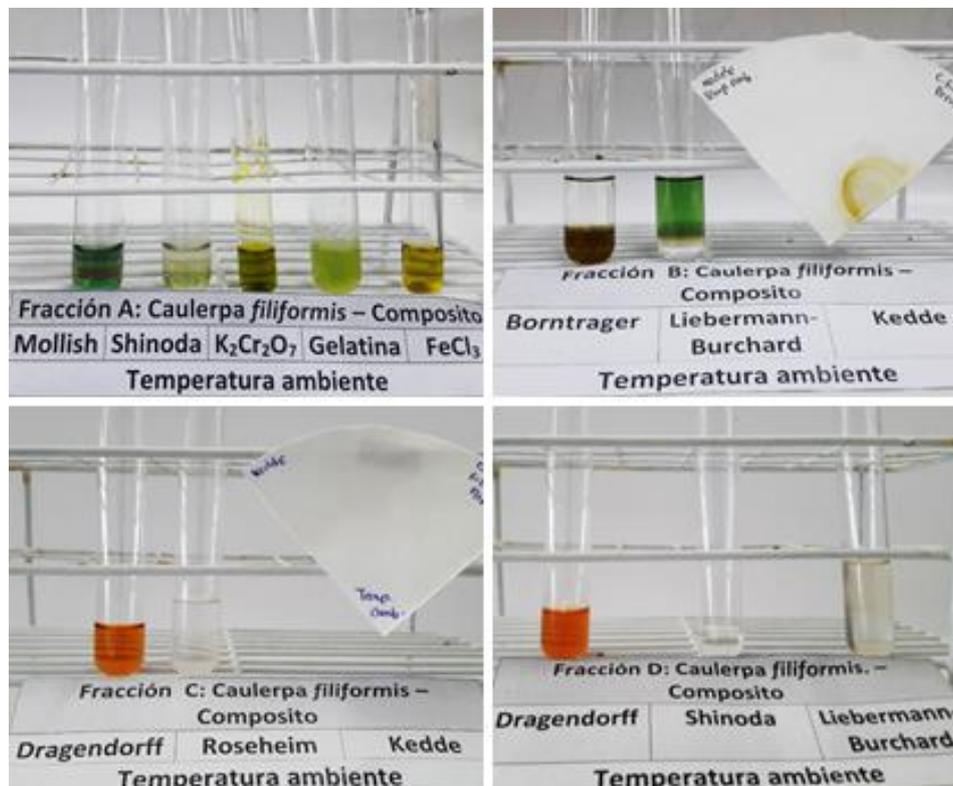


A) muestra de alga seca, (B) muestra de alga en metanol, (C) centrifugación de la mezcla y (D) extracto metanólico.

Anexo 4: Screening fitoquímico del talo de *C. filiformis* de Sechura.



Anexo 5: Screening fitoquímico del talo de *C. filiformis* de Paracas.



Anexo 6: Cuantificación de fenoles totales de *C. filiformis*.



Anexo 7: El estándar ácido gálico y su absorbancia en la cuantificación de fenoles totales.

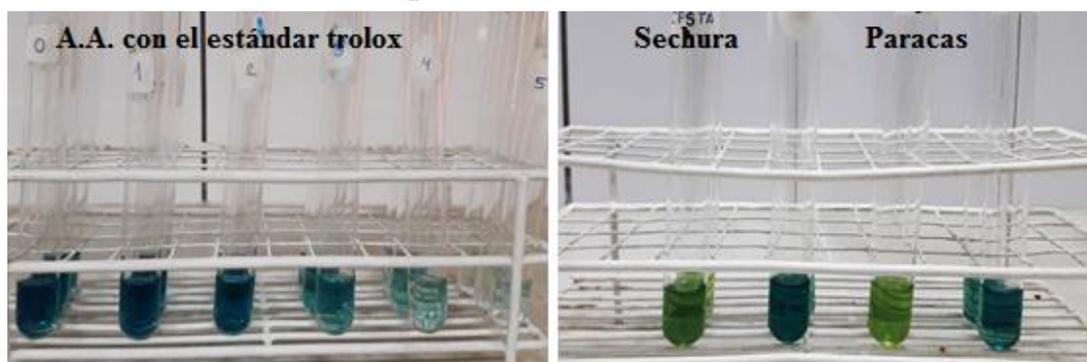
Ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia \pm DS a 765 nm
100	0.043 ± 0.003
200	0.080 ± 0.010
300	0.129 ± 0.015
400	0.174 ± 0.004
500	0.225 ± 0.001

Anexo 8: ANOVA de un factor del contenido de fenoles totales entre el extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas.

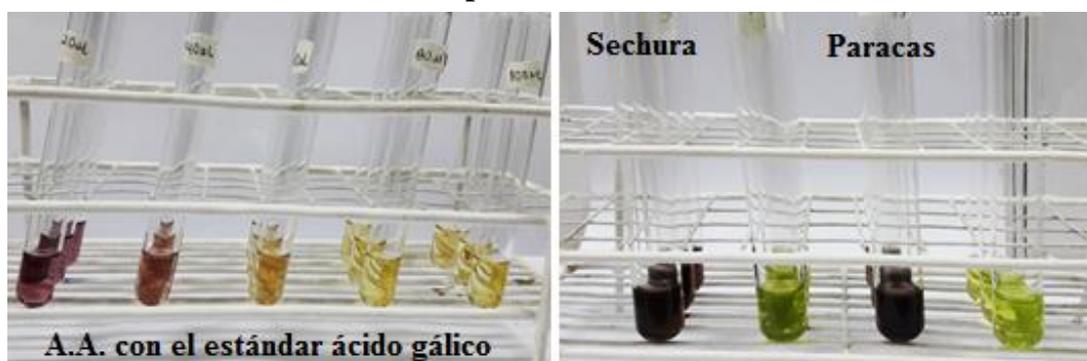
Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	Significancia
Entre extractos	656.537	1	656.537	5225	2.20E-07	***
Dentro de los extractos	0.502624	4	0.125656			
Total	657.04	5				

(***) Se encontraron diferencias significativas muy altas.

Anexo 9: Evaluación de la antioxidante de *C. filiformis* de Sechura y Paracas por el método ABTS.



Anexo 10: Evaluación de la actividad antioxidante de *C. filiformis* de Sechura y Paracas por el método DPPH.



Anexo 11: Análisis estadístico de la actividad antioxidante, por el método de captación del radical ABTS y DPPH.

Anexo 11A: ANOVA de un factor de la actividad antioxidante (%) del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas, por el método ABTS.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	Significancia
Entre extractos	0.0001826	1	0.0001826	13.92	0.02028	*
Dentro de los extractos	5.25E-05	4	1.31E-05			
Total	0.00023508	5				

(*) Se encontraron diferencias significativas.

Anexo 11B: ANOVA de la actividad antioxidante (%) del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas, por el método DPPH.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	Significancia
Entre extractos	0.0220241	1	0.0220241	93.92	0.0006345	**
Dentro de los extractos	0.00093804	4	0.00023451			
Total	0.0229621	5				

(**) Se encontraron diferencias significativas altas.

Anexo 11C: ANOVA de un factor de la capacidad antioxidante (IC₅₀) entre los extractos de Sechura y Paracas, a través de los ensayos de DPPH y ABTS.

Ensayo DPPH	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Entre extractos	1.57324	1	1.57324	943	0.0000067	***
Dentro de los extractos	0.00667321	4	0.0016683			
Total	1.57991	5				

Ensayo ABTS	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Entre extractos	6.47467	1	6.47467	51400	2.27E-09	***
Dentro de los extractos	0.00050413	4	0.000126032			
Total	6.47518	5				

(***) Se encontraron diferencias significativas muy altas.

Anexo 12: Análisis de correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante.

Anexo 12A: Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante (IC₅₀), según el método de captación del radical ABTS y DPPH.

	Actividad antioxidante	n	Correlación (Spearman)	p-valor	significancia
Fenoles totales	ABTS	12	0.64098	0.0247	*
Fenoles totales	DPPH	12	0.62456	0.029925	

(*) Se encontraron diferencias significativas.

Anexo 12B: Correlación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante (IC₅₀), según el método de captación del radical ABTS y DPPH.

	Capacidad antioxidante	N	Correlación (Spearman)	p-valor	Significancia
Fenoles totales	ABTS	6	-0.9862	0.000286	***
Fenoles totales	DPPH	6	-0.9732	0.001068	

(***) Se encontraron diferencias significativas muy altas.

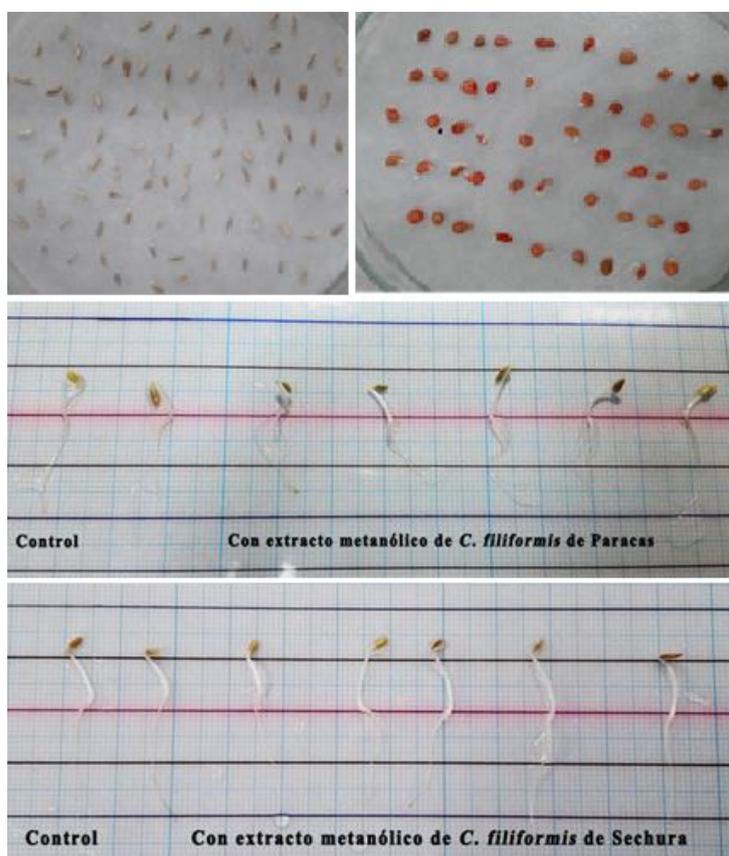
Anexo 13: Análisis estadístico de la inhibición de la enzima lipoxigenasa-1.

Anexo 13 A: ANOVA de un factor de la capacidad inhibitoria del extracto metanólico de *C. filiformis* de Sechura y Paracas (IC₅₀).

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	Significancia
Entre extractos	25.0872	1	25.0872	1534	2.54E-06	***
Dentro de los extractos	0.0654048	4	0.0163512			
Total	25.1526	5				

(***) Se encontraron diferencias significativas muy altas.

Anexo 14: Bioensayo de crecimiento de radículas e hipocótilos de lechuga y tomate.



Anexo 15: Análisis estadístico del crecimiento de radículas e hipocótilos de *L. sativa* y *S. lycopersicum*.

Anexo 15A: ANOVA de un factor para la elongación (%) de hipocótilos de *L. sativa* tratados con extractos metanólicos de Sechura.

Fuente de variación	SC	Gl	CM	F	p-valor	Significancia
Entre extractos	0.250375	6	0.0417292	10.73	0.0001488	***
Dentro de los extractos	0.0544535	14	0.00388953			
Total	0.304829	20				

(***) Se encontraron diferencias significativas muy altas.

Anexo 15B: Prueba de comparación de pares de Tukey entre la elongación (%) del hipocótilo del control y los tratamientos con la muestra de Sechura.

Control vs concentración del extracto (mg/mL)	p-valor	significancia
C vs 1	0.991	n.s.
C vs 3	0.152	n.s.
C vs 10	0.02199	*
C vs 30	0.0003607	***
C vs 60	0.003883	**
C vs 80	0.5697	n.s.

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15C: ANOVA de un factor para la elongación (%) de hipocótilos de *L. sativa* tratados con extractos metanólicos de Paracas.

Fuente de variación	SC	Gl	CM	F	p-valor	Significancia
Entre extractos	0.314674	6	0.0524457	19.45	4.79E-06	***
Dentro de los extractos	0.037759	14	0.00269707			
Total	0.352433	20				

(***) Se encontraron diferencias significativas muy altas.

Anexo 15D: Prueba de comparación de pares de Tukey entre la elongación (%) del hipocótilo del control y los tratamientos con la muestra de Paracas.

Control vs concentración del extracto (mg/mL)	p-valor	Significancia
C vs 1	0.9311	n.s.
C vs 3	0.1859	n.s.
C vs 10	0.003341	**
C vs 30	0.0001806	***
C vs 60	0.0001993	***
C vs 80	0.01164	*

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15E: ANOVA de un factor para la elongación (%) de radículas de *L. sativa* tratados con extractos metanólicos de Sechura.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	Significancia
Entre extractos	0.078478	6	0.0130797	4.163	0.0131	*
Dentro de los extractos	0.0439854	14	0.00314182			
Total	0.122463	20				

(*) Se encontraron diferencias significativas.

Anexo 15F: Prueba de comparación de pares de Tukey entre la elongación (%) de la radícula del Control y los tratamientos con la muestra de Sechura.

Control vs concentración del extracto (mg/mL)	p-valor	Significancia
C vs 1	0.9974	n.s.
C vs 3	0.6196	n.s.
C vs 10	0.737	n.s.
C vs 30	0.87	n.s.
C vs 60	0.4629	n.s.
C vs 80	0.006824	**

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15G: ANOVA de un factor para la elongación (%) de radículas de *L. sativa* tratados con extractos metanólicos de Paracas.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Entre extractos	0.0260978	6	0.00434964	1.43	0.2715	n.s.
Dentro de los extractos	0.0425981	14	0.00304272			
Total	0.0686959	20				

(n.s.) No se encontraron diferencias significativas.

Anexo 15H: ANOVA de un factor para la elongación (%) de hipocótilos de *S. lycopersicum* tratados con extractos metanólicos de Sechura.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Entre extractos	0.162865	6	0.0271441	6.18	0.002421	**
Dentro de los extractos	0.0614917	14	0.00439227			
Total	0.224357	20				

(**) Se encontraron diferencias significativas altas.

Anexo 15I: Prueba de comparación de pares de Tukey entre la elongación (%) del hipocótilo del control y los tratamientos con la muestra de Sechura.

Control vs concentración del extracto (mg/mL)	p-valor	Significancia
C vs 1	0.9937	n.s.
C vs 3	0.9253	n.s.
C vs 10	0.1442	n.s.
C vs 30	0.01188	*
C vs 60	0.01139	*
C vs 80	0.04501	*

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15J: ANOVA de un factor para la elongación (%) de hipocótilos de *S. lycopersicum* tratados con extractos metanólicos de Paracas.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Entre extractos	0.533371	6	0.0888951	12.71	5.82E-05	***
Dentro de los extractos	0.0979525	14	0.00699661			
Total	0.631323	20				

(***) Se encontraron diferencias significativas muy altas.

Anexo 15K: Prueba de comparación de pares de Tukey entre la elongación (%) del hipocótilo del control y los tratamientos con la muestra de Paracas.

Control vs concentración del extracto (mg/mL)	p-valor	Significancia
C vs 1	0.9918	n.s.
C vs 3	0.9378	n.s.
C vs 10	0.0275	*
C vs 30	0.0002324	***
C vs 60	0.01932	*
C vs 80	0.01212	*

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15L: ANOVA de un factor para la elongación (%) de radículas de *S. lycopersicum* tratado con extractos metanólicos de Sechura.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Entre extractos	0.120755	6	0.0201259	5.604	0.003776	**
Dentro de los extractos	0.0502799	14	0.00359142			
Total	0.171035	20				

(**) Se encontraron diferencias significativas altas.

Anexo 15M: Prueba de comparación de pares de Tukey entre la elongación (%) de la radícula del control y los tratamientos con la muestra de Sechura.

Control vs concentración del extracto (mg/mL)	p-valor	significancia
C vs 1	1	n.s.
C vs 3	0.9811	n.s.
C vs 10	0.201	n.s.
C vs 30	0.0422	*
C vs 60	1	n.s.
C vs 80	0.9978	n.s.

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15N: ANOVA de un factor para la elongación (%) de radículas de *S. lycopersicum* tratado con extractos metanólicos de Paracas.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Entre extractos	0.193316	6	0.0322194	9.757	0.0002481	***
Dentro de los extractos	0.0462295	14	0.00330211			
Total	0.239546	20				

(***) Se encontraron diferencias significativas muy altas.

Anexo 15O: Prueba de comparación de pares de Tukey entre la elongación (%) de la radícula del control y los tratamientos con la muestra de Paracas.

Control vs concentración del extracto (mg/mL)	p-valor	significancia
C vs 1	0.94	n.s.
C vs 3	0.956	n.s.
C vs 10	0.2264	n.s.
C vs 30	0.7901	n.s.
C vs 60	0.003019	**
C vs 80	0.009019	**

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15P: ANOVA de 2 factores para la elongación (%) de hipocótilos de *L. sativa* entre la procedencia de las muestras (Sechura y Paracas) y los tratamientos.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Procedencia	0.0065	1	0.0065	1.974	0.1711	n.s.
Tratamiento	0.5496	6	0.09159	27.81	1.44E-10	***
Interacción Proc.*Trat.	0.01549	6	0.002582	0.7839	0.5898	n.s.
Dentro de los grupos	0.09221	28	0.003293			
Total	0.6638	41				

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15Q: ANOVA de 2 factores para la elongación (%) de radículas de *L. sativa* entre la procedencia de las muestras (Sechura y Paracas) y los tratamientos.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Procedencia	0.1235	1	0.1235	39.93	7.78E-07	***
Tratamiento	0.04833	6	0.008056	2.605	0.03917	*
Interacción Proc.*Trat.	0.05624	6	0.009374	3.031	0.02064	*
Dentro de los grupos	0.08658	28	0.003092			
Total	0.3146	41				

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15R: ANOVA de 2 factores para la elongación (%) de hipocótilos de *S. lycopersicum* entre la procedencia de las muestras (Sechura y Paracas) y los tratamientos.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Procedencia	0.0592	1	0.0592	10.4	0.003202	**
Tratamiento	0.6214	6	0.1036	18.19	1.72E-08	***
Interacción Proc.*Trat.	0.0748	6	0.01247	2.189	0.07413	n.s.
Dentro de los grupos	0.1594	28	0.005694			
Total	0.9149	41				

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.

Anexo 15S: ANOVA de 2 factores para la elongación (%) de radículas de *S. lycopersicum* entre la procedencia de las muestras (Sechura y Paracas) y los tratamientos.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p-valor	significancia
Procedencia	0.03209	1	0.03209	9.311	0.004944	**
Tratamiento	0.1445	6	0.02408	6.987	0.0001285	***
Interacción Proc.*Trat.	0.1696	6	0.02826	8.2	3.59E-05	***
Dentro de los grupos	0.09651	28	0.003447			
Total	0.4427	41				

(n.s.) no significativo; (*) significativo; (**) significativo alto; (***) significativo muy alto.