



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE ALGUNAS
MACROALGAS DEL SISTEMA ARRECIFAL VERACRUZANO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

BIÓL. VIRIDIANA REMEDIOS ESCARTÍN ALPIZAR

TUTORA PRINCIPAL:

**DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

COMITÉ TUTOR:

**DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

DRA. HILDA PATRICIA LEÓN TEJERA POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA

ASESOR(A) EXTERNO(A):

**M. en C. GLORIA GARDUÑO SOLÓRZANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

CD. MX., ABRIL, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE ALGUNAS MACROALGAS DEL SISTEMA ARRECIFAL VERACRUZANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIÓL. VIRIDIANA REMEDIOS ESCARTÍN ALPIZAR

TUTORA PRINCIPAL:
DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR:
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DRA. HILDA PATRICIA LEÓN TEJERA

ASESORA EXTERNA:
M. en C. GLORIA GARDUÑO SOLÓRZANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

MÉXICO, CD. MX., ABRIL, 2020

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por apoyarme durante los meses del presente proyecto.

También agradezco al apoyo económico brindado por la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante la realización del mismo.

Así mismo, agradezco a mi Universidad, la Universidad Nacional Autónoma de México. Ser parte de ella me ha brindado la oportunidad de “ignorar menos”, tener divertidas (y estresantes) aventuras, momentos inolvidables (buenos y malos); y amistades increíbles.

A mi tutora, la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado, quien es una de las personas que más admiro, respeto y aprecio desde que tuve el gusto de conocerla. Le estoy muy agradecida por todo su apoyo, sus consejos y toda la ayuda que me ha brindado.

A mi comité tutor integrado por el Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. José Guillermo Avila Acevedo, Dra. Ana María García Bores, Dra. Hilda Patricia León Tejera y a mi asesora externa, la M. en C. Gloria Garduño Solórzano. A todos ustedes les agradezco mucho sus consejos, asesorías y apoyo en este proyecto.

Sin olvidar a todas las personas que estuvieron involucradas en la realización de esto. A ustedes también les estoy muy agradecida por todo su apoyo y atención mientras realizaba mi proyecto de maestría. No podría mencionarlos a todos pero saben perfecto quienes son.

*“The heart may be weak and sometimes it might even give in
but I’ve learned that deep down there’s a light that never goes out”*

Sora 

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	7
Área de estudio.....	8
Estrategia metodológica.....	10
• Colecta de material.....	10
• Identificación taxonómica.....	10
• Obtención de extractos.....	10
>>Actividad antimicrobiana.....	11
• Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.....	11
• Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.....	11
• Curvas de sobrevivencia.....	11
>>Actividad antifúngica.....	12
• Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.....	12
• Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.....	12
>>Caracterización fitoquímica de los extractos activos.....	12
>>Contenido de Fenoles Totales (CFT).....	13
>>Evaluación de la actividad antioxidante.....	13
Resultados.....	14
Discusión.....	37
Conclusiones.....	55
Apéndices.....	56
Bibliografía.....	66

Tabla 1	
Especies de algas colectadas de cada arrecife y clasificadas por filo.....	14
Tabla 2	
Relación peso seco y rendimiento en porcentaje de cada extracto algal obtenido.....	22
Tabla 3	
Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos activos.....	24
Tabla 4	
Determinación de CMI y CBM en <i>P. gymnospora</i>	27
Tabla 5	
Análisis preliminar fitoquímico de los extractos metanólicos de <i>D. cervicornis</i>	27
Tabla 6	
Contenido de fenoles totales en extractos metanólicos.....	29
Tabla 7	
Contenido de fenoles totales de los extractos hexánicos.....	29
Tabla 8	
Capacidad antioxidante media (CA ₅₀) de los extractos activos.....	31
Tabla 9	
Datos RP-HPLC-DAD fracción #7 del extracto metanólico de <i>D. cervicornis</i> (S)....	34
Tabla 10	
Datos RP-HPLC-DAD fracción #9 del extracto metanólico de <i>D. cervicornis</i> (S)....	35
Tabla 11	
Datos RP-HPLC-DAD fracción #14 del extracto metanólico de <i>D. cervicornis</i> (S)..	36
Tabla 12	
Pruebas cualitativas de los principales grupos de metabolitos secundarios con su respectivo reactivo y apariencia positiva.....	62
Tabla 13	
Concentraciones para preparar la solución problema para evaluar la actividad antioxidante.....	65

Índice de figuras

Fig. 1 Mapa del Sistema Arrecifal Veracruzano.....	9
Fig. 2 Diversidad algal del arrecife Ingenieros por porcentaje.....	15
Fig. 3 Ejemplar <i>Ulva lactuca</i>	16
Fig. 4 Ejemplar <i>Padina gymnospora</i>	17
Fig. 5 Ejemplar <i>Gracilariopsis carolinensis</i>	18
Fig. 6 Ejemplar <i>Hypnea musciformis</i>	19
Fig. 7 Ejemplar <i>Spyridia hypnoides</i> subesp. <i>complanata</i>	20
Fig. 8 Ejemplar <i>Dictyota cervicornis</i>	21
Fig. 9 Actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de algunas algas.....	23
Fig. 10 Comportamiento de la población bacteriana de <i>S. aureus</i> cc con el extracto metanólico de <i>D. cervicornis</i> (S).....	25
Fig. 11 Comportamiento de la población bacteriana de <i>S. aureus</i> cc con el extracto metanólico de <i>D. cervicornis</i> (IE).....	26
Fig. 12 Curva patrón de ácido gálico para la prueba de contenido de fenoles totales.....	28
Fig. 13 Prueba de actividad antioxidante preliminar para determinar los extractos con actividad frente al radical DPPH.....	30
Fig. 14 Alícuotas obtenidas de la columna Sephadex G-50 del extracto metanólico de <i>D. cervicornis</i> (S).....	31
Fig. 15 Cromatografía en placa del extracto metanólico de <i>D. cervicornis</i> (S) vista en luz ultravioleta $\lambda=366$ nm.....	32
Fig. 16 Cromatografía en placa del extracto metanólico de <i>D. cervicornis</i> (S) vista en luz ultravioleta $\lambda=254$ nm.....	32
Fig 17 Actividad antibacteriana de las fracciones activas obtenidas de la columna Sephadex G-50 del extracto metanólico de <i>D. cervicornis</i> (S) en <i>S. aureus</i> cc.....	33
Fig. 18 Corrientes superficiales de los océanos.....	40
Fig. 19 Sistema Arrecifal Veracruzano con los nombres de sus arrecifes.....	41
Fig. 20 Crecimiento y decaimiento de la termoclina mensual en latitudes medias.....	49
Fig. 21 Perfiles de temperatura típica de los océanos.....	49

Las algas se han reconocido como fuente potencial de drogas para la farmacología por poseer sustancias con propiedades útiles para tratar enfermedades. En los años recientes, las algas se han sometido a diversos estudios para corroborar las actividades biológicas que poseen. Sin embargo las investigaciones de los recursos algales en México sobre aspectos de ficología aplicada son escasas, en contraste con el avance del conocimiento de la biodiversidad a lo largo de la zona costera del país. En el presente trabajo se utilizaron extractos hexánicos y metanólicos de siete especies de algas de tres localidades del Sistema Arrecifal Veracruzano (arrecife Ingenieros (I), Salmedina (S) e Isla de En medio (IE)) para evaluar su actividad antimicrobiana, utilizando cepas Gram positivas y Gram negativas; así como su actividad antioxidante. La fecha de colecta del material algal fue el 17 de febrero del 2018. Sólo los extractos metanólicos de *Dictyota cervicornis* (S e IE) y *Padina gymnospora* (I) fueron activos sobre *Staphylococcus aureus* cc, *S. epidermidis* FES-C, *Candida albicans* 17MR, *S. aureus* cc, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis* ATCC 14506, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* CUSI. Ningún extracto algal mostró actividad contra cepas de hongos filamentosos. El extracto metanólico de *P. gymnospora* tuvo actividad contra *C. albicans*, sin embargo se requieren concentraciones mayores a 4.0 mg/mL para inhibir el 99.99% de la población. Los extractos metanólicos de *D. cervicornis* (IE y S) fueron positivos a la presencia de fenoles, glicósidos y triterpenos. Los extractos algales probados presentaron una baja concentración de fenoles. La mayoría de los extractos algales no mostraron actividad antioxidante frente al radical DPPH, solamente los extractos metanólicos de *P. gymnospora* y *G. carolinensis* mostraron actividad pero con una CA₅₀ mucho mayor a la del control positivo, quercetina. Las fracciones activas del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) fueron analizadas con RP-HPLC-DAD y se determinó que en las tres fracciones predominan los compuestos de tipo fenilpropanoide.

Abstract

Algae have been recognized as a potential source of drugs for pharmacology for possessing substances with useful properties to treat diseases. In recent years, algae have been subjected to various studies to corroborate their biological activities. However, investigations of algal resources in Mexico about their aspects of applied phycology are scarce, in contrast to the advance of knowledge of biodiversity throughout the country's coastal zone. In the present work, hexane and methanolic extracts from seven species of algae from three localities of the Veracruz Reef System (Ingenieros (I), Salmedina (S) and Isla de Enmedio (IE)) were used to evaluate their antimicrobial activity, using strains Gram positive and Gram negative; as well as its antioxidant activity. The collection date of the algal material was February 17, 2018. Only the methanolic extracts of *Dictyota cervicornis* (S and IE) and *Padina gymnospora* (I) were active on *Staphylococcus aureus* cc, *S. epidermidis* FES-C, *Candida albicans* 17MR, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis* ATCC 14506, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* CUSI. No algal extract showed activity against strains of filamentous fungi. The *P. gymnospora* methanolic extract had activity against *C. albicans*, however concentrations greater than 4.0 mg/mL are required to inhibit 99.99% of the population. The methanolic extracts of *D. cervicornis* (IE and S) were positive in the presence of phenols, glycosides and triterpenes. The tested algal extracts presented a low concentration of phenols. Most of the algal extracts did not show antioxidant activity against the DPPH radical, only the methanolic extracts of *P. gymnospora* and *G. carolinensis* showed activity but with a CA₅₀ much higher than that of the positive control, quercetin. The active fractions of the methanolic extract of *D. cervicornis* (S) were analyzed with RP-HPLC-DAD and it was determined that phenylpropanoid-type compounds predominate in the three fractions.

Las algas constituyen uno de los recursos naturales de creciente valor para los países que poseen una alta diversidad. El ambiente marino tiene una importancia indiscutible ya que éstas representan la principal fuente de carbono para los organismos acuáticos heterótrofos, manteniendo el funcionamiento de la cadena alimenticia dentro de estos ecosistemas, además de ser de las principales productoras de oxígeno, no sólo en dicho medio, sino en el planeta (Robledo y Freile, 1998; Mansilla y Alveal, 2004; Villalobos, 2016). Además, estos organismos acuáticos poseen diversas formas, pueden ser microscópicos unicelulares o multicelulares macroscópicos. Habitan en ambientes marinos, salobres y en aguas dulces, algunas especies también pueden vivir en el medio terrestre (Villalobos, 2016).

Los distintos grupos taxonómicos de algas marinas tienen un origen polifilético por lo cual las recientes clasificaciones de organismos eucariontes, como la de Adl *et al.* (2012), consideran diferentes linajes. De estos, ubican a las algas rojas y verdes dentro del supergrupo Archeoplastida, dentro de este también están las plantas con sistema de conducción “verdadero”, pues al igual que ellas poseen cloroplastos con dos membranas originados por una endosimbiosis primaria. Por su parte, Wynne (1989) señala colocarlos en los filo Rhodophyta y Chlorophyta.

Por otro lado, las algas pardas fueron ubicadas en el clado nombrado SAR (acrónimo de tres grupos: Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria), colocando Phaeophyta (Ochrophyta) dentro del grupo Stramenopiles. Las algas pardas presentan cloroplastos con cuatro membranas, resultado de una endosimbiosis secundaria (Adl *et al.*, 2012; Rodríguez-Prieto *et al.*, 2014).

Se han descrito aproximadamente 27,000 especies de algas en el mundo y en México se tienen alrededor de 2,702 especies, de las cuales 1,600 son marinas y 1,102 son dulceacuícolas (CONABIO, 2012). A pesar de que el país cuenta con suficientes recursos algales, el campo de la ficología aplicada es muy reducido y por tanto hace falta resaltar la relevancia de la biodiversidad y su correcta explotación, esto debido a que no se conoce lo suficiente la forma en la cual puede ser aprovechado este recurso marino (Freile, 2001).

Otros aspectos importantes de las algas marinas son la prevención de la remoción del sustrato, pues actúan como trampas de sedimentos; la filtración del agua al usar nitrógeno y fósforo para su crecimiento, y proveer de refugio a fauna como peces y algunos invertebrados marinos (Robledo y Freile, 1998).

Las algas no sólo sirven para mantener estos importantes ecosistemas marinos, el humano también las utiliza como alimento, producción de coloides para la industria

alimenticia, producción de pigmentos, fertilizantes y abonos (Chapman, 1970; Freile, 2001).

Desde hace tiempo estos organismos algales se han reconocido como fuente potencial en la farmacología por poseer sustancias con propiedades de interés farmacológico (Freile, 2001). Las algas han sido utilizadas tradicionalmente por la mayoría de las culturas para la cura y prevención de múltiples enfermedades que van desde la diarrea, afecciones pulmonares y del hígado, hasta tratamientos para la piel. La farmacología ha investigado especies de estos organismos marinos en la búsqueda de agentes antibacterianos y anticancerígenos (González, 1987).

Las algas marinas, como organismos fotosintéticos, están constantemente expuestas a la luz y a concentraciones altas de oxígeno, lo que promueve la producción de radicales libres. Estos organismos constituyen una fuente importante de compuestos antioxidantes que las protegen de estas moléculas (Freile, 2001).

Se ha reportado que las algas producen compuestos de origen fenólico, estos son muy buenos antioxidantes por la reactividad del grupo fenol (Robbins, 2003), de esta manera el contenido de estos compuestos que posee el organismo está directamente relacionado con esta actividad (Avello y Suwalsky, 2006).

En los seres humanos, la exposición a contaminantes, el estilo de vida o el ambiente en el que se vive pueden generar acumulación de radicales libres resultando en un estrés oxidativo. Este estrés está relacionado con la patogénesis de algunas enfermedades y en el proceso de envejecimiento (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013). Cabe mencionar que las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo y son necesarias para el mantenimiento del mismo, sin embargo, el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante (endógena o exógena) para evitar efectos negativos en él, provocados por los mismos radicales libres (Avello y Suwalsky, 2006).

En los años recientes, las algas se han sometido a diversos estudios, entre los que destacan aquellos sobre la química de estos organismos. Ejemplo de ello es la contribución de Vidal *et al.* (2006) donde usaron el extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum*, demuestran que posee capacidad antioxidante por producir compuestos de origen fenólico; también el de Echavarría *et al.* (2009) donde extractos hexánicos y metanólicos de cinco algas del Caribe mostraron actividad antioxidante y un buen rendimiento de compuestos fenólicos. Asimismo, Faten *et al.* (2009) investigaron el extracto etanólico de *Gracilaria verrucosa*, el cual fue particionado con éter de petróleo, acetato de etilo, butanol y agua; reportan que los dos primeros mostraron actividad antioxidante usando el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

De igual forma, se ha estudiado la actividad antibacteriana en estos organismos; como en el trabajo de Kandhasamy y Arunachalam en el 2008, evaluaron la actividad antimicrobiana de *Caulerpa racemosa*, *Ulva lactuca*, *Gracillaria folifera*, *Hypnea muciformis*, *Sargassum myricocystum*, *S. tenneerimum* y *Padina tetrastomatica* de las costas de India contra cepas Gram positivas y Gram negativas. Los extractos metanólicos de todas las algas mostraron un amplio espectro de actividad antibacteriana; sus resultados muestran a las Chlorophyta con una mayor actividad que las demás, sólo *Escherichia coli* fue resistente a todos los extractos excepto al de *S. tenneerimum*.

En el trabajo de Kolanjinathan *et al.* (2009) usaron los extractos etanólicos de *Gracilaria edulis*, *Calorpha peltada* (citada erróneamente, posiblemente sea *Caulerpa peltata*) e (nombre erróneo, posiblemente *Hydroclathrus* sp) *Hydroclathrus* sp. contra seis cepas bacterianas, material procedente de la costa de Mandapam. En sus resultados obtuvieron que el extracto de *G. edulis* inhibió el crecimiento de todas las cepas probadas excepto *Bacillus cereus* y *Enterobacter aerogenes*; el extracto de *C. peltada* (posible *C. peltata*) fue efectivo contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*; el extracto de *Hydroclathrus* sp. (posible *Hydroclathrus* sp) inhibió el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

De igual forma, el trabajo de Vallinayagam *et al.* (2009) evaluaron los extractos clorofórmicos de *Ulva lactuca*, *Padina gymnospora*, *Sargassum wightii* y *Gracilaria edulis*; con material colectado de la región de la costa suroeste Pudumadam. Estas fueron procesadas por el método de difusión en disco contra cepas Gram positivas y Gram negativas, reportando que la actividad de los extractos fue moderada.

Estos trabajos de investigación sugieren que los organismos marinos como las macroalgas, son fuentes potenciales de moléculas bioactivas. Sin embargo, las investigaciones de los recursos algales en México son escasos. Algunos de los trabajos realizados para la investigación farmacéutica de las algas en el país son el de Lara-Isassi *et al.* (1996) titulado "Actividad antibacteriana de las algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano" donde el extracto etanólico y acetónico de 18 especies de algas colectadas en Oaxaca fueron probados contra cinco cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los extractos acetónicos de nueve especies de algas mostraron actividad en *Staphylococcus aureus* y otras cinco especies contra *Streptococcus epygenes*. También, Zubia *et al.* (2007), investigaron la actividad antioxidante en macroalgas marinas tropicales de la Península de Yucatán, México; donde evaluaron la actividad antioxidante de extractos de 48 especies de algas marinas obtenidos con diclorometanol-metanol (2:1), colectadas en la Península de Yucatán. Todos los extractos mostraron tener actividad antioxidante y tres especies (*Avrainvillea longicaulis*, *Chondria baileyana* y *Lobophora variegata*) presentaron un buen potencial antioxidante al tener un índice de oxidación muy bajo.

Otra investigación realizada con extractos de macroalgas en el país es el de Villarreal-Gómez *et al.* (2010) donde evaluaron la actividad antibacteriana y anticancerígena de *Egregia menziesii*, *Codium fragile*, *Sargassum muticum*, *Endrarachne binghamiae*, *Centroceras clavulatum* y *Laurencia pacifica*, usando las cepas *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, material colectado de Bahía Todos Santos, México. Sus resultados mostraron que cinco de los seis extractos de algas fueron activas contra *Proteus mirabilis*, pero ninguno de los extractos presentaron actividad contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*. La cepa *K. pneumonia* mostró una baja sensibilidad contra los extractos probados.

Cabe mencionar que para la región veracruzana sólo se cuenta con la contribución de Avila-Romero (2016) en el cual evaluó la actividad antimicrobiana y antioxidante de 23 especies de algas del Sistema Arrecifal Veracruzano; en el concluyó que las especies de las algas pertenecientes al filo Rhodophyta tuvieron una actividad antibacteriana mayor que aquellas de los fila Chlorophyta y Phaeophyta. A pesar de que México cuenta con un alto porcentaje de zonas costeras, haciendo el mar un campo fértil para la búsqueda de nuevos productos con potencial farmacéutico, se puede ver que todavía no hay suficiente investigación sobre estos organismos algales. Por esto es importante su estudio, de esta forma se obtendrá información estratégica para la conservación y adecuado manejo de los recursos y, al mismo tiempo, para un buen aprovechamiento.

La pregunta científica del presente trabajo fue: ¿las macroalgas del Sistema Arrecifal Veracruzano de los arrecifes Ingenieros, Salmaedina e Isla de Enmedio, tendrán actividad antimicrobiana y antioxidante?

Hipótesis

Las macroalgas poseen metabolitos secundarios que han demostrado tener actividades biológicas como antioxidante, antibacteriano, entre otras. Entonces las macroalgas de los tres arrecifes seleccionados del Sistema Arrecifal Veracruzano tendrán metabolitos secundarios que les confieren estas actividades antimicrobianas y antioxidantes.

Objetivos

General

- ✓ Evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas de los fila Rhodophyta, Ochrophyta y Chlorophyta del Sistema Arrecifal Veracruzano, para conocer los productos naturales a partir de los recursos algales del SAV.

Particulares

- ✓ Colectar y determinar el material biológico en tres arrecifes del Sistema Arrecifal Veracruzano.
- ✓ Determinar el rendimiento de los extractos algales de diferente polaridad.
- ✓ Determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.
- ✓ Identificar cualitativamente los principales grupos de metabolitos secundarios en los extractos.
- ✓ Cuantificar el contenido de fenoles totales (CFT) de los extractos algales y la actividad antioxidante obteniendo la capacidad antioxidante media (CA₅₀) de los extractos.

El Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) es un área natural protegida establecida en el estado de Veracruz, creada con el fin de contrarrestar el impacto de las actividades realizadas en el puerto donde se albergan arrecifes (Fig. 1) (CEMDA, 2011).

Los arrecifes son hábitats críticos y de gran importancia ecológica pues proveen de servicios ambientales participando en la dinámica costera al prevenir la erosión y disminuir la fuerza del oleaje (CEMDA, 2011). En el país, los arrecifes de coral ocupan un área aproximada de 1,780 km², cerca del 0.63% del área total de este tipo de hábitats en el mundo (Spalding *et al.*, 2001). También protegen las costas de tormentas tropicales y huracanes, sin mencionar que muchas comunidades dependen de ellos para satisfacer necesidades como la alimentación, proveen de especies de crianza para el comercio y otras actividades económicas (CEMDA, 2011).

En este lugar se albergan una alta diversidad de flora y fauna, entre ellas diversas especies de macroalgas. Son poco más de 192 especies, de las cuales 122 son algas rojas (Rhodophyta), 70 son algas verdes (Chlorophyta); también algunas son verdes-azules (Cyanophyta) (CONABIO, 2007). En cuanto a las algas pardas, la SEMARNAT-CONANP establece que sólo hay un orden registrado para el PNSAV el cual es Fucales con la familia Sargassaceae con *Sargassum spp* (SEMARNAT-CONANP, 2017).

La conservación del SAV es de suma importancia pues constituye un área marina que alberga 28 formaciones arrecifales (incluyendo cayos e islas) de diferentes tamaños, formas y profundidad que como ya se mencionó, estos ecosistemas son relevantes en la protección de costas contra el oleaje o tormentas tropicales, sirven como refugio para diversas especies y fomentan su reproducción. Esta zona se distribuye en dos grupos separados por la desembocadura del río Jamapa. La principal importancia del SAV es la gran diversidad que ostenta, así como la alta productividad en términos de pesquerías y belleza escénica, también para los procesos de tasas de intercambio genético, recolonización y estabilidad general del ecosistema (CONABIO, 2007; CEMDA, 2011).

Dentro del área de estudio se seleccionaron los arrecifes Ingenieros, Isla de Enmedio y Salmedina como zonas de colecta. La decisión para considerar obtener el material biológico a partir de estas áreas fue el grado de impacto humano en ellos.

En la zona norte del SAV, se localiza el arrecife Ingenieros (19° 09' 4.9" N, 96° 05' 33.4" W); en él las actividades turísticas son constantes y sin un control que permita al lugar mantenerse limpio. Además, cabe señalar, que en esta zona se ubican varios hoteles y comercios, los cuales vierten sus desechos en áreas colindantes a

este arrecife, haciendo de este punto de colecta el que sufre un mayor impacto por las actividades humanas (Pérez y Vargas-Hernández, 2008).

En la zona sur del SAV se localizan Isla de Enmedio (19° 06' 5.3" N, 95° 56' 19.3" W) y Salmedina (19° 04' 45.5" N, 95° 57' 17.1" W). El primero es un arrecife de plataforma, en él si existe un control estricto sobre las actividades turísticas y la llegada de las lanchas con los turistas ya que el anclaje directo al arrecife provoca graves daños a los corales. Por esto es que se mantiene una constante vigilancia al lugar. Por eso este punto de colecta se considera con un impacto medio por las actividades humanas (Pérez y Vargas-Hernández, 2008).

Salmedina, arrecife de plataforma que no está permitido el arribo de turistas, sólo pueden llegar trabajadores del SAV e investigadores, con permiso de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). Esto con fines de trabajos para el mantenimiento y estudio del mismo arrecife (Pérez y Vargas-Hernández, 2008). Es por eso que se seleccionó este arrecife como punto de colecta sin impacto humano.

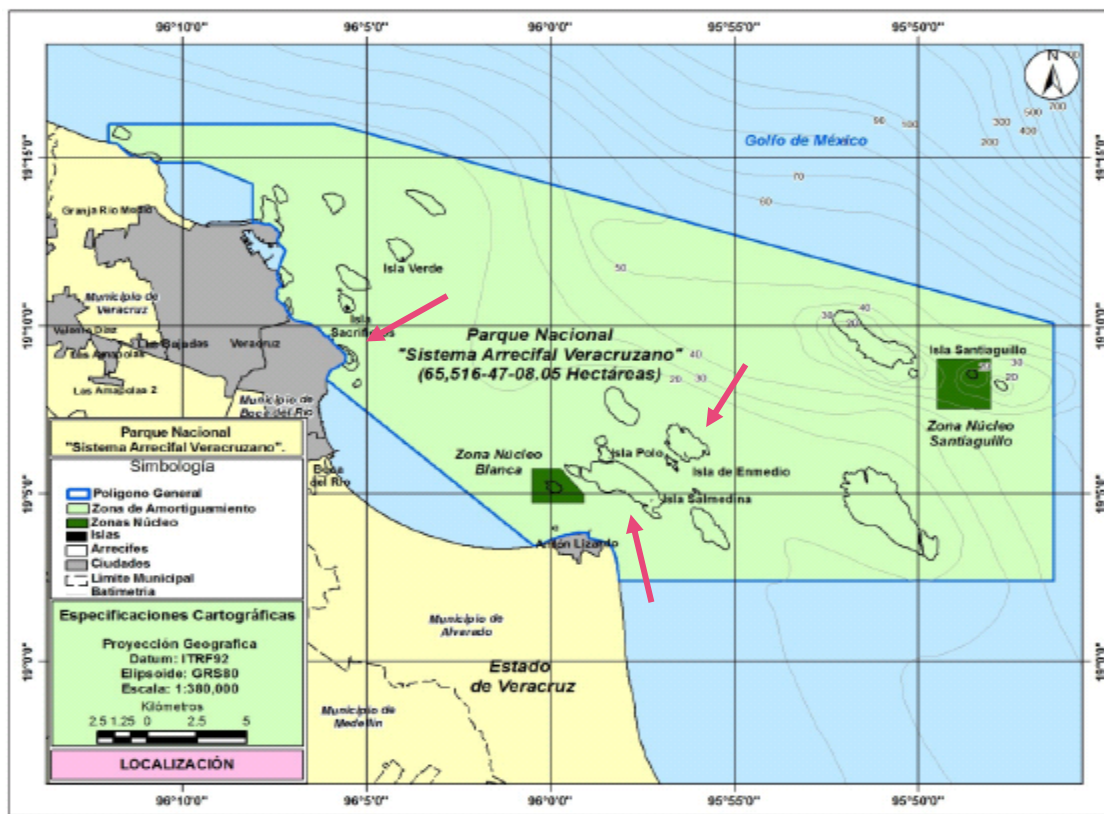


Fig. 1. Mapa del área que abarca el SAV, se muestran las 28 formaciones arrecifales conocidas: Anegada de Afuera, Topatillo, Santiaguillo, Anegadilla, Cabezo, De Enmedio, Rizo, Periférico, Chopas, Sargazo, Punta Coyol, La Palma, Polo, Blanca, Gioté, Ingeniero, Sacrificios, Mersey, Pájaros, Verde, Bajo Paducah, Anegada de Adentro, Blanquilla, Galleguilla, Gallega, Punta Gorda, Punta Brava y Hornos; así como los cayos conocidos comúnmente como: Isla Sacrificios, Isla Santiaguillo, Isla Verde, Isla De Enmedio e Isla Polo, o los que en un futuro se formen o emerjan dentro del polígono descrito. Señalados con flechas los tres arrecifes elegidos para este trabajo. *Imagen tomada del Diario Oficial de la Federación 29/11/2012 http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5280548&fecha=29/11/2012*

I. Colecta del material

El material biológico se obtuvo de los arrecifes Ingenieros, Isla de Enmedio y Salmedina. La colecta se llevó a cabo del 16 al 18 de febrero del 2018, donde a partir de buceo autónomo fueron seleccionadas aquellos morfotipos que permitieran obtener una biomasa aproximada de un kilogramo en peso húmedo.

Una vez obtenido el material se enjuagó con agua de mar inmediatamente y se dividió en dos grupos. Uno fue colocado en bolsas de plástico y, después de etiquetar los datos correspondientes, fueron transportadas en una hielera para su congelación (Zubia *et al.*, 2007) para ser posteriormente procesadas en el laboratorio de Productos Naturales en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala, UNAM. El segundo grupo de las muestras algales estuvo conformado por dos a tres ejemplares completos, los cuales se preservaron con formol al 4% y agua marina, para su posterior identificación taxonómica (Littler & Littler, 2000) en la FESI. Después de esto los ejemplares fueron herborizados para conformar la colección biológica del herbario IZTA.

II. Identificación taxonómica

Con base en los caracteres diacríticos de cada especie fueron determinados con base en el criterio de morfoespecie los materiales seleccionados. Para ello fueron consultadas las obras de Littler & Littler, (2000) y Gurgel *et al.*, (2003).

III. Obtención de extractos

El material algal se limpió mecánicamente al inicio, después se sometió a sonicación (sonicador Ultrasonic processor de la marca Cole Parmer) para asegurar la limpieza de epibiontes; finalmente el material se secó a la sombra colocándolo sobre papel periódico y absorbente. Después fue pesado y se realizó la extracción por el método de maceración con los respectivos solventes (hexano y metanol). Una vez obtenidos los extractos, se procedió a determinar su rendimiento por diferencia de peso (Avila-Acevedo, 1996).

Actividad Antimicrobiana

Microorganismos utilizados para los bioensayos:

- Cepas Bacterianas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* caso clínico (cc), *S. epidermidis* FES-C, *Enterococcus faecalis* ATCC 14506.
- Cepas Bacterianas Gram negativas: *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* CUSI.

I. Evaluación Cualitativa de la Actividad Antibacteriana

Para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana se empleó el método de Kirby-Baüer (Apéndice I). En cada sensidisco se colocaron 2 mg de los extractos a evaluar. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloranfenicol y como control negativo sensidiscos con 10 µL de cada uno de los solventes empleados. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Koneman *et al.*, 1996). Los halos de inhibición obtenidos en aquellos extractos activos fueron medidos y reportados en milímetros. Se reporta el promedio del halo de inhibición en mm ± la desviación estándar de tres repeticiones por extracto evaluado.

II. Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antibacteriana

Los extractos y cepas que presentaron un resultado positivo en la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana, se emplearon para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por medio de la técnica de dilución en agar (Apéndice II), utilizando concentraciones de 0.25 a 4.0 mg/mL de cada extracto y un grupo testigo. Cada una con tres repeticiones (Koneman *et al.*, 1996).

III. Curvas de sobrevivencia

Las curvas de sobrevivencia se realizaron con las cepas bacterianas más sensibles en la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana (una Gram positiva y una Gram negativa), posteriormente se llevó a cabo el monitoreo del crecimiento de las poblaciones de cepas bacterianas en 9 tiempos durante 24 horas con tres repeticiones (Apéndice III), mismas que se expusieron a diferentes concentraciones de los extractos activos ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo (Kubo *et al.*, 1993, citado en Avila-Acevedo, 1996).

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Microorganismos usados:

- Hongos filamentosos: *Tricophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum*, *F. moniliforme*, *Aspergillus niger*.
- Hongos levaduriformes: *Candida albicans* 17MR, *C. glabrata* cc, *C. tropicalis* cc.

I. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica

Para cepas de hongos filamentosas se empleó el método de inhibición de crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se impregnaron sensidiscos con 2 mg de los extractos, como control negativo se utilizaron sensidiscos con 10 μ L de cada uno de los solventes empleados y como control positivo sensidiscos con 56 μ g de Ketoconazol. Cada bioensayo se realizó por triplicado y se observó la disminución del crecimiento del microorganismo evaluado (Apéndice IV). La evaluación para las cepas levaduriformes se llevó a cabo con el método de difusión de Kirby-Baüer mencionado anteriormente, utilizando como control positivo 30 μ g de nistatina y como control negativo 10 μ L de cada uno de los solventes empleados.

II. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica

Esta evaluación sólo se realizó en el cepa levaduriforme de *C. albicans* 17MR usando el mismo método de dilución en agar y las mismas condiciones que las utilizadas en las cepas bacterianas para determinar cuantitativamente su actividad. Las concentraciones de los extractos fueron de 0.25-4.0 mg/mL.

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS ACTIVOS

Los extractos se analizaron mediante las pruebas cualitativas descritas por Domínguez (1979), Santizo-Rodas, 2004; Carvajal-Rojas *et al.*, 2009; Coy-Barrera *et al.*, 2014, determinando la presencia/ausencia de los principales grupos de metabolitos secundarios (Apéndice VI) como los alcaloides (Dragendorf y Mayer), fenoles (Cloruro férrico), taninos (Cloruro férrico y gelatina), glicósidos (Molish), saponinas (prueba de espuma), triterpenos y derivados (Reactivo de Lieberman-Buchard).

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT)

El contenido de fenoles totales (CFT) se llevó a cabo según el método de Singleton *et al.* (1999). Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las siguientes concentraciones: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 y 0.12 mg/mL, y tres repeticiones de cada una. La concentración que se utilizó para el extracto fue de 0.5 mg/mL disuelto en metanol. La absorbancia, medida a una longitud de onda de 760 nm, del extracto evaluado se interpoló con la curva de calibración del ácido gálico y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/mg) (Apéndice VII).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para la evaluación de la actividad antioxidante se realizó con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Apéndice VIII). Se determinó la Capacidad Antioxidante Media (CA_{50}) utilizando las siguientes concentraciones para los extractos: 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 μ g/mL con tres repeticiones cada una. Como control positivo se utilizó quercetina a las mismas condiciones que los extractos, pero con las siguientes concentraciones: 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9, 10.5, 12, 13.5 y 15 μ g/mL. Como blanco se utilizaron pozos con 200 μ L de metanol (MeOH) grado HPLC y como control negativo se utilizaron pozos con quercetina sin adicionar DPPH (Okusa *et al.*, 2007).

ANÁLISIS DE DATOS

Se realizaron análisis estadísticos tipo ANOVA de un factor para los datos obtenidos en los resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica utilizando el programa de Excel 2013.

Los resultados para las pruebas de fenoles totales (CFT) y la actividad antioxidante se utilizaron análisis de regresión lineal utilizando también el programa Excel 2013 (Durán *et al.*, 2004).

RESULTADOS

Colecta e identificación taxonómica del material

En la tabla 1 se muestran las especies de algas determinadas para cada arrecife estudiado. Bajo el criterio de coleccionar aquellas especies con abundancia de biomasa de un kilogramo en peso húmedo; el arrecife Ingenieros fue el que presentó la mayor diversidad algal, con cinco especies, en él se obtuvieron algas de los tres fila (Fig. 2), mientras que en los arrecifes Isla de Enmedio y Salmedina solamente *Dictyota cervicornis*, perteneciente al filo Ochrophyta, presentó la abundancia requerida.

De acuerdo a las claves de Thiers, 2016, el material determinado fue montado y etiquetado para ser después depositado en el herbario IZTA con los números de referencia del 1896 al 1902.

Tabla 1. Especie de algas determinadas según el filo correspondiente en cada uno de los arrecifes estudiados, con el acrónimo del herbario donde se depositaron y el número de referencia.

	Ingenieros	Isla de Enmedio	Salmedina
Chlorophyta	<i>Ulva lactuca</i> (Fig. 2) IZTA=1897		
Ochrophyta	<i>Padina gymnospora</i> (Fig. 3) IZTA=1896	<i>Dictyota cervicornis</i> (Fig. 8) IZTA=1901	<i>Dictyota cervicornis</i> (Fig. 8) IZTA=1901
Rhodophyta	<i>Gracilariopsis carolinensis</i> (Fig. 5) IZTA=1900		
	<i>Hypnea musciformis</i> (Fig. 6) IZTA=1898		
	<i>Spyridia hypnoides</i> subsp. <i>complanata</i> (Fig. 7) IZTA=1899		

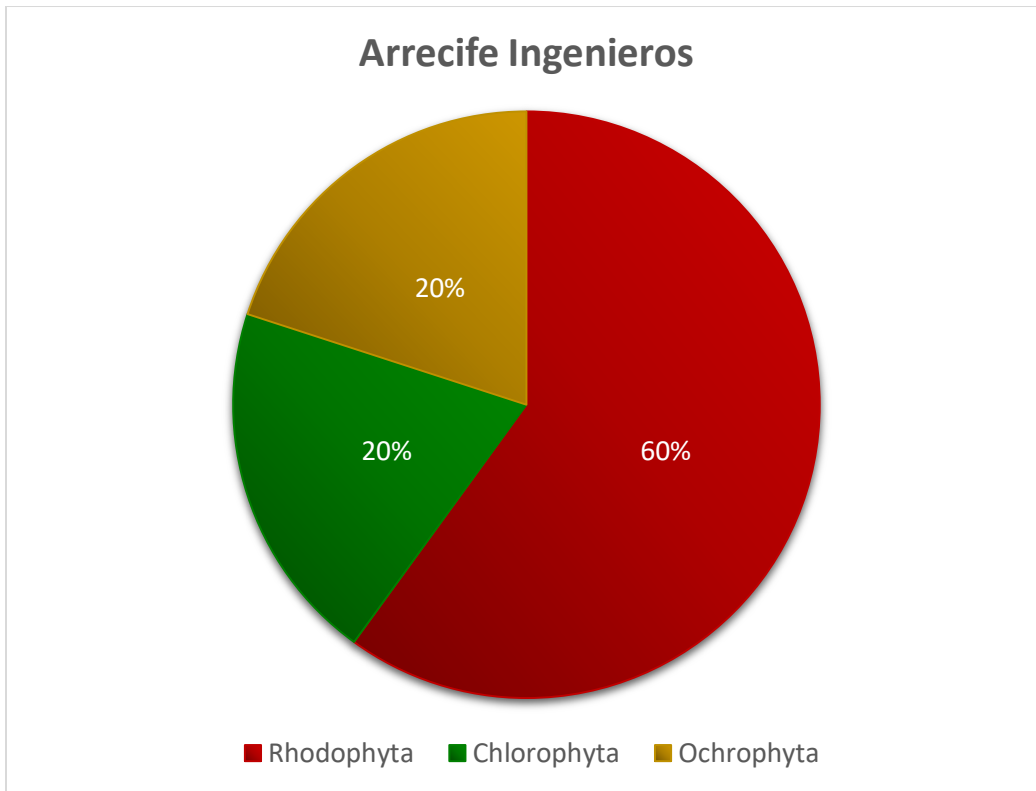


Fig. 2. Diversidad algal del arrecife Ingenieros expresada en porcentaje.

Se obtuvieron seis especies algales en total, de estas el mayor número de especies con la abundancia requerida se presentó en el arrecife Ingenieros donde se colectaron cinco especies diferentes; tres de estas pertenecen al filo Rhodophyta (60%), una al filo Chlorophyta (20%) y otra al filo Ochrophyta (20%) (Fig. 2).



Fig. 3. *Ulva lactuca* del Arrecife Ingenieros, Veracruz, IZTA = 1897.



Fig. 4. *Padina gymnospora* del Arrecife Ingenieros, Veracruz, IZTA = 1896.



Fig. 5. *Gracilariopsis carolinensis* del Arrecife Ingenieros, Veracruz, IZTA = 1900.



Fig. 6. *Hypnea musciformis* del Arrecife Ingenieros, Veracruz, IZTA= 1898.



Fig. 7. *Spyridia hypnoides* subsp. *complanata* del Arrecife Ingenieros, Veracruz, IZTA= 1899.

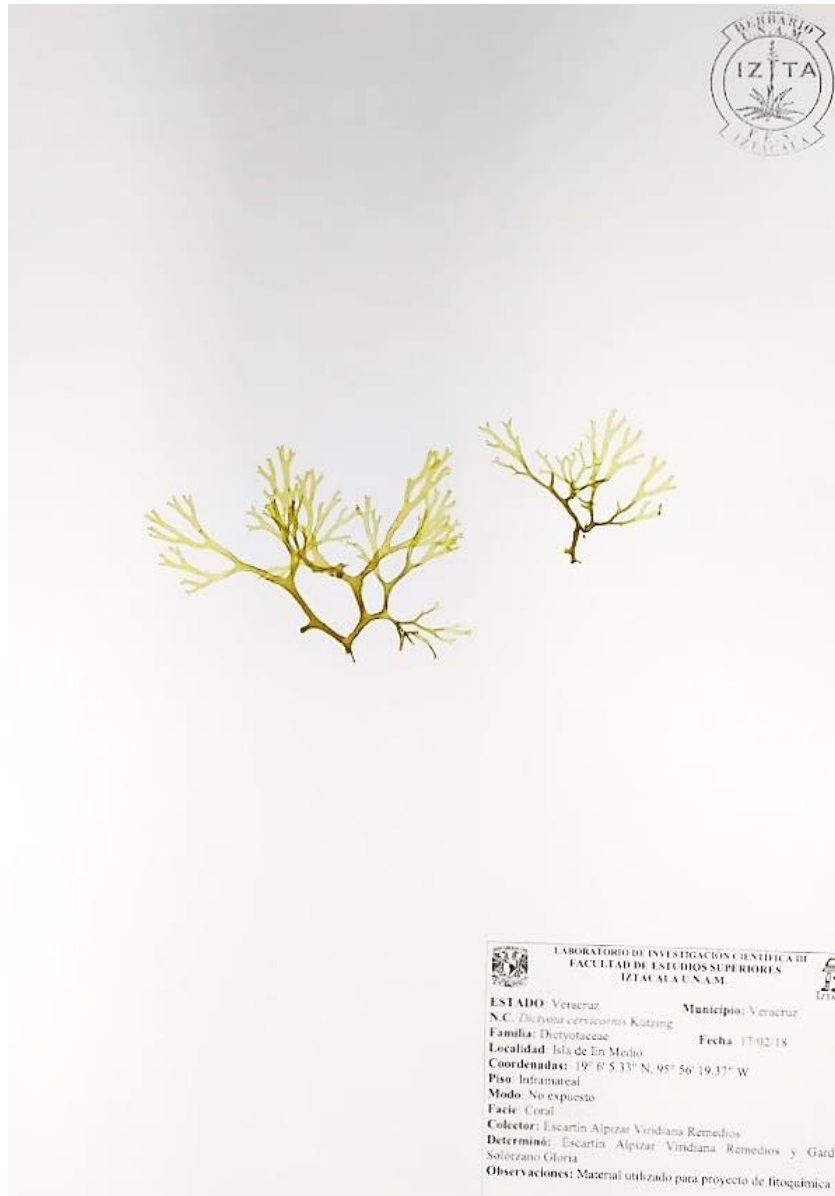


Fig. 8. *Dictyota cervicornis* del Arrecife Isla de Enmedio y Salmedina, Veracruz, IZTA= 1901.

Paralelamente a la identificación de las especies, se procedió a secar las muestras para comenzar la obtención de los extractos por maceración.

En la tabla 2 se observan los rendimientos de cada una de las especies. Se observa que *P. gymnospora* fue la especie algal con el mayor peso seco (151.88 g) y *S. hypnoides* subsp. *complanata* con el menor peso seco (8.72 g). Las especies del filo Rhodophyta mostraron los rendimientos más altos comparado con los otros extractos, seguido de los extractos metanólicos de las especies pertenecientes al filo Ochrophyta; sin embargo, los extractos hexánicos de las Rhodophyta fueron los más bajos comparado con los demás, indicando que la mayoría de los compuestos presentes son de naturaleza polar.

Tabla 2. Relación de peso seco y los rendimientos de cada extracto respecto a la especie.

Especie	Peso seco (g)	Rendimiento (g)		Porcentaje (%)	
		Hexánico	Metanólico	Hexánico	Metanólico
<i>Ulva lactuca</i> (I)	101.88	0.43	5.27	0.42	5.17
<i>Padina gymnospora</i> (I)	151.88	0.28	5.07	0.18	3.33
<i>Dictyota cervicornis</i> (IE)	27.39	0.69	0.92	2.51	3.35
<i>Dictyota cervicornis</i> (S)	42.25	2.05	2.05	4.85	4.85
<i>Gracilariopsis carolinensis</i> (I)	82.53	0.10	5.24	0.12	6.34
<i>Hypnea musciformis</i> (I)	59.73	0.05	3.33	0.08	5.57
<i>Spyridia hypnoides</i> subsp. <i>complanata</i> (I)	8.72	0.03	0.42	0.34	4.81

La simbología hace referencia a las especies algales colectadas en los respectivos arrecifes. I: Ingenieros; IE: Isla de Enmedio; S: Salmedina.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

I. Evaluación Cualitativa de la Actividad Antimicrobiana

La actividad antibacteriana cualitativa se presenta en la Fig. 9, se observa que sólo los extractos metanólicos de las especies *D. cervicornis* (S), *P. gymnospora* (I) y *D. cervicornis* (IE) fueron activos sobre las siguientes cepas bacterianas y una levaduriforme: *S. aureus* cc (7.00 ± 0.0 mm), *S. epidermidis* FES-C (6.0 ± 0.0 mm), *C. albicans* 17MR (6.0 ± 0.0 mm), *S. aureus* cc (5.66 ± 0.57 mm), *S. typhi* (6.0 ± 0.0 mm), *E. faecalis* ATCC 14506 (6.0 ± 0.0 mm), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (6.0 ± 0.0 mm) y *E. coli* CUSI (6.0 ± 0.0 mm). El control positivo tuvo actividad sobre todas las cepas probadas.

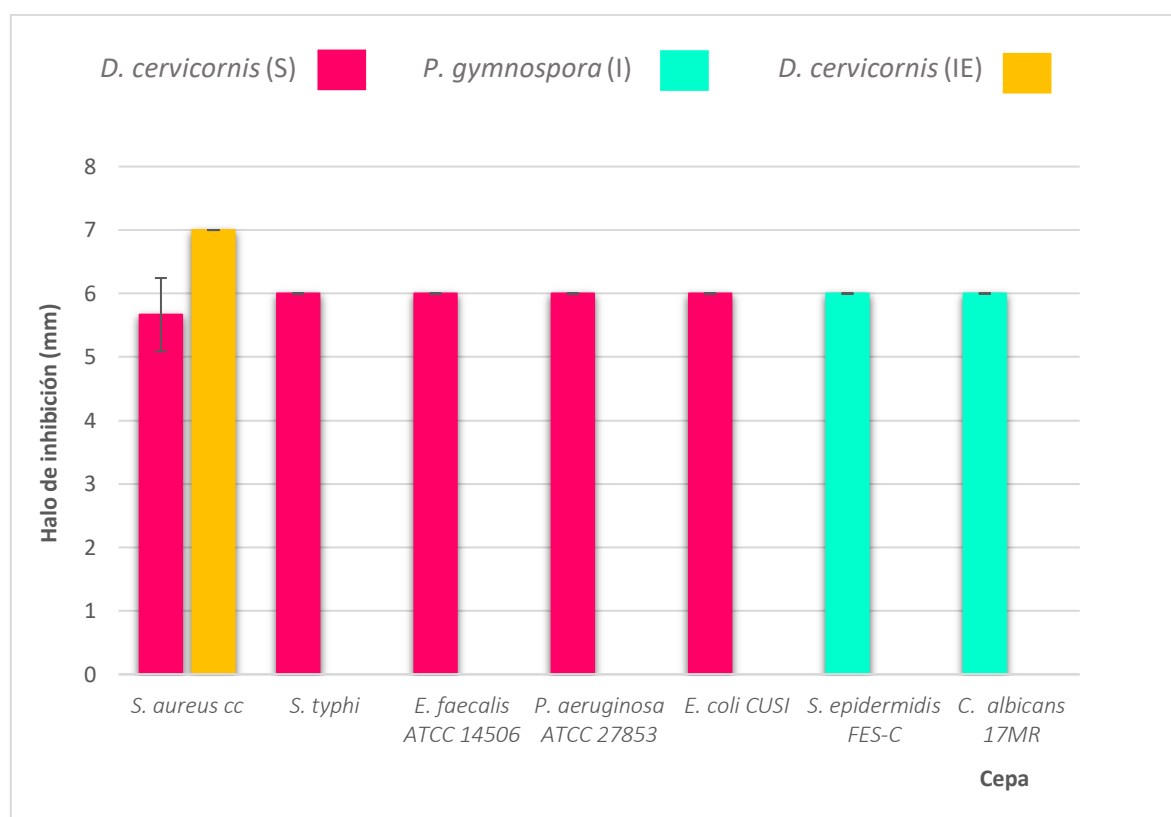


Fig. 9. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las algas *D. cervicornis* (S), *P. gymnospora* (I) y *D. cervicornis* (IE). Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

II. Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antibacteriana

Los resultados obtenidos para la determinación de la CMI y CBM de los extractos algales se muestran en la tabla 3. El extracto de *D. cervicornis* (S) contra la cepa de *S. aureus* cc fue el que tuvo una menor CMI y CBM con 0.5 mg/mL y 0.75 mg/mL, respectivamente. El extracto de *D. cervicornis* (IE) contra la misma cepa de *S. aureus* cc tuvo una CMI de 1 mg/mL y una CBM de 2 mg/mL. El resto de los extractos probados requiere de concentraciones mayores para inhibir el crecimiento bacteriano.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos metanólicos de *D. cervicornis* (S), *P. gymnospora* (I) y *D. cervicornis* (IE).

Especie	Cepa	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>D. cervicornis</i> (S)	<i>S. aureus</i> cc	0.5	0.75
<i>P. gymnospora</i> (I)	<i>S. epidermidis</i> FES-C	4.0	<4.0
<i>D. cervicornis</i> (IE)	<i>S. aureus</i> cc	1.0	2.0
<i>D. cervicornis</i> (IE)	<i>S. typhi</i>	4.0	<4.0
<i>D. cervicornis</i> (IE)	<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	4.0	<4.0
<i>D. cervicornis</i> (IE)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4.0	<4.0
<i>D. cervicornis</i> (IE)	<i>E. coli</i> CUSI	4.0	<4.0

III. Curvas de sobrevivencia

Posteriormente, se realizaron las curvas de crecimiento bacteriano para los extractos metanólicos activos de *D. cervicornis* de Salmedina (S) e Isla de En medio (IE) probando las mismas cepas que fueron sensibles a dichos extractos en la determinación de la CMI y CBM. Los resultados se muestran en las figuras siguientes:

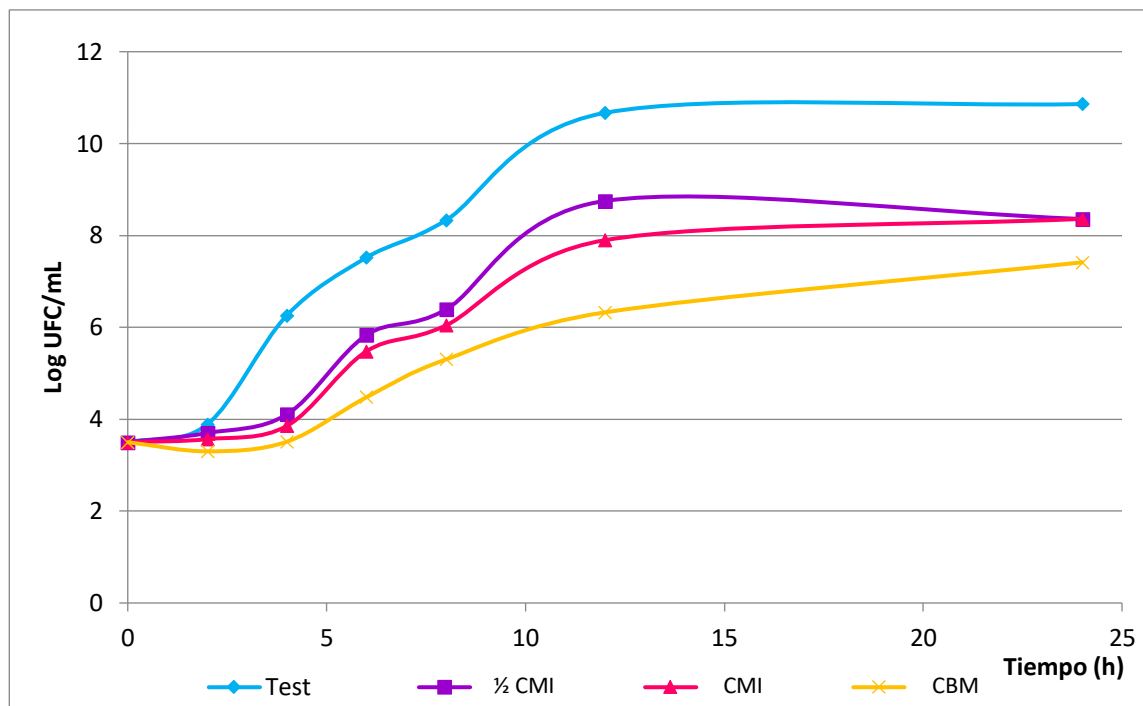


Fig. 10. Comportamiento de la población bacteriana bajo el efecto del extracto metanólico de *D. cervicornis* (Salmedina) sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* cc durante 24 horas. Testigo=Sin extracto; ½ CMI= 0.5; CMI= 1.0 y CBM= 2.0 mg/mL.

En la Figura 10 se observa el comportamiento de la población bacteriana de *S. aureus* cc con el extracto metanólico de *D. cervicornis* (S). La población del testigo después de las primeras dos horas (T1) fue de 3.88 Log UFC/mL, luego aumentó a 6.26 Log UFC/mL en el T2, finalmente en el T6 terminó con una población bacteriana de 10.85 Log UFC/mL. La CBM (2.0 mg/mL) tuvo un crecimiento en la población a 3.5 Log UFC/mL (T0). Pasadas dos horas (T1) la CBM tuvo una disminución en la población a 3.3 Log UFC/mL, luego de otras dos horas la población tuvo un aumento a 3.5 Log UFC/mL, pasadas ocho horas (T5) la CBM tuvo una población bacteriana de 5.3 Log UFC/mL. Finalmente, después de 24 horas (T6) tuvo una población bacteriana de 7.4 Log UFC/mL, cabe señalar que la población para la CBM siempre estuvo por debajo de las demás concentraciones probadas. La CMI (1.0 mg/mL) en el T1 tuvo una población de 3.56 Log UFC/mL, luego de dos horas (T2) fue de 3.85 Log UFC/mL y al terminar las 24 horas (T6) tuvo una población bacteriana de 8.35 Log UFC/mL. La ½ CMI (0.5 mg/mL) después de dos horas (T1) tuvo un crecimiento quedando en 3.69 Log UFC/mL, pasadas otras dos horas (T2) aumentó a 4.10 Log UFC/mL y finalizó con una disminución a 8.36 Log UFC/mL después de las 24 horas (T6). Estos resultados demuestran que el extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) tuvo un efecto retardante en el crecimiento de la población de la cepa *S. aureus* cc.

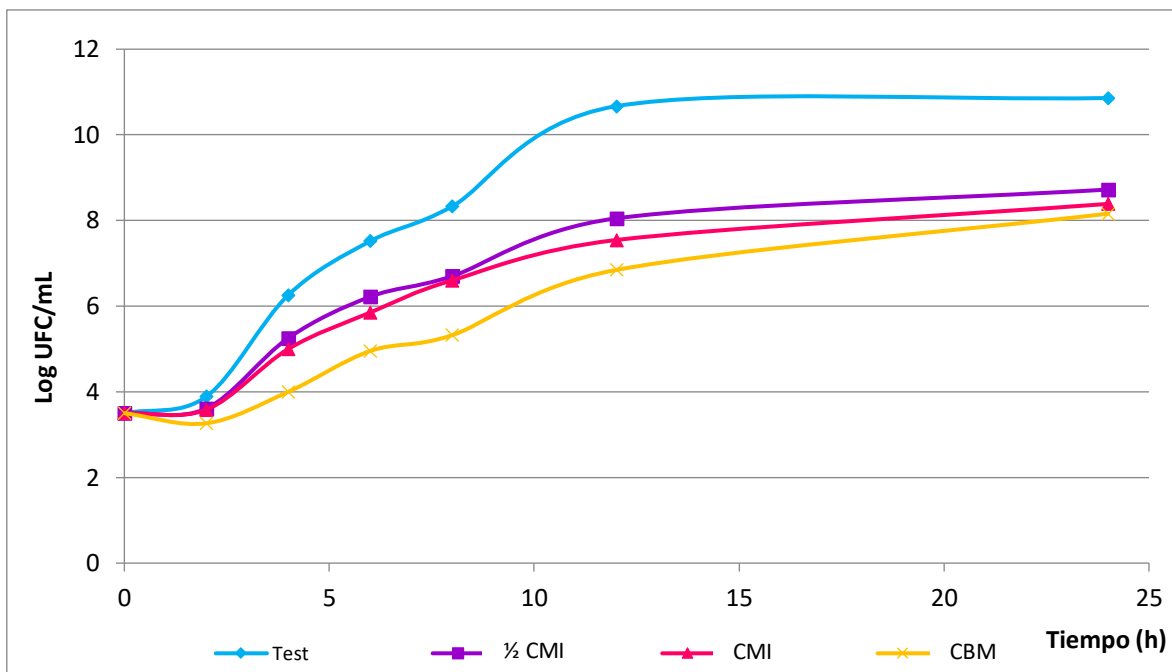


Fig. 11. Comportamiento de la población bacteriana bajo el efecto del extracto metanólico de *D. cervicornis* (Isla de Enmedio) sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* cc durante 24 horas. Testigo=Sin extracto; 1/2 CMI= 0.5; CMI= 1.0 y CBM= 2.0 mg/mL.

El comportamiento de la población bacteriana de *S. aureus* cc con el extracto metanólico de *D. cervicornis* (IE) se muestra en la figura 11. El grupo testigo inició con una población bacteriana de 3.5 Log UFC/mL y terminó (T5) con 10.85 Log UFC/mL. La CBM (2.0 mg/mL) mostró un crecimiento bacteriano siempre por debajo de las demás concentraciones (CMI= 1.0 mg/mL y 1/2 CMI= 0.5 mg/mL), iniciando con una población de 3.5 Log UFC/mL, dos horas después (T1) mostró un descenso en el crecimiento de la población (3.26 Log UFC/mL), sin embargo, después de otras dos horas (T2) el crecimiento de la población incrementó (4 Log UFC/mL) sin superar las otras concentraciones, pasadas las 24 horas (T5), la CBM quedó con una población de 8.15 Log UFC/mL. La población expuesta a la CMI creció más que en la CBM pero fue menor a la de la 1/2 CMI. La población bacteriana inició con 3.5 Log UFC/mL y dos horas después (T1) incrementó a 3.6 Log UFC/mL, pasadas otras dos horas (T2) la población aumentó a 5 Log UFC/mL, al término de las 24 horas (T5) la población expuesta a la CMI terminó con 8.38 Log UFC/mL. La población bacteriana expuesta a la 1/2CMI inició con una población de 3.5 Log UFC/mL, después de dos horas (T1) fue de 3.6 Log UFC/mL, pasadas otras dos horas (T2) aumentó a 5.25 Log UFC/mL y finalmente, después de 24 horas (T5), fue de 8.72 Log UFC/mL. La población expuesta a la 1/2CMI fue siempre mayor que a la CMI pero nunca sobrepasó al grupo testigo. El extracto metanólico de *D. cervicornis* (IE) también mostró un efecto retardante en el crecimiento de la población de la cepa *S. aureus* cc.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Durante la evaluación de la actividad antifúngica con las cepas de hongos filamentosos, ninguno de los extractos algales probados mostró actividad contra dichos organismos. En cuanto a los hongos levaduriformes sólo el extracto metanólico de *P. gymnospora* mostró actividad contra *C. albicans* (Fig. 9). En esta cepa se procedió a determinar su CMI y CBM, sin embargo se requieren concentraciones mayores a los 4.0 mg/mL para inhibir su crecimiento (Tabla 4).

Tabla 4. Determinación de CMI y CBM del extracto metanólico de *P. gymnospora* en *C. albicans*.

Especie	Cepa	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>Padina gymnospora</i>	<i>Candida albicans</i>	<4.0	<4.0

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS ACTIVOS

En la caracterización fitoquímica de los principales grupos de metabolitos secundarios (Tabla 5) se detectó la presencia de glucósidos, fenoles y triterpenos en los dos extractos metanólicos de *D. cervicornis*.

Tabla 5. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos metanólicos de *D. cervicornis* de los arrecifes Isla de Enmedio y Salmedina.

Extracto	Glucósidos	Fenoles	Alcaloides	Triterpenos y derivados	Saponinas
<i>Dictyota cervicornis</i> (IE)	O	O	X	O	X
<i>Dictyota cervicornis</i> (S)	O	O	X	O	X

Reacción positiva=O; Reacción negativa=X

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT)

Se obtuvo la curva patrón de ácido gálico (Fig. 12) para posteriormente poder determinar el contenido de fenoles totales en los extractos evaluados.

En algunos de los extractos metanólicos se detectó la presencia de fenoles (Tabla 6), como los de *P. gymnospora*, *D. cervicornis* (S) y *G. carolinensis*, sin embargo fueron cantidades por debajo de la concentración más baja de la curva patrón, indicando una baja cantidad de fenoles totales. De los extractos hexánicos analizados (Tabla 7), los dos tuvieron fenoles, sin embargo también fueron en bajas cantidades comparadas con los valores de la curva patrón.

Para poder disolver los extractos hexánicos, se utilizaron mezclas de solventes en el siguiente orden: hexano, acetona y metanol.

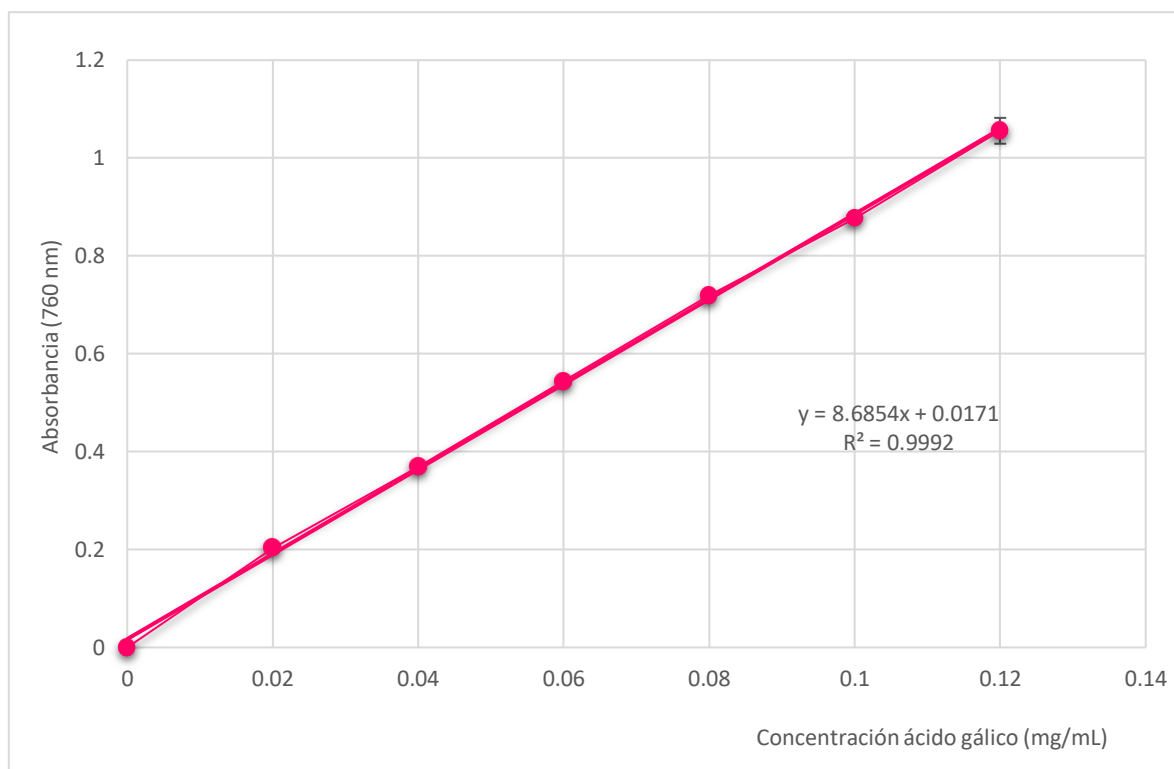


Figura 12. Curva patrón a diferentes concentraciones de ácido gálico para la determinación del contenido de fenoles totales. Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Tabla 6. Contenido de fenoles totales en los extractos metanólicos de algunas algas.

EXTRACTOS	mg EAG/g de extracto	% de fenoles totales
<i>P. gymnospora</i>	21.60	0.21
<i>D. cervicornis</i> (IE)	0	0
<i>D. cervicornis</i> (S)	7.21	0.07
<i>G. carolinensis</i>	8.02	0.08
<i>H. musciformis</i>	0	0
<i>U. lactuca</i>	0	0

Reportado en miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto y su porcentaje.

Tabla 7. Contenido de fenoles totales en los extractos hexánicos de algunas algas.

EXTRACTOS	mg EAG/g de extracto	% de fenoles totales
<i>D. cervicornis</i> (IE)	22.20	0.22
<i>D. cervicornis</i> (S)	14.12	0.14

Reportado en miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto y su porcentaje.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la actividad antioxidante solamente en aquellos extractos que mostraron una decoloración en la prueba preliminar (Fig. 13), en la cual se puso una muestra de cada extracto sobre una placa de sílica y se cubrió con la solución de DPPH, en ella se observó en aquellos extractos con actividad antioxidante frente a este radical una decoloración. Los extractos que mostraron una decoloración fueron a los que se les realizó la prueba cuantitativa de DPPH. Estos fueron los extractos metanólicos de *P. gymnospora*, *G. carolinensis* y *U. lactuca*; y el extracto hexánico de *D. cervicornis* (IE).

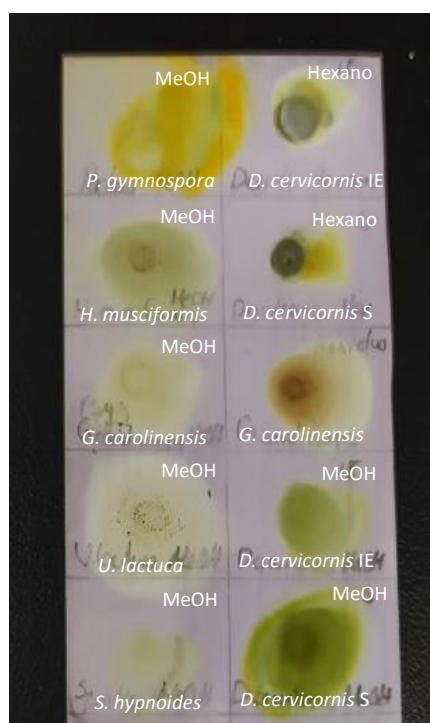


Fig. 13. Prueba en placa de sílica preliminar para determinar los extractos con actividad antioxidante frente al radical DPPH.

En la siguiente tabla se muestra la capacidad antioxidante media (CA_{50}) de cada extracto probado (Tabla 8), así como el control positivo quercetina, con el radical DPPH a diferentes concentraciones. En general ningún extracto mostró una actividad antioxidante destacable en comparación con el control positivo, la mayoría rebasa por mucho la CA_{50} del control positivo (CA_{50} quercetina=3.89 $\mu\text{g/mL}$) indicando una baja actividad antioxidante.

Tabla 8. Concentración antioxidante media (CA₅₀) de la quercetina y de los extractos algales metanólicos analizados frente al radical DPPH, expresada en µg/mL.

Extracto	CA ₅₀ (µg/mL)
Quercetina	3.89
<i>P. gymnospora</i>	148.88
<i>G. carolinensis</i>	1715.31

FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Se realizó una columna sephadex G-50 con el extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) obteniendo 25 alícuotas de 10 mL cada una (Fig. 14), usando como fase móvil los solventes: agua: agua-metanol: metanol. De las 25 alícuotas se juntaron en 12 fracciones por el patrón que mostraron en la cromatografía en placa (ccf) (Figs. 15, 16).

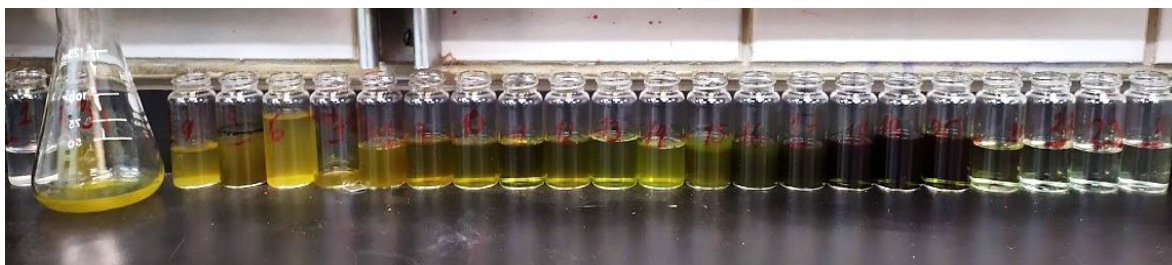


Fig. 14. Alícuotas obtenidas de la columna sephadex G-50 realizada al extracto metanólico de *D. cervicornis* (S).



Fig. 15. Cromatografía en placa del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) vista en luz ultravioleta a una $\lambda=366$ nm.

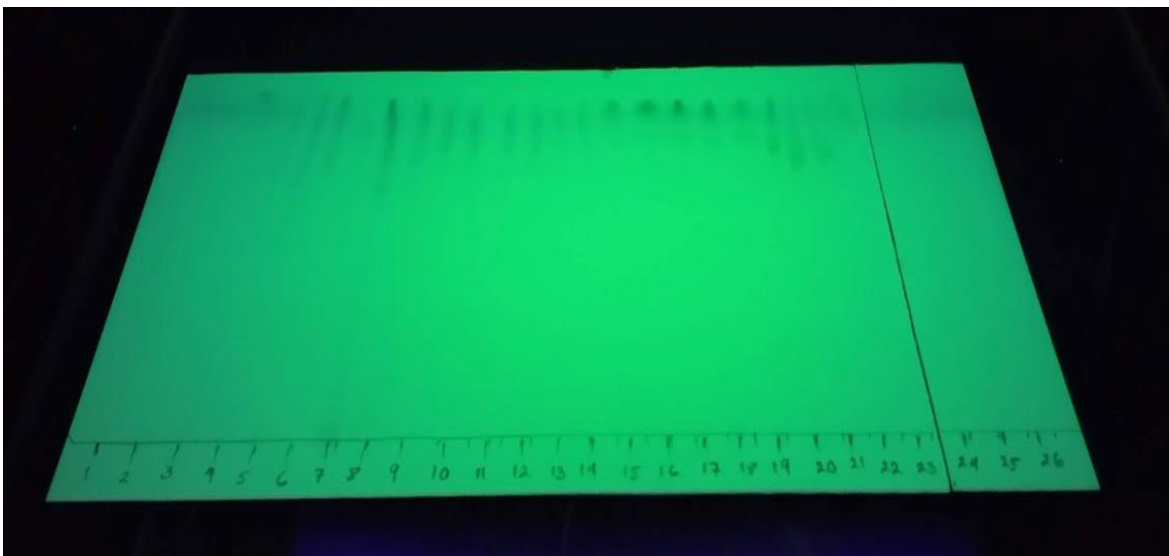


Fig. 16. Cromatografía en placa del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) vista en luz ultravioleta a una $\lambda=254$ nm.

Posteriormente, se probaron esas fracciones con *S. aureus* utilizando la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana (Apéndice 1). En la figura 17 se observa que sólo tres fracciones de las 12 probadas mostraron un halo de inhibición contra la cepa, estas fueron la número 7, 9 y 14. Los halos fueron de 7 mm para la fracción 9 y de 6 mm para la fracción 7 y 14.

Estas fracciones fueron sometidas a un análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia fase reversa acoplada a un detector de arreglo de diodos (RP-HPLC-DAD) para determinar qué tipo de polifenoles son los que contienen esas fracciones.

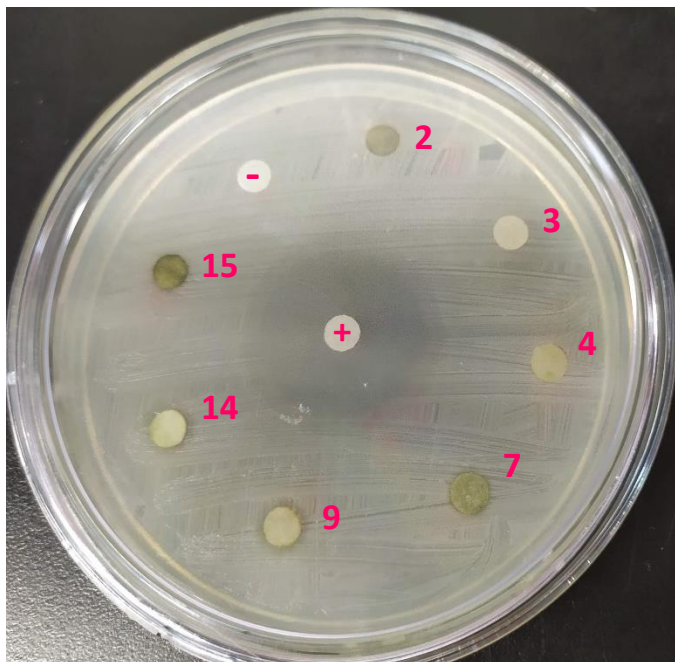


Fig. 17 Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) en *S. aureus* cc obtenidas por la cromatografía en columna sephadex G-50.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA FASE REVERSA CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS (RP-HPLC-DAD)

En la tabla 9 se tienen los datos del HPLC de la fracción número 7 del extracto, se detectaron en total 13 compuestos, a diferencia de los de la fracción número 9 (Tabla 10) en donde se tuvo un total de 14 compuestos. La fracción número 14 mostró 12 compuestos (Tabla 11).

Tabla 9. Datos de HPLC-DAD ($\lambda = 254$ nm) de la fracción número 7 del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S).

TR (min)	λ max	Área (mAU)
2.16	280 ^{fp}	36.6
2.49	276 ^{fp}	90
3.05	222, 280 ^{fp}	62.2
3.35	220, 276 ^{fp}	63.1
3.56	214, 280 ^{fp}	78
4.19	216 ^{fp}	51.5
4.7	232 ^{fp}	39
5.17	238 ^{fp}	31.1
5.45	234 ^{fp}	29.4
5.95	236 ^{fp}	22.5
8.43	244 ^{fp}	25.9
9.16	238 ^{fp}	21.2
10.17	240 ^{fp}	34.3
TOTAL ^{fp} :		584.8

TR: tiempo de retención; λ max: absorbancia máxima; mAU: miliunidades de absorbancia;
fp: fenilpropanoide

Tabla 10. Datos de HPLC-DAD ($\lambda = 254 \text{ nm}$) de la fracción número 9 del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S).

TR (min)	$\lambda \text{ max}$	Área (mAU)
2.35	280 ^{fp}	17.2
2.81	212, 274 ^{fp}	50.5
3.00	212, 274 ^{fp}	44.6
3.19	228, 280 ^{fp}	52.0
3.45	272 ^{fp}	72.2
4.45	216, 280 ^{fp}	72.8
4.85	226, 284 ^{fp}	67.5
5.32	234 ^{fp}	52.5
5.56	240 ^{fp}	50.0
6.11	234 ^{fp}	35.6
7.44	220 ^{fp}	21.3
8.31	224 ^{fp}	28.8
10.41	226 ^{fp}	19.2
14.05	224 ^{fp}	6.8
TOTAL ^{fp} :		591

TR: tiempo de retención; $\lambda \text{ max}$: absorbancia máxima; mAU: miliunidades de absorbancia;
fp: fenilpropanoide

Tabla 11. Datos de HPLC-DAD ($\lambda = 254$ nm) de la fracción número 14 del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S).

TR (min)	λ max	Área (mAU)
2.78	210, 278 ^{fp}	38.4
2.95	218, 266 ^{fp}	54.1
3.23	276 ^{fp}	59.1
3.58	214 ^{fp}	110
4.38	286 ^{fp}	120
4.74	224 ^{fp}	102
5.03	220 ^{fp}	92.4
5.26	218 ^{fp}	82.9
5.56	218 ^{fp}	72.9
10.33	226 ^{fp}	46.6
12.17	234 ^{fp}	44.1
13.44	204, 238, 330 ^{fv}	14.3
TOTAL ^{fp} :		822.5
TOTAL ^{fv} :		14.3

TR: tiempo de retención; λ max: absorbancia máxima; mAU: miliunidades de absorbancia; fp: fenilpropanoide; fv: flavonoide

DISCUSIÓN

Determinación taxonómica

En la determinación del material colectado de cada arrecife se observa una diferencia en diversidad. Sólo en el arrecife Ingenieros se encontraron algas de las tres filas, mientras que en los arrecifes de Salmedina e Isla de Enmedio se presentó una especie del filo Ochrophyta. Esto no coincide con lo reportado con Avila-Romero en el 2016 donde registró 23 especies de las tres fila colectadas en seis arrecifes diferentes del SAV. Avila-Romero (2016) obtuvo una mayor cantidad de especies pertenecientes al filo Rhodophyta (12 spp.), seguido del filo Chlorophyta (7 spp.) y para el filo Ochrophyta obtuvo solamente cuatro especies; a diferencia de las muestras obtenidas en este trabajo que se colectaron tres especies de algas del filo Ochrophyta, tres especies del filo Rhodophyta y una especie del filo Chlorophyta.

Las algas requieren de nutrientes para su crecimiento, estos se dividen en dos grupos: macronutrientes, aquellos que se encuentran en concentraciones mayores a los 0.02 mmol/kg; y micronutrientes, aquellos que se requieren en concentraciones de 0.5×10^{-6} mmol/kg. Dentro de los macronutrientes, requieren carbono, hidrógeno, magnesio, azufre, calcio, potasio, nitrógeno y fósforo (Edding *et al.*, 2006). Muchos de esos macronutrientes están presentes en las plantas de tratamiento de aguas residuales, escorrentía urbana y en los fertilizantes utilizados para la agricultura, siendo diversas las fuentes que vierten estos nutrientes a los cuerpos de agua produciendo una eutrofización (Vollenweider *et al.*, 1996); facilitando la proliferación de organismos como las algas y deteriorando la calidad del agua. Generalmente ocurre en cuerpos de agua estancados, pero no es exclusivo, pues también se presenta en aguas corrientes (Houbron, 2010; Rawat *et al.*, 2011).

El río Jamapa se ubica entre los 18° 45' y 19° 14' N y 96° 14' y 97° 17' W. El agua de este río fluye por varias zonas de cultivos (CONAGUA, 2014) y su desembocadura da hacia el Golfo de México dividiendo al SAV en dos zonas, zona norte y zona sur (CONABIO, 2007). Además, en Veracruz el tratamiento de aguas residuales no es del todo eficiente, se ha reportado que sólo 57 de los 212 municipios del estado cuentan con este servicio. Para realizarlo, las aguas son sometidas a tratamientos físicos, químicos y/o biológicos para reducir la carga contaminante de las mismas antes de ser vertidas al mar, su último paradero (INEGI, 2017).

Tanto el contacto de las aguas del río Jamapa con zonas de cultivos, así como la poca eficiencia en el tratamiento de aguas residuales del estado de Veracruz, podrían ser factores que expliquen los cambios hidrológicos y dinámica del crecimiento de las comunidades bénticas algales del área de estudio.

En el arrecife Ingenieros se registraron cinco especies, bajo el criterio de coleccionar poblaciones con más de un kilogramo (kg) de biomasa, comparada con los otros dos arrecifes, Salmedina e Isla de Enmedio, en los que sólo creció una especie (tabla 1). Este resultado, podría explicarse al señalar que es Ingenieros el arrecife más cercano a la desembocadura del río Jamapa y a su vez el que recibe más impacto turístico por los desarrollos hoteleros del área.

Los resultados expuestos en este trabajo difieren con los obtenidos en los de Avila-Romero del 2016. En su trabajo obtuvieron siete especies diferentes pertenecientes al filo Chlorophyta, 12 para el filo Rhodophyta y cuatro para el filo Ochrophyta; teniendo un total de 23 especies de macroalgas. Sus resultados muestran una mayor diversidad algal, comparado con los resultados en este trabajo, en el cual se tuvo un total de seis especies de macroalgas, observándose una diferencia de diversidad y abundancia.

Cabe señalar que los puntos de muestreos en el trabajo de Avila-Romero del 2016 fueron seis arrecifes diferentes (Isla Verde, Blanquilla, Gallega, Giote, Santiaguillo, e Isla de Enmedio) a los seleccionados en este trabajo.

La única especie algal que se registró en ambos trabajos fue *Ulva lactuca*. Para el presente trabajo se obtuvo en el Arrecife Ingenieros, mientras que Avila-Romero (2016) la obtuvo en el Arrecife Gallega, ambos arrecifes localizados en la zona norte del SAV (Fig. 19). Esta información respalda lo indicado por Garduño-Solórzano *et al.* (2005) donde indican que el género *Ulva* es un taxon ubicuo el cual crece en diferentes sustratos inorgánicos y orgánicos; el cual presenta una distribución continua a lo largo de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe; información previamente indicada por Lüning (1990) para zonas tropicales.

También, la diferencia entre los dos trabajos acerca de la diversidad algal encontrada puede deberse a los accidentes de derrames petroleros que han ocurrido dentro del mismo SAV, así como en zonas aledañas a este. Uno de ellos es el reportado en septiembre del 2016 por la embarcación Burgos, propiedad de Petróleos Mexicanos (PEMEX), la cual transportaba alrededor de 100 mil barriles de combustibles, esto en las costas de Boca del Río, Veracruz (Aguirre, 2016). Otro incidente fue el ocurrido el 14 agosto del 2017, en el cual el encallamiento del buque "Antares" dañó más de 4 mil metros cuadrados del arrecife Tuxpan en Veracruz. La evaluación de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) determinó que existieron daños relevantes en el arrecife del accidente por el buque (Méndez, 2017). Además, un derrame petrolero ocurrió el 30 de abril del 2015 entre las comunidades Rafael Curti y Emiliano Zapata, en el municipio de Papantla, Veracruz; este derrame contaminó el arroyo "Los Tejones". Reportaron que durante tres meses se realizó la limpieza de la zona, sin embargo, aún después de 22 meses del accidente, el hidrocarburo seguía contaminando el afluente y la limpieza cesó a los tres meses del reporte del accidente (Escamilla, 2017). También mencionan en la nota que el agua del arroyo tiene descargas de aguas congénitas, las cuales son

aguas saladas que están asociadas a las rocas de yacimientos de hidrocarburos (UNESCO-WHO, 1998). Estas aguas llevan sales inorgánicas e hidrocarburos en concentraciones elevadas, tratar este desecho es difícil por el riesgo de contaminar los cuerpos receptores, además por tener compuestos tóxicos (Mijaylova *et al.*, 2005).

Muchas actividades de la industria, como la refinación de petróleo y la agricultura, producen desechos con metales pesados que son vertidos en ríos o directo al mar (Páez-Osuna, 2005). Como ya se mencionó antes, el SAV es dividido por el río Jamapa en dos zonas, norte y sur (CONABIO, 2007), este río vierte sus aguas en el mar del Golfo de México y a la vez pasa por varias zonas de cultivo (CONAGUA, 2014).

El petróleo crudo es una mezcla de compuestos difíciles de determinar pero se ha descrito que se constituye en un 83-86% de carbono, de 10-14% de hidrógeno, de 0.05-6.0% de azufre, de 0.001-0.1% de nitrógeno y entre 0.001-0.1% de metales pesados como níquel, vanadio, sodio, calcio, cobre, entre otros (Feijoo-Ruíz, 2012).

Se han realizado estudios para determinar los efectos negativos que pueden causar los accidentes de petróleo en el medio acuático afectando directamente el desarrollo de especies algales como el de Vera *et al.* (2009) donde evaluaron los efectos ecotóxicos de los hidrocarburos de petróleo (petróleo crudo, diésel 2 y queroseno) sobre el crecimiento poblacional de la diatomea *Chaetoceros gracilis*. Ellos encontraron que la población de esta microalga, a las 24 h de exposición, disminuye en un 67, 70 y 92% con unas concentraciones de 1225, 1750 y 2500 mg/L respectivamente de petróleo crudo, aunque observaron una recuperación en la población hasta el tercer día de exposición, a pesar de eso, la tasa de división de esta población fue afectada en más del 50% respecto al control positivo. Con el diésel 2, las concentraciones mayores a 196, 280 y 400 mg/L inhibieron el crecimiento poblacional a las 24 h de la diatomea en un 97, 100 y 100 % respectivamente sin recuperación celular. Finalmente, la población expuesta durante 24 h a concentraciones de queroseno de 640 y 320 mg/L produjo una inhibición en el crecimiento poblacional del 96 y 83% respectivamente pero hasta el tercer y cuarto día de exposición.

Vera *et al.* (2009) también analizaron la tasa intrínseca de crecimiento poblacional, teniendo un valor para el control entre 1.47-1.56 por día mientras que para las células expuestas al petróleo crudo fue de 0.75-1.19 por día, para aquellas expuestas a diésel 2 estuvo entre 0.62-1.48 por día y para las expuestas a queroseno estuvo entre 0.29-1.44 por día. Reportaron la tasa de división por día (div/d) en cada grupo, para el control fue entre 2.12- 2.26 div/d, para la población expuesta al petróleo crudo fue de 1.08-1.71 div/d, las expuestas a diésel 2 fue alrededor de 0.89-2.14 div/d y las expuestas a queroseno estuvieron entre 0.42-2.08 div/d.

Ellos determinan que el hidrocarburo más contaminante de los evaluados fue el diésel 2 pues tiene una porción mayor de fracciones volátiles que lo hace más peligroso debido a que algunos componentes producen efectos narcóticos en los animales marinos (Crisp *et al.*, 1967).

La sumatoria de las descargas de nutrientes, actividades turísticas y los derrames de petróleo en el SAV podría señalar los cambios observados en las comunidades bénticas fotosintéticas, como son las macroalgas. Aunque no ocurrieron en zonas cercanas a este sistema arrecifal, la corriente marina de esa zona (Fig. 18). Va en sentido de las manecillas del reloj, (de norte a sur) lo que provoca que los residuos contaminantes de los mismos lleguen a los arrecifes más rápido, por lo tanto se les puede atribuir a los accidentes, ocurridos con mayor frecuencia en la zona norte del estado de Veracruz, esta baja diversidad y abundancia de algas en el muestreo realizado para este trabajo.

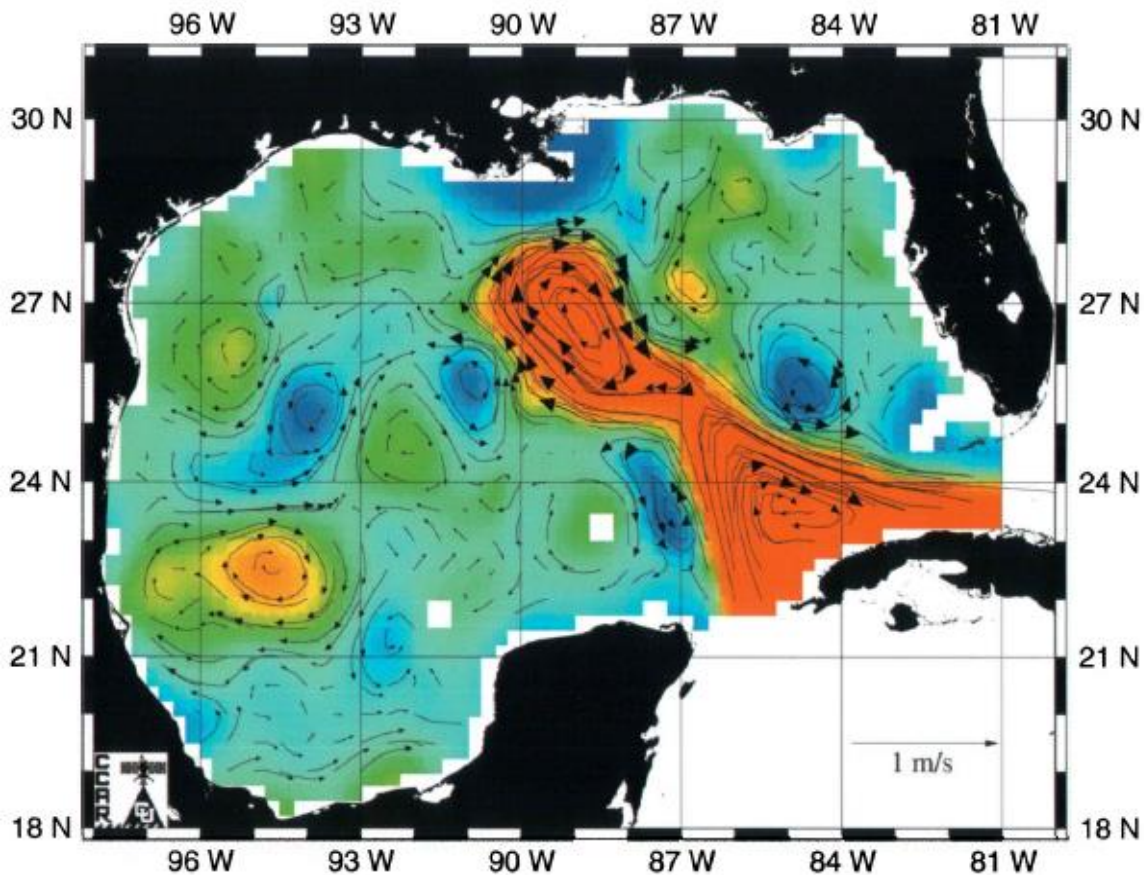


Fig. 18. Corrientes superficiales del Golfo de México señaladas con las flechas. Imagen modificada de Sturges *et al.* (2005) "Introduction to circulation in the Gulf of Mexico".

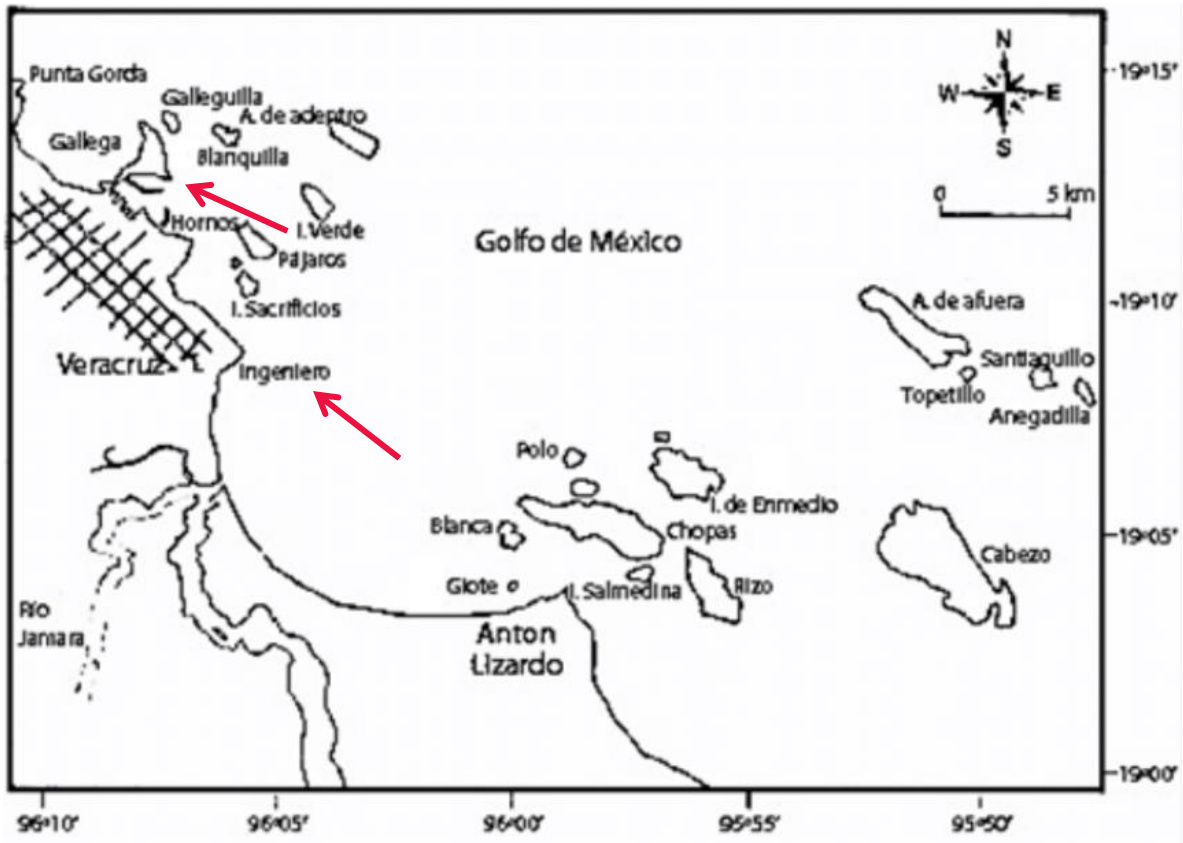


Fig. 19. Sistema Arrecifal Veracruzano con los nombres de sus respectivos arrecifes. Se señala el arrecife Gallega y el arrecife Ingenieros. Imagen tomada de Avila-Romero, 2016.

La evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana (Fig. 9) muestra que las tres especies de algas pardas tuvieron actividad contra cepas bacterianas y una levadura. Estas especies fueron *D. cervicornis* (IE) tuvo actividad contra cinco cepas, dos Gram positivas (*E. faecalis* ATCC 14506 y *S. aureus* cc) y tres Gram negativas (*S. typhi*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* CUSI); seguida de *P. gymnospora* con dos cepas, una Gram positiva (*S. epidermidis* FES-C) y una cepa levaduriforme (*C. albicans* 17 MR). Finalmente *D. cervicornis* (S) tuvo actividad solo contra una cepa Gram positiva (*S. aureus* cc).

La actividad de *D. cervicornis* coincide con los resultados publicados por Chiheb *et al.* (2009) donde probaron los extractos metanólicos en crudo de 32 especies algales, entre ellas *D. linearis* de las costas de Marruecos; siendo activa contra las mismas cepas, *E. coli* y *S. aureus*. Así mismo, Salvador *et al.* (2007) probaron extractos sólidos de 82 especies de macroalgas de las costas Ibéricas, donde concluyen que la mayor actividad antimicrobiana está en las especies del filo Phaeophyta con un 84% de especies activas contra las cepas de *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*; también la levadura *C. albicans*. Esto coincide con los resultados mostrados en este estudio ya que de los tres fila de macroalgas que se probaron (Rhodophyta, Ochrophyta y Chlorophyta) solamente fueron activas dos especies pertenecientes al filo Phaeophyta: *D. cervicornis* y *P. gymnospora*. Además, en el estudio destacan como las especies más activas a las del género *Dictyota*.

Otro trabajo que cabe mencionar es el de Abdu-llah *et al.* (2013) donde probaron los extractos de éter de petróleo, clorofórmicos, etanólicos y acuosos de cinco especies de macroalgas, entre ellas *Dictyota ciliolata*. Sus resultados muestran que los extractos clorofórmicos y etanólicos de *D. ciliolata* son activos contra las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo ya que *D. cervicornis* también mostró actividad contra esas cepas bacterianas.

En la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana (tabla 3), los extractos metanólicos activos de las tres especies de algas fueron probados (*P. gymnospora* y *D. cervicornis* de Isla de Enmedio y Salmedina). Para *P. gymnospora* no se pudo determinar la CMI ni CBM ya que se requieren concentraciones mayores a los 4 mg/mL (tabla 4). Shimaa *et al.* (2016) probaron extractos de diferentes polaridades de cuatro especies de macroalgas, entre ellas *P. pavonica* del mar Rojo; donde reportan que el extracto metanólico de esta especie sólo logró inhibir la cepa de *S. aureus* con una CMI de 50 mg/mL. Esto no coincide con los resultados obtenidos y podría deberse a que las concentraciones usadas en la prueba del presente trabajo fueron más bajas comparadas a los de Shimaa *et al.* (2016).

El extracto metanólico de *D. cervicornis* de Salmedina tuvo una CMI para *S. aureus* cc de 0.5 mg/mL y una CBM de 0.75 mg/mL; el extracto metanólico de la misma especie algal pero de Isla de Enmedio tuvo una CMI para la misma cepa bacteriana de 1.0 mg/mL y una CBM de 2 mg/mL (tabla 3). En ambos extractos, *S. aureus* cc fue la única cepa en la que se pudo determinar la CIM y CBM de *D. cervicornis*, las demás cepas evaluadas requieren de concentraciones mayores a los 4 mg/mL.

Stirk *et al.* (2007) probaron el extracto metanólico de siete especies de macroalgas colectadas en diferentes épocas del año en la costa este de Sudáfrica, Rocky Bay; entre las especies colectadas esta *Dictyota humifusa*. Los extractos los probaron contra tres cepas bacterianas (*Bacillus subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*). Concluyen que el extracto de *D. humifusa* fue el de mejor actividad antibacteriana al inhibir todas las cepas en todas las épocas muestreadas. Para la cepa de *S. aureus*, el extracto de *D. humifusa* tuvo una CMI de 6.25 mg/mL (para enero de 2004) y 3.12 mg/mL (para marzo de 2004), se consideran esas fechas ya que son las más cercanas a la fecha de muestreo (febrero 2018). Stirk *et al.* reportan al extracto metanólico de *D. humifusa* como el más activo, al igual que el extracto metanólico de *D. cervicornis*, coincidiendo con los resultados obtenidos en esta evaluación.

El que los extractos metanólicos de *D. cervicornis* de ambos arrecifes hayan sido activos sobre cepas Gram positivas (*S. aureus* cc) puede deberse a la estructura de la pared celular de estos microorganismos. Las bacterias Gram positivas tienen una pared celular de peptidoglicano gruesa, en el interior está la membrana celular; mientras que las Gram negativas poseen una membrana citoplasmática seguida de una pared celular, también de peptidoglicano, y después una membrana extracelular, confiriéndoles una mayor resistencia al paso de compuestos antimicrobianos (Macarulla y Goñi, 1994). Esta diferencia pudo favorecer la difusión del extracto y sus compuestos responsables de la actividad antibacteriana para lograr inhibir o disminuir el crecimiento de *S. aureus* cc (Gram positiva) comparada con las cepas Gram negativas evaluadas pues en ellas se requieren concentraciones del extracto más altas.

Actividad antifúngica

Ningún extracto probado en el presente trabajo mostró actividad antifúngica, excepto el extracto metanólico de *P. gymnospora*, el cual en la evaluación cualitativa demostró tener actividad contra *C. albicans* 17MR (Fig. 9). En la prueba cuantitativa se observó que se requieren concentraciones mayores a los 4 mg/mL de extracto para determinar su CMI y CBM (tabla 4), por esto se determinó que los extractos no tienen actividad antifúngica en las concentraciones evaluadas.

El resultado de la actividad antifúngica obtenido en este trabajo no coincide con lo reportado por Saidani *et al.* (2012) donde obtuvieron extractos metanólicos de cuatro especies de macroalgas de las costas de Argelia de los tres grupos (*Cystoseira tamarisciflora*, *Padina pavonica*, *Rhodomela confervoides* y *Ulva lactuca*). Entre los extractos que tuvieron actividad antifúngica estuvo el de *P. pavonica* contra *C. albicans* con un diámetro de inhibición de 26 mm, mientras que el extracto de *U. lactuca* tuvo un diámetro de inhibición menor, de 14.33 mm contra *C. albicans*.

Tuney *et al.* (2006), trabajaron extractos de etanol, éter dietílico, acetona y metanol, de 11 especies algales, entre ellas *Padina pavonica*, *Dictyota linearis* y *Gracilaria gracilis*; de Urla, Turquía. Reportaron a los extractos etanólicos de *P. pavonica* y *D. linearis*, además de los cuatro extractos obtenidos de *G. gracilis*, fueron activos contra *C. albicans*.

Las diferencias entre los estudios antes mencionados y los resultados obtenidos en este pueden atribuirse a las condiciones en las que se colectaron las especies en todos estos trabajos así como la localidad en las que se obtuvieron las algas. La producción de metabolitos secundarios varía, incluso, entre individuos de la misma especie según la zona, condiciones ambientales donde se encuentren e incluso la incidencia de herbívoros y patógenos (Rhodes, 1994; Cariveau *et al.*, 2004). Los metabolitos secundarios pueden sufrir cambios en su concentración, presencia o ausencia con base a las condiciones meteorológicas (Kobayashi, 2004). Por esto podría ser la razón por la que hay diferencias entre los resultados de las pruebas de la actividad antifúngica a pesar de ser especies del mismo género.

Para poder explicar el por qué los extractos evaluados de las especies algales del presente trabajo no tuvieron actividad contra las cepas de hongos probadas, se va a detallar las características necesarias para los antifúngicos. Muchos de estos no se han reportado en extractos de algas, por lo tanto es una posible causa a los resultados obtenidos en este trabajo.

Los antifúngicos azoles son fármacos fungistáticos sintéticos, su característica principal es el tener un anillo imidazólico unido por un enlace carbono-nitrógeno a más anillos aromáticos. Con base al número de anillos imidazólicos que tenga en compuesto se dividen estos fármacos en dos: imidazoles (poseen dos átomos de nitrógeno en la posición 3 del anillo azol. e. j. miconazol, ketoconazol, etc) y triazoles

(poseen tres átomos de nitrógeno en el anillo azol. e. j. fluconazol, voriconazol, etc). El mecanismo de acción de estos fármacos es impidiendo la conversión de lanosterol a ergosterol, afectando directamente la permeabilidad de la membrana fúngica, o bien, favorecen la acumulación de peróxido de hidrógeno que daña los organelos internos de la célula fúngica. Para tener un efecto positivo se requieren concentraciones altas, o bien, mantener el tratamiento durante un tiempo prolongado (Catalán y Montejo, 2006; Rivas y Cardona-Castro, 2009).

En el tratamiento de enfermedades causadas por hongos se utilizan fármacos con estructuras complejas, estos poseen anillos nitrogenados (imidazoles y triazoles), tienen cadenas muy largas de carbono las cuales son capaces de interactuar con el ergosterol (anfotericina B) o tienen ambas características (micafungina). Todo esto favorece su unión o paso a través de la membrana celular del hongo (Gregory-Valdés, 2005).

Además, es necesario señalar que hay una gran similitud en la composición de las células de los mamíferos y las fúngicas, resultando un problema al diseñar un fármaco con posible actividad antifúngica, ya que debe ser muy selectivo entre la célula humana y la célula patógena (Aveñanos, 1997). La membrana celular de los hongos miceliados está formada por ergosterol, este esterol se relaciona con el crecimiento del organismo y al estar ausente en las células de mamíferos se convierte en un punto clave para los antifúngicos (Pitt & Hocking, 1997).

Caracterización fitoquímica cualitativa

En la caracterización fitoquímica de los extractos activos se realizó una fase preliminar mediante pruebas coloridas para determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos secundarios. En ambos extractos metanólicos de *D. cervicornis* fue positivo a la presencia de glucósidos, fenoles y triterpenos (tabla 5). Igualmente, González-Giro *et al.* (2015) realizaron un análisis fitoquímico preliminar de dos extractos, acuoso e hidroalcohólico, de *P. gymnospora* (Dictyotales) de la región de Santiago de Cuba, Cuba, en el cual determinaron los mismos metabolitos, además de flavonoides, saponinas y terpenos.

Esto se puede explicar a partir de lo señalado por Rhodes (1994), Cariveau *et al.* (2004) y Kobayashi (2004), donde se conoce que la producción de metabolitos secundarios varía, incluso, entre individuos de la misma especie según la zona, condiciones ambientales donde se encuentren e incluso la incidencia de herbívoros y patógenos, así como de las condiciones oceánicas.

Se ha demostrado que las algas pardas, en especial aquellas de los órdenes Fucales y Dictyotales (a este último pertenece *D. cervicornis*) producen metabolitos con origen terpenoide-aromático, ácidos grasos y fenoles (Pesando, 1990). Se conoce que representantes del Orden Dictyotales producen diterpenos llamados “dictyoles”, muchos de ellos son estructuralmente similares y tienen actividades contra la herbivoría (Hay y Fenical, 1988).

Ogden (1976) realizó un trabajo en el cual analizaba la relación de los herbívoros arrecifales y su consumo de algas y pastos marinos. En ese trabajo concluye que las poblaciones vegetales marinas que alcanzan un crecimiento amplio bajo una presión alta de herbivoría son por la producción de defensas químicas por metabolismo secundario.

Pereira *et al.* (2000) analizaron los efectos de los metabolitos secundarios identificados en *Dictyota menstrualis* de poblaciones de Brazil para inhibir su consumo por invertebrados marinos. Determinaron varios terpenos (el diterpeno (6R)-6-hidroxicotoma-3, 14-dieno-1, 17-dial, el cual tuvo propiedades de defensa contra la herbivoría del anfípodo *Parhyale hawaiiensis* y del crustáceo *Pachygrapsus transversus*) a los cuales les atribuyen dicho efecto.

Es importante mencionar que en las algas pardas se desarrollan orgánulos ovoides llamadas fisoides los cuales contienen compuestos fenólicos y se localizan en el citoplasma, cerca del núcleo (Ragan y Glombitza, 1986; Schoenwaelder, 1996; Schoenwaelder, 2002). Se piensa que estos compuestos se sintetizan por la ruta de acetato-malonato (Targett y Arnold, 1998). Los fisoides aportan compuestos fenólicos a la composición de la pared celular de las algas pardas (Schoenwaelder y Clayton, 1998; Schoenwaelder, 2002). Además, se ha reportado que los compuestos fenólicos en las algas pardas juegan un rol importante contra la herbívora ya que evitan la depredación (Schoenwaelder, 2008). Por tanto, esta

estructura celular puede explicar la presencia de fenoles en el extracto de *D. cervicornis* analizado en el presente trabajo.

Contenido de Fenoles Totales

El método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) consiste en una reacción colorida (de amarillo a azul) de reducción que se da del fosfomolibdato y fosfotungstato en un medio básico por los fenoles presentes en las muestras analizadas, esta reacción se lee a 760 nm.

En la tabla 6 están los valores obtenidos para los extractos metanólicos analizados, entre ellos el de mayor contenido de fenoles fue el de *P. gymnospora* con una cantidad de 21.60 mg EAG/g, seguido de *G. carolinensis* con 8.02 mg EAG/g y *D. cervicornis* (S) con 7.21 mg EAG/g. En la tabla 7 se observan los valores de los extractos hexánicos, de estos el de mayor contenido es el de *D. cervicornis* (IE) con 22.20 mg EAG/g.

Avila-Romero (2016) realizó la prueba de CFT solamente en el extracto metanólico y acetónico de *Cimopolia barbata* (Chlorophyta), obteniendo los siguientes resultados: para el primero tuvo un valor de 0.02 mg EAG/g de extracto y para el segundo fue un valor de 0.016 mg EAG/g de extracto. Estos valores no coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, estos son menores comparados con los obtenidos en este estudio. Aunque se haya hecho una recolecta en la misma área de estudio (SAV), no se tuvo la misma diversidad que la reportada por Avila-Romero, como ya se mencionó antes, la razón por la cual pudo haber estas diferencias en los resultados puede ser por la contaminación provocada por los derrames petroleros dentro del SAV pues en esos años, 2016 año del trabajo de Avila-Romero y 2018 año de muestreo del presente trabajo, hubieron reportes de derrames de combustibles (Aguirre, 2016; Escamilla, 2017; Méndez, 2017).

Chakraborty *et al.* (2013) evaluaron el contenido de fenoles totales (CFT) en extractos metanólicos de *Turbinaria conoides* y *T. ornata*, ambas algas pardas (Ochrophyta) colectadas del golfo de Mannar, y de estos obtuvieron fracciones de hexano, diclorometano y acetato de etilo. De sus resultados de CFT, los más altos fueron las fracciones diclorometano y acetato de etilo del extracto metanólico de *T. conoides*, con 51.47 mg EAG/g y 105.97 mg EAG/g, respectivamente. Estos valores no coinciden con los obtenidos en el presente trabajo pues son mayores a los que obtuvimos.

También Chakraborty *et al.* (2013) evaluaron el CFT en tres especies de algas del filo Rhodophyta, colectadas del golfo de Mannar, *Hypnea musciformis*, *H. valentiae*

y *Jania rubens*. Obtuvieron los extractos metanólicos y de estos obtuvieron tres fracciones, hexánica, diclorometano y acetato de etilo. Sus resultados destacan el extracto metanólico de *H. musciformis* con 9.84 mg EAG/g; de las fracciones obtuvieron 56.81 mg EAG/g en la hexánica, 87.82 mg EAG/g en la de diclorometano y 205.48 mg EAG/g en la de acetato de etilo. Estos valores tampoco coinciden con los obtenidos en el presente trabajo ya que son menores a los reportados por Chakraborty *et al.*

Para dar explicación a la diferencia del contenido de fenoles totales entre este trabajo y los citados antes, es necesario explicar sobre la radiación y los efectos de esta sobre el ambiente marino.

La radiación solar es la mayor fuente de energía, aporta calor a la Tierra e influye en el clima, sin embargo, factores como la latitud y la época del año influyen en su comportamiento a nivel global, además, dentro de la atmósfera, la radiación también es afectada por la absorción, difusión y reflexión (Hufty, 1984).

En cuerpos de agua, como el océano, la temperatura puede ser dividida en tres zonas. La zona superior de 5-200 m con temperatura de las aguas superficiales, la zona de la capa de mezcla de 200-1000 m donde la temperatura disminuye rápidamente en base a la profundidad, y la zona profunda donde la temperatura cambia lentamente según la profundidad. En agua de latitudes bajas, cercanas al Ecuador, la zona superficial tendrá una temperatura aproximada de 20°C, las aguas de la zona profunda en esa región serán de 5-2°C y ambas estarán separadas por la capa de mezcla de forma permanente con una termoclina. En latitudes medias, la zona de la capa de mezcla tendrá una temperatura de 15°C en verano y en invierno será de 5-10°C, tornándose más tenue la separación térmica de las aguas. En latitudes altas, la temperatura superficial es mucho más baja, provocando que la termoclina no esté presente (Millero, 2013).

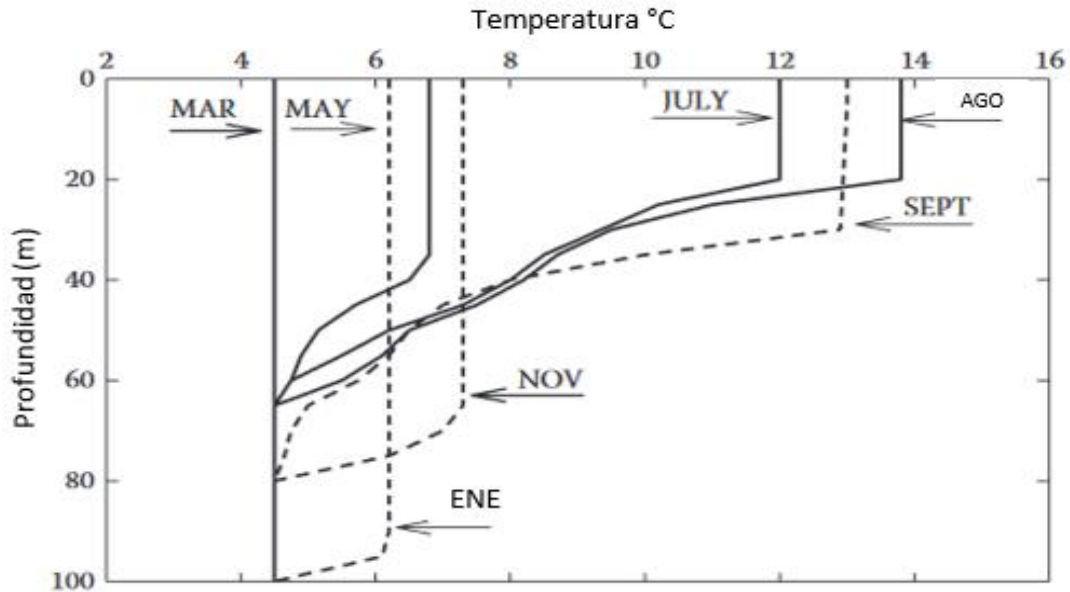


Fig. 20. Crecimiento y decaimiento de la termoclina mensual en latitudes medias. Modificado de Millero, 2013.

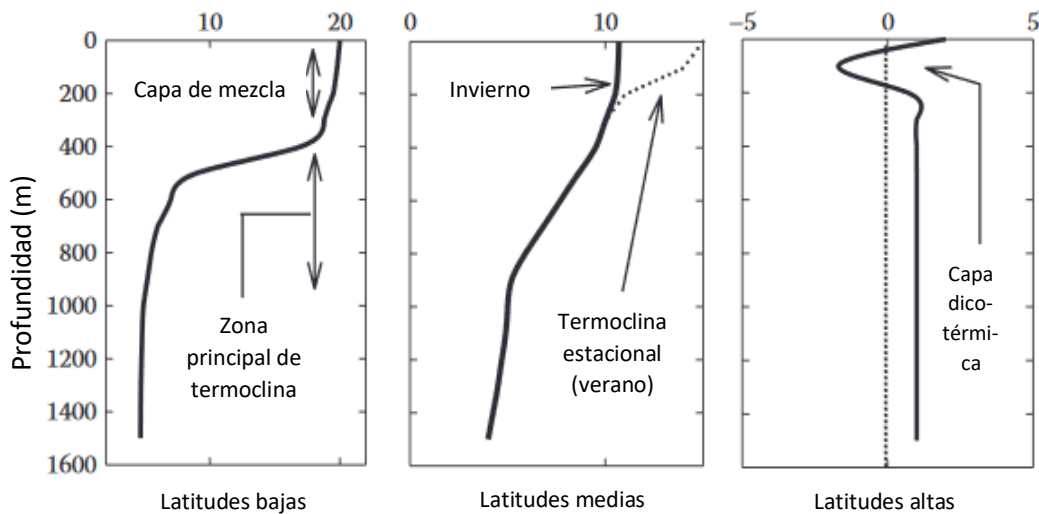


Fig. 21. Perfiles de temperatura típica en el océano. Modificado de Millero, 2013.

Pérez- UC *et al.* (2017) realizaron un estudio de perfil de la radiación solar en los pantanos de Centla, Tabasco. Ellos muestrearon por mes, estación y año la radiación máxima de un punto de muestreo, obteniendo el perfil promedio y máximo de la radiación solar. Sus resultados muestran que en invierno la radiación máxima fue de 576 Wh/m^2 , mientras que en primavera fue de 837 Wh/m^2 , en el verano fue de 844 Wh/m^2 y otoño tuvo un valor de 677 Wh/m^2 . Por lo tanto, a partir de estos valores se conocen que la menor radiación fue en invierno, seguida de otoño, primavera y finalmente en verano. Coincidiendo con el patrón latitudinal antes descrito por Millero, 2013.

Estos resultados indican que la temperatura se relaciona con los compuestos fenólicos en las algas pues, como ya se mencionó antes, en la época de invierno se tiene una temperatura menor (provocando la formación de una termoclina) que en otras estaciones por el comportamiento latitudinal de la radiación, por lo tanto la protección contra este fenómeno puede no ser prioritaria para las algas en esa época, por lo tanto la baja concentración de compuestos fenólicos en los extractos algales analizados en este trabajo pudo deberse a la época en que fueron colectadas (febrero del 2018), fechas que aún corresponden al invierno.

Respecto a los extractos hexánicos, Demirel *et al.* (2009) probaron extractos metanólicos, hexánicos y diclorometano de cinco macroalgas del mar Egeo (Mediterráneo), incluida *D. dichotoma* var. *implexa* y *D. dichotoma* y encontraron que el extracto hexánico de *D. dichotoma* var. *implexa* fue el que tuvo una mayor cantidad de polifenoles. Esto coincide con los valores obtenidos en el presente trabajo pues de los extractos analizados, los de mayor contenido de fenoles, fueron los hexánicos de *D. cervicornis* (IE y S). Como se ha mencionado antes, en las algas pardas se han encontrado estructuras ovoides llamadas fisoides, los cuales aportan compuestos fenólicos (Schoenwaelder, 1996; Schoenwaelder y Clayton, 1998; Schoenwaelder, 2002).

Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó a aquellos extractos que tuvieran una decoloración con la solución de DPPH sobre la placa de sílica (Fig. 13). De estos sólo los extractos metanólicos de las algas *P. gymnospora* y *G. carolinensis* se les realizó la prueba cuantitativa de DPPH (tabla 8). Estos tuvieron una CA₅₀ mucho mayor a la obtenida en la quercetina. Una CA₅₀ menor a la del control positivo indica una buena capacidad antioxidante pues se requiere una concentración de la muestra menor para disminuir un 50% al radical libre, en este caso el DPPH.

La CA₅₀ más baja de los extractos probados fue la del extracto metanólico de *P. gymnospora* (tabla 8) con un valor de 148.88 µg/mL, seguida de *G. carolinensis* con una CA₅₀ de 1715.31 µg/mL.

Zahra *et al.* (2007) evaluaron la actividad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos del alga parda *Sargassum boveanum*. Aquel extracto que destacan con mejor actividad fue el acuoso, este logró reducir un 94% el radical DPPH con 3 mg/mL del extracto, además de tener un contenido de fenoles totales de 17 mg equivalentes de catequina/g. Estos resultados coinciden con lo encontrado en el presente trabajo pues la actividad antioxidante del alga parda *P. gymnospora* fue efectiva sólo con altas concentraciones del extracto (148.88 µg/mL).

Vidal *et al.* (2006) realizaron un estudio donde analizaron la capacidad antioxidante del liofilizado del alga roja *Bryothamnion triquetum* de Brasil, donde obtuvieron una CA₅₀ de 4.66 mg, coincidiendo con el resultado de *G. carolinensis* donde se tuvo una CA₅₀ muy alta (1.71 mg/mL). Vidal *et al.* Concluyen que la actividad antioxidante de *B. triquetum* es efectiva sólo en altas concentraciones del extracto, tal como en este trabajo.

La FDA (Food and Drug Administration) declaró en el Registro Federal el 23 de septiembre de 1997 que para utilizar el término “alto en antioxidantes” se debía tener el 20% o más de lo equivalente a la ingesta diaria recomendada de vitamina E o vitamina C. Según lo publicado en el libro “Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids” por el Instituto de Medicina de Estados Unidos, dice que la ingesta diaria de vitamina C para adultos masculinos es de 105 mg/d (día) y para mujeres adultas es de 90 mg/d, para la vitamina E se tiene un estimado de ingesta diaria para hombres adultos de 9.4 mg/d y para mujeres adultas es de 6.4 mg/d. Los extractos probados en este proyecto tienen un contenido de fenoles menor al porcentaje establecido, quizá por eso no lograron reducir el radical DPPH en esta prueba, así que no se pueden considerar como buenos antioxidantes.

Fraccionamiento en Columna y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia Fase Reversa con Detector de Arreglo de Diodos (RP-HPLC-DAD)

Como ya se ha mencionado, en las algas pardas se desarrollan orgánulos ovoides localizados en el citoplasma llamadas fisoides los cuales contienen compuestos fenólicos (Ragan y Glombitza, 1986; Schoenwaelder, 1996; Schoenwaelder, 2002). Además estos fisoides aportan compuestos fenólicos a la composición de la pared celular de las algas pardas (Schoenwaelder y Clayton, 1998; Schoenwaelder, 2002). Por lo tanto a las tres fracciones activas obtenidas del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) se les realizó un análisis de RP-HPLC-DAD para determinar qué tipo de compuestos fenólicos presentan.

Se sabe que el uso de HPLC es común en la separación y cuantificación de compuestos polifenólicos en plantas. Además, para la cromatografía RP-HPLC-DAD se utiliza una columna RP-C18, un detector de arreglo de diodos y un sistema de solventes que en conjunto hacen un método confiable para la caracterización y detección de los compuestos fenólicos en las muestras (Parejo *et al.*, 2004).

Rajauria (2018) realizó un estudio en el cuál evaluó la eficiencia del análisis de RP-HPLC-DAD con el extracto metanólico de *Himantia elongata*, una alga parda igual que *D. cervicornis*. Midió las absorbancias en tres longitudes de onda para su análisis (254, 280 y 320 nm). En las longitudes de onda de 254 y 280 nm obtuvieron 28 picos, mientras que en la longitud de onda de 320 nm sólo obtuvieron nueve. Destacan que la mayoría de los compuestos separados estuvo en el rango de 254 nm, también mencionan que la sensibilidad de algunos grupos de polifenoles puede no ser mayor a 254 nm. Esto indica que el análisis realizado en el presente trabajo es certero acerca del tipo de compuestos fenólicos que contienen las fracciones del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) ya que, para la fracción número 7, se observaron 13 picos correspondientes a 13 compuestos fenólicos de tipo fenilpropanoide (tabla 9); en la fracción número 9 se obtuvieron 14 picos correspondientes a 14 compuestos fenólicos de tipo fenilpropanoide (tabla 10); y en la fracción número 14 se obtuvieron 12 picos que corresponden 11 a compuestos de tipo fenilpropanoide y uno solo a compuestos de tipo flavonoide (tabla 11), pues la longitud de onda a la cual se registraron las absorbancias de las muestras en el RP-HPLC-DAD realizado es también de 254 nm, coincidiendo con lo reportado por Rajauria (2018).

Los compuestos fenólicos absorben bien en rangos de luz ultravioleta (UV), la detección por UV es un método conveniente para la detección de los mismos. Los ácidos fenólicos, o fenilpropanooides, tienen su rango de longitud de onda máxima entre los 200-290 nm (Hyötyläinen y Kivilompolo, 2011).

Aguilar-Laurents (2015) agrupó los máximos de absorción de diferentes grupos de flavonoides como flavonas, flavonoles, chalconas, etcétera. Estos grupos absorben en un rango de 240-270 hasta 300-390 nm.

Estos datos coinciden con los resultados mostrados en el presente trabajo ya que en la fracción número 14 del extracto de *D. cervicornis* (S) sólo se detectó un compuesto que absorbió en longitudes de onda cercanas a las señaladas por Aguilar-Laurents (2015) (tabla 11) el cual fue relacionado con un compuesto de tipo flavonoide. Además, Domínguez (1979) menciona que los compuestos de este tipo no son muy comunes en las algas por lo cual también coincide con lo reportado en los resultados del análisis de RP-HPLC-DAD en las tres fracciones del extracto de *D. cervicornis* (S) pues la mayoría de los compuestos registrados pueden ser de tipo fenilpropanoide pues la longitud de onda a la que fueron detectados por el análisis de HPLC están dentro del rango descrito por Hyötyläinen y Kivilompolo.

Conclusiones

- Se obtuvieron en total siete especies de macroalgas del SAV, tres de ellas pertenecientes al filo Rhodophyta, tres del filo Ochrophyta y una del filo Chlorophyta.
- El extracto metanólico de la especie *D. cervicornis* (IE) presentó actividad antibacteriana contra cinco cepas bacterianas, dos Gram positivas y tres Gram negativas; así como el extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) tuvo actividad antibacteriana en una cepa Gram positiva.
- La CMI del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) fue de 0.5 mg/mL y una CBM de 0.75 mg/mL. Del extracto metanólico de *D. cervicornis* (IE) sólo se pudo determinar la CMI y CBM para una cepa, las cuales son 1.0 mg/mL y 2.0 mg/mL respectivamente.
- El extracto metanólico de *P. gymnospora* fue activo contra *C. albicans*, se requieren concentraciones mayores a los 4 mg/mL para determinar la CMI y CBM.
- *D. cervicornis* (IE y S) en la parte polar contiene glucósidos, fenoles y triterpenos.
- En el CFT, el extracto metanólico de *P. gymnospora* tuvo 21.59 mg EAG/g, seguido del extracto de *G. carolinensis* con 8.02 mg EAG/g. De los extractos hexánicos, el de mayor contenido de fenoles fue el de *D. cervicornis* (IE) con 22.19 mg EAG/g.
- El extracto metanólico de *P. gymnospora* tuvo una CA₅₀ de 148.88 µg/mL.
- Las tres fracciones activas del extracto metanólico de *D. cervicornis* (S) contienen en su mayoría compuestos fenólicos de tipo fenilpropanoide.

APÉNDICES

I. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer

(Koneman *et al.*, 1996)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos vegetales, el método es el siguiente:

Se utiliza agar Müeller-Hinton (Bioxon) ya que promueve el desarrollo de la mayoría de las cepas bacterianas clínicamente significativas. El medio debe alcanzar en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los compuestos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución del compuesto hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

El inóculo se prepara tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias con un asa de siembra, se sumerge en 10 mL de caldo Müeller-Hinton (Bioxon), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa. El tubo con la bacteria se incuba a 37°C durante 24 horas o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL. Posterior a esto se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión de bacteria, antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa con el agar que previamente se dejó solidificar. Finalmente se siembra mediante estría en tres direcciones dando vueltas a la placa en ángulos aproximados de 60° luego de cada estría.

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman No. 5. Con 2 mg de cada extracto a probar disuelto en 10 mL del disolvente correspondiente a cada uno, se impregnan los sensidiscos y se colocan en la superficie del agar utilizando una pinza estéril y se ponen por los menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la caja. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados. Para el control negativo se preparan sensidiscos con 10 µL del solvente empleado para disolver el extracto. Para el control positivo se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con 25 µg de cloranfenicol. Todos los sensidiscos se preparan con 24 horas de anticipación.

Una vez preparadas convenientemente las cajas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36°C, sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie

humedecida del agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es debido al pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Así mismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición.

En el caso de existir zonas de inhibición, se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

II. Método de dilución en agar

(Koneman *et al.*, 1996)

Para estos bioensayos se evalúan diferentes concentraciones de los extractos que resultan con actividad antibacteriana en la prueba cualitativa para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM). Las concentraciones evaluadas fueron: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL. Se utilizaron cajas con 24 pozos, en cada pozo se colocaron 5 mL de agar con la concentración del extracto correspondiente.

Se agrega cada concentración del extracto al agar y se agita para obtener una dispersión homogénea, posteriormente se coloca cada concentración en los pozos correspondientes.

El inóculo consiste en una suspensión bacteriana con una concentración de 1.5×10^8 bacterias por mL. Se toma el inóculo y se coloca sobre los pozos con los extractos a diferentes concentraciones tocando la superficie del agar únicamente cada cepa bacteriana. Se ocupan tres pozos por concentración, asegurando las tres repeticiones de cada una.

Todas las cepas a evaluar se ponen en una misma caja con todas sus concentraciones y repeticiones, ocupando los 24 pozos.

Como control positivo se utilizaron tres pozos sin extracto con 5 mL de agar Müller Hinton, para el control negativo se usaron las mismas condiciones que el control positivo pero al agar se le adicionaron 50 μ L del solvente empleado para disolver los extractos a evaluar.

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento bacteriano representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración en la que se produce una inhibición de la población del 99.99% representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

III. Efecto de los extractos sobre el crecimiento bacteriano.

(Kubo *et al.*, 1993, citado en Avila-Acevedo, 1996)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el crecimiento bacteriano basándose en las CMI y CBM obtenidas anteriormente y así determinar los impactos necesarios para que se produzca la muerte bacteriana. Se utiliza como medio de cultivo el agar Müeller-Hinton. Este se coloca en cajas Petri septadas.

Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^8 bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müeller-Hinton.

Con una micropipeta se inoculan 0.1 mL de la suspensión de bacteria en los tubos que contienen los extractos a evaluar. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^4 bacterias/mL de caldo en cada tubo. Se incuba en una estufa a 35°C sin presión de CO₂.

Los extractos o compuestos a evaluar se preparan en tubos con 10 mL de caldo Müeller-Hinton con las concentraciones de ½CMI, CMI y CBM. Se muestrea cada hora durante los primeros cinco tiempos: T₀-0, T₁-1, T₂-2, T₃-3, T₄-4 y T₅-5 (tiempo-horas transcurridas), después dos muestreos cada dos horas, luego un muestreo a las 12 horas y finalmente uno a las 24 horas. En cada tiempo se realizan dos diluciones de 50 µL en tubos con 5 mL de solución salina para determinar las UFC en cada tiempo a evaluar. Como testigo se prepara un tubo sin extracto y de este se toman los 50 µL. También se realizan las diluciones correspondientes.

Las cajas se incuban durante 24 horas a 35°C. Se cuentan las colonias de cada concentración y dilución de los tiempos evaluados. Se grafica el Log del número de sobrevivientes contra el tiempo (horas) en que se evaluó para determinar el efecto del extracto. Si se tiene una disminución del 99.99% de la población bacteriana se dice que el efecto es bactericida; si se tiene una disminución drástica de la población entonces el efecto es bacteriostático.

IV. Inhibición del crecimiento radial por difusión en agar.

(Wang y Bun, 2002)

Con el ensayo de inhibición del crecimiento radial por difusión en agar se evalúa cualitativamente la actividad antifúngica sobre hongos filamentosos del extracto. Los compuestos difunden a través del agar y, si estos son activos, el crecimiento del hongo es más lento o se detiene, resultando la deformación de la colonia.

Se lleva a cabo en caja Petri con 20 mL de agar de papa-dextrosa (PDA), en el cual se pone un botón con el micelio del hongo en crecimiento. Utilizando sensidiscos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5 se impregnan con 2 mg del extracto disueltos en 10 μ L del solvente correspondiente. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo para dejar que el disolvente se evapore por completo. Los discos se colocan a una distancia de 5 mm del límite micelial, utilizando una pinza estéril.

Como control negativo se colocan sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L de solvente y como control positivo se usan sensidiscos con 7 μ g de ketoconazol. Se realizan tres repeticiones para cada extracto por cepa de hongo.

Las cajas se incuban a 28°C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

En el caso de existir alguna deformación en el crecimiento del hongo, se reporta el extracto como activo ya que en condiciones normales el crecimiento del hongo es circular y éste debe crecer encima de los sensidiscos como con el control negativo, también cualquier signo de diferencia de color, esporulación o morfología indican actividad antifúngica.

Para realizar el ensayo de inhibición del crecimiento radial por difusión en agar para hongos levaduriformes, se realizó el mismo método utilizado en las cepas bacterianas (Apéndice II).

V. Contenido de Fenoles Totales (CFT)

(Método modificado por Singleton *et al.*, 1999)

El contenido de fenoles totales se mide por espectrofotometría en base a una reacción colorimétrica de óxido reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6⁺. La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5⁺ y 6⁺ formando una solución azul.

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH. Se utiliza para evaluar la cuantificación de fenoles totales, en este caso, del extracto metanólico.

Primero, se realiza una solución estándar de ácido gálico de 10-60 mg/L. A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico de 0.0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 mg/mL; a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener un volumen final de 1 mL.

Para el análisis de fenoles totales del extracto se prepara una solución estándar a una concentración de 0.5 mg/mL. Se toma una alícuota de 100 µL de esta y se agregan 900 µL de agua destilada para obtener un volumen final de 1 mL.

Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada, se añaden 1.5 mL de una solución de Na₂CO₃ (200 mg/L) hasta completar un volumen de 10 mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se realiza por triplicado y se obtiene el promedio de cada una.

Finalmente se grafica la concentración de ácido gálico contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico. Se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra evaluada. Los resultados se expresan como miligramos de equivalentes de ácido gálico/ gramos de extracto (mg de EAC/g de extracto) o bien en porcentaje.

VI. Caracterización Fitoquímica por métodos coloridos de los extractos.

(Domínguez, 1979; Santizo-Rodas, 2004; Carvajal-Rojas, *et al.*, 2009; Coy-Barrera *et al.*, 2014).

Los extractos se analizaron de manera preliminar mediante las pruebas de presencia y/o ausencia de los principales grupos de metabolitos secundarios ordenados en la siguiente tabla:

Tabla 12. Pruebas cualitativas de los principales grupos de metabolitos secundarios con su respectivo reactivo y apariencia positiva.

Grupo	Reactivo/Prueba	Apariencia positiva
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado anaranjado
	Mayer	Precipitado lechoso
Saponinas	Agitación	Produce espuma
Triterpenos y derivados	Lieberman-Buchard	Color azul o verde
		Rojo, violeta/morado
Fenoles	Cloruro férrico	Color azul-verde
Glucósidos	Molish	Anillo morado

Las pruebas cualitativas se realizaron utilizando soluciones de los extractos a una concentración de 1 mg/mL.

El reactivo de Mayer se prepara disolviendo 1.36 g de cloruro de mercurio en 60 mL de agua destilada, también se disuelven 5 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada. Estas dos soluciones se mezclan y se aforan hasta 100 mL (Santizo-Rodas, 2004; Carvajal-Rojas, *et al.*, 2009). La prueba se realiza añadiendo unas cuantas gotas del reactivo al extracto a evaluar y el resultado es positivo siempre que se tenga un precipitado de apariencia lechosa (Tabla 12).

El reactivo de Dragendorff se prepara también con dos soluciones. La primera es con 0.85 g de nitrato de bismuto diluido en 10 mL de ácido acético. La segunda solución es de 8 g de yoduro de potasio disuelto en agua destilada. Se utilizan solamente 25 mL de cada una de ellas y se mezclan en 100 mL de ácido acético, luego se afora a 500 mL con agua destilada. Este reactivo es estable manteniéndose en un recipiente obscuro y en refrigeración (Santizo-Rodas, 2004). La apariencia positiva de esta prueba (Tabla 12) es un precipitado naranja.

Para la prueba de espuma se debe agitar vigorosamente el extracto disuelto en un tubo de ensayo con tapa, después se deberá observar espuma que dure algunos minutos para que el resultado se considere positivo (Carvajal-Rojas *et al.*, 2009).

Para preparar el reactivo de Lieberman-Bouchard se mezclan 5 mL de anhídrido acético y 5 mL de cloroformo, se deja enfriar a 0°C para después agregarle de 1-2 gotas de ácido sulfúrico. Este reactivo es estable durante un día. Al realizar la prueba, se pone una gota del extracto disuelto en su respectivo solvente en una placa de gel de sílice, se deja secar la muestra y se le añade el reactivo de Lieberman-Bouchard para entonces someter la placa a calentamiento durante unos minutos (Santizo-Rodas, 2004; Carbajal-Rojas, *et al.*, 2009). El resultado es positivo (Tabla 12) si se muestran manchas de colores rojos, azules o verdes.

En la prueba de fenoles se utiliza una solución al 1% de cloruro férrico que ha sido neutralizada con hidróxido sódico. Al extracto disuelto que se va a evaluar se le adiciona esta solución de cloruro férrico y si es positiva la reacción (Tabla 12) se verá una coloración púrpura, verde o azul (Coy-Barrera *et al.*, 2014).

La prueba de glucósidos se realiza poniendo 1 mL del extracto disuelto a evaluar, se le añade dos gotas de α -naftol, se mezcla y se adicionan alrededor de 2 mL de ácido sulfúrico por las paredes. Si el resultado es positivo se observará un anillo morado en la solución de la prueba (Dominguez, 1979).

VII. Reducción del radical 2,2-difenil-1-Picrilhidracilo (DPPH).

(Okusa *et al.*, 2007).

Se realizó la técnica de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) para determinar la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) de los extractos metanólicos.

La actividad antioxidante de un extracto se determina mediante la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) que quiere decir la concentración del extracto a la cual se neutraliza el 50% de los radicales libres. Por lo tanto, la CA₅₀ obtenida se considera inversamente proporcional a la capacidad antioxidante.

Para preparar la solución STOCK se utilizaron 30 mg del extracto metanólico en 7.5 mL de MeOH grado HPLC para obtener las concentraciones de 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL, mientras la solución de DPPH se preparó pesando 10 mg del reactivo en un matraz color ámbar aforado a 50 mL con MeOH para obtenerlo a una concentración de 100 µM.

En una placa de 96 pozos se agregan 50 µL de la solución problema a las diferentes concentraciones (100-1000 µg/mL), posteriormente se agregan 150 µL de la solución de DPPH por triplicado. Para el blanco se llenan también tres pozos con 200 µL de MeOH. Para el control negativo se usa quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema pero con las concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 µg/mL.

Al terminar se debe de proteger de la luz cubriendo la placa con aluminio y se mantienen en agitación constante por 30 min exactos a 37°C. Después de este tiempo se leen las absorbancias en un lector de Elisa a 517 nm.

Tabla 13. Concentraciones para preparar las soluciones problema para evaluar la actividad antioxidante.

Stock (μL)	MeOH (μL)	Concentración Final Extracto (μg/μL)
0	1000	0
100	900	100
200	800	200
300	700	300
400	600	400
500	500	500
600	400	600
700	300	700
800	200	800
900	100	900
1000	0	1000

Para los resultados se deben obtener los porcentajes de reducción de cada concentración evaluada. Para ello se sigue la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C - E / C) * 100$$

Donde:

C= Absorbancia del DPPH sin antioxidante.

E= Absorbancia de la muestra a evaluar (concentraciones del extracto metanólico con solución DPPH).

Una vez obtenidos los porcentajes de reducción de cada concentración, se grafican. De esa gráfica se determina el modelo estadístico más conveniente a utilizar, de este se despejará X para obtener su valor a una concentración de 50, obteniéndose la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀).

Abdu-llah, A. S. S., Abdel-Raouf, N., El-Wazanani, H. y Aref, I. A. (2013) "Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia" King Saud University. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21, 57-64.

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., Mcmanus, H., Mitchell, E. A. D., Sharon, E., Mozley-Stanridge, Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. & Spiegel, F. W. (2012) "The revised classification of eukaryotes". *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 59 (5): 429-493.

Aguilar-Laurents, M. I. (2015) "Flavonoides. Biogénesis, aislamiento, determinación estructural y bioactividad de flavonoides y biflavonoides." En Delgado, G. y Romo de Vivar, A. (Ed.) "Temas selectos de química de productos naturales" (pp. 59-94). Instituto de Química, México.

Aguirre, R. (2016). "Se incendia buque petrolero en Veracruz". Excelsior. Fecha de publicación: 26-09-2016. Recuperado de: <https://www.excelsior.com.mx/nacional/2016/09/24/1118783>

Avello, M. y Suwalsky, M. (2006) "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección." *Atenea* 494 (2): 161-172.

Aveñanos, M. (1997) "Introducción a la química farmacéutica" 2º edición. Madrid, España. 337 pp.

Avila-Acevedo, J.G. (1996). "Actividad anti-Vibrio cholerae de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha." Tesis de Maestría. FES- Cuautitlán. UNAM. México. 234 pp.

Avila-Romero, M. (2016) "Efecto de la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas marinas del Sistema Arrecifal Veracruzano." Tesis de maestría. FES-Iztacala. UNAM. México. 92 pp.

Catalán, M. y Montejó, J. C. (2006) "Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética" *Revista Iberoamericana de Micología*. 23: 39-49.

Cariveau, D., Irwin, R. E., Brody, A. K., García-Mayeya, L. S. y Von Der Ohe, A. (2004) "Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits." *Oikos*. 104: 15-26.

Carvajal-Rojas, L., Hata-Urbe, Y., Sierra-Martínez, N. y Rueda-Niño, D. (2009) "Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff)." *Revista Colombiana Forestal*. 12: 161-170.

Centro Mexicano de Derecho Ambiental. (CEMDA) (2011) "El sistema arrecifal veracruzano. Reporte de un área natural protegida amenazada." Centro Mexicano de Derecho Ambiental. 55 pp.

Chakraborty, K., Joseph, D. & Praveen, N. K. (2013) "Antioxidante activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India." *Journal of Food Science and Technology*. 52(4): 1924-1935.

Chakraborty, K., Praveen, N. K., Vijayan, K. K. & Rao, G. S. (2013) "Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to *Turbinaria* spp. (Phaeophyta, *Sargassaceae*) collected from Gulf of Mannar." *Assian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(1): 8-16.

Chapman, V. J. (1970) "Seaweeds and their uses." Methuen & Co. Ltd, The Camelot Press Ltd. London, UK. 304 pp.

Chiheb, I., Riadi, H., Martínez-López, J., Domínguez-Seglar, J. F., Gomez-Vidal, J. A., Bouziane, H. y Kadir, H. (2009) "Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco" *African Journal of Biothechnology*. 8 (7): 1258-1262.

CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. (2014) "Caracterización fluvial e hidráulica de las inundaciones en México. CNA-SGT-GASIR-09/2014. Organismo de cuenca X Golfo Centro." Instituto de Ingeniería UNAM. Veracruz. 83 pp.

CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2012) "Algas." Biodiversidad Mexicana. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Consultada en: 2017-03-16 Disponible en: http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/plantas/algas/algas.html

CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; The Nature Conservancy; Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas; Pronatura México. (2007) "Ficha técnica para la evaluación de los sitios prioritarios para la conservación de los ambientes costeros y oceánicos de México." Golfo de México Sur. Consultada en: 2017-03-13 Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/gap/images/8/85/59_Sistema_Arrecifal_Veracruzano.pdf

Coy-Barrera, C. A., Parra, J. y Cuca-Suárez, L. E. (2014) "Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphyla* (Rutaceae)." *Revista Elementos*. 4: 1-9.

Crisp, D. J. Christine, O. y Ghobashy, A. (1967) "Narcotic and toxic action of organic compounds on barnacle larvae." *Comparative Biochemistry and Physiology*. 22: 629-649.

Demirel, Z., Yilmaz-Koz, F. F., Karabay-Yavasoglu, U. N, Ozdemir, G. y Sukatar, A. (2009) "Antimicrobial and antioxidant activity of Brown algae from the Aegean Sea". *Journal of the Serbian Chemical Society*. 74 (6): 619-628.

Diario Oficial de la Federación. (2012) "Decreto que modifica al diverso por el que se declara Área Natural Protegida, con el carácter de Parque Marino Nacional, la zona conocida como Sistema Arrecifal Veracruzano, ubicada frente a las costas de los municipios de Veracruz, Boca del Río y Alvarado del Estado de Veracruz Llave publicado los días 24 y 25 de agosto de 1992." Consultada en: 2018-05-05 Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5280548&fecha=29/11/2012

Domínguez, X. A. (1979) Métodos de la Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México. 45-47.

Durán, D. A., Vargas, V. A. y Cisneros, C. A. (2004) "Bioestadística" UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 220 pp.

Echavarría, B., Francos, A. y Martínez, M. A. (2009) "Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe colombiano." *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 16 (1): 126-131.

Edding, M., Tala, F. y Vásquez, J. (2006) "Capítulo XI: Fotosíntesis, productividad y algas marinas" En: Squeo, S. F. y Cardemil, L. (Eds.), "Fisiología Vegetal" (39 pp). La Serena, Chile. Universidad de La Serena.

Escamilla, E. (2017) "Municipios: Derrame de hidrocarburo mal tratado continúa contaminando río en el norte". La Jornada Veracruz. Fecha de publicación: 13-02-2017. Recuperado de: http://www.jornadaveracruz.com.mx/Post.aspx?id=170213_074715_337

Faten, M. A. E. y Emad, A. S. (2009) "Antioxidant activity of extract and semi-purified fractions of marine red macroalga *Gracilaria verrucosa*." *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3(4): 3179-3185.

Feijoo-Ruíz, C. D. E. (2012) "Procesamiento de la mezcla crudo y medium distillate for blending stock (MDBS) para aumentar la producción de destilados medios." Tesis de licenciatura en Ingeniería petroquímica. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, Perú. 114 pp.

Freile, P. Y. (2001) "Algas en la bótica." *Avance y Perspectiva*. 20: 283-292.

Food & Drug Administration (FDA). Department of Health and Human Services. (1997) "Food labeling; Nutrient content claims: Definition for "High potency" and definition of "Antioxidant" for use in nutrient content claims for dietary supplements and conventional foods. Rules and Regulations". Federal Register. 62 (184): 49868-49882.

Garduño-Solórzano, G., Godínez-Ortega, J. L. y Ortega, M. M. (2005) "Distribución geográfica y afinidad por el sustrato de las algas verdes (Chlorophyceae) bénticas de las costas mexicanas del Golfo de México y mar Caribe." *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. (76): 61-78.

González, G. J. (1987) "Las algas de México." *Revista Ciencias*. Facultad de Ciencias. UNAM. 10: 10.

González-Giro, Z., Fuentes-Reyes, M., Batista-Corbal, P., Campos-Castro, A. y Vera-Pérez, Y. (2015) "Análisis fitoquímico preliminar de dos extractos del alga *Padina gymnospora*." *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 17(2): 26-29.

Gregory-Valdés, B. S. (2005) "Estructura y actividad de los antifúngicos." *Revista Cubana Farmacéutica*. 39 (2): 1-15.

Gurgel, C. F. D., Liao, L. M., Fredericq, S. y Hommersand, M. H. (2003) "Systematics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on *rbcl* sequence analyses and morphological evidence" *Journal Phycology*. 39: 154-171.

Hay, E. M. y Fenical, W. (1988) "Marine plant-herbivore interactions: The ecology of chemical defense." *Annual Reviews of Ecology and Systematics*. 19: 111-145.

Houbron, E. (2010) "Patrimonio Cultural. Calidad del agua." En: Florescano, E. y Ortiz, E., J. (Coors) "Atlas del patrimonio natural, histórico y cultural de Veracruz" Veracruz, México: Universidad Veracruzana. 147-170.

Hufty, A. (1984) "Introducción a la climatología". Ed. Ariel. Barcelona, España. 292 pp.

Hyötyläinen, T. & Kivilompolo, M. (2011) "Applications of HPLC in the analysis of phenols, phenolics acids and tannins." En Waksmundzka-Hajnos, M. & Sherma, J. (Ed.) "High performance liquid chromatography in phytochemical analysis." (pp. 477-534). Florida, EE. UU. CRC Press.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2017) "Comunicado de prensa No. 127/17. En México, sólo 34 de cada 100 municipios cuentan con servicio de tratamiento de aguas residuales municipales" Comunicación social. Consultada en: 19-11-18. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/agua2017_Nal.pdf

Kandhasamy, M. y Arunachalam, K. D. (2008) "Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India." *African Journal of Biotechnology*. 7(12). 1958-1961.

Kobayashi, K. (2004) "Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soul." *Weed Biology. Management*. 4: 1-17.

Kolanjinathan, K., Ganesh, P. y Govindarajan, M. (2009) "Antibacterial activity of etanol of seaweeds against fish bacterial pathogens." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 13: 173-177.

Koneman, E., Allen, S. D., Dowell, V. R., Summers, H. M. (1996). "Diagnóstico microbiológico." Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 909 pp.

Kubo, I. (1993) "Antimicrobial activity of Green tea flavor components." In Bioactive volatile compounds from plants. Edited by Teranishi, R. and Buttery, R. G. *America Chemical Society*. Washington, D. C., USA. 57-70.

Lara-Isassi, G., Alvarez-Hernández, S. y Lozano-Ramírez, T. (1996) "Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano." *Revista de Biología Tropical*. 44(2): 895-898.

Littler, D. S. & Littler, M. M. (2000) "Caribbean reef plants: an identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico". OffShore Graphics, Inc. Washington, D. C. 542 pp.

Lüning, K. (1990) "Seaweeds, their environment, biogeography and ecophysiology." John Wiley & sons, Inc. New York. 489 pp.

Macarulla, J. M. y Goñi, F. M. (1994) "Bioquímica Humana. Curso básico". Editorial Reverté. Barcelona. 161-163.

Mansilla, A. y Alveal, K. (2004). "Generalidades sobre las macroalgas." En Werlinger, I. C. (Ed.), *Biología marina y oceanografía: conceptos y procesos*. (pp 349-364) Santiago, Chile. Editorial Trama.

Méndez, E. (21/08/2017) "Buque 'Antares' provoca severo daños en arrecife de Veracruz." *Excelsior*. Recuperado de: <https://www.excelsior.com.mx/nacional/2017/08/21/1183142>

Mijaylova, P., Sandoval, L. y Ramírez, E. (2005) "Tratabilidad de las aguas residuales de desalación del petróleo, para su reúso en pozos de inyección al subsuelo". *Revista Aidis de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*. 1 (2): 1-16.

Millero, F. J. (2013) "*Chemical oceanography*." CRC Press. Boca Raton, Florida. 519 pp.

- Ogden**, C. J. (1976) "Some aspects of herbivore-plant relationships on caribbean reefs and seagrass beds." *Aquatic Botany*. 2: 103-116.
- Okusa**, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P. (2007) "Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gilletti* De Wild (*Boraginaceae*)." *Journal of Ethnopharmacology*. 112: 476-481.
- Páez-Osuna**, F. (2005) "Fuentes de metales en la zona costera marina." *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. 2: 329-342.
- Parejo**, I., Viladomat, F., Bastida, J. y Codina, C. (2004) "Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C 18 column. *Anal. Chim.* 512: 271-280.
- Pereira**, R. C., Cavalcanti, D. N., Teixeira, V. L. (2000) "Effects of secondary metabolites from the tropical Brazilian Brown alga *Dictyota menstrualis* on the amphipod *Parhyale hawaiiensis*." *Marine Ecology Progress Series*. 205: 95-100.
- Pérez**, E. H. y Vargas-Hernández, J. M. (2008) "Caracterización ecológica y monitoreo del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano: Primera etapa." Universidad Veracruzana. Centro de ecología y Pesquerías Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. DM002. México, D. F. 99 pp.
- Pesando**, D. (1990) "Antibacterial and antifungal activities of marine algae." En: SPB Academic Publishing. "Introduction to applied phycology." Akatsuka Editorial. The Hague. 3-26.
- Pérez- UC**, D. A., Pedrero-Hernández, S. E., Pérez-Durán, M. A. y Zarate, M. A. (2017) "Estudio de perfiles de radiación solar de pantanos de Centla". *Revista de Energía Química y Física*. 4 (11): 1-8.
- Pitt**, J. I. & Hocking, A. D. (1997) "Fungi and food spoilage." Editorial Springer-Science-Business Media, B. V. Sydney, Australia. 40 pp.
- Ragan**, M. A. y Glombitza, K. W. (1986) "Phlorotannins, brown algal polyphenols". *Progress in Phycological Research*. 4: 129-241.
- Rajauria**, G. (2018) "Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in seaweed." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 148: 230-237.
- Rawat**, I., Ranjith, K. R., Mutanda, T. y Bux, F. (2011) "Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production" *Applied Energy*. 88: 3411-3424.
- Rivas**, A. M. y Cardona-Castro, N. (2009) "Antimicóticos de uso sistémico: ¿Con qué opciones terapéuticas contamos?" *Revista CES Medicina*. 23: 61-76.

Robbins, J. R. (2003) "Phenolics acids in foods: An overview of analytical methodology." *Journal Agric. Food Chem.* 51(10): 2866-2887.

Robledo, R. D. y Freile P. P. (1998) "Aspectos económicos sobre la biodiversidad de México. Macrofauna marina de interés económico de las costas de Yucatán." CONABIO. Mérida, Yucatán. 167-204.

Rodríguez-Prieto, C., Ballesteros, E., Boisset, F. & Afonso-Carrillo, J. (2014) "Guía de las macroalgas y fanerógamas marinas del mediterráneo occidental." OMEGA. Barcelona, España. 550 pp.

Rhodes, M. J. C. (1994) "Physiological roles for secondary metabolites in plants: Some progress many outstanding problems." *Plant Molecular Biology.* 24: 1-20.

Salvador, N., Gómez, G. A., Lavelli, L. y Ribera, M. A. (2007) "Antimicrobial activity of Iberian macroalgae". *Scientia Marina.* 71 (1): 101-113.

Sánchez-Valle, V. y Méndez-Sánchez, N. (2013) "Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad." *Revista de Investigación Médica Sur Mex.* 20(3): 161-168.

Saidani, K., Bedjou, F., Benabdesselam, F. y Touati, N. (2012) "Antifungal activity of methanolic extracts of four Algerian marine algae species." *African Journal of Biotechnology.* 11(39): 9496-9500.

SEMARNAT. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. CONANP. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (2017) "Programa de Manejo Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano." Gobierno de la República. México. 352 pp.

Santizo-Rodas, I. M. (2004) "Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*." Tesis licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 134 pp.

Schoenwaelder, M. E. A. (1996) "The distribution and secretion of phenolic compounds in the early development of *Acrocarpia paniculata* and *Hormosira banksii* (Phaeophyceae)". Tesis doctoral, Universidad Monash, Australia. 117 pp.

Schoenwaelder, M. E. A. y Clayton, M. N. (1998) "Secretion of phenolic substances into the zygote *Acrocarpia* (Fucales, Phaeophyceae)". *Journal Phycology.* 34: 969-980.

Schoenwaelder, M. E. A. (2002) "The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae". *Phycological Reviews* 21. *Phycologia.* 41: 125-266.

Schoenwaelder, M. E. A. (2008) "The biology of phenolic containing vesicles". *Algae.* 23(3): 163-175.

Shimaa, M. E. S., Samh, S. A. & Mostafa, M. E. S. (2016) "Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria" *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 42: 65-74.

Singleton, L. V., Orthofer, R. & Lamuela, R. M. (1999) "Analysis of total phenols and oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Coicalteu reagent." *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.

Spalding, M., Ravilious, C. & Green, E. P. (2001) "World Atlas of Coral Reefs." Prepared at the UNEP World Conservation Monitoring Center, University of California Press, Berkeley. 424.

Stirk, A. W., Reinecke, L. D. & Staden, J. (2007) "Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds" *Journal of Applied Phycology*. 19: 271-276.

Sturges, W., Lugo-Fernandez, A & Shargel, M. D. (2005) "Introduction to circulation in the Gulf of Mexico: observations and models." American Geophysical Union. 347 pp.

Targett, N. M. y Arnold, T. M. (1998) "Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans". *Journal Phycology*. 34: 195-205.

Thiers, B. (2016). "*Index Herbariorum. A global directory of public herbaria and associated staff.*" New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponible en: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih>

Tuney, I., Cardici, B. H., Unal, D. y Sukatar, A. (2006) "Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey)." *Turkish Journal of Biology*. 30(3): 171-175.

United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. World Meteorological Organization (UNESCO-WHO). (1998) "International Glossary of Hydrology Geneva". 343 pp.

Vallinayagam, K., Arumugam, R., Ragupathi, R. K. R., Thirumaran, G. y Anantharaman, P. (2009) "Antibacterial activity of some selected seaweeds from Pudumadam Coastal Regions." *Global Journal of Pharmacology*. 3(1): 50-52.

Vera, G., Tam, J y Pinto, E. (2009) "Efectos ecotoxicológicos del petróleo crudo, diésel 2 y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros gracilis* Schutt." *Ecología aplicada*. 8(1): 1-7.

Vidal, A., Fallarero, A., Andrade-Wartha, E. R. S., Oliveira, A. M. S., De Lima, A., Pavan, T. R., Vuorela, P., Mancini-Filho, J. (2006) "Composición química y actividad

antioxidante del alga roja *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe.” *Revista Brasileña de Ciencias Farmacéuticas*. 42(4): 589-600.

Villalobos, C. (2016) “Posee Politécnico la más importante colección de algas en México”. Selección Gaceta Politécnica. 29-33.

Villarreal-Gómez, L. J., Soria-Mercado, I. E., Guerra-Rivas, G. y Ayala-Sánchez, N. E. (2010) “Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their Surface.” *Revista de Biología Marina y Oceánica*. 45(2): 267-275.

Vollenweider, R., Rinaldi, A., Viviani, R. y Todini, E. (1996) “Assessment of the state of eutrophication in the Mediterranean Sea”. MAP Technical Reports Series.106: 228 pp.

Wang, H. y Bun, T. N. (2002) “Isolation of an Antifungal Thaumatin-like protein from kiwifruit fruits”. *Phytochemistry*. 61: 1-6.

Wynne, M. J. (1989) “The re-instatement of *Hydropuntia* Montagne (Gracilareaceae, Rhodophyta). *Taxon*. 38: 476-479.

Zahra, R., Mehranian, M., Farzaneh, V. y Kohzad, S. (2007) “Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*.” *African Journal of Biotechnology*. 6 (24): 2740-2745.

Zubia, M., Robledo, D. y Freile-Pelegri Y. (2007) “Actividad antioxidante en macroalgas marinas tropicales de la Península de Yucatán, México.” *Journal of Applied Phycology*. 19: 449-458.