



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
Química Marina

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

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARISOL AVILA ROMERO

TUTORA

Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado (Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
UNAM)

COMITÉ TUTORAL

Dr. Manuel Jiménez Estrada (Instituto de Química, UNAM)

Dra. Hilda León Tejera (Facultad de Ciencias, UNAM)

Dra. Ana María García Bores (Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM)

Dr. José Guillermo Avila Acevedo (Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM)

Asesora externa: M. en C. Gloria Garduño Solorzano (Facultad de Estudios Superiores
Iztacala, UNAM)

MÉXICO, D. F. ENERO 2016



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.



Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



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

T E S I S

que para obtener el grado académico de

MAESTRA EN CIENCIAS

(Química Marina)

p r e s e n t a

MARISOL AVILA ROMERO

Directora de Tesis: Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado

Comité Tutorial: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Dra. Hilda León Tejera

Dra. Ana María García Bores

Dr. José Guillermo Avila Acevedo

Asesora externa: M. en C. Gloria Garduño Solorzano

México D. F. 2016

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por ser mi casa de estudios y darme la oportunidad de crecer académica, profesional y laboralmente.

Al laboratorio de Farmacognosia-Fitoquímica por ser el lugar donde he crecido como académica y como persona. A TODOS los que forman parte de este gran equipo.

A los miembros del Comité Tutorial por sus aportaciones que enriquecieron este trabajo. Gracias a todos por compartir conmigo su sabiduría.

Dr. Manuel Jiménez Estrada

Dra. Hilda León Tejera

Dra. Ana María García Bores

Dr. Guillermo Avila Acevedo

M. en C. Gloria Garduño Solorzano

A la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado, mi Nani querida, por ser mi apoyo en todo momento, porque aunque hubo momentos difíciles que tuvimos que superar, nunca dejo de confiar en mí. Porque en usted encontré no solo una tutora sino una gran amiga en quien yo me puedo apoyar en cualquier circunstancia. Mi admiración, respeto y cariño.

A la Dra. Ana María García Bores, mi ángel, la persona que indudablemente me mandaron para ayudarme a caminar. Porque siempre ha estado de manera incondicional para mí, gracias por todas sus aportaciones invaluable a mi trabajo, gracias por no dejarme caer cuando mas lo necesitaba, gracias por siempre tener la palabra adecuada para calmar mi alma, gracias por quererme tanto a mí y a mi familia. Mi admiración, respeto y cariño.

Al Dr. Guillermo Avila Acevedo, doc, por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio, por tenerme la confianza de permitirme trabajar y colaborar con ustedes. Porque siempre solucionaba mis

dudas de la mejor manera, por siempre tener esa gran sonrisa para nosotros y hacernos ver lo maravillosa que es la Biología. Mi admiración, respeto y cariño.

A la M. en C. Gloria Garduño Solorzano, gracias maestra Gloria por todo el apoyo que he recibido de usted desde el día que la conocí. Por todas las enseñanzas y las largas horas trabajo en su laboratorio, por las charlas, los consejos, las observaciones y contagiarme el amor a las algas.

A mis compañeras y amigas M. en C. Julieta Orozco Martínez y Montserrat Espinosa González, Julis y Mons, porque he pasado agradables momentos a su lado, llenos de risa, apoyo, problemas, buscando superarnos en todos los aspectos.

A la M. en C. Martha Urzua Meza, “Martita”, gracias por ser una amiga en la que puedo confiar, gracias por escucharme y aconsejarme en todos los aspectos de mi vida y por siempre estar cuando la necesito.

A mis alumnas Carolina Carranza Nestitla y Zulema Hernández Ruiz, mi niñas queridas Caro y Zule, gracias por hacerme crecer como académica, por confiar en mí, por ayudarme en este proceso que ustedes saben que no fue nada fácil, gracias por tenerme tanta paciencia, siempre las voy a llevar en mi mente, las quiero.

A Doña Betty por hacerme las mañanas de trabajo agradables, por las interminables pláticas, por los consejos y por ser parte de esta gran familia que nos apoya en todo momento.

A todos los miembros del laboratorio Farmacognosia-Fitoquímica, Rocío, Aurora, Erick, Cristina, Alma, Fanny, Ari, Miguel, Alfonso, Dafne, Sayil, Carito, Diana, Ángel, Fernanda, George, Pedro, Karen y Ernesto, por hacer el trabajo diario más ameno, logrando que uno disfrute estar en el laboratorio.

DEDICATORIAS

A Andrés

Por ser mi gran amor, por ser el motor de mi vida, porque siempre he contado con tu ayuda incondicional, por las largas horas de espera y paciencia, por la familia que estamos formando, porque eres la mejor bendición que llegó para mí, por ser un increíble compañero de vida. Por todo lo que aún nos falta por vivir..... TE AMO MI AMOR.

A mis padres, Alma Rosa y Alejandro

Por su infinito amor, por darme la oportunidad de vivir y realizarme como persona, porque gracias a ustedes esto es lo que soy, por siempre brindarme su ayuda, por ser los ángeles de mi vida. LOS AMO INFINITAMENTE

A mi hermana, Marlene

Porque eres mi mejor amiga, mi cómplice, por todos los sacrificios que pasamos juntas, por siempre tener las palabras adecuadas, por quererme y porque todo lo que he logrado siempre has estado tú. TE AMO MAR.

A mi abue, Inés

Porque aunque tu mente ha volado a otro lado, recibí de ti las mejores cosas, por quererme y enseñarme tanto, porque si por alguien estoy aquí es por ti, por hacerme ver lo hermosa que es la vida. TE AMO ABUE.

A mi tía, Lulú

Porque siempre hemos sido tu orgullo, por quererme como si fuera tu hija, por siempre ser el apoyo de mi familia, porque nunca nos has dejado, por siempre estar al pendiente de todas las actividades durante este largo camino. TE QUIERO LULÚ.

A mis suegros, Irene y Andrés

Por brindarme todo su apoyo en esta etapa, por sus consejos y la buena vibra que siempre nos transmiten. Por acogerme como parte de su familia. LOS QUIERO MUCHO

A mi cuñada, Alejandra

Por apoyarme en esta meta, porque lo que ha estado en tus manos lo has hecho por nosotros. TE QUIERO.

A la vida, por este regalo tan maravilloso.....

*Vivé como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a
vivir siempre..*

Mahatma Gandhi

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	13
Introducción	14
Antecedentes	15
Objetivo general	19
Área de colecta	21
Estrategia metodológica	22
Resultados	29
Discusión	58
Conclusiones	70
Referencias	72
Anexos	82

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Algas marinas del SAV, división Chlorophyta	30
Tabla 2	Algas marinas del SAV, división Rhodophyta	30
Tabla 3	Algas marinas del SAV, división Ochrophyta	31
Tabla 4	Cianobacterias del SAV	31
Tabla 5	Rendimiento de los extractos metanólicos de las macroalgas del SAV	33
Tabla 6	Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos algales del SAV	35
Tabla 7	Actividad antifúngica de los extractos metanólicos algales del SAV	36
Tabla 8	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos metanólicos algales del SAV	38
Tabla 9	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) de los extractos metanólicos algales del SAV	39
Tabla 10	Rendimiento de los extractos de <i>C. barbata</i>	40
Tabla 11	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>C. barbata</i>	41
Tabla 12	Escala de toxicidad en larvas nauplio de <i>A. salina</i>	47
Tabla 13	Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas del extracto acetónico de <i>C. barbata</i>	49
Tabla 14	Compuestos detectados por CG-EM de la fracción 5 del	50

extracto acetónico de *C. barbata*.

Tabla 15	Compuestos detectados por CG-EM de la fracción 6 del extracto acetónico de <i>C. barbata</i>	51
Tabla 16	Compuestos detectados por CG-EM de la fracción 2 del extracto acetónico de <i>C. barbata</i>	51
Tabla 17	Compuestos detectados por CG-EM de la fracción 3 del extracto acetónico de <i>C. barbata</i>	52
Tabla 18	Compuestos detectados por CG-EM de la fracción 4 del extracto acetónico de <i>C. barbata</i>	53
Tabla 19	Estructuras químicas de los compuestos del extracto acetónico de <i>C. barbata</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Mapa de localización de sitios (arrecifes) de muestreo en el SAV	21
Figura 2	Número de especies por división en los diferentes arrecifes	32
Figura 3	Comparación de la actividad antimicrobiana entre grupos algales	37
Figura 4	Curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 expuesta al extracto metanólico de <i>C. barbata</i> . T: testigo, CMI: Concentración Mínima Inhibitoria, CBM: Concentración Bactericida Mínima	42
Figura 5	Actividad antioxidante del extracto metanólico de <i>C. barbata</i> sobre el radical DPPH	43
Figura 6	Actividad antioxidante del extracto acetónico de <i>C. barbata</i> sobre el radical DPPH	44
Figura 7	Cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de <i>C. barbata</i>	45
Figura 8	Cuantificación de fenoles totales del extracto acetónico de <i>C. barbata</i> , segunda colecta	46
Figura 9	Ensayo de toxicidad en larvas nauplio de <i>A. salina</i> sometidas al extracto metanólico de <i>C. barbata</i>	47
Figura 10	Ensayo de toxicidad en larvas nauplio de <i>A. salina</i> sometidas al extracto acetónico de <i>C. barbata</i>	48
Figura 11	Placa cromatográfica de las fracciones de la separación en columna abierta del extracto acetónico de <i>C. barbata</i> reveladas con DPPH	49
Figura 12	<i>C. barbata</i> . Crecimiento, ápices con mechones de filamentos (arriba izquierda) y facies de los utrículos calcificadas (como	83

panal de abejas, arriba derecha), hábito (abajo

Figura 13 *C. barbata*. A y B: segmentos con articulaciones, detalles del
sifón estructural. C: crecimiento

84

LISTA DE ABREVIATURAS

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BHT	Butilhidroxitolueno
BHA	Butilhidroxianisol
CA ₅₀	Capacidad antioxidante media
CBM	Concentración bactericida mínima
cc	Cromatografía en columna
ccf	Cromatografía en capa fina
CF ₅₀	Concentración fungicida media
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CL ₅₀	Concentración letal media
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DPPH	Difenil-picril-hidracilo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Food and drug administration
FeCl ₃	Cloruro férrico
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
MH	Müller Hinton
MS	Metabolitos secundarios
PDA	Agar Papa Dextrosa
SAV	Sistema Arrecifal Veracruzano
UFC	Unidades formadoras de colonia
TTC	Cloruro de tetrazolio

RESUMEN

La importancia de los productos naturales marinos se ha reconocido por las diversas actividades biológicas que poseen, entre estas destacan la actividad antimicrobiana y antioxidante. Dentro de los antimicrobianos se están buscando sustancias novedosas a los que los microorganismos no han sido expuestos debido a la problemática que causa la resistencia microbiana. Por otro lado, las sustancias antioxidantes juegan un papel importante en el papel de varios padecimientos y enfermedades crónico degenerativas, por lo que son muy apreciados en las industrias cosmética, alimenticia, médica, etc. En las macroalgas se han reportado grupos de metabolitos secundarios como terpenos, esteroides, saponinas, taninos, alcaloides, entre otros. En el actual trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas del Sistema Arrecifal Veracruzano para contribuir al conocimiento de la química de las algas marinas. La determinación taxonómica de las especies colectadas en el Sistema Arrecifal Veracruzano se realizó mediante análisis de la morfología y la utilización de claves habiéndose determinado 22 especies de macroalgas. Se encontraron dos nuevos registros de especies para la zona que fueron *Hypnea spinella* (C. Agardh) Kützinger y *Laurencia gracilis* (C. Agardh) Montagne y un nuevo registro para México *Compsothamnion thuyoides* (Smith) Nägeli. La evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana se realizó mediante la técnica de difusión en agar o de Kirby-Baüer y la prueba cuantitativa con la técnica de dilución en agar para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima. De las 22 especies algales se realizaron ensayos para evaluar la actividad antimicrobiana y de estas fue seleccionada *Cymopolia barbata* por ser la que presentó la mayor actividad. El extracto acetónico de esta especie presentó actividad antimicrobiana en *Salmonella tify*, *Staphylococcus epidermidis* cc, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Candida glabrata*, *C. albicans* ATCC 14065, *C. albicans* cc y *Candida tropicalis*. Además, se observó un efecto bacteriostático sobre la curva de crecimiento de una población de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. La actividad antioxidante del extracto se evaluó mediante la determinación de la concentración antioxidante media (CA_{50}) a través de la decoloración del radical difenil-picril-hidracilo, teniendo el extracto acetónico de *C. barbata* una $CA_{50}=226.97 \pm 0.01$ $\mu\text{g/mL}$ con una cantidad de fenoles de 15.81 μg equivalentes de ácido gálico por miligramo de extracto. La prueba de toxicidad se realizó con el modelo de *A. salina* donde registró una $CL_{50}= 47.82$ $\mu\text{g/mL}$, siendo el extracto acetónico de *C. barbata* muy tóxico. El extracto acetónico de *C. barbata* se fraccionó en una columna cromatográfica de forma biodirigida. Se obtuvieron 22 fracciones en total de las cuales cinco mostraron actividad antimicrobiana y/o antioxidante. Las fracciones no polares del extracto acetónico de *C. barbata* fueron analizadas en CG-EM, los cromatogramas revelaron como constituyentes principales a ácidos grasos como el ácido linoléico, ácido tetradecanóico, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, ácido vaccénico, ácido palmitoleico y el aldehído hexadecadienal. A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que probablemente la actividad antimicrobiana se deba principalmente a los compuestos bromados y la dipropetrina y el potencial antioxidante este dada por la presencia de ácidos grasos.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales también conocidos como metabolitos secundarios poseen actividades biológicas muy importantes, por lo que se han utilizado en terapéutica o tomado como modelo para realizar modificaciones estructurales específicas y generar nuevos fármacos. Estos se han obtenido de plantas, hongos y organismos marinos cuya función aún no se conoce con exactitud, aunque se piensa que muchos tiene la función en los seres vivos de defenderlos de diversos agentes externos como competencia por sustrato, sobrevivencia ante los depredadores, variaciones climáticas, etc (García, 2011).

La mayoría de los metabolitos secundarios han sido extraídos de plantas terrestres, mientras que el medio marino carece en general de una historia etnobiológica y etnomédica. Aproximadamente, desde hace 40 años se están desarrollando estudios que han demostrado que el medio marino es un excepcional banco de sustancias bioactivas (Lenis *et al.*, 2007).

Los productos naturales marinos ofrecen una alternativa para diversos padecimientos y de éstos sólo se conocen 15,000 compuestos que es apenas una décima parte de los terrestres (De la Calle, 2007). Diversas investigaciones han demostrado que los organismos marinos son una fuente natural de sustancias con actividad biológica, ya que tiene la capacidad de biosintetizar y liberar potentes sustancias químicas que son activas, entre las cuales se reportan compuestos anticancerígenos, antimicrobianos, antimicóticos, antioxidantes, antiinflamatorios y antimaláricos (Martínez *et al.*, 2007).

Existe una amplia variedad de antimicrobianos naturales, los cuales se han desarrollado a partir de microorganismos, plantas, animales, algas, etc. Estos contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y hongos. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores del crecimiento (Inclán-Sánchez, 2004).

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides y actúan principalmente sobre las membranas de los microorganismos invasores (Inclán-Sánchez, 2004).

Los sitios de acción de los agentes antimicrobianos incluyen a la membrana celular, en la síntesis de proteínas, pared celular y el sistema genético. Todos ellos puntos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos y cualquier acción sobre ellos puede inactivar a la célula microbiana (Madigan *et al.*, 2009).

Por otro lado, los antioxidantes son moléculas con gran afinidad a los radicales libres actúan cediendo electrones a las especies reactivas, así evitan que éstas dañen a las biomoléculas como: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, necesarias para la estructura y función celular. Una vez que los radicales libres reaccionan con los antioxidantes se reducen parcialmente o se unen en forma de aductos, reduciendo su reactividad y oxidando al antioxidante (Muñoz, 2015).

ANTECEDENTES

Actualmente la búsqueda de compuestos con actividad biológica en organismos marinos, particularmente en algas marinas empieza a despuntar, pues en algunos lugares como es el caso de la medicina tradicional China, son usadas para curar enfermedades como el bocio, combatir desórdenes estomacales y de hipertensión entre otras (De Lara-Isassi, 1996). De estas se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios como: diterpenos, eicosanoides, lecitinas, esteroides, saponinas, taninos, terpenos, alcaloides, ácidos grasos, etc (Lenis *et al.*, 2007; Mendiola *et al.*, 2005).

Algunos autores como Mautner y colaboradores (1953) reportan que el extracto de *Rhodomela larix* (Turner) inhibió el crecimiento bacteriano, aislando un compuesto fenólico bromado que fue el responsable de la actividad biológica. Martínez-Nadal y colaboradores (1963) trabajaron en Puerto Rico y llegaron a la conclusión de que los compuestos sarganina y chonalgina aislados de *Sargassum natans* y *Chondria littoralis* respectivamente, tienen más capacidad antibiótica que la penicilina, la

estreptomycin y la clorotetraciclina, inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium smegmatis*.

Burkholder y colaboradores (1960) investigaron 20 especies de macroalgas como inhibidores del crecimiento de dermatofitos, bacterias Gram positivas, Gram negativas y bacterias marinas. En 1979 Henríquez y colaboradores, trabajaron las poblaciones de algas chilenas e informaron que 27 algas de las 33 estudiadas (51.5%) fueron activas contra bacterias patógenas al hombre. Por otro lado, Norris y Fenical (1982) realizaron estudios similares con especies algales de la costa de Belice, interpretando la presencia de metabolitos secundarios con acción antibiótica como una estrategia de defensa contra la herbivoría y para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos presentes en el medio.

Entre los trabajos publicados sobre especies de algas en el territorio mexicano De Lara-Isassi y colaboradores (1996) realizaron un estudio el cual se llevó a cabo en las costas de Oaxaca específicamente en las localidades de Cacalotepec, Puerto Escondido, Carrisalillo, Punta de Zicatela, Playa Zipolite, Playa Muertos, Punta Arena y Bahía Tangolunda, donde se realizaron extractos acetónicos de 18 especies algales. Las especies fueron: *Chaetomorpha antennina*, *Cladophoropsis robusta*, *Codium giraffa*, *Enteromorpha intestinalis*, *Halimeda discoidea*, *Ulva lactuca*, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa racemosa* (Chlorophyta), *Amphiroa beauvoissi*, *Amphiroa mexicana*, *Rhodymenia pacifica*, *Hypnea spinella* (Rhodophyta), *Chnoospora minima*, *Sargassum liebmannii*, *Padina durvillaei*, *Padina gymnospora* y *Padina crispata* (Ochrophyta). De éstas, el 50% tuvieron actividad en la cepa de *S. aureus* y cinco extractos fueron activos contra *S. pyogenes*. Ambas cepas son Gram positivas. Los extractos algales no tuvieron actividad en bacterias Gram negativas.

También De Lara-Isassi (1991) investigó algunas algas del estado de Veracruz en localidades como Barra Corazones, Escollera Tuxpan, Barra Cazonas, Punta Delgada, Punta la Litera, La Mancha y Costa de Oro. En estos lugares encontraron un 33% de especies activas. Este autor en el mismo año, trabajó con

representantes de la flora ficológica de los estados de Sonora y Sinaloa hallando un 62% de especies con actividad antibacteriana.

En estudios realizados por De Lara-Isassi y colaboradores (1999) se utilizaron diferentes extractos (agua, alcohol o acetona) de 57 especies de macroalgas. 12 de ellas de la división Chlorophyta, 13 integrantes de la división Ochrophyta y 32 pertenecientes a la división Rhodophyta. Las especies fueron colectadas en 6 estados de la República Mexicana: Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán ubicadas en aguas del Golfo de México y en el estado de Quintana Roo y en el Caribe Mexicano. Se evaluó la actividad en cuatro cepas de microorganismos, dos bacterias Gram positivas (*S. pyogenes* y *S. aureus*) y dos Gram negativas (*E. coli* y *S. sonnei*). Del total de especies colectadas el 54% de ellas (31 especies) presentaron actividad antibiótica en al menos uno de sus extractos en alguna de las cepas bacterianas usadas. Cabe destacar que para fines del presente trabajo se tuvo especial interés por las especies que se colectaron en Veracruz por pertenecer a la misma área de investigación. En esta zona se colectaron 23 especies de algas de las 3 divisiones de lugares como Costa de Oro, La Mancha, Barra Cazonas, Punta La Litera, Punta Delgada, Escollera Tuxpan y Punta El Morro. Solo 10 especies reportaron efecto sobre *S. aureus*. Las algas con mayor actividad antibacteriana en el extracto acetónico fueron *Cladophora sericea* e *Hypnea spinella*.

Por otro lado, los antioxidantes naturales provenientes de algas juegan un papel importante en el desarrollo de varias enfermedades crónico degenerativas. Las macroalgas producen antioxidantes los cuales son una buena fuente debido a que estos organismos están expuestos constantemente a la radiación solar. Esto permite la formación de radicales libres y algunas especies reactivas de oxígeno (ERO). A pesar de lo anterior las algas presentan resistencia a los procesos de oxidación y la reestructuración de sus componentes, indicando la presencia de sistemas de defensa antioxidantes eficientes en sus células (Batista *et al.*, 2009; Kelman *et al.*, 2012; Balboa *et al.*, 2013).

Algunos autores como Zubia y colaboradores (2007) han reportado actividad antioxidante de cuatro macroalgas de la Península de Yucatán: *Avrainvillea longicaulis* (1.44 ± 0.01 mg/mL), *Halimeda tuna* (6.17 ± 0.01 mg/mL), *Caulerpa cupresoides* (6.35 ± 0.15 mg/mL) y *Caulerpa paspaloides* (7.36 ± 0.16 mg/mL), en donde todas presentan valores muy cercanos a antioxidantes comerciales conocidos.

Matsukawa (1997) reportó que *Enteromorpha linza* (Chlorophyta) tiene poca actividad, ya que inhibe en menos del 50% al radical DPPH .

En cuanto a los reportes sobre la composición química de las macroalgas destacan el trabajo de Ganesan y colaboradores en el 2008. Estos autores publican el aislamiento de filofeolina (*Eisenia bicyclis*), florotaninos (*Sargassum kjellmanianum*) y fucoxantina (*Hijikia fusiformis*), estos son algunos de los compuestos identificados como antioxidantes.

Otros autores como Xiao-Juan y colaboradores (2006) detectaron la presencia de carotenoides derivados del tocoferol como la vitamina E y derivados de isoprenoides en organismos marinos y macroalgas, estas sustancias tienen actividad antioxidante.

Ali A El Gamal (2010) ha trabajado con la división Chlorophyta. Menciona que existen poco reportes de nuevos metabolitos secundarios obtenidos de esta división, en comparación con Rhodophyta y Ochrophyta. Este autor identificó dos compuestos, el primero de *Ulva lactuca* el 3-O- β -D-glucoriranosida-5, 25 dieno y el segundo de *Cladophora fascicularis* el 2-(2',4'-dibromofenoxy)-4,6 dibromoanisol. Mismos que presentaron actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria.

JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana o antioxidante han sido obtenidos de organismos del medio terrestre; sin embargo el potencial de las macroalgas las hace candidatas ideales para conocer nuevos compuestos bioactivos provenientes de estos organismos marinos. Dado que el estudio de macroalgas como agentes antimicrobianos y antioxidantes son escasos en México y nulos en el SAV, se hace necesario dedicar esfuerzos encaminados hacia el campo de la ficología aplicada. Los resultados obtenidos hasta este momento indican que existe un gran potencial en éstos organismos para ser utilizados en el control de enfermedades producidas por algunos agentes patógenos y como fuentes de antioxidantes.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las macroalgas del Sistema Arrecifal Veracruzano tendrán efecto antimicrobiano y antioxidante?

HIPÓTESIS

Se conoce que las macroalgas producen compuestos contra algunos patógenos producto de las interacciones que se dan en el medio marino, además de estar sometidas a la radiación solar lo que da lugar a la producción de sustancias con potencial antioxidante, por tanto las macroalgas del SAV deberán contener metabolitos secundarios con dichas bioactividades.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas marinas de las divisiones Rhodophyta, Ochrophyta y Chlorophyta del Sistema Arrecifal Veracruzano.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Colectar y determinar el material biológico.
- Obtener extractos algales de diferente polaridad y determinar su rendimiento.
- Determinar la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) de los diferentes extractos de macroalgas contra cepas de importancia clínica.
- Obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Bactericida Mínima (CBM), Concentración Fungicida Mínima (CFM) y la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) de los extractos que presenten actividad.
- Determinar el efecto de los extractos activos sobre la curva de crecimiento de bacterias Gram positiva y negativa.
- Identificar cualitativamente los principales grupos de metabolitos secundarios en el extracto con mayor actividad.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos de las algas colectadas.
- Evaluar la toxicidad general de los extractos de las algas colectadas.
- Conocer la composición química del extracto que presente la mayor bioactividad.
- Contribuir al conocimiento de los productos naturales marinos del SAV.

ÁREA DE COLECTA

El Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) es un área Natural Protegida. Éste es el sistema arrecifal más complejo en el Sur del Golfo de México. Se localiza en la zona del Puerto de Veracruz y Antón Lizardo, consta de 15 estructuras arrecifales, algunas de ellas bien desarrolladas. Este complejo arrecifal está formado por dos grupos de arrecifes divididos por la desembocadura del Río Jamapa. El grupo norte lo conforman los arrecifes: Punta Gorda, Punta Majahua, Galleguilla, Gallega, Anegada de Adentro, Blanquilla, Pájaros, Isla Verde, Hornos, Isla Sacrificios y Punta Mocambo. El grupo sur lo conforman los arrecifes: Anegada de Afuera, Topatillo, Santiaguillo, Anegadilla, Polo, Isla de Enmedio, Blanca, Chopas, Rizo y Cabezo (Tunnell, 1988).

De estos, fueron seleccionados seis arrecifes: del grupo Norte a Blanquilla, Gallega e Isla Verde y del grupo Sur, al arrecife Giote, Isla de Enmedio y Santiaguillo (Figura 1).

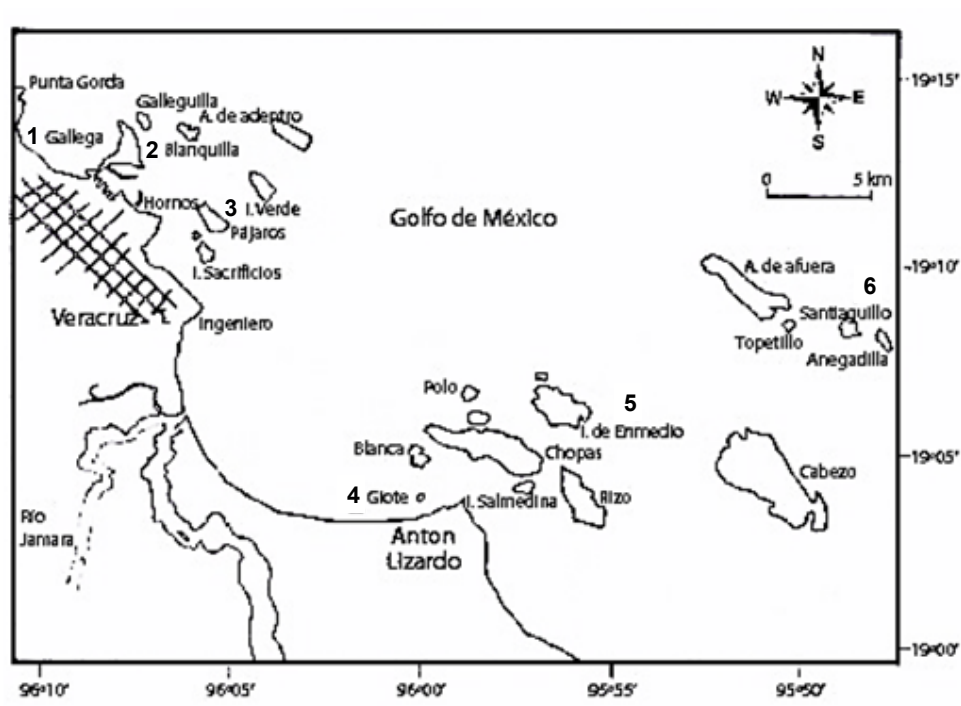


Figura 1. Mapa de localización de sitios (arrecifes) de muestreo en el SAV. 1) Gallega, 2) Blanquilla, 3) Isla Verde, 4) Giote, 5) Isla de Enmedio y 6) Santiaguillo.

Para el área de estudio, algunos autores dividen el año en tres estaciones climáticas bien establecidas. La primera llamada de “secas” que abarcan de marzo a mayo con temperatura en promedio de 24 °C, velocidades del viento de 6.1 m/s precipitación mínima de 6.0 mm. La segunda es la época de “lluvias”, que comprende de junio a octubre, se registran las temperaturas más altas, en promedio de 26.8 °C, velocidades del viento mínimas de alrededor de 3.8 m/s y con las máximas precipitaciones en promedio de 200 a 400 mm. Finalmente, se tiene a la temporada de “nortes” de noviembre a febrero, caracterizada por temperaturas bajas con promedios de 20 °C, velocidades del viento altas de 7 m/s y precipitación de 24.0 mm en promedio (Tunell, 1988).

ESTRATEGIA METODOLÓGICA

1.- COLECTA DE MATERIAL

Las diferentes especies de macroalgas de las tres divisiones (Chlorophyta, Rhodophyta y Ochrophyta) fueron colectadas en el SAV. El muestreo se llevo a cabo el 23 y 24 de mayo del 2013; la segunda colecta se realizó el 17 y 18 de junio del 2014.

Todas las macroalgas colectadas fueron separadas del substrato con la ayuda de una espátula o en su defecto extraídos manualmente del piso intermareal rocoso y de las zonas arrecifales. Para cada especie se colectó un aproximado de 300 g. En la bitácora de campo se registraron datos como son: número de muestra, fecha, localidad, tipo de sustrato (arenoso o rocoso), profundidad de la columna de agua y observaciones pertinentes (turbidez del agua, epífitos, etc.).

Una vez realizada la colecta, las algas se enjuagaron con agua de mar con la finalidad de eliminar la arena, residuos sólidos y la fauna asociada. Inmediatamente después se preclasificaron por grupos de acuerdo a su color, una parte se colocó en una bolsa de plástico para su posterior congelación, esto con la finalidad de evitar al máximo la degradación enzimática para trasladarlas al Laboratorio de Farmacognosia-Fitoquímica de la FES Iztacala. La otra parte se

preservó en formol al 4% para su posterior identificación taxonómica y su incorporación a la colección científica del herbario IZTA (Thiers, 2015).

2.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Las determinaciones taxonómicas se realizaron a partir del análisis de caracteres morfológicos mediante observaciones en el microscopio óptico para identificar estructuras externas y posteriormente con ayuda de cortes y tinciones. En cada caso se identificaron estructuras internas que definen de manera particular la especie. En el transcurso de todo este trabajo se utilizaron las obras de: Brandão, 1967; Aviles, 1990; Littler & Litter, 2000; Ortega *et al.*, 2001; Senties & Dreckmann, 2002; Dawes & Mathieson, 2008. Los nombre científicos válidos fueron verificados en el *Index Nominum Algarum* y Guiry & Guiry, 2015.

3.-OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Una vez que se tuvo el material en el laboratorio, la parte preservada para los ensayos microbiológicos se limpió manualmente con ayuda de un microscopio estereoscópico. Esto con la finalidad de eliminar todas las algas epífitas y/o otros organismos marinos. Después de ser limpiadas se sonicaron para eliminar las epífitas, pequeños pedazos de arena y sal que pudieran quedar.

Una vez limpio el material se colocó sobre papel absorbente con el fin de eliminar el exceso de agua, procediéndose a la obtención de los extractos algales. La preparación de los mismos se efectuó macerándose con metanol.

Una vez obtenidos los extractos metanólicos, fueron filtrados y concentrados a presión reducida. Se determinó su rendimiento por diferencia de peso (Avila, 1996).

4.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

4.1 Actividad antibacteriana

4.1.1 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.

Para la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Koneman, 1996). Los sensidiscos fueron impregnados con 2 mg del extracto algal. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de cloramfenicol y como control negativo se colocaron 10 µL de cada uno de los solventes empleados. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Anexo II).

La actividad antibacteriana fue evaluada en cuatro cepas, de las cuales dos son Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Staphylococcus epidermidis*) y dos Gram negativas (*Escherichia coli* aislada de un caso clínico y *Salmonella tiphy*).

4.1.2 Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos que presentaron actividad se realizó por la técnica de dilución en agar (Koneman, 1996). Las concentraciones que se utilizaron para cada bioensayo fueron: 0.0312, 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Anexo II).

4.1.3 Efecto del extracto sobre la curva de sobrevivencia.

La evaluación de la sobrevivencia bacteriana se hizo en la cepa que presentó mayor sensibilidad, para lo cual se monitoreo su crecimiento en nueve tiempos durante 24 horas al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto (CMI, ½ CMI, CBM) y un grupo testigo (sin extracto) (Avila, 1996) (Anexo III).

4.2 Actividad antifúngica

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó en nueve cepas de hongos levaduriformes y en cinco cepas de hongos miceliados.

Levaduras:

Candida albicans aislada de urocultivo, *C. albicans* y *C. tropicalis* aisladas de un caso clínico, donada por el Laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala (UNAM), *C. albicans* ATCC 14065, donadas por la FES Cuautitlán (UNAM), *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* aisladas de casos clínicos, donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano).

Hongos filamentosos:

Fusarium sporotrichum NRLL 3299, *Aspergillus niger*, *Trichophyllum mentagrophytes*, *Fusarium moniliforme*, donadas por el Laboratorio de Fisiología vegetal de la UBIPRO, FES-Iztacala y *Rizoctonia solani* donada por el INIFAP, Celaya, México.

4.2.1 Evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antifúngica para levaduras.

Para la evaluación de la actividad antifúngica sobre hongos levaduriformes se empleó el método de difusión en agar de Kirby-Baüer, mediante el uso de agar papa dextrosa (PDA). Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de nistatina.

La evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) de los extractos sobre hongos levaduriformes se determinó utilizando la técnica de dilución en agar (Koneman, 1996).

4.2.2 Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica para hongos filamentosos.

Para el método cualitativo de inhibición de crecimiento radial se utilizaron sensidiscos impregnados con 2 mg de los extractos algales. El control negativo fueron 10 µL de la mezcla de solventes a utilizar y como control positivo 25 µg de ketoconazol. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Wang y Bun, 2002).

4.2.3 Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica de hongos filamentosos.

Para la determinación de la Concentración Fungicida Media (CF_{50}) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento lo cual corresponde a la CFM; mientras que la concentración que representa el 50% de inhibición es la CF_{50} , esto se calcula con una regresión lineal. Las concentraciones para cada bioensayo fueron: 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/mL. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Wang y Bun, 2002).

5.0 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO BIOACTIVO de *C. barbata*

5.1 Prueba cualitativa para la detección los principales metabolitos secundarios.

Para la detección de alcaloides en el extracto acetónico de *C. barbata* se utilizaron los reactivos Drangendorff y Mayer (Wagner, 2001), mientras que para fenoles se realizó con una solución de cloruro férrico ($FeCl_3$) al 1%. Los monoterpenos se detectaron por la prueba de Vainilla-HCl. En el caso de glicósidos se utilizó la prueba de Molisch y por último para la prueba de saponinas se hizo la prueba de hemólisis (Dey y Harborne, 1989).

5.2 Prueba cuantitativa para fenoles

La concentración de fenoles totales se cuantificó por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utilizó fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (Método modificado de Vernon *et al.*, 1999).

6.0 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *C. barbata*.

Para el fraccionamiento del extracto acetónico de *C. barbata* se realizó una cromatografía de adsorción en columna abierta (cc), la cual se realizó sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck malla 70-230 ASTM). Como fase estacionaria y la fase móvil fueron mezclas ascendentes de hexano-acetona-metanol. Cada alicuota obtenida se analizó por cromatografía en capa fina (ccf) usando cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck 0.2 mm de espesor). Como agentes cromogénicos se emplearon: 1) revelado con luz UV a 254 y 366 nm (Ultraviolet Fluorescence Analysis Cabinet Spectroline Mod CX-20), y 2) una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado, en este caso para observarse el desarrollo del color fue necesario calentar ligeramente las placas cromatográficas durante dos minutos.

7.0 CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES ACTIVAS

Las fracciones no polares obtenidas de la cromatografía en columna abierta fueron analizadas en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas para conocer la composición química de estas. El análisis de llevo acabo en el laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala.

La identificación de los picos del cromatograma se realizó por la comparación del espectro de masas disponibles en la base de datos NIST MS Search 2.0, ver anexo IV.

8.0 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante fue evaluada en todos los extractos algales por el método de decoloración del radical 2, 2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) 250 µM. A partir de una solución stock de 10 mg de extracto disuelto en 10 mL de metanol, se prepararán las siguientes diluciones: 37.5, 75, 125, 135, 150, 200, 250, 300 ppm. Como control negativo se utilizarán pozos con 200 µL de MeOH y como control positivo se utilizó quercetina a las mismas concentraciones que el extracto algal (García-Bores, 2010).

Este método permite evaluar la actividad antioxidante a través del grado de decoloración de una solución metanólica de DPPH, debido a la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones por medio de espectrometría VIS a una longitud de onda de 517 nm (Rivero y Betancort, 2006).

Para determinar la capacidad antioxidante media (CA_{50}) del extracto metanólico y acetónico de *C. barbata* se obtuvo el porcentaje de decoloración del DPPH de cada una de las concentraciones (31.25-150 ppm). El porcentaje de reducción se calculó con la siguiente fórmula

$$\% \text{ de decoloración} = 1 - (\text{absorbancia del problema} / \text{absorbancia del blanco}) \times 100$$

La CA_{50} expresa la cantidad necesaria de un antioxidante para reducir en un 50% al radical DPPH. Valores bajos de CA_{50} indican un mayor potencial antioxidante (García-Bores, 2010; Muñoz, 2015).

9.0 TOXICIDAD GENERAL

El ensayo de toxicidad se realizó con larvas nauplio de *Artemia salina*. Las larvas fueron colocadas en frascos de vidrio transparentes con 10 mL de solución de NaCl al 0.5% cada uno. Las concentraciones del extracto algal fueron 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Como control negativo se empleó dimetilsulfóxido (DMSO). Los frascos de mantuvieron bajo luz blanca durante 24 h a temperatura ambiente (23 y 25 °C) para que posteriormente fueran cuantificadas las larvas sobrevivientes. La concentración letal media (CL_{50}) para cada extracto, se obtuvo interpolando en gráficas de porcentaje de sobrevivencia contra la concentración en $\mu\text{g/mL}$ a través del análisis de regresión. Todo lo anterior por triplicado (McLaughlin, 1991).

10.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los resultados obtenidos de los ensayos de actividad antimicrobiana se les aplicó un análisis de varianza factorial, en donde los factores fueron: extractos, cepas bacterianas y tipo bacteriano, cepas levaduriformes y hongos miceliados

RESULTADOS

EVALUACIÓN PRELIMINAR

Colecta

A partir de de la colecta del 23 y 24 de mayo del 2013, se obtuvieron 28 organismos los cuales fueron utilizados para realizar los ensayos de antimicrobianos. Con esta evaluación se determinó el taxa que se ocuparía para los siguientes ensayos.

Determinaciones taxonómicas

La identificación y conservación de ejemplares resulta de suma importancia para el registro científico. Además, es fundamental determinarlas porque las actividades biológicas varían entre las especies.

Las macroalgas colectadas en los seis arrecifes (Blanquilla, Gallega, Giote, Isla de Enmedio, Isla Verde y Santiaguillo) fueron determinadas. En las tablas 1, 2 y 3 se muestran los listados de las algas marinas del SAV por división. Se colectaron 28 macroalgas de las cuales se determinaron 22 especies y en una se llegó a nivel de género

El filo Chlorophyta presentó 7 especies diferentes. Los géneros *Caulerpa* y *Ulva* fueron registrados en más de un arrecife (Tabla 1).

En la tabla 2 se observan todas las macroalgas pertenecientes al grupo de las Rhodophyta, en total se determinaron 12 especies. Los géneros *Laurencia* y *Tricleocarpa* fueron los que presentaron mayor incidencia en los diferentes arrecifes. Es importante mencionar que se encontraron dos nuevos registros para la zona *Laurencia gracilis* (Gallega y Giote) y *Sebdenia flabellata* (Isla de Enmedio). Además de *Compsothamnion thuyoides* colectada en Blanquilla, la cual resultó ser un nuevo registro para México.

El filo Ochrophyta fue la que presentó un menor número de especies con solo cuatro registros: *Dictyota dichotoma*, *Padina boergenseni*, *Sargassum fluitans* y

Sargassum natans. La mayoría de las especies fueron encontradas en Isla de En medio (Tabla 3).

Tabla 1. Algas marinas del SAV filo Chlorophyta.

No.	Especie	Localidad	IZTA Herbario
1	<i>Caulerpa chemnitzia</i> (Esper) J. V. Lamouroux	S	1813
2	<i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskål) J.Agardh	BL, IV	1824, 1817
3	<i>Caulerpa sertularioides</i> (S. G. Gemlin) M. A. Howe	GA	1823
4	<i>Cymopolia barbata</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	IE	1812
5	<i>Dictyosphaeria cavernosa</i> (Forsskål) Børgesen	IE	1810
6	<i>Ulva intestinalis</i> Linnaeus	GA	1835
7	<i>Ulva lactuca</i> Linnaeus	GA	1829

Blanquilla (BL), Gallega (GA), Isla de Enmedio (IE), Isla Verde (IV), Santiaguillo (S)

Tabla 2. Algas marinas del SAV filo Rhodophyta

No.	Especie	Localidad	IZTA Herbario
1	<i>Amphiroa fragilissima</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	IE, IV	1822, 1837
2	<i>Ceramium</i> sp	GI	1818
3	<i>Compsothamnion thuyoides</i> (Smith) Nägeli **	BL	1836
4	<i>Galaxaura comans</i> Kjellman	BL, IV	1826, 1827
5	<i>Hypnea spinella</i> (C. Agardh) Kützing*	GA	1834
6	<i>Laurencia gracilis</i> J.D. Hooker y Harvey *	GA, GI	1819, 1815
7	<i>Laurencia obtusa</i> (Hudson) J.V.Lamouroux	GI, IE	1811, 1808
8	<i>Titanophycus validus</i> (Harvey) Huisman G.W. y A.R.Sherwood	GA	1820
9	<i>Sebdenia flabellata</i> (J.Agardh) P.G.Parkinson*	IE	1809

10	<i>Tricleocarpa cylindrica</i> (J.Ellis y Solander) Huisman y Borowitzka	BL	1825
11	<i>Tricleocarpa fragilis</i> (Linnaeus) Huisman y R.A.Townsend	IE	1821
12	<i>Wrangelia bicuspidata</i> Børgesen*	GI	1807

Blanquilla (BL), Gallega (GA), Giote (GI), Isla de En medio (IE), Isla Verde (IV). *Nuevo registro para la zona.
**Nuevo registro para México.

Tabla 3. Algas marinas del SAV filo Ochrophyta

No.	Especie	Localidad	IZTA Herbario
1	<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) J.V.Lamouroux	IE	1828
2	<i>Padina boergenseni</i> Vickers	IE	1806
3	<i>Sargassum fluitans</i> (Børgesen) Børgesen	S	1816
4	<i>Sargassum natans</i> (Linnaeus) Gaillon	IE	1814

Isla de Enmedio (IE), Santiaguillo (S)

Dos cianobacterias se colectaron durante el muestreo: *Phormidium* sp. y *Oscillatoria* sp., a estas también se les realizaron las pruebas biológicas para saber si presentaban actividad antimicrobiana aunque no fueran macroalgas (Tabla 4)

Tabla 4. Cianobacterias del SAV

Género	Localidad
<i>Phormidium</i> sp	GI
<i>Oscillatoria</i> sp	S

Giote (GI), Santiaguillo (S)

La figura 2 nos muestra el número de especies que se encontraron de cada división. Las algas del filo Rhodophyta las podemos encontrar en todos los sitios de muestreo. En el caso de Chlorophyta en el único arrecife donde no fueron

encontradas es en Giote, esto pudo deberse a que la visibilidad en este lugar era escasa al momento de la colecta. Por último, el grupo Ochrophyta solo se encontró en Isla de Enmedio y Santiaguillo.

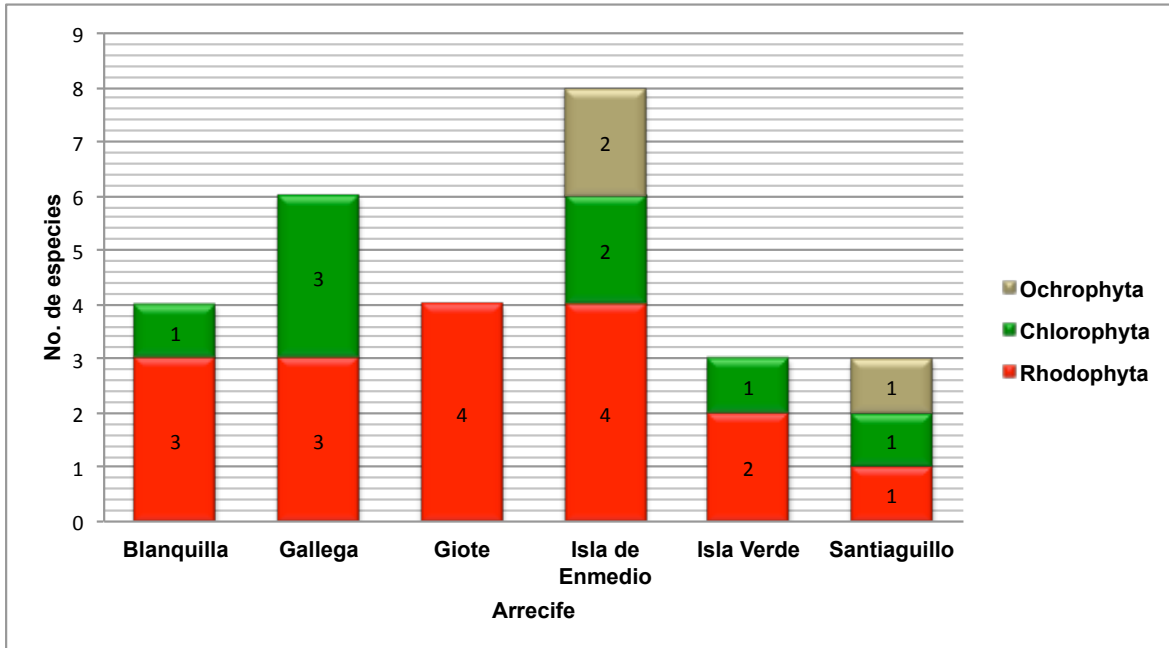


Figura 2. Número de especies por filo en los diferentes arrecifes.

Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos metanólicos algales fue muy variable, el rango osciló entre 3.7 a 0.1%. Como se puede observar en la tabla 5 el mayor rendimiento lo presentaron el extracto de *C. thuyoides* 3.7% y *L. obtusa* con 3.5%, mientras que el menor rendimiento estuvo presente en 11 extractos con un 0.1%.

Tabla 5. Rendimiento de los extractos metanólicos de las macroalgas del SAV.

Especie	% de rendimiento	Localidad
<i>Amphiroa fragilissima</i>	0.1	IE
<i>Amphiroa fragilissima</i>	0.1	IV
<i>Caulerpa chemnitzia</i>	2.7	S
<i>Caulerpa racemosa</i>	0.1	BL
<i>Caulerpa racemosa</i>	2.7	IV
<i>Caulerpa sertularoides</i>	0.1	GA
<i>Compsothamnion thuyoides</i>	3.7	BL
<i>Cymopolia barbata</i>	3.5	IE
<i>Dictyosphaeria cavernosa</i>	0.1	IE
<i>Dictyota dichotoma</i>	2.7	IE
<i>Galaxaura comans</i>	0.1	BL
<i>Galaxaura comans</i>	1.7	IV
<i>Hypnea spinella</i>	0.1	GA
<i>Laurencia gracilis</i>	0.1	GA
<i>Laurencia gracilis</i>	0.1	GI
<i>Laurencia obtusa</i>	3.5	IE
<i>Laurencia obtusa</i>	1.2	GI
<i>Titanophycus validus</i>	0.3	GA
<i>Padina boergenseni</i>	0.5	IE
<i>Sargassum fluitans</i>	0.1	S
<i>Sargassum natans</i>	0.4	IE
<i>Sebdenia flabellata</i>	0.4	IE
<i>Tricleocarpa cylindrica</i>	0.1	BL
<i>Tricleocarpa fragilis</i>	3.1	IE
<i>Ulva intestinalis</i>	0.9	GA
<i>Ulva lactuca</i>	0.1	GA
<i>Wrangelia bicuspidata</i>	0.2	GI

Blanquilla (BL), Gallega (GA), Giote (GI), Isla de En medio (IE), Isla Verde (IV), Santiaguillo (S).

Pruebas cualitativas preliminares (antimicrobianos)

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos algales. Los extractos de 16 especies de algas fueron activos frente a diferentes cepas. Lo que equivale a un 53.3% de especies activas.

Por otro lado, se calculó el porcentaje de macroalgas que fueron activas en ambas zonas de colecta (norte y sur). El grupo Norte presenta un 62.5% de especies activas frente al grupo Sur con un 37.5%; sin embargo el análisis estadístico no muestra diferencia significativa ($F=0.51$, $p\leq 0.05$) en cuanto al número de especies que fueron activas para cada zona.

Las macroalgas que presentaron los mayores halos de inhibición fueron *C. sertularoides* (GAA1) con un halo de inhibición de 15.0 ± 0.0 mm en la cepa *S. epidermidis* cc, en *S. aureus* ATCC 29213 se registró un halo de 9.0 ± 0.0 mm. *L. obtusa* (GIA5) con halos de 9.0 ± 0.0 mm, 8.0 ± 0.0 mm en *S. epidermidis* cc y *S. aureus* ATCC 29213 respectivamente. Por último se encuentra la especie *U. lactuca* (GAA3) con 9.0 ± 0.0 mm en *S. aureus* ATCC 29213 y 8.0 ± 0.0 mm para *S. epidermidis* cc.

En cuanto a la actividad antibacteriana de los extractos por tipo bacteriano de las 28 especies de macroalgas colectadas en los 6 arrecifes, 16 especies presentaron actividad en bacterias Gram negativas y 12 en Gram positivas.

Tabla 6. Registro de las macroalgas con actividad antibacteriana de los extractos metanólicos algales del SAV.

Especie	Cepa			
	<i>E. coli</i> cc	<i>S. tiphy</i>	<i>S. epidermidis</i> cc	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
Chlorophyta				
<i>C. sertularioides</i>	6.0±0.0	6.0±0.0	15.0±0.0	10.0±0.0
<i>C. racemosa</i>	-	6.0±0.0	-	-
<i>C. barbata</i>	-	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>D. cavernosa</i>	-	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>U. intestinalis</i>	-	6.0±0.0	6.0±0.0	
<i>U. lactuca</i>	6.0±0.0	6.0±0.0	8.0±0.0	9.0±0.0
Ochrophyta				
<i>S. natans</i>	-	6.0±0.0	8.0±0.0	-
Rhodophyta				
<i>C. thuyoides</i>	-	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>A. fragilissima</i>	-	6.0±0.0	7.0±0.0	-
<i>G. comans</i>	-	6.0±0.0	-	-
<i>H. spinella</i>	6.0±0.0	-	5.3±0.0	7.0±0.0
<i>L. gracilis</i> (1)	-	6.0±0.0	6.0±0.0	-
<i>L. gracilis</i> (2)	7.0±0.0	6.0±0.0	-	-
<i>L. obtusa</i>	-	6.0±0.0	9.0±0.0	8.0±0.0
<i>T. validus</i>	-	6.0±0.0	-	-
<i>T. cylindrica</i>	-	6.0±0.0	7.0±0.0	6.0±0.0
Control cloramfenicol	15.7±0.6	21.7±1.5	20.0±2.6	15.3±0.6

(Halos de inhibición en mm±SD). (1) Gallega, (2) Gíote.

En el tabla 7 se muestra el promedio de los resultados obtenidos de la actividad antifúngica en levaduras. El 16.6% del total de algas colectadas fueron activas en las diferentes cepas levaduriformes. Las macroalgas con mayor actividad antifúngica fueron: *C. barbata*, *L. obtusa* y *U. lactuca*.

Al realizar el ANOVA para comparar la actividad en ambas zonas se obtuvo que no hay diferencias estadísticamente significativas ($F=0.25$, $p\leq 0.05$) entre la actividad antifúngica en levaduras para la zona Norte y Sur.

El extracto de *C. barbata* fue activo en cuatro cepas levaduriformes: *C. glabrata* cc (7.0 ± 0.0 mm), *C. tropicalis* cc (6.3 ± 0.6 mm) y en dos cepas *C. albicans* ATCC 14065 y *C. albicans* cc (6.0 ± 0.0 mm). La especie *U. lactuca* mostró actividad en 4 cepas presentando halos de inhibición de 7.0 ± 0.0 mm en promedio para *C. glabrata* cc, *C. albicans* ATCC 14065 y *C. albicans* cc, mientras que para *C. tropicalis* cc (7.3 ± 0.6 mm). *L. obtusa* presentó actividad en tres cepas: *C. glabrata* cc (7.3 ± 0.6 mm) y *C. albicans* ATCC 14065 y *C. tropicalis* cc (9.0 ± 0.0 mm).

Tabla 7. Actividad antifúngica de los extractos metanólicos algales del SAV.

Especie	Cepa			
	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 14065	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> cc
Chlorophyta				
<i>C. barbata</i>	7.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.3 ± 0.6	6.0 ± 0.0
<i>U. lactuca</i>	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	7.3 ± 0.6	7.0 ± 0.0
Rhodophyta				
<i>C. thuyoides</i>	6.0 ± 0.0			
<i>L. obtusa</i>	7.3 ± 0.6	9.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	
<i>L. gracilis</i> (2)	6.7 ± 1.2			
Control Nistatina	17.0 ± 0.1	25.1 ± 0.1	20.0 ± 0.1	25.1 ± 0.1

(Halos de inhibición en $\text{mm}\pm\text{SD}$), (2) Giote.

Al realizar el análisis comparativo entre grupos algales con respecto a la actividad antibacteriana mostrada se encontró que solo 16 especies fueron activas. De estas Chlorophyta (7 especies) presentó un 43.7%, Rhodophyta (8 especies) un 50% y Ochrophyta (1 especie) con un 6.25%. Esto nos indica que los extractos de las algas de las divisiones Rhodophyta y Chloropoyta son los que presentaron mayor actividad (Figura 3).

En cuanto a las levaduras el 43.75% de las especies de Chlorophyta fueron activas mientras que para Rhodophyta fueron el 60% (Figura 3).

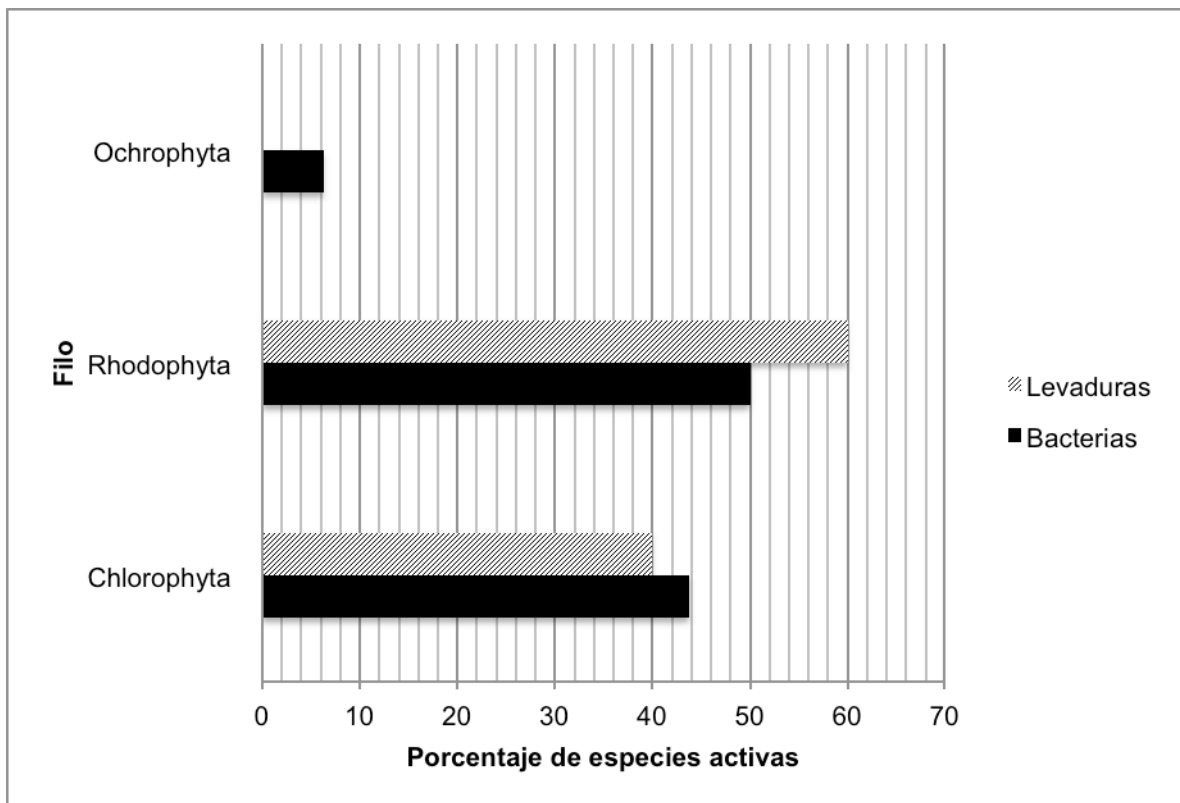


Figura 3. Comparación de la actividad antimicrobiana entre grupos algales.

Pruebas cuantitativas (antimicrobianos)

Los resultados obtenidos en la determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los extractos algales se muestran en la tabla 8. Como se puede observar la especie que presentó las concentraciones inhibitorias menores fue *L. obtusa*, en *S. thipy* (MIC=0.5 mg/mL), *S. epidermidis* cc

(CMI=0.125 mg/mL) y finalmente en *S. aureus* ATCC29213 (CMI=0.5 mg/mL). Para las otras especies las CMI estuvieron por arriba de 1 mg/mL (Tabla 7).

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos metanólicos algales del SAV.

No.	Localidad	Especie	<i>S. thiphy</i>		<i>S. epidermidis</i> cc		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
			CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
1	BLA1	<i>C. thuyoides</i>	4	>4	-	-	-	-
2	GAA5	<i>T. validus</i>	>4	>>4	>4	>>4	-	-
3	GIA5	<i>L. obtusa</i>	0.5	1	0.125	0.25	0.5	1
4	IEA4	<i>D. dichotoma</i>	4	>4	0.5	1	-	-
5	IEA6	<i>C. barbata</i>	4	>4	0.5	1	0.5	1
6	IEA8	<i>D. cavernosa</i>	>4	>>4	-	-	-	-
7	IEA9	<i>L. obtusa</i>	2	4	-	-	-	-

*Valores en mg/mL. BL (Blanca), GA (Gallega), IE (Isla de Enmedio).

En cuanto a la actividad registrada para levaduras podemos observar que el extracto de *C. barbata* fue el más activo porque inhibe el crecimiento de *C. albicans* CC con 0.0625 mg/mL. *L. obtusa* provocó una CMI para *C. albicans* ATCC 14065 y *C. albicans* cc de 1 mg/mL. La especie *U. lactuca* tuvo una CMI de 0.25 mg/mL en *C. albicans* ATCC 14065 y 0.125 mg/mL en *C. albicans* cc (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) de los extractos metanólicos algales del SAV.

No.	Localidad	Especie	<i>C. glabrata</i> cc		<i>C. albicans</i> ATCC 14065		<i>C. tropicalis</i> cc		<i>C. albicans</i> cc	
			CMI	CFM	CMI	CFM	CMI	CFM	CMI	CFM
1	GAA3	<i>U. lactuca</i>	-	-	0.25	0.5	-	-	0.125	0.25
2	GIA5	<i>L. obtusa</i>	-	-	1	2	-	-	1	2
3	IEA6	<i>C. barbata</i>	0.5	1	0.125	1	2	>2	0.0625	0.125

*Valores en mg/mL. GA (Gallega), GI (Giotte), IE (Isla de Enmedio).

Cabe mencionar que se realizaron los ensayos antifúngicos en hongos filamentosos de las 28 macroalgas así como de las 2 cianobacterias y estos extractos no mostraron actividad en ninguna de las cepas estudiadas.

ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD GENERAL DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *C. barbata*

Con los resultados obtenidos en la evaluación preliminar se determinó que la especie elegida para continuar con el estudio fue *C. barbata*, ya que presentó la mayor actividad antimicrobiana. De esta manera se realizó una segunda colecta de esta macroalga.

Segunda Colecta

El segundo muestreo se realizó el 17 y 18 de junio del 2014. En este únicamente se colectó la especie *C. barbata* del arrecife Isla de Enmedio para continuar con los estudios de la curva letal, la evaluación de su capacidad antioxidante, la toxicidad y el fraccionamiento del extracto en columna.

Rendimiento

El rendimiento de la extracción *C. barbata* se presenta en la tabla 10. En esta se puede observar el resultado para los tres extractos (hexánico, acetónico y metanólico).

El extracto de *C. barbata* que presentó mayor rendimiento es el acetónico con un 0.67% seguido del hexánico con 0.28% y por último el metanólico con un rendimiento del 0.06%.

Tabla 10. Rendimiento de los extractos de *C. barbata*.

Extracto	Rendimiento (%)
Metanólico	0.06
Acetónico	0.67
Hexánico	0.28

Prueba cualitativa (antimicrobianos)

Los extractos obtenidos de *C. barbata* fueron sometidos a las pruebas cualitativas de actividad antimicrobiana (difusión en agar o de Kirby-Baüer) para saber cual era el extracto activo. Cabe mencionar que se seleccionaron las cepas donde se había registrado la mayor actividad antimicrobiana en la evaluación preliminar.

Los resultados se muestran en la tabla 11, en esta se puede observar que el extracto acetónico es el más activo pues registró los mayores halos de inhibición: 8.0 ± 0.00 mm para *S. epidermidis* y 14.0 ± 0.5 en *S. aureus* ATCC 29213. En levaduras se obtuvo un halo de 6.0 ± 0.0 para *C. albicans* cc y 7.6 ± 0.57 en *C. glabrata* cc.

Tabla 11. Actividad antimicrobiana de los extractos de *C. barbata*.

Extracto	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>S.</i> <i>epidermidis</i> FES-C	<i>C. glabrata</i> cc	<i>C.</i> <i>albicans</i> cc
Metanólico	9.0±0.0	6.0±0.0	DPB	DPB
Acetónico	14.0±0.5	8.0±0.0	7.6±0.57	6.0±0.0
Hexánico	8.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	DPB

(Halos de inhibición en mm±SD) *DPB=Disminución de la población bacteriana

Curvas de crecimiento microbiano

Las curvas de letalidad o mortalidad-tiempo proporcionan información importante sobre la dinámica de la acción antimicrobiana y su relación con la concentración de la sustancia a evaluar. Estas se utilizan fundamentalmente para el estudio de nuevos antimicrobianos.

El estudio del efecto del extracto metanólico de *C. barbata* en el crecimiento bacteriano se realizó en *S. aureus*. Como se observa en la figura 4:

- La Concentración Bactericida Mínima (CBM 1 mg/mL) al paso de una hora provoca el descenso de 2.97 a 2.14 log UFC/mL y al paso de 6 horas reduce la población bacteriana hasta 1.6 log UFC/mL. El efecto del extracto se pierde después de 6 horas puesto que la población bacteriana comienza a incrementarse nuevamente. Por lo que se observa un efecto bacteriostático.
- En la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI 0.5 mg/mL) se observa un comportamiento similar. La población bacteriana desciende en el tiempo inicial de 2.84 a 2.44 log UFC/mL a las 4 horas, pasando este tiempo la población bacteriana empieza a incrementar.
- El efecto del extracto a la concentración de ½ CMI se presenta un descenso solo en la primera hora, a partir de este tiempo la población bacteriana comienza a incrementarse. Hasta llegar a las 24 horas al mismo número de UFC (log 7.7 UFC/mL).

Con estos datos se puede decir que *C. barbata* tiene un efecto bacteriostático en la cepa *S. aureus* ATCC 29213, ya que únicamente por un periodo de tiempo (6 horas) disminuye la reproducción bacteriana. Esto nos indica que el extracto aunque no produce la muerte de una población bacteriana, impide su crecimiento

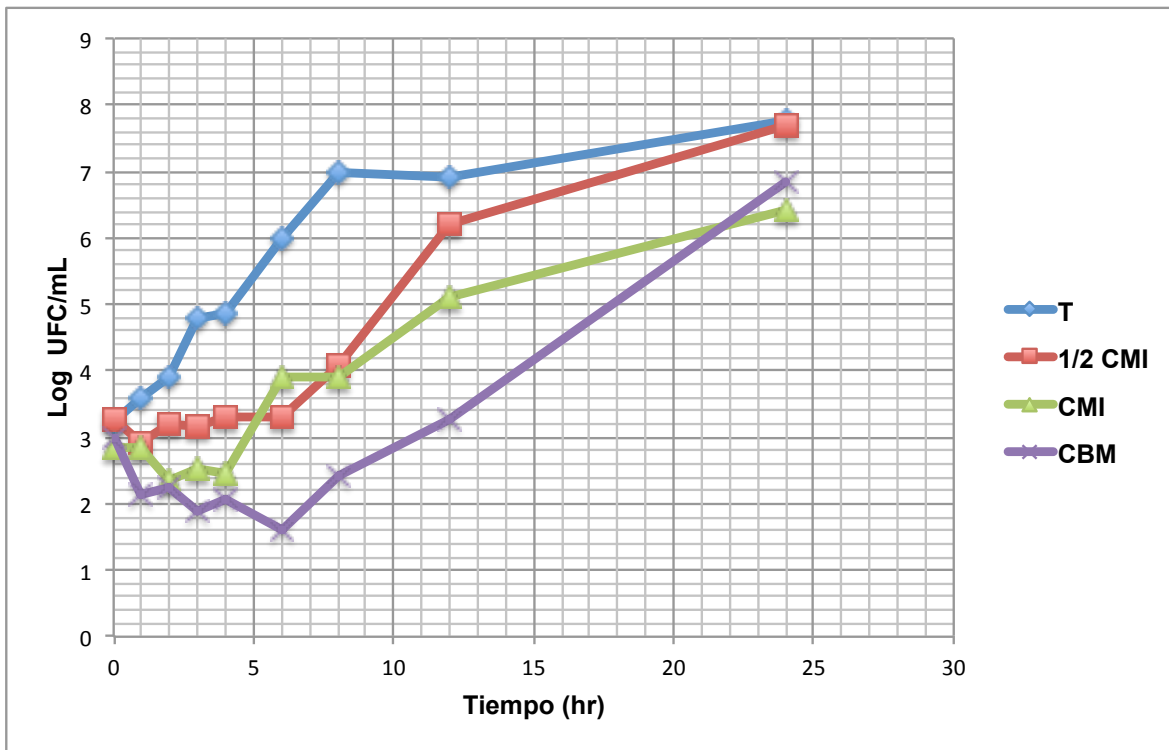


Figura 4. Curva de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 expuesta al extracto metanólico de *C. barbata*. T: testigo, CMI: Concentración Mínima Inhibitoria CBM: Concentración Bactericida Mínima. CBM: 1.0 mg/mL, CMI: 0.5 mg/mL y ½ CMI: 0.25 mg/mL

Es importante mencionar que los estudios que se han realizado acerca de extractos de macroalgas en diferentes cepas de microorganismos, solo han sido cualitativos, no se han hecho ensayos cuantitativos y/o curvas de crecimiento microbiano.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se puede evaluar con la reducción del radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidracilo). Este es un radical libre, que en solución metanólica presenta color violeta y tiene una absorción a 517 nm. Cuando la solución de DPPH es mezclada con algún sustrato que lo reduzca, la coloración cambia de color morado a amarillo claro (Nur Alam *et al.*, 2013). Por lo que la actividad del antioxidante puede medirse por espectrofotometría.

Los resultados de la actividad antioxidante del extracto metanólico de *C. barbata* se observan en la figura 5, estos son promedio de una n=8. *C. barbata* exhibe en el extracto metanólico una capacidad antioxidante media (CA₅₀) de 106.78±0.01 µg/mL.

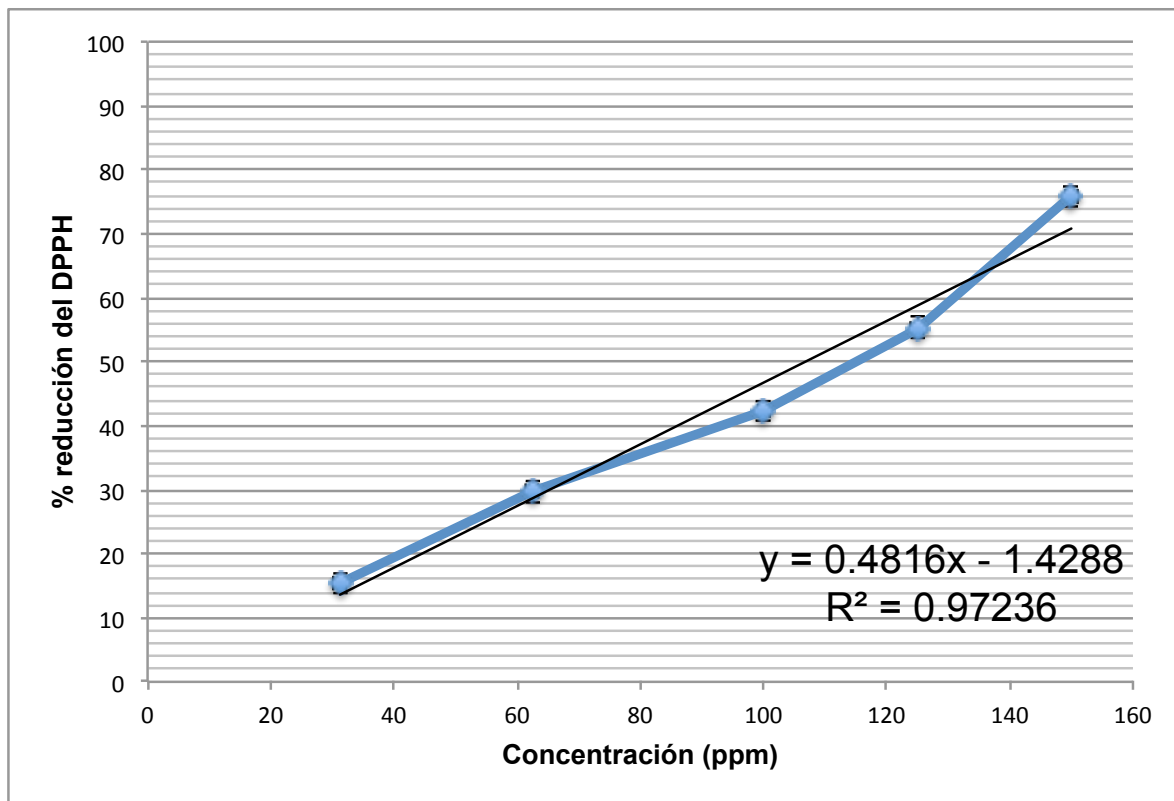


Figura 5. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *C. barbata* sobre el radical DPPH.

La actividad antioxidante del extracto acetónico de *C. barbata* presentó una $CA_{50} = 226.97 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ (Figura 6).

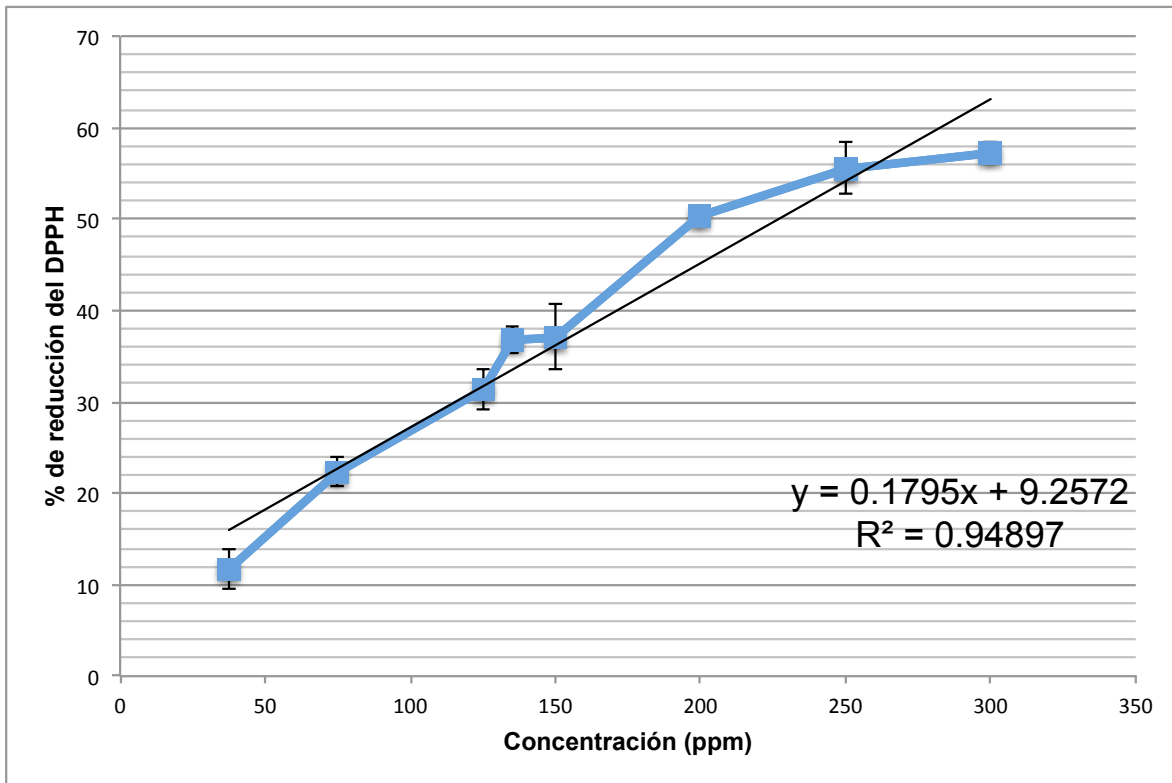


Figura 6. Actividad antioxidante del extracto acetónico de *C. barbata* sobre el radical DPPH.

Fenoles totales

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres, de esta manera neutraliza peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes (Balboa *et al.*, 2013).

El extracto metanólico presentó $20.38 \mu\text{g}$ de equivalentes de ácido gálico/miligramo de extracto (Figura 7).

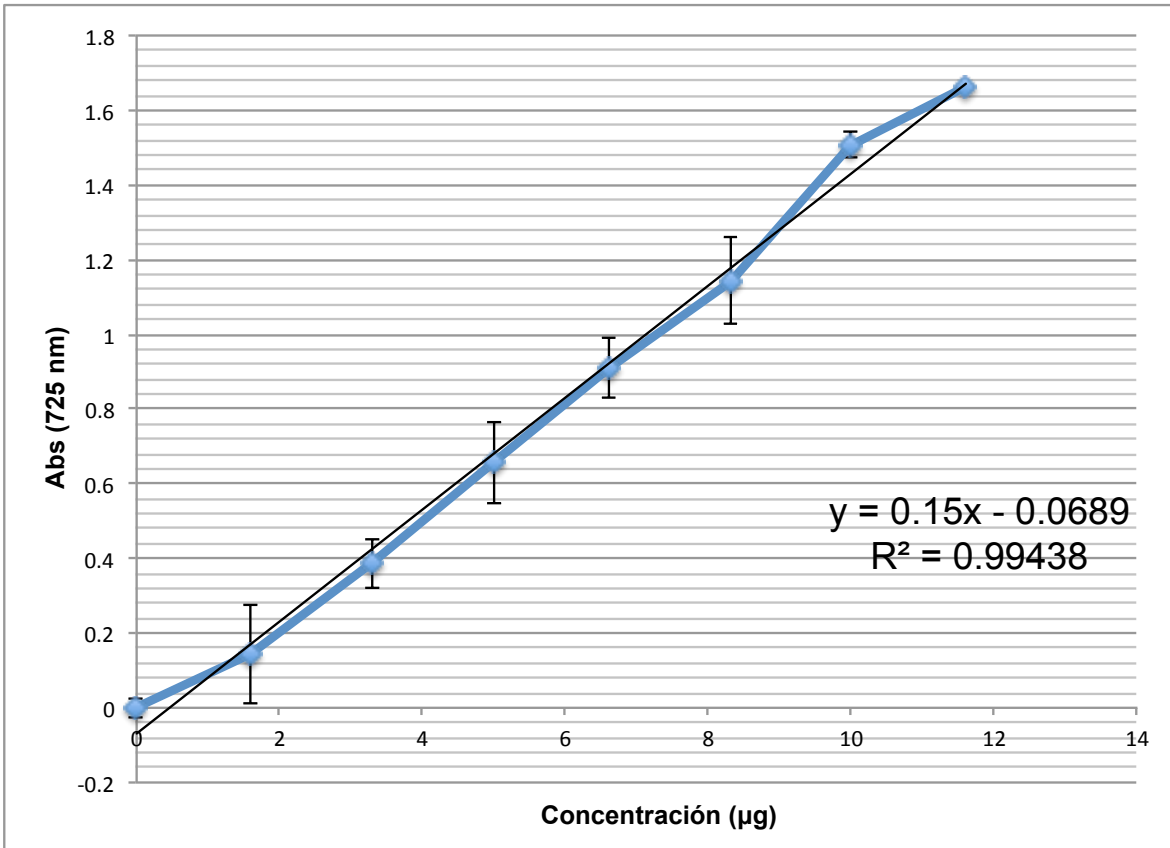


Figura 7. Cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de *C. barbata*.

La cantidad de fenólicos totales para la muestra del extracto acetónico de *C. barbata* fue de 15.81 µg equivalentes de ácido gálico / miligramo de extracto (Figura 8).

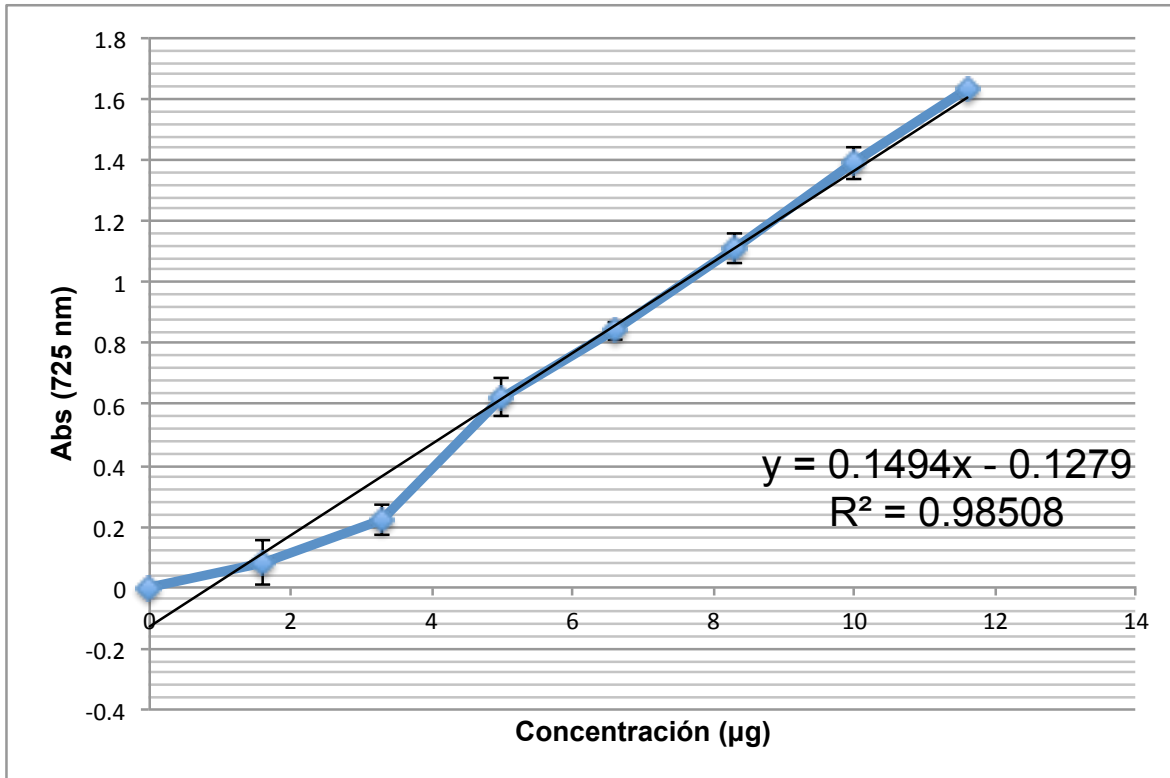


Figura 8. Cuantificación de fenoles totales del extracto acetónico de *C. barbata*, segunda colecta.

Toxicidad

Los ensayos de toxicidad se realizaron con larvas de *A. salina*. Este modelo se ha utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos, de la misma manera se ha estudiado su biología y sus potenciales en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales (Pino y Jorge, 2010).

La toxicidad del extracto metanólico se muestra en la figura 9. La $CL_{50}=30.94$ µg/mL del extracto metanólico de *C. barbata*, lo que nos indica que es un extracto muy tóxico ($10 > CL_{50} < 100$), de acuerdo a la escala de toxicidad para este ensayo reportada por Pino y Jorge (2010) (Tabla 12).

Tabla 12. Escala de toxicidad en larvas nauplio de *A. salina*

Escala	Rango
Extremadamente tóxico	$CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$
Muy tóxico	$10 > CL_{50} < 100$
Moderadamente tóxico	$100 < CL_{50} < 1000$
No tóxico	$CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$

*Escala tomada de Pino y Jorge, 2010.

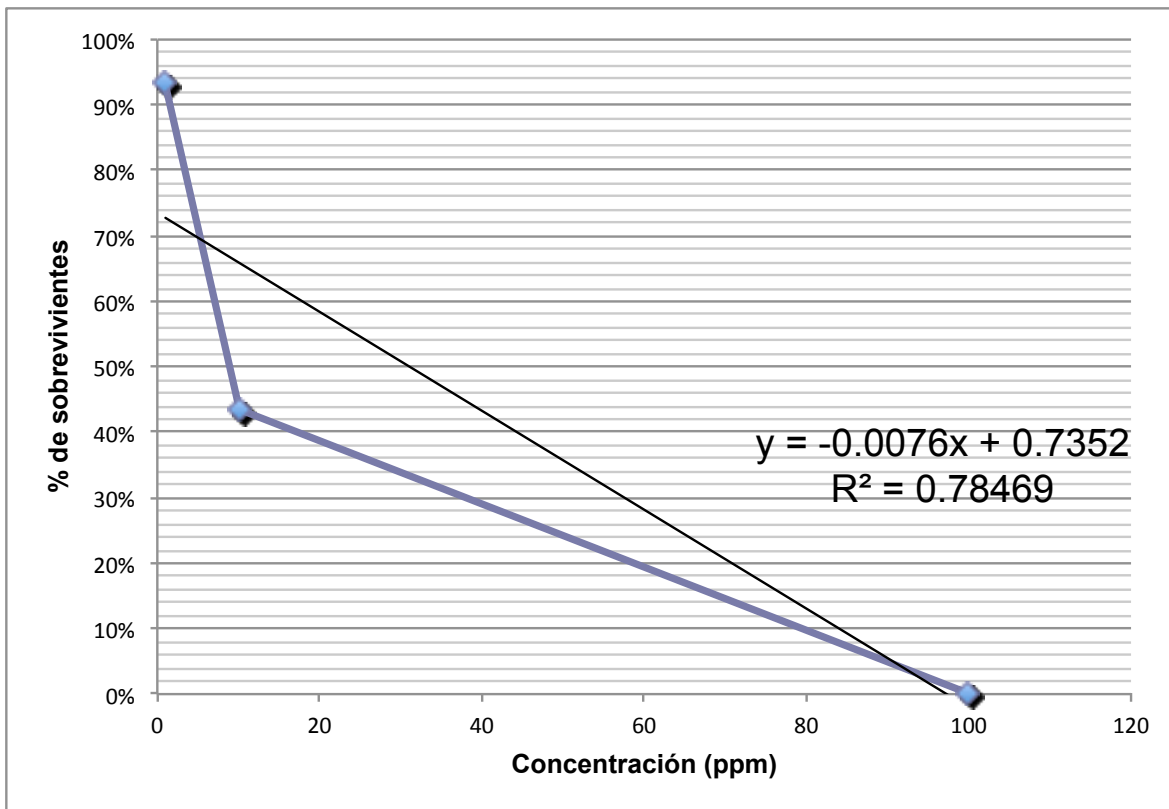


Figura 9. Ensayo de toxicidad en larvas nauplio de *A. salina* sometidas al extracto metanólico de *C. barbata*.

El ensayo de toxicidad también se realizó para el extracto acetónico registrando una $CL_{50}=47.82\mu\text{g/mL}$, que al igual que el anterior nos indica que es un extracto muy tóxico (Figura 10).

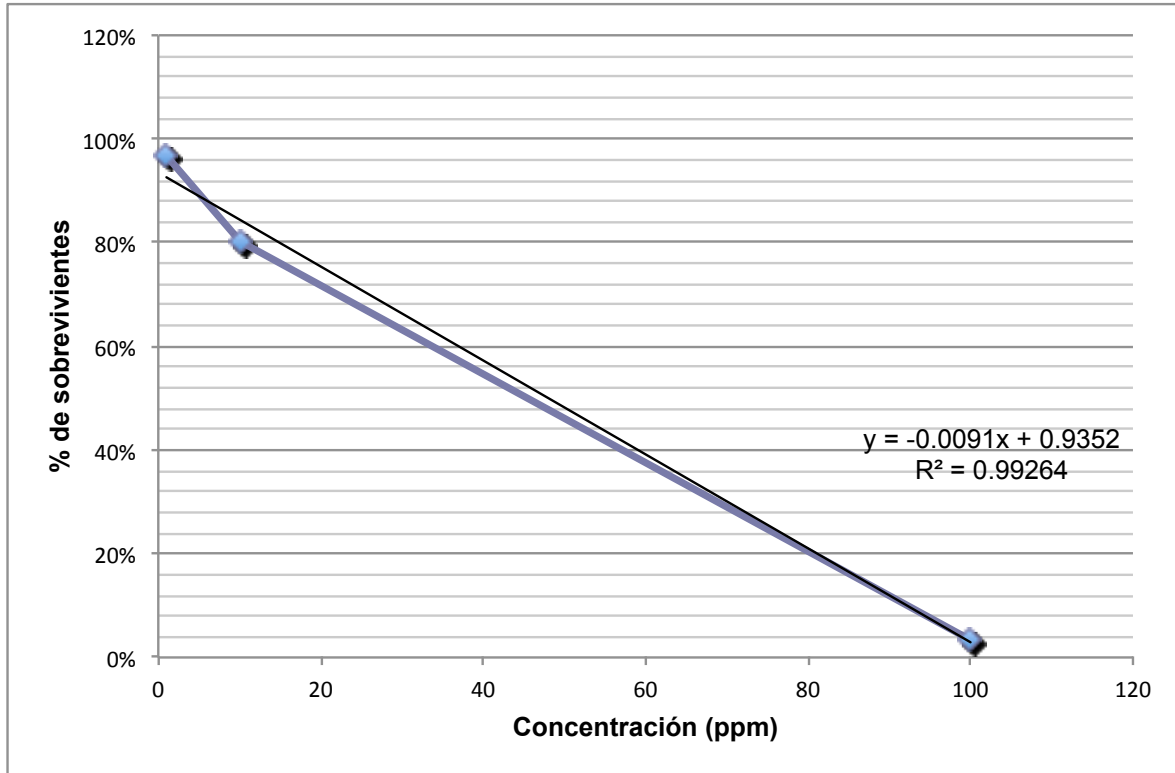


Figura 10. Ensayo de toxicidad en larvas nauplio de *A. salina* sometidas al extracto acetónico de *C. barbata*.

Fraccionamiento en columna cromatográfica

El extracto acetónico fue seleccionado para iniciar el fraccionamiento en columna ya que fue el que presentó las mayores bioactividades además, de tener el más alto rendimiento.

De la cromatografía en columna abierta del extracto acetónico de *C. barbata* se obtuvieron un total de 136 alícuotas, las cuales fueron reunidas en 22 fracciones de acuerdo al patrón que mostraban en la cromatografía en placa (ccf). De las 22 fracciones obtenidas y reveladas con DPPH, sólo las seis primeras mostraron actividad antioxidante (Figura 11).

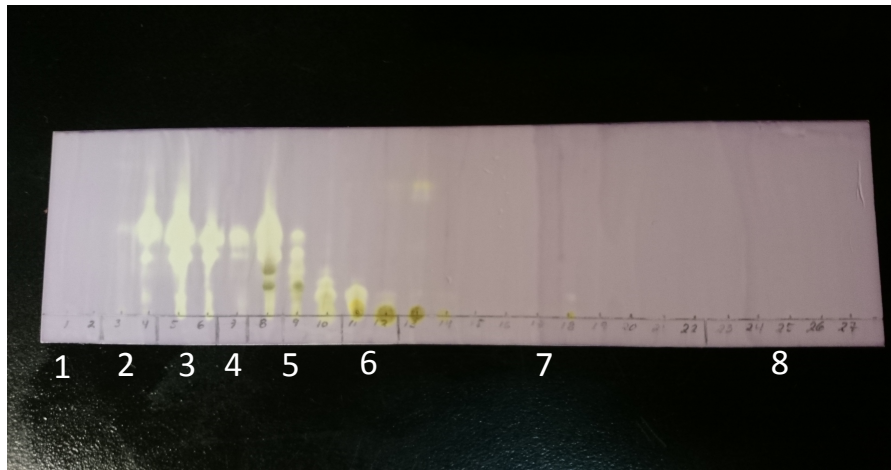


Figura 11. Placa cromatográfica de las fracciones de la separación en columna abierta del extracto acetónico de *C. barbata* reveladas con DPPH.

El ensayo cualitativo para determinar la actividad antimicrobiana (Kirby-Baüer) se realizó con las fracciones obtenidas del extracto acetónico de *C. barbata*. De estas sólo las fracciones 3, 4, 5, 6, 7 y 22 presentaron actividad sobre a la cepa *S. aureus* ATCC 29213 (Tabla 13). En *S. typhi* y *C. albicans* cc no presentaron actividad.

Tabla 13. Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas del extracto acetónico de *C. barbata* sobre *S. aureus*.

Fracción	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
3	7.0
4	9.0
5	9.0
6	8.0
7	DPB
22	DPB

*DPB: Disminución de la población bacteriana. Halo de inhibición (mm).

Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de las fracciones obtenidas del extracto acetónico de *C. barbata*.

Las fracciones 2, 3, 4, 5 y 6 se les realizó una cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM), para conocer la composición química de la muestra. En este reporte se mostrarán primero los resultados de las dos fracciones que tuvieron tanto actividad antimicrobiana como antioxidante, que son las fracciones 5 y 6, después las demás fracciones.

En la tabla 14 se muestra los resultados obtenidos del análisis de la fracción cinco. Como se puede observar esta fracción esta constituida principalmente por el 10,12-hexadecadienal (21.42%) y ácido octadecadienóico (23.18%). De la misma manera podemos observar que la fracción 6 presenta β -sitosterol (11.83%) y estigmasterol (22.87%) (Tabla 15).

Tabla 14. Composición química de la fracción 5 del extracto acetónico de *C. barbata* analizada por CG-EM.

RT (min)	Nombre	Fórmula condensada	Abundancia (%)
6.339	Ácido tetradecanóico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1.65
7.736	10,12-hexadecadienal	C ₁₆ H ₂₈ O	21.42
8.278	9-oxabicyclo [6.1.0] nonano	C ₈ H ₁₄ O	1.30
9.035	Ácido octadecadienóico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	23.18

*RT=Tiempo de Retención

Tabla 15. Composición química de la fracción 6 del extracto acetónico de *C. barbata* analizada por CG-EM.

RT (min)	Nombre	Fórmula condensada	Abundancia (%)
11.363	Estigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	22.87
13.274	β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	11.83

*RT=Tiempo de Retención

En la fracción 2, como se puede observar en el tabla 16, entre los compuestos mayoritarios se encuentra el fitol (38.79%), el ácido vaccenólico (15.22%), el ácido-9-hexadecanóico (7.88%), el ácido hexadecanóico (5.01), la dipropetrina (3.24%), el ácido-10-octadecanóico (1.30%) y el ácido tetradecanóico (0.97%).

La fracción 3 se detectaron dos componentes como los mayoritarios como son: el fitol (32.66%) y el 4-bromo-3-fenil- isotiazol (16.94%) (Tabla 17).

Tabla 16. Composición química de la fracción 2 del extracto acetónico de *C. barbata* analizada por CG-EM.

RT (min)	Nombre	Fórmula condensada	Abundancia (%)
13.582	Ácido tetradecanóico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.97
14.673	Ácido hexadecanóico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	5.01
14.949	Ácido- 9-hexadecanóico	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	7.88
15.853	Ácido linoléico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	0.47
15.950	Ácido 9,12-octadecadienóico	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	0.75
15.982	Ácido-10-octadecanóico	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	0.82

16.014	Ácido-16-octadecanóico	$C_{19}H_{36}O_2$	1.30
16.065	Fitol	$C_{20}H_{40}O$	38.79
16.296	Ácido vaccenóico	$C_{18}H_{34}O_2$	15.22
16.841	Dipropetrina	$C_{11}H_{21}N_5S$	3.24

*RT=Tiempo de Retención

Tabla 17. Composición química de la fracción 3 del extracto acetónico de *C. barbata* analizada por CG-EM.

RT (min)	Nombre	Fórmula condensada	Abundancia (%)
16.052	Fitol	$C_{20}H_{40}O$	32.66
16.411	4-bromo-3-fenil-isotiazol	C_9H_6BrNS	16.94

*RT=Tiempo de Retención

Los constituyentes de la fracción 4 se muestran en la tabla 18. En esta predominan ácidos grasos como son: el ácido-9-hexadecanóico (37.34%), el ácido-2-undecanóico (3.85%) y el ácido tetradecanóico (5.19%). Además de estar presente un aldehído: el 10,12-hexadecadienal con 6.28% de abundancia.

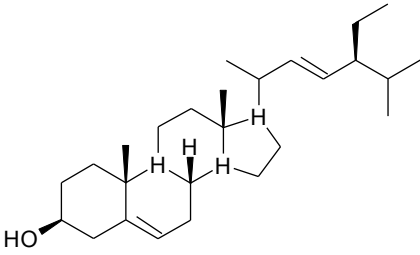
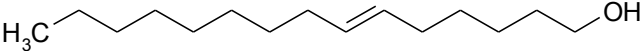
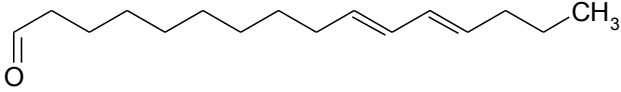
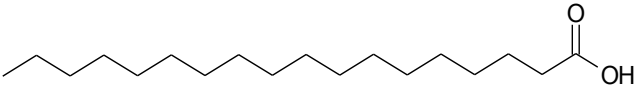
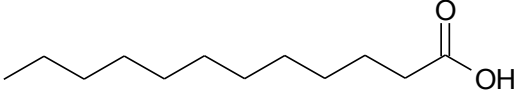
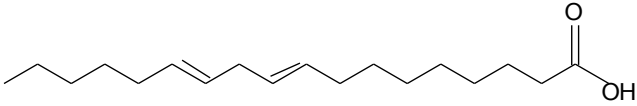
Tabla 18. Composición química de la fracción 4 del extracto acetónico de *C. barbata* analizada por CG-EM.

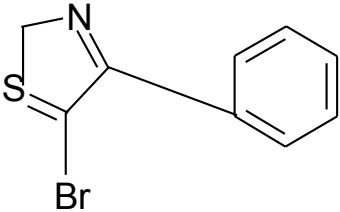
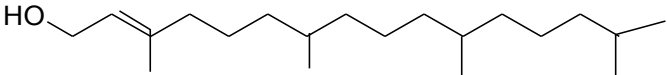
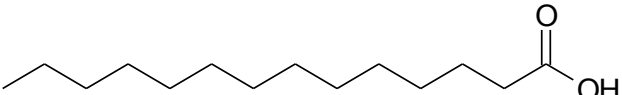
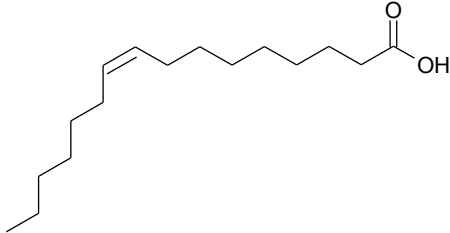
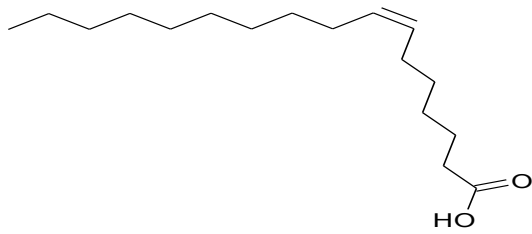
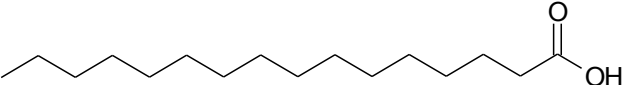
RT (min)	Nombre	Fórmula condensada	Abundancia (%)
4.241	Ácido 2-undecanóico	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	3.85
4.866	Ácido dodecanóico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0.15
6.388	Ácido tetradecanóico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	5.19
7.812	Ácido 9-hexadecanóico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	37.34
7.896	10,12-Hexadecadienal	C ₁₆ H ₂₈ O	6.28
9.098	6,9-Pentadecadien-1-ol	C ₁₅ H ₂₈ O	30.15

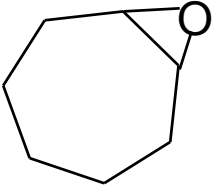
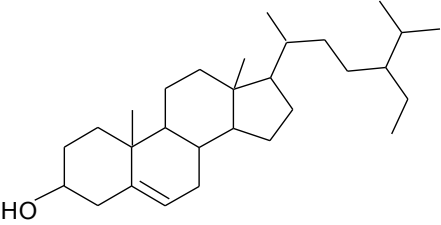
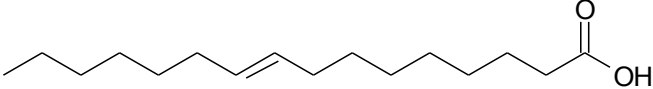
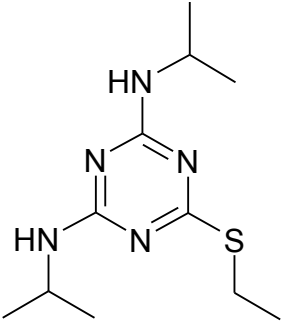
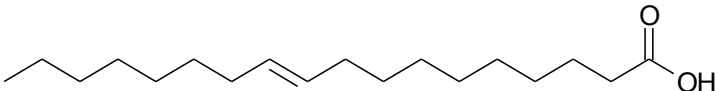
*RT=Tiempo de Retención

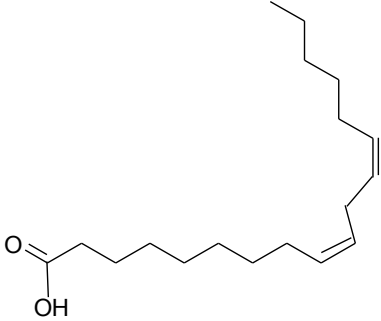
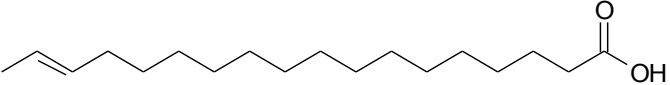
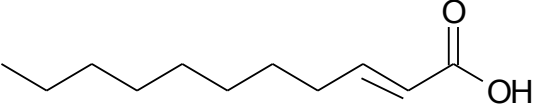
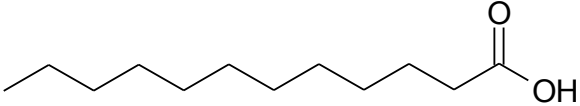
Las estructura química de los principales compuestos detectados en las fracciones del extracto acetónico de *C. barbata* se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Estructuras químicas de los compuestos del extracto acetónico de *C. barbata*.

Nombre	Estructura química
Estigmasterol	
6,9 Pentadecadie-1-ol	
10, 12 Hexadecadienal	
Ácido octadecanóico o esteárico	
Ácido dodecanóico o láurico	
Ácido octadecadienóico o linoléico	

<p>4-bromo-3 fenil-isotiazol</p>	
<p>Fitol</p>	
<p>Ácido tetradecanóico o mirístico</p>	
<p>Ácido hexadecenóico o palmitoléico</p>	
<p>Ácido vaccénico</p>	
<p>Ácido hexadecanóico o palmítico</p>	

<p>9-oxabicyclo [6.1.0] nonano</p>	
<p>β-sitosterol</p>	
<p>Ácido 9-hexadecenóico</p>	
<p>Dipropetrina</p>	
<p>Ácido 10-octadecenóico</p>	

<p>Ácido 9, 12-octadecadienónico</p>	 <p>The structure shows a long hydrocarbon chain with two double bonds at the 9th and 12th positions and a carboxylic acid group at the 1st position. The chain is drawn in a zig-zag pattern, with the carboxyl group on the left and the terminal methyl group on the right.</p>
<p>Ácido 16-octadecenónico</p>	 <p>The structure shows a long hydrocarbon chain with a single double bond at the 16th position and a carboxylic acid group at the 1st position. The chain is drawn in a zig-zag pattern, with the carboxyl group on the right and the terminal methyl group on the left.</p>
<p>Ácido 2-undecenónico</p>	 <p>The structure shows a hydrocarbon chain with a double bond at the 2nd position and a carboxylic acid group at the 1st position. The chain is drawn in a zig-zag pattern, with the carboxyl group on the right and the terminal methyl group on the left.</p>
<p>Ácido dodecanónico</p>	 <p>The structure shows a straight hydrocarbon chain with a carboxylic acid group at the 1st position. The chain is drawn in a zig-zag pattern, with the carboxyl group on the right and the terminal methyl group on the left.</p>

DISCUSIÓN

EVAUACIÓN PRELIMINAR

Determinaciones taxonómicas

En este trabajo es importante destacar a las especies de algas: *Laurencia gracilis* J.D.Hooker y Harvey, *Wrangelia bicuspidata* Børgesen y *Sebdenia flabellata* (J. Agardh) P. G. Parkinson, las cuales fueron cotejadas con la base de algaeBASE y son nuevos registros para el SAV (Tabla 2). La especie *Compsothamnion thuyoides* (Smith) Nägeli es un nuevo registro para México; los únicos registros que se tienen de esta especie cercana a la zona de colecta son en: Florida (Schneider y Searles, 1991; Littler y Littler, 2000; Littler *et al.*, 2008), Carolina del Norte (Schneider y Searles, 1991) Carolina del Sur (Schneider y Searles, 1991) Texas (Wynne, 2009), Bahamas (Littler y Littler, 2000) y Brasil (Creed *et al.*, 2010) según lo consultado en algunas fuentes (www.algaebase.org y Ortega *et al.*, 2001).

En la colecta el número de especies de algas pertenecientes a la división Rhodophyta fue más abundante (43.3%), seguido por Chlorophyta (26.6%) y por último Ochrophyta (13.3%). Esta es una tendencia que se presenta en el SAV, sitio que es señalado por Galicia y Morales (2007) como un ambiente con alta riqueza y biodiversidad. Estos autores realizaron una recopilación de los reportes sobre macroalgas del SAV encontrando la misma tendencia. En el SAV se conocen un total de 284 especies de macroalgas (incluyendo variedades y formas), donde las Rhodophyta, es el grupo taxonómico con alta riqueza específica (157 especies), seguida de Chlorophyta con 87 y por último Ochrophyta que presentan 40. Esto puede ser explicado debido a que las algas rojas se desarrollan mejor en sustratos con arena fina o limo, como lo mencionan Ortégón y colaboradores (2010), sumada a la temperatura y otros factores.

Actividad antimicrobiana de los extractos algales: pruebas cualitativas

Los extractos algales presentaron actividad en un mayor número de cepas Gram negativas (16 cepas bacterianas) que en Gram positivas (12). Sin embargo se registraron los mayores halos de inhibición en la Gram positivas, esto concuerda con lo reportado por De Lara Isassi y colaboradores (1996), ya que ellos mencionan que tuvieron actividad en 18 cepas Gram positivas principalmente en *S. aureus* y *S. pyogenes* con los mayores halos de inhibición, mientras que en Gram negativas no reportan efecto antibacteriano.

La explicación de por qué estas macroalgas del SAV presentan actividad puede ser debido a que cuando algún organismo es sometido a cualquier tipo de estrés (temperatura, salinidad, humedad, contaminantes, etc.) alteran la producción de metabolitos secundarios (Watterman y Mole, 1989; Vargas-Álvarez *et al.*, 2005). Las algas del SAV están constantemente sometidas a estrés producto de todas las actividades portuarias que se realizan en dicha región, aunado a esto, existe una gran cantidad de contaminantes para este lugar, además de la descarga de la zona hotelera lo que produce gran cantidad de materia orgánica. Estos factores someten a los organismos a diferentes tipos de estrés, incluyendo a las macroalgas (Inclán-Sánchez, 2004; Pantoja, 2013).

Muchos de los productos naturales en las macroalgas son inicialmente sintetizados como defensas químicas contra patógenos y herbívoros, de hecho pueden ser vitales para la supervivencia en un arrecife coralino (Amsler, 2009).

Este estudio encontró en las algas rojas (Rhodophyta) mayor cantidad de especies activas, seguida de las algas verdes (Chlorophyta). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por De Lara-Isassi y colaboradores en 1996, ya que encontraron que las macroalgas que presentaron mayor actividad pertenecen a la división Rhodophyta. Además, existen reportes de que las algas rojas poseen compuestos halogenados, fenólicos y terpenos con actividad antimicrobiana (Amsler, 2009). Algunos otros autores mencionan que esta división también contiene ácido acrílico, aldehídos y terpenoides, los cuales se ha demostrado que son potentes biocidas (Inclán-Sánchez, 2004).

Freile-Peegrín y Morales (2004) realizaron estudios en las costas de la Península de Yucatán y reportan que las algas con mayor actividad antimicrobiana son las verdes (Chlorophyta) con un 100% de especies activas, seguida de las rojas (Rhodophyta) con 78% y por últimas las algas pardas (Ochrophyta) con 50%. Además encontraron mayor cantidad de especies activas en bacterias gram positivas que en gram negativas, contrario a lo que se encontró en el presente estudio. Se sabe que la producción de los metabolitos secundarios se ve influenciada por factores bióticos diferentes como la herbivoría, el estado de reproducción del alga, diferentes porciones del talo que se estén ocupando para el ensayo, todo esto junto con factores abióticos como la estacionalidad y la región geográfica pudieron haber tenido influencia en la bioactividad reportada en diferentes estudios en los extractos algales (Freile-Peegrín y Morales, 2004).

Es importante resaltar que *C. barbata* tuvo actividad en todas las cepas de *Candida* y las menores CMI registradas fueron para la especie *C. albicans* (Tabla 9). Esto es importante ya que la mayoría de los agentes infecciosos en mucosas y dermatofitos son ocasionados por candidas (Cecilia *et al.*, 2012). Además de que los hongos levaduriformes debido al uso indiscriminado de antifúngicos han desarrollado resistencia, de hecho esta reportado que *Candida albicans* la ha adquirido a casi todos los antimicrobianos que se conocen hasta el momento (Madigan *et al.*, 2009). Por ello resulta de vital importancia poner en práctica diversas estrategias para identificar y producir nuevos compuestos antifúngicos.

En cuanto a la actividad de los extractos algales en hongos filamentosos, no se encontró actividad. Esto puede deberse a que las macroalgas no estén expuestas a estas cepas de hongos filamentosos y por tanto no necesitan sintetizar metabolitos secundarios para defenderse de ellos. Aunque, se ha reportado la presencia de hongos filamentosos en el medio marino en otros trabajos (Stchigel *et al.*, 2007; Samón-Legra y Enríquez-Lavandera, 2010), algunos de estos son: *Antennospora* Meyers (1957), *Arenariomyces* Hohnk (1954), *Dryosphaera* Koch y Tokura (1987), *Lignincola* Höhnk (1956), *Lindra* Wilson (1956), *Nia* Moore y Meyers (1959), *Cirrenalia* Kohlmeyer, Meyers y Moore (1996), *Cumulospora* Schmidt (1985), *Trichocladium* Meyers y Moore (1971), *Ceriosporopsis* Kohlm

(1953) y *Papulaspora sp* Nova (1963). Autores como De Lara-Isassi y colaboradores en 2005 reportan que las especies *Padina boergesenii*, *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans* presentan actividad antifúngica en *Aspergillus niger* en los extractos metanólicos y clorofórmicos, lo que no concuerda con lo reportado en este estudio.

Actividad antimicrobiana de los extractos algales: pruebas cuantitativas

L. obtusa fue una de las macroalgas en donde se observaron los valores de CMI y CBM mas bajo; es decir se requieren de una baja concentración para inhibir el crecimiento microbiano (Tablas 7 y 8). En estudios anteriores sobre especies del *Laurencia* se han reportado como fuentes muy prolíficas, diversas y únicas de metabolitos secundarios. Este grupo de algas posee compuestos halogenados y no halogenados. Más de 250 sustancias han sido aisladas y clasificadas dentro de los terpenos y compuestos eterbromados como el laureacina y laureatina. La variación en la producción de MS dentro del género *Laurencia* ha permitido encontrar especies con actividad antimicrobiana como por ejemplo *L. obtusa*, la cual produce compuestos como la laurencienina un éter-aceteilénico (Freile-Peegrín y Morales, 2004; Amsler, 2009), es bien sabido que la producción de MS puede variar debido entre familias, géneros e incluso entre especies al grado de ser especie-específico (Scogings *et al.*, 2015).

L. obtusa fue colectada en dos sitios diferentes del SAV, una en el arrecife Giote y la otra en Isla de En medio (Tabla 7). La que se colectó en Giote, presentó mayor actividad con CMI bajas. El arrecife Giote es una zona sumamente perturbada, en donde el estrés al que están sometidos todos los organismos incluyendo las macroalgas es considerablemente mayor en comparación con Isla de En medio. Esto seguramente puede explicar el porque una de ellas es más activa que la otra. Se ha documentado que los metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas también ayudan a las algas a mantener la capacidad de recubrir o regenerarse rápidamente después de la acción por un depredador o algún daño abrasivo (Freile-Peegrín y Morales, 2004).

Cymopolia barbata

C. barbata fue el taxón que se seleccionó con base en los ensayos preliminares para continuar con las demás pruebas, esto fue porque presentó la mejor actividad inhibitoria en bacterias y levaduras.

Antimicrobianos

El extracto metanólico de *C. barbata* presentó actividad bacteriostática sobre *S. aureus* ATCC 29213, según Sánchez y Tay (2003) sugieren que pueden estar sucediendo de manera general dos procesos: 1) inhibiendo la función ribosomal y por lo tanto de síntesis de proteínas, 2) alterando la membrana celular o 3) inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos.

Los extractos pueden atravesar la membrana y la pared celular hasta el citoplasma, donde inhiben la síntesis de proteínas mediante la unión irreversible a los ribosomas. El modo de acción es que las subunidades ribosomales 30s y 50s constituyen el sitio de acción de los agentes antimicrobianos, el sitio de unión hará que este impida la formación de polisomas o altera la lectura de ARNm. Por otro lado los efectos secundarios de los extractos son la inducción de errores en la translocación y disrupción en la permeabilidad de las membranas bacterianas, parecida a la manera que actúan los fármacos. El tercer modo de acción es que los extractos interfieren a diferentes niveles en la síntesis de ácidos nucleicos. También pueden inhibir la síntesis de nucleótidos o interferir con las polimerasas involucradas en la replicación y transcripción del DNA (Sánchez y Tay, 2003).

La actividad antimicrobiana y la toxicidad que presentó *C. barbata* la podemos explicar porque tiene compuestos bromados estos los poseen la mayoría de los organismos marinos (Kazanjan y Fariñas, 2006). Estas sustancias pertenecen al grupo conocido como halogenuros orgánicos, los cuales están presentes en estos seres vivos debido al alto contenido de fluor, cloro, yodo y bromo presentes en el agua de mar. Estos son incorporados y por tanto se pueden sintetizar compuestos con estos átomos, a diferencia de los organismos del medio terrestre, donde la producción de halogenuros es nula. Cabe mencionar que son utilizados actualmente en la industria química como plaguicidas o como precursores en la

síntesis de otros productos. Se sabe que los organismos marinos los producen porque cumplen diversas funciones ya que sirven como repeletentes e inhibidores del apetito, agentes antibacteriales y antiincrustantes, feromonas y hormonas (Gribble, 2005).

C. barbata se ubica en la familia de las Dasycladales, la cual es una de las algas verdes que aunque esta calcificada y por lo tanto tiene algunas defensas estructurales, también contiene una gran cantidad de compuestos químicos, de hecho se siguen buscando nuevos antibióticos provenientes de esta especie (Park *et al.*, 1992).

La macroalga *C. barbata* sintetiza series únicas, 20 hidroquinonas bromadas preniladas llamadas cymopoles. La monobrominación es encontrada exclusivamente para el sitio de prenilación como se conoce en el cymopolone. Las cadenas laterales del isopreno todos son originados de unidades de geranil C10 con diferentes estados de oxidación, algunos de los cuales se hacen cíclicos de nuevo en la hidroquinona aromática como se observa en el debroisocymobarbatol.

Dentro de las hidroquinonas preniladas la que se sintetiza en mayor cantidad es el llamado "cymopole" (Park *et al.*, 1992; Amsler, 2009) este se ha reportado que inhibe la herbivoría por parte del molusco *Littorina littorea* y el erizo de mar *Lytechinus variegatus*. También se ha documentado que el dibromoisocymobarbatol disminuye los niveles de herbivoría aproximadamente un 29% ($p < 0.005$). De hecho los reduce estos niveles en un 50% por el pez *Lagodon rhomboides* y disminuye el pastoreo del anfípodo *Hyale macrodactyla* en un 22% ($p < 0.005$). En contraste este compuesto estimula la alimentación del erizo de mar *Diadema antillarum* (Park *et al.*, 1992, Amsler, 2009).

Por otro lado la dipropetrina también puede tener un efecto importante en la actividad antimicrobiana y la toxicidad, ya que esta sustancia se emplea para elaborar plaguicidas, estos son herbicidas derivados de la triazina, los cuales actúan específicamente como fungicidas en cultivos de algodón (Greene y Pohanish, 2005). La incorporación de estos compuestos a las macroalgas probablemente se deba a que en esta zona desemboca el río Jamapa, el cual

permite el acarreo de desechos desde puntos distantes hacia el mar con importantes implicaciones de contaminación en sus aguas, ya que los desechos que se vierten a estas cuencas llegan a la costa, en su mayor parte sin tratamiento alguno. Todos los organismos bentónicos como las macroalgas son susceptibles de ser afectados debido a su estrecha relación con los sedimentos (Guzman *et al.*, 2005).

Antioxidantes

En lo referente a la actividad antioxidante es importante mencionar que no se tienen registro de ésta en *C. barbata* para el SAV. Algunos autores reportan que las algas verdes son muy poco activas en comparación con las Rhodophyta u Ochrophyta (Ganesan *et al.*, 2008; Bin-Gui *et al.*, 2009), pues mencionan que estas últimas, tienen gran cantidad de compuestos fenólicos. Incluso en algunos trabajos estos compuestos ya han sido aislados. Sin embargo autores como Satoshi y colaboradores en el 2003, encontraron una fuerte capacidad antioxidante en *C. barbata* colectada en Jamaica, esto lo atribuyen a dos compuestos que aislaron llamados cymopolon y 7-hidroxicympolon. En este estudio reportan la capacidad antioxidante a través de otro método llamado “tecnología fluorescente” la cual evalúa esta actividad en células vivas donde se muestra la capacidad que tiene el producto natural para penetrar en las membranas celulares e inhibir las ERO (Especies Reactivas de Oxígeno) en células humanas vivas, teniendo una IC₅₀ de 4.0 µM con DCFH-DA (2',7'-diclorodihydrofluoresceína diacetato).

En este trabajo fue encontrado un compuesto en la fracción 3 que tienen al menos un grupo perteneciente a los bromofenoles el 4-bromo-3-fenil-isotiazol. Estos fenólicos bromados han demostrado poseer actividad atrapadora del radical DPPH, incluso algunos como los reportados por Ke Li y colaboradores en el 2007, mencionan que tienen mejor actividad que antioxidantes comerciales conocidos como el butilhidroxitolueno (BHT). Estos autores aislaron 4 compuestos fenólico bromados, los cuales tienen una CA₅₀ entre 9.67±0.04 a 21.90±0.1 µg/mL que comparados con la actividad antioxidante del BHT (83.84±0.3 µg/mL).

Otro trabajo que también reporta buena capacidad antioxidante de un bromofenol es el realizado por Ke Li en 2012, donde se registró la actividad de 14 compuestos fenólicos bromados va de 5.22 ± 0.04 a 23.60 ± 0.10 $\mu\text{g/mL}$ comparado nuevamente con el BHT con CA_{50} de 82.10 ± 0.20 $\mu\text{g/mL}$. Lo cual nos indica que estos tiene potencial para atrapar al radical DPPH. Es importante mencionar que estos dos estudios fueron realizados en dos algas pertenecientes a la división Rhodophyta: *Polysiphonia urceolata* y *Rhodomela confervoides*, lo cual resulta aún más interesante, pues el alga con la cual se trabajo en este estudio corresponde a una alga verde perteneciente a la división Chlorophyta. Esto es muy importante pues la mayoría de los compuestos que poseen actividad antioxidante en las macroalgas son aislados de algas rojas o pardas (Vidal *et al.*, 2001; Xiao-Juan *et al.*, 2006; Ke Li *et al.*, 2007; Bin-Gui *et al.*, 2009 y Ke Li *et al.*, 2012) pero no de verdes, además esta reportado que las Chlorophyta tiene poca o nula actividad antioxidante.

Con respecto a los ácidos grasos se sabe que los más comunes tanto en plantas superiores como en animales son el ácido palmítico, oleico, linoléico y los ácidos esteáricos. Cabe mencionar que el ácido linoléico se encuentra tanto en algas como en plantas, y es considerado como nutriente (Harborne y Baxter, 1993). Sin embargo los ácidos grasos que tienen entre 12 y 20 átomos de carbono son menos comunes en la naturaleza (Bhat *et al.*, 2009). Esto es importante resaltar ya que los ácidos grasos con un mayor porcentaje de abundancia en este estudio, son aquellos que tiene más de 12 átomos de carbono.

Frikha y colaboradores (2011) mencionan que es muy común encontrar en algas ácidos grasos insaturados como el ácido tetradecanóico, el ácido hexadecanóico, el 9 y 10 ácido octadecanóico y el ácido decanóico, como se reporta en este trabajo. Todos estos ácidos grasos insaturados provenientes de algas son una fuente de antioxidantes naturales (Vidal *et al.*, 2006).

Esto nos sugiere que los ácidos grasos insaturados obtenidos en las fracciones de baja polaridad del extracto acetónico de *C. barbata* también tienen capacidad antioxidante. Los ácidos grasos insaturados con propiedades antioxidantes

protegen a las células de la lipoperoxidación. La peroxidación lipídica comienza por la abstracción de un átomo de hidrógeno de un carbono alílico o un doble enlace por un RS lo que provoca un radical centrado en el carbono, después esta estructura sufre un rearrreglo molecular. Posteriormente entra el O₂ y con esto se forma el lipoperóxido, ocasionando que sea más reactivo y vuelva a realizar la abstracción de otro átomo de hidrógeno del lípido de la membrana adyacente (Vollhardt y Schore, 2000; Halliwell y Gutteridge, 2007). Esta reacción puede llevarse a cabo varias veces pues los ácidos grasos insaturados tienen de una a cinco dobles ligaduras en su estructura alterando la membrana celular (Bhat *et al.*, 2009).

Por otro lado las variaciones de ácidos grasos se pueden atribuir tanto a diferencias genéticas entre las especies como ambientales (localización, temperatura del agua, luz, concentraciones de nitrógeno y otros compuestos en el agua). De hecho los estudios en organismos marinos sugieren que estos varían ampliamente en la producción de metabolitos secundarios (Vidal *et al.*, 2006; Frikha *et al.*, 2011).

De acuerdo a la actividad antioxidante determinada para ambos extractos (metanólico y acetónico) de *C. barbata*, estos tienen buena capacidad antioxidante según lo reportado por la FDA (Food and Drug Administration, USA), ya que esta menciona que se consideran antioxidantes aprobados, aquellos que estén por debajo de 200 ppm (Gardziella *et al.*, 2000). Es importante resaltar que aunque los extractos de *C. barbata* no tienen la misma actividad que antioxidantes comerciales conocidos, como el BHT (2.0±1 µg/mL), ácido gálico (19.0±0.7 µg/mL) o el ácido ascórbico (4.0±0.03 µg/mL) (Bin-Gui *et al.*, 2009); es de considerarse que estos últimos son compuestos puros, mientras que el extracto es una mezcla que puede presentar una gran cantidad de sustancias que no precisamente son moléculas antioxidantes.

Toxicidad

La toxicidad del extracto metanólico y acetónico de *C. barbata* registrada en este estudio demostró que ambos extractos son muy tóxicos con una CL₅₀ de 30.94 y

47.82 µg/mL respectivamente. Esta toxicidad puede estar dada también por los compuestos bromados y la dipropetrina, que ya que discutió anteriormente.

El modelo de *A. salina* se ha utilizado en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales. De hecho en la última década se ha incorporado este ensayo porque se requieren pequeñas cantidades de muestra (2-20 mg o menos) lo cual permite la evaluación rápida de extractos crudos y fracciones. Además, se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, otro punto importante es que no se requiere suero animal, el cual si es necesario para evaluar citotoxicidad de productos naturales (Pino y Jorge, 2010).

Es importante mencionar que la concentración letal media obtenida en esta prueba, nos muestra que son extractos muy tóxicos según la escala propuesta por Pino y Jorge en el 2010, indicando que es un extracto que posiblemente se pueda utilizar en ensayos de citotoxicidad, como insecticida o para algunos otros efectos farmacológicos. De hecho se han realizado varios estudios de la evaluación biológica frente a *A. salina* de diversas plantas para probar el efecto de plaguicidas potenciales, ya que desde el punto de vista social y económico la identificación de compuestos activos como candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos productos fitosanitarios brinda nuevas alternativas, eficaces y ambientalmente seguras para el campo de la agricultura (Pino *et al.*, 2007). Además de que trabajar con *A. salina* nos garantiza que la CL₅₀ no esta influenciada por algunos otros factores, ya que como el conteo de los sobrevivientes se realiza a las 24 horas, es posible discriminar si la inhibición del crecimiento se presenta por alteración del comportamiento (efecto antialimentario) o por efecto fisiológico post-ingestión (Pino y Jorge, 2010).

Con respecto al papel que tienen los ácidos grasos en la toxicidad algunos autores como Manilal *et al.* 2011, encontraron actividad insecticida de una fracción obtenida del extracto de *L. brandenni*, la cual mostró ser tóxica en larvas de *Sarcophaga sp* con una CL₅₀ de 43 mg/g y *Sitophilus oryzae* con CL₅₀ de 3.7

mg/cm. Estos autores le atribuyen esta actividad a los ácidos grasos, ya que al analizar su fracción en CG-EM, obtuvieron un alto contenido de diversos ácidos grasos como el ácido hexadecanóico, ácido dodecanóico y el ácido octadecadienóico. Estos ácidos grasos fueron encontrados en el presente estudio.

La abundancia del β -sitosterol en la fracción 6 obtenida del extracto acetónico de *C. barbata* es de esperarse pues este ha sido reportado como el componente esencial de las membranas celulares en plantas y algas (Seckman e Ikan, 1972; Govindan *et al.*, 2003). Seckman e Ika mencionan que el β -sitosterol es uno de los compuestos principales de macroalgas y este es justamente la transición que existe entre los procariontes y las algas superiores. Govindan y colaboradores en el 2003 aislaron al β -sitosterol de *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta), sin embargo no presentó actividad antimicrobiana.

El fitol es un compuesto diterpénico que está en todas las plantas y algas es un alcohol acíclico presente en forma de éster en la clorofila, pigmento universal de organismos fotosintéticos (Geissman, 1974).

El aldehído encontrado (10-12-hexadecadienal) de la fracción 4 ya ha sido reportado en diferentes especies del género *Ulva*, incluso es uno de los principales constituyentes en sus extractos. Ésta alga al igual que la del presente estudio pertenecen a la división Chlorophyta (Kajiwara *et al.*, 1992).

Por último, es importante resaltar que los estudios que se han llevado a cabo en el SAV en macroalgas son en su mayoría florísticos. También existen algunos que abordan aspectos ecológicos, de evaluación de recursos y de detección de metales pesados. Este es el primer reporte donde realiza el análisis de compuestos químicos en macroalgas del SAV. Es importante mencionar que el conocimiento de las macroalgas del SAV se encuentra en un nivel descriptivo debido a que no se tiene un inventario completo de la flora de los arrecifes; solo se han efectuado colectas en el nivel intermareal superior (Galicia y Morales, 2007), por lo que es posible que la riqueza de especies que potencialmente pueden producir metabolitos secundarios es todavía desconocida.

Con todo esto es claro que trabajos como el realizado son de suma importancia; ya que contribuyen al conocimiento químico y de las actividades biológicas de las especies de macroalgas del SAV un Área Natural Protegida que constituye el hábitat de numerosas especies potencialmente útiles. A partir de las macroalgas se pueden obtener sustancias novedosas con probables actividades biológicas.

CONCLUSIONES

1. 28 especies del SAV se determinaron. El 53.5% pertenece al filo Rhodophyta, 28.5% Chlorophyta y 17.8% a Ochrophyta. Además dos cianobacterias fueron determinadas. Tres especies *Laurencia filiformis* (C. Agardh) Montagne, *Sebdenia flabellata* (J. Agardh) P. G. Parkinson y *Wrangelia bicuspidata* Børgesen se determinaron como nuevos registros para el SAV. Un nuevo registro se determinó para México: *Compsothamnion thuyoides* (Smith) Nägeli.
2. Las algas del filo Rhodophyta presentaron mayor actividad antibacteriana (50%), seguida de Chlorophyta (43.75%) y Ochrophyta (6.25%). Las algas del filo Rhodophyta presentaron mayor actividad antifúngica en levaduras con (60%), seguido de Chlorophyta (40%).
3. La especie *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) fue la que tuvo mayor actividad en cepas bacterianas, seguida de *C. barbata* (Chlorophyta).
4. Las algas de la división Ochrophyta no tuvieron actividad en ninguna cepa levaduriforme. Los extractos metanólicos algales no tuvieron efecto sobre hongos miceliados.
5. *C. barbata* registró actividad antifúngica en todas las cepas levaduriformes.
6. El extracto metanólico de *C. barbata* (Chlorophyta) presentó terpenos, fenoles y saponinas.
7. La CA_{50} frente al radical DPPH del extracto metanólico de *C. barbata* es de $106.78 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ y presentó una concentración de $28.76 \mu\text{g eq. ácido gálico/mg de extracto}$. El extracto acetónico de *C. barbata* tuvo una $CA_{50} = 226.97 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ con el radical DPPH y registró una concentración de $15.81 \mu\text{g eq. ácido gálico/mg de extracto}$.
8. El extracto metanólico de *C. barbata* tiene efecto bacteriostático sobre la población de *S. aureus* ATCC 29213 a concentraciones de CBM (1.0 mg/mL).
9. El extracto metanólico y acetónico de *C. barbata* demostraron ser muy tóxicos con una CL_{50} de 30.94 y 47.82 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente en *A. salina*.

- 10.El ensayo cualitativo de DPPH indica que las fracciones de baja polaridad tienen actividad antioxidante.
- 11.El ensayo cualitativo antimicrobiano nos muestra que en la fracción 5 y 6 del extracto acetónico de *C. barbata* son activas sobre la cepa *S. aureus* ATCC 29213.
- 12.Los ácidos grasos registrados en fracciones de baja polaridad del extracto acetónico de *C. barbata* son los responsables de la actividad antioxidante. Los compuestos bromados y la dipropetrina tienen actividad antimicrobiana y participan en la toxicidad del extracto de *C. barbata*.

REFERENCIAS

- Ali A. El Gamal. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18:1-25.
- Amsler C. D. 2009. Algal chemical ecology. Springer. Alemania. 1-55 pp.
- Avila, J. G. 1996. Actividad antio-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM. México. 234 p.
- Aviles, J.M. 1990. Contribución al estudio del género *Caulerpa* Lamoux en México. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México. 121p.
- Balboa, M. E., Conde, E., Moure, A., Falqué, E. y Domínguez, H. 2013. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from Brown algae. *Food chemistry* 138:1764-1785.
- Batista, G. A. E, Charles, B. M, Mancini-Filho, J y Vidal, N. A. 2009. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 14(2): 1-18.
- Bhat S. V., Nagasampagi B. A. y Meenakshi. 2009. Natural Products. Chemistry and Applications. *Alpha Science International Ltd.* India. 3.2-3.31 p
- Bin-Gui W, Wei-Wei Z, Xiao-Juan D, Xiao-Ming L. 2009. *In vitro* antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chemistry* 113: 1101-1015.
- Brandão, J.A. 1967. Géneros de algas marinas da Costa Atlántica. Latino-Americana. Universidad de São Paulo. Brasil. 353 y 354 pp.
- Burkholder, R., Burkholder, L. M. y Almodovar, L.R. 1960. Antibiotic activity of some marine algae from Puerto Rico. *Botánica Marina* 2:149-156.
- Cecilia, G.E.A., Dos santos, A.M.A., Pinheiro, S.A.K., Oliveira de Souza, L.I., De Barros, L., De Albuquerque, M. F.C. y Goulart, S.A.E. 2012. Antifungal

activities of different extracts of marine macroalgae against dermatophytes and *Candida* species. *Mycopathologia* 174: 223-232.

Creed, M., Fujii, M.T., Barreto, M.B. de B., Guimarães, S.M.P. de B., Cassano, V., Pereira, S.M.B., Carvalho, M. de F. de O, y Khader, S. 2010. Rhodophyceae. En: Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Vol. 1. (Forzza, R.C. Eds). Rio de Janeiro Andrea Jakobsson Estudio; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Ríó de Janeiro. 416-436 pp

Davis, B.D. y Dulbecco, R. 1996. Tratado de microbiología. 4ª Edición. Ed. Masson. México.

Dawes, C.J. 1986. Botánica Marina. Limusa. México. 146-151 p.

Dawes, C.J. y Mathieson, A.C. 2008. The seaweeds of Florida. University Press of Florida. USA. 591p.

De la Calle, F. 2007. Fármacos de origen marino. *Les biotecnologías*. Perú. 58:141-155.

De la Garza, F.C. 2003. Clave genérica de las algas rojas marinas macroscópicas y comunes de las costas de Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. México. 69p.

De Lara Isassi, G. 1991. Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bentónicas. *Hidrobiológica* 1(2): 21-28.

De Lara-Isassi, G., Álvarez-Hernández, S. y Lozano-Ramírez, C. 1996. Actividad antibacteriana de algas marina de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano. *Revista de Biología Tropical* 44(2): 895-898.

De Lara Isassi, G., Álvarez-Hernández S., Lozano-Ramírez C. Y Hernández-Soto, N. 1999. Nuevas adiciones al conocimiento de la actividad antibiótica de macroalgas marinas mexicanas. *Hidrobiología* 9(2): 159-169.

- De Lara Isassi G., Álvarez-Hernández S. e Inclán-Sánchez A. 2005. Detección antimicótica en extractos de algas marinas. *Revista Sociedad Mexicana de Historia Natural* 3(1): 45-53.
- Dey, P. M. y Harbone, J. B. 1989. *Methods in Plant Biochemistry*. Volumen 1. Academic Press Limited. 552 pp.
- Freile-Pelegri Y. y Morales J. L. 2004. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. *Botánica Marina* 47: 140-146.
- Frikha F., Kammoun M., Mchirgui R.A., Belbahri L., Gargouni Y., Miled N. Y Ben-Rebach F. 2011. Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. *Ciencias Marinas* 37(2):113-124.
- Galicia G. C. y Morales G. A. 2007. Investigaciones sobre macroalgas realizadas en el Sistema Arrecifal Veracruzano. 141-160p. En: Granados B. A., Abarca A. L. G. Y Vargas H. J. M. (Eds) *Investigaciones Científicas en el Sistema Arrecifal Veracruzano*. Universidad Autónoma de Campeche. ISBN 968-5722-53-6. 304 p.
- Ganesan P, Kumar CS, Bhaskar N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology* 99(8):2717-23.
- García-Bores A. M. 2010. Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa* Baker. Tesis de Doctorado. FES Iztacala. UNAM. México. 59-105 pp.
- García, J.G.J. 2011. Evaluación de bioactividad de extractos de la planta *Ardisia compressa* Kunth y las macroalgas *Padina durvillaei* Bory y *Ulva hildebrandtii* Gepp y Gepp y *Ulva lactuca* Linnaeus. Tesis de Licenciatura. Campus Puerto Ángel. Universidad del Mar. México. 82 p.
- Gardziella, A., Pilato, L.A. y Knop. 2000. *Phenolic Resins*. 2da. Edición. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 560 p.
- Geissman, T. A. 1974. *Principios de química orgánica*. 2da. Edición. Editorial Reverté. España. 878 pp.

- Govindan M., McClean A.E. y Brown K.A. 2003. Chemical constituents of the Caribbean marine alga *Bryopsis plumosa*. *Microchemical Journal* 47:193-196.
- Greene, S.S y Pohanish, R.P. 2005. *Sitting's Handbook of pesticides and agricultural chemicals*. William Andrew Publishing. USA. 376, 1081, 1057, 1037 pp.
- Gribble, G. W.. 2005. Halogenuros orgánicos. *Investigación y Ciencia*. 78-84 pp.
- Guiry M. D. y Guiry G.M. 2015. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; buscado el 11 Noviembre 2015.
- Guzmán, A.P., Villanueva, F.S. y Botello, A.V. 2005. Metales en tres lagunas costeras del estado de Veracruz. 361-372. En: Botello, A.V., Rendon-von Osten, J., Gold-Bouchot, G. y Agraz-Hernández, C. (Eds). 2005. *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. 2da. Edición. Universidad Autónoma de Campeche. Universidad Autónoma de México. Instituto de Ecología. 646 p.
- Halliwell, B. Y Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4ta. Edición. Oxford University Press. Gran Bretaña. 238-247 pp.
- Harborne J.B. y Baxter H. 1993. *Phytochemical Dictionary*. Taylor and Francis. London.
- Henríquez, P. A., Candia, R. Norambuena, R, Silva, M. Y Zenelman, R. 1979. Antibiotic properties of marine algae II. Screening of Chilean marine algae for antimicrobial activity. *Botánica Marina* 22: 451-453.
- Inclán-Sánchez, A. 2004. Variación estacional de la actividad antimicótica de algunas macroalgas de las costas del Estado de Veracruz. Tesis de Maestría. Iztapalapa. Universidad Autónoma Metropolitana. 91p.
- Index Nominum Algarum*. [www. 128.32.109.44/e-ina.html](http://www.128.32.109.44/e-ina.html) Integrated Taxonomic Information System.
- Kajiwara, T., Hatanaka, A., Matsui, K., Tomoi, T., Fujimura, T. y Kawai, T. 1992. Distribution of long chain aldehyde-forming activity from fatty acids and

- changes in its activity with growth in marine algae. *Phytochemistry* 31(8):2635-2639.
- Kazanjian, A. y Fariñas, M. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysia lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). *Revista de Biología Tropical*. 54(3): 189-200.
- Ke Li, Xiao-Ming Li, Nai-Yun Ji y Bin-Gui Wang. 2007. Natural bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* (Rhodomelaceae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15: 6627-6631.
- Ke Li, Xiao-Ming Li, James B. G. Y Bin-Gui Wang. 2012. New nitrogen-containing bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides* and their radical scavenging activity. *Food Chemistry* 135: 868-872.
- Kelman, D., Kromkowski, P. E., McDermid, J. K., Tabandera, K. N., Wringh, R. P y Wringh, D. A. 2012. Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Marine Drugs* 10:403-416.
- Koneman, E. W. 1996. Diagnóstico microbiológico. Editorial Panamericana. México. 386-393 p.
- Konigsberg F. M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México. 3-21 p.
- Lenis, V. L.A., Benitez, R., Peña, S. E. y Chito, T. D. M. 2007. Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. *Scientia Et Technica* 13 (33): 97-102.
- León, A.D, Candelaria, S.C., Hernández, A. P. y León, T. H. 2007. Géneros de algas marinas tropicales de México. Las prensas de ciencias. UNAM. México. 132-135 p.
- Littler, D.S. y Littler, M.M. 2000. Caribbean Reef Plants. Offshare Graphics. Inc. USA. 594p.

- Littler, D.S, Littler, M.M. y Hanisak, M.D. 2008. Submersed plants of the Indian River Lagoon. Washington, D.C.: Offshore Graphics, Inc. 1-286 pp.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. 12 edición. Pearson. España. 866-901 p.
- Manilal, A., Sujith, S., Sabarathnam, B., Kiran, G. S., Selvin, J., Shakir, C. y Lipton, A. P. 2011. Biological activity of the red alga *Laurencia brandenni*. *Acta Botanica Croatica* 70(1): 81-90.
- Martínez-Nadal, N. G., Rodríguez, L. V. Y Casillas, C. 1963. Sarganin and Chonalgin, new antibiotic substances from marine algae from Puerto Rico. *Antimicrobial Agenst and Chemotherapy* 27: 68-72.
- Martínez, M. A., Galeano, J. E., Cadavid, J., Mirand, R. J., Llano., L. J. y Montalvo, M. K. 2007. Acción insecticida de extractos etanólicos de esponjas del golfo de Urabá sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*. *Vitae* 14(2): 90-94.
- Matsukawa R , Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T. Chihara M, Yamamoto Y, Niki E, Karube I· 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 9: 29–35.
- Mautner, H. G., Gardner, G.M. y Pratt, R. 1953. Antibiotic activity of seaweed extracts II. *Rhodomella arix*. *Journal of American Pharmaceutical Associaton Scientific Edition* 42:294-296.
- McLaughlin. 1991. Crown gall tumors on potato disc and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. En: Dey, P. M., Harbone, J. B., Hostettman, K. *Methods in plant chemistry Assays for bioactivity*. Academic Press U.S.A. 1-32 pp.
- Mendiola, M. J., Hernández, H., Acuña, D., Esquivel, M., Scull, L. R. y Abreu, P. J. 2005. Actividad inhibidora del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

- de extractos de algas del género *Laurencia*. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 57(3):1561-3054.
- Muñoz, C.D.S. 2015. *Larrea tridentata* de dos zonas áridas de México: análisis fitoquímico y evaluación antioxidante. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México.
- NIST (National Institute of Standards and Technology) MS Search 2.0. Software.
- Norris, J. N. y Fenical, W. 1982. Chemical defense in tropical marine algae. *Smiths Contributions in Marine Science* 12: 417-431.
- Nur Alam Md., Nusrat, J.B. y Rafiquzzaman Md. 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21:143-152
- Ortega, M. M., Godinez, J. L. Y Garduño, S. G. 2001. Catálogo de algas bénticas de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe. Instituto de Biología. UNAM. México. 594 p.
- Ortegón, A. I., Freile-Pelegrián, Y. y Robledo, R.D. Capítulo Diversidad vegetal. Algas. 162-164 pp En: Durán R. y M. Méndez (Eds). 2010. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. 496 pp.
- Pantoja, F. M. R. 2013. Metales pesado en algas y pastos marino en el grupo Norte del Sistema Arrecifal Veracruzano. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México. 32p.
- Park M., Fenical W. y Hay M. E. 1992. Debromoisocymobarbatol, a new chromanol feeding deterrent from the marine alga *Cymopolia barbata*. *Phytochemistry* 31(12):4115-4118.
- Pino Pérez O, Jorge Lazo F, Tacoronte Morales JE, Khambay BPS. 2007. Aislamiento y caracterización de compuestos activos de *Mammea americana* L. *Revista Cubana de Química* 19(1):74-77.

- Pino P. O. y Jorge L. F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal* 22(1): 34-43.
- Rivero, R. A. y Betancort, R. J. R. 2006. Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. *Medicinal Chemistry* 10 p.
- Samón-Legra, E. y Enríquez-Lavandera. D. 2010. Nuevos registros de hongos marinos filamentosos en el litoral sur de Guantánamo, Cuba. Serie Oceanológica. 7:61-68.
- Sánchez, V.J.T. y Tay, Z.J. 2003. Fundamentos de microbiología y parasitología médicas. Méndez Editores. México. 211-218 p.
- Satoshi, T., Hodges T.W., Rajbhandari, I., Gerwick, W.H., Hamann, M. T. y Nagle, D.G. 2003. Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *Journal of Natural Products* 66:605-608.
- Schneider, C.W. y Searles, R.B. 1991. Seaweeds of the southeastern United States. Cape Hatteras to Cape Canaveral. 553, 563 pp.
- Scogings, P.F., Hattas, D., Skarpe, C., Hjältén, J., Dziba, L., Zobolo, A. y Rooke, T. 2015. Seasonal variations in nutrients and secondary metabolites in semi-arid savannas depend on year and species. *Journal of Arid Environments* 114:54-61
- Seckman J. e Ikan R. 1972. Sterols and chloroplast structure of *Cyanidium caldarium*. *Plant Physiology* 49:457-459.
- Sentíes, G. A. y Dreckmann, M.K. 2002. Monografías Ficológicas. UAM-Iztapalapa. México. 192p.
- Stchigel, A. M., Calduch, M., Mac Cormack, W. P., Ruberto, L. A. M. Y Guarro, J. 2007. Simposio Argentino y III Latinoamericano sobre investigaciones antárticas. Instituto Antártico Argentino.
- Struthers, K. J. y Westran, R.P. 2005. Bacteriología clínica. Masson. España. 49-56 p.

- Thiers B. 2015. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponible en: <http://sweetgum.nybg.org> (Noviembre 2015).
- Tunnell, J. W. 1988. Regional comparison of southwestern Gulf of Mexico to Caribbean Sea coral reefs. Proc. 6th. Int. Coral Reef Symp. 3:303-308.
- Vargas-Álvarez, D., Soto-Hernández, M., González-Hernández, V. A., Engleman, E. M., Martínez-Garza A. 2005. Variación del contenido de flavonoids en hojas de Guayaba en condiciones de estres. *Revista Chapingo* 11(1):89-92.
- Vernon, L. S., Rudolf, O y Rosa, M. L. R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin- ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299:159-178.
- Vidal N. A., Motidome M., Mancini-Filho J., Fallarero L. A., Midori T. M., Brandao T. L. M y Lapa A. J. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelim) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 37(3): 373-382.
- Vidal N. A., Fallarero A., Silva A.W.E.R., Oliveira S.A.M., Lima A., Pavan T.R., Vuovela P. y Mancini F.J. 2006. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 42(4): 589-600.
- Vollhardt, K.P.C. y Schore, N. E. 2000. Organic Chemistry. 3er. Edición. W. H. Freeman and Company. USA. 1012-1013 pp.
- Wagner, H. 2001. Plant drug analysis. Second Edition. Springer Germany. 15-29 pp.
- Wang, H. y Bun, T. N. 2002. Isolation of an Antifungal thaumatin-like protein from kiwin fruits. *Phytochemistry* 61:1-6
- Watterman, P. G., Mole, S. 1989. Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plant. Set Plant Interactions. Ed. Bernays E.A. Volúmen 1. Florida. USA.

Wynne, M.J. (2009 '2008'). A checklist of the benthic marine algae of the coast of Texas. *Gulf of Mexico Science* (1): 64-87.

Xiao-Juan D, Wei-Wei Z, Xiao-Ming L, Bin-Gui W. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry* 95: 37-43.

Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrín Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 19:449–458.

www-algaebase.org. (Fecha de consulta: 20-Julio-2015).

ANEXO I

DASYCLADALES

El orden Dasycladales perteneciente a la división Chlorophyta comprende miembros calcificados con registros fósiles de casi 10 géneros que datan desde el Ordovícico. Las formas actuales son todas tropicales o subtropicales. Todas muestran ramificación verticilada y producen quistes que contienen núcleos secundarios haploides a partir de los cuales son liberados los anisogametos. El ciclo de vida es diploide. La familia Dasycladaceae comprende todos los géneros vivos que tiene simetría radial un eje principal erecto y uno o muchos verticilos de ramas laterales. El talo tiene inicialmente un gran núcleo primario, pero a través de la división nuclear (amitosis) la condición cenocítica se establece antes de la reproducción. La meiosis puede ocurrir durante o justo después de la división del núcleo. Koop (1979) sugiere que la meiosis ocurre en el núcleo primario (Dawes, 1986).

***Cymopolia barbata* J.V.F. Lamouroux 1816**

Hábito, morfología vegetativa. Talos con forma de arbustos o matas de poca altura, formando crecimientos parecidos a matorrales gregarios, psamofíticos o epilíticos (litofíticos o saxícolas), con fijación al sustrato mediante rizoides, erectos, semirígidos, ásperos, pétreos, calcificados, al corte transversal teretes, formados por partes compactos con estructura relativamente compleja, son segmentos articulados, ápices con mechones de filamentos. Estípites presentes o ausentes, con constricciones anulares a lo largo. Ramificación del talo simpodial, de cuarto o mayor orden, en un plano, dicotómica. Ramas con diámetro uniforme a lo largo del talo, longitudinalmente con el mismo diámetro, en sección transversal circulares.

Estructura y anatomía. El talo esta formado por un filamento central con ramificaciones (laterales) en verticilo que a su vez ramifican hasta formar con sus ápices unseudoparénquima cortical (donde se deposita el carbonato de calcio). Sifones cilíndricos, con ápices sencillos o lisos ramificando en varios planos, dicotómicamente, sin septos celulares en o cerca de las ramificaciones. No tienen

estructuras vegetativas especializadas. Los miembros de esta especie alcanzan una altura de 20 cm, aunque son más típicos los de menor altura.

Características celulares. Pirenoides ausentes

Características reproductivas. Gametangios, generalmente pedicelados, producen gametos (León *et al.*, 2007).

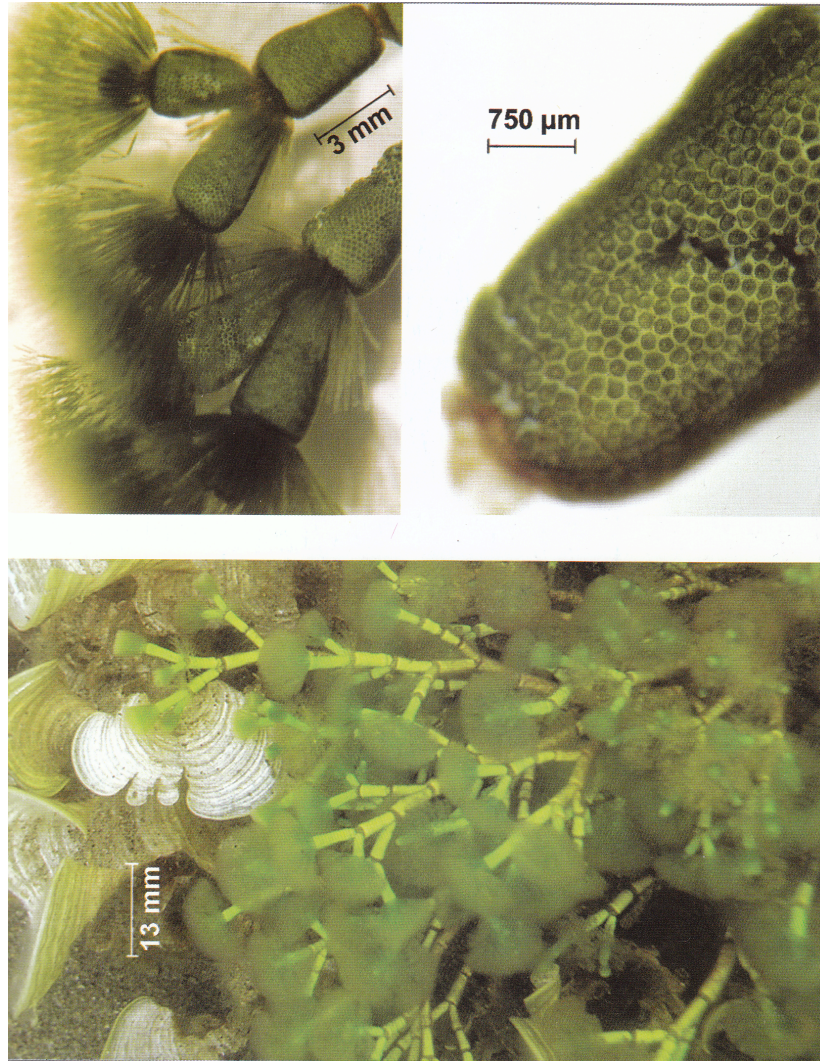


Figura 12. *C. barbata*. Crecimiento, ápices con mechones de filamentos (arriba izquierda) y facies de los utrículos calcificadas (como panal de abejas, arriba derecha), hábito (abajo) *Tomada de León *et al.*, 2007.

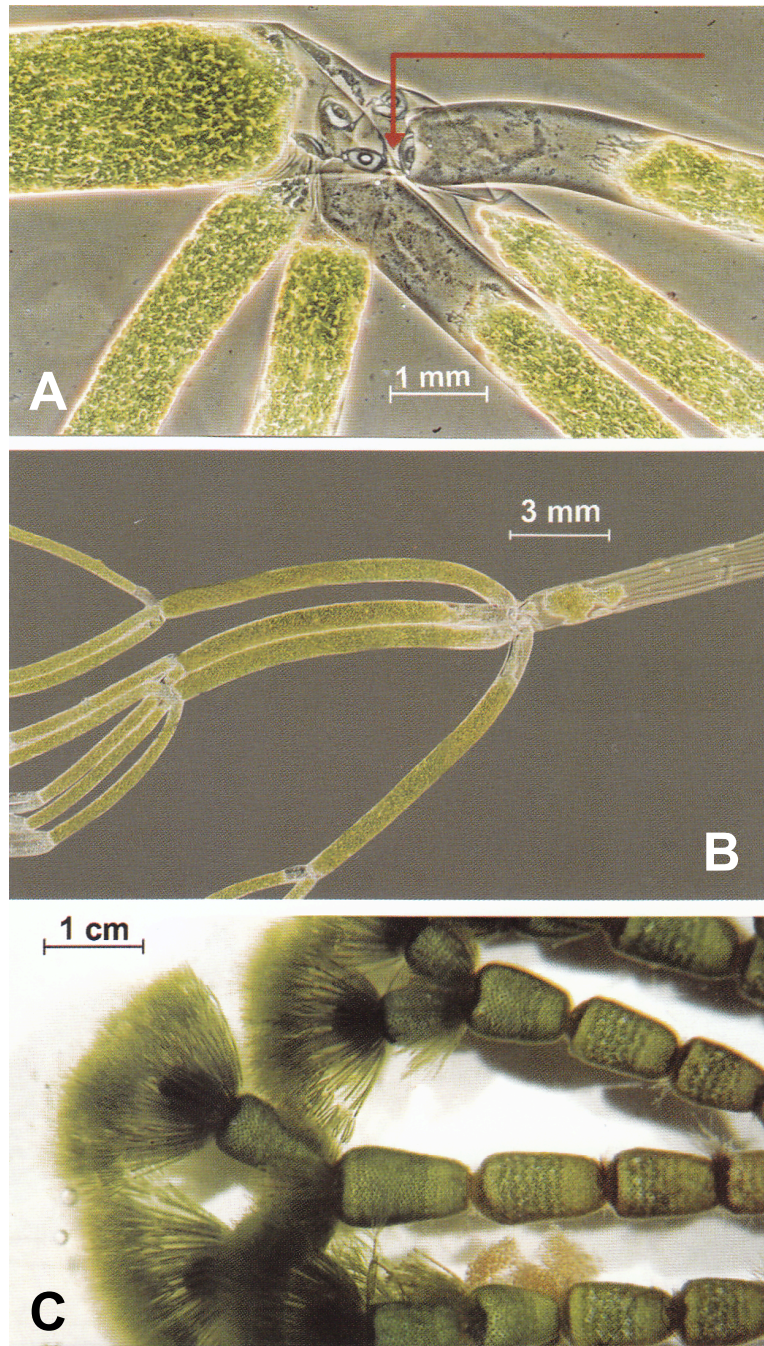


Figura 13. *C. barbata*. A y B: segmentos con articulaciones, detalles del sifón estructural.

C: crecimiento. *Tomada de León *et al.*, 2007.

ANEXO II

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Prueba de dilución en caldo o de Kirby-Baüer

Fundamento. La mayor parte de los laboratorios utilizan la prueba de susceptibilidad con discos o antibiograma. En esta prueba se utilizan discos de celulosa impregnados con concentraciones estándar de un antibiótico. Estos discos se colocan en placas de agar en las que se ha realizado la inoculación del microorganismo objeto de evaluación. A medida que las bacterias se multiplican durante la incubación nocturna, el antibiótico muestra difusión en el agar. Alrededor de cada disco aparece una banda de inhibición cuyo tamaño es proporcional a la susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico del que está impregnado el disco correspondiente. Mediante la aplicación de criterios estandarizados, se equipara el tamaño de la banda de inhibición con la resistencia o sensibilidad del microorganismo frente al antibiótico (Struthers y Westran, 2005).

Medio. Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar MH, ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos 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 difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Inóculo. Con ayuda de un asa de siembre estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de microorganismos a ensayar. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo MH, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 24 h o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL.

Preparación del estándar. El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 mL de cloruro de bario a 99.5 mL de H₂SO₄ 0.36N (Hendrickson, 1987, citado por Ávila 1996). La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto con es espectrofotómetro.

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9% hasta igualarlas. Una vez logrado esto, se sumerge un segundo hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana, y 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 de agar de MH. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente, es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Por último se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez que ha secado el inóculo, la placa de MH está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará su actividad antibacteriana.

Aplicación de sustancias. Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del No. 5, los cuales serán previamente esterilizados. Una vez teniéndolos se impregnarán con la cantidad deseada de extracto (2 mg / sensidisco).

Para realizar la prueba de susceptibilidad, los sensidiscos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan manualmente sobre la superficie del agar, con ayuda de una pinza estéril, los sensidiscos deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa. Estos deben presionarse suavemente con la punta de la pinza, teniendo cuidado de no moverlos.

Controles negativos. En los bioensayos se utilizaron sensidiscos impregnados con los diferentes solventes que se utilizaron para disolver los extractos, dejándolos evaporar durante 12 h.

Control positivo. La sensibilidad de las cepas experimentales se evaluó con sensidiscos impregnados con 25 µg de cloramfenicol.

Interpretación de resultados. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, la prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedios en mm.

Concentración Mínima Inhibitoria

Fundamento. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es el parámetro fundamental para determinar la sensibilidad de una bacteria frente a un antibiótico. Se introduce en tubos de ensayo una suspensión diluida de la bacteria, de manera que cada uno de los tubos contiene una concentración diferente del antibiótico que se debe evaluar. La concentración antibiótica máxima utilizada en esta prueba suele ser de 32 mg/mL. Este rango o una concentración inferior es relevante debido a que, a estas concentraciones, los antibióticos suelen ser eficaces en la sangre, los fluidos y los tejidos corporales, con efecto tóxicos generalmente mínimos. Tras la incubación a lo largo de la noche, se determina la CMI comprobando el crecimiento de las bacterias en cada uno de los tubos, indicado por la turbidez en su interior. La CMI es la concentración menor del antibiótico que inhibe el crecimiento (Struthers y Westran, 2005).

Método de macrodilución en caldo (Jones *et al.*, 1987, modificado por Avila, 1996).

Preparación de reactivos y soluciones. La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo el extracto en el caldo MH a la mayor concentración final deseada. Se colocan 2 mL de solución de trabajo en el primer tubo de la serie de diluciones que se va a utilizar, luego se transfiere de ese tubo 1 mL con una micropipeta a un segundo tubo donde se tenía previamente 1 mL de caldo MH para que se pudiera llevar a cabo la dilución, este proceso continua hasta llegar al último tubo, al cual se le quitará 1 mL que se desechará. Las concentraciones finales de antimicrobianos en esta prueba son iguales a la mitad de la serie inicial de dilución.

Inoculación e incubación de los tubos. Se preparó un inóculo que contenga 10^6 a 10^7 UFC/mL ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez. Incubar los tubos a 35°C durante 24 h.

Interpretación de los resultados. La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que la droga ha sido capaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

Concentración Mínima Bactericida

Fundamento. La determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CBM) se realiza con los mismos tubos de la prueba de CMI. La observación de crecimiento bacteriano en estas placas de agar demuestra que los microorganismos del inóculo inicial quedaron inhibidos por el antibiótico, pero no fueron destruidos por éste. Si las bacterias sobreviven en los tubos que tienen una dilución superior al doble de la CMI, se considera que las bacterias con “tolerantes” al antibiótico (Struthers y Westran, 2005).

Método de la determinación de la Concentración Bactericida Media (Finegold y Jo Baron, 1989, en Avila, 1996).

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en caldo. Cuando la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento inmediatamente después de ser sembrado, la cual se inoculara en una placa de agar MH para determinar el número real de unidades formadoras de colonia del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la inoculación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación del factor de dilución.

Luego de haberse determinado la CMI se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 mL) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no

presentan turbidez luego de la incubación, en placas de agar MH. El número de colonias que se desarrolla en estos subcultivos luego de incubar durante 18 h se compara con el número de UFC/mL del cultivo original. En aquellos tubos que no presenten turbidez, los microorganismos permanecerán viables o bien, habrán sido destruidos por el agente microbiano. Debido a que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original, se denomina Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1996).

La microtécnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determinan en placas de ELISA. La micropipeta se preparó colocando 50 µL de caldo MH con la concentración deseada del extracto a probar.

Se prepara una suspensión bacteriana con un asa de siembre estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo MH, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 24 h o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/mL, de esta suspensión se toman 0.1 mL y se le adicionan a 99.9 mL de solución salina al 0.9% obteniéndose así una concentración de 10⁵ bacterias/mL. Cada pozo se inocula con 50 µL de esta suspensión bacteriana.

Una vez inoculada la placa se tapa para evitar la desecación y se incuba por 24 h a 37° C, pasado este tiempo se le añaden 50 µL de una solución de cloruro de tetrazolio (TTC) al 0.08% a cada pozo, se incuba por 30 min a 37° C. En los pozos donde se desarrolla el organismo el colorante es reducido a formazan que es de color rojo, produciéndose un botón rojo en el fondo del microtubo. Donde no hay desarrollo bacteriano la solución permanece clara.

ANEXO III

Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento) (Kubo, 1993; citado en Avila, 1996).

Fundamento. Para potenciar las defensas naturales del organismo y eliminar una infección bacteriana, el antibiótico debe estar presente a una concentración eficaz y durante el tiempo suficiente. La concentración debe ser una o varias veces superior a la CMI. Sin embargo, la concentración del antibiótico no tiene que ser tan elevada como para causar toxicidad en el paciente (Struthers y Westran, 2005).

Método.

1. Preparar y rotular por lo menos un tubo con el extracto problema, para muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de dos horas, hasta las 8 hrs. A partir de este muestreo, se preparan tubos para realizar lecturas cada 6 hrs.
2. Preparar y rotular un tubo sin antídoto que sirva como control del desarrollo.
3. Preparar el inóculo con aproximadamente $1 \times 10^{7-8}$ bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo MH (esta concentración bacteriana se obtiene en un período de 12 a 18 h de incubación).
4. Inocular con ayuda de una micropipeta 0.1 mL de la suspensión bacteriana en los tubos que contienen el extracto (el cual estará a una concentración igual a la CBM) y sus múltiplos medios; esto es, la MIC y la mitad de la MIC.
5. Muestrear cada dos horas durante las 8 primeras horas, además de que se realizan diluciones en solución salina al 0.8%, para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo. Pasadas las 8 horas se muestrea cada 6hrs. La duración del experimento es de 24 a 36 h.
6. Para los resultados se grafica el Log del número de sobrevivientes contra el tiempo y para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis y Dulbecco, 1996).

ANEXO IV

Cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas.

1. Para el análisis de las fracciones 2, 3, 5, 6 y 7 obtenidas de la cromatografía de columna abierta se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies 6850GC acoplado a espectrómetro de masas (CG-MS) marca Agilent Technologies modelo 5975C VL MSD. El análisis se realizó utilizando una columna Agilent 19091s-43E de 30.0 m y diámetro de 250 μm . Las condiciones fueron: temperatura del horno 70-290°C a 15°C por minuto, temperatura de inyector 250°C, gas de acarreo He, a presión de 7.52 psi y velocidad linear de 35 cm/s, cantidad de muestra empleada: 1.0 μL , energía de ionización.

2. Para la fracción 4 obtenida de la cromatografía de columna abierta se utilizó el mismo cromatógrafo y columna, lo único que cambio son las condiciones a las cuales se analizó la muestra. Estas fueron: temperatura del horno 150-300°C a 15°C por minuto, temperatura de inyector 280°C, gas de acarreo He, a presión de 11.81 psi y velocidad linear de 36 cm/s, cantidad de muestra empleada: 1.0 μL , energía de ionización.