



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

LABORATORIO DE FICOLOGÍA

Caracterización morfológica y aislamiento de algunos  
compuestos activos de *Sargassum sp.*, en dos  
localidades de Veracruz durante épocas diferentes  
(secas y lluvias)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

**Ávila López Sergio Erick**



**DIRECTOR DE TESIS:** Dra. Alejandrina Graciela Avila Ortiz  
Asesor interno: M. en C. Rosalva Rangel Corona

México DF,

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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **ÁVILA LÓPEZ SERGIO ERICK**, con número de cuenta **307023526**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **13 de abril de 2016** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Q. ENCARNACIÓN MARÍA ESTELA JIMÉNEZ

**VOCAL** Dra. ALEJANDRINA GRACIELA AVILA ORTIZ

**SECRETARIO** M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

**SUPLENTE** Biól. ANGÉLICA ELAINE GONZÁLEZ SCHAFF

**SUPLENTE** Biól. ROCÍO ESPITIA LICEA

El título de la tesis que presenta es: **Caracterización morfológica y aislamiento de algunos compuestos activos de Sargassum sp., en dos localidades de Veracruz durante épocas diferentes (secas y lluvias).**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
México, D. F., a 02 de marzo de 2016

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR



RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo fue elaborado bajo la dirección de la Dra. Alejandrina G. Ávila Ortiz, en el Laboratorio de Fisiología perteneciente al Herbario FEZA y el asesoramiento de la M. en C. Rosalva Rangel Corona del laboratorio de Oncología celular, L 4 PB de la unidad de investigación de Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), perteneciente a la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), ambos laboratorios ubicados en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Así como hago mención que este trabajo de tesis contó con el apoyo financiero de los programas PAPIIME con clave PE208612 y PE213312 y el proyecto PAPIIT con clave IN215713 de la DGAPA, UNAM.

*Una inteligencia sin límites es el mayor tesoro de los hombres.*

–Rowena Ravenclaw–

del libro “Harry Potter y las reliquias de la muerte” de J.K. Rowling.

*Así es -suspiró el coronel-. La vida es la cosa mejor que se ha inventado.*

–Gabriel García Márquez.

## Agradecimientos personales

- ❖ A la **Universidad Nacional Autónoma de México** (UNAM) y a la **Facultad de Estudios superiores Zaragoza** (FES-Z), por ser mi segundo hogar y brindarme todo lo necesario para mi formación profesional como biólogo.
- ❖ A mi directora de tesis la **Dra. Alejandrina**, por creer en mí y darme todo el apoyo necesario, mil gracias.
- ❖ A los sinodales **M. en C. Rosalva, Q. Estela, y las biólogas Roció y Angélica** por su ayuda en las correcciones y enriquecerme con su sabiduría en sus diferentes áreas de conocimiento.
- ❖ Al **Laboratorio de Ficología** por permitirme conocer este maravilloso y fascinante mundo algal
- ❖ A mis padres **Lidia y Sergio** por ser mi gran apoyo incondicional
- ❖ A mi hermana (**Carolina**) y mis primos (**Yael, Ariadne, Isabella y Diego**) por ser mi motor para seguir adelante.
- ❖ A mis abuelos (**Guadalupe y Raúl**) que siempre me alientan a seguir adelante y no rendirme
- ❖ A mi mejor amigo **Abel**, gracias por estar ahí y darme consejos, apoyo pero sobre todo tu amistad
- ❖ A la Ficobanda (**Arturo, Lisandro, Olivia, Marianita y Blanca**) y los Micoamigos (**Prof. Marco, Adriana y Marcos**) por su apoyo en el laboratorio para el aprendizaje y por los momentos de alegría que se viven sin ustedes el laboratorio no sería el mismo.
- ❖ A mis amigos y colegas de la carrera (**Paola, Angel “logan”, Fidel Buendía, Fidel González, Yasmin, Enrique, Yodeli, Ilse, Pati, Laura, Memo, Mitzi y demás**) por acompañarme a través de toda la carrera en el estudio y en la fiesta, por todo gracias.
- ❖ A mis amigos fuera de la carrera (**Aby Hikari, Angi hermanita, Jaz Neri, Ángel Reséndiz, Thomas, Pilar, Abraham, Melisa González, Martí, y demás**) gracias por las aventuras y las salidas y su amistad, siempre han sido un gran apoyo en mi vida.
- ❖ A mis primos (**Víctor, Cristina, Livier, David y Daniel**) porque cuando a pesar de las distancias siempre hay apoyo y unidad
- ❖ A la **Brigada de Respuesta a Emergencias** (BREM) por enseñarme tantas cosas desconocidas en la vida, que siempre hay que hacer las cosas que se saben hacer.

## Dedicatoria

*Esta tesis va dedicada primeramente a **mis padres** por ser mi gran apoyo los amo, a **mi hermana** que siempre será un gran motor en mi vida, pero sobre todo la quiero dedicar a esos cuatro ángeles que me cuidan en el cielo que aunque no me acompañen físicamente, sé que me alientan con su apoyo donde estén, gracias por cuidarme **Tía Viky, Abuelitas Chuy, Socorrito y Juana.***

<b>Contenido</b>	<b>Paginas</b>
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Productos naturales.	2
2.2. Importancia de las algas.	3
2.3. Compuestos con principios activos presentes en las algas.	4
2.4. Género <i>Sargassum</i> .	4
2.5. Carotenoides.	6
2.6. Técnicas de extracción.	7
2.7. Técnicas de separación.	7
2.8. Cromatografía gases – masa.	8
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS	9
5. OBJETIVO GENERAL	9
5.1. Objetivos particulares.	9
6. MATERIAL Y MÉTODO	10
6.1. Área de estudio.	10
6.2. Trabajo de campo.	10
6.3. Trabajo en el herbario.	11
6.4. Obtención del extracto.	12
6.4.1. Extracción líquido – líquido.	12
6.4.2. Extracción sólido – líquido.	12
6.5. Cromatografía de capa fina.	12
6.5.1. Preparación y punteo de la placa.	12
6.5.2. Preparación de la cámara de elución.	13
6.5.3. Separación de compuestos y revelado.	13
6.6. Cromatografía de columna.	14
6.7. Actividad biológica.	15
6.8. Selección de la fracción.	15
7. RESULTADOS	16
7.1. Análisis morfológico.	16
7.2. Estandarización de la técnica de extracción y análisis de la actividad biológica.	22
7.3. Análisis químico.	25
8. CONCLUSIONES	28
9. CONSIDERACIONES FINALES	29
10. BIBLIOGRAFÍA	30
11. ANEXOS	35

	<b>Índice de Figuras</b>	<b>Paginas</b>
<b>Figura 1</b>	<b>Mapa de las localidades estudiadas.</b>	<b>11</b>

	<b>Índice de Laminas</b>	<b>Paginas</b>
<b>Lamina 1</b>	<b><i>Sargassum buxifolium</i> (Chauvin) M. J. Wynne, Playa Muñecos, temporada de lluvias.</b>	<b>18</b>
<b>Lamina 2</b>	<b><i>Sargassum buxifolium</i> (Chauvin) M. J. Wynne, Playa Muñecos, temporada de secas.</b>	<b>19</b>
<b>Lamina 3</b>	<b><i>Sargassum buxifolium</i> (Chauvin) M. J. Wynne, Punta Delgada, temporada de lluvias.</b>	<b>20</b>
<b>Lamina 4</b>	<b><i>Sargassum buxifolium</i> (Chauvin) M. J. Wynne, Punta Delgada, temporada de secas.</b>	<b>21</b>

	<b>Índice de Tablas</b>	
<b>Tabla 1</b>	<b>Caracteres morfológicos observados.</b>	<b>17</b>
<b>Tabla 2</b>	<b>Actividad presente en las fracciones del extracto de <i>Sargassum</i>.</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 3</b>	<b>Identificación de los compuestos mediante el tiempo de retención.</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 4</b>	<b>Comparación de los compuestos entre fracciones.</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 5</b>	<b>Nombre de los compuestos dados por la cromatografía gases-masa.</b>	<b>27</b>

	<b>Índice de Anexos</b>	
<b>Anexo 1</b>	<b>Gráfica general de la fracción 2 de Playa Muñecos secas</b>	<b>35</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>Gráfica general de la fracción 3 de Punta Delgada lluvias</b>	<b>36</b>
<b>Anexo 3</b>	<b>Compuesto A, fracción 2</b>	<b>37</b>
<b>Anexo 4</b>	<b>Compuesto A, fracción 3</b>	<b>38</b>
<b>Anexo 5</b>	<b>Compuesto B, fracción 2</b>	<b>39</b>
<b>Anexo 6</b>	<b>Compuesto B, fracción 3</b>	<b>40</b>
<b>Anexo 7</b>	<b>Compuesto C, fracción 3</b>	<b>41</b>
<b>Anexo 8</b>	<b>Compuesto D, fracción 2</b>	<b>42</b>
<b>Anexo 9</b>	<b>Compuesto D, fracción 3</b>	<b>43</b>
<b>Anexo 10</b>	<b>Compuesto E, fracción 2</b>	<b>44</b>
<b>Anexo 11</b>	<b>Compuesto E, fracción 3</b>	<b>45</b>
<b>Anexo 12</b>	<b>Compuesto F, fracción 3</b>	<b>46</b>
<b>Anexo 13</b>	<b>3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol</b>	<b>47</b>
<b>Anexo 14</b>	<b>2-Hexadecene,3,7,11,15-tetramethyl-,[R-[R*.R*-(E)]]-</b>	<b>48</b>
<b>Anexo 15</b>	<b>Phenol, 2,4,6-tris(1,1-dimethylethyl)-</b>	<b>49</b>
<b>Anexo 16</b>	<b>4H-1-Benzopyran-4-one,3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-</b>	<b>50</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron los caracteres morfológicos de las poblaciones de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) J. M. Wynne en dos localidades de Veracruz, Playa Muñecos y Punta Delgada durante dos temporadas diferentes (secas y lluvias), con base en la revisión de caracteres externos (forma y margen de los filoides, disposición de criptostomas y presencia-ausencia de aerocistos). Además con la finalidad de comprobar su efectividad antitumoral del extracto de *Sargassum* en las dos localidades y en las dos épocas, se hicieron extracciones de algunos compuestos (carotenoides) mediante las técnicas de líquido-líquido y sólido-líquido y su separación con las técnicas de cromatografía de capa fina y columna, de cada una de ellas se obtuvieron 20 fracciones las cuales se enviaron al Laboratorio de Oncología Celular de la FES Zaragoza para probar su actividad antitumoral. Las pruebas indicaron que la fracción 2 de Playa Muñecos (secas) y la fracción 3 de Punta Delgada (lluvias) presentaron actividad sobre dos líneas celulares. Estas fracciones se enviaron al Instituto de Química de la UNAM para la identificación de los compuestos por medio de una cromatografía de gases-masa. El resultado fue que se trata de la misma especie, con variaciones morfológicas, en cuanto a su efectividad antitumoral varía según la época finalmente los compuestos obtenidos tienen una aproximación con los fitoles.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las algas como las plantas contienen carbohidratos, proteínas, minerales, aceite, grasas, ácidos grasos poliinsaturados, así como compuestos bioactivos tales como antioxidantes (polifenoles, tocoferoles [vitamina E], la vitamina C, aminoácidos-micosporina), y pigmentos, tales como carotenoides (caroteno), xantofila, clorofilas y ficobilinas (ficocianina, ficoeritrina), que poseen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicos, antioxidantes, anti-inflamatorias, y las propiedades antitumorales. Debido a esto los extractos de algas están ganando creciente interés debido a su composición y las posibilidades de las aplicaciones industriales (Michalak & Chojnacka, 2015).

Las algas pardas contienen los siguientes compuestos: fenoles, fucoidan, polisacáridos crudos, polisacáridos sulfatados, lípidos, derivados porfirinos, triterpenos, esteroides, diterpenos, terpenos, lactanos, bioflavonoides, proteínas y FATS (ácido palmítico) los cuales presentan actividad antibacterial, antiviral, antifúngica, antioxidante, antiinflamatoria, y antitumoral (Ermakova et al, 2011; Michalak & Chojnacka, 2015).

Particularmente el género *Sargassum* contiene polisacáridos crudos, polisacáridos sulfatados y fenoles con uso antibacterial, antiviral, antifúngica, antioxidante, y antitumoral. Sin embargo los estudios en la actividad antitumoral estan en vías de experimentación.

Por otra parte la variación morfológica del género *Sargassum* es en el que se encuentra el mayor número de especies. Guiry & Guiry (2015) consideran 352 en todo el mundo, Frecuentemente es difícil distinguir las diferencias entre ellas, debido al traslape de caracteres usados en las descripciones de las especies, también puede deberse como resultado de un proceso de hibridación (Taylor, 1960).

Por lo que en el presente estudio, se revisaran los caracteres morfológicos de dos poblaciones de *Sargassum*, así como su actividad antitumoral.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Productos naturales.**

Los productos naturales de origen vegetal son recursos renovables de múltiples usos para el hombre. Le proporcionan alimentos para la subsistencia, fibras textiles para vestirse y material para construir casas, le deleitan por su aroma y colorido; le curan o intoxican, según sus propiedades; y regeneran el aire que respiran. Por su participación en los ciclos biológicos, las plantas son indispensables para la supervivencia del hombre (Domínguez, 1979).

Todos los pueblos primitivos han adquirido información sobre las propiedades medicinales de un gran número de plantas propias de su ambiente. Estos conocimientos, generalmente los han acumulado individuos, sacerdotes, hechiceros, curanderos, etc. quienes los han transmitido de generación en generación, a determinados aprendices y a sus descendientes, Es necesario separar las actividades empíricas de la experimentación sistemática y objetiva llevada a cabo en ejemplares etnobotánicos. Con esto, se pretende únicamente diferenciar ambas, pero nunca menospreciar los usos del legado ancestral basados en la experiencia. Más bien, se reconoce en primera instancia que las raíces antiguas del empleo medicinal, son el motivo real que impulsa investigaciones más profundas que permiten validar objetivamente el uso terapéutico de los especímenes en cuestión. (Domínguez, 1979 y Villa-Rauno et al, 2011).

La exploración sistemática de las plantas medicinales tiene como objetivo esencial conocer la química intrínseca, con la finalidad de obtener nuevas drogas que después de ser sujetas a pruebas clínicas que demuestren su efectividad, puedan incorporarse al mercado farmacéutico como medicamentos patentados. Desde mediados del siglo XX, la química vegetal o fitoquímica ha sido una herramienta muy importante para la obtención de extractos herbolarios, usados como medicamentos. La extracción de los principios activos por medio de la fitoquímica se basa en conceptos básicos de la polaridad de las moléculas. De acuerdo a los mismos, se han desarrollado técnicas analíticas de separación, que facilitan la

obtención de perfiles químicos detallados, lo que a su vez permite la identificación y el aislamiento de moléculas bioactivas con mayor rapidez y precisión. La información obtenida de la investigación de compuestos de origen vegetal ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen y lograr su mejor aprovechamiento con fines científicos y económicos (Domínguez, 1979 y Villa-Rauno et al, 2011).

En este sentido además de las plantas, las algas son organismos que también contienen principios activos con usos muy diversos como son: agrícolas, industriales, terapéuticos, y, principalmente, alimenticios. En el norte de Europa se recolectan muchas especies para utilizarlas como abonos y para extraer los productos minerales que contienen. Algunos tipos se utilizan en la confección de colchones, y también en preparados industriales, culinarios, cosméticos o farmacéuticos, de estos últimos destacan el uso como antivirales (Wang, 2008). Las macroalgas proporcionan, además alimento, protección y zonas de reproducción y crianza para una amplia variedad de organismos marinos, incluyendo algunos de importancia comercial, como el caracol rosado (Quan-Young, 2004.).

## **2.2. Importancia de las algas.**

Las algas forman un grupo muy diverso de organismos fotosintéticos y la comunidad algal constituye un elemento primordial del ambiente bentónico; a diferencia de las plantas terrestres la morfología completa se describe como talo e incluye: fronde, estípites y rizoides (Aguilar-Rosas & Diéguez, 1993; Zertuche-González *et al.* 1995). Además, de que poseen células reproductoras que carecen de una envoltura especial. Habitan aguas continentales y marinas, desde los trópicos hasta los polos y realizan más del 90% de la fotosíntesis en el mar. Su tamaño va desde delicadas unicelulares microscópicas (microalgas) que flotan libremente en el plancton, hasta, algas macroscópicas (macroalgas, que pueden llegar a alcanzar una talla de 30 m) generalmente fijas al fondo marino (Aguilar-Rosas & Diéguez, 1993).

Las macroalgas están comprendidas principalmente en tres divisiones: Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas rojas) y Ochrophyta (algas pardas) (Dawes, 1986). Se clasifican de acuerdo a diversos caracteres, tales como la organización de sus células (complejidad estructural), forma de almacenamiento de sus reservas energéticas, tipos de pigmentos presentes. Todas las algas poseen clorofila a, más otros pigmentos que dan un color característico a cada grupo; se adhieren a varios sustratos por medio de discos basales, estolones, rizoides o masas rizoidales; constituyen junto con las fanerógamas marinas uno de los productores primarios principales de la materia orgánica en el mar (Ganesan, 1983; Quan & Ruíz, 2007).

### **2.3 compuestos con principios activos presentes en las algas.**

En las algas pardas existen compuestos (carotenoides, xantofilas, terpenos, flavonoides, fenoles, etc.) que son químicamente complejos, por lo que no es rentable su síntesis química, y por lo tanto se siguen extrayendo directamente de las algas y son de gran importancia para la industria alimentaria, textil, así como para la fabricación de electrodos de soldadura, abrillantadores de zapatos, cremas dentales, lodos de perforación y otros productos (Graham & Wilcox, 2000; Mauseth, 1995; Lee, 1999).

Entre los compuestos orgánicos con principios activos se consideran a los carotenoides los cuales son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias (Domínguez, 1982).

### **2.4. Género *Sargassum*.**

Las algas pardas son organismos casi exclusivamente marinos ya que sólo se conocen unas pocas especies de aguas dulces. Son abundantes en costas rocosas, especialmente en aguas frías agitadas y bien aireadas. Morfológicamente son muy variadas (Mauseth, 1995).

Este grupo de organismos cuenta con aproximadamente 1500 especies agrupadas en diferentes clases, entre ellas, la clase Phaeophyceae que comprende 19 ordenes y de éstos el orden Fucales que cuenta con aproximadamente 521 especies. En él se ubica la Familia Sargassaceae y en ella el género *Sargassum* el cual tiene una distribución alta en las costas de México (Mauseth, 1995; Graham & Wilcox, 2000).

- Imperio Eukaryota
- Reino Chromista
- Subreino Harosa
- Infrareino Heterokonta
- Phylum Ochrophyta
- Subphylum Phaeista
- Infraphylum Marista
- Superclase Fucista
- Clase Phaeophyceae
- Orden Fucales
- Familia Sargassaceae
- Género *Sargassum*

Los *Sargassum* son talos de color marrón claro; cuando están unidos, los discos de fijación con lóbulos más bien masivos, de apariencia arbustiva, los órganos foliares simples o bifurcadas, enteras o serradas; vejigas generalmente presentes de forma lateral en el tallo; receptáculos axilares o paniculados, generalmente casi cilíndrico, prismático comprimido con menos frecuencia, o aplanado, bifurcado (Taylor, 1960).

Con frecuencia es sumamente difícil distinguir a las especies de *Sargassum* por lo que es necesario revisar los caracteres descriptivos que son:

Talos espesos y erectos, de color olivo a marrón oscuro. Ejes principales lisos y cilíndricos. Hojas concurridas, ovales a oblongas, dispuestas radialmente, carente zona blanca a lo largo de nervadura central; nervadura central oscuro en las hojas maduras, bases asimétricas, márgenes lisos o con unos pequeños dientes afilados. Vejigas de aire esféricas, con pequeñas espinas dispersas, generalmente uno por hoja axial. Disco adhesivo robusto, cryptostomas escasos, pequeños, dispersos, un tercio más cerca del margen de la hoja, siempre y cuando las hojas adyacentes, conceptáculos en racimos apretados, extremadamente rugosa (Wynne, 2011, Littler & Littler, 2000 y Taylor, 1960).

Existen un gran número de publicaciones de grupos de investigación, quienes han probado el efecto terapéutico de diversos metabolitos entre los que destacan los polisacáridos y pigmentos, extraídos de ejemplares de algunas especies del género *Sargassum* como *S. natans*, *S. thunbergii*, *S. palmeri*, *S. acanacifolium*, *S. micracanthum*, *S. dentifolium*, *S. polycylum*, *S. hystrix* var. *buxifolium*, *S. palludum*, *S. horney* y *S. coreanum*, (Ye et al, 2008; Ermakova et al, 2011; Ko et al, 2011; Luna, 2012 y Nomura et al, 2013).

## **2.5 carotenoides.**

Los carotenoides son el grupo más representativo de los tetraterpenos, compuestos que se caracterizan por una estructura con 40 átomos de carbono, aunque no todos los carotenoides se ajustan estrictamente a esta regla. Su color, que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro. Son pigmentos liposolubles que pueden ser aislados por extracción con un disolvente adecuado: benceno, éter de petróleo, éter, etanol, cloroformo, etc. La evaporación del extracto da un material crudo que, en algunos casos, cristaliza directamente. Los carotenos se disuelven mejor en éter, éter de petróleo y benceno, pero poco en metanol. El metanol y etanol disuelven mejor los carotenoides oxigenados (Primo, 1995).

## **2.6. Técnicas de extracción.**

La extracción es una técnica de separación y purificación que tiene por objeto aislar una sustancia de una mezcla sólida o líquida en que se encuentra, mediante el uso de un disolvente. Por extracción se aíslan y purifican numerosos productos naturales, como vitaminas, alcaloides, grasas, hormonas y pigmentos, así como sustancias que intervinieron o se formaron en una síntesis orgánica. La extracción puede ser por el estado físico de los materiales: sólido-líquido y líquido-líquido. Por sus características la extracción puede ser: discontinua o continua (Domínguez, 1982).

En la extracción sólido-líquido, la sustancia que se extrae está contenida en un material sólido, junto con otros compuestos, los que deberán ser prácticamente insolubles en el disolvente utilizado. Un aparato muy útil para la técnica anterior es el Soxhlet, que es una técnica de extracción continua (sólido-líquido), en la cual se presenta el sólido en un cartucho de papel filtro colocado en el extracto, los vapores del disolvente se elevan por el tubo de la derecha y el disolvente condensado gotea sobre el sólido y filtra el material soluble y la lleva al matraz donde se acumula (Domínguez, 1982).

En la extracción líquido-líquido, el compuesto se encuentra disuelto en un disolvente (A) y para extraerlo se emplea un disolvente (B) inmisible en A. En la extracción discontinua las fases (A) y (B) se agitan para incrementar el contacto entre ambas fases, con lo que el compuesto se distribuye entre ambas capas, de acuerdo con sus solubilidades en los dos líquidos.

## **2.7. Técnicas de separación.**

Tanto los extractos de productos naturales, como los crudos de las reacciones orgánicas, suelen ser mezclas multicomponentes, a menudo muy complejas. Este hecho constituyó un serio impedimento para el estudio de unos y de los otros, hasta la implementación de los modernos métodos separativos. Entre éstos, uno de los que mayor relevancia ha alcanzado, es la cromatografía de adsorción en columna (Dalmases & Bonet 1982).

La cromatografía es la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución diferencial entre dos fases, una estacionaria y otra móvil. Hay varios tipos de cromatografía, según la naturaleza de las dos fases involucradas y los compuestos son retenidos en la fase estacionaria por adsorción o partición. Según la naturaleza de las dos fases, las cromatografías pueden ser: sólido-líquido (cromatografías en columna, en capa delgada y en papel), líquido-líquido y gas-líquido (en fase de vapor) (Domínguez, 1982).

Las separaciones en capa fina características se realizan en placas de vidrio revestidas con una capa delgada y adherente de partículas firmemente divididas; esta capa constituye la fase estacionaria. Las partículas son semejantes a las de la cromatografía por adsorción (Skoog, 2008).

La cromatografía en columna es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánico a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina con una placa porosa que impide su paso y en un estrechamiento con una llave. La mezcla se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria mientras que la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones. (Skoog, 2008).

## **2.8. Cromatografía de gases-masas.**

La espectrometría de masas es una técnica para medir la masa y, por lo tanto, la masa molecular de una molécula. Además, con frecuencia es posible obtener información estructural acerca de las moléculas al medir las masas de los fragmentos producidos cuando se rompen las moléculas. Tiene tres partes básicas: una fuente de ionización en la que se le da una carga eléctrica a las moléculas, un analizador de masas en el que se separan los iones por su relación de masa a carga ( $m/z$ ) y un detector del que se registran los iones separados (McMurry, 2012).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los compuestos activos de origen vegetal, se extraen principalmente de plantas vasculares, debido a su conocimiento terapéutico desde la época antigua. En las algas también existen compuestos con actividad biológica, sin embargo los estudios en el género *Sargassum* son escasos. Es por ello que se requiere de más investigación sobre aquellas especies de algas que contienen este tipo de compuestos, y por lo tanto representa una posibilidad del uso de un recurso natural presente en las costas de nuestro país.

### **4. HIPÓTESIS**

Si las dos poblaciones de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne de Playa Muñecos y Punta Delgada taxonómicamente es la misma especie, a pesar de la variación morfológica que pudiera presentarse en dos temporadas (secas y lluvias), se esperaría que tenga la misma actividad biológica sobre cultivos de líneas celulares de carcinoma de cérvix (CALO e INBL)

### **5. OBJETIVO GENERAL**

- ❖ Corroborar la identidad taxonómica de dos poblaciones de *Sargassum* sp. de dos localidades y temporadas diferentes (lluvias y secas) y comparar el efecto anti-tumoral de su extracto.

#### **5.1 objetivos particulares.**

- ❖ Analizar los caracteres morfológicos de dos poblaciones de *Sargassum* sp. para su determinación taxonómica.
- ❖ Estandarizar un método de extracción de los carotenoides de *Sargassum* sp.
- ❖ Realizar métodos de separación del extracto de *Sargassum* sp., mediante la cromatografía en capa fina y columna.
- ❖ Contrastar los resultados del Laboratorio de Oncología Celular sobre la efectividad de los extractos de *Sargassum* sp.
- ❖ Analizar los resultados de la cromatografía de gases-masas de la fracción con mayor efectividad.

## **6. MATERIAL Y MÉTODO**

### **6.1 área de estudio.**

Los ejemplares de *Sargassum* fueron recolectados en dos localidades (Playa Muñecos y El Morro) del Estado de Veracruz, esta entidad limita al norte con Tamaulipas, al este con el Golfo de México y Tabasco, al sureste con Chiapas, al sur con Oaxaca y al oeste con Puebla, Hidalgo y San Luis Potosí. Las dos localidades del presente estado se ubican en la porción central del estado con las siguientes coordenadas: N19° 44' 38.0", W 96° 24' 25.5" y N 19° 51' 34.9", W 96° 27' 34.2 respectivamente (Figura 1).

#### ➤ Punta Delgada

Es una playa donde predomina la zona rocosa con presencia de construcción humana (FARO) donde el oleaje es fuerte y persistente, la zona arenosa es muy pequeña.

#### ➤ Playa Muñecos

Es una playa mixta donde la zona arenosa es extensa y se localiza en el centro de la localidad, a los costados hay presencia de zonas rocosas y acantilados, el oleaje es fuerte y persistente.

### **6.2. Trabajo en campo.**

Se realizaron dos salidas de campo, una durante las temporadas de lluvias (agosto, 2012) y otra en secas (marzo, 2013) a playa Muñecos y Punta Delgada, donde se recolectaron los ejemplares con la mano y con una espátula para desprenderlos del sustrato, se registraron los siguientes datos:

- ❖ pH con un peachimetro
- ❖ Salinidad con un refractómetro ATAGO S/Mill-E de 0 – 100%
- ❖ Temperatura ambiente tomada con un termómetro de inmersión de -20° a 110° C
- ❖ Temperatura del agua tomada con un termómetro de inmersión de -20° a 110° C
- ❖ Coordenadas con GPS

Los ejemplares recolectados se seleccionaron, unos de estos especímenes se preservaron en alcohol al 70%, mientras que otros fueron prensados en fresco utilizando una prensa botánica (Lot & Chiang, 1986).

### 6.3 trabajo en el herbario.

Los ejemplares recolectados en campo, se revisaron para observar los siguientes caracteres: hábito, forma del disco de fijación, margen de los filoides, presencia o ausencia de los crisptostomas. En laboratorio, con una navaja de afeitar se tomó una muestra de los filoides de cada uno de los ejemplares el cual fue colocado sobre un portaobjetos, posteriormente se vertió unas gotas de agua sobre el corte y se le colocó un cubreobjetos para observarlos al microscopio óptico de campo claro. Para la determinación taxonómica se utilizó una clave taxonómica y literatura especializada.



Figura 1. Mapa de las localidades estudiadas.

## **6.4. Obtención del extracto.**

### **6.4.1. Extracción líquido – líquido.**

Los ejemplares preservados en alcohol al 70% se maceraron con etanol, se dejó concentrar el macerado durante tres días, en un frasco ámbar con tapa para su concentración.

Se decantó el concentrado quedando solo el líquido, la separación líquido-líquido se hizo con éter de petróleo en la solución de etanol al 70% y se juntó con el concentrado que se obtuvo del decantado.

Se agregó sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) como agente desecante, posteriormente se filtró con ayuda de un embudo de tallo corto y algodón.

Se evaporó el solvente de la solución para concentrar el extracto, en un frasco ámbar y se tapó (Pasto & Johnson, 1981; Pasto et al 1992).

### **6.4.2. Extracción sólido – líquido.**

Del material recolectado en campo y deshidratado se pesaron 10 g de *Sargassum* en balanza analítica. Se colocó en un mortero con pistilo de porcelana y se maceró con éter de petróleo posteriormente se dejó concentrar durante tres días, en un frasco ámbar con tapa. Después del tiempo requerido se filtró con ayuda de un embudo de tallo corto y papel filtro del número 4, se dejó volatilizar el solvente para concentrar el extracto.

## **6.5 cromatografía de capa fina.**

### **6.5.1. Preparación y punteo de placas.**

En un frasco de 100 mL con boca ancha se preparó la papilla con 40 g de silica gel para capa fina y 100 mL de acetato de etilo, mezclando con un agitador de vidrio hasta obtener una mezcla homogénea. Se limpiaron portaobjetos de 26 x 76 mm con un algodón impregnado de acetona y dejaron secar. Se tomaron dos portaobjetos y alinearon paralelamente, introduciéndolos en la papilla por tres segundos, al sacar de la papilla se retiró el remanente de las orillas de los portaobjetos con una espátula pequeña y se separaron los portaobjetos, de esta

manera solo quedó una cara del portaobjetos cubierto con silica. Se colocaron las placas (los portaobjetos con la silica) sobre una superficie de papel aluminio para observar que las placas se encuentren de forma homogénea, es decir, que no tenga grumos o escurrida, y se dejaron secar. También se utilizaron placas prefabricadas.

Ya secas, se activaron las placas colocándolas en una parrilla de calentamiento a 100° C, por aproximadamente 10 min y se dejaron enfriar. Con un encendedor se calentó la parte central de un capilar hasta que se ablande y se estiró provocando un estrechamiento. Éste se sumergió en los dos extractos del alga (liquido-liquido y Solido-liquido) y dejar que suba por efecto de capilaridad.

Al estar frías las placas se midió un centímetro a lo largo a partir de donde la silica está más próxima a la orilla sin deshacerla, se punteó dos o tres veces de forma rápida con el capilar que contiene los extractos procurando que estuvieran a la misma distancia entre los puntos y la orilla de la placa, para evitar que se mezclen al momento de hacer correr el disolvente (Dalmases & Bonet, 1982).

### **6.5.2. Preparación de cámara de elución.**

Con una pipeta de 5 mL se agregó 5 mL de disolvente en frascos de 200 mL grandes de boca ancha y transparentes donde quepan las placas y puedan cerrar bien (un disolvente por cámara de elución) en orden de polaridad (éter de petróleo, hexano, tolueno, cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol) posteriormente se cortó papel filtro del número 4 de 5 x 10 cm para cada cámara y se colocaron sobre la superficie interna del frasco permitiendo una abertura para ver al interior (Dalmases & Bonet, 1982).

### **6.5.3. Separación de los compuestos y revelado.**

En el interior de las cámaras se colocó la placa previamente punteada para que el disolvente suba poco a poco de forma homogénea por la misma hasta que falte aproximadamente un centímetro para cubrir toda la sílice, en ese momento se sacó la placa de la cámara y se dejó que se evapore el disolvente. Este paso se repitió para todas las cámaras de elución (Dalmases & Bonet, 1982).

NOTA: El frasco siempre debe de permanecer cerrado desde que se le agregó el disolvente para evitar que este se evapore, solo se abrirá para meter y sacar el papel filtro y la placa de sílica.

Una vez seca la placa se observó en cuantos compuestos se separó el extracto en los diferentes disolventes y se eligió el que tenga mejor separación, al no tener una apreciación a simple vista, se usó una lámpara UV y una cámara de revelación que consiste en un frasco color ámbar de boca ancha con yodo sublimado en su interior, se dejó la placa dentro de la cámara unos 3 minutos posteriormente se retiró y observaron los compuestos separados.

Con lo anterior, se hizo una mezcla de (acetato de etilo y cloroformo) en diferentes proporciones [(9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (5:5), (4:6), (3:7), (2:8), (1:9)]. Para cada una de ellas se utilizaron dos pipetas de 5 mL (una por cada disolvente) se agregaron las proporciones en nuevas cámaras de elución moviendo el frasco en círculos para mezclar los disolventes y se introdujo la placa previamente punteada para que la mezcla suba poco a poco hasta llegar aproximadamente un centímetro para cubrir toda la sílice, en ese momento se sacó la placa de la cámara y se dejó que se evapore la mezcla.

Una vez secas las placas, se revelaron usando la lámpara UV y la cámara de revelación. Una vez observadas todas las placas se eligió la mezcla de acetato de etilo y cloroformo en una proporción (3:7) para usar en la cromatografía de columna.

## **6.6. Cromatografía en columna.**

En un soporte universal se sujetó con unas pinzas dobles una bureta de 50 mL a la cual se agregó un poco de hexano e introdujo un pedazo de algodón en la parte inferior de la bureta, por otro lado se suspendió en un matraz bola de 100 mL sílica gel para columna con hexano y ésta se vertió a la bureta sin dejar de agitar, se deja que se asiente la sílice dentro de la bureta y en el caso de que se llene retirar el exceso de hexano, se debe tener en cuenta que la columna no se fragmente, una vez asentada la sílice se agregó cloruro de sodio (NaCl) hasta cubrir un

centímetro de la bureta. El hexano que contiene la bureta debe de estar por arriba de la columna formada por la sílice y el NaCl por lo que nunca se debe dejar sin disolvente.

Se preparó 150 mL de la mezcla de los dos disolventes con la proporción seleccionada (3:7). Cabe aclarar que se prepararon dos columnas una para cada extracto (sólido – líquido y líquido – líquido)

Los extractos se dejaron concentrar por medio de la evaporación del disolvente (éter de petróleo) hasta 1 mL, el cual se introdujo en la bureta con una pipeta y se distribuyó en diferentes puntos de forma homogénea sobre la columna.

Con una pipeta de 5 mL se añadió la mezcla de los disolventes sobre las paredes de la bureta para permitir que el extracto baje poco a poco hasta llegar a la parte inferior de la sal sin dañar la columna, una vez que llego a este punto se llenó la bureta. Se abrió la bureta solo un poco, permitiendo que tenga un goteo lento pero constante, de esta manera el extracto bajo poco a poco por la columna (hay que estar revisando que el nivel de la mezcla del disolventes no llegue a la sílice por lo que hay que estar agregando constantemente más mezcla de disolventes).

En tubos Eppendorf de 1.5 mL se recolectaron fracciones de 1 mL con un total de 20 para cada columna.

### **6.7. Actividad biológica.**

Ya una vez obtenidos los eluatos se enviaron al Laboratorio de Oncología Celular en la UMIEZ de la FES Zaragoza para comprobar la actividad biológica.

### **6.8. Selección de la fracción.**

Posteriormente se llevaron al Instituto de Química para una cromatografía de gases masa en un JOEL GCmate.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Análisis morfológico.

Se revisaron un total de 200 ejemplares de Playa Muñecos y de Punta Delgada, Veracruz recolectados en dos temporadas diferentes. Con base en la revisión bibliográfica, se consideraron 13 caracteres (Tabla 1), de estos los que ayudaron a la determinación taxonómica fueron: Ausencia de los aerocistos, morfología de los filoides y distribución de los criptostomas (Láminas 1, 2, 3 y 4). Con la determinación taxonómica de los ejemplares se les asignó el nombre de *Sargassum hystrix* var. *buxifolium* Chauvin (Litter & Litter, 2000 y Taylor, 1960), la distribución de esta especie abarca desde Florida hasta Brasil. En México tiene presencia en las costas de Veracruz, Yucatán y Quintana Roo (Dreckmann, 1998; Litter & Litter, 2000 y Taylor, 1960). Actualmente esta especie es considerada como sinónimo de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (Wynne, 2011; Guiry & Guiry, 2015).

El género *Sargassum* es uno de los grupos más difíciles de estudiar debido a su variación morfológica principalmente en las diferentes etapas de desarrollo, así como por las condiciones ambientales en las que se pueda encontrar, considerando también su alta hibridación (Núñez-López & Casas-Valdéz, 1996; Rocha-Ramírez & Siqueiros-Beltrones, 1990 y Taylor, 1960).

Núñez-López y Casas-Valdéz (1996) en su estudio fenológico de *Sargassum sinicola*, *S. herporhizum* y *S. lapazeanum* consideraron la presencia o ausencia de filoides, aerocistos y estructuras reproductoras, sin embargo hay que mencionar que estas últimas no son necesarias para la determinación, por otra parte Lu y Tseng (2004) describieron cuatro especies de *Sargassum* basándose en el disco de fijación, aerocistos y filoides.

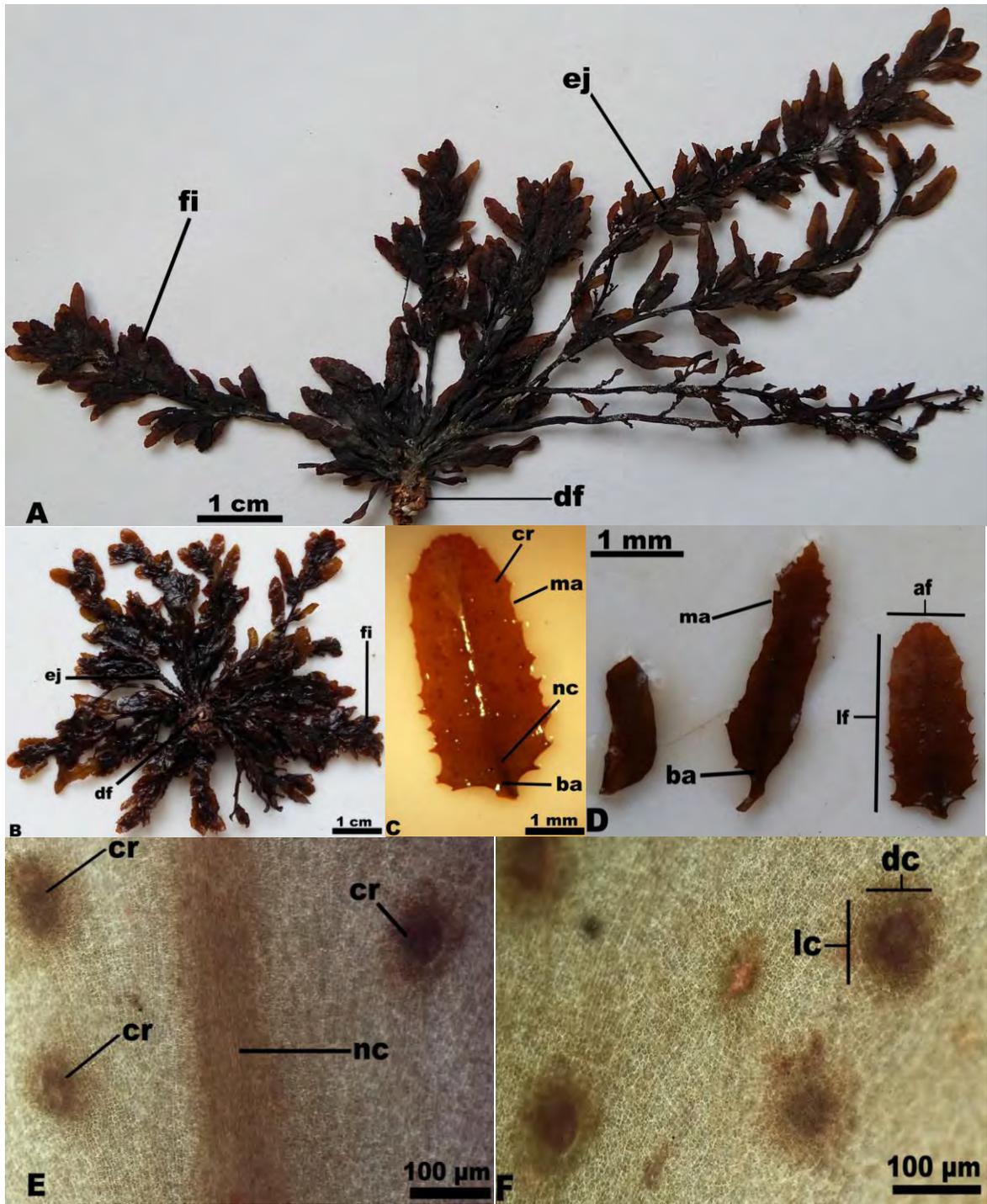
Mattio, et al. (2008) identificaron tres especies de *Sargassum* en la Polinesia Francesa con caracteres morfológicos y moleculares, para su análisis tomaron en cuenta: el disco adhesivo, eje principal, filoides y aerocistos. En el análisis molecular utilizaron la región ITS2 nuclear y porciones de la región rbcLS del

cloroplasto. Posteriormente Mattio y Payri (2009) identificaron 10 especies de *Sargassum*, una variedad y una especie sin identificar en Nueva Caledonia.

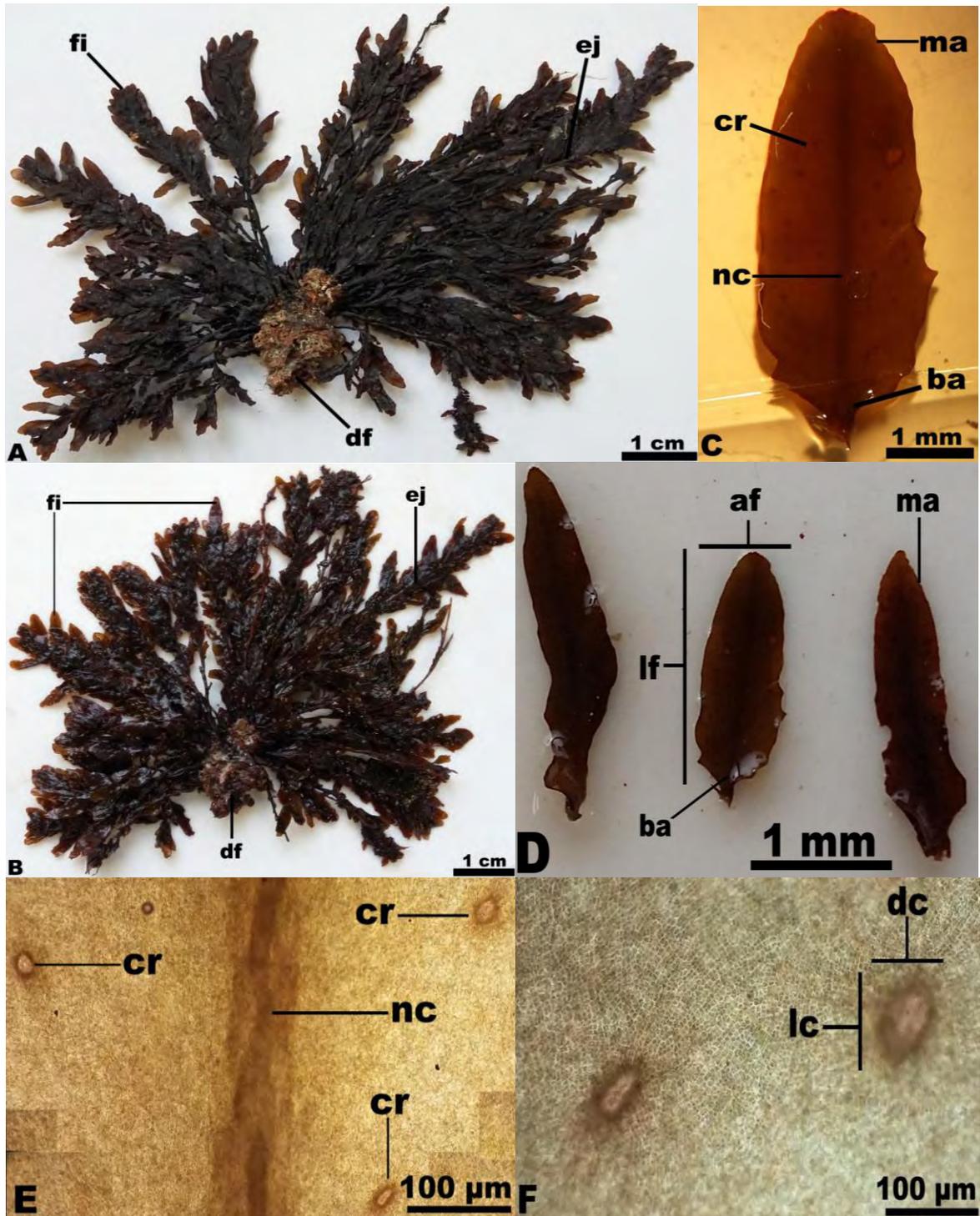
El análisis morfológico del presente estudio se contrastó con el análisis molecular realizado por Hernandez (2015) quien consideró cuatro morfotipos de *Sargassum* distribuidos en Playa Muñecos y Punta Delgada. Para el estudio molecular utilizó dos marcadores (rbcLS y cox3), el resultado fue que estos cuatro morfotipos son la misma especie.

**Tabla 1. Caracteres morfológicos analizados en los ejemplares recolectados.**

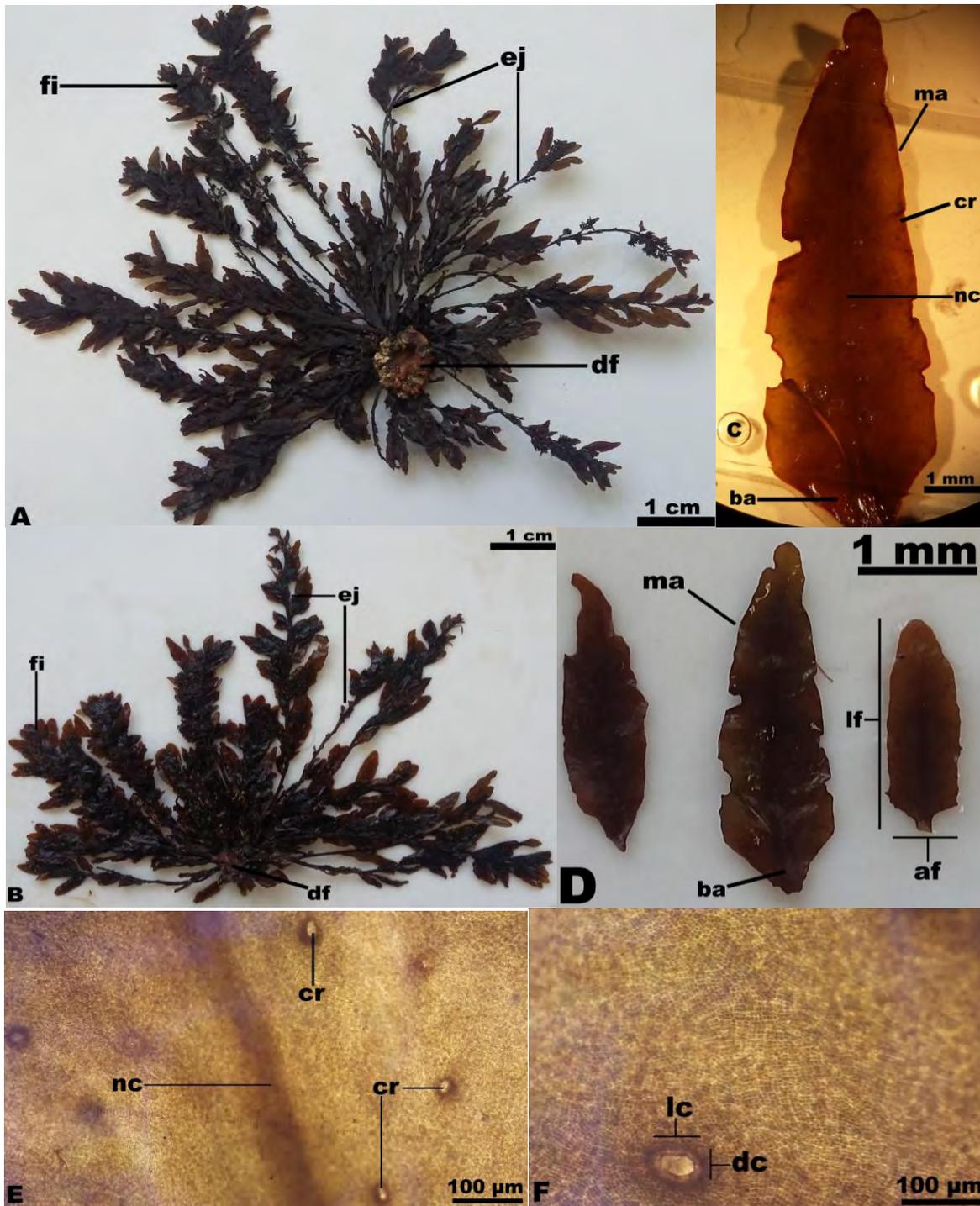
Caracteres	Playa Muñecos		Punta Delgada	
	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias
<b>Disco de Fijación</b>	Asimétrico y robusto			
<b>Aerocistos</b>	Ausentes			
<b>Color</b>	Verde Oliva	Marrón	Verde Oliva	Marrón
<b>Eje principal</b>	Erecto, liso y Cilíndrico			
<b>Talla (promedio)</b>	6.06 cm	4.72 cm	6.75 cm	7.4 cm
<b>Filoide</b>				
<b>Margen</b>	Dentado	Parcialmente Dentado	Parcialmente Dentado	Dentado
<b>Forma</b>	Oblongo			
<b>Largo (promedio)</b>	1.58 cm	1.41 cm	1.52 cm	1.27 cm
<b>Ancho (promedio)</b>	0.37 cm	0.41 cm	0.42 cm	0.36 cm
<b>Nervadura Central</b>	Visiblemente marcada			
<b>Criptostomas</b>				
<b>Ubicación</b>	Dispersos			
<b>Diámetro (promedio)</b>	95 µm	92.93 µm	84.29 µm	63.02 µm
<b>Longitud (promedio)</b>	114.92 µm	98.04 µm	103.43 µm	111.76 µm



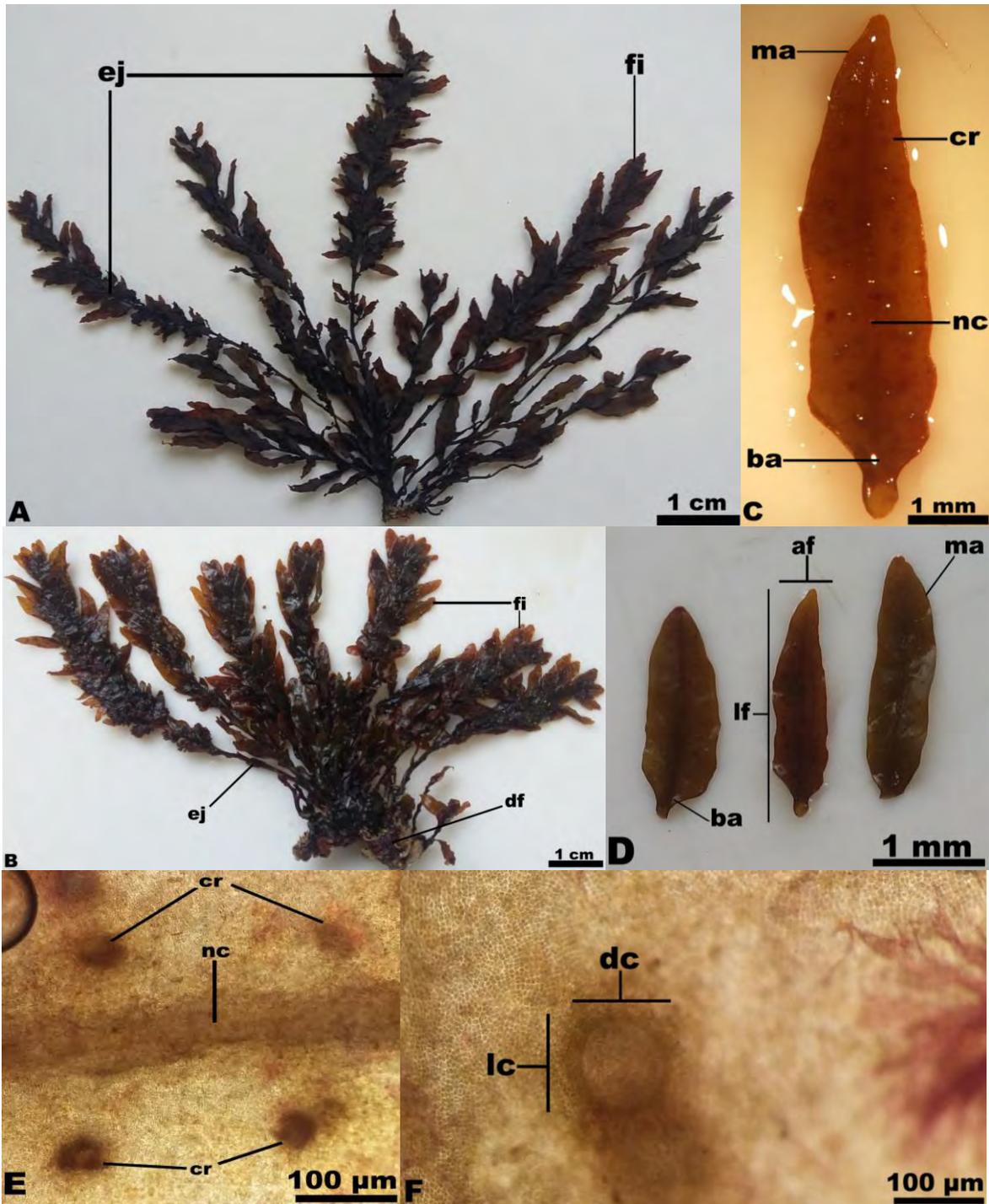
Lamina 1. *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne, Playa Muñecos, temporada de lluvias. A)Ejemplar deshidratado utilizado en el análisis químico; B)Ejemplar rehidratado; C)Margen del Filoide; D)Variación morfológica de los filoides en la población; E)Criptostomas en 10X; F)Criptostomas en 40X (fi= filoides; df= disco de fijación; ej= eje del talo; ma= margen; cr= criptostomas; nc= nervadura central; ba= base asimétrica; af= ancho del filoid; lf= largo del filoid; dc=diámetro del criptostomata y lc= longitud del criptostomata).



Lamina 2. *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne, Playa Muñecos, temporada de secas. A)Ejemplar deshidratado utilizado en el análisis químico; B)Ejemplar rehidratado; C)Margen del Filoide; D)Variación morfológica de los filioides en la población; E)Criptostomatas en 10X; F)Criptostomatas en 40X (fi= filioides; df= disco de fijación; ej= eje del talo; ma= margen; cr= criptostomatas; nc= nervadura central; ba= base asimétrica; af= ancho del filioide; lf= largo del filioide; dc=diámetro del criptostomata y lc= longitud del criptostomata).



Lamina 3. *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne, Punta Delgada, temporada de lluvias. A)Ejemplar deshidratado utilizado en el análisis químico; B)Ejemplar rehidratado; C)Margen del Filoide; D)Variación morfológica de los filoides en la población; E)Criptostomas en 10X; F)Criptostomas en 40X (fi= filoides; df= disco de fijación; ej= eje del talo; ma= margen; cr= criptostomas; nc= nervadura central; ba= base asimétrica; af= ancho del filoide; lf= largo del filoide; dc=diámetro del criptostomata y lc= longitud del criptostomata).



Lamina 4. *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne, Punta Delgada, temporada de secas. A)Ejemplar deshidratado utilizado en el análisis químico; B)Ejemplar rehidratado; C)Margen del Filoide; D)Variación morfológica de los filoides en la población; E)Criptostomas en 10X; F)Criptostomas en 40X (fi= filoides; df= disco de fijación; ej= eje del talo; ma= margen; cr= criptostomas; nc= nervadura central; ba= base asimétrica; af= ancho del filoide; lf= largo del filoide; dc=diámetro del criptostomata y lc= longitud del criptostomata).

## **7.2. Estandarización de la técnica de extracción y análisis de la actividad biológica.**

Una vez revisados y determinados taxonómicamente los ejemplares, se seleccionaron para las diferentes pruebas de extracción de carotenoides presentes en el género *Sargassum*.

La primera extracción fue liquido-liquido, se realizó con los ejemplares preservados en etanol al 70%, del que se obtuvo un producto de color marrón, el cual se puso a prueba en un cultivo de células (CALO e INBL) sin presentar actividad anti-tumoral.

La segunda extracción fue solido-liquido, con ejemplares deshidratados y se utilizó éter de petróleo, el producto fue de color verde, mismo que se puso a prueba y mostró un efecto anti-tumoral.

Jaime y colaboradores (2005) realizaron extractos con etanol para poder separar y caracterizar compuestos (carotenoides y fenoles) del alga *Spirulina plantesis*, mientras que Herrero y colaboradores (2006) obtuvieron extracciones de *Dunaliella salina* con fines antioxidantes utilizando hexano y etanol, el primero resulto con mejor actividad, por otro lado Plaza y su equipo (2010) hicieron la detección de diferentes ácidos grasos con actividad antimicrobiana y antioxidante de las algas *Himantalia elongata* y *Synechocystis sp.* utilizando extractos a base de hexano, etanol y agua de los cuales los extractos con mejores resultados fueron los realizados con etanol. Bhagavathy y colaboradores (2011) extrajeron carotenoides con acetona, benceno, cloroformo, éter dietílico, acetato de etilo, hexano y metanol de la Chlorophyta *Chlorococcum humicola* para actividad antimicrobiana teniendo con mejor resultado aquellos extractos realizados con hexano. Sin embargo, hay que mencionar que entre estos trabajos no hay referencias sobre el uso de hexano para las extracciones del género *Sargassum*, además al ser un disolvente considerado cancerígeno se sustituyó por el éter de petróleo el cual está basado en hexano y es menos riesgo para la salud.

A partir de este segundo extracto se hicieron pruebas con mezclas de diferentes disolventes para la separación de compuestos mediante cromatografía en capa fina y columna. La mejor separación fue con una mezcla de acetato de etilo y cloroformo (3:7).

Se realizaron cuatro cromatografías de columna con los extractos de los ejemplares de las dos localidades Playa Muñecos y Punta Delgada de ambas temporadas (secas y lluvias), de cada columna se obtuvieron 20 fracciones, mismas que se enviaron al Laboratorio de Oncología Celular de la FES Zaragoza donde de pusieron a prueba para su actividad citostática en las líneas celulares de CALO e INBL en cáncer de cérvix. Cabe destacar que la fracción 2 de Playa Muñecos (secas) y la fracción 3 de Punta Delgada (lluvias) presentaron efecto sobre ambas líneas celulares de carcinoma Tabla 2.

**Tabla 2 Actividad presente en las fracciones del extracto de *Sargassum*. PM = Playa Muñecos PD = Punta Delgada ■=CALO ■=INBL ■=Ambas líneas**

Fracción	PM / secas	PM / lluvias	PD / Secas	PD / lluvias
1		INBL		
2	CALO, INBL			
3		INBL	CALO	CALO, INBL
4		CALO	INBL	
5				
6	INBL			
7				INBL
8				
9			CALO	
10		CALO		
11				
12	INBL			
13	CALO		INBL	INBL
14	CALO	INBL	CALO	CALO
15	INBL	CALO	CALO	CALO
16	CALO	CALO	CALO	INBL
17		CALO	INBL	CALO
18		INBL	INBL	
19		INBL	INBL	
20	INBL	INBL		

De esta manera se confirma la actividad de los extractos de *Sargassum buxifolium* de Playa Muñecos en la temporada de secas de Luna (2012) donde se presentó la disminución en la proliferación celular en CALO a las 24 h. y de INBL a las 48 h., a su vez indicó que induce la proliferación de la actividad inmunorreguladora sobre linfocitos de Sangre periférica (LSPH). Por otra parte, Santiago (2014) reportó que la fracción dos del extracto de *Sargassum buxifolium* regula positivamente la expresión del ARNm para citocromo C en la línea celular CALO mientras que para INBL regula negativamente la expresión de ARNm para citocromo C a las 48 h, mientras que a las 72 h de cultivo la expresión del mensaje aumenta. En los estudios realizados con la misma fracción por Guzmán (2015) dio a conocer que regula positivamente la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/Diablo en ambas líneas celulares de cáncer de cérvix.

### 7.3. Análisis químico.

Al comprobar una actividad biológica sobre las dos líneas celulares (CALO e INBL) con las fracciones dos de Playa Muñecos (secas) y tres de Punta Delgada (lluvias), éstas se enviaron al Instituto de Química de la UNAM para un análisis de cromatografía de gases – masas donde se obtuvieron cuatro compuestos para la fracción dos y seis compuestos para la fracción tres (Anexos 1 y 2). Para fines prácticos a cada compuesto (pico) se le asignó una letra (A, B, C, D, E, y F) tomando en consideración el tiempo de retención (Tabla 3).

**Tabla 3. Identificación de los compuestos mediante el tiempo de retención.**

Tiempo de retención	Compuesto	Fracción en la que se presenta
20.52 min	A	Fracción 2
		Fracción 3
20.61 min	B	Fracción 2
		Fracción 3
20.73 min	C	Fracción 3
20.84 min	D	Fracción 2
		Fracción 3
21.08 min	E	Fracción 2
		Fracción 3
31.18 min	F	Fracción 3

Por otra parte, se obtuvo un porcentaje de similitud entre los compuestos que coinciden en ambas fracciones (Tabla 4). Tomando en cuenta cuatro aspectos de las gráficas descritos por McMurry (2012): el número iónico, el pico base, los picos principales y el porcentaje de concentración de estos últimos.

**Tabla 4. Comparación de los compuestos entre fracciones.**

Tiempo de retención	compuesto	Porcentaje de similitud
20.52 min	A	75 %
20.61 min	B	35 %
20.84 min	D	45 %
21.08 min	E	75 %

El porcentaje de los compuestos (B y D) son bajos (35 y 45 respectivamente), al mostrar al mostrar una diferencia en el pico base y en el número iónico (anexos 5, 6, 8 y 9), mientras que (A y E) tienen mayor similitud (75 %) al tener diferencia solo en el número iónico (anexos 3, 4, 10 y 11).

Los compuestos de ambas fracciones fueron contrastados con los más de 592,000 compuestos contenidos en el registro de datos espectrales de masas del Instituto de Química para identificarlos, los nombres de los compuestos dados por el registro de datos espectrales se acercan al fitol (3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) y algunos derivados (2-Hexadecene, 3,7,11,15,-tetramethyl-,[R-[R\*,R\*-€]]-; Phenol, 2,4,6-tris(1,1-dimethylethyl)- y 4H-1-Benzopyran-4-one-, 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-) Tabla 5.

Estos compuestos no tienen referencia de actividad anticancerígena, sin embargo, Upadhyay y colaboradores (2014) estudiaron los fitoles con fines antibacterianos obteniendo como resultado que el fitol por sí solo no presenta actividad pero al encontrarse en conjunto con sus derivados presentan una actividad considerable sobre las bacterias.

**Tabla 5. Nombre de los compuestos dados por la cromatografía gases – masa.**

Tiempo de retención	Compuesto	Nombre del compuesto	Fracción en la que se presenta	% de similitud	Anexos
20.52 min	A	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	Fracción 2	30.28 %	3 y 13
			Fracción 3	30.28 %	4 y 13
20.61 min	B	2-Hexadecene, 3,7,11,15,-tetramethyl-, [R-[R*,R*-€]]-	Fracción 2	27.69 %	5 y 14
			Fracción 3	59.89 %	6 y 14
20.73 min	C	Phenol, 2,4,6-tris(1,1-dimethylethyl)-	Fracción 3	33.32 %	7 y 15
20.84 min	D	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	Fracción 2	21.77 %	8 y 13
			Fracción 3	54.87 %	9 y 13
21.08 min	E	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	Fracción 2	60.54 %	10 y 13
			Fracción 3	60.54 %	11 y 13
31.18 min	F	4H-1-Benzopyran-4-one-, 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-	Fracción 3	19.28 %	13 y 14

Como se puede apreciar, los porcentajes de similitud (Tabla 5) entre los compuestos de las fracciones del extracto de *Sargassum* y el registro de datos espectrales fue menos del 60% excepto el compuesto E. Por lo que quizá los compuestos obtenidos en este trabajo no están en el registro de datos espectrales.

## 8. CONCLUSIONES

- Desde el punto de vista morfológico, los ejemplares de *Sargassum* colectados en las dos localidades, presentaron pequeñas diferencias en el margen de los filoides, forma de los filoides, tamaño de los criptostomas, aunque en la época de secas los criptostomas son de menor tamaño a diferencia con los ejemplares de la época de lluvias, estas diferencias no son significativas como para considerarlos diferentes especies.
- En lo referente a los métodos de extracción, el sólido-líquido, fue el que proporcionó fracciones con actividad antitumoral sobre células de las líneas de carcinoma de cérvix (CALO e INBL).
- Los resultados obtenidos por el Laboratorio de Oncología Celular indicó que Playa Muñecos en época de secas presentó la misma actividad que Punta Delgada en lluvias.
- Los resultados preliminares del análisis químico mediante cromatografía de gases- masa, muestra que la fracción 2 de Playa Muñecos (secas) posee cuatro compuestos. Mientras que la fracción 3 de Punta Delgada (lluvias), seis.

## 9. CONSIDERACIONES FINALES.

- Continuar con la purificación de los compuestos identificados en este trabajo para su caracterización.
- Continuar los estudios de la actividad biológica del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) J. M. Wynne sobre las fracciones de Playa Muñecos y Punta Delgada que presenta actividad sobre las células de una sola línea de cáncer de cérvix.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar Rosas, R. y Diéguez, A. 1993. *La edad y la longevidad de la macroalgas marinas*. Divulgare. U.A.B.C. Ensenada, Baja California. México, pp. 27-39.
2. Bhagavathy, S., Sumathi, P., Jancy Sherene Bell, I. 2011. *Green algae Chlorococcum humicola – A new source of bioactive compounds with antimicrobial activity*. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 1,51-57.
3. Dawes C. J. 1986. *Botánica marina*. Editorial Limusa. Primera edición. México.
4. Dalmases, P. y Bonet, J. J. 1982. *Técnicas de cromatografía líquido-sólido en columna*. Departamento de Química Orgánica, Instituto Químico de Sarriá, Barcelona. España. pp.126.
5. Domínguez, X. 1979. *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa. Distrito Federal, México. 281 pp.
6. Domínguez S.X.A., 1982. *Química orgánica experimental*. Editorial Limusa. México. p. 79-81,97.
7. Dreckmann, K. M. 1998. *Clasificación y Nomenclatura de las Macroalgas marinas bentónicas del atlántico mexicano*. CONABIO. Pp. 140.
8. Ermakova, S., Sokolova, R., Kim, S. M., Um, B. H., Isakov, V. & Zuyagintseva, T. 2011. *Fuicoidans from Brown Seaweeds Sargassum hornery, Eclonia cava, Costaria costata: structural characteristics and Anticancer Activity*. Appl Biochem Biotechnol 164:841-850.
9. Ganesan, E. K. 1983. *Evaluación de la flora macrobentónica (macroalgas y fanerógamas marinas) de la cuenca Tuy-cariaco, Venezuela*. Bol. Inst. Oceanogr. Venez. Univ. Oriente. 22(1 y 2): 145-175.
10. Graham, L. E. y Wilcox, L. W. 2000. *Algae*. Prentice Hall. USA. Pp. 640
11. Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2015. *AlgaeBase*. Publicación electrónica de todo el mundo, de la Universidad Nacional de Irlanda, Galway. <http://www.algaebase.org>; buscado el 15 de octubre de 2015.
12. Guzmán P., N. N. 2015. *Efecto del extracto de Sargassum buxifolium (Chauvin) M. J. Wynne sobre la expresión del ARNm de la proteína*

- proapoptótica Smac/DIABLO en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL*. Tesis de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. Distrito Federal. México. Pp 90.
13. Hernandez A., L. 2015. *Evaluación taxonómica de Sargassum buxifolium (Chauvin) M. J. Wynne de dos localidades de Veracruz con datos moleculares*. Tesis de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. Distrito Federal. México. pp 49.
  14. Herrero, M., Jaime, L., Martin-Alvarez, P. J., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. 2006. *Optimization of the extraction of antioxidants from Dunaliella salina microalga by pressurized liquids*. J. Agric. Food Chem. 54, 5597-5603.
  15. Jaime, L., Mendiola, J. A., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Señoráns, F. J., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. 2005. *Separation and characterization of antioxidants from Spirulina platensis microalga combining pressurized liquid extraction, TLC and HPLC-DAD*. J. Sep. Sci. 28, 2111-2119.
  16. Ko, S. C., Lee, S. H., Ahn, G., Kim, K. N., Cha, S. H., Kim, S. K., Jeon, B. T., Park, P. J., Lee, K. W. & Jeon, Y. J. 2011. *Effect of enzyme-assisted extract of Sargassum coreanum on induction of apoptosis in HL-60 tumor cells*. J. Appl. Phycol. 24, 675-684.
  17. Lee, R. E. 1999. *Phycology*. Thyrd Edition. Cambridge University. USA. Pp 547.
  18. Littler S. D. y Littler M. M. 2000. *Caribbean Reef Plants. An identification to the reef plants of de Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of México*. Ofshore Graphics, inc. USA.
  19. Lot, A. y Chiang, F. 1986. *Manual de herbario: Administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos*. Editorial Consejo Nacional de la Flora de México. A. C. Instituto de Biología. UNAM. Distrito Federa. México. Pp. 47 – 54.
  20. Lu, B., & Tseng, C. K. 2004. *Studies on four new species of the malacocarpic Sargassum (Sargassaceae, Heterokontophyta) in China*. Hidrobiologia. 512:193-199.

21. Luna Cruz, N. A. 2012. *Determinación de las fases del ciclo celular de lunas de Carcinoma de Cervix CALO E INBL cultivadas en presencia del extracto de Sargassum hystrix buxifolium Chauvin*. Tesis de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. Distrito Federal. México. Pp 74.
22. Mattio, L. & Payri, C. E. 2009. *Taxonomic revisión of Sargassum species (Fucales, Phaeophyceae) from New Caledonia based on morphological and molecular analyses*. J. Phycol. 45, 1374-1388.
23. Mattio, L., Payri, C. E. & Stiger-Pouvreau, V. 2008. *Taxonomic revisión of Sargassum (Fucales, Phaeophyceae) from French Polynesia based on morphological and molecular analyses*. J. Phycol. 44, 1541-1555.
24. Mauseth, J.D. 1995. Botany. An introduction to plant biology: Algae and the origen of eukaryotic cells. Division Phaeophyta: brown Algae. Pp 624.
25. McMurry, J. 2012. *Química orgánica*. CENGAGE Learning. Octava edición. Pp 1262
26. Michalak, I. y Chojnacka, K. 2015. *Algae as production systems of bioactive compounds*. Eng. Life Sci. 15. 160-176.
27. Noruma, M., Kamogawa, H., Susanto, E., Kawagoe, C., Yasui, H., Saga, N., Hosokawa, M. & Miyashita, K. 2013. *Seasonal variations of total lipids, fatty acid composition, and fucoxanthin contents of Sargassum hornery (Turner) and Cystoseira hakodatensis (Yendo) from the northern seashore of Japan*. J. Appl Phycol. 25:1159-1169.
28. Núñez-López, R. A. & Casas-Valdéz, M. M. 1996. *Fenología de lase especies de Sargassum (Fucales: Sargassaceae) en tres zonas de la Bahía Concepción, B. C. S. México*. Rev. Biol. Trop., 44(2) 455-464.
29. Pasto, D. J. y Johnson C. R. 1981. *Determinación de estructuras orgánicas*. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España. 18 – 59 pp.
30. Pasto, D. J., Johnson, C. R. y Miller, M. J. 1992. *Experiments and techniques in organic chemistry*. Editorial Prentice Hall, Inc. New Jersey. USA. 56 – 81 pp.

31. Plaza, M., Santoyo, S., Jaome, L., Garcia-Blairsy, R., Herrero, M., Señoráns, F. J. & Ibáñez, E. 2010. *Screening for bioactive compounds from algae*. J. Pharmac. Biomed. Anal. 51, 450-455.
32. Primo Y.E., 1995. *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Reverté. Barcelona, España. p 869.
33. Quan, L. y Ruiz, J. D. 2007. *Creación de la colección ficológica de la Universidad de Quintana Roo (UQROO), México*. Caos Conciencia 1: 25-30.
34. Quan-Young, L.I., M. A. Díaz-Martín, y J. Espinoza-Avalos. 2004. *Floristics, cover, and phenology of marine macroalgae from Bajo Pepito, Isla Mujeres, Mexican Caribbean*. Bull. Mar. Sci. 75(1): 11-25.
35. Rocha-Ramirez, V. & Siqueiros-Beltrones, D. 1990. *Revisión de las especies del género Sargassum C. Agardh registradas para la Bahía de la Paz, B. C. S., México*. Ciencias Marinas, 16(3): 15-26.
36. Santiago, C., R. 2014. *Determinación del ARNm para citocromo c en líneas celulares de CaCu, cultivadas en presencia del extracto de Sargassum buxifolium (Chauvin) M. J. Wynne*. Tesis de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. Distrito Federal. México. Pp 84.
37. Skoog, A.D., Holler J.F., Crouch R.S., 2008. *Principios de análisis instrumental*. 6ª edición, Cengage Learning Editores. México.
38. Taylor, W. R. 1960. *Marine Algae of the Eastern tropical and subtropical coasts of the America*. The University of Michigan press. USA. 870 pp.
39. Upadhyay, H. C., Dwivedi, G. R., Roy, S., Sharma, A., Darokar, M. P. y Srivastava, S. K. 2014. *Phytol Derivatives as Drug Resistance Reversal Agents*. ChemMedChem. 9, 1860-1868.
40. Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Lara-Zaragoza, E. B., Franco-Monsreal, J. Cardeña-Bozziere, I. M., Galván-Valencia, O. T., Ruiz-Gómez, L. M. 2011. *Ensayos. Biotecnología de plantas medicinales: generando fármacos de un futuro tornado presente*. Temas de ciencia y Tecnología. Vol. 15. Número 43. Universidad de la Sierra del Sur. Oaxaca. México. Pp 13-20.

41. Wang, H. 2008. *Antiviral activities of extracts from Hong Hong seaweeds*. Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 969 – 976 pp
42. Wynne, M. J. 2011. *A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: third revision*. Nova Hedwigia J. Cramer. Michigan. USA. 666 pp
43. Ye, H., Wang, K., Zhou, C., Liu, J. & Zeng, X. 2008. *Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed Sargassum pallidum*. Food Chemistry 111: 428-432.
44. Zertuche, J.A., I. Pacheco-Ruíz y J. González- González. 1995. *Macroalgas*. En: W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem (eds) *Guía FAO para la identificación de especies para fines de la pesca*. Pacífico Centro- Oriental. Volumen I. Plantas e Invertebrados, Roma. FAO, 646 pp.

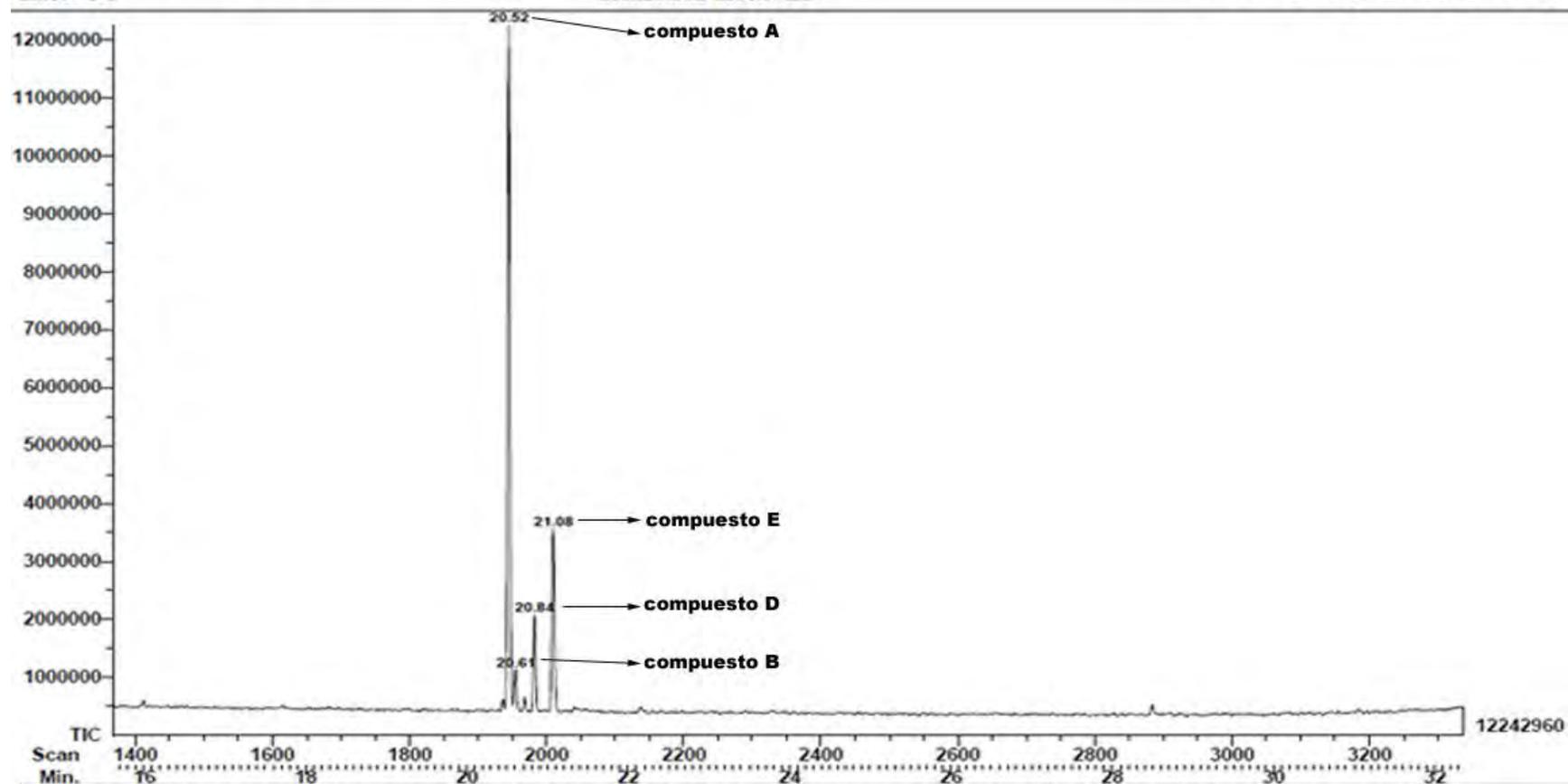
## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Gráfica general de la fracción 2 de Playa Muñecos secas

File: 335 STE-4915 Sabuch Fracción 2 PM / Secas  
Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 12:17:03)  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)



Anexo 2. Gráfica general de la fracción 3 de Punta Delgada lluvias

File: 336 STE-4916 Sabuch Fracción 3 PD / Lluvias

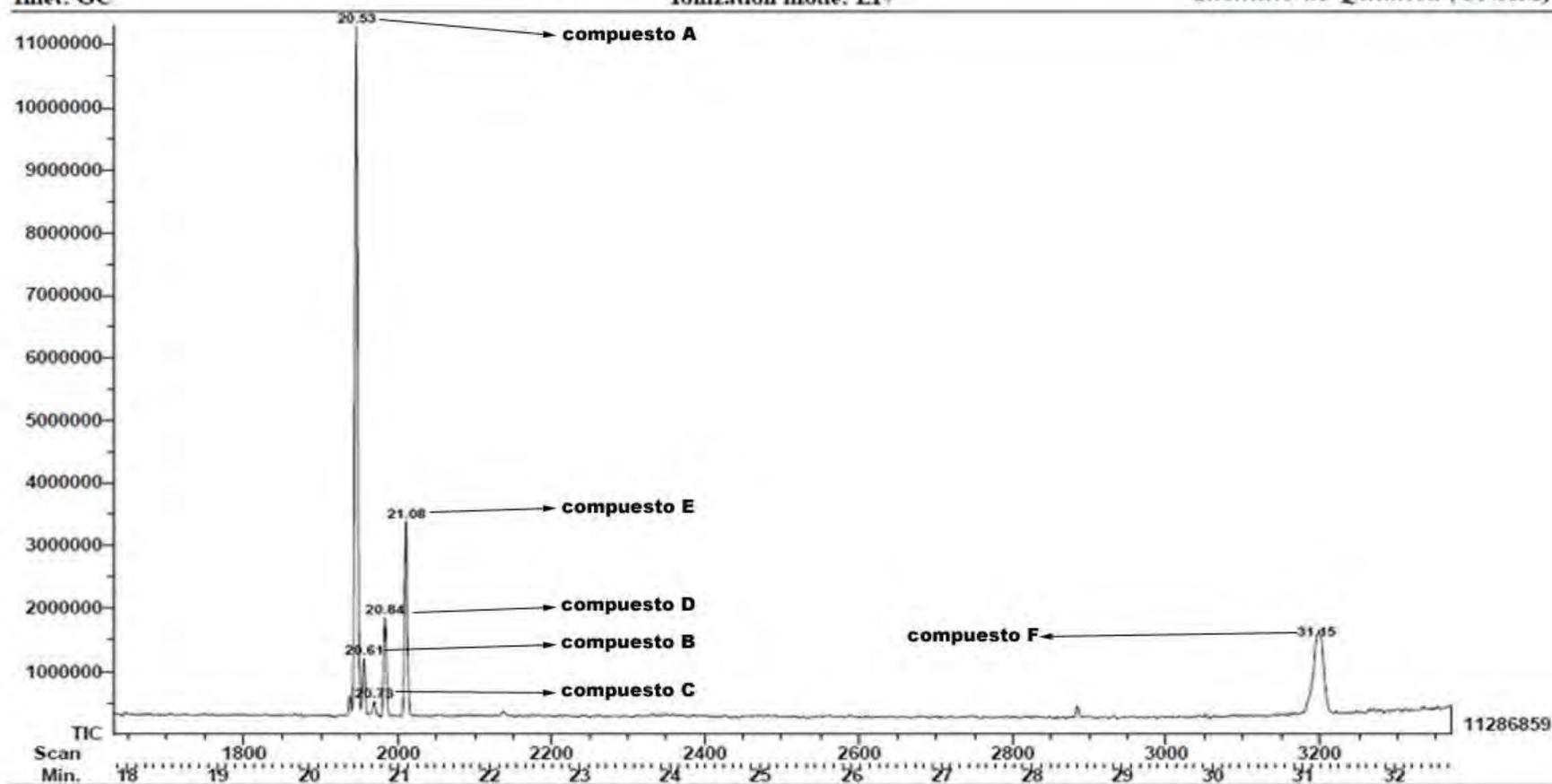
Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 13:06:30)

Instrument: JEOL GCmate

Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)



Anexo 3. Compuesto A, fracción 2

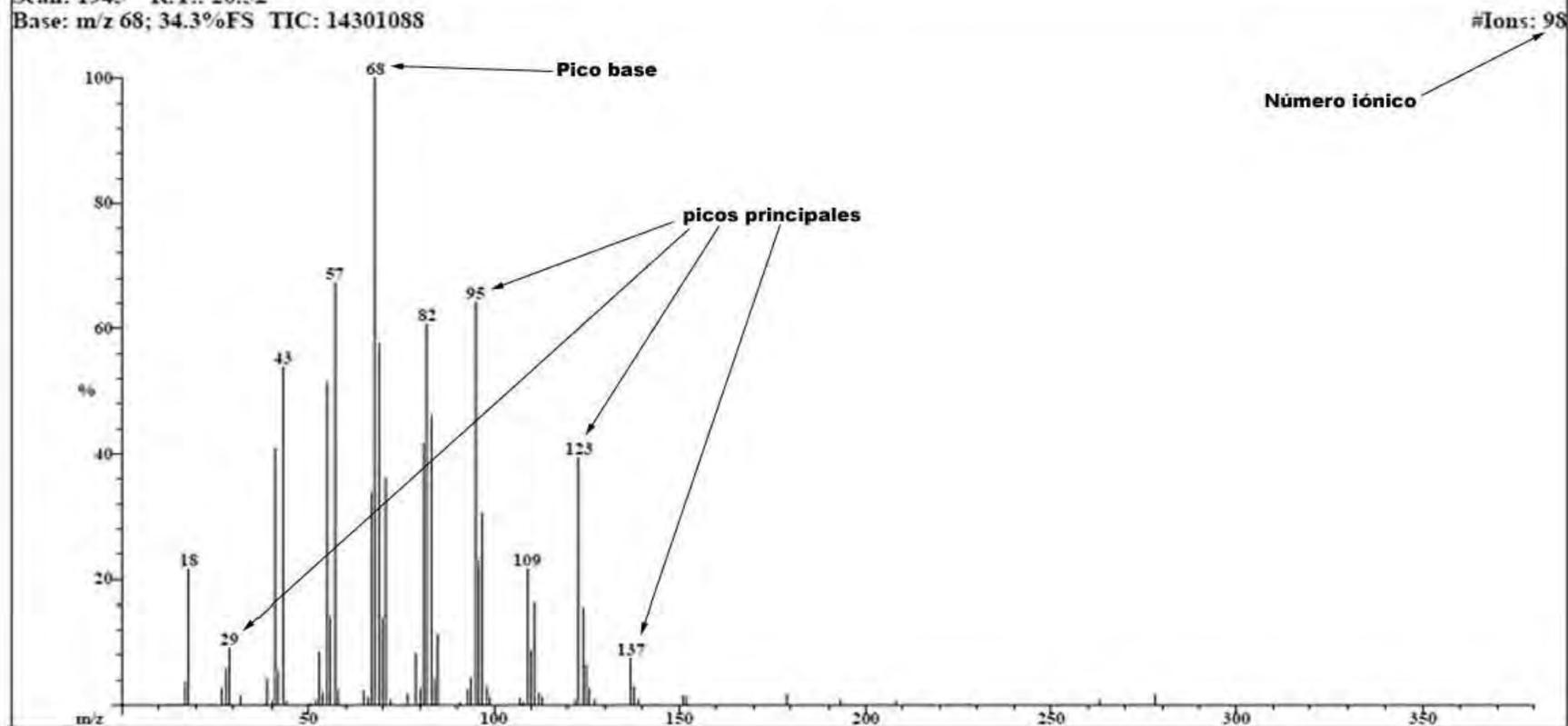
File: 335 STE-4915 Sabuch **Compuesto A / Fracción 2**  
Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 12:17:03)  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)

Scan: 1945 R.T.: 20.52

Base: m/z 68; 34.3%FS TIC: 14301088



Anexo 4. Compuesto A, fracción 3

File: 336 STE-4916 Sabuch **Compuesto A / Fracción 3**  
Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 13:06:30)  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: GC

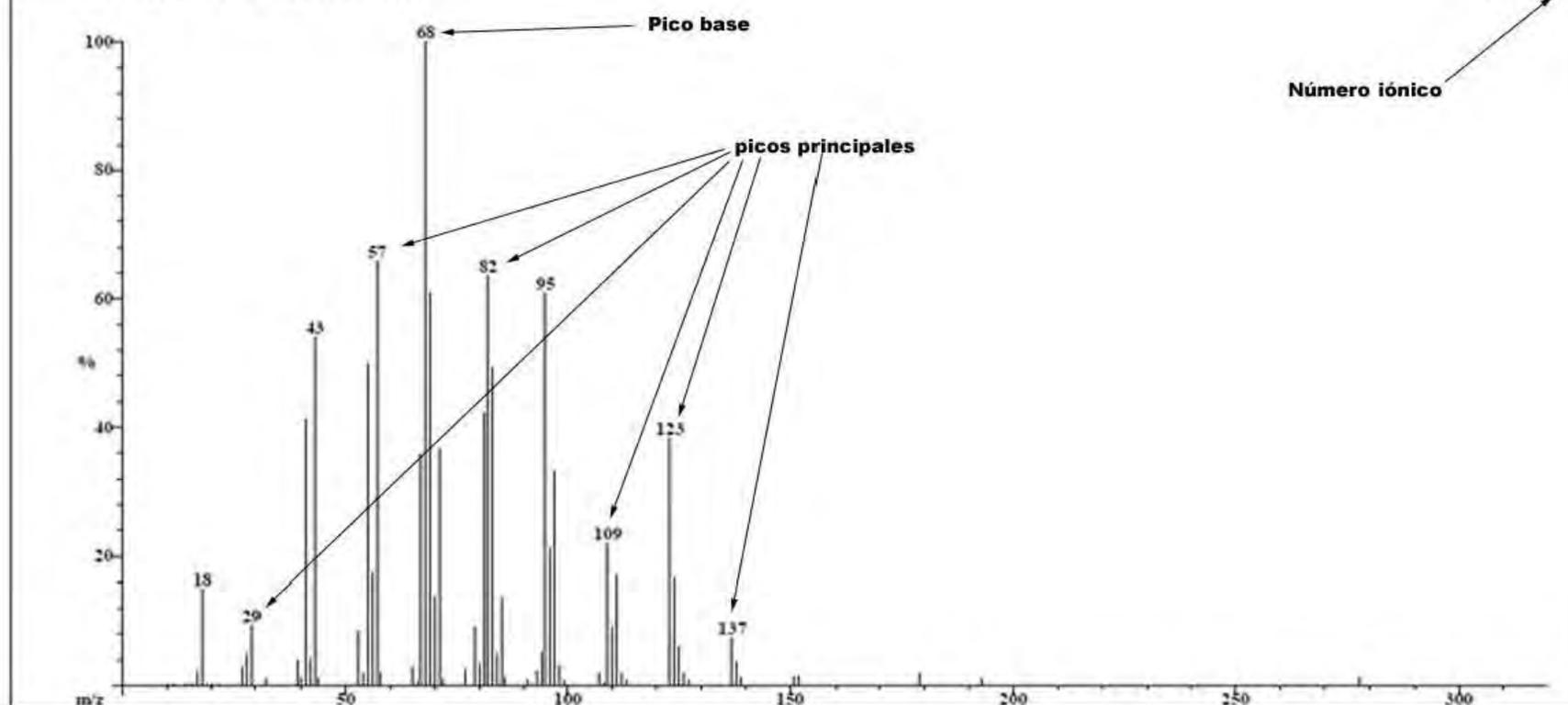
Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)

Scan: 1946 R.T.: 20.53

Base: m/z 68; 30.7%FS TIC: 12941008

#Ions: 109

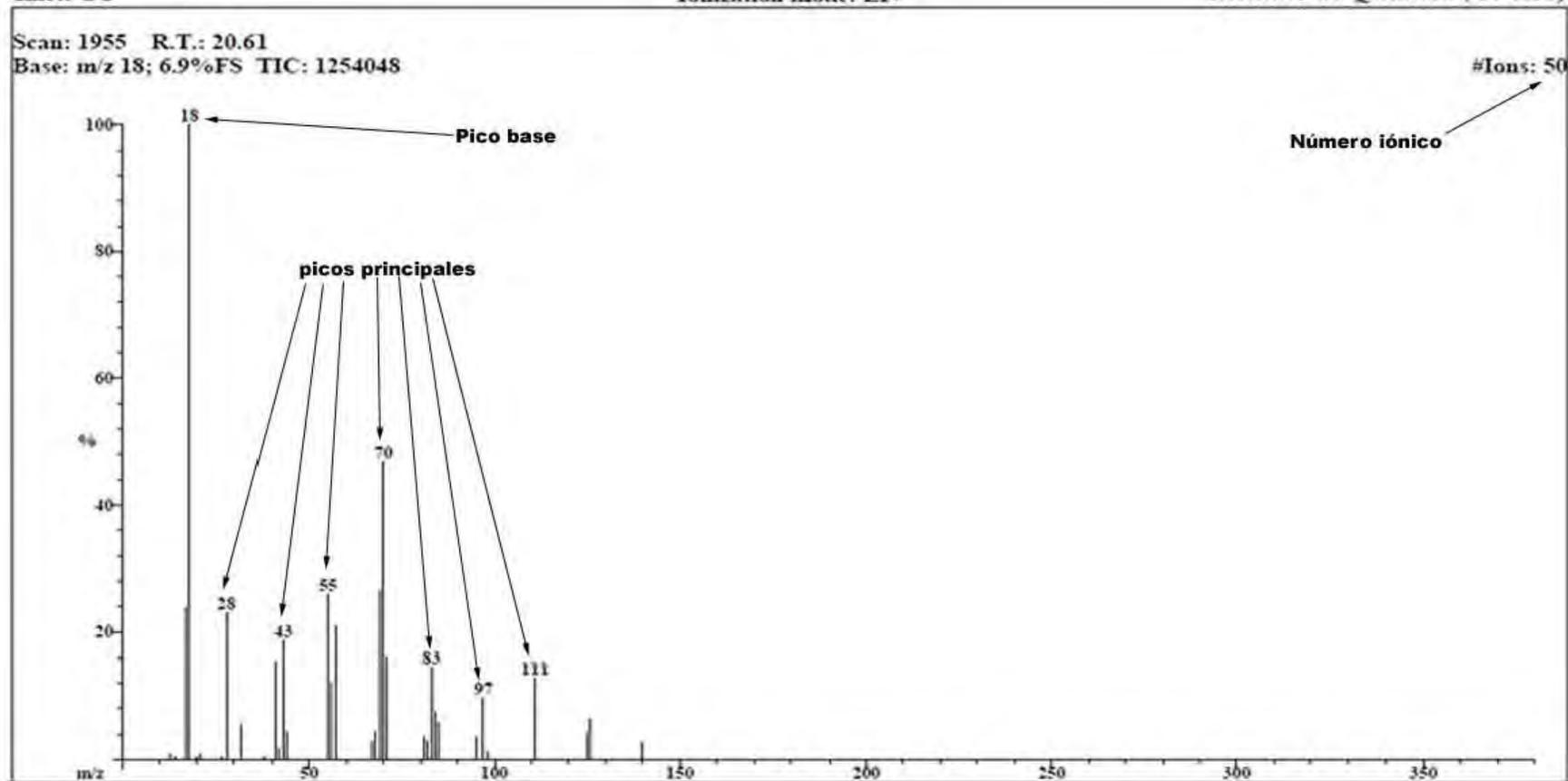


Anexo 5. Compuesto B, fracción 2

File: 335 STE-4915 Sabuch **Compuesto B / Fracción 2**  
Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 12:17:03)  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)



Anexo 6. Compuesto B, fracción 3

File: 336 STE-4916 Sabuch **Compuesto B / Fracción 3**

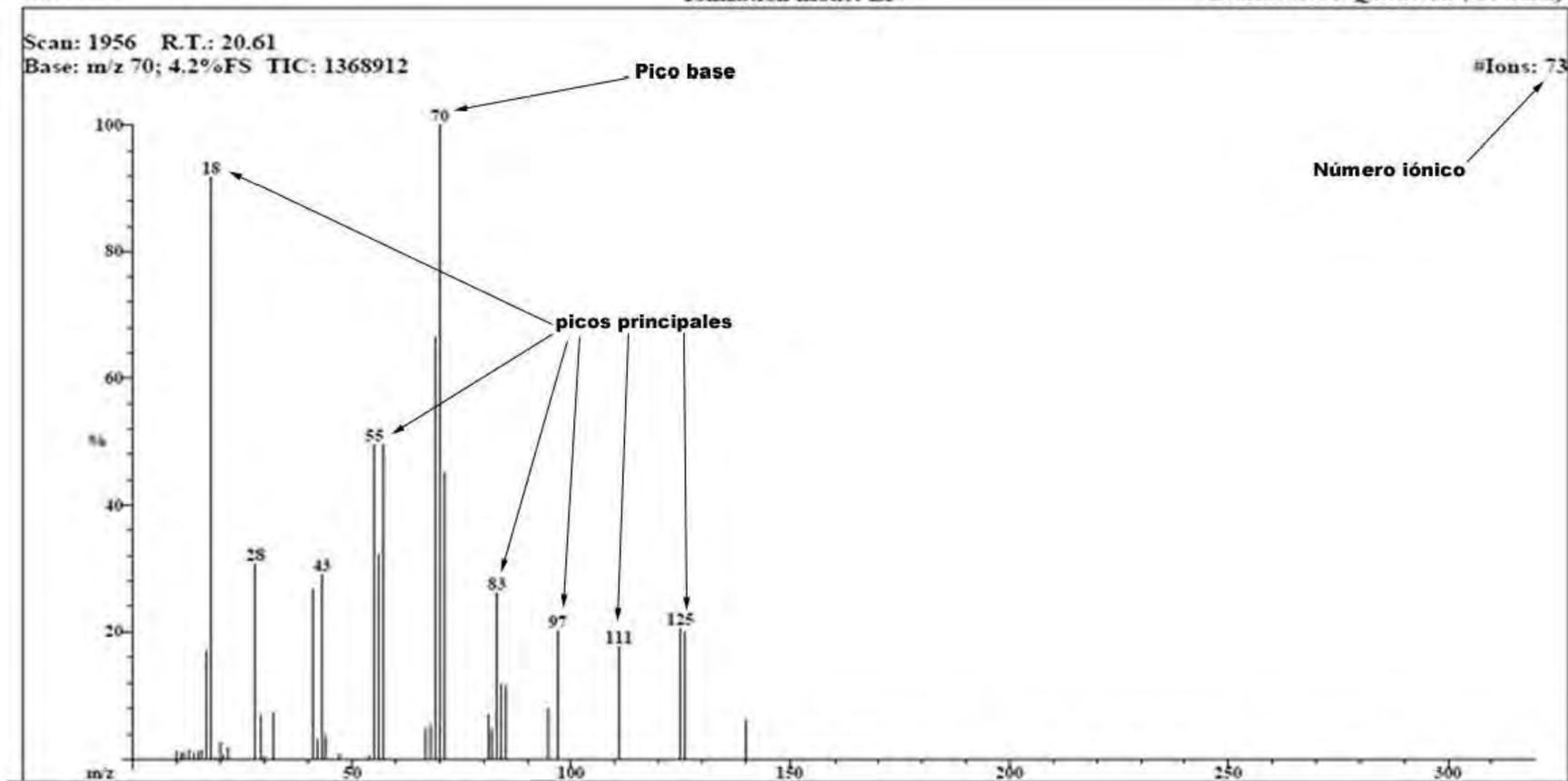
Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 13:06:30)

Instrument: JEOL GCmate

Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)



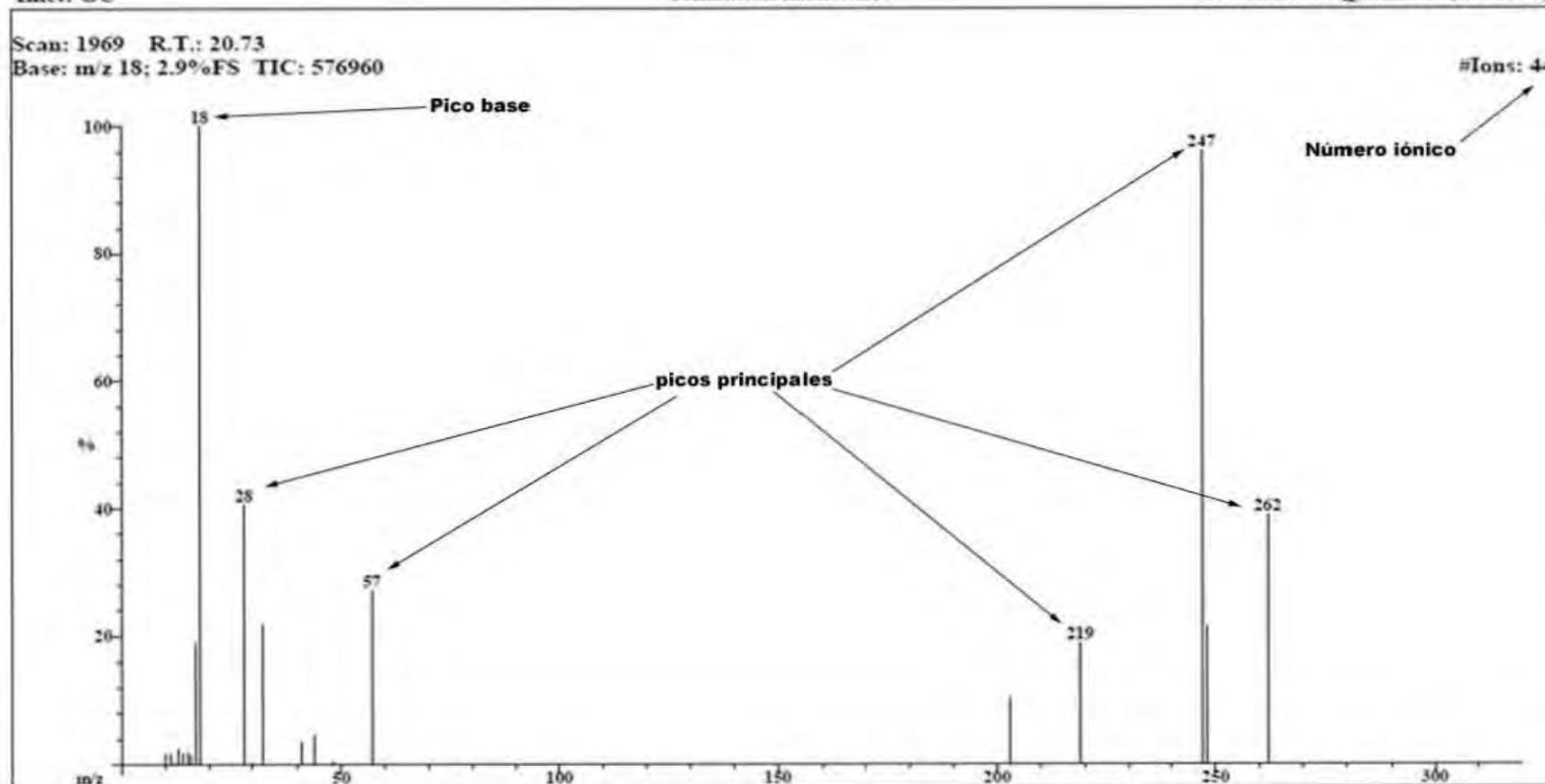
Anexo 7. Compuesto C, fracción 3

File: 336 STE-4916 Sabuch **Compuesto C / Fracción 3**  
Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 13:06:30)  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)

Scan: 1969 R.T.: 20.73  
Base: m/z 18; 2.9%FS TIC: 576960



Anexo 8. Compuesto D, fracción 2

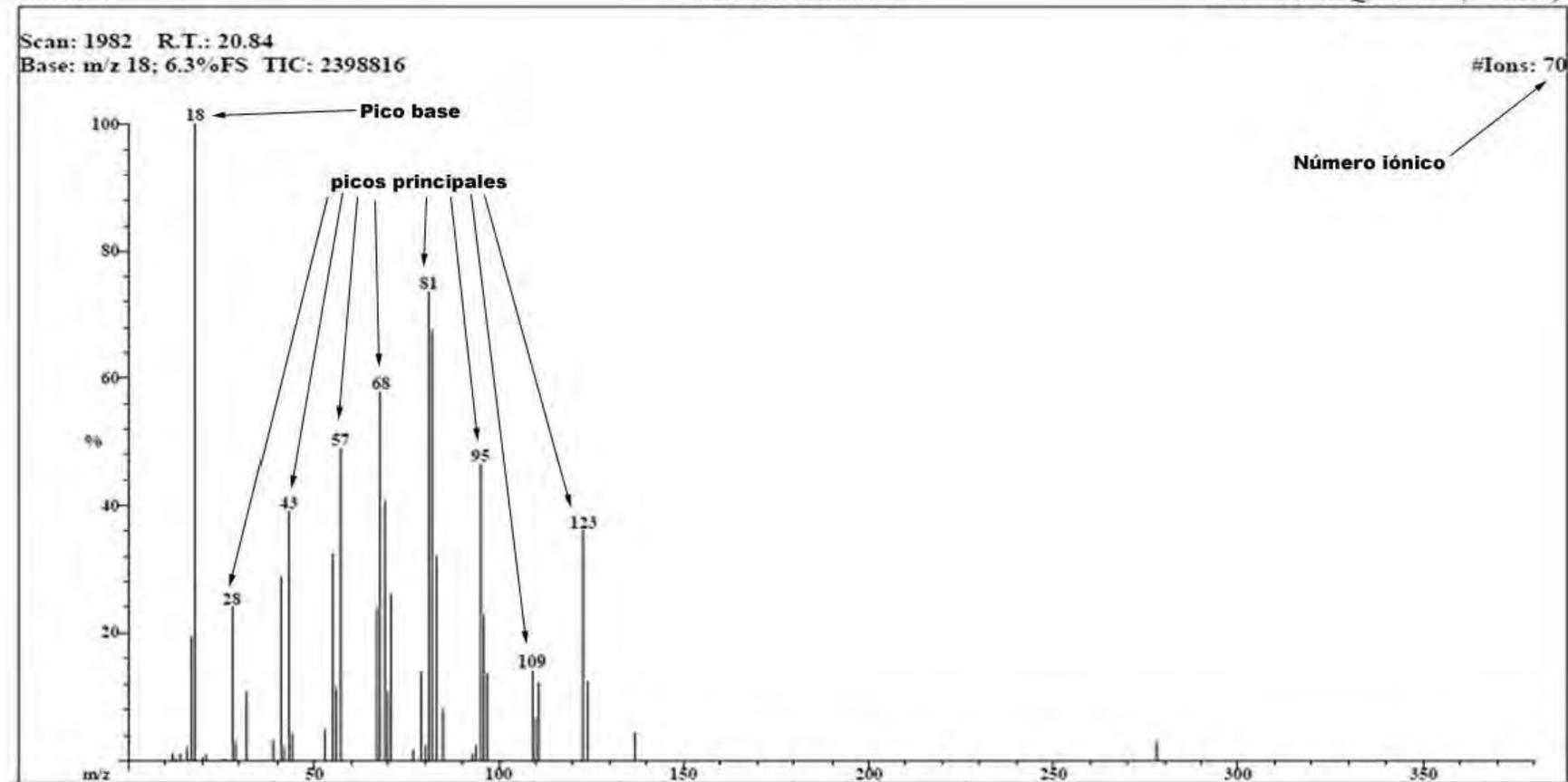
File: 335 STE-4915 Sabuch **Compuesto D / Fracción 2**  
Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 12:17:03)  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)

Scan: 1982 R.T.: 20.84

Base: m/z 18; 6.3%FS TIC: 2398816

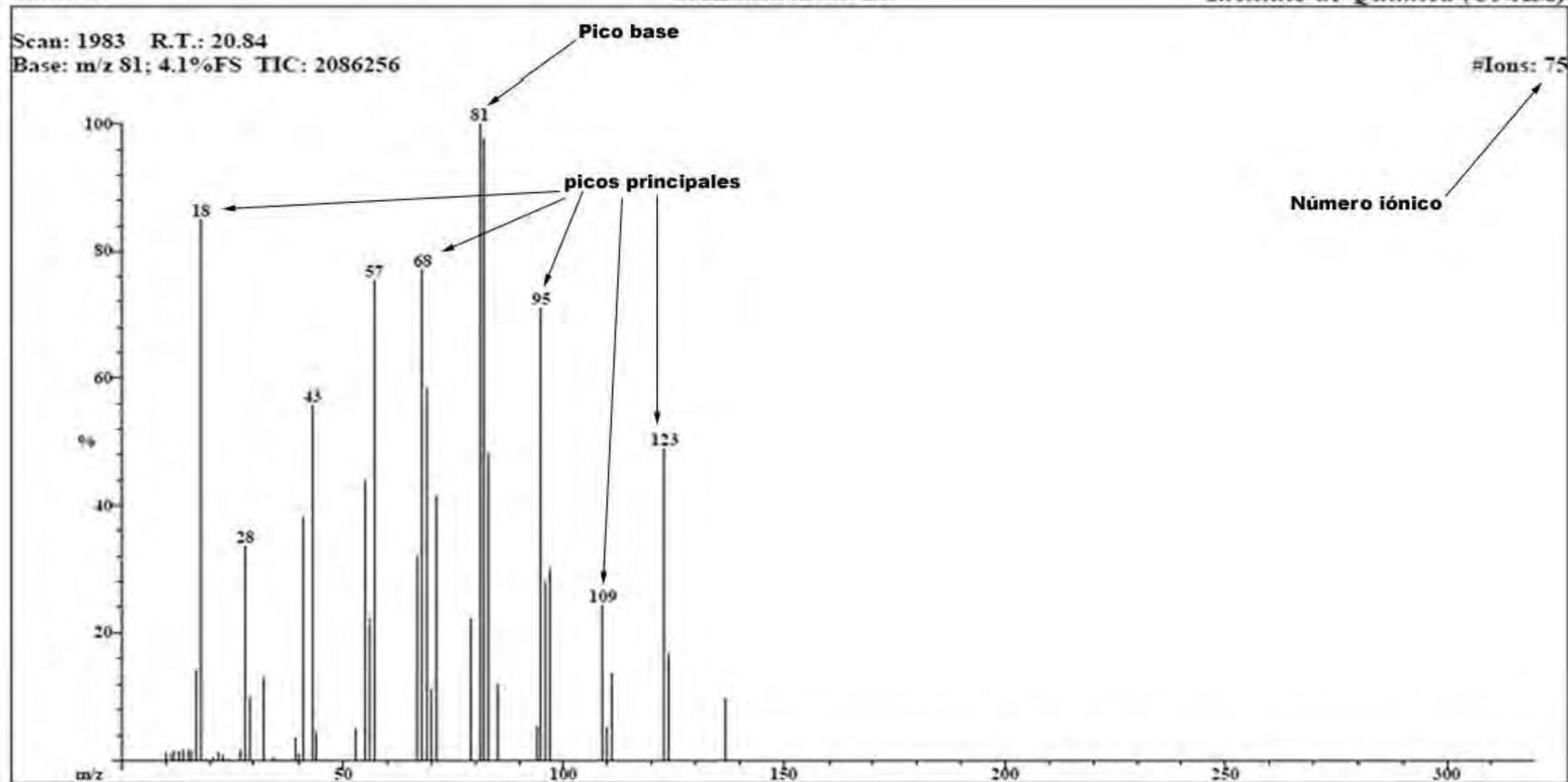


Anexo 9. Compuesto D, fracción 3

File: 336 STE-4916 Sabuch **Compuesto D / Fracción 3**  
Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 13:06:30)  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)



Anexo 10. Compuesto E, fracción 2

File: 335 STE-4915 Sabuch **Compuesto E / Fracción 2**

Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 12:17:03)

Instrument: JEOL GCmate

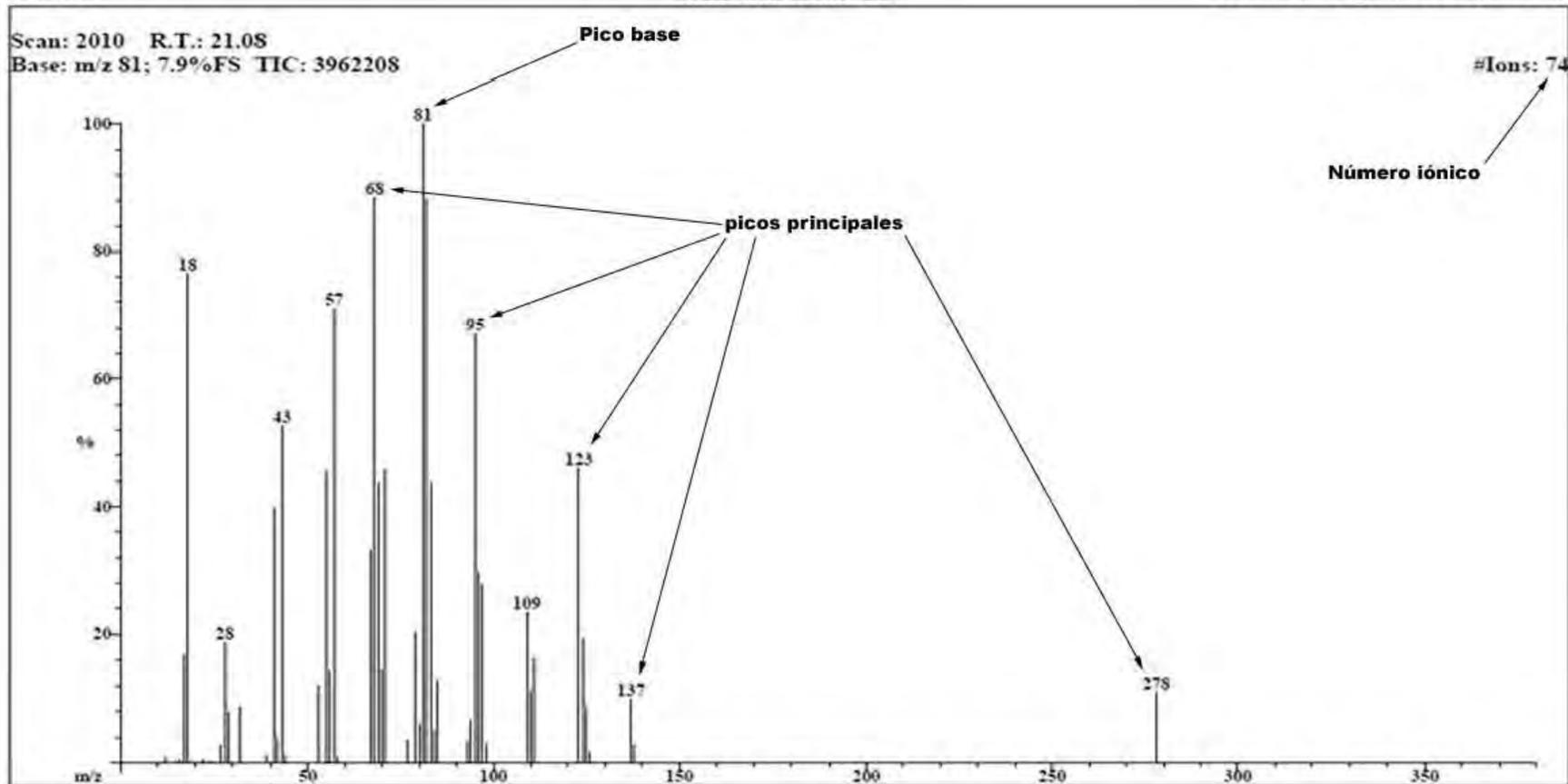
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)

Scan: 2010 R.T.: 21.08

Base: m/z 81; 7.9%FS TIC: 3962208



Anexo 11. Compuesto E, fracción 3

File: 336 STE-4916 Sabuch **Compuesto E / Fracción 3**

Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 13:06:30)

Instrument: JEOL GCmate

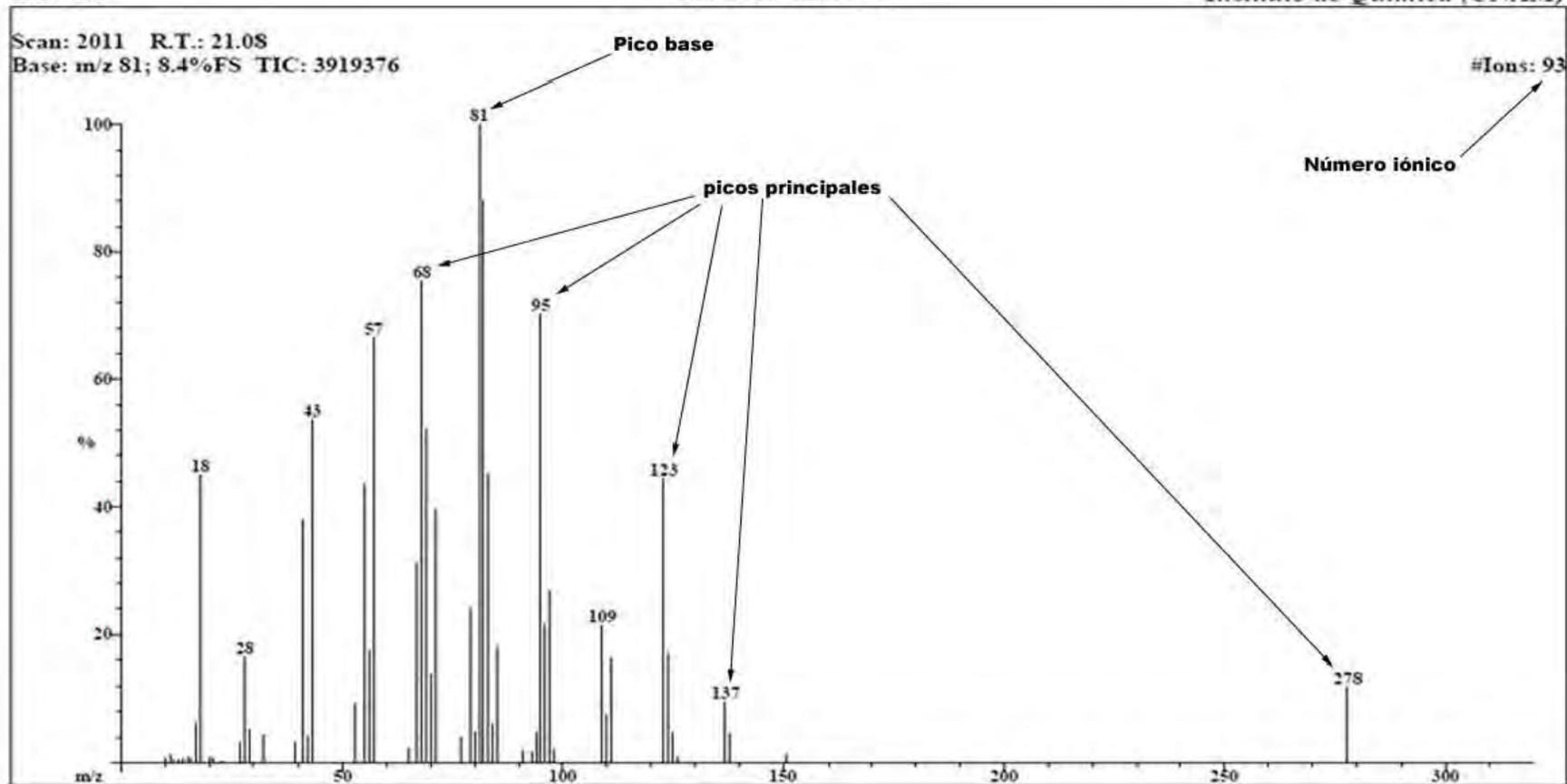
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)

Scan: 2011 R.T.: 21.08

Base: m/z 81; 8.4%FS TIC: 3919376



Anexo 12. Compuesto F, fracción 3

File: 336 STE-4916 Sabuch **Compuesto F / Fracción 3**

Date Run: 05-03-2015 (Time Run: 13:06:30)

Instrument: JEOL GCmate

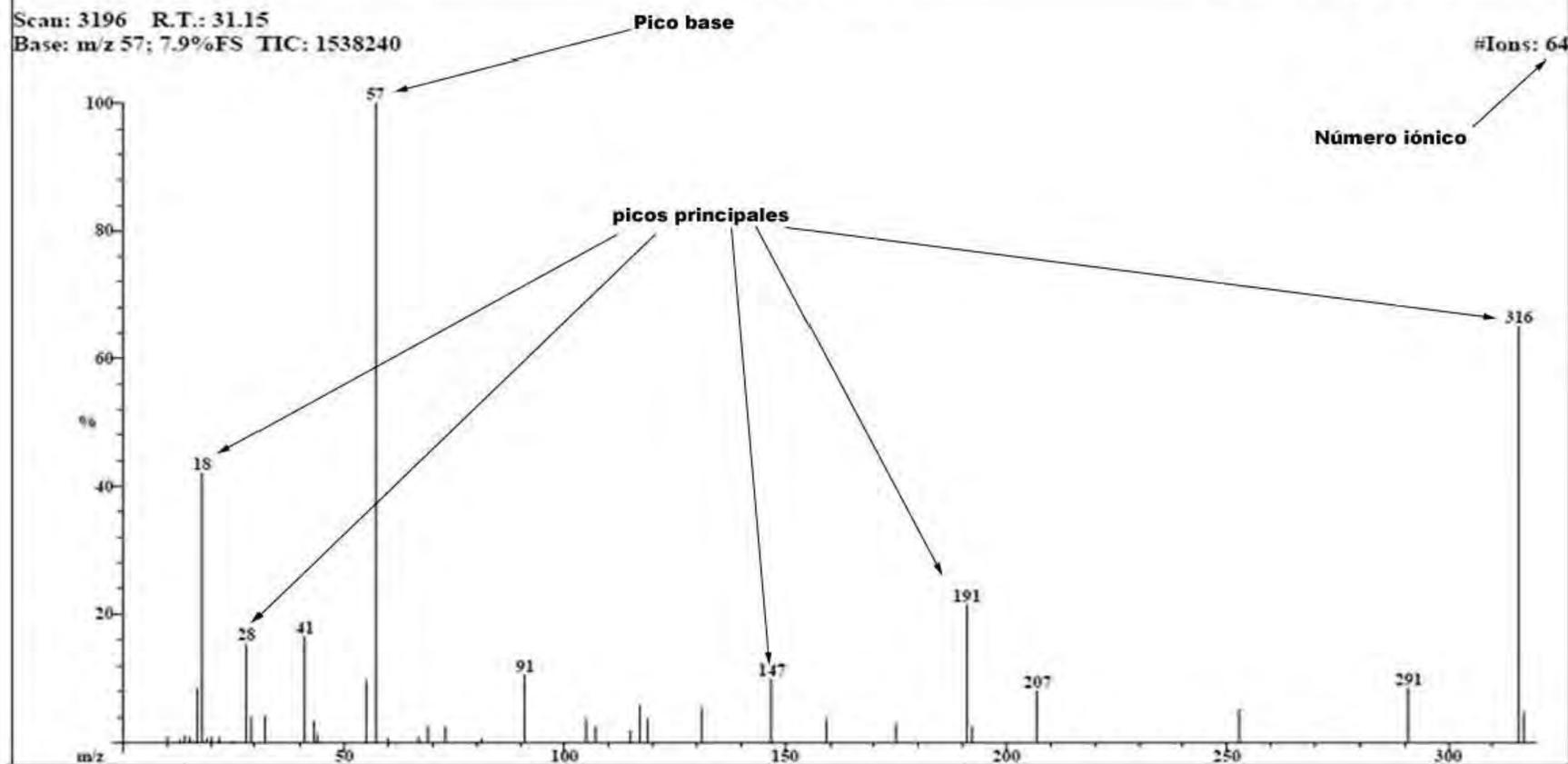
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Instituto de Química (UNAM)

Scan: 3196 R.T.: 31.15

Base: m/z 57; 7.9%FS TIC: 1538240



Anexo 13. 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol

Instituto de Química (UNAM)

Asignado a los compuestos A, D y E

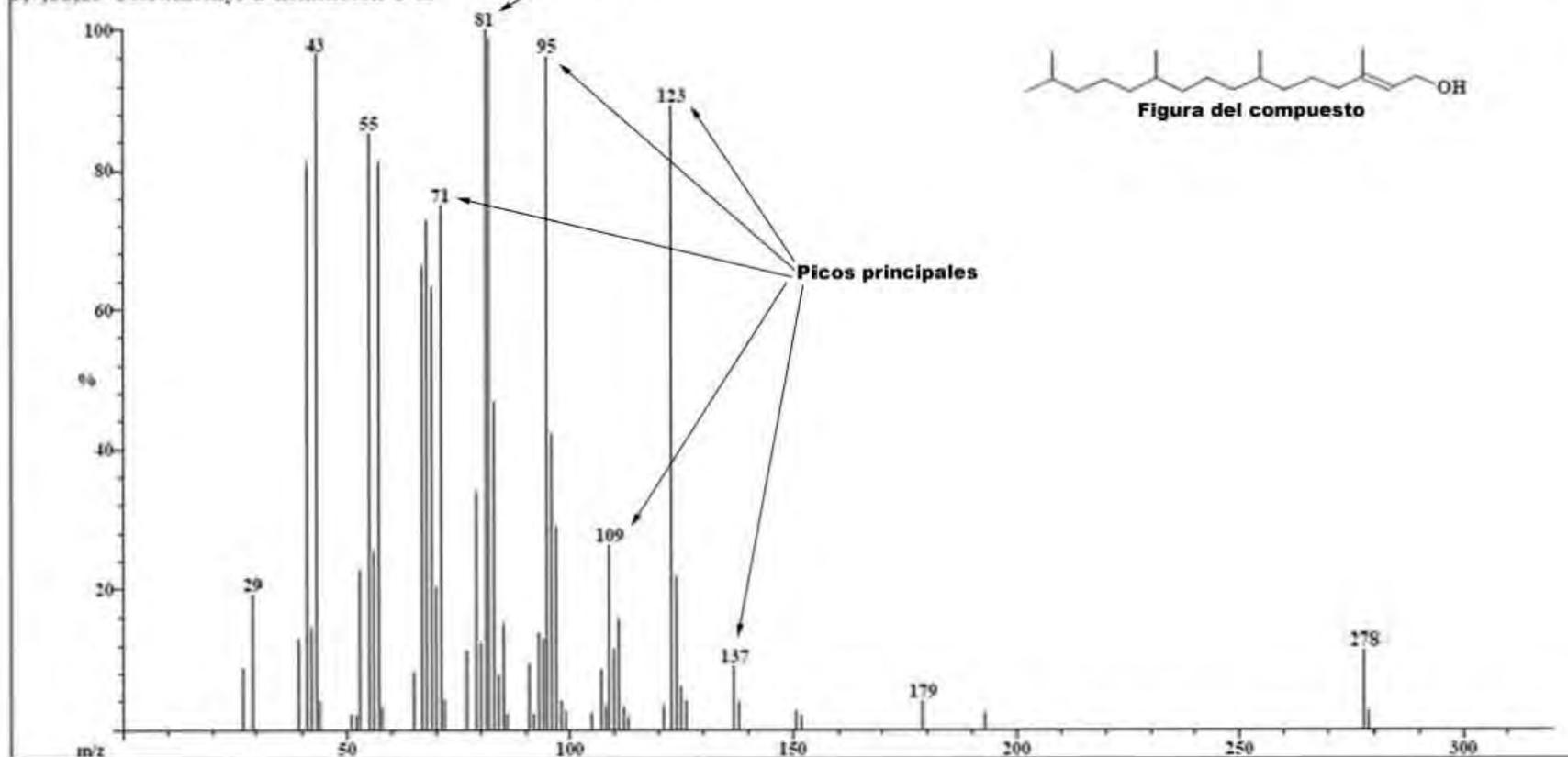
Número iónico

#Ions: 60

NIST MS 1 of 1 (102608-53-7)

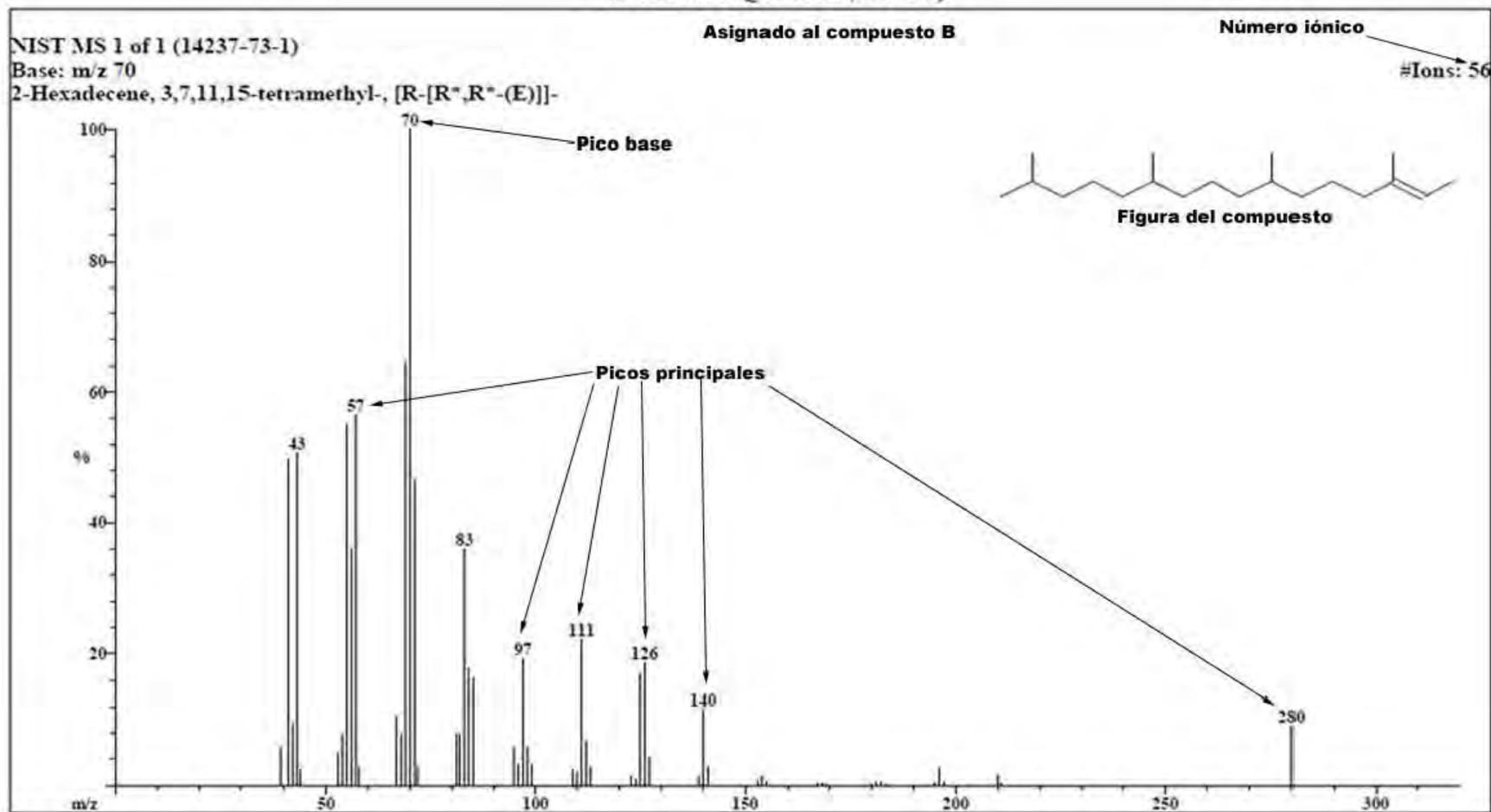
Base: m/z 81

3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol



Anexo 14. 2-Hexadecene,3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R\*.R\*-(E)]]-

Instituto de Química (UNAM)



Anexo 15. Phenol, 2,4,6-tris(1,1-dimethylethyl)-

Instituto de Química (UNAM)

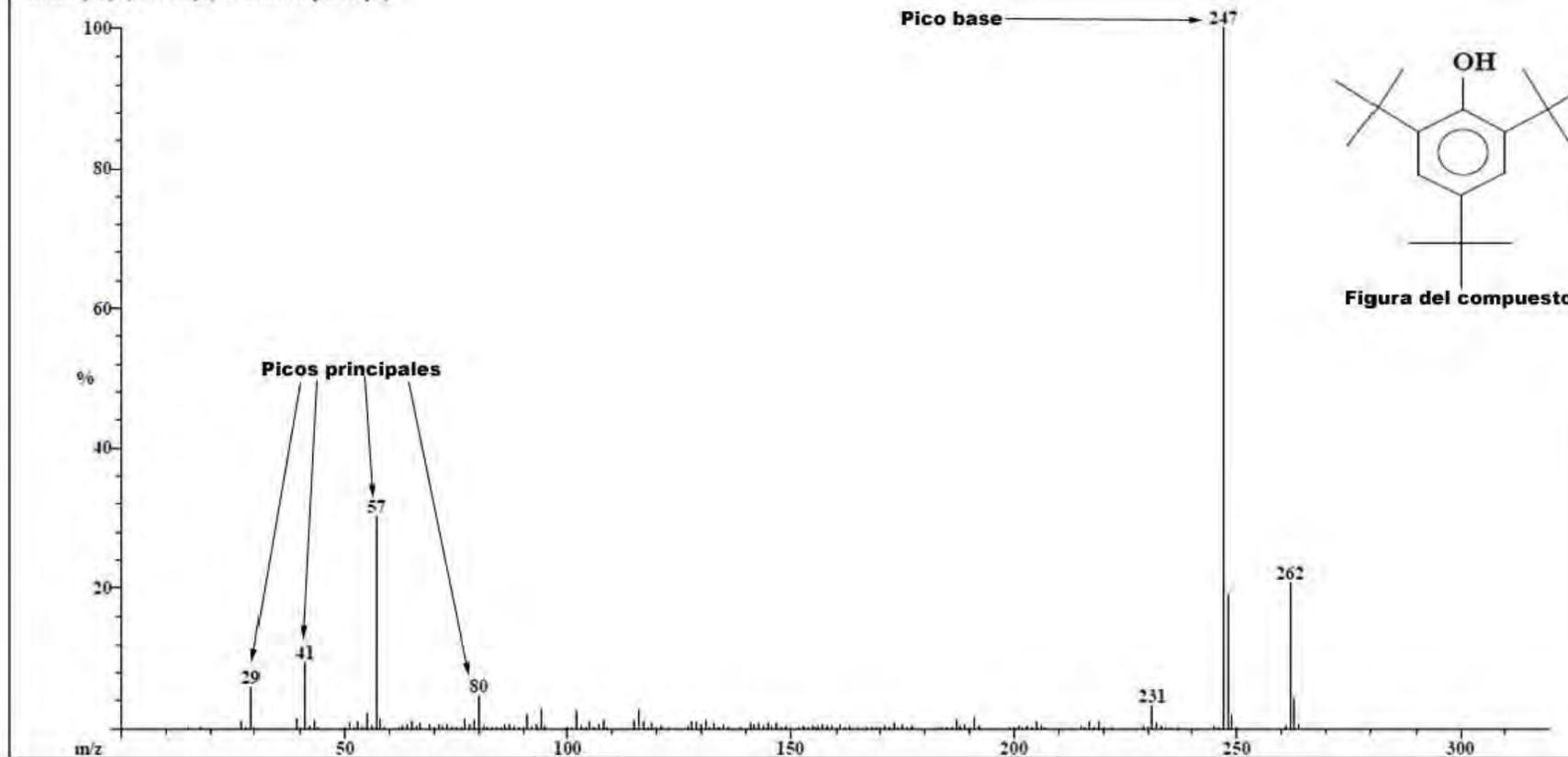
Asignado al compuesto C

Número iónico  
#Ions: 162

NIST MS 1 of 1 (732-26-3)

Base: m/z 247

Phenol, 2,4,6-tris(1,1-dimethylethyl)-



Anexo 16. 4H-1-Benzopyran-4-one,3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-

Instituto de Química (UNAM)

Asignado al compuesto F

NIST MS 1 of 1 (480-19-3)

Base: m/z 316

4H-1-Benzopyran-4-one, 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-

Número iónico

#Ions: 28

