



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Actividad antioxidante de diferentes macroalgas del Sistema
Arrecifal Veracruzano, zona Norte**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

ZULEMA GUADALUPE HERNÁNDEZ RUIZ

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. MARISOL AVILA ROMERO

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO

MÉXICO, 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTO

**Este estudio fue financiado por el proyecto PAPCA 2014-12
Actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas marinas del
PNV.**

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por permitirme obtener el conocimiento para crecer académica y personalmente.

Al laboratorio Fitoquímica-Farmacognosia, por aceptarme y ser mi segundo hogar durante mucho tiempo.

A mi asesora, la M. en C. Marisol Avila Romero, por ser mi apoyo, mi guía durante este trayecto, por levantarme el ánimo cada que creía haber caído, por confiar en mí y ayudarme a creer en mí misma. Gracias por su tiempo sus valiosas e invaluable enseñanzas, por ayudarme a resolver mis dudas, por escucharme, darme un buen consejo siempre que lo necesitaba y por impulsarme a llegar más lejos.

A mis sinodales, por su paciencia, sus valiosas observaciones, el tiempo que le dedicaron a este trabajo y por aceptarlo. Gracias por brindarme y compartirme de su conocimiento.

Dra. Ana María García Bores

Dr. José Guillermo Avila Acevedo

Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado

M. en C. Gloria Garduño Solorzano

M. en C. Marisol Avila Romero

A la Dra. Ana María García Bores, por tener siempre la disposición de ayudarme, por todas sus aportaciones y observaciones, por hacerme ver que la bioquímica es más que estructuras complejas. Muchas gracias por todo.

Al Dr. José Guillermo Avila Acevedo, por enseñarme química y biología de manera más divertida y por hacer mi trabajo menos complejo cuando resolvía mis dudas.

A la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado, por la confianza que depositó en mí, por motivarme a no abandonar el proyecto y hacerme aportaciones muy valiosas. Gracias por impulsarme a seguir por más.

A la M. en C. Gloria Garduño Solórzano, por abrirme el panorama y ayudarme a conocer el maravilloso mundo de las algas, muchas gracias por todas sus aportaciones, su dedicación, esfuerzo y ayuda para culminar este trabajo.

A Carolina Carranza Nestitla, “Carito”, por soportarme durante todo este tiempo, ser mi compañera, mi apoyo incondicional, mi confidente, mi “hermana académica”. Gracias por ser mi amiga, por hacer divertidos todos los días en el laboratorio, por tu ayuda y por los grandes consejos que siempre me das.

A la Sra. Betty, por su confianza y amistad, por escucharme siempre y hacerme las mañanas más amenas, gracias por motivarme, por hacerme ver lo lejos que puedo llegar, le agradezco infinitamente.

A todos mis amigos y compañeros que han estado conmigo a lo largo de este camino, gracias por brindarme su amistad, compartir agradables momentos y motivarme para ir por más. Gracias por todo su apoyo.

DEDICATORIAS

A Dios,

Por regalarme a la familia más bonita y permitirme llegar hasta dónde estoy ahora.

A mi papá y abuelitos,

Porque sin ustedes nada de esto habría sido posible. Por ser la luz de mi vida, mi mayor motivación, mi motor todos los días. Gracias por no dejarme caer, por todo su amor, por creer en mí y por brindarme todo su apoyo, porque por ustedes soy quien soy.... LOS AMO PARA TODA LA VIDA.

A mi tía Claudia,

Por todos tus consejos, porque siempre has buscado la mejor manera de hacerme entender las cosas, por enseñarme lo bonita y valiosa que es la vida. TE QUIERO MUCHO.

A mi tía Martha,

Por creer en mí, darme tu confianza, por ser mi ejemplo, como mujer, madre y amiga, porque gracias a ti he aprendido a no caer tan fácil. TE QUIERO MUCHO.

A mi tía Matilde Juana,

Por enseñarme a vivir al máximo, por escucharme siempre que lo necesito, por comprenderme en cada etapa de mi vida y por tus valiosos y buenos consejos. TE QUIERO MUCHO.

A mis tíos Loreto y Alfonso,

Por todas sus enseñanzas, por su cariño, por ser un apoyo incondicional en mi vida y una motivación. Gracias por todo. LOS QUIERO MUCHO.

A mis primos Mariana y Emmanuel,

Por ser ese rayito de luz que me alegra los días, porque a pesar de estar chiquitos la motivación que ejercen en mí es muy grande. LOS QUIERO MUCHO, BEBÉS.

A mi primo Jesús,

Por enseñarme lo bonito que es tener ganas de aprender todos los días, porque aunque no lo veas, has creído en mí como bióloga. Gracias por llenarme de alegría. TE QUIERO INFINITAMENTE.

A mis primos Josué y Tere,

Por motivarme todos los días, por hacerme reír con sus ocurrencias, por darme la fuerza para no dejarme vencer nunca. Muchas gracias. LOS QUIERO MUCHO.

"Qué sería de la vida, si no tuviéramos el valor de intentar algo nuevo."

Vincent van Gogh

Resumen	2
Introducción	3
Antecedentes	5
Justificación	8
Pregunta de investigación.....	8
Hipótesis	8
Objetivo General.....	9
Objetivos Particulares.....	9
Zona de colecta	9
Materiales y métodos.....	11
Material biológico	11
Determinación taxonómica.....	11
Obtención de extractos	12
Rendimiento.....	12
Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios	12
a) Reacción de Dragendorff y Mayer (Alcaloides).....	12
b) Reacción con cloruro férrico (Fenoles)	13
c) Reacción de Molisch (Glicósidos).....	13
d) Cromatografía en capa fina revelada con vainillina (Terpenos).....	13
e) Prueba de la espuma (Saponinas)	13
Ensayo de la actividad antioxidante	14
a) Método de DPPH	14
b) Método de ABTS	14
c) Método de FRAP	15
Determinación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu).....	15
Resultados y discusión	16
Determinación del material biológico	16
Rendimiento de los extractos.....	20

Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios	21
Extractos metanólicos	21
Extractos acetónicos	22
Extractos hexánicos	24
Prueba de saponinas (hemólisis)	27
Determinación de la actividad antioxidante	29
Método de DPPH	29
Método de ABTS ⁺ y FRAP	33
Determinación del contenido de fenoles totales	35
Conclusiones	38
Referencias	39
Anexos	52

Índice de cuadros	Página
Cuadro 1. Macroalgas identificadas pertenecientes al SAV, zona Norte.....	17
Cuadro 2. Rendimiento de los extractos (%)......	20
Cuadro 3. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios en los extractos metanólicos de las algas colectadas.....	22
Cuadro 4. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios en los extractos acetónicos de las algas colectadas.....	23
Cuadro 5. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios en los extractos hexánicos de las algas colectadas.....	25
Cuadro 6. Prueba de saponinas mediante hemólisis.....	28
Cuadro 7. Actividad antioxidante ante el radical DPPH. Extractos metanólicos, acetónicos y hexánicos de las macroalgas.....	30
Cuadro 8. Cuantificación de fenoles totales de los extractos acetónico y metanólico de <i>C. racemosa</i> y <i>T. cylindrica</i>	36

Índice de figuras

Página

Figura 1. Sistema Arrecifal Veracruzano.....	10
Figura 2. Número de especies colectadas por arrecife.....	16
Figura 3. Porcentaje de macroalgas por división colectadas en los arrecifes: Blanquilla, Gallega e Isla Verde.....	19
Figura 4. Prueba cualitativa de la actividad antioxidante (DPPH) (extractos hexánicos algales).....	32
Figura 5. Cuantificación de fenoles totales de los extractos acetónico y metanólico de <i>C. racemosa</i> y <i>T. cylindrica</i>	35

Abreviaturas

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

BHA: Butilhidroxianisol

BHT: Butilhidroxitolueno

CA₅₀: Capacidad antioxidante media

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FRAP: Ferring Reducing Ability of Plasma (Poder antioxidante reductor de hierro)

GAE: Equivalentes de ácido gálico

MS: Metabolitos secundarios

PEA: Feniletilamina

RL: Radical libre

SAV: Sistema Arrecifal Veracruzano

TPTZ: 2,4,6-tripiridol-s-triazina

TYR: Tiramina

UV: Ultravioleta

Resumen

Los radicales libres son moléculas que presentan uno o más electrones no apareados en su orbital más externo. Éstos inducen la formación de nuevas especies reactivas que pueden ser controladas por defensas antioxidantes. A pesar de su eficacia, algunos compuestos de los antioxidantes sintéticos han demostrado actividad carcinogénica y otros efectos tóxicos, por lo cual ha surgido el interés por los productos naturales marinos obtenidos a partir de las macroalgas. Es por eso que en el presente estudio se estudian las propiedades antioxidantes que poseen diferentes macroalgas del Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV), zona Norte ya que se ha comprobado que estos organismos pueden prevenir o eliminar el estrés oxidativo que ocasionan los radicales libres. Se colectaron 14 macroalgas en los arrecifes Blanquilla, Gallega e Isla Verde, de las cuales se determinaron 11 especies. 57% pertenece a la división Rhodophyta, 36% a Chlorophyta y 7% a Ochrophyta. Los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de las macroalgas se obtuvieron mediante los métodos de maceración y destilación a presión reducida. Se realizaron pruebas cualitativas con el fin de identificar la presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios, como alcaloides, fenoles, glicósidos, terpenos y saponinas. En estas pruebas se encontraron terpenos y saponinas en todos los extractos, mientras que los extractos hexánicos fueron los únicos que presentaron alcaloides. La determinación de saponinas mediante hemólisis corroboró la presencia de éstas una vez determinadas en la prueba de espuma, siendo el extracto metanólico de *Caulerpa racemosa* del arrecife de Blanquilla la que presentó el halo de lisis más grande (15.0 ± 0.0 mm), seguido del extracto metanólico de *C. sertularioides* del arrecife Gallega (9.3 ± 0.6 mm). La actividad antioxidante de los extractos algales se evaluó mediante los métodos DPPH, ABTS y FRAP. En el ensayo DPPH, el extracto metanólico de *C. racemosa* (Blanquilla) presentó el mayor porcentaje de reducción de dicho radical (38.21%) a una concentración de 500 ppm seguido del extracto metanólico de *Tricleocarpa cylindrica* (Isla Verde) (36.42%) a la misma concentración. La mayoría de los extractos hexánicos resultaron positivos en las pruebas cualitativas del radical DPPH, en tanto que en los ensayos de ABTS y FRAP las macroalgas no presentaron actividad. Al hacer las evaluaciones del radical DPPH y encontrar los máximos porcentajes de reducción en *C. racemosa* y *T. cylindrica*, se realizó la prueba cuantitativa de fenoles totales (Folin-Ciocalteu) únicamente en estas especies, siendo el extracto metanólico de *C. racemosa* (28.61 μg eq. de ácido gálico/mg extracto) y el extracto acetónico de *T. cylindrica* (23.70 μg eq. de ácido gálico/mg extracto) los que presentaron el mayor contenido de fenoles totales. Partiendo de los resultados anteriores se concluye que la actividad antioxidante de *T. cylindrica* está relacionada con la cantidad de fenoles totales que posee, sin embargo, la actividad antioxidante de *C. racemosa* no está directamente relacionada con su contenido fenólico y probablemente se deba a la sinergia de diferentes compuestos como los liposolubles (vitamina A, E y carotenoides).

Introducción

Los radicales libres (RL) son moléculas que presentan uno o más electrones no apareados en su orbital más externo e inducen la formación de nuevas especies reactivas. Estas moléculas, producidas normalmente durante el metabolismo aerobio se utilizan en diversos procesos fisiológicos como un mecanismo de defensa contra agentes infecciosos (Delgado *et al.*, 2010). Sin embargo, los radicales libres tienen un potencial efecto oxidante por lo que son controlados por mecanismos protectores denominados defensas antioxidantes (Morales *et al.*, 2010).

Los compuestos antioxidantes son sustancias que eliminan, previenen o remueven la acción de los radicales libres y de ciertas especies oxidantes (Morales *et al.*, 2010). Es comúnmente reconocido que los antioxidantes sintéticos, utilizados en medicina y en la industria alimenticia pueden neutralizar potencialmente a los radicales libres dañinos en células antes de que causen la oxidación lipídica y proteica, reduciendo las mutaciones eventuales, de esta manera pueden prevenir enfermedades asociadas a las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Valdés *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2009).

A pesar de su eficacia y bajo costo, algunos compuestos de los antioxidantes sintéticos han mostrado actividad carcinogénica y otros efectos secundarios (Batista *et al.*, 2009). Es por eso que recientemente se ha incrementado el interés por los productos naturales como fuente de antioxidantes, al prevenir el daño celular por inactivación de los radicales libres (Garrido y Parada, 2008).

Las plantas y algas marinas están sometidas a una intensa radiación ultravioleta. La presencia de oxígeno y de luz UV favorecen el proceso de formación de especies reactivas de oxígeno, el cual es iniciado con la formación de radicales libres. Los efectos nocivos de los radicales libres producidos en estas condiciones, son neutralizados por antioxidantes naturales (Rivero y Betancort, 2006).

Las macroalgas han desarrollado diferentes habilidades y capacidades adaptativas debido al estrés al que están sometidas constantemente (Menendez *et al.*, 2010), como por ejemplo la actividad de carga y descarga de embarcaciones, el turismo, descarga de agua contaminada y otras actividades recreativas en el mar (INE, 2007). Estas actividades producen contaminación a gran escala que provoca sólidos en suspensión, básicamente materia orgánica, lo cual crea una turbidez elevada impidiendo el paso de la luz y con ello el crecimiento y sobrevivencia de las algas (Universidad Politécnica de Cataluña, 2006).

En los últimos años, las algas marinas han atraído la atención como fuentes naturales de antioxidantes con amplias perspectivas de aplicación en el tratamiento de diferentes patologías, conservación de alimentos y en la industria de cosméticos (Garrido y Parada, 2008). Algunos autores han comprobado que extractos de algas marinas poseen actividad atrapadora de radicales libres (Garrido y Parada, 2008). Se ha confirmado que dicha actividad es explicada por varios mecanismos de acción; entre éstos se encuentran la captación de dichas moléculas, la quelación de metales pro-oxidantes, los mecanismos de donación y aceptación de electrones y la capacidad de interrupción de la peroxidación lipídica (Batista *et al.*, 2009).

La actividad antioxidante de las algas marinas, puede ser explicada por la presencia de diferentes compuestos químicos. Estos organismos pudieran tener constituyentes apolares, como los derivados clorofílicos, terpenoides y carotenoides. Algunas especies de algas tienen aminoácidos tipo micosporinas, capaces de absorber cantidades apreciables de radiaciones UV y evitar así el daño peroxidativo. El contenido de vitaminas hidrosolubles como la vitamina C y liposolubles como la vitamina E, también pudieran contribuir a las propiedades antioxidantes de estos organismos (Batista *et al.*, 2009).

En los últimos años han sido descubiertos potentes antioxidantes a partir de algunas especies de algas por su alto contenido en polifenoles, que neutralizan la actividad oxidante (Valdés *et al.*, 2008).

La actividad antioxidante reportada en algunas especies de algas, no parece estar vinculada solamente a la presencia de polifenoles. Así, en algunas investigaciones se ha encontrado que ésta se manifiesta en fracciones que poseen una variada composición química, lo cual sugiere que este efecto se debe a la acción conjunta de varios metabolitos con un posible efecto aditivo y/o sinérgico. En tal sentido, se ha encontrado en algunas especies de algas marinas que dicha actividad está en función de los carotenoides y del ácido ascórbico (Morales *et al.*, 2010).

Antecedentes

Los compuestos obtenidos a partir de extractos algales han demostrado no sólo tener un uso cosmético sino también médico, diferentes autores, como Echavarría y colaboradores (2009) han revisado dicho potencial.

Algunas especies del género *Halimeda*, por ejemplo, han sido investigadas como fuentes de fitofármacos naturales, con resultados alentadores. De estas macroalgas se encontró que los extractos de *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux son efectivos tanto en la captación *in vitro* de radicales libres así como en las propiedades neuroprotectoras (Vidal *et al.*, 2009).

Pandithurai y Murugesan (2014) señalaron que la macroalga *Spatoglossum asperum* J. Agardh posee una capacidad antioxidante media (CA₅₀) más alta (85 µg/mL) en la captación del radical ABTS⁺ en comparación con antioxidantes conocidos como el BHT (butilhidroxitolueno) (32.5 µg/mL) y el ácido ascórbico (45.1 µg/mL) (valores bajos de CA₅₀ representan la concentración de un extracto o compuesto en el que se observa el 50% de su efecto máximo).

Movahedinia y Heydari (2014) demostraron que *Gracilaria corticata* (J.Agardh) J. Agardh posee mayor actividad antioxidante ante FRAP ($4422.4 \pm 588/8 \mu\text{mol trolox/g}$) en comparación con *Sargassum tenerrimum* J. Agardh ($4076.54 \pm 585.4 \mu\text{mol Trolox/g}$), además de que dicha actividad está relacionada con la cantidad de fenoles totales.

Dotulong y colaboradores (2013) observaron que *Caulerpa sertularioides* (S.G.Gmelin) Howe (Chlorophyta) posee una mayor actividad antioxidante ante el radical FRAP ($10.63 \pm 0.28 \text{ mg GAE/g extracto}$) en comparación con las macroalgas *Laurencia tranoi* Gazon-Fortes (Rhodophyta) ($6.90 \pm 0.21 \text{ mg GAE/g extracto}$) y *Padina australis* Hauk (Ochrophyta) ($7.91 \pm 0.29 \text{ mg GAE/g extracto}$).

Indu y Seenivasan (2013) revelaron que el extracto etanólico de *Sargassum wightii* Greville ex J. Agardh presenta mayor actividad antioxidante ante el radical ABTS⁺ ($76.08 \pm 0.71\%$) a diferencia del extracto acetónico, el cual tiene una actividad de $75.45 \pm 0.48\%$.

Mahendran y Saravanan (2013) determinaron que la macroalga *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J.Agardh posee un porcentaje de 73.32 ± 1.27 de actividad captadora del radical ABTS⁺.

Nascimento y colaboradores (2013) observaron que *Sargassum vulgare* C. Agardh presenta mayor actividad antioxidante contra el radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) a diferencia de *Dictyota cervicornis* Kützinger. Esto se debe a que *S. vulgare* C. presenta una CA₅₀ más baja (553 ppm) en comparación con *D. cervicornis* (4263 ppm).

Sanger y colaboradores (2013) señalaron que *Gracilaria salicornia* (C.Agardh) E. Y. Dawson posee una actividad antioxidante FRAP de $42.95 \pm 2.24 \text{ g GAE/100 g extracto}$, sin embargo, mencionan que es menor comparada con el BHT ($80.37 \pm 3.14 \text{ g/100 g extracto}$).

Paiva y colaboradores (2012) mostraron que los extractos hexánicos de las algas *Porphyra* sp C.Agardh, *Osmundea pinnatifida* (Hudson) Stackhouse, *Pterocladia capillacea* (S. Gmelin) Santelices y Hommersand, *Sphaerococcus coronopifolius* Stackhouse, *Gelidium microdon* Kützing, *Ulva compressa* L., *Chaetomorpha pachynema* Kützing y *Fucus spiralis* L. reflejan diferencias en la actividad de captación del radical DPPH. Dicha actividad se debe a su composición química, principalmente del tipo y la cantidad de los compuestos fenólicos que contienen.

Echavarría y colaboradores (2009) indicaron que los extractos en metanol de las macroalgas *Sargassum cymosum* C. Agardh (0.261 mg/mL) y *Sargassum* sp C. Agardh (0.361 mg/mL), al presentar valores de CA₅₀ similares entre sí, poseen una capacidad análoga de capturar el radical DPPH, superior a la de los extractos en metanol de las macroalgas, *Dictyota* sp. (Hudson) J.V. Lamouroux (0.645 mg/mL), *Laurencia* sp. J. V. Lamouroux (0.770 mg/mL) y *Caulerpa mexicana* Sonder ex Kützing (1.110 mg/mL), siendo esta última la única con una baja actividad.

Las investigaciones fitoquímicas con macroalgas en México son pocas, entre ellas se encuentran las de Zubia y colaboradores (2007), quienes demostraron que algunas especies de macroalgas de la Península de Yucatán como *Avrainvillea longicaulis* (Kützing) G.Murray y Boodle (Chlorophyta) (CA₅₀=1.44±0.01 mg/mL), *Lobophora variegata* (J.V.Lamouroux) Womersley ex E.C.Oliveira (Ochrophyta) (CA₅₀=0.32±0.01 mg/mL) y *Chondria baileyana* (Montagne) Harvey (Rhodophyta) (CA₅₀=2.84±0.07 mg/mL) presentan actividad alta en la captación del radical DPPH. Esto fue medido con un bajo índice de oxidación CA₅₀, equivalente con el de algunos antioxidantes comerciales como α-tocoferol, ácido ascórbico, butilhidroxianisol (BHA) y BHT.

Vargas (2011) reveló que *Padina conrescens* Thivy de la Bahía de la Paz, Baja California Sur, posee actividad captadora del radical DPPH de 0.29 mg/mL, la cual estaba por debajo de los valores obtenidos de los estándares de BHT (0.50 mg/mL) y ácido ascórbico (0.46 mg/mL).

Para los recursos ficológicos del SAV sólo se conoce el trabajo de Avila (2016), quién demostró que el extracto metanólico de la macroalga *Cymopolia barbata* L. posee una capacidad antioxidante media (CA_{50}) del radical DPPH de 106.78 ± 0.01 $\mu\text{g/mL}$.

Justificación

Actualmente existe un marcado interés en la búsqueda de antioxidantes naturales marinos. Las macroalgas se han vuelto ideales para encontrar compuestos con dicha actividad debido a su composición química, ya que sintetizan sustancias, como metabolitos secundarios, producto de las interacciones que existen con otros organismos marinos, así mismo, los daños ocasionados por la radiación UV a la que se encuentran sometidas es neutralizado por defensas antioxidantes que éstas producen. Debido a que los estudios de macroalgas como agentes antioxidantes son escasos en nuestro país y casi nulos en el Sistema Arrecifal Veracruzano, es necesario contribuir al conocimiento de estos organismos, puesto que algunos resultados de las investigaciones existentes hasta ahora han demostrado que existe un gran potencial para ser utilizadas como fuentes de antioxidantes.

Pregunta de investigación

¿Las macroalgas del Sistema Arrecifal Veracruzano, zona Norte, tendrán actividad antioxidante?

Hipótesis

La actividad antioxidante de las macroalgas está definida por su composición química, resultado de la genética específica, así como del estrés y radiación UV a la que se encuentran sometidas, dando lugar a la producción de sustancias

antioxidantes, por tanto se espera que las macroalgas del Sistema Arrecifal Veracruzano posean compuestos químicos, responsables de dicha actividad.

Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante de diferentes macroalgas del Sistema Arrecifal Veracruzano, Zona Norte.

Objetivos Particulares

- Obtener los extractos de las diferentes macroalgas colectadas del SAV.
- Determinar el rendimiento de las macroalgas colectadas en el SAV.
- Determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en los extractos de hexano, acetona y metanol de las macroalgas colectadas.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos algales del SAV.
- Determinar el contenido de fenoles totales en los extractos que presenten actividad antioxidante.
- Contribuir al conocimiento de los productos naturales marinos del SAV.

Zona de colecta

El Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) se ubica en la plataforma occidental del Golfo de México en la porción central del litoral veracruzano, sobre la plataforma continental y frente a las costas de los municipios de Veracruz, Boca del Río y Alvarado. Geográficamente está localizado entre los 19°00'00" y 19°16'00" Norte y los 95°45'00" y 96°12'00" Oeste. Está constituido por un conjunto de 23 arrecifes coralinos con una superficie de 52, 238 hectáreas. Es por mucho el área de arrecifes coralinos más extensa en el Golfo de México (CONANP, 2011) el cual es dividido de manera natural en grupo Norte y Sur gracias a la desembocadura del río Jamapa (Granados *et al.*, 2007). El primer grupo se localiza frente al puerto de Veracruz e incluye los arrecifes: Gallega, Galleguilla, Anegada de Adentro, La

Blanquilla, Isla Verde, Isla de Sacrificios, Pájaros, Hornos, Ingeniero y Punta Gorda. La segunda área se ubica frente a punta Antón Lizardo, a unos 20 kilómetros al Suroeste del Puerto de Veracruz, la constituyen los arrecifes: Giote, Polo, Blanca, Punta Coyol, Chopas, Enmedio, Cabezo, El Rizo, Santiaguillo, Anegada de Afuera, Anegadilla y Topatillo (CONANP, 2011) (Figura 1).

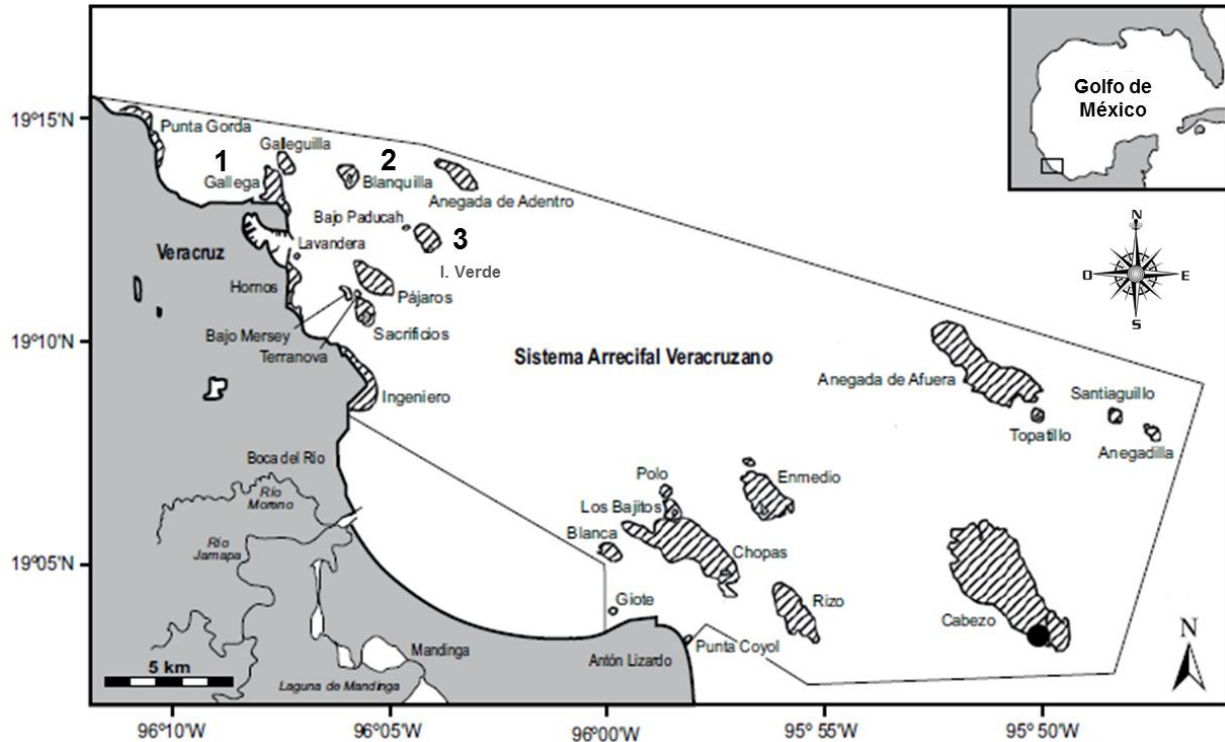


Figura 1. Sistema Arrecifal Veracruzano. Sitios de muestreo: 1. Gallega, 2. Blanquilla, 3. Isla Verde (Tomado de Robinson *et al.*, 2012).

Clima

El clima del parque es cálido-húmedo con lluvias en dos épocas bien marcadas: la de nortes, de menor precipitación, que se presenta de septiembre a abril, con frecuentes invasiones de masas de aire frío del Norte. La época de lluvias se presenta de mayo a agosto, con temperaturas elevadas, alta precipitación y vientos débiles del Este (INE, 2007).

Entre las actividades del área protegida y su zona de influencia destacan la actividad pesquera, la actividad de carga y descarga de embarcaciones de muy diversos tipos, sobre todo la generada por el Puerto de Veracruz, el turismo y otras actividades recreativas en el mar (INE, 2007), tales como el buceo libre y con equipo SCUBA (RAMSAR, 2004).

Materiales y métodos

Material biológico

La colecta del material algal se realizó los días 6 y 7 de Junio del 2014 en la zona norte del SAV, en temporada de lluvias. Los arrecifes de muestreo fueron Blanquilla, Gallega e Isla Verde (Figura 1).

La colecta del material algal se realizó manualmente a través de buceo libre, parte de los organismos se preservó en una solución con agua de mar y formol al 4% para su determinación taxonómica (Echavarría *et al.*, 2009) y posterior incorporación al herbario IZTA. Al material biológico fresco se le realizó la limpieza manual de organismos epífitos, sal y arena. Posteriormente se procedió a realizar un proceso de secado a temperatura ambiente hasta que éstas quedaron completamente secas.

Determinación taxonómica

La determinación del material biológico se realizó mediante cortes y tinciones histológicas, así mismo se utilizaron claves taxonómicas para su determinación hasta especie con ayuda de los textos de Aviles (1990), Brandão (1967), Dawes y Mathieson (2008), Littler y Litter (2000), Ortega *et al.* (2001) y Senties y Dreckmann (2002).

Obtención de extractos

El material algal seco se pesó y se maceró con solventes de diferente polaridad (hexano, acetona y metanol). Los extractos obtenidos se filtraron y se sometieron a destilación mediante presión reducida. Se guardaron a temperatura ambiente y en total ausencia de luz para evitar la degradación de los pigmentos y también para evitar la pérdida de sus propiedades químicas (López *et al.*, 2007).

Rendimiento

Los extractos de metanol, acetona y hexano se dejaron a temperatura ambiente para eliminar residuos de solvente y obtener los sólidos totales. El rendimiento de cada muestra algal se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Carrillo *et al.*, 2011):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \text{Peso del extracto} * 100 / \text{peso de la macroalga seca}$$

Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios

a) Reacción de Dragendorff y Mayer (Alcaloides)

Las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos) de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno, etc, formando precipitados. En la práctica, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como bicloruro de mercurio y yoduro de potasio (reactivo de Mayer), los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol. También se usa el tetrayodo bismuto de potasio (reactivo de Dragendorff), donde la presencia de alcaloides se detecta por formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona este reactivo a una solución ácida de alcaloides (Muñoz, 2015).

b) Reacción con cloruro férrico (Fenoles)

La mayor parte, pero no todos los fenoles, dan complejos fuertemente coloreados con las sales férricas. La coloración con el cloruro férrico es un ensayo de la aplicación en el reconocimiento de fenoles. Ocasionalmente, el color dado por un fenol con el FeCl_3 puede servir de ayuda para la determinación de la estructura. La pirocatequina y otros *o*-hidroxi derivados del benceno dan coloraciones verdes (Muñoz, 2015).

c) Reacción de Molisch (Glicósidos)

Este ensayo permite detectar la presencia de glucósidos en una muestra; se basa en la acción hidrolizante y deshidratante que ejerce el ácido sulfúrico sobre estos compuestos. Los ácidos concentrados originan una deshidratación de los azúcares para rendir furfurales, que son derivados aldehícos del furano. Los furfurales se condensan con los fenoles para dar productos coloreados característicos, empleados frecuentemente en el análisis colorimétrico (Muñoz, 2015).

d) Cromatografía en capa fina revelada con vainillina (Terpenos)

La cromatografía en capa fina se utiliza para detectar las manchas de terpenos sobre la placa del cromatograma, ya que si la sustancia es incolora no se verá a simple vista. Otra forma de detectar e identificar manchas es mediante el uso de reveladores, o sustancias pulverizadas sobre la placa cromatográfica, de esta manera se origina una coloración específica sobre alguna de las manchas, debido a que el revelador es una sustancia química que reacciona específicamente con algunos componentes, originando un color visible característico. El reactivo de Gibbs, el ácido sulfúrico y la vainillina son algunas sustancias que se pueden emplear como reveladores de monoterpenos (Ortuño, 2006).

e) Prueba de la espuma (Saponinas)

Las saponinas son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico; esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les

permite actuar como tensioactivos. La prueba de formación de espuma consiste en disolver el extracto en agua, agitar vigorosamente la solución acuosa en un tubo de ensayo y observar la espuma formada. Ésta debe permanecer por lo menos 1 minuto para poder establecer la presencia de saponinas (Carvajal *et al.*, 2009)

Ensayo de la actividad antioxidante

a) Método de DPPH

El 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) es un radical estable que presenta una coloración azul violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida en espectrofotómetro a 493 nm (Ramos *et al.*, 2008). En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en la reducción del DPPH debida a la donación de electrones de la especie antioxidante (Rivero y Betancort, 2006) (Anexo 1).

Para determinar la capacidad antioxidante media (CA_{50}) de los extractos metanólicos y acetónicos de las algas se obtiene el porcentaje de decoloración de DPPH de cada una de las concentraciones (31.2-500 ppm) (Avila, 2016). El porcentaje de reducción es calculado mediante la siguiente fórmula (Argüelles, 2011):

$$\% \text{ reducción} = \frac{\text{Absorbancia DPPH} - \text{Absorbancia muestra problema} + \text{DPPH}}{\text{Absorbancia DPPH}} * 100$$

El ensayo del DPPH se realizó con 8 repeticiones por extracto algal.

b) Método de ABTS

El compuesto 2,2'-azino-bis (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), genera el cromóforo $ABTS^+$ verde azul a través de la reacción

entre ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). La reacción se mide a 734 nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^+$ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando ácido gálico como estándar bajo las mismas condiciones (Tovar del Río, 2013). El ensayo se realizó por triplicado en los extractos algales (Anexo 1).

c) Método de FRAP

El ensayo de FRAP (Ferring Reducing Ability of Plasma) se basa en la reducción del catión férrico a ferroso, se forma un complejo en presencia de un enlace que estabiliza el Fe (II) tal como la tripiridil-triazina (TPTZ). Este complejo presenta una coloración azul y se mide a 593 nm. Los valores de FRAP se obtienen midiendo los cambios de absorbancia a la longitud de onda dada después de ser añadida la muestra y dichos valores son comparados con una curva estándar de ácido gálico (Usquiano, 2013). Cada ensayo se realizó por triplicado en cada uno de los extractos algales (Anexo 1).

Determinación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu)

Para el ensayo de fenoles totales se utiliza como reactivo una mezcla de ácido fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Se realiza una curva patrón con ácido gálico y se interpola la absorbancia de la muestra en la curva. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 725 nm. Los resultados se expresan en μg de ácido gálico por mg de muestra (Usquiano, 2013). El ensayo de cada extracto algal se realizó por triplicado en esta prueba (Anexo 2).

Resultados y discusión

Determinación del material biológico

La colecta se realizó los días 6 y 7 de Junio del año 2014, durante la temporada de lluvias. Ésta se realizó únicamente en aquellos organismos que presentaron un tamaño considerable para la obtención de los extractos. 14 algas fueron colectadas en los 3 arrecifes, de las cuales 6 pertenecen al arrecife Gallega, 4 al arrecife Blanquilla y 4 a Isla Verde.

En el arrecife Gallega, de las 6 especies colectadas, 3 ejemplares pertenecen a la división Chlorophyta y 3 a Rhodophyta. Para el arrecife de Blanquilla de las 4 muestras colectadas, 1 especie pertenece a la división Chlorophyta y 3 a Rhodophyta. Finalmente en Isla Verde se colectaron 4 especies de las cuales una especie pertenece a la división Chlorophyta, 1 a Ochrophyta y 2 a Rhodophyta (Figura 2).

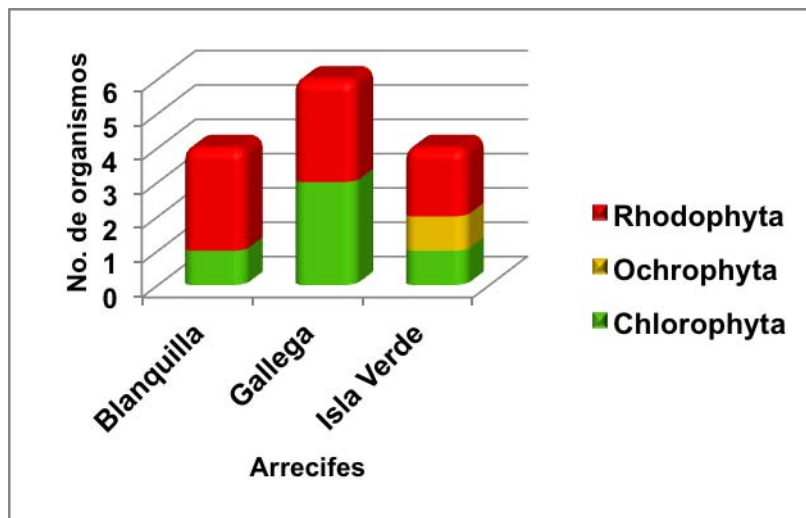


Figura 2. Número de especies colectadas por arrecife.

Del total de las 14 macroalgas colectadas se identificaron 11 especies diferentes (Cuadro 1). *Caulerpa racemosa* (Chlorophyta) y *Galaxaura comans* (Rhodophyta)

se identificaron en dos arrecifes diferentes, los cuales fueron Blanquilla e Isla Verde.

Cuadro 1. Macroalgas identificadas pertenecientes al SAV, zona norte.

Arrecife	Coordenadas	División	Especie	IZTA Herbario
Gallega	19° 13'.621 N 96° 07'.82 O	Rhodophyta	<i>Ceramium nitens</i> (C.Agardh) J. Agardh	1869
			<i>Gracilaria bursa-pastoris</i> (S. Gmelin) Silva	1874
		Chlorophyta	<i>Caulerpa sertularioides</i> (S. G. Gmelin) Howe	1873
			<i>Halimeda opuntia</i> (L) Lamouroux	1872
			<i>Ulva lactuca</i> L.	1875
Blanquilla	19° 13'.602 N 96° 05'.912 O	Rhodophyta	<i>Galaxaura comans</i> Kjellman	1876
			<i>Laurencia microcladia</i> Kützing	1884
		Chlorophyta	<i>Wrangelia argus</i> (Montagne) Montagne	1885
			<i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskål) J. Agardh	1863
Isla Verde	19° 12'.132 N 96° 14'.162 O	Rhodophyta	<i>Galaxaura comans</i> Kjellman	1876
			<i>Tricleocarpa cylindrica</i> (J. Ellis y Solander) Huisman y Borowitzka	1860
		Chlorophyta	<i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskål) J. Agardh	1863
		Ochrophyta	<i>Sargassum natans</i> (L) Gaillon	1867

Como se puede observar en el cuadro 1, para el arrecife de Gallega, en la división Rhodophyta se determinaron las especies *G. bursa-pastoris* y *C. nitens*. Dentro de la división Chlorophyta se identificaron las especies *C. sertularioides*, *H. opuntia* y *U. lactuca*.

Romero (2003) en su trabajo "Flora bentónica del arrecife Gallega: Un análisis de similitud con localidades insulares y costeras del Estado de Veracruz", reporta en el arrecife de Gallega a *G. bursa-pastoris*, pero no a *C. nitens* (Rhodophyta), mientras que para la división Chlorophyta reporta a *C. sertularioides* y a *U. lactuca*, pero no a *H. opuntia*. Sin embargo, Robinson y colaboradores (2012) sí hacen mención de las especies *H. opuntia* y *C. sertularioides* en dicho arrecife. Por su parte, Ortega y colaboradores (2001), no reportan para este arrecife a ninguna de las especies antes mencionadas por lo que se confirma el avance del conocimiento de la ficoflora para las costas de Veracruz.

En el arrecife de Blanquilla, de la división Rhodophyta se identificaron las macroalgas *G. comans*, *L. microcladia* y *W. argus*; dentro de Chlorophyta se identificó la especie *C. racemosa*. En el trabajo reportado por Ortega y colaboradores (2001) reportan a *C. racemosa* en dicho arrecife. Así mismo hacen mención de las especies de la división Rhodophyta determinadas en este trabajo. De manera similar, Robinson y colaboradores (2012) mencionan que *C. racemosa* está presente en todo el Golfo de México.

Dentro del arrecife de Isla Verde, para la división Rhodophyta se identificaron las especies, *G. comans* y *T. cylindrica*. Dentro de las Chlorophyta a *C. racemosa*. En la división Ochrophyta se identificó la especie *S. natans*. Mateo-Cid y colaboradores (1996) identificaron para este arrecife a especies del género *Caulerpa* dentro de las algas verdes. Sin embargo, no se hace mención de la especie *G. comans* ni de especies del género *Sargassum*. Esta información es similar a la de Ortega y colaboradores (2001) y Littler y Littler (2000), quienes tampoco hacen mención de la especie *G. comans* ni de alguna especie del género *Sargassum* en el arrecife pero la reportan para otros arrecifes del Estado de Veracruz.

La biodiversidad costera está amenazada por diversas causas incluyendo el impacto humano y los ciclones. Los efectos de estos últimos repercuten a mayor profundidad, incluyendo resuspensión de sedimentos y arrastre de fragmentos u organismos completos que no pueden escapar del enérgico movimiento del agua. El impacto de un ciclón puede transformar en un día la distribución y abundancia de los organismos y generar patrones muy distintos a los previos. Por otro lado, el humano ha modificado las poblaciones de los consumidores naturales de macroalgas, aportado nutrimentos por el drenaje, introduciendo otros contaminantes y ocasionando cambios globales en la temperatura, lo cual es crucial para el desarrollo de ciertas especies de macroalgas (Salazar-Vallejo, 2002). Esto podría explicar porque en algunos estudios no están presentes especies que habían sido descritas anteriormente en un mismo arrecife.

Así mismo, los factores ambientales juegan un papel importante en los cambios espaciales y temporales de las poblaciones de macroalgas marinas en los litorales costeros. Sin embargo, no se pueden descartar los aspectos ecológicos como la competencia y la herbivoría que afectan la distribución y producción espacio-temporal de las especies (Guilarte *et al.*, 2013). Esto también podría explicar porque algunos autores presentan datos distintos de las especies existentes en un mismo arrecife, ya que a pesar de ser reportados en diferente año, los muestreos pudieron haber sido en una época del año cuando las condiciones ambientales eran totalmente distintas.

En la figura 3 se puede observar que del total de especies determinadas, el 57% pertenece a la división Rhodophyta seguido de la división Chlorophyta (36%) y sólo un 7% a Ochrophyta. Según Galicia y Morales (2007) de 284 especies de macroalgas registradas para el SAV, el 55.3% está representado por algas rojas (Rhodophyta), el 30.6% por algas verdes (Chlorophyta) y el 14.1% por algas pardas (Ochrophyta), lo cual es similar a la tendencia de los resultados obtenidos en este estudio.

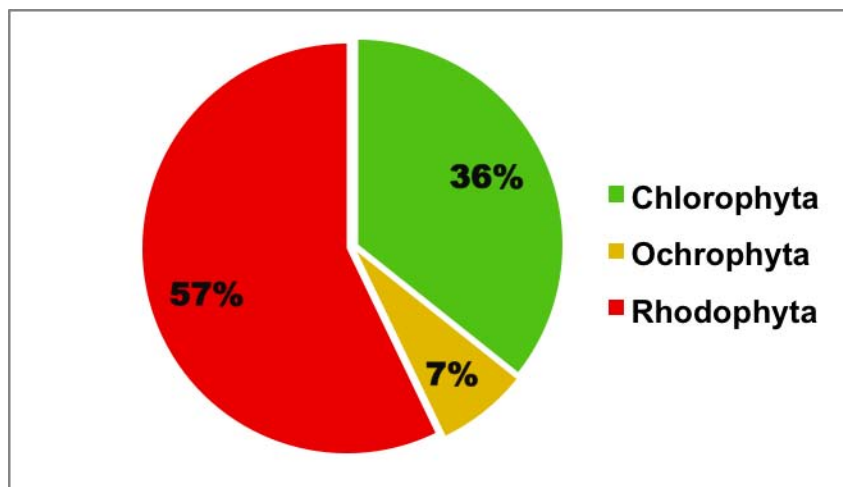


Figura 3. Porcentaje de macroalgas por división colectadas en los arrecifes: Blanquilla, Gallega e Isla Verde.

Por otro lado, en el Estado de Veracruz se tienen registradas 322 especies de macroalgas, de las cuales 177 pertenecen a la división de las algas rojas, 51 a la división de las pardas y 94 a la de las algas verdes (Pedroché y Senties, 2003). Este resultado también demuestra que las Rhodophyta son las más abundantes en el SAV seguido por las Chlorophyta y finalmente Ochrophyta. Esto puede ser explicado debido a que la mayor diversidad de algas rojas está claramente ligada al tipo de sustrato calcáreo/coralino y a la disponibilidad de sustrato duro que favorece el crecimiento de las especies de esta división relacionado con su forma de fijación (Ortegón *et al.*, 2010) aunado a otros factores como la temperatura (Avila, 2016). Además, el mayor porcentaje de colecta de las algas Chlorophyta está ligado a suelos de arena fina y limo (Ortegón *et al.*, 2010).

Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos obtenidos de cada especie de macroalga se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Rendimiento de los extractos (%).

Arrecife	Especie	Hexano	Acetona	Metanol
Gallega	<i>C. sertularioides</i>	1.66	0.95	0.56
	<i>C. nitens</i>	0.18	0.06	1.02
	<i>G. bursa-pastoris</i>	1.40	0.40	1.90
	<i>G. bursa-pastoris</i>	0.10	0.21	4.84
	<i>H. opuntia</i>	/	/	/
	<i>U. lactuca</i>	0.02	0.04	0.89
Blanquilla	<i>C. racemosa</i>	0.28	1.03	1.50
	<i>G. comans</i>	0.56	0.09	0.68
	<i>L. microcladia</i>	/	/	/
	<i>W. argus</i>	/	/	/
Isla verde	<i>C. racemosa</i>	0.57	2.10	5.12
	<i>G. comans</i>	0.35	0.09	0.25
	<i>S. natans</i>	3.01	0.10	0.65
	<i>T. cylindica</i>	0.20	0.30	6.49

*/: No se determinó el rendimiento de los extractos

En el cuadro 2 se puede observar que *S. natans* (Isla Verde) es la especie que presentó el mayor rendimiento en hexano (3.01%), lo cual sugiere que la mayoría de compuestos extraídos con dicho solvente en esta macroalga son de baja polaridad, ya que el hexano es un solvente apolar y la polaridad se encuentra muy relacionada con la solubilidad, es por ello que un compuesto que forma enlaces de hidrógeno con el agua, por tanto, tiende a ser más soluble en ella que uno que no lo forma (Santizo, 2004).

Por otra parte, el extracto acetónico de *C. racemosa* (Isla Verde) presentó el mayor rendimiento en acetona (2.10%), esto significa que, a diferencia de *S. natans*, *C. racemosa* posee compuestos químicos que tienen una afinidad medianamente polar como algunos flavonoides, ya que su solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los flavonoides poco hidroxilados son solubles en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona (Santizo, 2004).

T. cylindrica (Isla Verde) es la que presentó el mayor rendimiento en el extracto de metanol (6.49%), lo cual sugiere que esta especie presenta una gran cantidad de compuestos polares en comparación con las demás macroalgas. Mesa-Vanegas y colaboradores (2010), así como Echavarría y colaboradores (2009) demostraron que los extractos medianamente polares y polares, además de presentar un alto contenido fenólico, poseen la mayor actividad captadora del radical DPPH.

Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios

Extractos metanólicos

La determinación cualitativa de los principales grupos de MS de los extractos metanólicos se presenta en el cuadro 3. Se puede observar que la mayoría de los extractos de las macroalgas contienen saponinas y terpenos; mientras que todos los ensayos en los extractos algales resultaron negativos para las pruebas de alcaloides, fenoles y glicósidos.

Cuadro 3. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios en los extractos metanólicos de las algas colectadas.

Arrecife	Especie	Alcaloides		Fenoles	Glicósidos	Terpenos	Saponinas
		Drangendorff	Mayer				
Gallega	<i>C. sertularioides</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>C. nitens</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>G. bursa-pastoris</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>G. bursa-pastoris</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>H. opuntia</i>
	<i>U. lactuca</i>	-	-	-	-	+	+
Blanquilla	<i>C. racemosa</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>G. comans</i>	-	-	-	-	+	-
	<i>C. racemosa</i>	-	-	-	-	+	+
Isla Verde	<i>G. comans</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>S. natans</i>
	<i>T. cylindrica</i>	-	-	-	-	+	-

*...: No determinado -: Negativo +: Positivo

Extractos acetónicos

En el caso de los extractos acetónicos (Cuadro 4) en todos los ensayos se encontró la presencia de terpenos y saponinas a excepción de *U. lactuca*. Estos resultados concuerdan con Mascheck y Baker (2008), quienes mencionan que más de la mitad de los metabolitos secundarios reportados en algas son isoprenoides, terpenos, esteroides, carotenoides, quinonas preniladas e hidroquinonas. Así mismo, Hay y Fenical (1988) mencionan que algunas familias de algas rojas y verdes tienden a ser particularmente ricas en compuestos biológicamente activos que varían en estructura, de simples cetonas alifáticas y fenoles bromados a más complejos monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos.

Cuadro 4. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios en los extractos acetónicos de las algas colectadas.

Arrecife	Especie	Alcaloides		Fenoles	Glicósidos	Terpenos	Saponinas
		Drangendorff	Mayer				
Gallega	<i>C. sertularioides</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>C. nitens</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>G. bursa-pastoris</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>G. bursa-pastoris</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>H. opuntia</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>U. lactuca</i>	-	-	-	-	+	-
Blanquilla	<i>C. racemosa</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>G. comans</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>C. racemosa</i>	-	-	-	-	+	+
Isla Verde	<i>G. comans</i>	-	-	-	-	+	+
	<i>S. natans</i>
	<i>T. cylindrica</i>	-	-	-	-	+	+

*...: No determinado -: Negativo +: Positivo

Algunos arrecifes del SAV reciben grandes cantidades de contaminantes, minerales derivados de descargas de aguas urbanas, complejos hoteleros, etc., así como nutrientes orgánicos (Granados *et al.*, 2007). El aporte de nutrientes mediante diferentes vías, es la causa principal de la eutrofización. El aumento del estado trófico de un sistema puede ser el resultado de aportes externos o internos. La carga externa se genera a partir de materiales arrastrados por la acción de la precipitación y/o erosión; la interna es el sedimento propio del sistema, el cual puede actuar como trampa o fuente de nutrientes, de acuerdo a las condiciones de óxido-reducción. El aumento de la carga de nutrientes determina una mayor biomasa de productores primarios (fitoplancton y macroalgas) y secundarios (peces y anfípodos) (Mazzeo *et al.*, 2002). Un probable aumento en las poblaciones de productores secundarios en el SAV podría explicar la producción de metabolitos secundarios utilizados para defensa de éstas.

Jormalainen y Honkanen (2008) mencionan que los alcoholes diterpénicos de las macroalgas reducen el crecimiento de los peces herbívoros y la disminución de la supervivencia, el crecimiento y la reproducción de varias especies de anfípodos.

Por otra parte, Ocampo (1994), menciona que las saponinas son astringentes, antifúngicas y antibacteriales, además de poseer un sabor amargo y ser extremadamente tóxicas para animales de sangre fría, como peces y anfibios, tienen la propiedad de romper la tensión superficial y producir hemólisis sobre los eritrocitos (Valle y Lucas, 2000).

Acorde a lo anterior y tras realizarse la colecta de macroalgas en época de lluvias, se puede explicar una producción baja de MS, como fenoles (responsables de la protección contra los rayos UV), ya que las precipitaciones ocasionan suspensión de materia orgánica y sedimentos y con ello la incidencia de luz UV es menor para estos organismos. Sin embargo produjeron otros MS, como terpenos y saponinas, para su defensa contra los depredadores.

Extractos hexánicos

Los resultados de las pruebas cualitativas de MS en los extractos hexánicos se muestran en el cuadro 5. Se puede observar que estos extractos, además de presentar terpenos y saponinas, a diferencia de los extractos acetónicos y metanólicos, son los únicos en los que se encontraron alcaloides. Esto puede deberse a que la solubilidad de los alcaloides varía en función del pH, es decir, según se encuentren en estado de base o de sal. En forma de base, son solubles en solventes orgánicos no polares como benceno, éter etílico, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo. En forma de sales, son solubles en solventes polares, agua, soluciones ácidas e hidroalcohólicas (Arango, 2008).

La mayoría de alcaloides resultaron positivos en la prueba de Dragendorff, esto puede deberse a que las técnicas de reconocimiento de alcaloides están basadas en la capacidad que tienen éstos de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (de Mayer) y yoduro de bismuto (Dragendorff) (Coy *et al.*, 2014).

Cuadro 5. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios en los extractos hexánicos de las algas colectadas.

Arrecife	Especie	Alcaloides		Fenoles	Glicósidos	Terpenos	Saponinas
		Drangendorff	Mayer				
Gallega	<i>C. sertularioides</i>	+	+	-	-	+	+
	<i>C. nitens</i>	-
	<i>G. bursa-pastoris</i>
	<i>G. bursa-pastoris</i>	+	-	-	-	+	+
	<i>H. opuntia</i>
	<i>U. lactuca</i>	-
Blanquilla	<i>C. racemosa</i>	+	+	-	-	+	+
	<i>G. comans</i>
	<i>C. racemosa</i>	+	-	-	-	+	+
Isla Verde	<i>G. comans</i>	+	-	-	-	+	+
	<i>S. natans</i>
	<i>T. cylindrica</i>

*...: No determinado -: Negativo +: Positivo

Los resultados anteriores son similares a los de Echavarría y colaboradores (2009), quienes mencionan que en el caso particular de las algas rojas, además de terpenoides, contienen alcaloides de diferentes tipos, los cuales incluyen núcleos de indol y naftiridina. Así mismo, Ding-Quan y colaboradores (2013) en un estudio de *C. racemosa* demostraron que esta macroalga posee alcaloides de tipo bisindol tales como racemosin A y B.

Lo anterior también concuerda con Cemal y colaboradores (2010) quienes reportan que las macroalgas poseen alcaloides del grupo feniletilamina, tales como feniletilamina (PEA) y tiramina (TYR) y alcaloides indólicos como caulerpina (presentes también en especies de los géneros *Laurencia*, *Halimeda*, *Hypnea* y *Chondria*), caulersina, fragilamida, martensinos A y B, martefragina A, denticinos A, B y C, amazolon y alcaloides indólicos halogenados como bromoindoles y bromobisindoles.

Algunos estudios en algas marinas han demostrado que muchos compuestos tienden a ser más abundantes en organismos jóvenes que en los que están en crecimiento, así como también pueden estar alterados por la salinidad y

exposición a la marea. Otros estudios en determinados géneros de macroalgas, en cuanto a la variación de MS, demuestran que su concentración es mayor en los meses de invierno que en verano, sin embargo, aunque la herbivoría suele darse en los meses más cálidos, la producción de MS no sólo está ligada a ésta, ya que existen otros factores (protección contra la luz UV, contaminantes) (Hay y Fenical, 1988). Esto coincide con lo propuesto por Zubia y colaboradores (2007), quienes reportaron que la actividad antioxidante de las algas puede estar sujeta a factores extrínsecos (herbivoría, irradiación, profundidad, salinidad, nutrientes, etc.) e intrínsecos (tipo, edad y estado reproductivo).

Se ha señalado que los huracanes o algún otro tipo de daño afectan la cobertura de la vegetación acuática, principalmente la de las algas, ocasionando su disminución o desaparición, aunque se ha visto que en dos meses pueden recuperar el 90% de su cobertura original, siendo las algas verdes (Chlorophyta) las primeras en restablecerse (Fuentes *et al.*, 2014).

Las algas del género *Caulerpa* son fácilmente arrancadas del fondo por las redes de los pescadores o las anclas de embarcaciones de recreo, motivo por el cual, el crecimiento de las especies de este género se vuelve muy activo (Ballesteros, 2008). Sin embargo, los factores bióticos como la herbivoría, puede jugar un papel importante en el crecimiento explosivo de algunas especies del género antes mencionado, es por eso que estas algas han desarrollado diferentes adaptaciones para contrarrestarla (Fuentes *et al.*, 2014). Una de estas adaptaciones es la producción de MS repulsivos y tóxicos para los consumidores potenciales. Entre éstos se encuentran polifenoles, terpenos, bases aminoácidas y compuestos halogenados que se caracterizan por afectar a la palatabilidad del alga (Centeno, 2008).

Dentro de los MS producidos por las *Caulerpales* se presentan compuestos como caulerpina, caulerpicina y caulerpinenos, los cuales son considerados como alcaloides tóxicos (Duarte y Acero, 1988) que actúan como inhibidores tanto del herbivorismo como del epifitismo (Centeno, 2008). Lo anterior podría explicar

porque dos especies del género *Caulerpa* presentaron alcaloides en ambos ensayos (Dragendorff y Mayer), puesto que es posible que requieran de éstos para defenderse de sus depredadores que inhiben su crecimiento y con ello recobrar su cobertura original.

Prueba de saponinas (hemólisis)

Los resultados de las pruebas de hemólisis se muestran en el cuadro 6. Se puede observar que la mayoría de los extractos acetónicos y metanólicos poseen saponinas, ya que se visualizó un halo, resultado de la hemólisis, en algunas especies. El extracto metanólico de *C. racemosa* (Blanquilla) presentó el halo más grande (15.0 ± 0.0 mm) y una coloración transparente, seguido del extracto metanólico *C. sertularioides* (Gallega), el cual presentó un halo de 9.3 ± 0.6 mm y una coloración verde. De acuerdo a Silva y colaboradores (2006) se distinguen dos tipos de hemólisis dependiendo de la coloración del halo (alfa y beta hemólisis). La alfa hemólisis se observa por una estrecha zona verde debido a la conversión de hemoglobina a metahemoglobina, conservándose los glóbulos rojos intactos. En la beta hemólisis se observa una zona clara e incolora debido a la destrucción de los glóbulos rojo.

Cuadro 6. Prueba de saponinas mediante hemólisis

Arrecife	Especie	Hexano		Acetona		Metanol	
		Tamaño	Color	Tamaño	Color	Tamaño	Color
Gallega	<i>C. sertularioides</i>	2.7±4.6	V	7.0±0.0	V	9.3±0.6	V
	<i>C. nitens</i>	NA		ND		4.0±3.5	V
	<i>G. bursa-pastoris</i>	6.3±0.6	V	NA		NA	
	<i>G. bursa-pastoris</i>	ND		NA		NA	
Blanquilla	<i>U. lactuca</i>	NA		6.3±0.6	T	4.0±3.5	V
	<i>C. racemosa</i>	ND		7.3±0.6	V	15.0±0.0	T
	<i>G. comans</i>	ND		ND		7.3±0.6	T
Isla Verde	<i>C. racemosa</i>	NA		7.7±0.6	V	6.0±0.0	T
	<i>G. comans</i>	NA		7.0±0.0	V	8.3±0.6	V
	<i>T. cylindrica</i>	ND		5.3±4.6	T	8.3±0.6	T

* NA: No hay actividad, ND: No determinado, V: Verde, T: Transparente. Halos en mm±SD.

La metahemoglobina se forma de la oxidación del hierro de la hemoglobina con cambio de estado ferroso (Fe^{2+}) a su forma férrica (Fe^{3+}) (De Rubens-Figueroa *et al.*, 2007). Dicha oxidación del hierro ocurre de manera constante y puede ser provocada por diversos factores (drogas oxidantes o toxinas). Entre estos factores se encuentran fármacos como anestésicos locales, antimicrobianos, sulfonamidas, nitritos y nitratos, aminofenoles, azul de metileno, cloruro de potasio, bismuto, bromatos, cloratos, así como productos químicos industriales (nitrobenceno, nitroetano, herbicidas (Román *et al.*, 2011).

Gribble (2005) menciona que en los organismos marinos, como las macroalgas, existen sustancias que contienen flúor, cloro, yodo y bromo, presentes en el agua de mar y que éstos son incorporados por las macroalgas pudiendo sintetizar compuestos con estos átomos. Así mismo menciona que se sabe que los organismos marinos los producen porque desarrollan múltiples funciones ya que sirven como repelentes e inhibidores del apetito, agentes antibacteriales y anticrustantes, feromonas y hormonas. Por otra parte Guzmán y colaboradores

(2005) señalan que algunos de estos compuestos son utilizados en campos de cultivo como herbicidas y que la incorporación de dichos 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 en estas cuencas llegan a la costa, en su mayor parte sin tratamiento alguno. Esto podría explicar porque las macroalgas contienen sustancias que son capaces de formar metahemoglobina en la sangre visualizada en los ensayos como alfa hemólisis.

Se ha comprobado que las saponinas tienen tanto la capacidad de aumentar la permeabilidad de las paredes celulares, como de destruir los hematíes por hemólisis, ya que en contacto con la sangre, éstas interaccionan con el colesterol de la membrana de los eritrocitos (López, 2001). Sin embargo, aunque dicha actividad hemolítica está determinada por saponinas, se ha demostrado que algunas de éstas son relativamente inocuas mostrando no tener dicha actividad (García, 2011), esto podría explicar porque algunos extractos no presentaron actividad hemolítica mientras que en la prueba de la espuma dieron positivo.

Determinación de la actividad antioxidante

Método de DPPH

Los datos cuantitativos de la actividad antioxidante (método de DPPH) de los extractos acetónicos y metanólicos de las macroalgas, así como los resultados cualitativos de los extractos hexánicos, se presentan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Actividad antioxidante ante el radical DPPH de los extractos metanólicos, acetónicos y hexánicos de las macroalgas.

Arrecife	División	Especie	% reducción (500 ppm)		Cualitativo
			Metanol	Acetona	
Gallega	Rhodophyta	<i>C. nitens</i>	0	0	+
		<i>U. lactuca</i>	0	Negativo	+
		<i>C. sertularioides</i>	23.73	1.63	+
	Chlorophyta	<i>H. opuntia</i>	Negativo	0	ND
		<i>G. bursa-pastoris</i>	15.70	Negativo	+
Blanquilla	Rhodophyta	<i>G. comans</i>	0	0	+
		<i>L. microcladia</i>	ND	ND	ND
		<i>W. argus</i>	ND	ND	ND
	Chlorophyta	<i>C. racemosa</i>	38.21	0	+
	Rhodophyta	<i>G. comans</i>	0	0	+
Isla Verde	Rhodophyta	<i>T. cylindrica</i>	36.42	0	ND
	Chlorophyta	<i>C. racemosa</i>	0	0.9	+
	Ochrophyta	<i>S. natans</i>	Negativo	Negativo	Negativo

*ND No determinado +: Positivo

Extractos metanólicos

Se puede observar que el extracto metanólico de *C. racemosa*, del arrecife Blanquilla es el que obtuvo el mayor porcentaje de reducción del radical DPPH (38.21%) seguido de *T. cylindrica* en el arrecife Isla Verde (36.42%) a una concentración de 500 ppm. Según Chaminda y colaboradores (2014) el extracto metanólico de *C. racemosa* mostró una actividad significativa media contra el radical DPPH de 34.34%, la cual es menor a la actividad reportada en este trabajo para la misma especie.

El ensayo de DPPH no es específico a un antioxidante en particular. La reducción de estos radicales libres por parte de los extractos puede deberse a la presencia de otros antioxidantes solubles en agua tales como el ácido fólico, tiamina y ácido ascórbico, que contienen la mayoría de las algas marinas (Vargas, 2011). La variación en la actividad antioxidante de *C. racemosa* reportada en diferentes estudios puede deberse a la influencia de varios parámetros, tales como región

geográfica en que fueron colectadas, las partes del talo que se utilizaron, la herbivoría, así como el estado de reproducción de la macroalga (Freile-Pelegrín y Morales, 2004), además de que es conocido que la producción de MS puede variar entre especies al grado de ser especie-específico (Scogings *et al.*, 2015).

Extractos acetónicos

El extracto acetónico de *C. sertularioides* (Gallega) es el que presentó el mayor porcentaje de reducción del radical DPPH (1.63%) en comparación con los demás extractos acetónicos, seguido de *C. racemosa*, el cual presentó una actividad de 0.9%.

Extractos hexánicos

En los ensayos cualitativos de la actividad antioxidantes de los extractos hexánicos (figura 4) puede observarse que la mayoría de éstos presentaron resultados positivos en la actividad de captación del radical DPPH. Todas las macroalgas de los arrecifes Blanquilla y Gallega presentaron actividad antioxidante la cual es visualizada por la decoloración de violeta a amarillo en la placa. Así mismo, se puede observar que la mayoría de las macroalgas del arrecife Isla Verde mostraron dicha actividad a excepción de *S. natans*, la cual no presentó este cambio de coloración.

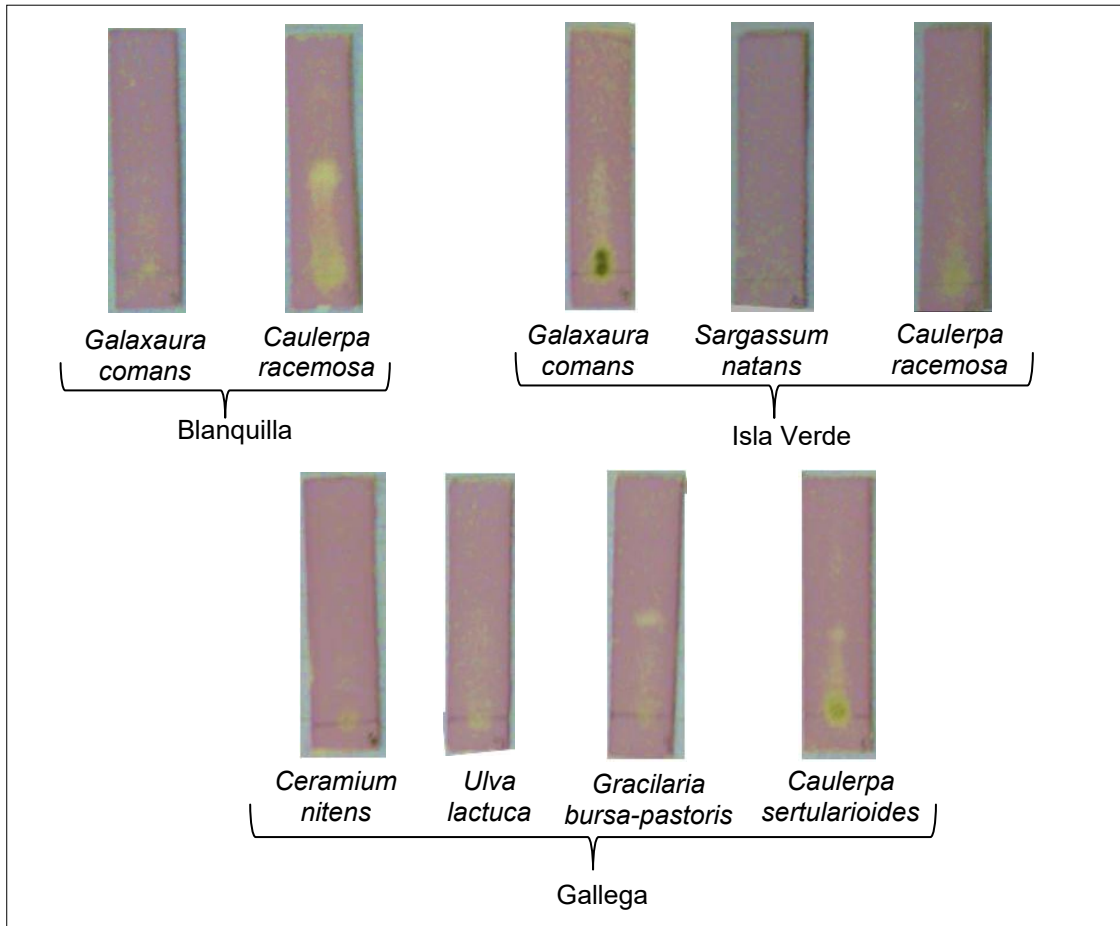


Figura 4. Prueba cualitativa de la actividad antioxidante (DPPH) (extractos hexánicos algales)

La actividad antioxidante cualitativa de los extractos hexánicos podría atribuirse a diferentes compuestos liposolubles presentes en las algas marinas y que tienen probada actividad antioxidante (Batista *et al.*, 2009). Entre estos compuestos se encuentran clorofilas, especialmente la *a*, carotenoides (Muñoz, 2010) y algunos fosfolípidos (Batista *et al.*, 2009). Cabe señalar que estos últimos participan en la disipación de la energía en exceso y en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que se forman principalmente en la fotosíntesis (Manrique, 2003). Así mismo, Batista y colaboradores (2009) reportan que la clorofila *a* tiene la capacidad de actuar sinérgicamente con el tocoferol y aumentar su capacidad antioxidante.

Ortiz (2011) menciona que la vitamina E (α -tocoferol) contribuye a la estabilidad de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las macroalgas previniendo la formación de radicales libres (RL). Además la actividad antioxidante en estos extractos también podría estar relacionada a la presencia de alcaloides, ya que Cemal y colaboradores (2010) mencionan que los alcaloides indólicos conocidos como fragilamida y denticinos A, B y C poseen actividad antioxidante y anti foto-oxidativa.

Los resultados de la actividad antioxidante de los extractos hexánicos reportados en este trabajo son contrarios a los indicados por Kokabi y colaboradores (2013) quienes no detectaron actividad antioxidante en los extractos hexánicos de cuatro macroalgas, atribuyendo la actividad antioxidante a la presencia de fenoles en extractos de mayor polaridad. De manera contraria Aili y colaboradores (2011), demostraron una potente actividad antioxidante ($46.831 \pm 0.685\%$) en el extracto hexánico de *Acanthophora spicifera* (Rhodophyta) mencionando que no hay correlación de dicha actividad con el contenido de fenoles totales, es decir, existen otros compuestos como carotenoides, vitaminas, alcaloides, responsables de dicha actividad.

Método de ABTS⁺ y FRAP

Las pruebas de ABTS⁺ y FRAP únicamente se realizaron en el extracto acetónico de *C. racemosa* (Blanquilla) y el extracto metanólico de *T. cylindrica* (Isla Verde), esto debido a que la actividad antioxidante de dichos métodos se determinó posterior a la cuantificación de fenoles totales. Cabe señalar que ambos extractos no son capaces de reducir al radical ABTS⁺ y FRAP.

El radical ABTS⁺ es un radical artificial que puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el de éste (0.68 V) (Carpio, 2014). El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada, fijando tiempos cortos o muy elevados. El FRAP puede ser reducido por productos con

potenciales redox menores a 0.7 V (potencial redox del Fe^{3+} -TPTZ). Debido a que el potencial redox del Fe^{3+} -TPTZ es comparable con el del ABTS^+ se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos aunque las condiciones de reacción sean distintas (Romero de Soto, 2012).

Lo anterior podría explicar porque el extracto acetónico de *C. racemosa* y el extracto metanólico de *T. cylindrica* no presentaron actividad contra ABTS^+ y FRAP, y sí con el radical DPPH, el cual de acuerdo a lo reportado, es un radical débil (Piszcz *et al.*, 2013), cuyo potencial redox es de 0.25 V (Vianna *et al.*, 2012). Por lo cual es probable que los extractos algales utilizados en dichos ensayos (ABTS^+ y FRAP) están por debajo de este potencial, de esta manera sólo se obtuvo actividad antioxidante débil en la prueba de DPPH.

El resultado obtenido de la actividad de FRAP es similar a los datos de Kelman y colaboradores (2012) ya que mencionan que *T. cylindrica* presentó una actividad antioxidante menor a 1 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de extracto, la cual es reportada como nula y es comparada con la macroalga *Turbinaria ornata*, la cual presentó actividad de $10.27 \pm 0.40 \mu\text{M}/\mu\text{g}$ de extracto.

Contrario a lo anterior, Chew y colaboradores (2007), mostraron que *C. racemosa* muestra actividad FRAP (0.737 ± 0.423 mg equivalentes de ácido gálico/g) más alta que la macroalga roja *Kappaphycus alvarezii* (0.561 ± 0.269 mg equivalentes de ácido gálico/g), la cual estaba relacionada con el contenido de fenoles totales. Así mismo, Dotulong y colaboradores (2013) también mencionan que la actividad de FRAP está relacionada con los fenoles totales que poseen las macroalgas *C. sertularioides*, *Laurencia tronoi* y *Padina australis*, las cuales mostraron tener actividad antioxidante.

Tariq y colaboradores (2015), reportaron actividad antioxidante de ABTS^+ en quince macroalgas, entre las que destacan con mayor actividad *Caulerpa taxifolia* (71.32%), *Sargassum variegatum* (86.93%), *Stoechospermum marginatum*

(67.83%) y *Padina pavonica* (53.42%). Así mismo, Demirel y colaboradores (2011) indicaron que existe actividad antioxidante ABTS⁺ en las macroalgas *Laurencia obtusa* ($9.83 \pm 2.3\%$) y *L. obtusa* var. *pyramidata* ($3.8 \pm 0.9\%$), la cual no está relacionada al contenido de fenoles totales ya que *L. obtusa* var. *pyramidata* exhibió mayor cantidad de éstos y presentó menor actividad.

Determinación del contenido de fenoles totales

La determinación de fenoles totales únicamente se realizó en los extractos acetónicos y metanólicos de las macroalgas con mayor porcentaje de reducción del radical DPPH.

La cuantificación de fenoles totales se muestra en las figura 5. Los resultados se muestran como μg de equivalente de ácido gálico/mg de extracto. Los datos se obtuvieron de la interpolación en la curva de ácido gálico.

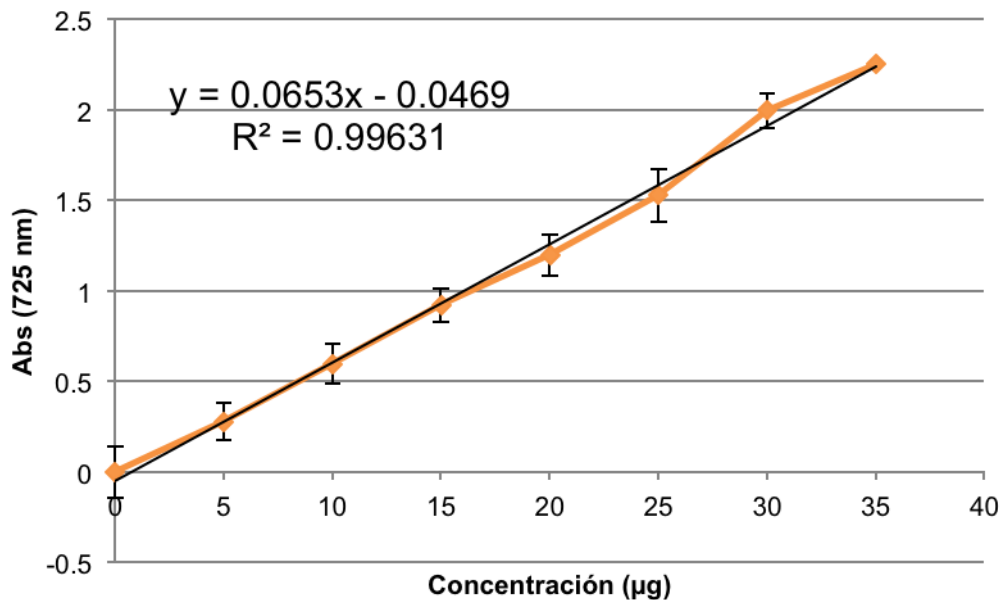


Figura 5. Cuantificación de fenoles totales de los extractos acetónico y metanólico de *C. racemosa* y *T. cylindrica*. Los resultados muestran el promedio de tres repeticiones \pm SD.

Los resultados del contenido total de fenoles se muestran en el cuadro 8. Se puede observar que el extracto acetónico de *C. racemosa* es el que presentó el mayor contenido de fenoles totales (28.61 μg de eq. ácido gálico/mg extracto) seguido del extracto metanólico de *T. cylindrica* (23.70 μg de eq. ácido gálico/mg extracto).

Cuadro 8. Cuantificación de fenoles totales de los extractos acetónico y metanólico de *C. racemosa* y *T. cylindrica*

Arrecife	Especie	Extracto acetónico μg eq. ácido gálico/mg extracto	Extracto metanólico μg eq. ácido gálico/mg extracto
Blanquilla	<i>C. racemosa</i>	28.61 (2.8%)	18.57 (1.8%)
Isla Verde	<i>T. cylindrica</i>	22.31 (2.2%)	23.70 (2.3%)

Los fenoles producidos por las algas son agentes que absorben los rayos UV e inhiben el crecimiento de hongos, bacterias y otras algas. Además, algunas sustancias fenólicas liberadas por las algas parecen ser necesarias para su desarrollo normal y la terminación de sus ciclos de vida (Anaya, 2003), esto podría explicar porque *C. racemosa* presentó mayor contenido fenólico, ya que además de tener una dispersión local mucho más rápida relacionada con la eficiencia de su desarrollo vegetativo y de su reproducción sexual (Ruiz, 2007), esta última es altamente efectiva en verano (Ballesteros, 2008), periodo cercano en el que fueron colectadas las macroalgas de este trabajo.

En un estudio realizado con 6 macroalgas marinas Chaminda y colaboradores (2014) mencionan que el extracto metanólico de *C. racemosa* posee un contenido de fenoles totales de 3.78%, sin embargo, no se relaciona con la actividad antioxidante determinada en su investigación, ya que esta macroalga presentó bajo contenido fenólico en comparación con las otras y su actividad antioxidante fue mejor.

Sarini y colaboradores (2014) reportaron que el mayor contenido de fenoles totales estuvo presente en *C. racemosa* (19.711 mg GAE/L) comparada con las macroalgas *P. gymnospora*, *C. lentillifera*, *S. binderi*, *Turbinaria conoides*, *S. baccularia* y *Eucheuma cottonii*. Por otra parte, Ahmad y colaboradores (2012), también reportaron que *C. racemosa* posee mayor contenido de fenoles totales (47.88 ± 1.18 mg equivalentes de floroglucinol/g muestra seca) a diferencia de 9 especies de macroalgas rojas, las cuales oscilaban entre los 9 y los 21 mg equivalentes de floroglucinol/g muestra seca. Esto puede deberse a que muchas veces no es posible encontrar la misma proporción relativa de sustancias químicas en épocas y lugares diferentes, ya que la síntesis de estos constituyentes es controlada por factores del ecosistema (luz, calor, temperatura, humedad y suelo) (Castañeda *et al.*, 2008b).

Vargas (2011) menciona que las algas verdes y pardas son las que presentan un mayor contenido de fenoles totales, lo cual concuerda con los resultados de este estudio, ya que como se mencionó, *C. racemosa* fue la que mostró la mayor cantidad de fenoles totales a diferencia de *T. cylindrica*, que es una macroalga roja. Según Wangensteen y colaboradores (2004), existe una correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante. Sin embargo, no toda la actividad antioxidante es dependiente del contenido fenólico, ya que puede existir la sinergia con otros compuestos (Vargas, 2011). Esto podría explicar porque no existe una relación entre el extracto acetónico de *C. racemosa* y el contenido de fenoles totales con su actividad antioxidante.

Conclusiones

- 14 macroalgas fueron colectadas, de las cuales se identificaron 11 especies. No se encontraron registros bibliográficos de *Ceramium nitens* en el arrecife de Gallega ni de *Galaxaura conmans* y *Sargassum natans* en Isla Verde; sin embargo sí existe el registro de estas especies para las costas de Veracruz.
- Los extractos metanólicos algales son los que presentaron el mayor porcentaje de rendimiento.
- Los metabolitos secundarios presentes en la mayoría de los extractos algales metanólicos, acetónicos y hexánicos fueron los terpenos y las saponinas.
- Los extractos algales hexánicos son los únicos que presentaron alcaloides.
- El extracto metanólico de *Caulerpa racemosa* presentó el mayor porcentaje de reducción del radical DPPH (38.21%) a una concentración de 500 ppm.
- Cualitativamente los extractos hexánicos presentaron capacidad de reducción del radical DPPH.
- El mayor contenido de fenoles totales se presentó en el extracto acetónico de *C. racemosa* (28.61 µg eq. ácido gálico/mg extracto) y el extracto metanólico de *T. cylindrica* (23.70 µg eq. ácido gálico/mg extracto).
- El extracto acetónico de *C. racemosa* y el extracto metanólico de *T. cylindrica* no mostraron actividad de reducción de los radicales ABTS^{•+} y FRAP.
- La actividad antioxidante no está directamente relacionada al contenido de fenoles totales.

Referencias

- Ahmad F., Rosni S. M., Saimon W., Fook Y. C., Matanjun P. 2012. Proximate compositions and total phenolic contents of selected edible seaweed from Semporna, Sabah, Malaysia. *Borneo Science* 31: 74-83
- Aili Z. N., Ibrahim D., Fariza S. S., Afifah S. N., 2011. Phytochemical Composition and antibacterial potential of hexane extract from Malaysian red algae, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. *World Appl. Sci. J.* 15 (4): 496-501
- Anaya L. A. L. 2003. Ecología química. Ed. Plaza y Valdés. México. 86-87 pp
- Arango A. G. J. 2008. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de Química Farmacéutica. UDEA
- Argüelles M. L., Hernández R. I., Méndez I. D., Méndez H. P. 2011. Evaluación de la capacidad antioxidante de los alimentos preparados y bebidas típicas del Estado de Tlaxcala. *Rev. Med. UV* 11(1): 25-28
- Avila R. M. 2016. Efecto de la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas marinas del Sistema Arrecifal veracruzano. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. México 91 p.
- Aviles, J.M. 1990. Contribución al estudio del género *Caulerpa* Lamoux en México. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México. 121 p.
- Ballesteros E. 2008. La rápida expansión de algas del género *Caulerpa* por el litoral mediterráneo. En: Vila M., Valladares F., Traveset A., Santamaría L., Castro P. Invasiones biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 155-158 pp.

- Batista G. A., Charles M. B., Mancini-Filho J., Vidal N. A. 2009. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas medicinales* 14(2): 1-18
- Brandão, J.A. 1967. Géneros de algas marinas da Costa Atlântica. Latino-Americana. Universidad de São Paulo. Brasil. 353-354 p.
- Carpio J. J. M. 2014. Subproductos de cacao como fuente de compuestos antioxidantes. Tesis de Licenciatura. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. 75 p.
- Carrillo M. L., Castillo L. N., Mauricio R. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información Tecnológica* 22(5): 21-28
- Carvajal R. L., Hata U. Y., Sierra M. N., Rueda N. D. 2009. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana krukoff*). *Colomb. for.* 12: 161-170
- Castañeda C. B., Ramos E. Ll. Ibáñez V. L. 2008a. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horiz. Med.* 8(1): 56-72
- Castañeda B., Castro de la Mata R., Manrique R., Ibáñez L., Fujita L., Barnnet, Mendoza E. 2008b. Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 Plantas con efecto hipoglicemiante. *Horiz. Med.* 8(1): 6-34
- Centeno A. 2008. Ecología de Caulerpales: Fauna y biomarcadores. Tesis de Doctorado. Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados. Universidad Islaes Baleares. 354 p.

- Cemal G. K., Percot A., Ekrem S. 2010. Alkaloids in marine algae. *Mar. Drugs* 8:269-284
- Chaminda L. H. H., Samarakoon K. W., Lee W. W., Lee J. H., Abeytunga D. T. U., Lee H. S., Jeon Y. J. 2014. Anticancer and antioxidant effects of selected Sri Lankan marine algae. *J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka*. 42(4): 315-323
- Chew Y. L., Lim Y. Y., Omar M., Khoo K. S. 2007. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT*. 41: 1067–1072
- CONANP (Comisión de Áreas Naturales Protegidas). 2011. Protocolo de monitoreo No. 17: Monitoreo de peces arrecifales, con énfasis en el pez (*Elacatinus jarocho*) en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano, en el Estado de Veracruz. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México. 5 pp.
- Coy B. C., Parra J., Cuca S. L. 2014. Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Elementos* 4: 31-39
- Dawes, C.J. y Mathieson, A.C. 2008. The seaweeds of Florida. University Press of Florida. USA. 591 p.
- De Rubens-Figueroa J., Jiménez-González M. E., Francisco-Revilla E. N. 2008. Cianosis como manifestación de metahemoglobina. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 46 (4): 439-444
- Demirel Z., Yilmaz-Koz F. F., Karabay-Yavasoglu N. U., Ozdemir G., Sukatar A. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts and the essential oil composition of *Laurencia obtusa* and *Laurencia obtusa* var. *pyramidata*. *Romanian Biotechnological Letters*. 16(1): 5927-5936

- Ding-Quan L., Shui-Chun M., Hai-Yang Z., Xio-Qing Y., Mei-Tang F., Bin W., Li-Hua F., Yue-Wei G. 2013. Racemosins A and B, two novel bisindole alkaloids from the green alga *Caulerpa racemosa*. *Fitoterapia* (91):15-20
- Dotulong V., Widjanarko S., Yuniata, Mamahit L. 2013. Antioxidant activity of three-marine algae methanol extract collected from North Sulawesi Waters, Indonesia. *IJSEI* 2(23): 26-30
- Duarte S. A. y Acero A. 1988. Hábitos alimentarios de los peces del género *Acanthurus* (Perciformes: Acanthuridae) en la región de Santa Marta (Caribe colombiano). *Rev. Biol. Trop.* 36 (2):399-405
- Delgado O. L., Betanzos C. G., Sumaya M. M. T. 2010. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia* (50): 10-15
- Echavarría Z. B., Franco S. A., Martínez M. A. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Revista de la Facultad de Universidad de Antioquía, Medellín. Química Farmacéutica* 16(1): 126-131.
- Fernández P. J. V. 2011. [En línea]. Barrido sistemático de la actividad antioxidante total y el contenido de compuestos fenólicos (flavonoides y fenoles totales) de alimentos vegetales del departamento de La Paz. <<http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/1389/1/T193.pdf>>. [Consultado: 10-11-2014]
- Freile-Pelegrín Y. y Morales J. L. 2004. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. *Botánica Marina* 47: 140–146

- Fuentes S. A., Gallegos M. E., Mandujano M. C. 2014. Demografía de *Caulerpa paspaloides* var. *wudermannii* (Bryopsidales: Caulerpáceae) en la zona costera de Campeche, México. *Rev. Biol. Trop.* 62 (2): 729-741
- Galicia G. C. y Morales G A. 2007. Investigaciones sobre macroalgas realizadas en el Sistema Arrecifal Veracruzano. En: Granados B., A., L.G. Abarca A., J.M. Vargas H. Investigaciones Científicas en el Sistema Arrecifal Veracruzano. Universidad Autónoma de Campeche. México. 141-160 pp.
- García. O. M. A. D. 2011. Evaluación de malezas usadas como forraje en el Estado de Querétaro en cuanto al contenido de fitatos, saponinas y su actividad hemolítica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. 62 p.
- Garrido F. D. y Parada V. R., 2008. Propiedades antioxidantes y funcionales de cinco algas chilenas sobre la calidad de pasta del salmón. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 109 p.
- Granados B., A., L.G. Abarca A., J.M. Vargas H. (eds.). 2007. Investigaciones Científicas en el Sistema Arrecifal Veracruzano. Universidad Autónoma de Campeche. México. 304 pp.
- Gribble G. W. 2005. Halogenuros orgánicos. *Investigación y Ciencia.* 78-84 pp.
- Guilarte B. A. J., Rodríguez R. J. G., Velázquez a. J., Martínez E. 2013. Distribución espacial y temporal de macroalgas bentónicas en la bahía de Boca del Río, Isla de Margarita, Venezuela. *Acta bot. Venez.* 36(2): 239-259
- Guzmán A. P., Villanueva F. S., Botello A. V. 2005. Metales en tres lagunas costeras del Estado de Veracruz. En Botello A. V., Rendon-von Osten J.,

- Gold-Bouchot G., 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. 361-372 pp.
- Hay M. E. y Fenical W. 1988. Marine-plant herbivore interactions: The ecology of chemical defense. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 19: 111-145
- Indu H. y Seenivasan R. 2013. *In vitro* antioxidant activity of selected seaweeds from southeast Coast of India. *Int J Pharm Pharm Sci* 5(2): 474-484
- Jormalainen V. y Honkanen T. 2008. Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring temperate marine communities. En: Amsler C. D. (Ed.). *Algal Chemical Ecology*. 69 pp.
- INE (Instituto Nacional de Ecología). 2007. [En línea]. Parque Marino Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. <<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/2/sav.html>>. [Consultado: 20-07-2014]
- Kelman D., Kromkowski P. E., McDermid K. J., Tabandera N. K., Wright P. R., Wright A. D. 2012. Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Mar. Drugs* 10:403-416
- Kokabi M., Yousefzadi M., Ali ahmadi A., Fegghi M. A., Keshavarz M. 2013. Antioxidant Activity of extracts of selected algae from the Persian Gulf, Iran. *Journal of the Persian Gulf* 4(12): 45-50
- Littler, D.S. y Littler, M.M. 2000. Caribbean Reef Plants. Offshare Graphics. Inc. USA. 594 p.
- López L. M. T. 2001. Saponósidos. *Fitoterapia*. 20(6): 124-128

- López S. R., Negrete R. P., Romero J. J., 2007. Comprobación *in vivo* de la capacidad antibacterial de *Oedogonium capillare* contra *Vibrio fluvialis* en pez dorado *Carassius auratus*. *Red. Vet* 38(4): 439-454.
- Mahendran S. y Saravanan S. 2013. Purification and in vitro antioxidant activity of polysaccharide isolated from green seaweed *Caulerpa racemosa*. *Int J. Pharm Bio Sci* 4(4):1214-1227
- Manrique R. E. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Revista Científica de Ecología y Medio Ambiente*. 1: 1-11
- Mascheck J. A. y Baker B. J. 2008. The chemistry of algal secondary metabolism. En: Amsler C. D. (Ed.). *Algal Chemical Ecology*. 1-24 pp.
- Mateo-Cid L. E., Mendoza-González A. C., Galicia G. C. 1996. Algas marinas de Isla Verde, Veracruz, México. *Acta. Bot. Mex.* 36:59-75
- Mazzeo N. Clemente J. García-Rodríguez F. Gorga J. Kruk C. Larrea D. Meerhoff M. Quintans F. Rodríguez-Gallego L. Scasso F. 2002. Eutrofización: causas, consecuencias y manejo. En: Domínguez A. y R.G. Prieto (eds.). *Perfil Ambiental*. Nordan-Comunidad. Montevideo. 39-55 pp.
- Menendez R., Fernández M. D., García N. 2010. Las algas marinas como fuente de nuevos agentes anti-inflamatorios. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente* (19): 1-10
- Mesa-Vanegas A. M., Gavira C. A., Cardona F., Sáez-Vega J. A., Blair T. S., Rojano B. A. 2010. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Rev Cubana Plant Med* 15(2):13-26

- Morales A. R., Fernández P. M., Menéndez S. R. 2010. Antioxidantes de origen marino. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente* 10(19): 1-7
- Movahedinia A. y Heydari M. 2014. Antioxidant activity and total phenolic content in two alga species from the Persian Gulf in Bushehr Province, Iran. *Int J Biol Sci* 3: 954-958
- Muñoz C. D. S. 2015. *Larrea tridentata* de dos zonas áridas de México: Análisis fitoquímico y evaluación antioxidante. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 75 p.
- Muñoz O. M. 2010. Potencial farmacológico de las algas marinas de Baja California Sur, México. Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. 73 p.
- Nascimento N. Y., Cecília G. E., De Oliveira R. H., Marina P. L. 2013. Partial characterization and evaluation of antioxidant activity from fractionated polysaccharides obtained of brown algae. *Int J Pharm Pharm Sci* 5(3): 815-818.
- Ocampo R. A. 1994. Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica. CATIE. Costa Rica. 24-26 pp.
- Ortega, M. M., Godínez, 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 P. Y., Robledo R. D. Diversidad Vegetal. Algas. 2010. En: Durán R. y Méndez R (Eds.). Biodiversidad y Desarrollo humano en Yucatán. CICY. PPD-FMAM. CONABIO. SEDUMA. 162-164.

- Ortiz V. J. 2011. Composición Nutricional y Funcional de Algas Pardas Chilenas: *Macrocystis pyrifira y Durvillaea antártica*. Monografía. Facultad de Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 26 p.
- Ortuño S. M. F. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. AIYANA. España. 277 p.
- Paiva L. S., Patarra R. F., Neto A. I., Lima E. M., Baptista J. A. 2012. Antioxidant activity of macroalgae from Azores. *Life and Marine Sciences* 29: 1-6.
- Pandithurai M. y Murugesan S. 2014. Free radical scavenging activity of methanolic extract of brown alga *Spatoglossum asperum*. *J. Chem. Pharm. Res.* 6(7):128-132
- Pedroché F.F. y Senties A. G. 2003. Ficología marina mexicana. Diversidad y Problemática actual. *Hidrobiológica* 13(1): 23-32
- Piszcz P., Wozniak M., Asztemborska M., Głód B. K. 2014. Comparative analysis of antioxidative activity of flavonoids using HPLC–ED and photometric assays. *Food Anal. Methods* 7:1474–1480
- Ramos L. E., Castañeda C. B., Ibáñez V. L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev. Acad. Peru Salud* 15(1): 42-46
- RAMSAR. 2004. [En línea]. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar. Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. <<http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/CGMA/DIFUSION/ENPS/RAMSAR/SITIO%20RAMSAR%20SISTEMA%20ARRECIFAL%20VERACRUZANO.PDF>>. [Consultado: 20-07-2014]

- Rivero R. A. y Betancort R. J. 2006. Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. Facultad de Ciencias del Mar. Instituto Tecnológico de Canarias. España. 10 p.
- Robinson N. M., Galicia-García C., Okolodkov Y. 2012. New records of green (Chlorophyta) and Brown algae (Phaeophyceae) for Cabezo reef, National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, Gulf of Mexico. *Acta Bot. Mex.* 101: 11-48
- Román L. Buño S. A., Alcaide M. J. M., Fernández C. P., Oliver S. P. 2011. Mujer de 18 años con metahemoglobinemia tras utilización de crema anestésica tópica. *Rev Lab Clin.* 4(1):45-49
- Romero D. D. A. 2003. Flora marina bentónica del arrecife Gallega: Un análisis de similitud con localidades insulares y costeras del Estado de Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 56 p.
- Romero de Soto M. D. 2012. Estudios de farmacotecnia y desarrollo de formas de dosificación de vegetales deshidratados para su aplicación en pediatría y personas de la tercera edad. Tesis de Doctorado. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Granada. 251 p.
- Ruiz F. J. M., Marín G. L., Ramos S. A. 2007. Expansión reciente del alga tropical invasora *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Caulerpales, Chlorophyta) en la costa mediterránea de la Región de Murcia. Informe anual. España. 16 p.
- Salazar-Vallejo S. I. 2002. Huracanes y biodiversidad costera tropical. *Rev. Biol. Trop.* 50(2): 415-428

- Sanger G., Widjanarko S., Kusnadi J. Berhimpon S. 2013. Antioxidant activity of metanol extract of sea weeds obtained from North Sulawesi. *Food Science and Quality Management* 19: 63-70
- Santizo R. I. M. 2004. Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 74 p.
- Sarini A. W., Nor'Aishah H., Zaini N. M. 2014. Determination of antioxidant activity for seven types of macroalgae *IPCBE*. 65: 51-56
- 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
- Sentíes, G. A. y Dreckmann, M.K. 2002. Monografías Ficológicas. UAM-Iztapalapa. México. 192 p.
- Silva G. M. C., García B. M. J., Silva G. L., Navarro E. J. L., Carrillo P. C. I., Mesa L. V. A., Ochoa G. O., Castilla A. M. C., Perea-Milla L. E., Gómez M. D., Vilches A. A., Desongles C. J., Ponce C. E. A. 2006. Microorganismos implicados en procesos infecciosos. En: Silva G. M. C., García B. M.J., Silva G. L., Navarro E. J. L., Carrillo P. C. I., Mesa L. V. A., Ochoa G. O., Castilla A. M. C., Perea-Milla L. E., Gómez M. D., Vilches A. A., Desongles C. J., Ponce C. E. A. Técnico especialista en laboratorio. Vol. 1. Centros Hospitalarios de Alta Resolución de Andalucía. 511-554 pp.
- Tariq A., Ara J., Sultana V., Ehteshamul-Haque S., Athar M. 2015. Antioxidant potencial of seaweeds occurring at Karachi coast of Pakistan. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 84: 207-212

- Tarrega R. J. 2009. Efecto de la presión de homogeneización sobre la actividad antioxidante del zumo de mandarina (var. Ortanique) Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Valencia. España. 19 p.
- Tovar del Río J. 2013. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Tesis de Licenciatura. Facultad de Tecnología. Universidad tecnológica de Pereira. Colombia. 133 p.
- Universidad Politécnica de Cataluña. 2006. [En línea]. Técnicas ambientales. Parámetros de contaminación. <<http://www.eei.upc.edu/continguts/APUNTS/MASTER/Aguas%20residuales/2%20PARAMETROS%20DE%20CONTAMINACI%C3%93N.pdf>>. [Consultado: 25-01-2015]
- Usquiano L. I. V. 2013. Evaluación de la capacidad antioxidante y determinación de compuestos fenólicos a partir de extractos de frutas de los valles de La Paz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia. 74 p.
- Valdés O., Hernández Y., Fernández M., Hernández I., Rodríguez M., Cano M., Laguna A., Díaz C., Cabrera B. 2008. Actividad antioxidante de algas y plantas marinas de la plataforma insular cubana. *Ciencia Farmacéutica Perú*. 1-6
- Valle V. P. y Lucas F. B. 2000. Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. México. 261 p.
- Vargas B. F. 2011. Evaluación de la actividad antioxidante y fenoles totales en extractos de macroalgas de la bahía de La Paz. B. C. S., México. Tesis de Licenciatura. Departamento Académico de Biología Marina. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 59 p.

Vianna D. R., Bubols G., Meirelles G., Silva B. V., Da Rocha A., Lanznaster M., Monserrat J. M., García S. G., Von Poser G., Eifler-Lima V. L. 2012. Evaluation of the antioxidant capacity of synthesized coumarins. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 7260-7270

Vidal A., Silva de Andrade-Wartha E., De Oliveira e Silva A., Pavan R., Lima A., Fallarero A., Batista A., Mancini-Filho J. 2009. Actividad antioxidante y polifenoles de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. *Ars Pharm.* 50(1): 24-31

Wangensteen H., Berit S. A., Egil M. K. 2004. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem.* 88: 293-297

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

Anexos

Anexo 1

Métodos para estandarizar y evaluar la actividad antioxidante de extractos

a) Reducción del radical DPPH (Método de Murillo, modificado por Argüelles, 2011)

A partir de una solución stock de 10 mg de extractos disueltos en 5 mL de metanol, se preparan diferentes concentraciones (31.2, 62.5, 125, 250, 500 ppm). Cada una de las concentraciones es multiplicada por cuatro y el resultado es la cantidad que se toma de la solución stock para llevar 1 mL con metanol.

En una placa de 96 pozos se adicionan 50 µl de cada concentración más 150 µl de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final será de 250 µM. Como control negativo se colocan 200 µl de metanol y como control positivo se utiliza ácido gálico (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ppm). La placa se incuba en la oscuridad durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 493 nm (Castañeda *et al.*, 2008a). La actividad antioxidante se expresará como porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula (Argüelles *et al.*, 2011):

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

Dónde:

C= Promedio absorbancia del control DPPH.

E= Promedio absorbancia del experimental (Mezcla DPPH+compuesto problema).

Se reporta la CA₅₀ (muestra que disminuye el 50% del radical DPPH) del compuesto antioxidante frente al radical DPPH. La disminución de coloración es expresada como el porcentaje reducción de dicho radical.

b) Reacción con el radical 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin- 6-sulfónato de amonio (ABTS^{·+}) (Método de Re *et al.*, modificado de Tarrega, 2009).

El radical ABTS^{·+} se produce utilizando una mezcla que contiene solución de ABTS (7mM/L) y solución de persulfato de potasio (2.45 mM/L) en agua destilada. La solución de trabajo se prepara mezclando las dos soluciones stock en cantidades iguales y se deja 16 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. La disolución ABTS^{·+} se diluirá mezclando 1 ml de solución ABTS^{·+} con 60 ml de metanol para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 unidades a 734 nm.

Se preparan concentraciones (200, 400, 600, 800, 1000 ppm) del extracto, se toman 300 μ l de la muestra y se hacen reaccionar 2700 μ l de la solución ABTS^{·+} para un volumen final de 3 mL. La mezcla resultante se agita y se deja en la oscuridad por 7 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lee la absorbancia de la mezcla de reacción a 734 nm (se mide el cambio de absorbancia de 734 nm de la solución ABTS^{·+} cuando alcanza el estado estacionario). El ácido gálico se usa como estándar de referencia (Fernández, 2011). El porcentaje de reducción del radical ABTS^{·+} se calcula con la fórmula (Tarrega, 2009):

$$\% \text{ reducción} = \frac{A_c - A_m}{A_c} \times 100$$

Dónde:

A_c= Promedio absorbancia control.

A_m= Promedio absorbancia muestra.

Se reporta la CA₅₀ del compuesto antioxidante frente al radical ABTS^{·+}. La disminución de la coloración es expresada como el porcentaje de reducción de ABTS^{·+}, la cual es comparada con una curva estándar del antioxidante de referencia. Los resultados se expresan como μ g equivalente de ácido gálico/mg extracto (Fernández, 2011).

c) Poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP) (por sus siglas en inglés: ferric reducing antioxidant power) (Método de Benzie y Strain, modificado por Fernández, 2011).

En este ensayo se preparan las siguientes soluciones:

- a) 300 mM de amortiguador de acetato pH 3.6 (acetato de sodio trihidratado/ácido acético glacial).
- b) 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridol-s-triazina) en 40 mM de HCl.
- c) 20 mM FeCl₃.

Procedimiento:

Las soluciones descritas se mezclan en una relación 10:1:1 (v/v/v) para obtener la mezcla de reactivos FRAP, la cual debe mantenerse a una temperatura de 37°C.

Se preparan concentraciones (200, 400, 600, 800, 1000 ppm) del extracto y se mezclan 284 µL de la muestra más 2714 µL del reactivo FRAP para obtener un volumen final de 3 mL. Se incuba en la oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lee a una absorbancia de 593 nm. La absorbancia final de las muestras se comparará con la de una curva estándar de ácido gálico (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ppm). Los resultados se expresarán como µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto (Fernández, 2011).

Anexo 2

Método de Folín-Ciucaltea (Fernández, 2011)

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico, a partir de una solución stock de 10 mg de ácido gálico más 700 µl de agua destilada y 300 µl de metanol. Se toman las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ppm) y tener un volumen final de 1 mL de cada una.

Se preparan soluciones stock del extracto (5 y 10 mg de extracto en 1 mL de agua destilada más 1 mL de metanol) y se colocan 100 µl de cada muestra en tubos de ensayo más 900 µL de agua destilada para un volumen final de 1 mL.

Se transfiere cada concentración (ácido gálico y muestra) en tubos y posteriormente se adicionan 500 µl del reactivo Folín-Ciucalteu a cada tubo. Después de 5 minutos de incubación se añaden 1.5 ml de una solución de Na₂CO₃ (200 g/l) hasta completar un volumen de 3 mL. Los tubos se incuban durante una hora a temperatura ambiente.

Después del tiempo de reacción, se determina la absorbancia a 725 nm y se grafica la concentración contra la absorbancia. Para obtener la curva patrón de ácido gálico se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de las muestras a evaluar. Los resultados se expresarán como mg equivalentes de ácido gálico/ gramo de extracto (Fernández, 2011).